



HAL
open science

Déterminisme des blooms d'Haslea en environnement naturel: dynamique et impacts

Julie Séveno

► **To cite this version:**

Julie Séveno. Déterminisme des blooms d'Haslea en environnement naturel: dynamique et impacts. Biologie végétale. Le Mans Université, 2022. Français. NNT : 2022LEMA1020 . tel-04001859

HAL Id: tel-04001859

<https://theses.hal.science/tel-04001859>

Submitted on 23 Feb 2023

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

LE MANS UNIVERSITE

ECOLE DOCTORALE N° 598

Sciences de la Mer et du littoral

Spécialités : Biologie et Écologie Marine

Par

Julie SÉVENO

Déterminisme des blooms d'*Haslea* en environnement naturel

Dynamique et Impacts

Thèse présentée et soutenue au Mans le 16 Novembre 2022

Unité de recherche : **Biologie des Organismes, Stress, Santé, Environnement (BIOSSE)**

UFR Sciences et Techniques

Thèse N° : 2022LEMA1020

Rapporteurs avant soutenance :

Pascal CLAQUIN, Professeur,
Université Caen Normandie

Sébastien LEFEBVRE, Professeur,
Université de Lille

Sous la direction de :

Directeur de thèse
Jean-Luc MOUGET, Professeur,
Le Mans Université

Co-encadrants

Vincent LEIGNEL, Maître de conférences, HDR,
Le Mans Université

Myriam BADAWI, Maître de conférences,
Le Mans Université

Composition du Jury :

Hélène HEGARET, Directrice de recherche CNRS
LEMAR, IUEM

Johann LAVAUD, Chargé de recherche CNRS, HDR
LEMAR, IUEM

Vona MEDELER, Maître de conférence, HDR
Nantes Université

Invité

Damien Sirjacobs, Assistant Professeur
Université de Liège

« Que veux-tu, elle a mis dans son idée »

REMERCIEMENTS

Un grand Merci aux rapporteurs Pascal Claquin et Sébastien Lefebvre et aux membres du jury Hélène Hégaret, Vona Meleder et Johann Lavaud qui ont accepté d'examiner ce travail de thèse.

Merci à mes encadrants de m'avoir permis de faire cette thèse, un grand merci à Jean-Luc pour ta disponibilité, tes conseils qui ont fait évoluer et poussé ce sujet. Merci d'avoir su m'orienter vers les bonnes personnes qui ont permis toutes ces belles interactions scientifiques autour des *Haslea*. Merci Vincent pour ton aide pour la partie moléculaire et pour les relectures du manuscrit. Merci à Myriam d'avoir fait partie de l'encadrement de cette thèse.

Merci aux membres de mon comité de thèse Catherine Leblanc et Annick Wilmotte qui m'ont apporté de nombreux conseils et qui sont restées disponibles, ce fut un plaisir d'échanger avec vous.

Merci aux membres du pôle doctoral pour les réponses aux différentes questions administratives surtout en cette fin de thèse. Un grand merci à l'équipe du pôle culture scientifique Ingrid, Marion et Simon c'était vraiment super de pouvoir faire ma mission complémentaire avec vous et participer à l'organisation de la Nuit des chercheurs.

Cette thèse a été financée par une demi-bourse régionale et ministérielle. Ce projet a également bénéficié de financements du programme de recherche et d'innovation Horizon 2020 de l'Union européenne au titre de la convention de subvention n° 734708 / GHANA / H2020-MSCA-RISE-2016.

Un grand merci à Emmanuelle pour le management du projet et qui a organisé les différents meetings liés au projet, toujours dans la bonne humeur, ce furent des moments très enrichissants. Nous n'avons pas loupé une opportunité de faire de la bioprospection sur les différents bords de mer! Merci aux membres GHANA Fiddy, Winwin, Yusuf, Ikha, Ella,... rencontrés pour des discussions enrichissantes et pour votre bonne humeur rafraîchissante !

Merci aux collègues du MMS/BIOSSE pour les discussions scientifiques et les cafés. Merci particulièrement à Yolène, Brigitte et Marie pour le support technique et vos nombreuses indications. Merci beaucoup à Justine, Aurore, Nathalie, Françoise, Benoit, ... pour votre aide au labo ou pour vos conseils donnés dans les périodes d'hésitations. Un immense merci à Valérie pour toute ton aide administrative notamment pour les différents déplacements. Profite bien de ta retraite et du bord de mer ! Merci à Sandrine et Christelle qui ont pris le relais ces derniers mois.

Merci à la team jeunes chercheurs et ceux qui sont déjà docteurs, qui ont pu me donner de très bonnes indications sur comment survivre à la thèse et sur les secrets d'agencements du labo Charlotte, Matteo, Orlane, Mariem. Merci également aux occupants du bureau 332/bureau des

plaintes/bureau incontournable en cas d'hypoglycémie (vive les brookies !) ce fut super de partager le bureau avec vous Aurélie, Gurvan, Romuald (c'était plus ta salle de pause que ton bureau), Maxime, Amel, Marwa, Adam, Adeline, Mickael, Nellie, Amina, Samir, Perla, Fiddy, ... et aux stagiaires de passage qui ont su amener un renouveau d'énergie positive au labo

Merci à Krystal, Capucine et Edouard que j'ai eu la chance d'encadrer, j'ai sûrement appris tout autant que vous pendant ces périodes.

Merci à la team des doctorants du Mans et spécialement les membres de l'ADoUM Valentine, Théo, Audrey et Martin pour ces moments *d'échanges interdisciplinaires* et de détente. Merci à Jean le délégué des doctorants pour les conseils de fin de thèse. Bon courage à vous pour la fin !!

Un grand merci à Damien pour tout ce que tu as pu m'apprendre sur le terrain et les algues (micro et macro). Le rythme était soutenu mais heureusement il y avait du chocolat belge !

Un **immense** merci à toutes les personnes de STARESO pour l'accueil lors des missions terrains et mille mercis de m'avoir proposé de rédiger dans les meilleures conditions !! Merci pour la logistique, l'aide pour les plongées, les discussions scientifiques, les sorties snorkeling de jour/de nuit et tous ces moments off incroyables ! Merci à Pierre Lejeune et Sylvie Gobert (vive les boulettes) qui veillent sur cette grande famille starésienne. Merci Michel pour ta belle philosophie professionnelle qui réunit travail de grande qualité avec bienveillance et bonne humeur. Merci Lovina, Quentin, Nine, Dimitri, Justine, Séb, Nils, Marion, Aubin, Arnaud, Lucie, Annick, Hervé, Cyril, Michèle, Sylvain, Géraldine (même le chalet ne t'aura pas résisté !) et les personnes de passage pour ces discussions riches sur la vie marine et pas que ... J'espère qu'on pourra de nouveau travailler ensemble ;)

Dziękuję ci bardzo Pr Andrzej for everything that you taught me about diatoms it was a real honor to learn with you. Merci beaucoup Romain pour tes conseils tout au long de ma thèse et ton aide sur les analyses génétiques, la rédaction. On va réussir à le finir cet article *Dziękuję Ci* to the geoscience lab in Szczecin especially Eva, Marta, Elif (Şerefe!), Alexandra and Adrian you always had good advices on work for diatom preparation and good advices about what to do after work, *Do zobaczenia!*

Puno hvala Ana for your welcome in Dubrovnik, it was such a pleasure to meet you and work with you, I learnt so much about diatoms. I have been so lucky to be able to sample there in between the covid restrictions. Hope we can collaborate again. The trip to Hvar and Mljet were so amazing and a great success thanks to you and Zoran for the organization. *Hvala* to Iris for chemistry analysis.

Je suis immensément reconnaissante du soutien que m'a apporté ma famille et mes amis pendant ces presque quatre ans, qui m'ont aidé plus qu'ils ne le pensent.

Un grand merci à ma famille Séveno-Labousse *Trugarez*, pour tous ces moments passés ensemble. Particulièrement merci à mes parents pour leur soutien, leurs conseils, de m'avoir laissé l'opportunité de faire ce dont j'avais envie. Merci Arti d'être un super fréro, si inspirant et déterminé. Merci Tata Isa pour tes conseils et montrer qu'il n'est jamais trop tard pour faire ce que l'on a envie de faire.

Merci à mes amis pour tous ces bons moments. Les copines de Marpirécité qui sont là depuis le début (ou presque) Nono, Manue, Gilou et Agathe A nos débuts de réalisatrices mais c'est sûrement mieux qu'on ait choisi d'autres carrières par la suite ! Marie (de la médecine au SIG il n'y a qu'un pas), Maéva et Mathilde et Nono (encore) à nos 10 ans du Bac ! Il s'en est passé des choses depuis, je suis si fière de vous

Et les copines d'après le bac Angèle, Marion, Léa, Sandrine, Marie, Lise², Laurette, ... pour tous ces souvenirs ensemble pourvu qu'on en refasse d'aussi drôles !

Les Océanauts, from Luminy to world-wide, de + 2000 m à - 45 m, on peut vraiment compter les uns sur les autres en toutes circonstances ! Merci pour votre soutien, vos conseils, les skypes et tous ces moments de rigolades pourvu que ça continue !

En parlant de Luminy, merci à la meilleure des marseillaise Gaby, savoir qu'on va faire ce voyage m'a redonné tellement de motivation pour ces derniers mois !

Merci à Noémie et Pablo c'était top d'être en coloc avec vous (et Shanky, Ada et Tita), rentrer à la maison cuisiner parler de tout : de plantes (~~volées~~ bouturées), de couture, de cirque, de poésie, de voyages.

Et merci aux diatomées, si souvent oubliées, qui produisent pourtant tant d'oxygène !!

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	III
SOMMAIRE	VII
LISTE DES PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES	X
LISTE DES DIFFUSIONS ET MÉDIATIONS SCIENTIFIQUES	XII
Introduction générale.....	3
Partie 1 : Généralités sur les diatomées	4
1. Origine évolutive des diatomées.....	4
2. Écologie et cycles biogéochimiques	6
3. Morphologie et Classification.....	9
3.1 Structure cellulaire	9
3.2 Diversité et classification	9
3.3 Diatomées et notion d'espèces	11
4. Cycle de vie et Reproduction.....	12
5. Utilisations et Valorisations.....	14
6. Diatomées benthiques	16
7. Interactions biotiques avec les diatomées	18
7.1 Interactions entre diatomées – Allélopathie.....	18
7.2 Interactions diatomées - bactéries.....	19
Partie 2 : Le genre <i>Haslea</i>	22
1. Contexte historique.....	22
2. Caractéristiques du genre	23
2.1 Écologie.....	25
2.2 Morphologie	25
2.3 Production de pigments	26
2.4 Reproduction	26
3. Les <i>Haslea</i> bleues	27
3.1 L'espèce type <i>H. ostrearia</i>	27
3.2 La marennine.....	28
3.3 Diversité des <i>Haslea</i> bleues.....	29
Partie C : Contexte du sujet de thèse	31
Méthodes d'analyses.....	33
1. Zones d'études et Échantillonnage	34
1.1 Mer de Ligurie – Baie de Calvi	34
1.2 Mer de Ligurie – Autres	37
1.3 Mer Adriatique – Côtes Croates	38
2. Paramètres environnementaux.....	38
2.1 Mer de Ligurie – Baie de Calvi	38
2.2 Mer Adriatique – Côtes Croates	39
3. Substrats étudiés.....	40
3.1 Turf	40
3.2 <i>Padina</i> spp.	40
4. Culture cellulaire	41
4.1 Isolement et maintien des cultures.....	41
4.2 Processus d'axénisation.....	42

5.	Identification taxonomique	42
5.1	Identification moléculaire des souches d' <i>Haslea</i>	42
5.2	Identification morphologique des diatomées	43
5.3	Identification moléculaire des communautés bactériennes	43
6.	Analyses des données et Statistiques	44
6.1	Cartographie	44
6.2	Bio-informatique.....	44
6.3	Statistiques	45
Chapitre 1 Diversité des <i>Haslea</i>		47
1.	Contexte	48
2.	Abstract	49
3.	Introduction.....	50
4.	Methods	51
4.1	Sampling and culturing.....	51
4.2	Microscopy	52
4.3	Next Generation Sequencing.....	52
4.4	Phylogeny	52
5.	Results	53
5.1	Morphology and taxonomy descriptions	53
5.2	Differential diagnosis	57
5.3	Phylogeny	60
5.4	Analysis of chloroplastic genomes.....	60
6.	Discussion	62
7.	Conclusion	64
Chapitre 2 Dynamique et environnement des bloom d' <i>Haslea</i>		65
Partie 1 : Dynamique des blooms d'<i>Haslea</i>		66
1.	Contexte	66
2.	Abstract	68
3.	Introduction.....	69
4.	Methods	70
4.1	Study sites.....	70
4.2	Environmental parameters.....	72
4.3	Algal culture and DNA identification	72
4.4	Data analysis	73
5.	Results	73
5.1	Corsica	73
5.2	Croatia	75
5.3	Global blooms observations	76
5.4	Species of blue <i>Haslea</i> responsible for the blooms.....	79
5.5	Environmental parameters.....	80
6.	Discussion	83
7.	Conclusion	86
8.	Supplementary materials	87
Partie 2 : Lien entre état écologique, substrats et blooms d'<i>Haslea</i>		89
1.	Contexte et introduction	89
2.	Méthodes	90
3.	Résultats et discussion	90
3.1	Mesure de l'indice	90
3.2	Lien entre CARLIT et <i>Haslea</i>	92
4.	Conclusion	92

Chapitre 3 Impact des blooms d' <i>Haslea</i>	93
1. Contexte	94
2. Abstract	96
3. Introduction.....	97
4. Methods	98
4.1 Study sites and sampling	98
4.2 Diatom process	99
4.3 Bacterial DNA extraction, PCR amplification and Data processing	100
4.4 Statistical analysis	100
5. Results	101
5.1 Diatoms.....	101
5.2 Bacteria.....	104
6. Discussion	106
6.1 Diatom community associated with the biofilm	106
6.2 Bacteria associated with the biofilm	107
7. Conclusion	109
8. Supplementary materials	111
9. Diatoms Plates.....	113
 Conclusion générale	 141
1. Résumé et contextualisation	142
2. Comparaison avec des blooms de diatomées	143
3. Perspectives.....	144
3.1 Températures et adaptation des espèces au sein du biofilm	144
3.2 Perspectives de terrain	145
3.3 Limites expérimentales.....	146
4. Directions à prendre.....	146
4.1 Identification du pigment	146
4.2 Médiation scientifique.....	147
 Références bibliographiques	 149
 Annexe 1 : Protocole d'extraction des ADN totaux au CTAB	 172

LISTE DES PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES

- **Articles scientifiques**

Gastineau R, Hansen G, Poulin M, Lemieux C, Turmel M, Bardeau J-F, Leignel V, Hardivillier Y, Morançais M, Fleurence J, Gaudin P, Méléder V, Cox EJ, Davidovich NA, Davidovich OI, Witkowski A, Kaczmarek I, Ehrman JM, Soler Onís E, Quintana AM, Mucko M, Mordret S, Sarno D, Jacquette B, Falaise C, Séveno J, Lindquist NL, Kemp PS Jr., Eker-Develi E, Konucu M, Mouget J-L. *Haslea silbo*, A Novel Cosmopolitan Species of Blue Diatoms. *Biology*. 2021; 10(4):328.

<https://doi.org/10.3390/biology10040328>

Gabed N, Verret F, Peticca A, Kryvoruchko I, Gastineau R, Bosson O, Séveno J, Davidovich O, Davidovich N, Witkowski A, Kristoffersen JB, Benali A, Ioannou E, Koutsaviti A, Roussis V, Gâteau H, Phimmaha S, Leignel V, Badawi M, Khair F, Francezon N, Fodil M, Pasetto P, Mouget J-L. What Was Old Is New Again: The Pennate Diatom *Haslea ostrearia* (Gaillon) Simonsen in the Multi-Omic Age. *Marine Drugs*. 2022; 20(4):234. <https://doi.org/10.3390/md20040234>

L. Fullgrabe, Q. Fontaine, M. Marengo, A. Donnay, D. Sirjacobs, L. Iborra, S. Cnudde, N. Mellet, J. Séveno, A. Boulenger, L. Lefebvre, M. Binard, M. Leduc, L. Katz, A. Abadie, P. Boissery, S. Gobert, P. Lejeune (2022) : STARECAPMED (STAtion of Reference and rEsearch on Change of local and global Anthropogenic Pressures on Mediterranean Ecosystems Drifts) – Année 2021. Rapport de recherches, STARESO, 123 pages.

- **Communications Écrites (Posters)**

J. Séveno, D. Sirjacobs, P. Lejeune, D. Baurain, S. Gobert, M. Badawi, V. Leignel, J-L. Mouget, Blue *Haslea* blooms in natural environment - First investigations in Revellata bay, Corsica, France. 7th European Phycological Congress, 25th - 30th August 2019, Zagreb Croatia.

- **Communications Orales**

J. Séveno, A. Car, D. Sirjacobs, A. Witkowski, R. Gastineau, D. Baurain, S. Gobert, P. Lejeune, M. Badawi, V. Leignel, J-L. Mouget, Comparison of epiphytic diatom communities on turf and *Padina* sp. during blue *Haslea* blooms in the Ligurian Sea and the Adriatic Sea. International Society of Applied Phycology (ISAP), 7th July 2021, online.

J. Séveno, A. Kryk, R. Gastineau, A. Witkowski, A. Car, I. Dupčić Radić, D. Sirjacobs, I. Safitri, A. Sapar, Y. Risjani, Yuniarta, F. Prasetya, P. Lejeune, M. Badawi, V. Leignel, J-L. Mouget, Across seas and blooms: a study of diatom epiphytic communities of *Padina* sp. Marine Geology and Marginal Seas – Past and Future, 14th – 17th December 2021, online.

J. Séveno, D. Sirjacobs, A. Witkowski, R. Gastineau, A. Car, P. Lejeune, M. Badawi, V. Leignel, J-L. Mouget, What about *Haslea* spp. in environment? GHANA (The Genus *Haslea*, New marine resources for blue biotechnology and Aquaculture) H2020 final meeting 20th May 2022, Szczecin, Poland.

LISTE DES DIFFUSIONS ET MÉDIATIONS SCIENTIFIQUES

- **Communications Écrites**

SÉVENO Julie, LAMARE Véronique in : DORIS, 01/06/2022 : *Haslea provincialis* Gastineau, Hansen & Mouget, <https://doris.ffessm.fr/ref/specie/5596>

SEVENO Julie, LAMARE Véronique in : DORIS, 01/06/2022 : *Haslea ostrearia* (Gaillon) Simonsen, <https://doris.ffessm.fr/ref/specie/5595>

- **Communications Orales**

J. Séveno, Un bloom d'*Haslea* : une explosion de bleue. MT 180s (Ma thèse en 180 secondes), 8 Mars 2021, Le Mans.

AVANT-PROPOS

Ce manuscrit de thèse résume les presque quatre années de recherche effectuées sur les blooms d'*Haslea* spp. en environnements ouverts. Ces recherches ont été menées au laboratoire BIOSSE du Mans et en collaboration avec la station de biologie marine et bureau d'études STARESO à Calvi, l'université de Liège en Belgique, l'université de Szczecin en Pologne et l'université de Dubrovnik en Croatie. Ces collaborations ont été possibles grâce au programme européen GHANA (*The Genus Haslea, New marine resources for blue biotechnology and Aquaculture*, H2020-MSCA-RISE-2016) porté par le Pr Jean-Luc Mouget.

Ce manuscrit de thèse est organisé de la manière suivante : une introduction générale faisant un état de l'art sur les diatomées et le genre *Haslea*, les méthodes employées, les chapitres contenant les résultats et une conclusion globale.

Les chapitres sont présentés de la façon suivante : une partie présentant le contexte de l'étude, l'étude rédigée sous forme d'article scientifique puis des perspectives sont proposées. Les articles ont été rédigés en anglais et les autres parties en français.

This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation program, under grant agreement No 734708 /GHANA / H2020-MSCA-RISE-2016

Diatom Glossary:

Apex: extremity of the diatom

Girdle bands (*copulae*): interlayering siliceous bands connecting the epivalve and hypovalve

Girdle view: side view of the cell, girdle bands visible, opposite of the valvar view

Helictoglossa: visible in internal view, elongated, tongue-like raised thickening of the raphe at the apical ends

Longitudinal striae: are parallel to the raphe, reaching both apex and are perpendicular to the transversal striae

Pseudo-stauros: thickening of the central transversal striae

Introduction générale

Partie 1 : Généralités sur les diatomées

“Few objects are more beautiful than the minute siliceous cases of the Diatomophyceae: were these created that they might be examined and admired under the higher powers of the microscope?”

(Darwin, 1872)

Le phylum des diatomées ou *Bacillariophyta* fait partie de l’embranchement *Ochrophyta*, autrement appelé algues brunes. Cette appellation est liée à la production de pigments bruns tels que la fucoxanthine qui masque les pigments chlorophylliens (Round *et al.*, 1990). Une de leurs caractéristiques principales est que la cellule est encapsulée dans une “coque” en silice, le frustule.

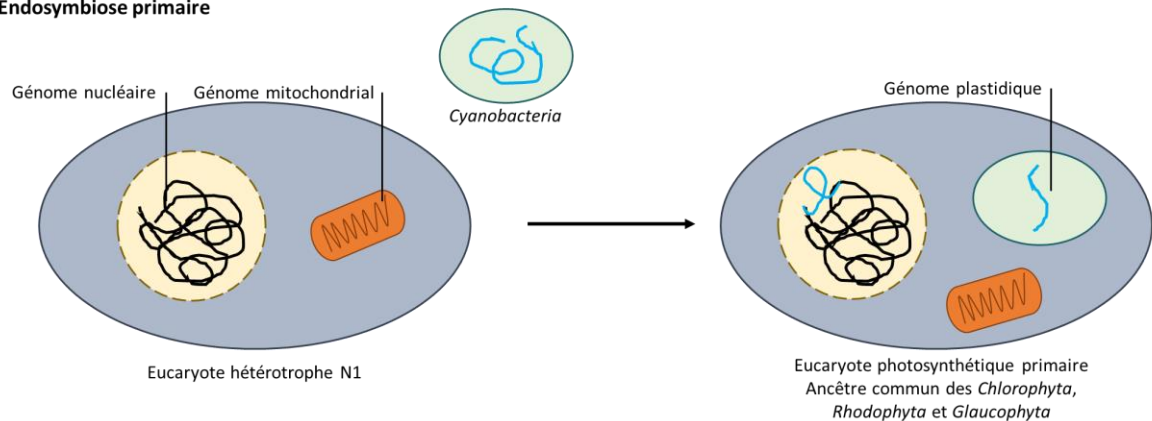
1. Origine évolutive des diatomées

Les macro- et micro-algues forment un groupe diversifié, polyphylétique défini comme des organismes photosynthétiques sans tissu différencié. La photosynthèse chez les organismes eucaryotes a été acquise il y a 1,5 milliard d’années (Ma) suite à une l’endosymbiose d’une cyanobactérie par un eucaryote hétérotrophe (Figure 0-1a) (Armbrust, 2009; Gould *et al.*, 2008). Cette cellule est l’ancêtre commun *Chlorophyta*, *Glaucophyta* et *Rhodophyta*. Environ 500 millions d’années (Mo) après, l’infra-règne des Straménopiles (aussi appelé *Heterokonta*, précurseurs des *Ochrophyta*) a émergé d’une seconde endosymbiose de cet organisme photosynthétique primaire par un eucaryote hétérotrophe (Figure 0-1b) (Cavalier-Smith, 1999, 1982; Cavalier-Smith *et al.*, 1995). Au cours de cette seconde endosymbiose, le chloroplaste s’est retrouvé entouré de quatre membranes (McFadden, 2001). Les diatomées sont issues du groupe des Straménopiles qui ont des niches écologiques et des métabolismes très diversifiés (autotrophes et hétérotrophes).

Les diatomées descendent d’un ancêtre commun unicellulaire sans exosquelette. Les frustules les plus anciens de diatomées découverts datent du Jurassique (-190 Ma) (Rothpletz, 1900, 1896; Sims *et al.*, 2006). Suite à l’émergence du groupe des diatomées raphides pennées, un pic de diversité aurait eu lieu il y a 30 Mo (Oligocène) (Rabosky and Sorhannus, 2009).

Au cours de leur évolution, des transferts horizontaux de gènes ont également eu lieu entre bactéries et diatomées. Un nombre important de gènes d’origine bactérienne est retrouvé dans les génomes de diatomées. Par exemple, jusqu’à 5 % dans le génome de *Phaeodactylum tricornutum* (Bowler *et al.*, 2008). Ces gènes partagés sont principalement impliqués dans des voies métaboliques (cycle du carbone, azote et urée) (Kroth *et al.*, 2008).

a) Endosymbiose primaire



b) Endosymbiose secondaire

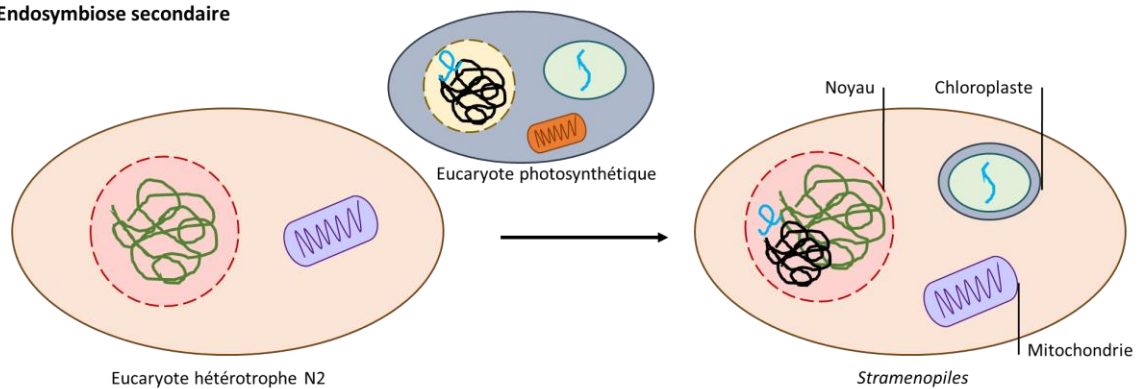


Figure 0-1 : Histoire évolutive des endosymbioses a) primaire et b) secondaire, aboutissant aux diatomées (adaptée de Armbrust, 2009; Parker et al., 2008)

En plus de leur génome nucléaire, les diatomées possèdent généralement des génomes d'organelles : mitogénome et plastome. Ce dernier étant absent chez les diatomées non-photosynthétiques (Kamikawa *et al.*, 2018).

- **Génome mitochondrial ou mitogénome**

Il est sous forme d'un chromosome circulaire simple. Le contenu codant du mitogénome est similaire à celui des algues brunes et comprend des gènes codant pour des protéines essentielles de la chaîne respiratoire ainsi que des protéines associées aux différentes sous-unités du ribosome ; pour un total compris entre 33 et 35 gènes. De plus, le mitogénome code pour des ARNt et ARNr (Crowell *et al.*, 2019; Secq *et al.*, 2006). En plus des parties bien conservées, des parties du mitogénome varient entre les différents ordres, genres et espèces de diatomées. L'emplacement des gènes mitochondriaux peuvent changer entre les différentes espèces de diatomées. La présence d'introns ou de pseudo-gènes ainsi que de longues parties non-codantes a également été mise en évidence (Gastineau *et al.*, 2022; Secq et Green, 2011).

- **Génome chloroplastique ou plastome**

De structure circulaire, le génome chloroplastique code pour 134 à 180 protéines, des ARNt et ARNr (Yu *et al.*, 2018). Le génome chloroplastique des diatomées est proche de celui des rhodophytes et chlorophytes, issu de la seconde endosymbiose. Cependant le contenu codant est moins important chez les diatomées et a donc dû subir des réductions au cours de l'évolution (Muñoz-Gómez *et al.*, 2017). Les mécanismes évolutifs qui ont conduit à cette perte importante de gènes chloroplastiques restent cependant à expliquer. Certains de ces gènes pourraient avoir été transférés dans le génome nucléaire (Dorrell *et al.*, 2022). Des différences dans le contenu et le nombre de gènes au sein du chloroplaste ont été observées, mais avec une sous-représentation dans les études des espèces raphides (Yu *et al.*, 2018). Parmi ces dernières, les *Naviculaceae* ont particulièrement été peu étudiées.

Le génome total des diatomées peut être vu comme une mosaïque regroupant des parties de génomes issus des chlorophytes, rhodophytes et de procaryotes acquis lors des précédentes endosymbioses et transferts de gènes. Cette mixité et plasticité génétique acquises au cours de leur évolution a permis aux diatomées de développer de nouveaux gènes et fonctions métaboliques. Ce qui en fait un groupe très diversifié avec des voies métaboliques singulières (*e.g.* : assimilation d'azote à partir d'urée). Cette grande diversité leur a permis de coloniser tous les milieux aquatiques. De plus, elles sont devenues des éléments clés des réseaux trophiques aquatiques, étant à l'interface entre les cycles géochimiques et les producteurs secondaires.

2. Écologie et cycles biogéochimiques

Les diatomées peuplent tous les milieux aquatiques des zones tropicales à polaires, présentant suffisamment de lumière et de nutriments. Elles représentent la partie la plus importante du phytoplancton dans les zones côtières propices aux upwellings et à la formation de glace de mer (Morel et Price, 2003). Afin d'optimiser leur métabolisme, les diatomées accomplissent des migrations nyctémérales en variant leur flottabilité, alternant entre la couche de surface lumineuse le jour pour réaliser la photosynthèse et les couches inférieures plus riches en nutriments qu'elles stockent la nuit (Villareal *et al.*, 1999). Elles sont ainsi présentes dans toute la zone photique des océans, jusqu'à 200 m de profondeur. Constituant pourtant un faible pourcentage de la biomasse marine, les diatomées réalisent jusqu'à un cinquième de la photosynthèse sur Terre et 40 % de la production primaire totale océanique (Nelson *et al.*, 1995a). De par ces différentes caractéristiques, les diatomées jouent un rôle majeur dans les cycles biogéochimiques des océans.

Ces microalgues sont à la base des chaînes trophiques, via la photosynthèse. Elles vont fixer le carbone minéral en molécules organiques plus complexes (carbohydrates et lipides) qui seront ensuite utilisées par le zooplancton et d'autres hétérotrophes. Quand les diatomées meurent, elles sombrent rapidement dû à leur frustule, séquestrant ainsi du carbone organique dans l'océan profond (Prentice *et al.*, 2001). Ces agrégats microscopiques qui échappent aux consommateurs secondaires sont aussi appelés "neige marine". Cette exportation verticale du carbone est une partie de ce qu'on appelle " la pompe biologique des océans" (Sarhou *et al.*, 2005; Thornton, 2002; Volk et Hoffert, 1985). Ce carbone organique sera une source d'énergie pour les espèces habitant les zones pélagiques disphotiques où il pourra être reminéralisé par des bactéries hétérotrophes (Cho et Azam, 1990). Une fraction de ce carbone va échapper à ces différents prédateurs et sera séquestrée dans les sédiments profonds. Ce long processus participe ainsi à la réduction du carbone atmosphérique.

En raison de leur frustule en silice (SiO_2), les diatomées ont un rôle majeur dans le cycle du silicium (second atome le plus abondant dans la croûte terrestre après l'oxygène). Ce sont les premiers producteurs de silice biogénique des océans (Nelson *et al.*, 1995a). Lors de leur apparition et de leur diversification les diatomées, en devenant les principaux organismes siliceux, ont engendré une diminution de 70 % du silicium disponible (Siever, 1992). En entrant dans l'océan, un atome de silicium sera incorporé en moyenne 39 fois au frustule d'une diatomée avant de sédimenter dans les fonds océaniques (Tréguer *et al.*, 1995). Contrairement au cycle du carbone, le cycle du silicium est moins influencé par les pressions anthropiques. Les apports en silice dans l'océan se font par les rivières, le vent ainsi que les sources hydrothermales et sont liés à l'érosion progressive de la croûte terrestre (Tréguer et De La Rocha, 2013).

L'azote est également un élément primordial pour tous les êtres vivants car il est à la base des acides-aminés et protéines. Les rivières et les eaux côtières subissent des apports grandissant en nitrates à cause de la fertilisation intensive des sols. Cette eutrophisation impacte grandement les communautés algales (*e.g.* : Menesguen *et al.*, 2001). Les diatomées sont capables d'assimiler l'azote sous forme inorganique (NO_2 , NO_3 et NH_4^+) et organique (urée) (Rees et Syrett, 1979). En milieu oligotrophe, les cyanobactéries associées aux diatomées planctonique peuvent leur permettre de fixer l'azote sous forme gazeuse (N_2) (Foster et Zehr, 2006). Il a également été montré qu'en l'absence de lumière et en conditions anoxiques, des diatomées peuvent survivre en respirant des nitrates (Kamp *et al.*, 2011). Les diatomées sont donc responsables d'une part importante de la fixation d'azote inorganique.

Les diatomées ont également un rôle majeur dans les cycles du phosphate et du fer qui sont des éléments nutritifs essentiels aux organismes photosynthétiques (Buessler, 1998).

Diatomées et changements globaux : En absorbant l'excès de carbone relâché dans l'atmosphère, engendré par les activités humaines, l'océan agit comme un tampon. Cette absorption croissante de carbone résulte en une acidification des océans ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$). Depuis l'ère préindustrielle, une diminution de 0,1 unité de pH a déjà été mesurée, cette baisse de pH est estimée à -0,5 en 2100 (Raven *et al.*, 2005). L'acidification des océans impacte négativement les organismes synthétisant du carbonate de calcium pour leur squelette ou test (coraux, bivalves, *etc.*) (Riebesell *et al.*, 2000). Plus généralement, les changements globaux ont un impact sur les flux de nutriments via l'eutrophisation et l'augmentation de l'azote et du phosphore dans les eaux côtières due à l'utilisation massive d'engrais. La circulation thermohaline pourrait également être altérée par le réchauffement climatique et les variations de densité des masses d'eaux. Ces changements rapides ont un impact considérable sur les communautés phytoplanctoniques (Bernard *et al.*, 2011; Toggweiler and Russell, 2008).

Les diatomées ont su s'adapter aux différentes variations du climat passé et de nombreuses études essayent de comprendre comment ce groupe pourrait s'adapter face aux changements futurs. Des hypothèses sont émises sur les changements possibles dans la distribution des espèces avec des adaptations et disparition de certaines d'entre elles. Par exemple, une étude de Goldstein *et al.*, (2008), indique que les blooms de la diatomée *Pseudo-nitzschia spp.*, toxiques pour les mammifères marins et l'homme, sont plus fréquents depuis 1998 sur les côtes californiennes. Une étude de Xiao *et al.*, (2018) suggère que l'augmentation de la stratification des eaux de surface dans l'Est de la mer de Chine, favorise les blooms de dinoflagellés face aux diatomées présentes.

Il est difficile de prendre en compte tous les paramètres impliqués dans les changements globaux de par la multitude de facteurs et leurs complexités. Par exemple, la déforestation engendre plus d'instabilité dans les sols et donc un plus grand apport en nutriments mais les barrages diminuent le débit des rivières arrivant dans l'océan. Il y a donc un impact global difficilement quantifiable sur les cycles biogéochimiques et la biodisponibilité des éléments nutritifs dans les océans, tel que celui de la silice (Figure 0-2).

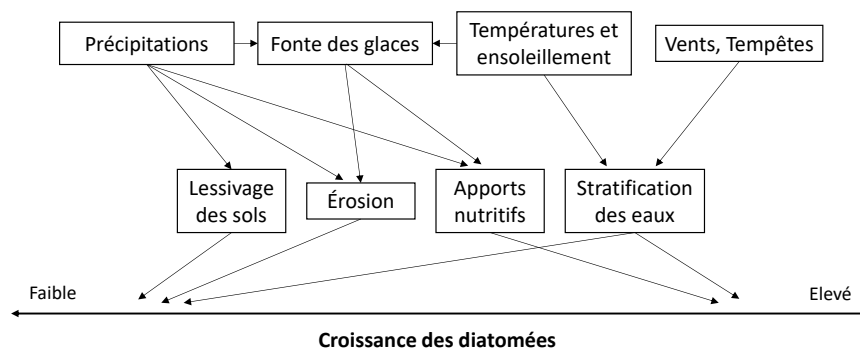


Figure 0-2: Représentation des différents facteurs globaux influençant la croissance des diatomées, adaptée de Anderson, (2010)

3. Morphologie et Classification

3.1 Structure cellulaire

Du grec *diatomos*, signifiant coupé en deux, les diatomées sont composées de deux valves asymétriques. Une grande valve, l'épivalve et une plus petite, l'hypovalve qui sont reliées par le *cingulum* (*girdle band*) (Figure 0-3a). Cette structure forme le frustule en silice, cette "coque" protège la cellule.

Le frustule sert de barrière mécanique et présente un avantage écologique pour lutter contre la prédation. Les cellules vont également être plus résistantes à la pression. En effet, la silice biogénique est plus résistante que les exosquelettes faits de calcaire (coccolithophoridés) ou de cellulose (dinoflagellés) (Kooistra *et al.*, 2007). Le frustule peut aussi avoir un rôle protecteur face aux facteurs abiotiques, par exemple la silice absorbe les UV-B. De plus, les cellules peuvent adapter leur flottabilité via les variations de densité du frustule et la présence de vacuoles dans la cellule. Ce mécanisme permet aux cellules de se positionner de façon optimale dans la colonne d'eau en fonction de leurs besoins. Raven et Waite (2004), suggèrent que cette particularité morphologique permettrait également à une cellule de sombrer plus rapidement lorsque celle-ci est parasitée et ainsi freiner la propagation de maladies au sein de la population.

Le cingulum permet également d'adapter le volume cellulaire en fonction du cycle de vie. Dans le genre *Mastogloia* le cingulum a une structure particulière, formant un renforcement dans la cellule, leur arrangement est donc un critère clé d'identification pour ce genre.

3.2 Diversité et classification

Les diatomées forment le groupe algal le plus diversifié avec 200 000 espèces estimées et seulement 10 % d'espèces décrites (Guiry, 2012; Mann et Vanormelingen, 2013; Medlin, 2018). Le phylum comprend également une grande diversité morphologique, avec un large spectre de taille et de formes (Figure 0-3b), des cellules uniques ou en colonies pouvant former des chaînes (Kooistra *et al.*, 2007).

Au 17^{ème} siècle, les diatomées furent d'abord classées dans le règne animal du fait de leur mobilité. Au 19^{ème} siècle, elles ont ensuite été incluses dans le règne végétal après avoir été confirmées comme des organismes photosynthétiques.

La classification des diatomées a été en premier lieu basée sur des critères morphologiques dont la symétrie du frustule. Les diatomées sont divisées en deux super-classes : centriques et pennées.

D'un point de vue évolutif, il existe trois clades majeurs : les diatomées centriques ayant une symétrie radiale, *Coscinodiscophyceae*, qui ont émergées pendant le Jurassique ; les diatomées centriques ayant une symétrie polaire, *Mediophyceae* apparues au début du Crétacé ; les diatomées pennées ayant une symétrie radiale, *Bacillariophycidae*, apparues à la fin du Crétacé (Kooistra *et al.*, 2007, 2003; Medlin, 2016).

Les diatomées centriques sont souvent sphériques et circulaires ce qui leur confèrent une meilleure flottabilité et sont donc majoritairement planctoniques. Au sein du groupe des diatomées pennées, qui sont, elles, majoritairement benthiques, l'apparition du raphé est un critère évolutif (Kooistra *et al.*, 2003). On différencie les araphides (ancêtre commun des pennées) : sans raphé, les proraphides : raphé court aux pôles, les monoraphides : raphé sur une valve seulement et les biraphides : raphé sur chaque valve, groupe le plus récent. La grande variété de formes et l'ornementation des pores sur le frustule peuvent permettre l'identification des diatomées (Lewin, 1961). L'identification microscopique des diatomées se fait sur des valves propres après un processus de nettoyage afin d'éliminer la matière organique qui entoure le frustule.

Le chloroplaste (lieu de la photosynthèse) peut aussi servir d'indicateur taxonomique car il peut présenter des formes particulières chez certaines diatomées. Les centriques ont, en général, plusieurs chloroplastes en forme de disque et les pennées ont un ou deux chloroplaste(s) allongé(s) le plus souvent le long des parois cellulaires (Bedoshvili *et al.*, 2009). On les retrouve également lobés pour les genres *Surirella* et *Mastogloia*.

La nomenclature est complexe et régulièrement mise à jour, suite aux avancées en termes de microscopie et de génétique. Le développement de nouvelles techniques de séquençage permet l'utilisation d'une multitude de marqueurs génétiques pour identifier les différentes espèces.

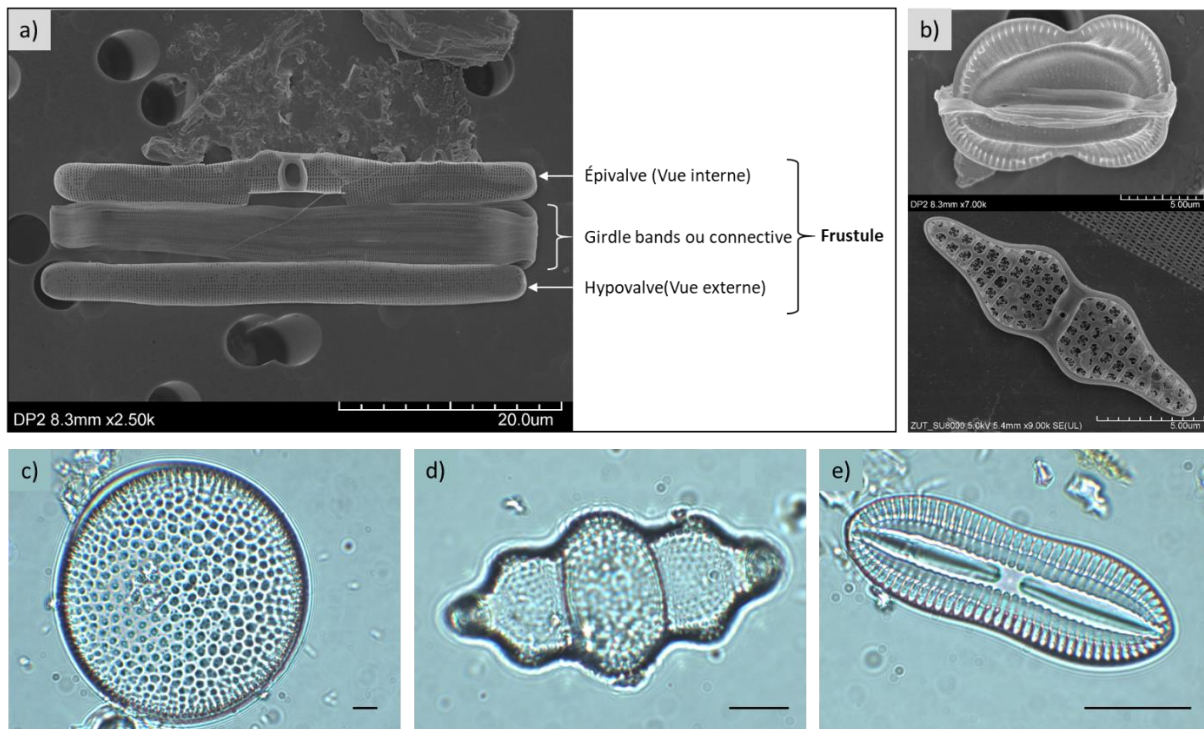


Figure 0-3: Morphologie des diatomées (a et b vues en microscopie électronique à balayage) ; a) Organisation d'un frustule (*Cyclophora* sp.) ; b) formes variées ; (c – e : vues en microscopie optique, le trait noir représente 10 μ m) c) exemple de symétrie radiale chez *Coscinodiscus* sp. ; d) exemple de symétrie polaire chez *Biddulphia tridentula* ; e) exemple de symétrie latérale chez *Diploneis* sp.

3.3 Diatomées et notion d'espèces

Le concept d'espèce a été souvent revu par les diatomistes au cours des derniers siècles (Mann, 1989). La définition moderne "d'espèce" proposée par Mayr (1976) se résume par un groupe de populations capables de se reproduire et qui sont reproductivement éloignées des autres populations occupant la même niche écologique.

Chez les diatomées, le concept biologique de l'isolement reproductif est généralement le mécanisme clé utilisé pour distinguer deux espèces. Cependant, il semble peu réaliste de tester les capacités de croisement pour chaque espèce de diatomées car leur mode de reproduction n'est pas toujours bien connu.

Le concept morphologique est donc le plus utilisé chez les diatomées. Il a cependant ses limites car la taille des cellules diminue à chaque division. Lorsque les cellules atteignent leur taille limite elles peuvent être déformées et avoir une ornementation irrégulière ce qui rend difficile leur identification (Alverson *et al.*, 2011, p. 20; Goldman *et al.*, 1990; Medlin et Fryxell, 1984). De plus, des cellules peuvent avoir des morphologies de frustule similaires mais appartenir à des taxons éloignés.

Le concept phylogénétique est donc de plus en plus utilisé. Il permet de déterminer à partir de quand deux lignées ont suffisamment divergées et forment deux espèces distinctes, en se basant sur des critères génétiques non-subjectifs tels que les marqueurs moléculaires (Alverson *et al.*, 2011; Silva,

2008). De plus, les marqueurs moléculaires peuvent parfois faciliter l'identification taxonomique des espèces. L'étude des données moléculaires permet également de définir des sous-populations écologiquement distinctes (écotypes) et de déceler des espèces cryptiques (similaires morphologiquement mais génétiquement distinctes).

Une combinaison de ces trois concepts ainsi que des informations sur leur écologie et leur distribution sont maintenant utilisées pour décrire de nouvelles espèces de diatomées et les classer dans l'arbre du vivant.

4. Cycle de vie et Reproduction

Les diatomées sont des organismes unicellulaires diploïdes ayant deux modes de multiplication connus.

Le plus courant est la reproduction végétative lors de laquelle une cellule mère donne deux cellules filles par division mitotique (Figure 0-4a). En conditions optimales, les petites espèces ayant une croissance rapide peuvent se diviser en moyenne une fois par jour (Rivkin, 1986). La cellule, en plus de devoir doubler ses organelles et son matériel génétique, doit synthétiser deux nouvelles valves. De manière générale, l'hypovalve et l'épivalve de la cellule mère vont servir d'épivalve aux cellules filles qui synthétiseront ensuite leur hypovalve (Figure 4a). Via ce processus une des cellules filles sera plus petite que la cellule mère, jusqu'à atteindre une taille limite au fil des reproductions clonales (environ un tiers de la taille initiale) (Macdonald, 1869).

Le second mode de reproduction, la reproduction sexuée, permet à la cellule de retrouver sa taille maximale (Figure 0-4b). Elle est enclenchée quand les diatomées atteignent 40 à 50 % de leur taille initiale. Outre la taille limite des cellules, le processus de reproduction sexuée est également lié à divers facteurs biologiques, comme la compatibilité des partenaires sexuels (Chepurnov et Mann, 2004), la densité cellulaire (Scalco *et al.*, 2014) et les conditions environnementales. Par exemple chez *Haslea ostrearia*, la photopériode, la quantité et la qualité des ondes lumineuses influencent les fenêtres propices à la reproduction sexuée (Mouget *et al.*, 2009). Chez les diatomées pennées, la reproduction sexuée pourrait aussi être amorcée par la production de phéromones. Des études sur les mécanismes de reproduction sexuée chez *Seminavis robusta* et *Pseudo-nitzschia multistriata* ont montré que quand les cellules atteignent leur taille limite, elles relâchaient des phéromones (Fiorini *et al.*, 2020; Moeys *et al.*, 2016). Ces phéromones seraient spécifiques à chaque type sexuel et permettraient de trouver un partenaire compatible.

Le cycle sexuel diffère entre les diatomées centriques et pennées.

Les diatomées centriques sont homothalliques, c'est-à-dire que les individus ne sont pas sexuellement différenciés, sur le plan de la morphologie, de la physiologie ou du comportement. Au moment de la reproduction sexuée, le gamétophyte se différencie en gamètes mâles flagellés mobiles ou en gamètes femelles immobiles. Dans ce cas où les gamètes sont morphologiquement différents, on parle d'oogamie.

Les diatomées pennées sont généralement hétérothalliques, c'est-à-dire que les individus ont des lignées sexuelles différentes. Au moment de la reproduction sexuée, chaque gamétophyte produit des gamètes non flagellés qui sont peu différenciés morphologiquement ou physiologiquement. Si leur comportement est identique, on parle d'isogamie. Si leur comportement est différent, on parle d'anisogamie.

Les diatomées centriques n'ont pas de mobilité propre, mais leurs gamètes mâles sont mobiles. Au contraire, les diatomées pennées ont généralement la capacité de se déplacer et leurs gamètes ont perdu leur flagelle et donc la capacité de se propulser (Poulsen *et al.*, 2022). Cependant, les gamètes mâle et femelle se rejoignent par des mouvements amiboïdes, via la déformation du cytoplasme. Dans les deux cas, après la rencontre des deux gamètes, un zygote se forme. Le zygote s'élargit ensuite pour former une auxospore à l'intérieur de laquelle se forme la cellule initiale, qui retrouvera une taille maximale.

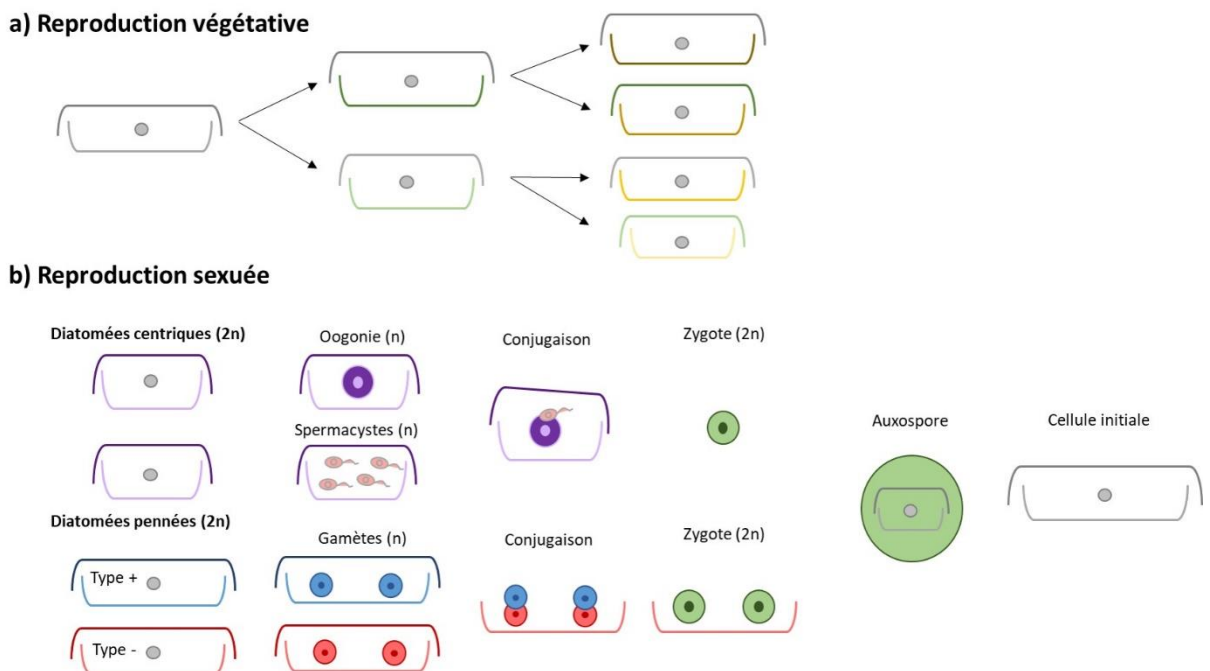


Figure 0-4: Schématisation des deux modes de reproduction identifiés chez les diatomées ; a) la reproduction végétative qui leur permettent de se multiplier rapidement et b) la reproduction sexuée qui leur permettent de regagner leur taille initiale

Cette étape de reproduction sexuée permet également d'augmenter la diversité génotypique au sein de l'espèce grâce à la production de gamètes et la recombinaison méiotique des chromosomes (Tesson *et al.*, 2013).

Quand les conditions sont défavorables : variations de luminosité, de pH, de salinité ou prédation, on peut observer chez certaines espèces la formation de spores (Kooistra *et al.*, 2007). Les spores sont denses et sombrent dans les sédiments. Ce passage par cette phase de dormance permet la survie des diatomées, principalement en milieu côtier. Quand les conditions sont à nouveau favorables, elles peuvent être précurseurs d'un bloom. C'est-à-dire qu'on observe une augmentation rapide de la concentration cellulaire des diatomées. En milieu planctonique, le seuil du bloom est généralement défini à partir d'une concentration cellulaire atteinte. Dans notre cas, en milieu benthique, on parle de bloom quand des patchs sont visibles à l'œil nu.

5. Utilisations et Valorisations

Les diatomées sont utilisées, soit en tant que cellules ou via leurs composés produits, dans de nombreux secteurs. Une présentation de quelques-unes de leurs nombreuses utilisations est faite ci-dessous.

- **Agroalimentaire et Pharmaceutique**

De manière générale, les cultures de diatomées, une fois concentrées, peuvent servir d'apport nutritif en aquaculture.

Leurs pigments photosynthétiques sont des composés bioactifs à haute valeur ajoutée qui peuvent avoir plusieurs utilités. Les diatomées produisent deux types de pigments photosynthétiques, la chlorophylle qui piège l'énergie lumineuse (Chl a et Chl c) et les caroténoïdes intervenant dans la photoprotection (Kuczynska *et al.*, 2015). Il existe plus de 700 types de caroténoïdes synthétisés dans la nature, on en retrouve sept chez les diatomées (Britton *et al.*, 2004). Les β -carotènes sont les caroténoïdes les plus efficaces en tant qu'antioxydants, grâce à leur forte capacité à éliminer les formes réactives de l'oxygène ou ROS (*reactive oxygen species*) (Stahl et Sies, 2005). Par exemple la fucoxanthine, produite en grande quantité par *P. tricornutum*, a un fort pouvoir antioxydant, mais également des propriétés anti-cancéreuse, anti-inflammatoire, anti-obésité et anti-angiogénique (Pangestuti et Kim, 2011).

- **Technologies environnementales**

Les populations de diatomées évoluent rapidement en fonction des paramètres physico-chimiques ce qui en fait de bons indicateurs environnementaux (Lowe, 1974). Les paramètres auxquels elles sont les plus sensibles sont : température, salinité, pH et nutriments. La communauté des diatomées évolue également en fonction de la pollution du milieu, avec la présence d'espèces pollurésistantes et des espèces pollusensibles.

En France, l'indice biologique diatomées (IBD) est utilisé depuis 2000 par les différentes agences de l'eau pour évaluer la qualité des cours d'eau. Il se base sur l'étude des communautés de diatomées benthiques et a été normalisé par une norme AFNOR (NF T90-354).

- **Police scientifique**

Les diatomées sont également utilisées en police scientifique. Lors d'une noyade, l'eau et ses microparticules dont les microalgues sont aspirées par les poumons et traversent ensuite les alvéoles pour se retrouver dans la circulation sanguine. Ainsi, lorsque l'autopsie est réalisée des diatomées sont retrouvées dans le sang et les organes (Lunetta *et al.*, 1998). Une fois identifiées les diatomées peuvent permettre de retrouver le lieu de la noyade. En revanche, l'absence de diatomées dans les tissus signifie que la personne était déjà morte quand son corps a été immergé.

- **Paléontologie**

Le frustule en silice est très préservé dans les sédiments ce qui permet d'identifier certaines espèces fossiles. Les frustules des diatomées les plus anciens dateraient du Jurassique (-190 Ma) (Sims *et al.*, 2006). L'étude paléontologique permet donc de retracer les changements environnementaux passés.

L'accumulation et le compactage des diatomées forment une roche poreuse et fine appelée la diatomite. Cette roche a des propriétés filtrantes, absorbantes et isolantes, ce qui lui donne de nombreuses utilisations commerciales (Ivanov et Belyakov, 2008).

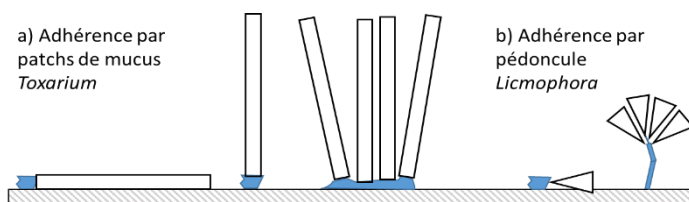
6. Diatomées benthiques

Dans l'environnement aquatique, une surface immergée sera rapidement colonisée. Une des premières étapes de la colonisation est la formation d'un biofilm. Les biofilms sont des structures ubiquitaires initiées par des bactéries pouvant se développer sur tout type de surfaces.

Le périphyton peut être défini comme un assemblage de microorganismes attachés à différents substrats, dans lequel les diatomées sont majoritaires. Les organismes auront une dénomination différente en fonction du substrat sur lequel ils se développent. On peut différencier épilithique sur la roche, épisammon : sur le sable, épipelon : sur la vase et les sédiments fins, épiphytique : sur les macroalgues et plantes aquatiques, épizootique : sur les animaux (tortues, plumes d'oiseaux marins).

Les diatomées auront également différentes dénominations en fonction de leur type d'attachement au substrat. Les "Adnate diatoms" ont une forte adhésion au substrat via leur raphé (espèces monoraphides et biraphides) ce qui facilite les échanges entre les deux. En se développant au sein de la couche limite du substrat, ces espèces seront moins affectées par l'hydrodynamique du milieu mais peuvent facilement être recouvertes et avoir un accès à la lumière moindre.

Les "Erect diatoms" adhèrent de façon verticale au substrat via des patchs de mucus ou des pédoncules (espèces araphides, monoraphides et biraphides) (Figur 0-5). Cette verticalité leur confère une meilleure résistance à la pression de pâturage tout en ayant un meilleur accès à la lumière et en gardant une surface d'échange importante avec l'environnement. (Steinman *et al.*, 1989).



Figur 0-5: Adhérence chez les "Erect diatoms" (adaptée de Molino et Wetherbee, 2008)

Les "Tube-dwelling diatoms" sécrètent du mucilage et une capsule sur la surface du substrat (espèces monoraphides et biraphides). Ce tube sécrété s'allonge au fil des multiplications. Cela leur assure une protection supplémentaire face à la prédation et permet aussi aux diatomées de résister face aux variations de paramètres environnementaux (Drum, 1969).

Notre étude se concentre sur l'étude des biofilms benthiques photoautotrophiques. Ces microenvironnements très dynamiques se forment par une succession d'étapes décrites dans la littérature en milieux dulcicole et marin (*e.g.*: Burns et Ryder, 2001; Gawne *et al.*, 1998; Rosowski *et al.*, 1986; Tuji, 2000). Le substrat nu est recouvert de matière organique dissoute qui sert de "terreau" pour le recrutement des bactéries. Les diatomées vont ensuite rapidement (dans les premiers jours de l'établissement du biofilm) coloniser cette surface. Pendant les premières semaines, bactéries et diatomées seront les organismes dominants. Elles synthétisent en grande quantité une matrice d'exopolymères principalement saccharidiques (EPS : "*Extracellular polymeric substance*") ce qui va donner une dimension 3D au biofilm. Chez les diatomées la sécrétion d'EPS se fait au travers du raphé (Hoagland *et al.*, 1993). Cette matrice va alors favoriser l'attachement de nouveaux organismes tout en maintenant une cohésion entre eux. Elle pourra également servir de source de carbone pour certaines espèces hétérotrophes (Underwood et Smith, 1998). Par la suite, protozoaires, cyanobactéries et petites algues filamenteuses colonisent également le milieu. Les biofilms photoautotrophiques sont donc à la base des réseaux trophiques benthiques. Ils vont recouvrir tout type de substrats, les diatomées auront cependant une préférence pour les substrats naturels comme les végétaux marins (Bere et Tundisi, 2011).

Les diatomées benthiques sont principalement des pennées raphides qui ont la particularité de pouvoir se déplacer. Ce déplacement se fait grâce à un système de filaments contractiles de type actine-myosine au travers du raphé (Edgar, 1983; Poulsen *et al.*, 1999). Les diatomées mobiles se déplacent en glissant le long du substrat à une vitesse qui peut atteindre les 200 $\mu\text{m/s}$ (John, 2015). Le déplacement procure un fort avantage écologique aux diatomées benthiques, leur permettant par exemple d'améliorer leur accès à la lumière, éviter la dessiccation et la perturbation du sédiment (Sauer *et al.*, 2002).

En effet, en milieu benthique la compétition pour l'accès au substrat est importante. Un étagement va se mettre en place, reflétant l'organisation des populations en fonction de leurs besoins. La communauté du biofilm va donc être structurée en fonction de l'accès à la lumière, la concentration en nutriments et la pression de broutage des organismes herbivores (Figure 0-6) (Brotas *et al.*, 1995; Wotton, 2004). De nombreuses interactions ont lieu au sein du biofilm, entre diatomées (allélopathie) ainsi qu'entre diatomées et bactéries (Cooksey et Wigglesworth-Cooksey, 1995; Wetherbee *et al.*, 1998). Le microphytobenthos est défini comme un assemblage de microalgues avec une composition très dynamique, généralement dominée par différentes espèces de diatomées (MacIntyre *et al.*, 1996). Dans certains cas, une des espèces devient dominante au sein de la communauté. Des blooms benthiques ont pu être observés dans différents environnements On par exemples retrouvés ces blooms sur des vasières intertidales (Ribeiro *et al.*, 2013), suite à un changement rapide des conditions

environnementales (Cibic *et al.*, 2012) ou sans que les raisons aient été identifiées (*e.g.*: Ahn *et al.*, 2016; Galland et Pennebaker, 2012).

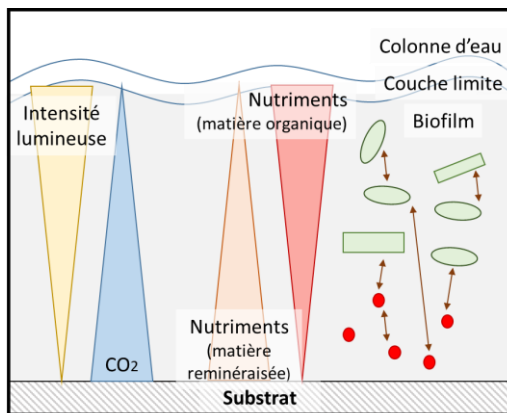


Figure 0-6 : Schéma d'un biofilm benthique photoautotrophique avec une représentation simplifiée des différentes interactions entre les organismes et variations des paramètres abiotiques

7. Interactions biotiques avec les diatomées

De manière générale, les diatomées sont des modèles intéressants pour étudier les interactions au sein du milieu, situées à la fois à la base du réseau trophique en tant qu'autotrophes et en même temps organismes "pivots", de par leurs interactions avec les bactéries (Vincent et Bowler, 2022). Cette place de pivot au sein du réseau trophique peut également être perçue par le fait qu'elles subissent à la fois des pressions *top-down* de la part de prédateurs et pathogènes et des pressions *bottom-up* en lien avec les facteurs environnementaux (Smetacek, 2012). On abordera ci-dessous seulement les interactions entre diatomées et les interactions diatomées – bactéries.

7.1 Interactions entre diatomées – Allélopathie

Une des définitions la plus répandue dans la communauté scientifique pour l'allélopathie est celle proposée par Ricel (1984): "*Any direct or indirect, harmful or beneficial effect by one plant (including microorganisms) on another through the release of chemicals that escape into the environment*". Les effets allélopathiques peuvent être de nature et amplitude différentes, car résultant de molécules chimiques elles-mêmes très variables (composés phénoliques, alcaloïdes, peptides, ...). La compétition entre diatomées vise principalement l'accès aux nutriments. La signalisation chimique a été plus étudiée chez les diatomées planctoniques que benthiques. Par exemple, au cours des blooms planctoniques de *Skeletonema marinoi* ou de *Thalassiosira pseudonana* des métabolites sont exsudés

afin d'informer de l'état métabolique les cellules voisines et leur microbiome (Barofsky *et al.*, 2009; Shibl *et al.*, 2020).

Contrairement au milieu planctonique, dans les biofilms, les cellules sont plus proches ce qui permet de faciliter l'action des molécules chimiques. Les diatomées benthiques seraient donc plus résistantes aux composés allélopathiques que les diatomées planctoniques (Hilt, 2006). Les diatomées benthiques sont des éléments importants structurants le périphyton et les interactions allélopathiques permettent de structurer la grande diversité des organismes présents (Durrett et Levin, 1997). Par exemple, la diatomée benthique *Nitzschia cf. pellucida* exsude des composés allélopathiques antagonistes pour les autres diatomées du biofilm (Vanellander *et al.*, 2012). Ces composés sont excrétés sous forme de courtes décharges lors du lever du soleil et permettent de diminuer la densité des espèces concurrentes. Ce mécanisme paraît très efficace, il permet à la cellule d'avoir un meilleur accès à la lumière pendant la journée tout en bénéficiant des nutriments issus des diatomées éliminées (Vanellander *et al.*, 2012).

7.2 Interactions diatomées - bactéries

Diatomées et bactéries cohabitent dans les océans depuis plus de 200 Mo d'années. La rencontre entre bactéries marines et diatomées se fait par chimiotaxie, c'est-à-dire un déplacement des cellules suite à un stimulus chimique (Barbara et Mitchell, 2003). On peut différencier les bactéries épiphytes des diatomées de celles habitant de la colonne d'eau. En effet, les diatomées sont entourées d'une fine couche d'eau (couche limite) entourant la cellule et qui ne se mélange pas avec le reste du milieu aussi appelé phycosphère (Bell et Mitchell, 1972; Ploug *et al.*, 1999; Richardson et Stolzenbach, 1995). La couche limite ou "*boundary layer*" est présente chez les organismes aquatiques de moins de 100 μm (Berg, 1983). Le transport entre les deux couches se fait par diffusion (et pas par advection). C'est au sein de cette phycosphère qu'on retrouve les bactéries épiphytes des diatomées, faisant partie de leur microbiome. Ce concept est analogue à la rhizosphère plus connue en milieu terrestre.

Les bactéries planctoniques se déplacent en détectant les molécules dans leur environnement et se dirigent en suivant le gradient, soit vers leur source, attractif ou à l'opposé, répulsif. Les bactéries copiotrophes, capables de chimiotaxie, sont plus compétitives dans la phycosphère que les bactéries oligotrophes qui ne peuvent pas se déplacer. Les bactéries oligotrophes seront plus compétitives dans les environnements pauvres en nutriments (Koch, 2001). Pour communiquer entre elles, les bactéries utilisent le "*quorum sensing*" comme mécanisme de signalisation. Les bactéries synthétisent des autoinducteurs, de petites molécules qui vont réguler l'expression des gènes au sein de la population bactérienne (Waters et Bassler, 2005).

Différents qualificatifs existent pour définir le type d'interactions entre deux espèces, en fonction de l'impact positif, neutre ou négatif que chacune des deux espèces va en retirer (Figure 0-7).

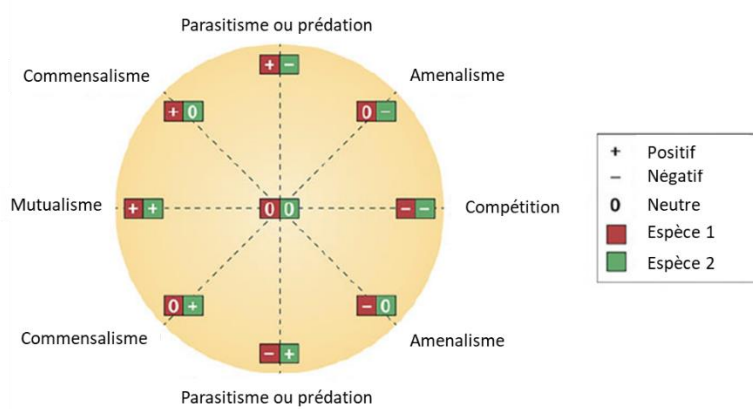


Figure 0-7: Résumé des différents types d'interactions possible entre deux espèces, adaptée de Vincent et Bowler, 2022

Les diatomées exsudent dans leur phycosphère des composés organiques qui seront ensuite utilisés par les bactéries. Les bactéries hétérotrophes vont se nourrir de ces composés de carbone organique dissous (DOC) et participer à la reminéralisation du carbone qui pourra de nouveau être utilisé par les organismes autotrophes (mutualisme). Les bactéries peuvent également utiliser les molécules constitutives des diatomées lorsque ces dernières meurent (commensalisme).

Les bactéries en produisant des phéromones peuvent induire chez les diatomées une activation de gènes conduisant à la sécrétion de molécules d'intérêts (Amin *et al.*, 2012). La bactérie *Sulfitobacter pseudonitzschiae* produit une hormone induisant une augmentation de la multiplication cellulaire chez la diatomée *Pseudo-nitzschia*. Cela lui permet d'accéder à une plus grande quantité de molécules carbonées (Amin *et al.*, 2015).

Pendant des blooms de microalgues on observe une dynamique de succession des populations bactériennes (Buchan *et al.*, 2014; Needham et Fuhrman, 2016; Teeling *et al.*, 2012). Les diatomées vont favoriser la croissance de certains clades du bactérioplancton qui rendent disponibles les nutriments nécessaires à leur croissance (Teeling *et al.*, 2012).

Une des interactions la plus étudiée est la synthèse de cobalamine (vitamine B12) par les bactéries, nécessaire à la croissance des microalgues. Une étude de Ohwada et Taga, (1972) suggère que le manque de vitamine B12 pourrait avoir un lien avec la fin du bloom de *Cyclotella nana*. De plus, certaines bactéries en synthétisant des sidérophores rendent le fer plus accessible aux diatomées (Hassler *et al.*, 2011). On peut également mentionner une interaction bactérie – diatomée pour l'azote. Les bactéries vont fixer le diazote gazeux sous une forme plus disponible telle que l'ammonium, le nitrate et le nitrite.

Des interactions antagonistes (amensalisme, compétition, parasitisme ou prédation) ont également été observées entre diatomées et bactéries. Par exemple certaines bactéries vont sécréter des molécules algicides (*e.g.* : Paul et Pohnert, 2011) et des diatomées peuvent aussi produire des composés antibactériens (*e.g.* : Desbois *et al.*, 2009).

De par les nombreuses interactions précédemment décrites, il semble pertinent d'étudier les diatomées et leurs bactéries associées en tant que holobionte (Gordon *et al.*, 2013). En particulier dans le contexte de l'étude de la dynamique des blooms, ou pour l'optimisation des conditions de croissance en laboratoire, où dans ce dernier cas les bactéries sont surtout considérées comme des contaminants. En effet, sur le plan évolutif, l'étroite proximité entre ces organismes au sein des biofilms a vraisemblablement abouti à de nombreux échanges de gènes, et on peut alors parler d'hologénome (Rosenberg et Zilber-Rosenberg, 2016). Ce concept d'hologénome prend en compte le génome de l'hôte et de ses symbiotes comme un tout en termes de sélection naturelle. Le génome de l'hôte est hautement conservé alors que le génome du microbiome est dynamique et permet à l'holobionte de s'adapter rapidement aux variations de l'environnement (Rosenberg et Zilber-Rosenberg, 2018). Ce concept ne fait cependant pas l'unanimité dans la communauté scientifique. En effet, il peut exister une relation hôte-microbiome étroite et ancienne sans que des mécanismes de sélection naturelle se mettent en place (Moran et Sloan, 2015). De plus, les symbiotes peuvent parfois coloniser différents organismes et le concept d'hologénome suggère une grande fidélité des partenaires s'ils évoluent en tant qu'unité (Douglas et Werren, 2016).

Partie 2 : Le genre *Haslea*

*Marennes : c'est un gros bourg situé entre la rivière de Seudre et le havre de Brouage
(...) les huîtres vertes de Marennes sont en grande réputation"*
(Begon, 1698)

1. Contexte historique

L'espèce emblématique *Haslea ostrearia* (Gaillon) Simonsen a été découverte par Gaillon en 1820 et a été premièrement décrite sous le nom de *Vibrio ostrearius*. Gaillon cherchait à mieux comprendre pourquoi dans certains parcs ostréicoles comme ceux de Marennes d'Oléron, du Havre ou Dieppe, il était possible d'observer les branchies des huîtres se colorer en vert. Bien que déjà consommées en ce temps, des hypothèses suggéraient que la couleur verte pouvait être liée à une maladie. Dans les claires où un verdissement des huîtres était observé, des taches vertes étaient visibles sur le fond des claires au printemps et en automne. En regardant les sédiments au microscope, Gaillon (1820) décrit "*des milliers de petits animalcules linéaires atténués et pointus aux extrémités [...] formant des petites masses d'un vert noirâtre.*" Les "animalcules" regroupaient à l'époque tous les organismes microscopiques.

Les huîtres vertes sont consommées depuis le 17^{ème} siècle, suite au développement des bassins ostréicoles en région d'Oléron qui sont des environnements propices aux blooms d'*H. ostrearia*. Il est rapporté que les huîtres vertes étaient régulièrement consommées à la table de Louis XIV (Grelon, 1978).

L'anglais Sprat en 1669, est un des premiers à relier le verdissement du fond avec le verdissement des branchies d'huîtres. Il décrit les conditions favorables au verdissement des huîtres dans l'estuaire du Chelmer (Sud-ouest du Royaume-Uni) :

"These Pits from some quality in the Soil cooperating with the heat of the Sun, will become green, and communicate their colour to the Oysters that are put into them in four or five days, though they commonly let them continue there six Weeks, or two Months, in which time they will be of a dark green."

Arnou en 1688 observa également, que le verdissement des huîtres est plus intense dans les claires peu profondes et ayant un fond en bri (roche argileuse riche en silicates).

Le verdissement des huîtres en claires (Figure 0-8a) est toujours réalisé de nos jours et apporte une meilleure valeur marchande que les huîtres "classiques". Ces huîtres fines de claires vertes de Marennes Oléron (Figure 0-8b) sont label rouge depuis 1989. Ce phénomène apporte donc une valeur patrimoniale et économique à la région.



Figure 0-8: Vue aérienne des claires d'huîtres à Marennes Oléron, b) huître fine de claire verte, les branchies présentes une couleur bleu-verte suite à la fixation de la marennine

2. Caractéristiques du genre

Le genre *Haslea* est classé dans le taxon des diatomées pennées biraphides, dans la famille des Naviculaceae, représentée par des cellules lancéolées avec un raphé droit sur les deux valves et des apex aigus. Le genre *Haslea* a été créé par Simonsen en 1974 grâce aux avancées en termes de microscopie électronique à balayage (MEB). Des espèces appartenant aux genres *Amphipleura*, *Gyrosigma*, *Navicula* et *Pleurosigma* ont été transférées dans ce nouveau genre, ainsi nommé en l'honneur de la biologiste norvégienne Grethe Rytthter Hasle, spécialiste du phytoplancton.

Les cellules vivantes sont reconnaissables en microscopie optique par leurs chloroplastes pariétaux allongés de chaque côté de la cellule, en vue valvaire (Figure 0-9a). L'observation en MEB des valves nettoyées permet de distinguer, en vue externe, des bandes de silice longitudinales parallèles (Figure 0-9 c, d et e). En vue interne, les bandes longitudinales croisent des bandes transversales, formant des alvéoles carrées à rectangulaires (Figure 0-9 b et e). Ce quadrillage est relié aux bandes longitudinales externes par des cloisons perforées appelées *saepes*, l'ensemble forme ainsi une structure en double couche (Sterrenburg *et al.*, 2015).

Le genre *Haslea* comprend actuellement 37 espèces taxonomiquement acceptées et référencées sur Algeabase (Guiry et Guiry, 2022). Notre connaissance du genre s'est considérablement améliorée ces dernières années grâce à l'amélioration des techniques de microscopie et la démocratisation des moyens de séquençage. Récemment de nouvelles espèces ont été découvertes *Haslea apolloniae* Lobban & Perez, *Haslea arculata* Lobban & Ashworth, *Haslea fusiformis* Lobban & Perez, *Haslea guahanensis* Lobban & Perez, *Haslea silbo* Gastineau, Hansen & Mouget.

Les nombreuses espèces d'*Haslea* ont des caractéristiques différentes présentées dans les paragraphes suivants.

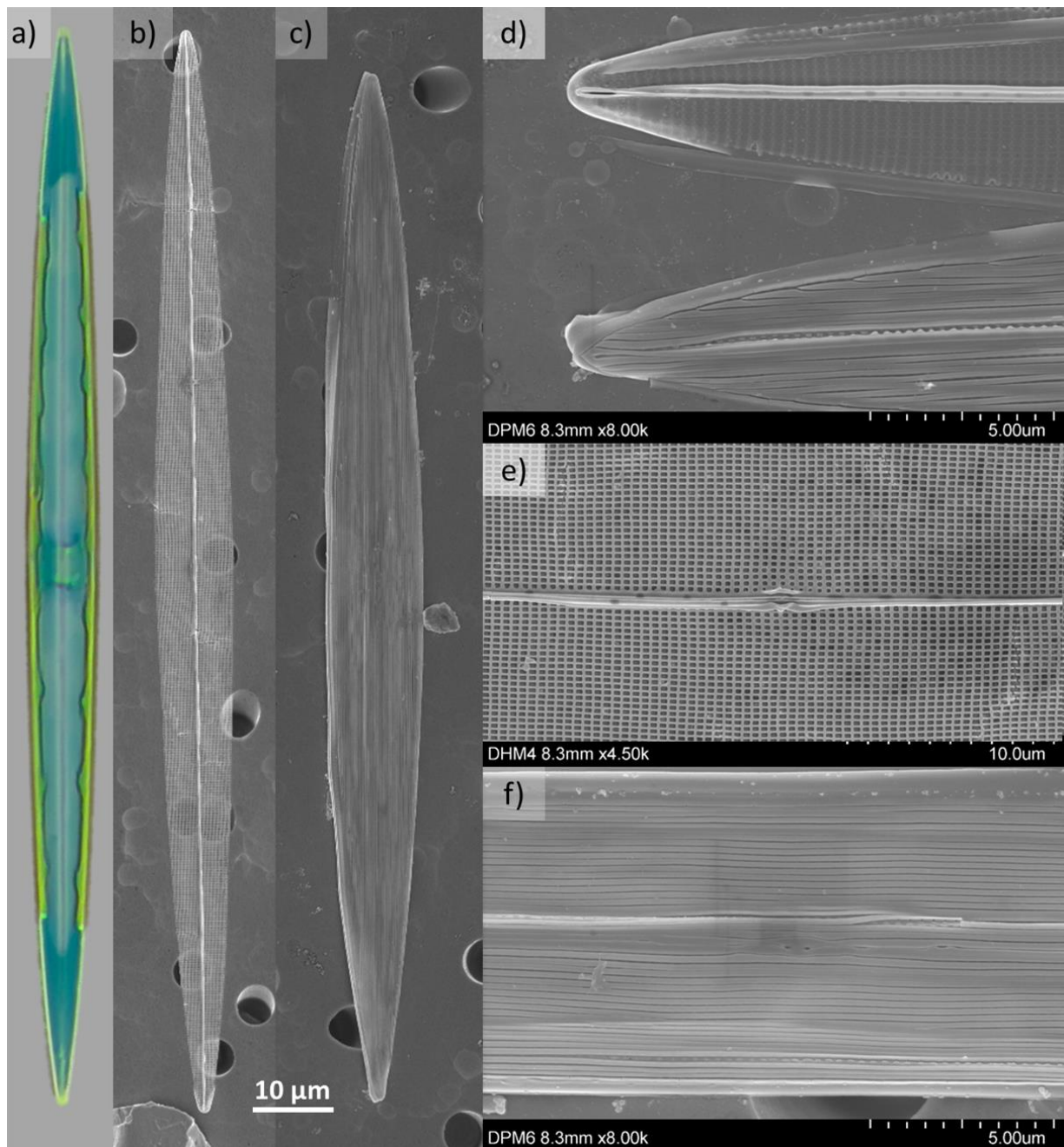


Figure 0-9: Caractéristiques morphologiques du genre *Haslea* illustré par des vues de *H. ostrearia* ; a) présence de deux chloroplastes pariétaux, observation en microscopie optique ; b-f) : vue des frustules en microscopie à balayage) b) vue interne du quadrillage siliceux ; c) vue externe d'un frustule avec la présence de bandes longitudinales ; d) apex des cellules, haut vue interne et bas vue externe ; e) vue interne des terminaisons centrales du raphé et des aréoles quadrangulaires ; f) vue externe des terminaisons centrales du raphé

2.1 Écologie

Le genre *Haslea* est cosmopolite, il a été identifié dans tous les océans. Ce sont des espèces marines euryhalines, c'est-à-dire résistantes à des environnements saumâtres ou avec des variations périodiques de salinité. *Haslea crucigeroides* (Hustedt) Simonsen et *Haslea spicula* (Hickie) Bukhtiyarova ont été identifiées dans des environnements polaires. Contrairement à *Haslea aakal* Gastineau & Mouget sp. nov. et *Haslea nusantara* Mouget, Gastineau & Syakti qui ont été caractérisées dans des eaux tropicales (Prasetya *et al.*, 2019). La plupart des *Haslea* sont benthiques, exceptées *Haslea wawriake* (Hustedt) Simonsen et *Haslea gretharum* Simonsen qui sont des espèces planctoniques.

Actuellement trois espèces *H. ostrearia*, *H. provincialis* et *H. silbo* ont été identifiées comme pouvant être à l'origine de blooms se développant sur les fonds marins peu profonds.

2.2 Morphologie

Les *Haslea* ont majoritairement une forme lancéolée, des espèces avec une forme sigmoïde comme *Haslea nipkowii* (Meister) Poulin & Massé et *Haslea staurosigmoidea* Sterrenburg & Tiffany qui avaient été classées antérieurement dans le genre *Gyrosigma*. *Haslea arculata* Lobban & Ashworth et *Haslea feriarum* Sterrenburg & Tiffany ont, quant à elles, une forme arquée.

Les espèces d'*Haslea* présentent une large gamme de taille, avec une taille moyenne d'une centaine de micromètres. *Haslea gigantea* (Hustedt) Simonsen comme son nom l'indique, a une taille exceptionnelle, pouvant atteindre 500 µm.

Chez plusieurs espèces dont *Haslea crucigera* (Smith) Simonsen et *Haslea salstonica* Massé, Rincé & Cox, on observe un pseudo-stauros, c'est-à-dire un épaissement des côtes centrales. Cette structure observée chez d'autres diatomées benthiques leur permettrait de faciliter leur adhésion au substrat (Cohn et Weitzell Jr., 1996).

2.3 Production de pigments

Les *Haslea* synthétisent les pigments classiquement retrouvés chez les diatomées tels que les chlorophylles a et c, la diatoxanthine, la diadinoxanthine, la fucoxanthine (Mouget *et al.*, 1999). De plus, *H. karadagensis* Davidovich, Gastineau et Mouget, *H. nusantara*, *H. ostrearia*, *H. provincialis* et *H. silbo* ont la capacité de produire un pigment bleu de type marennine. La marennine est spécifique de l'espèce emblématique *H. ostrearia*. Ces pigments vont s'accumuler aux apex des cellules. Ces *Haslea* produisant ces pigments bleus forment un sous-groupe génétiquement différent des autres *Haslea* non-bleus (Gastineau *et al.*, 2018).

2.4 Reproduction

La reproduction de *H. ostrearia* a été en premier lieu étudiée par Neuville et Daste (1978, 1975) qui ont observé la formation d'auxospores dans des cultures supposément clonales. Ils ont identifié que le processus de reproduction homothallique (de même type sexuel) était induit quand les cellules atteignaient une taille critique de 65 μm . Une des particularités de cette espèce est qu'une reproduction de type hétérothallique (deux cellules de type sexuel différent et compatibles) a également été mise en évidence (Davidovich *et al.*, 2009).

Dans les deux cas, il semble que les conditions en laboratoire reproduisent les conditions hivernales afin d'amorcer la reproduction. En effet, les rendements et l'auxosporulation sont augmentés lorsque les couples compatibles sont exposés à de courtes photopériodes (de 6 à 10 heures par jour), avec un faible éclairement ($< 50 \text{ photons m}^2 \text{ s}^{-1}$) et une bonne qualité d'ondes lumineuses dont des longueurs aux alentours de 600 nm (Davidovich *et al.*, 2009; Neuville et Daste, 1975). Un effet densité est également observé, puisque l'auxosporulation est favorisée lorsque les cultures compatibles sont mises en contact lors de leur phase exponentielle de croissance avec des concentrations initiales faibles d'environ 2000 cellules/mL (Gastineau, 2011).

La reproduction est un phénomène complexe à induire en laboratoire, mais qui permet de disposer de souches sur le long terme sans avoir à recourir à des prélèvements en milieu naturel.

3. Les *Haslea* bleues

3.1 L'espèce type *H. ostrearia*

Le terme espèce type ou holotype fait référence à l'espèce ou l'individu qui a été utilisé pour décrire officiellement le genre ou l'espèce correspondant, et dont du matériel est disponible dans une collection.

Haslea ostrearia est une espèce cosmopolite évoluant dans des environnements tempérés à tropicaux, elle n'a pas été détectée dans les mers polaires (Figure 0-10).



Figure 0-10 : Répartition d'*H. ostrearia* d'après la littérature, certaines de ces observations n'ont pas été vérifiées par des données moléculaires, adaptée de Gastineau 2016

C'est une diatomée benthique qui peut former des blooms sur les sédiments, sur les biofilms et sur les macroalgues. Elle peut être observée en milieu pélagique lors d'une remise en suspension du biofilm (Robert, 1983). C'est une espèce euryhaline trouvée dans des eaux saumâtres comme les claires à huîtres et des eaux plus salées comme à la mer Méditerranée (Neuville et Daste, 1978; Wraige *et al.*, 1997). Elle peut également s'adapter à de fortes variations de la luminosité allant de 20 à 752 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ et résiste aux rayons ultraviolets (Mouget *et al.*, 1999; Rech *et al.*, 2005).

La longueur maximale de la cellule initiale observée en laboratoire est de 140 μm et la longueur minimale est de 17 μm , en dessous de cette valeur la cellule ne peut plus réaliser de division mitotique (Davidovich *et al.*, 2009). La largeur varie de 6 à 12 μm .

Une des spécificités de *H. ostrearia* est la production de marennine. Comme énoncé précédemment, les premières études sur cette diatomée étaient en lien avec l'ostréiculture et le verdissement des huîtres.

3.2 La marennine

- **Propriétés chimiques**

Bien que *H. ostrearia* et la marennine soient depuis longtemps connues et utilisées en laboratoire pour de nombreuses expériences, la composition chimique du pigment n'a pas encore été déterminée.

Plus le processus de purification du pigment s'améliore (Bélanger *et al.*, 2020; Falaise *et al.*, 2018 ; Pouvreau *et al.*, 2007b), plus les hypothèses sur la nature du pigment sont remises en cause. Les dernières études décrivent la marennine comme une molécule complexe constituée d'un squelette carboné comportant des polysaccharides, dont certains sulfatés, des groupements polyphénoliques et un chromophore (Bélanger *et al.*, 2020; Gastineau *et al.*, 2014; Pouvreau *et al.*, 2006).

Ce pigment a été nommé *marenin* par (Lankester, 1886), en référence à la région de Marennes Oléron et de ses huîtres vertes caractéristiques. Lors d'un bloom, ce pigment hydrosoluble peut être accumulé en plus grande quantité dans les environnements fermés ou semi-fermés (comme les bassins ostréicoles). Le pigment va se fixer aux mucocytes des branchies des bivalves lorsque celles-ci filtrent l'eau pour se nourrir, les branchies peuvent alors se colorer en vert (Gastineau *et al.*, 2018).

La marennine synthétisée par *H. ostrearia* est stockée dans le cytoplasme aux apex de la cellule. La marennine est ensuite excrétée dans le milieu extérieur par exocytose (Nassiri *et al.*, 1998). La forme extracellulaire (EMn) et la forme intracellulaire (IMn) se différencient par leurs poids moléculaires, respectivement 9,9 kDa et 10,7 kDa (Pouvreau *et al.*, 2007b, 2006). Leur pic d'absorbance est décalé, le maximum pour l'EMn est à 677 nm et 672 nm pour l'IMn.

Sa couleur varie également en fonction du pH, de violet à pH acide à gris-vert en conditions basiques (Figure 0-11).

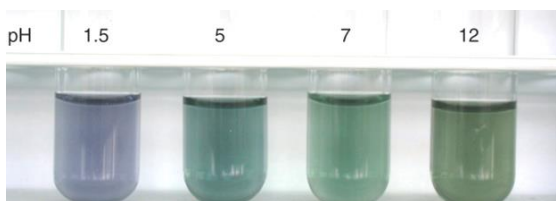


Figure 0-11: Variation de couleur de la marennine en fonction du pH (source R. Gastineau)

- **Activités biologiques**

Sa voie de biosynthèse et les fonctions biologiques que la marennine apporte à la cellule ne sont pas élucidées. En effet, la synthèse de ce pigment a un coût métabolique pour la cellule, celle-ci doit donc y trouver un avantage écologique. Des études ont cependant mis en évidence les conditions favorables à la synthèse de ce pigment. Quand l'éclairement est plus fort, la photopériode plus longue et de bonne qualité (avec des longueurs d'ondes dans le bleu), la production de la marennine est ainsi

favorisée (Mouget *et al.*, 2005; Neuville et Daste, 1972; Prasetya *et al.*, 2016; Tremblin *et al.*, 2000). Neuville et Daste (1972) avaient suggéré que la production de marennine augmentait lors d'un appauvrissement en nitrate. Des travaux plus récents ont montré qu'en fonction de la concentration de nutriments et leur état organique ou inorganique, la concentration en cellule et la concentration en marennine seront modulées différemment (Nghiem Xuan *et al.*, 2021, 2020; Prasetya *et al.*, 2022).

Il existe plusieurs pistes pour expliquer l'intérêt de ce pigment pour la cellule. Il a été démontré que ce pigment avait de nombreuses activités biologiques telles que des propriétés allélopathiques (Pouvreau *et al.*, 2007a; Prasetya *et al.*, 2016), antibactériennes (Falaise *et al.*, 2019; Gastineau *et al.*, 2014), antivirales, antiprolifératives (Carbonnelle *et al.*, 1999; Gastineau *et al.*, 2012b) et antioxydantes (Pouvreau *et al.*, 2008). Ces propriétés pourraient ainsi donner un avantage compétitif à *H. ostrearia* par rapport aux autres espèces de diatomées benthiques.

De par ses nombreuses propriétés et activités biologiques, des essais de culture d'*H. ostrearia* en photo-bioréacteurs ou bassins sont en cours (Gargouch *et al.*, 2022; Nghiem Xuan *et al.*, 2021).

- **Utilisation**

Outre l'intérêt de ce pigment pour l'ostréiculture, il pourrait avoir des applications dans l'industrie agroalimentaire et cosmétique. En effet, les pigments bleus synthétiques couramment utilisés comme le bleu brillant FCF (E133) et l'Indigo Carmine (E132) sont issus de la pétrochimie (Sharma *et al.*, 2011). Cependant, les pigments bleus naturels sont encore peu exploités car ils ne sont pas assez stables (Newsome *et al.*, 2014). Une récente étude (Francezon *et al.*, 2021) a décrit une bonne stabilité de la marennine qui pourrait donc être un bon candidat pour des applications en agroalimentaire ou cosmétique.

3.3 Diversité des *Haslea* bleues

Haslea ostrearia a longtemps été considérée comme la seule diatomée bleue. Grâce à l'augmentation de l'échantillonnage et de la démocratisation des méthodes d'identification moléculaires, de nouvelles espèces d'*Haslea* bleues ont été décrites. Actuellement, cinq espèces d'*Haslea* synthétisant des pigments bleus de type marennine ont été décrites (Tableau 0-1).

Après *H. ostrearia* la seconde espèce d'*Haslea* bleue qui a été identifiée est *H. karadagensis*, une espèce endémique de mer Noire. *Haslea silbo* a été identifiée pour la première fois sur les côtes des îles Canaries en 2011 puis sur la côte est des États-Unis où on retrouve également le phénomène de verdissement des huîtres. Deux autres espèces ont ensuite été identifiées, *H. provincialis*,

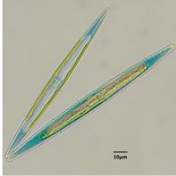

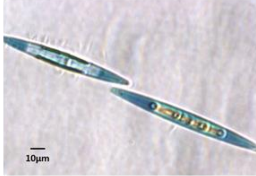
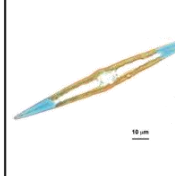
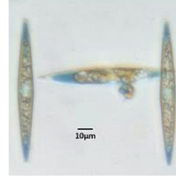
endémique de la mer Méditerranée et *H. nusantara* observée en mer de Java et sur les côtes vietnamiennes.

Ces espèces sont difficiles à différencier en microscopie optique mais présentent des différences en microscopie à balayage au niveau de leur frustule, notamment le nombre de stries longitudinales et latérales. Les espèces peuvent aussi être identifiées en utilisant des marqueurs moléculaires. Pour le genre *Haslea*, le plus adapté est un marqueur moléculaire du chloroplaste, codant pour la grande sous-unité de la RuBisCo (*rbcl*).

L'important effort d'échantillonnage a également permis d'observer des blooms au-delà des zones ostréicoles. De plus, en grande concentration, *H. silbo* et *H. provincialis* peuvent comme *H. ostrearia* apporter une coloration bleu-verte aux branchies des bivalves (Gastineau *et al.*, 2018).

Pour les espèces d'*Haslea* produisant des pigments bleus autres que *H. ostrearia*, on parle de pigment de type marennine. Les différences entre ces pigments sont actuellement étudiées et font l'objet d'une thèse.

Tableau 0-1: Espèces d'*Haslea* connues produisant des pigments bleus de type marennine

	<i>H. ostrearia</i> (Gailion) Simonsen 1974	<i>H. karadagensis</i> Davidovich, Gastineau & Mouget 2012	<i>H. provincialis</i> Gastineau, Hansen & Mouget 2016	<i>H. nusantara</i> Mouget, Gastineau & Syakti 2019	<i>H. silbo</i> Gastineau, Hansen & Mouget 2021
Photo Microscopique					
Aire de répartition	Cosmopolite	Mer Noire	Mer Méditerranée	Mer de Java et mer de Chine	Océan Atlantique et mer Méditerranée
Bloom observé	Oui	Non	Oui	Non	Oui

Partie C : Contexte du sujet de thèse

Ce projet de thèse s'inscrit dans le cadre du programme H2020 GHANA qui s'articule autour de différents axes de recherche tels que l'étude de la physiologie des *Haslea* bleues, la recherche de composés à haute valeur ajoutée (e.g. silice, acides gras), le développement d'unités de production (photobioréacteurs), la bioprospection pour la découverte et l'identification de nouvelles espèces ou encore la valorisation des *Haslea* et de leurs pigments bleus dans le secteur de l'aquaculture.

Pour améliorer nos connaissances sur le genre *Haslea* et mener au mieux ce programme, il est également primordial de comprendre comment les espèces vivent dans l'environnement naturel.

Les blooms benthiques d'*Haslea* bleues ont été enregistrés en baie de Calvi depuis la fin des années 90. Ces développements se traduisent par des patches bleus recouvrant les rochers sur quelques centimètres à plusieurs mètres carrés. Ils sont présents de février à juin entre 1 et 8 m de profondeur, avec un maximum d'abondance en mars et avril dans la zone des 3 à 5 m. Ces blooms en environnements ouverts n'ont pas été décrits dans la littérature contrairement aux blooms qui ont lieu dans les claires d'huîtres et qui ont été décrits et étudiés dès le 17^{ème} siècle.

Initialement, ce travail de thèse avait pour but de comprendre la dynamique et l'impact des blooms d'*Haslea* en environnement naturel. Cette étude a pour objectif de répondre aux problématiques suivantes :

- Quelles sont les espèces d'*Haslea* présentes dans les blooms ?
- Il y a-t-il de nouvelles espèces à décrire ?
- Quels sont les types de substrats propices à l'établissement de ces efflorescences ?
- Quels paramètres environnementaux permettent d'amorcer les blooms, et quels sont ceux qui participent à la décroissance des blooms ?
- Connaissant les propriétés biologiques de la marennine, comment le bloom va impacter les communautés majoritaires du biofilm ?

Pour répondre à ces questions, différentes méthodes ont été mises en place. Elles ont été regroupées et présentées dans la partie suivante.

Le chapitre 1 décrit trois nouvelles espèces d'*Haslea* non-bleues coexistant avec des *Haslea* bleues et rencontrées lors des campagnes de bioprospection, en fonction de leurs caractéristiques morphologiques et moléculaires.

Le chapitre 2, est composé d'une première partie présentant les questions relatives à la dynamique des blooms et d'une seconde partie traitant de l'occurrence des blooms en fonction de la présence de certaines macroalgues

Le chapitre 3 présente l'impact du bloom sur les communautés de diatomées et de bactéries présentes dans le biofilm. Des pistes sur le rôle biologique de la marennine sont proposées.

Dans la dernière partie, les différents résultats obtenus sont discutés afin d'en tirer des perspectives.

Méthodes d'analyses

L'ensemble des protocoles et des analyses qui ont été mis en place pour ce travail de thèse sont détaillés dans cette partie. Les méthodes de chaque étude seront synthétisées dans les parties correspondantes.

Ces protocoles ont été en partie développés en collaboration avec la station marine de STARESO (Calvi) et les universités des Szczecin (Pologne), Dubrovnik (Croatie) et Liège (Belgique).

1. Zones d'études et Échantillonnage

Pour étudier la dynamique des blooms d'*Haslea* bleues en Méditerranée, deux zones d'études ont été choisies. Une zone en baie de Calvi, mer de Ligure et une zone en Dalmatie le long des côtes croates de l'Adriatique (Figure présentée dans chapitre 2). Ces deux zones sont des environnements oligotrophes et sont considérés comme des zones de références peu polluées.

1.1 Mer de Ligure – Baie de Calvi

Située au nord-ouest de l'île de Corse, la baie de Calvi est entourée de côtes granitiques. Cette baie, délimitée par la pointe de Spano à l'est et la pointe de la Revellata à l'ouest, a une superficie de 22 km². La Baie de Calvi est reconnue depuis 2015 comme un site de référence et un site atelier. Cette dénomination est liée à différentes caractéristiques comme la présence d'écosystèmes emblématiques de Méditerranée (herbiers, coralligènes, etc) et en bon état écologique de conservation malgré la présence des pressions anthropiques (Fullgrabe *et al.*, 2022) (Figure 0-12). De plus de nombreuses études et suivis sont réalisés par la station marine STARESO depuis les années 1970.

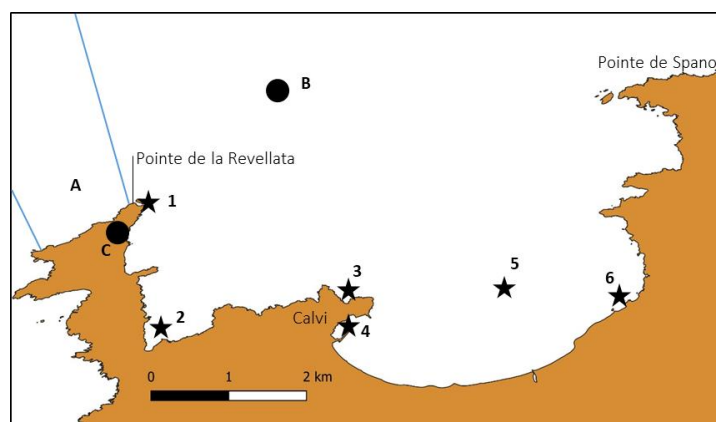


Figure 0-12: Représentation de la baie de Calvi et de ses différentes caractéristiques.

A – C : Zones d'intérêt A : Cantonnement de pêche; B : Tête du canyon sous marin ; C : station marine STARESO ;
1 – 6 : Zones de pressions anthropiques 1 : Activité importante de plongées sous-marine; 2 : Mouillages sans aménagement;
3 : émissaire de la station d'épuration; 4 : Port de plaisance et zone de mouillages aménagés, 5: Aquaculture, 6 : Embouchure du Fiume Seccu

Les campagnes d'échantillonnage y ont été réalisées au printemps de 2019, 2021 et 2022. (L'échantillonnage n'a pas eu lieu en 2020 en raison de la pandémie.)

La dynamique du bloom d'*Haslea* a été suivie sur ces trois années. Des échantillons environnementaux ont été récoltés afin de caractériser les espèces d'*Haslea* présentes. De plus, en 2019 et 2021 des échantillons ont été pris pour suivre l'évolution des communautés de diatomées et de bactéries.

- **Suivi du bloom**

À chaque début de campagne un état des lieux du bloom le long de la pointe de la Revellata a été réalisé. Pour cela, la ligne bathymétrique des quatre mètres de profondeur était suivie en snorkeling, les patchs ont été photographiés, leur surface et leur densité ont été estimées. Des échantillonnages ont été effectués dans les zones bleues (présence du bloom) et non-bleues (zone témoin) pour vérifier la présence de cellules d'*Haslea* au microscope. Si lors des missions des patchs étaient observés dans d'autres lieux de la baie de Calvi, ils ont alors été répertoriés.

Afin de comprendre l'impact du bloom sur les communautés de diatomées et de bactéries associées au biofilm, des prélèvements ont ensuite été réalisés.

- **Prélèvements**

La première année, en 2019, deux sites d'échantillonnage ont été choisis, un site avec des patchs bleus d'*Haslea* de faible intensité (site Port) et un second site correspondant à la zone où le bloom était le plus développé (site Madrepore). En 2021, le bloom n'était pas aussi développé sur le site Madrepore, donc un troisième site où le bloom était le plus développé a été ajouté (site Oscelluccia) (Tableau 0-2). Les prélèvements ont été réalisés en plongée sous marine à partir de STARESO, à une profondeur d'entre 3 et 4 m. Les plongées sur les différents sites étaient réalisées sur des jours consécutifs afin de réduire le biais temporel.

Tableau 0-2 : Synthèse des prélèvements réalisés en baie de Calvi

Échantillonnage réalisé				
Zone	Année	Site	Date	Substrat
Calvi Bay	2019	Port	13/04; 28/05	<i>Padina</i> , Turf, <i>Halopteris</i>
		Madrepore	12/04; 23/04; 28/05	<i>Padina</i> , Turf, <i>Halopteris</i>
	2021	Port	26/03; 03/05; 22/05	<i>Padina</i> + Turf
		Madrepore	25/03; 04/05; 23/05	<i>Padina</i> + Turf
		Oscelluccia	29/03; 04/05; 25/05	<i>Padina</i> + Turf

Sur chaque site, six quadrats (30 x 40 cm) ont été posés, trois quadrats sur des patchs très bleus et trois quadrats sur des zones sans *Haslea* visibles. A chaque fois, *Padina* sp., *Halopteris scoparia* et du turf ont été prélevés. Dans chaque quadrat, deux tubes (15 mL et 50 mL) ont été remplis avec des thalles de *Padina*, de la même manière deux tubes ont été remplis avec *H. scoparia* ou du turf. *Halopteris scoparia* a seulement été prélevé en 2019 et pas en 2021 car la quantité de matériel prélevée en 2019 était trop faible pour réaliser les analyses.

Les tubes de 15 mL ont ensuite été conditionnés avec 4 % de formol pour l'identification morphologique des diatomées. Une fraction de milieu frais a été gardée et la densité des *Haslea* par rapport au reste des diatomées a été déterminée dans la journée. En 2019, de l'éthanol 96 % avait été ajouté dans les tubes de 50 mL pour atteindre une concentration finale de 70 %. Afin d'optimiser leur conservation, en 2021, les tubes de 50 mL ont été centrifugés pour se débarrasser de l'excès d'eau de mer et les culots ont été resuspendus dans de l'éthanol 96 % et stockés à -80 °C jusqu'à l'extraction des ADN bactériens.

- **Indice CARLIT (CARTographie LITtorale)**

La mesure de l'indice CARLIT avait pour but d'identifier la communauté de macroalgues associée aux blooms d'*Haslea* et de les relier à la qualité de l'eau (Ballesteros *et al.*, 2007). Cet indice a été mesuré en baie de Calvi, sur 19 stations. Les stations ont été choisies sur des sites où la dynamique algale a été suivie depuis 1979 (Demoulin *et al.*, 1980). À chaque station, des transects de 20 m de long ont été réalisés, entre 0 et 3 m de profondeur, subdivisés en trois couches : 0 - 0,5 m ; 0,5 – 1 m ; 1 – 3 m, pour faciliter les mesures. Les relevés ont été faits pendant un nombre de jours restreint pour éviter tout changement ou évolution de la communauté qui pourrait ajouter un biais aux résultats. Les observations ont été faites entre fin mai et début juin 2021 (10 jours), en snorkeling. Pour calculer l'indice CARLIT, les espèces de macroalgues ont été identifiées et leur taux de recouvrement a été déterminé. Les mesures ont été réalisées entre avril et juin lorsque les thalles d'algues sont bien développés, ce qui facilite leur identification et rend le taux de recouvrement plus précis. Un indice de sensibilité a été attribué aux espèces d'algues concernées, il est compris entre 1 et 20, les valeurs augmentent avec la sensibilité des espèces à la pollution (Tableau 0-3a). Cet indice de sensibilité a été adapté à partir des travaux de Ballesteros (2007) et Blanfuné *et al.* (2017). Les algues sans indice de sensibilité attribué ont également été notées (Tableau 0-3b), afin de suivre la communauté algale globale. Un second indice a également été attribué à chaque transect, en fonction de la géomorphologie du littoral (pente, morphologie et type de substrat), suivant Ballesteros (2007) (Tableau 0-3c).

La somme des indices de sensibilité des algues, en fonction du taux de recouvrement de l'espèce correspondante et l'indice de morphologie ont été utilisés pour déterminer le ratio de qualité écologique (EQR) pour chaque transect. L'EQR a été calculé de la manière suivante :

$$EQ = \frac{\sum(li * SLi)}{\sum li}$$

EQ = indice de qualité environnemental par communauté
li = pourcentage de recouvrement de la communauté i
SLi = indice sensibilité de la communauté i

$$EQR = \frac{\sum \frac{EQ(ssi) * li}{EQ(rsi)}}{\sum li}$$

EQR = Ratio de Qualité Ecologique
EQssi = l'EQ de la morphologie étudiée pour la situation i
EQrsi = l'EQ dans le site de référence pour la situation i

La valeur de l'EQR est comprise entre 0 et 1 et permet de déterminer l'indice CARLIT correspondant (Tableau 0-3d).

Tableau 0-3 a) Indice de sensibilité des algues ; b) inventaire des algues présentes ; c) indice de sensibilité morphologique côtière ; d) correspondance entre l'EQR et l'indice CARLIT

a)		b)		c)			
Espèces et communauté	Indice de sensibilité	Espèces et communauté		Morphologie côtière	EQi		
<i>Lithophyllum byssoides</i>	20	Algues filamenteuses	algues sans indice	naturelle	blocs	12,2	
<i>Posidonia oceanica</i>	20	Algues mucilagineuses		naturelle	basse	16,6	
<i>Ericaria amentacea</i> 100%	20	<i>Acetabularia acetabulum</i>		naturelle	haute	15,3	
<i>E. amentacea</i> discontinue (>50 %)	19	<i>Amphiroa rigida</i>		artificielle	blocs	12,1	
<i>E. amentacea</i> patchs abondants (25-50%)	15	<i>Bryopsis</i> sp.		artificielle	basse	11,9	
<i>E. amentacea</i> rares indiv. isolés	12	<i>Caulerpa racemosa</i>		artificielle	haute	8,0	
<i>E. amentacea</i> bcp indiv. isolés	10	<i>Cladostephus spongiosus</i>		d)			
<i>Ericaria brachycarpa</i>	20	<i>Colpomenia sinuosa</i>		EQR	indice CARLIT		
<i>Ericaria crinita</i>	20	<i>Dictyopteris membranaceae</i>		> 0,75 – 1	Très bon		
<i>Cystoseira</i> abritées (<i>foeniculacea/spinosa</i>)	20	<i>Dictyotaceae</i>		> 0,60 – 0,75	Bon		
<i>Ericaria barbatula</i>	20	<i>Discosporangium</i>		> 0,40 – 0,60	Moyen		
<i>Cystoseira compressa</i>	12	<i>Flabellia petiolata</i>		> 0,25 – 0,40	Médiocre		
Dictyotales	10	<i>Halimeda tuna</i>		0 – 0,25	Mauvais		
Stypocaulaceae (<i>H. scoparia</i> et <i>H. filicina</i>)	10	<i>Halopithys incurva</i>					
Janioides	10	<i>Haslea</i> sp. (quand patchs bleus visibles)					
Turf	10	<i>Laurencia obtusa</i>					
Corallina spp. (elongata/caespitosa)	8	<i>Liagora viscida</i>					
Corallinales encroûtantes	6	<i>Nemalion helminthoides</i>					
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	6	<i>Padina pavonica</i>					
Algues vertes (<i>Ulva / Cladophora</i>)	3	<i>Palmophyllum</i>					
Ceinture sub-littorale d'algues vertes	3	<i>Peyssonnelia</i>					
Tapis bruns (cyano ou <i>Derbesia</i> t.)	1	<i>Pterocladiaella / Ulva / Schyzimonia</i>					
		<i>Rissoella verruculosa</i>					
		<i>Zonaria tournefortii</i>					

1.2 Mer de Ligurie – Autres

Un bloom a également été observé dans la calanque de la Crine, dans l'archipel du Frioul au large de Marseille, le 6 juin 2021. Des échantillons y ont été prélevés pour analyser les espèces d'*Haslea* présentes.

1.3 Mer Adriatique – Côtes Croates

En mer Adriatique, en août 2019, des échantillons avaient été prélevés à l'île de Krk pour identifier les espèces d'*Haslea* présentes. Il n'y avait pas de patches visibles à l'œil nu.

Fin juillet 2020, quatre localisations ont également été échantillonnées en Dalmatie, sur les îles de Hvar, Mljet, Lopud et autour de Dubrovnik (Tableau 0-4). Des padines bleues et non-bleues ont été prélevées et conservées dans 4 % de formol pour l'analyse taxonomique des diatomées. Le turf n'a pas été prélevé car le bloom était localisé sur les thalles de *Padina*.

Tableau 0-4: Localisation des lieux de prélèvements sur la côte Dalmatienne

Échantillonnage réalisé				
Zone	Année	Site	Date	Substrat
Dalmatian coast	2020	Saplunara	16/07	<i>Padina</i>
		Gonoturska	17/07	<i>Padina</i>
		Malo et veli	17/07	<i>Padina</i>
		Ston Bay	21/07	<i>Padina</i>
		Drvenik	21/07	<i>Padina</i>
		Lanterna	22/07	<i>Padina</i>
		Vrbroska	22/07	<i>Padina</i>
		Šunj	26/07	<i>Padina</i>
		Dubrovnik	27/07	<i>Padina</i>

L'effort d'échantillonnage a été important cependant tous les échantillons n'ont pas pu être traités pendant la thèse par faute de temps. Le focus a été mis sur ceux des *Padina* et du turf ainsi que sur les sites où le bloom était le plus important.

2. Paramètres environnementaux

2.1 Mer de Ligurie – Baie de Calvi

Les paramètres environnementaux ont été enregistrés en baie de Calvi, au niveau de la station marine de STARESO (42°34'52.9"N 8°43'50.3"E). La salinité et la température ont été mesurées à l'aide d'un capteur CTD (Conductivité Température Profondeur) (EXO 2, YSI). Pour les nutriments et la chlorophylle a (Chl a), les prélèvements d'eau ont été faits à 1 m de profondeur par des bouteilles Niskin. Le phosphate, le silicate, l'ammonium, le nitrate et le nitrite ont été analysés à l'aide de SAN-Skalar selon la méthode décrite par (Strickland and Parsons, 1972) pour un système automatique (Grasshoff *et al.*, 1999) adapté aux environnements oligotrophes. Pour la mesure de Chl a, les prélèvements d'eau ont été filtrés sur des filtres Whatman 25 mm G/F (0,7 µm et stockés à -20 °C

jusqu'à analyse. La Chl a, a été mesurée par fluorométrie selon la méthode Welschmeyer (1994), en utilisant un fluorimètre Trilogy, Turner Design. Les mesures de biovolumes de zooplancton ont été faites en réalisant des traits horizontaux de subsurface (2-3 m de profondeur). Les transects ont été effectués à 2 km/h pendant 20 min. L'échantillonnage a été effectué entre 7 h et 9 h (heure locale) à l'aide d'un filet WP2 de maillage 200 µm avec un diamètre d'ouverture de 60 cm. Les échantillons ont été concentrés, puis conservés dans une solution de formaldéhyde tamponnée à 4 %. Leurs biovolumes ont ensuite été déterminés à l'aide d'une éprouvette graduée.

Les données de 2016 à 2022 ont été utilisées pour les nutriments et pour la chlorophylle et les données de 2017 à 2022 ont été exploitées pour la température et la salinité, en prenant seulement les mesures prises dans les 10 premiers mètres.

2.2 Mer Adriatique – Côtes Croates

Les paramètres physico-chimiques : température, salinité, oxygène, Chl a, silicate (SiO_4), phosphate (PO_4), nitrate (NO_3^-), nitrite (NO_2^-), ammonium (NH_4^+) et azote total ($\text{NIT} = \text{NO}_3^- + \text{NO}_2^- + \text{NH}_4^+$) ont été relevés à Hvar et Mljet.

La température et la salinité ont été mesurées in situ à l'aide d'une sonde multiparamétrique WTW Multiline P4. Des échantillons d'eau ont été prélevés pour l'analyse des nutriments et de la Chl a. Les échantillons pour l'ammonium ont été fixés immédiatement après le prélèvement avec du phénol/éthanol, conservés à 4 °C et analysés ultérieurement selon Ivančić et Degobbis (1984). Pour les autres nutriments, ils ont été conservés à -20 °C jusqu'à leur analyse, suivant les indications de Strickland et Parsons (1972). Les échantillons de chlorophylle ont été également conservés à -20 °C, puis les pigments ont été extraits dans de l'acétone en suivant le protocole de Holm-Hansen *et al.*, (1965). Les pigments sont mesurés par fluorométrie à l'aide d'un fluorimètre de laboratoire Turner TD-700 (Sunnyvale, CA) calibré avec de la Chl a pure (Sigma).

3. Substrats étudiés

3.1 Turf

Le terme turf peut être utilisé en milieu terrestre et marin. Dans cette étude, le terme turf correspond à la définition donnée par (Connell *et al.*, 2014). C'est-à-dire un tapis algal de quelques millimètres à centimètres, recouvrant les substrats rocheux. Cet assemblage est composé principalement de petites branches d'*Halopteris scoparia*, de petites algues calcaires et filamenteuses. Retenant également des sédiments le turf est à la base des écosystèmes marins et permet ensuite à de nombreuses macroalgues de s'y développer, notamment des Dictyotales (Figure 0-13).

3.2 *Padina* spp.

Faisant partie de la famille des Dictyotales, le genre *Padina* Adanson a la particularité de comprendre des espèces calcifiantes. Ces algues brunes ont un thalle érigé complanaire ou flabellé, jusqu'à 20 cm de longueur. Le thalle est annuel, cependant le crampon lui reste attaché au substrat. Cette algue photophile comporte des stries calcifiées concentriques. On peut observer sur la partie supérieure et interne du thalle (Figure 0-13), des poils absorbants qui permettent d'augmenter la surface d'échange avec le milieu. Ce genre est largement distribué dans les mers tropicales et tempérées (Ni-Ni-Win *et al.*, 2011).

Dans ce manuscrit, on mentionne *Padina* spp. et non pas *Padina pavonica* (Linnaeus) Thivy (espèce majoritaire en Méditerranée) car les différentes espèces du genre sont très semblables morphologiquement et nécessitent une identification moléculaire.

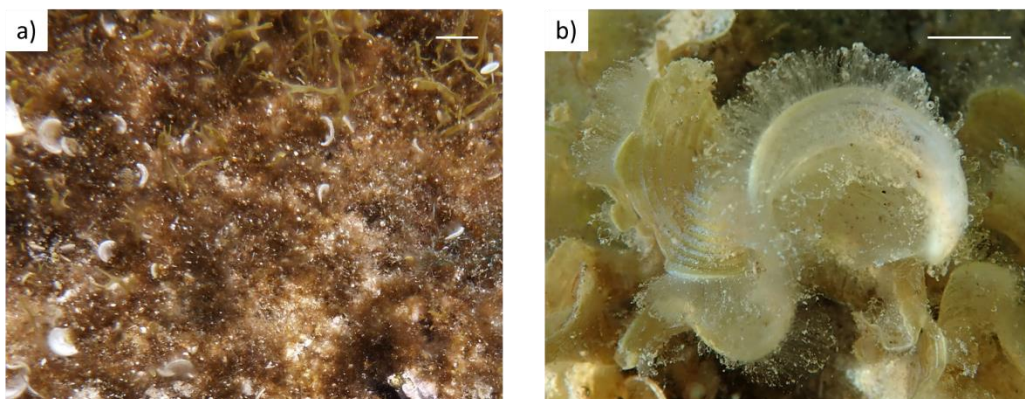


Figure 0-13: (l'échelle correspond à 2 cm) a) Turf en baie de Calvie, France, 3 m de profondeur
b) Thalles de *Padina* spp., Mljet, Croatie, 2 m de profondeur

4. Culture cellulaire

4.1 Isolement et maintien des cultures

Les cellules d'*Haslea* bleues ont été isolées sous un microscope optique, à l'aide d'une pipette Pasteur en verre, puis transférées dans un milieu d'eau de mer artificielle. Trois étapes successives d'isolement ont été faites pour que la culture soit considérée monoclonale et éviter les contaminants. Cependant les bactéries associées à la cellule y restent attachées et se retrouvent également dans la culture.

Le milieu utilisé pour maintenir les cultures a été fabriqué à partir de poudre Instant Ocean (Aquarium Systems, France), diluée dans de l'eau distillée puis autoclavée. Le milieu a ensuite été enrichi en silicates, phosphates, nitrates, métaux et vitamines préalablement filtrés sur 0,2 µm (Tableau 0-5).

Tableau 0-5: Composition du milieu de culture réalisé à base de poudre d'Instant Ocean

Composés	Quantité pour 1 L d'eau distillée
Sels Instant Ocean	28 g
Silicates (Na ₂ SiO ₃ , 9 H ₂ O) 30 g.L ⁻¹	1 mL
Phosphates (NaH ₂ PO ₄ , 2 H ₂ O) 3,494 g.L ⁻¹	1 mL
Nitrates (NaNO ₃) 46,7 g.L ⁻¹	1 mL
Métaux, solution 1 (Na ₂ EDTA, 2H ₂ O; FeCl ₃ , 6H ₂ O; FE NH ₄ -citrate) x1000	1 mL
Métaux, solution 2 (Na ₂ EDTA, 2H ₂ O; ZnSO ₄ , 7H ₂ O; CoSO ₄ , 7H ₂ O; MnSO ₄ , H ₂ O; CuSO ₄ , 5H ₂ O; Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O; NiCl ₂ , 6H ₂ O, NaSeO ₃) x10000	0,1 mL
Vitamines : Thiamine HCl (297 nM), Thymine (950 nM), inositol (1110 nM), CA-d-pantothénate (8,39 nM), Acide nicotinique 32,5 nM), Biotine (4,09 nM), B12anocobamine (1,47 nM) et Acide folique (0,18 nM)	0,1 mL

Les cultures ont été maintenues en Erlenmeyers (stériles) dans des conditions contrôlées : 16 °C, irradiance de 400 µmol photons/m²/s, lumière/obscurité 16:8. L'éclairage des cultures a été assuré par des tubes fluorescents (Philips TLD 36W/965) et l'irradiance a été mesurée à l'aide d'un capteur quantique Li-Cor LI-189.

Afin d'être maintenues en phase exponentielle de croissance, les cultures ont été repiquées tous les 10 jours. Pour cela, les cultures ont été homogénéisées et un cinquième de celles-ci a été versé dans un nouvel Erlen et du milieu est ajouté. Le repiquage a été réalisé en milieu stérile, sous PSM (poste sécurité microbiologique) afin d'éviter les contaminations extérieures.

4.2 Processus d'axénisation

En vue d'obtenir des cultures monoclonales sans bactérie, des tests d'axénisation ont été réalisés. Pour cela un mélange d'antibiotiques Fisher (Tableau 0-6) a été utilisé dilué à 1 ‰.

Tableau 0-6: Composition du mixe d'antibiotiques

Antibiotique	Action	Concentration initiale
Pénicilline	Bactériostatique	10.000 IU/mL
Streptomycine	Antibactérien cytotatique et cytotoxique	10 mg/mL
Amphotéricine B	Antifongique	25 µg/mL

La présence de bactéries a été vérifiée en déposant du milieu de culture sur de la gélose nutritive salée.

Les résultats ne sont pas présentés dans le manuscrit car l'amélioration des protocoles est toujours en cours.

5. Identification taxonomique

5.1 Identification moléculaire des souches d'*Haslea*

Au vu de leur similarité morphologique, l'identification moléculaire est nécessaire pour vérifier les espèces d'*Haslea* récoltées sur le terrain. Pour cela 50 mL d'une culture monoclonale de densité d'au moins 5^{e5} cellules/mL ont été centrifugés à 3500 g pendant 15 min. L'extraction d'ADN a été effectuée sur le culot en utilisant le kit Plant II Nucleospin MN© et en suivant les instructions du fabricant.

La quantité et la qualité de l'ADN ont été vérifiées à l'aide d'un Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, US). Le marqueur chloroplastique *rbcl* (1336 pb) a été amplifié en utilisant les amorces *rbcl*-forward (GACCGTTACGAATCTGGTG) et *rbcl*-reverse (GACCACATGTTAGCAGC) et le kit Promega GoTaq® Flexi DNA Polymerase. Le programme suivi était : dénaturation 0,5 min à 94 °C, hybridation 1 min à 54 °C et élongation 1 min à 72 °C, sur 35 cycles. Les produits PCR ont été envoyés à la plateforme génomique AZENTA, Allemagne pour un séquençage Sanger.

5.2 Identification morphologique des diatomées

Afin d'éliminer la matière organique, les échantillons ont été bouillis dans une quantité équivalente de peroxyde d'hydrogène (30 %) pendant 24 heures, puis lavés plusieurs fois avec de l'eau désionisée. Dix gouttes de la suspension ont été séchées à l'air libre sur une lamelle qui a ensuite été montée sur une lame à l'aide de colle Naphrax (Brunel Microscopes Ltd, Wiltshire, UK). Les lames ont été observées sous un microscope optique Zeiss Axio Scope A1 avec un objectif à immersion Zeiss Plan-Apochromat x100 avec contraste interférentiel différentiel (Carl Zeiss Ltd, Oberkochen, Allemagne). Les photos microscopiques ont été prises avec un appareil photo Zeiss Axio Cam ICc5.

En microscopie optique, un minimum de 300 valves de diatomées a été compté et identifié (Bak *et al.*, 2012 ; Schrader & Gersonde 1978). L'identification taxonomique a été principalement réalisée en utilisant le guide floristique de Witkowski *et al.* (2000a). Pour plus de précisions sur le genre *Mastogloia*, le guide floristique (Loir and Novarino, 2016) a été consulté.

Pour vérifier la taxonomie de certaines espèces, des images ont également été réalisées en MEB (Microscopie électronique à balayage). Les échantillons ont été pipetés sur un filtre en membrane polycarbonate (Whatman Nuclepore avec des pores de 1 µm). Une fois séchés, ils ont été montés sur des plots en aluminium et revêtus de 20 nm d'or ou d'alliage or-palladium par pulvérisation cathodique par un métalliseur Q150T, Quorum Technologies (Laughton, UK). Les observations ont été réalisées à l'aide du microscope à balayage à ultra-haute résolution SU8020, Hitachi (Tokyo, Japan) de l'Université de Szczecin (Pologne).

5.3 Identification moléculaire des communautés bactériennes

- **Tests des protocoles d'extraction d'ADN**

Plusieurs protocoles ont été testés afin d'améliorer le rendement et la qualité de l'ADN extrait.

Les échantillons ont été centrifugés afin d'enlever l'excès d'eau de mer et éthanol. Deux méthodes de broyage ont été testées pour comparer leur efficacité : un broyage dans l'azote liquide ou une lyse cellulaire via des microbilles. En parallèle, les trois protocoles suivants ont été essayés pour optimiser l'extraction d'ADN : protocole CTAB (Annexe 1), kit Plant II Nucleospin MN© et kit Soil Nucleospin MN© en suivant le protocole du fournisseur.

Pour les échantillons ayant un bon rendement, l'amplification par PCR a été testée en utilisant les amorces bactériennes des régions V3 V4 du 16S rDNA avec le programme suivant : dénaturation à 94 °C pendant 1 min, hybridation à 52 °C pendant 1 min, élongation à 72 °C pendant 1 min. Des gels d'électrophorèse ont ensuite été réalisés pour vérifier l'amplification et la longueur du fragment d'ADN.

Ces extractions d'ADN ont eu soit un rendement trop faible, soit la qualité n'était pas suffisante pour réaliser les PCR.

- **Protocole validé pour l'extraction des ADN bactériens**

L'extraction de l'ADN a été réalisée à l'aide du kit Power Soil (Qiagen, US), conformément aux instructions du fabricant. La qualité et la quantité d'ADN ont été vérifiées en utilisant un Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, US) et ajustées à 20 ng/μL. Les régions hypervariables V3 et V4 de l'ADNr 16S ont été amplifiées par PCR et séquencées par la plateforme AZENTA, Allemagne.

Ce protocole a été mis en place pour les échantillons bactériens prélevés en baie de Calvi sur 2 sites (Port et Oscelluccia) en 2021.

6. Analyses des données et Statistiques

6.1 Cartographie

Les cartes ont été réalisées en utilisant le logiciel QGIS (version 3.16). Les cartographies de la Corse ont été réalisées en utilisant la base de données d'orthophotographie aérienne IGN2017 et le trait de côte du SHOM/IGN, histolittv2 2013. Pour les cartographies de Croatie, le fichier raster Google Satellite, Map data 2015 a été utilisé pour réaliser le fond de carte et le trait de côte est issu des données de l'agence européenne de l'environnement, EEA coastline, 2017.

6.2 Bio-informatique

- **Arbre Phylogénétique**

L'arbre phylogénétique a été construit à partir des séquences du marqueur chloroplastique *rbcL* amplifiées par PCR (les séquences ADN ont été déposées sur Genbank avec un numéro d'enregistrement) et des séquences *rbcL* déjà disponibles sur Genbank. L'ensemble des séquences a été aligné en utilisant l'algorithme MUSCLE sur le logiciel MEGA X et coupées à une longueur finale de 973 pb. L'arbre de maximum de vraisemblance a été réalisé avec 1000 répliques de bootstrap et en utilisant *Navicula veneta* et *Seminavis robusta* comme racines.

- **Données bactériennes**

Les librairies ont été réalisées par séquençage Illumina-MiSeq, 250 pb paired-end. Le logiciel Cutadapt (v1.9.1) a été utilisé pour fusionner chaque paire de reads. Le logiciel Qiime (1.9.1) (Caporaso *et al.*, 2010) a permis de vérifier la qualité des reads et supprimer les séquences chimériques. Les séquences ayant plus de 97% de similarité avec les OTU (*Operational taxonomic unit*) ont été considérées comme étant les mêmes OTU. Le nombre total d'OTU dans chaque échantillon variait de 14704 à 51275. L'annotation des espèces a été faite en comparant les OTU à la base de données Greengenes en utilisant l'algorithme bayésien RDP sur le logiciel Qiime (DeSantis *et al.*, 2006).

6.3 Statistiques

Les analyses statistiques ont été faites en utilisant le logiciel R, version 4.0.3. Sur les bar plots représentant l'abondance, "Other" représente le niveau du phylum avec une AR (abondance relative) supérieure de 1 %, le graphique a été réalisé à l'aide du paquet ggplot2. La transformation de Hellinger a été effectuée sur l'abondance bactérienne totale (Legendre and Gallagher, 2001). Dans l'analyse, on a utilisé soit la RA soit la HA (Hellinger abundance). La statistique de Hopkins a été réalisée pour vérifier la possibilité de regroupement. Les méthodes k-mean ont été utilisées pour effectuer le regroupement sur l'ACP.

La diversité alpha a été estimée en utilisant les indices de Shannon et de Simpson via le paquet vegan sur R (Shannon, 1948; Somerfield *et al.*, 2008). L'indice de Shannon peut être comparé entre les échantillons et l'indice de Simpson peut également être comparé avec les indices d'autres études. Des tests T ont été effectués pour vérifier la signification statistique entre les conditions. La diversité bêta a été mesurée en utilisant l'UniFrac non pondéré (Lozupone and Knight, 2005) et l'UniFrac pondéré (Lozupone *et al.*, 2007). Une NMDS (Non-Multidimensional Scaling) a été effectué sur la matrice de distance de la diversité bêta afin de visualiser le regroupement des échantillons, en utilisant le paquet vegan sur le logiciel R. Une analyse multivariée permutative de la variance PERMANOVA (Adonis3, package GUniFrac) basée sur la dissimilarité de Bray-Curtis avec 999 permutations a été effectuée pour vérifier les résultats du regroupement.

Chapitre 1

Diversité des *Haslea*

1. Contexte

Les premiers frustules de diatomées datent du Jurassique mais le pic de diversité pour les diatomées pennées a eu lieu pendant l'Oligocène. Le genre *Haslea* serait apparu avant ce pic avec comme espèce fossile *Haslea antiqua* Fenner datant de la fin du Paléocène (Fenner, 2015). Le genre comprend actuellement 45 espèces répertoriées sur Algaebase, dont 5 espèces capables de produire des pigments de type marennine. La classification des espèces au sein du genre est régulièrement mise à jour avec un dissensus sur le fait de baser la classification sur des critères morphologiques ou moléculaires (Li *et al.*, 2017; Lobban *et al.*, 2020; Sterrenburg *et al.*, 2015).

Les premières espèces intégrées au genre étaient de diatomées fusiformes transférées des genres *Amphipecta*, *Navicula* et *Stauroneis* de par leur forme fusiforme et la présence de bandes slicées continues parallèles visibles en MEB. Depuis, des bandes longitudinales continues ont également été observées chez d'autres genres comme *Navicula* comme récemment décrit dans Sabbe *et al.* (2019). Des espèces avec des morphologies de valves différentes mais avec des bandes slicées continues ont été transférées des genres *Amphora*, *Gyrosigma* et *Pleurosigma* vers *Haslea*. Des données moléculaires ont également appuyé le transfert de *H. nipkowii* (Meister) Poulin & Massé basionyme *Gyrosigma nipkowii* Meister du genre *Gyrosigma* à *Haslea*.

Dans l'autre sens, les espèces *Navicula avium* Tiffany, Herwig & Sterrenburg, *Navicula howeana* (Hagelstein) Giffen et *Navicula tsukamotoi* Sterrenburg & Hinz qui avaient été décrites ou transférées dans le genre *Haslea* appartiennent finalement, suite à une identification moléculaire au genre *Navicula* (Li *et al.*, 2017).

Du fait de l'intérêt grandissant pour le genre *Haslea* de par des espèces en lien avec l'ostréiculture et ayant un intérêt patrimonial et économique comme *Haslea ostrearia* (Gaillon) Simonsen et *Haslea silbo* Gastineau, Hansen & Mouget, de nouvelles espèces d'*Haslea* ont pu être identifiées et décrites. Afin de s'assurer que ces espèces sont réellement nouvelles, un inventaire des espèces déjà décrites avec leurs caractéristiques morphologiques a été réalisé. De plus, quand elles étaient disponibles, les données moléculaires ont été intégrées à l'étude.

Ce chapitre décrit trois nouvelles espèces d'*Haslea* non-bleues.

Morphological and molecular description of three new *Haslea* species, an inventory of the genus

Séveno J.¹, Gastineau R.², Witkowski A.², Lemieux C.³, Turmel M.³, Car A.⁴, Robledo R.⁵,
Badawi M.¹, Leignel V.¹ and Jean-Luc Mouget J-L.¹

(to be submitted)

1 BIOSSE Laboratory, Le Mans University, France

2 Institute of Marine Sciences, University of Szczecin, Poland

3 Institut de Biologie Intégrative et des Systèmes, Université Laval, Canada

4 Institute for Marine and Coastal Research, University of Dubrovnik, Croatia

5 CINVESTAV research center, Mérida, México

2. Abstract

The *Haslea* genus has been distinguished from *Navicula* by Simonsen 1974 based on morphological criteria visible thanks to SEM development. Since then, new species have been discovered and some species originally described in another genus have been moved to *Haslea*. The holotype of the genus is *Haslea ostrearia*, a lanceolate 'blue' diatom that has long been known to produce marennine, a water soluble blue-green pigment. The genus now encompasses species with various valve shapes, producing or not marennine-like pigments. After a morphological study and multigene phylogeny analysis, we described three new *Haslea* species. Morphologically *H. aakal* sp. nov., *H. corsicuricta* sp. nov. et *H. forojuliensis* sp. nov. are lanceolate with a number of transapical and longitudinal striae close to *H. apolloniae* and *H. pseudostrearia*. Their complete chloroplast genomes were sequenced and it appeared that these species belong to a same cluster, characterized by the loss of a photosystem I gene. These new additions and the inventory of existing species brought the number among the genus to 45 species.

3. Introduction

Diatoms are photosynthetic unicellular organisms with a siliceous cell wall made of two valves forming the frustule. By accounting for one-fifth of photosynthesis on Earth (Nelson *et al.*, 1995b), diatoms play a key role in oceanic biogeochemical cycles in seas and oceans for carbon, oxygen and silica (Tréguer and De La Rocha, 2013). The genus *Haslea* is part of the family of Naviculaceae, described by Simonsen (1974) as lanceolate cells with a straight raphe and acute apex. At the time, Simonsen distinguished *Haslea* from the genera *Navicula*, *Amphipleura*, *Gyrosigma*, *Pleurosigma* using scanning electron microscopy (SEM). The common morphological features of the genus are, in external view, parallel continuous longitudinal bands of silica and in internal view, longitudinal bands crossing transversal bands, both forming a grid pattern with squarish alveoli. These two systems are held together by perforated walls called *saepes*, thus creating a double-layer structure (Sterrenburg *et al.*, 2015). In contrast to *Navicula*, *Haslea* central raphe endings are thin with a possible short accessory rib and the axial costa is prominent over apical pore (Poulin *et al.*, 2004). In light microscopy (LM) *Haslea* cells possess two parietal chloroplasts laying on each side of the cell in valval view. The type species of the genus is *Haslea ostrearia* (Gaillon) Simonsen, previously named *Vibrio ostrearius* by Gaillon, (1820), then *Navicula ostrearia* by (Bory, 1824), also commonly known as the “blue diatom”. Indeed, this species is well known for producing marennine, a water-soluble blue pigment showing allelopathic, antibacterial, antiviral and antioxidant activities (Falaise *et al.*, 2019; Gastineau *et al.*, 2012b; Pouvreau *et al.*, 2007a). This pigment is also responsible for the greening of oysters (Gastineau *et al.*, 2018). Since, four *Haslea* species producing marennine-like pigments have been described, namely *Haslea karadagensis* Davidovich, Gastineau & Mouget, *Haslea nusantara* Mouget, Gastineau & Syakti, *Haslea provincialis* Gastineau, Hansen & Mouget and *Haslea silbo* Gastineau, Hansen & Mouget.

The genus *Haslea* currently refers to 45 species with 37 taxonomically accepted species according to the specialized databases Algaebase (Guiry and Guiry, 2022) and WORMS (World Register of Marine Species, doi:10.14284/170) (both accessed on 12/09/22). Our knowledge of the diversity of this genus has considerably increased in the last decade due to the combined use of SEM observations and molecular phylogenetic analysis (*e.g.*: Li *et al.*, 2017; Lobban *et al.*, 2020; Sterrenburg *et al.*, 2015; Talgatti *et al.*, 2014). Within the genus, the species can inhabit various ecological niches. For example, species like *Haslea crucigeroides* (Hustedt) Simonsen and *Haslea vitrea* (Cleve) Simonsen were isolated from sea-ice from the Arctic (Brown *et al.*, 2020). While *H. nusantara* have been found in the tropical waters of Indonesia and Vietnam (Prasetya *et al.*, 2019). The genus is predominantly benthic with a putative tychopelagic behavior in the case of *H. ostrearia* (Pouvreau *et al.*, 2006). One species only is known for being planktonic, *Haslea wawrikan* (Hustedt) Simonsen. The genus also displays important

morphological variabilities. While most species are lanceolate, some are sigmoid, such as *Haslea nipkowii* (Meister) Poulin & Massé, *Haslea sigma* Talgatti, Sar & Carvalho Torgan, *Haslea staurosigmaidea* Sterrenburg & Tiffany. Some *Haslea* species display shapes more resembling to *Halamphora* spp., for example *Haslea feriarum* Tiffany & Sterrenburg or an arcuate shape in the case of *Haslea arculata* Lobban & Ashworth.

On the other hand, some species have been described or transferred in *Haslea* genus based on morphological criteria but after molecular identification are in the end part of *Navicula avium* Tiffany, Herwig & Sterrenburg, *Navicula howeana* (Hagelstein) Giffen and *Navicula tsukamotoi* Sterrenburg & Hinz (Li *et al.*, 2017). In fact the presence of parallel continuous striae have also been observed in *Navicula* genus (*e.g.*: Sabbe *et al.*, 2019).

In the frame of several sampling campaigns aimed at prospecting blue *Haslea* diversity, different strains of non-blue species of *Haslea* spp. from the Caribbean and Mediterranean Seas have been observed, isolated and cultivated. The purpose of the current article is to describe three species of non-blue *Haslea* spp., which have proved to be new to science.

4. Methods

4.1 Sampling and culturing

Samples were collected in four different locations, three in the Mediterranean Sea: Fréjus (France), Porto-Vecchio (France) and Baška (Croatia), and one in the Caribbean Sea in Cancún (Mexico) by either taking surface sediment or scrapping biofilm on rocks and macroalgae (Table 1-1). Cells were isolated using glass Pasteur pipettes and then transferred in artificial seawater medium ASW (Perkins *et al.*, 2006). If needed, up to three successive steps of re-isolation were performed before cultures were considered monoclonal. Cultures were grown and maintained in Erlenmeyer flasks under controlled conditions, 16 ± 1 °C, irradiance of 400 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$, light/dark 16:8, at the university of Le Mans. Culture illumination was provided by fluorescent tubes (Philips TLD 36W/965) and irradiance was measured using a Li-Cor LI-189 quantum meter coupled with a 2P Li-Cor Q21284 quantum sensor.

Table 1-1: Sampling details for each species

Species	Locality	Substrate	Sampling date	GPS coordinates
<i>H. aakal</i>	Punta Nizuc, Cancún, México	Sediment biofilm	13/03/18	21°02'02.4"N 86°46'48.0"W
<i>H. corsicuricta</i>	Baška, Krk island, Croatie	<i>Padina</i> spp.	28/08/20	44°58'10.8"N 14°45'41.8"E
<i>H. corsicuricta</i>	Porto-Vecchio, Corse, France	Wood biofilm	21/04/19	41°37'05.0"N 9°19'14.4"E
<i>H. forojulensis</i>	Fréjus, France	Rocks biofilm	07/03/19	43°25'00.8"N 6°44'41.6"E

4.2 Microscopy

Pictures of live cells were taken using Zeiss AxioStar plus microscope with a Zeiss AxioCam Cc1 (Carl Zeiss, Jena, Germany). For frustule examination, samples were boiled with 30 % H₂O₂ and rinsed three times with deionized water, mounted on glass slides with Naphrax and observed in LM using an Olympus BX51 (Tokyo, Japan), with a DP72 digital camera, in differential interference contrast and phase contrast. For SEM observations, cleaned frustules were air-dried onto circular coverslip placed on an aluminum stub and sputter coated with either gold, platinum, or palladium-platinum alloy, using a Q150T coater from Quorum Technologies (Laughton, U.K.). Observations were done using a SU8020 ultra-high resolution scanning microscope from Hitachi (Tokyo, Japan) (JEOL, Tokyo, Japan).

4.3 Next Generation Sequencing

Biomass was gathered from cultures during exponential growth phase and DNA was extracted following the protocol from Doyle and Doyle (1990). Sequencing was conducted at two different facilities. *Haslea corsicuricta* and *H. forojuliensis* were sequenced at the Beijing Genomic Institute, Shenzhen (China) on a DNBSEQ platform, for a total of 60 millions of clean 100 bp paired-end reads per sample. *Haslea aakal* was sequenced on a MiSeq platform at the 'plateforme d'analyse génomique' from the IBIS institute, at Laval University (Québec, Canada) for a total of 20 million clean 300 bp paired-end reads. Data were assembled using SPAdes 3.15.5 (Bankevich *et al.*, 2012) with k-mer of 85 for DNBSEQ reads and 125 for MiSeq reads. The contigs corresponding to plastid genomes were retrieved from assembly files by customized blastn queries and verified with Consed (Gordon *et al.*, 1998). Annotation was done using the same set of tools as previously described (Gastineau *et al.*, 2021c; Turmel *et al.*, 2017) and tRNA genes were localized with tRNAscan-SE 1.23 (Chan and Lowe, 2019). Maps of the organellar genomes were obtained using OGDRAW (Greiner *et al.*, 2019). for the plastid genomes.

4.4 Phylogeny

Protein-coding genes were extracted from the plastomes of several species of raphid pennate diatoms and the araphid pennate species *Synedra acus* Kützing was used as an outgroup. Genes were concatenated within each species by alphabetical order in a similar manner to (Górecka *et al.*, 2021) and Dabek *et al.* (2022). The second copy of the inverted repeat was removed before alignment. Sequences were aligned using MAFFT 7 (Kato & Standley, 2013) with the -auto option and trimmed by trimAl (Capella-Gutiérrez *et al.*, 2009) with the -automated1 option. The alignment was used to

choose the best evolutionary model according to ModelTest-NG (Darriba *et al.*, 2020). Maximum Likelihood phylogenies were conducted with IQ-TREE 2.2.0 (Minh *et al.*, 2020), with 1000 bootstrap replications.

5. Results

5.1 Morphology and taxonomy descriptions

Haslea aakal Gastineau, Séveno & Mouget sp. nov.

Holotype: slide was deposited at the Szczecin collection under accession number SZCZJ 2169

Etymology: áak'al means lagoon in Maya as type locality being Nizuc lagoon in the Yucatán peninsular region, the historic central location of the Mayan civilization.

Type locality: Biofilm on sediment in Nizuc lagoon (43°25'00.8"N, 6°44'41.6"E), Cancún Quintana Roo, Mexico (Table 1-1).

Description: Using light microscopy, in valve view, cells appear pennate and fusiform with two parietal chloroplasts on each side of the girdle (Figure1-1a). Cells are in average $50.8 \pm 0.9 \mu\text{m}$ (max 52.8 μm , min 49.3 μm) long and $6.9 \pm 0.8 \mu\text{m}$ wide (max 8.5 μm , min 5.8 μm) (values are means \pm SD, n=20) with a straight raphe. In SEM, valves are narrowly lanceolate with rostrate apices where longitudinal and transapical striations are visible. In 10 μm , there are 37 parallel transapical striations and 43 parallel longitudinal striations with squarish alveoli (ratio l/w between 0.8-1.2, average 1.0, n=20). A thin axial costa goes along most of the raphe on one side, stopping 1-2 μm before the apex (Figure1-2a). Central raphe endings are straight and very thin in internal view (Figure1-2b), and in external view they are tiny crook-shaped that tend to fuse (Figure1-2c). In external valve view, silica strips are longitudinal, parallel and abutting the peripheral slits (Figure1-2c). External raphe ending are straight with an helictoglossa visible in internal view (Figure1-2d) and deflected in external view (Figure1-2e).

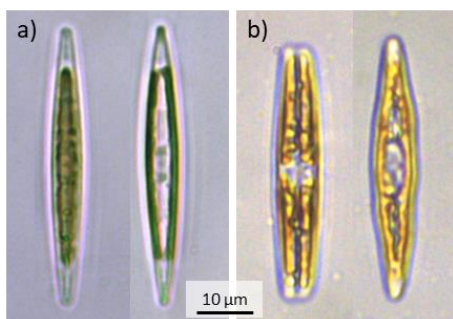


Figure 1-1: a) *H. aakal* from Cancún, March 2018; b) *H. corsicuricta* from Baška August 2019; both with girdle view on the left and valvar view on the right

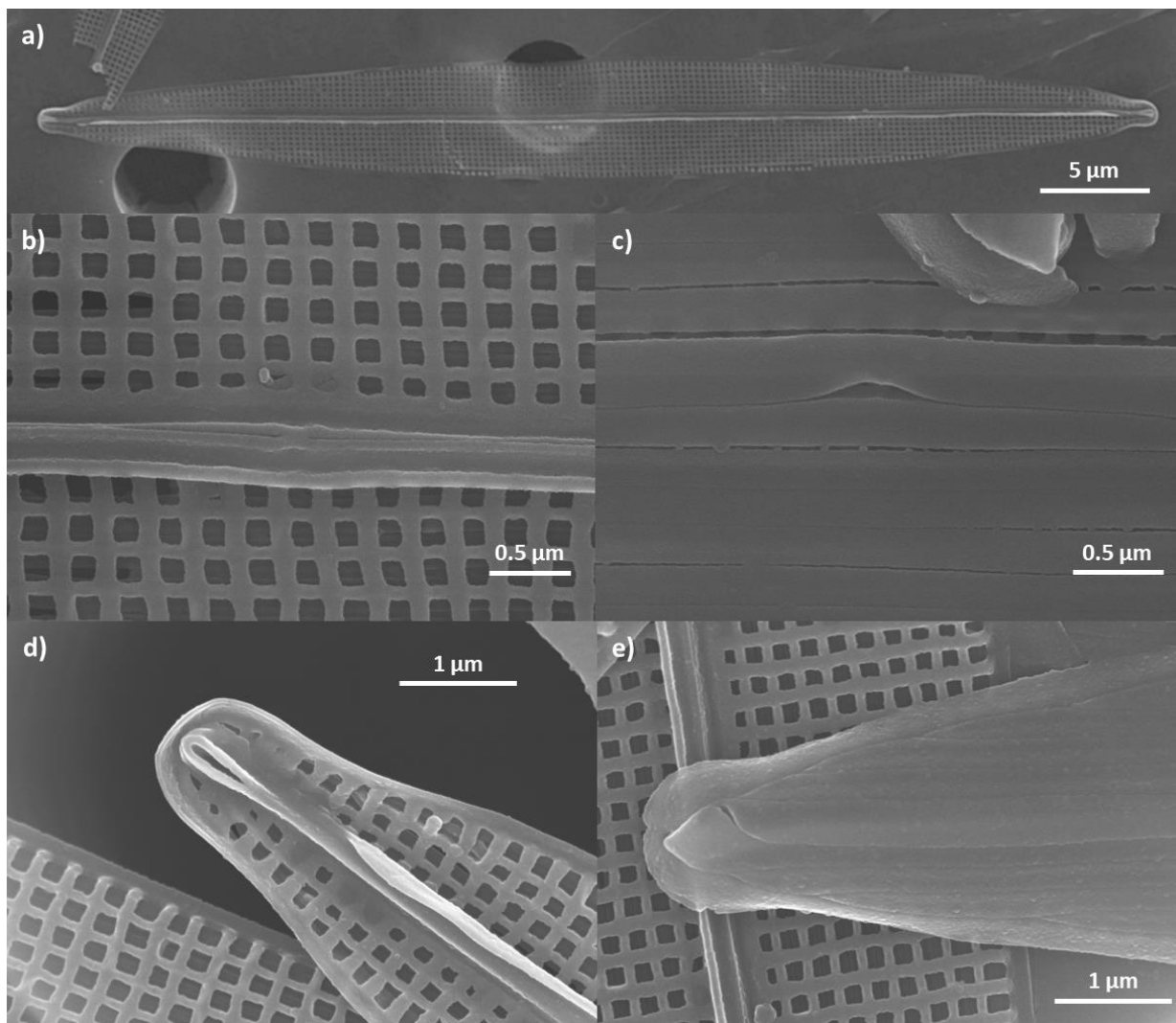


Figure 1-2: *H. aakal*; specimen from Cancún, March 2018; a) whole valve in internal view; central raphe endings b) in internal view and c) in external view; terminal raphe endings d) in internal view and e) in external view

Haslea corsicuricta Falaise, Mouget & Séveno sp. nov.

Holotype: slide was deposited at the Szczecin collection under accession number SZCZJ 2170

Etymology: Contraction of the two latin words *Corsica* and *Curicta* (Krk), corresponding to the two islands where the species was first discovered.

Type locality: Biofilm on wood in a lagoon of Porto-Vecchio (41°37'05.0"N 9°19'14.4"E), Corsica, France. Another strain of the same species was collected from *Padina* sp. thallus in Baška (44°58'10.8"N 14°45'41.8"E), Krk Island (Croatia).

Description: Using light microscopy, in valve view, cells appear pennate and fusiform with two parietal chloroplasts on each side of the girdle (Figure1-1b). Cells are in average $62.8 \pm 2.9 \mu\text{m}$ long (max 67.1 μm , min 56.2 μm) and $9.3 \pm 0.9 \mu\text{m}$ wide (max 10.6 μm , min 7.5 μm) (values are means \pm SD, n=20) with a straight raphe. In SEM, valves are narrowly lanceolate with acute apices where longitudinal and transapical striations are visible. In 10 μm , there are 39 parallel transapical striations and 38 parallel

longitudinal striations with almost square alveoli (ratio l/w between 1-1.4, average 1.2, n=20). An axial costa goes along most of the raphe on one side, stopping 1-2 μm before the apex (Figure1-3a). In internal view, central raphe endings are thin and straight with an accessory rib (Figure1-3b). In external view they look like two dots less than 1 μm apart (Figure1-3c). In external valve view, silica strips are longitudinal, parallel and abutting the peripheral slits (Figure1-3e). External raphe endings are straight with an helictoglossa in internal view (Figure1-3d) and are deflected in external view (Figure1-3e).

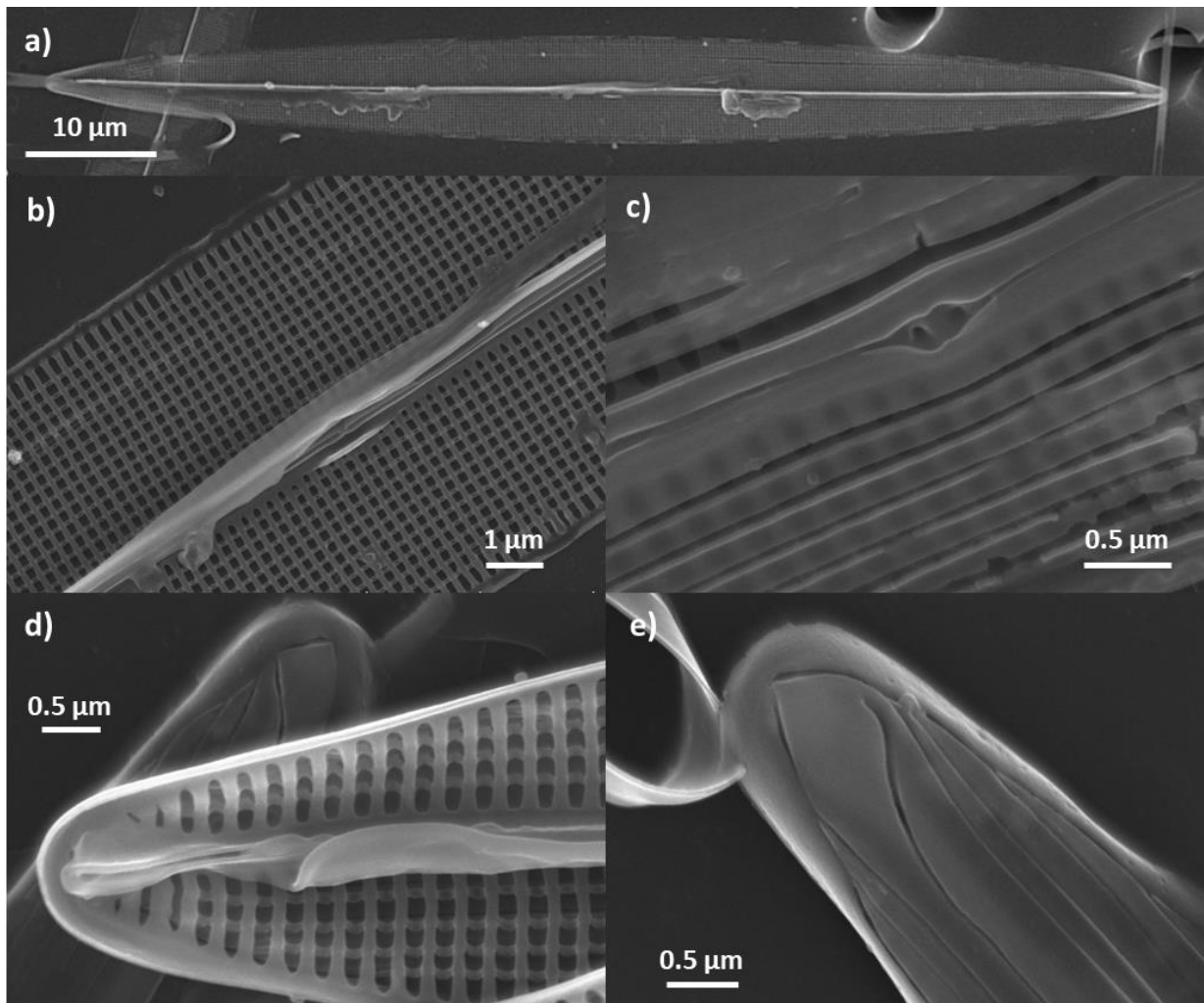


Figure 1-3: *H. corsicuriecta*; specimen from Corsica, March 2019; a) whole valve in internal view; central raphe endings b) in internal view and c) in external view; terminal raphe endings d) in internal view and e) in external view

Haslea forojuliensis Caruso & Mouget sp. nov.

Holotype: slide was deposited at the Szczecin collection under accession number SZCZJ 1887

Etymology: Referring to the type locality Fréjus, Forum Julii in Latin, which means 'Market of Julius'

Type locality: Biofilm on rocks at Fréjus Beach (43°25'00.8"N 6°44'41.6"E), France.

Description Using light microscopy, in valve view, cells appear pennate and fusiform with two parietal chloroplasts on each side of the girdle. Cells are in average $51.1 \pm 0.7 \mu\text{m}$ long (max 52.6 μm , min 49.8

μm) and $8.3 \pm 0.6 \mu\text{m}$ wide (max $9.5 \mu\text{m}$, min $7.2 \mu\text{m}$) (values are means \pm SD, $n=20$). A straight raphe is visible. In SEM, valves are narrowly lanceolate with acute apices, longitudinal and transapical striations are visible. In $10 \mu\text{m}$, there are 34 parallel transapical striations and 32 parallel longitudinal striations with almost square alveoli (ratio l/w between 1-1.5, average 1.2, $n=20$). A thin axial costa goes along most of the raphe on one side, stopping 1-2 μm before the apex (Figure1-4a). In internal view, central raphe endings are thin and straight (Figure1-4b). In external view they look like tiny crook-shaped that tend to fuse (Figure1-4c). In external valve view, silica strips are longitudinal, parallel and abutting the peripheral slits (Figure1-4e). External raphe endings are straight with an helictoglossa in internal view (Figure1-4d) and deflected according to pictures in external view (Figure1-4e).

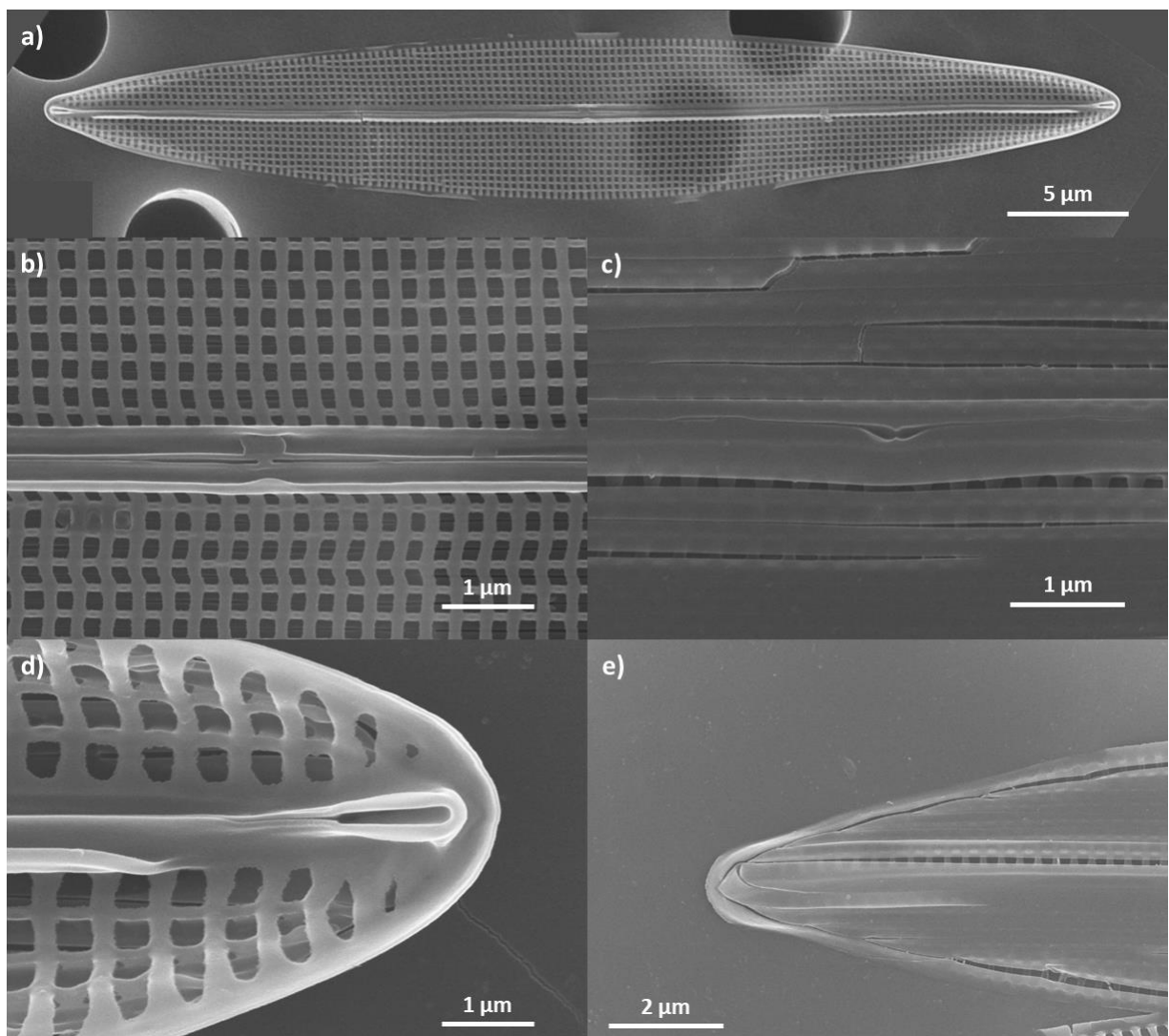


Figure 1-4: *H. forojuliensis*; specimen from Fréjus, March 2019; a) whole valve in internal view; central raphe endings b) in internal view and c) in external view; terminal raphe endings d) in internal view and e) in external view

5.2 Differential diagnosis

Main morphological characteristics of all *Haslea* species yet described and the three new species described in this study are presented in Table 1-2. This table complements the determination key proposed by Lobban *et al.*, (2020) (“key to warm/temperate, delicate, fusiform species of *Haslea* lacking a pseudostauros”).

According to global morphology of the valves, the three species *H. aakal*, *H. forojuliensis* and *H. corsicuriecta* have lanceolate shape. Therefore, they differ from the *Haslea* with sigmoid shape: *H. nipkowii*, *H. sigma*, *H. staurosigoidea*, from the ones with a crescent shape: *Haslea ferarium* (Sterrenburg and Tiffany) or with an arcuate shape: *H. arculata*. These three new *Haslea* species can also be distinguished from the blue *Haslea* clade, which presently encompasses *H. ostrearia*, *H. karadagensis*, *H. provincialis*, *H. nusantara* and *H. silbo*. Indeed, the ability to produce marennine or marennine-like pigments, easily observable using light microscopy, has been confirmed to be specific to this clade, using molecular techniques.

The presence of a pseudostauros (thickening of the central *virgae*) can also discriminate the new species from *H. crucigera*, *H. crucigeroides*, *H. ferarium*, *Haslea quarnerensoides* (Hustedt) Navarro, *Haslea salstonica* Massé, Rincé and Cox, *H. sigma*, *Haslea spicula* (Hickie) Bukhtiyarova, *H. staurosigoidea*, *Haslea sulcata* (Cleve) Simonsen. In internal view, *Haslea apoloniae* Lobban and Perez, *Haslea fusiformis* Lobban and Perez and *Haslea guahanensis* Lobban and Perez have a central silica bars on both sides of the central nodule, *Haslea pseudostrearia* Massé, Rincé and Cox has a long accessory rib on one side. Whereas *H. forojuliensis* and *H. aakal* do not possess an accessory rib, *H. corsicuriecta* presents a very thin accessory rib on one side. In external view, the central raphe fissure of *H. pseudostrearia* is straight and slightly enlarged while it looks like dots in *H. corsicuriecta*.

Another key feature to discriminate between *Haslea* species is the number of transapical and longitudinal striae. For the three new species, the number of transapical striae is in between 34 and 39 in 10 µm and the number of longitudinal striae is in between 32 and 43 in 10 µm, which is in the same range as *H. apoloniae*, *H. fusiformis*, *H. guahanensis*, *H. pseudostrearia*, *H. silbo* and *H. staurosigoidea*.

Table 1-2: Comparative table of Haslea species morphological assess

Genus	species	Discoverers	Blue/ NB	Valve shape	Raphe	Apex	Length (µm)	Width (µm)	Transapical striae in 10 µm	Longitudinal striae in 10 µm	Pseudo- striae	Accessory rib axial costa	Shorter central bar	Internal central raphe ending	External central raphe ending	Internal apex raphe ending	External apex endings
<i>Haslea</i>	<i>aakal</i>	Gastineau, Séveno & Mouguet sp. nov.	NB	linear lanceolate	straight	rostrate	49.9	5.1	9.8	37	43	no		straight, very fine	straight, very fine	deflected	deflected
<i>Haslea</i>	<i>caesariata</i>	Falaise, Mouguet & Séveno sp. nov.	NB	linear lanceolate	straight	acute	82.2	8-8.5	10.4	39	38	no	yes	straight, very fine	straight, very fine	deflected	deflected
<i>Haslea</i>	<i>forajullensis</i>	Caruso & Mouguet sp. nov.	NB	linear lanceolate	straight	acute	44.3	7	6.3	34	32	no		straight, fine	straight, fine	deflected	deflected
<i>Haslea</i>	<i>alexanderi</i>	Lobban & Perez	NB	broadly lanceolate	straight	acute	145-366	21-40	8.3	24-26	29-33	no	yes	slightly deflected	straight and fine	straight	straight
<i>Haslea</i>	<i>alexandrum</i>	Herwig, Tiffany, Hargraves & Sterrenburg	NB	broadly lanceolate	straight	acute	32-39	7.5-8.5	4.4	11	22	no		fine pores	fine pores	deflected	deflected
<i>Haslea</i>	<i>antiqua</i>	Ferner	NB	lanceolate	straight	acute	110-180	15-24	7.4	22-25	24-26	narrow	yes	slightly deflected	slightly deflected	straight	straight
<i>Haslea</i>	<i>apoloniae</i>	Lobban & Perez	NB	narrowly lanceolate	straight	acute	40-83	6-12	7.1	33-35	40-45	no	yes	fine straight	slightly deflected	straight	deflected
<i>Haslea</i>	<i>arculata</i>	Lobban & Ashworth	NB	slightly arcuate	bi-arcuate	deflected	86-109	7-8	12.9	32	73	no	yes	fine straight	dorsally deflected	curved	curved
<i>Haslea</i>	<i>balearica</i>	unknown	NB	lanceolate	straight	acute	NA	NA	NA	NA	NA	no					
<i>Haslea</i>	<i>britannica</i>	(Hustedt & Aleem) Witkowski, Lange-Bertalot & Metzeltin	NB	linear lanceolate	straight	acute	39	8	4.9	18-20	21-24	no		fine	fine	deflected	deflected
<i>Haslea</i>	<i>clevei</i>	Hinz, Hargraves & Sterrenburg	NB	linear oblong	straight	rectangular	85-110	10-12	8.8	23-25	30	no	yes	fuse depressed	straight, very fine	deflected	deflected
<i>Haslea</i>	<i>crucigera</i>	(W.Smith) Simonsen	NB	linear lanceolate	straight	rostrate	65-125	9-12	9.1	12-19	25	yes	yes	deflected	deflected	deflected	deflected
<i>Haslea</i>	<i>crucigeroides</i> var. <i>crucigeroides</i>	(Hustedt) Simonsen; Cefarelli, Simonato & Mascione	NB	lanceolate	straight	rostrate	61-168	8-19	7.4	21-24	21-24	yes					
<i>Haslea</i>	<i>crucigeroides</i> var. <i>australis</i>	Cefarelli, Simonato & Mascione	NB	linear lanceolate	straight	acute	68-172	8-23	7.7	20-23	19-24	narrow		fine straight	crooked shaped	straight	deflected
<i>Haslea</i>	<i>crucigeroides</i> var. <i>densestriata</i>	Cardinal, Poulin & Bérard-Therriault	NB	lanceolate	straight	acute	65-107	8-10	9.6	22-25	28	yes	yes	fine	fine	straight	straight
<i>Haslea</i>	<i>crystallina</i>	(Hustedt) Simonsen	NB	lanceolate	straight	acute	106-155	12-15	8.8	26	30	no					
<i>Haslea</i>	<i>duerenbergiana</i>	Sterrenburg	NB	linear lanceolate	straight	capitate	34	5.00	6.8	17	NA	no					
<i>Haslea</i>	<i>feriarum</i>	Tiffany & Sterrenburg	NB	amphoroid	straight	rostrate	69-90	7.8-15	6.7	18-24	20-26	yes	yes dorsal	straight close	slightly deflected	deflected	deflected
<i>Haslea</i>	<i>frauenfeldii</i>	(Grunow) Simonsen	NB	lanceolate	straight	acute	100-190	17-25	7.5	29	29	no					
<i>Haslea</i>	<i>fusiformis</i>	(Grunow) Lobban & Perez	NB	linear lanceolate	straight	acute	102-150	8-11	13.9	31-34	32-36	no	yes	two small pores	straight, fine	slightly deflected	slightly deflected
<i>Haslea</i>	<i>gigantea</i> var. <i>gigantea</i>	(Hustedt) Simonsen	NB	lanceolate	straight	acute	300-410	32-48	9.4	16-17	20-22	no		depressed	depressed	straight	straight
<i>Haslea</i>	<i>gigantea</i> var. <i>tenuis</i>	Von Stosch	NB	lanceolate	straight	acute	180-315	18-23	10.0	16.5-18.5	23.5-27	no					
<i>Haslea</i>	<i>grefharum</i>	Simonsen	NB	lanceolate	straight	acute	150-200	19-22	7.7	18-19	36-40	no					
<i>Haslea</i>	<i>guahanensis</i>	Lobban & Perez	NB	linear lanceolate	straight	acute	107-145	9-13	11.9	28-31	42-49	no		straight	deflected	straight	straight
<i>Haslea</i>	<i>hyalissima</i>	Simonsen	NB	linear lanceolate	straight	acute	45-60	5-7	8.7	27-28	>30	no		fine	fine	straight	straight
<i>Haslea</i>	<i>indica</i>	Desikachary & Prema	NB	broadly lanceolate	straight	rounded	102	28	3.6	10	NA	no		fine	fine	straight	straight
<i>Haslea</i>	<i>karadagensis</i>	Davidovich, Gastineau & Mouguet	blue	lanceolate	straight	acute	52	8	6.5	31	58	no	yes	straight	straight	straight	straight
<i>Haslea</i>	<i>kjellmanii</i>	(Cleve) Simonsen	NB	lanceolate	straight	acute	168	26	6.5	15	NA	no					
<i>Haslea</i>	<i>meteoru</i>	Hinz & Sterrenburg	NB	lanceolate, rhombic	straight	acute	38-45	7-10	5	18-20	14-16	no		fine fuse, tilted	tiny crooks	curved	depressed crooks
<i>Haslea</i>	<i>nautica</i>	(Cholnoky) Giffen	NB	broadly lanceolate	straight	sub acute	45-60	9-12	5.0	15	15	no		deflected	deflected	curved	curved
<i>Haslea</i>	<i>nipkowii</i>	(Meister) Poulin & Massé	NB	lanceolate sigmoid	sigmoid	acute	190-290	16-22	13.2	25	30	no	yes	fine straight	deflected	straight	bifurcated
<i>Haslea</i>	<i>nusantara</i>	Mouguet, Gastineau & Syakti	blue	lanceolate	straight	acute	74	6.8	10.9	35-37	50-54	no	yes	straight	straight	straight	straight
<i>Haslea</i>	<i>ostrearia</i>	(Gailion) Simonsen	blue	linear lanceolate	straight	acute	68-69	6.5-7.5	9.8	36	53	no	yes	very slight	straight	straight	straight
<i>Haslea</i>	<i>pallida</i>	(Ritzky) Poulin & Massé	NB	sigmoide	sigmoide	acute	150-198	17-20	8.8	NA	NA	no					
<i>Haslea</i>	<i>provincialis</i>	Gastineau, Hansen & Mouguet	blue	lanceolate	straight	acute	66	7	9.4	33	60	no	yes	straight	straight	straight	straight
<i>Haslea</i>	<i>pseudostrearia</i>	Massé, Rincé & Cox	NB	linear lanceolate	straight	acute	37-43	6.5-12	6.2	34-36	42	no	yes	straight	straight	deflected	deflected
<i>Haslea</i>	<i>quamerensoides</i>	(Hustedt) Navarro, Micheli & Navarro	NB	lanceolate	straight	acute	110-79	10-13	8.5	25-27	20-21	yes	yes	slightly deflected	slightly deflected	deflected	deflected
<i>Haslea</i>	<i>salstonica</i>	Massé, Rincé & Cox	NB	broadly lanceolate	straight	acute	63	17	3.7	15-17	25	yes	yes	curved	curved	deflected	deflected
<i>Haslea</i>	<i>sigma</i>	Talagati Sar & Carvalho-Torgan	NB	lanceolate sigmoid	arcuate	acute	55-70	6	10.4	NA	NA	yes	yes				
<i>Haslea</i>	<i>silba</i>	Gastineau, Hansen & Mouguet	blue	lanceolate	straight	sub acute	138-20	10.5	13.8	32	37-38	no	yes	fine	straight	straight	narrow
<i>Haslea</i>	<i>spicula</i>	(Hickie) Bukhtyarova	NB	linear lanceolate	straight	sub acute	130-50	13-4	10	25-30	NA	yes		straight, fine	straight, fine	straight	straight
<i>Haslea</i>	<i>staurisigmaidea</i>	Sterrenburg & Tiffany	NB	sigmoid	sigmoid	acute	100-120	6-8	15.7	30	40	yes	yes	straight	fine, curved	straight	straight
<i>Haslea</i>	<i>stundii</i>	(Hustedt) Blanco, Borrego-Ramos & Olencí	NB	linear lanceolate	straight	acute	25-36	3-5	6.7	16-18	NA	no					
<i>Haslea</i>	<i>subagrita</i>	(Proshkina-Lavrenko) Makarova & Karayeva	NB	lanceolate	straight	acute	45	5.3	8.5	17-18	NA	no					
<i>Haslea</i>	<i>suicata</i>	(Cleve) Simonsen	NB	lanceolate	straight	sub acute	109-88	8-9	11.8	21	13-14	yes	yes				
<i>Haslea</i>	<i>trompii</i>	(Cleve) Simonsen	NB	linear lanceolate	straight	acute	70-160	10-14	11.4	28-30	17-20	no					
<i>Haslea</i>	<i>virea</i>	(Cleve) Simonsen	NB	lanceolate	straight	acute	NA	NA	NA	NA	NA	no		straight	straight	straight	straight
<i>Haslea</i>	<i>wawriakae</i>	(Hustedt) Simonsen	NB	linear lanceolate	straight	tapered	286-560	4-7	44.0	18-21	40	no					
<i>Navicula</i>	<i>avium</i>	Tiffany, Herwig & Sterrenburg	NB	broadly lanceolate	straight	acute	32-62	6-9	6.3	13-15	30	no	yes	straight fine	curved crooks	pores	deflected
<i>Navicula</i>	<i>hawaena</i>	(Hagelstein) Giffen	NB	linear lanceolate	straight	sub acute	75-85	11-12	7.0	15	15	no		crooked shaped	crooked shaped	curved	curved
<i>Navicula</i>	<i>tsukamotoi</i>	Sterrenburg & Hinz	NB	broadly lanceolate	straight	acute	25-68	7-12	4.9	16-19	18-23	no		fine straight fuse	crooked shaped	straight	crooked shaped

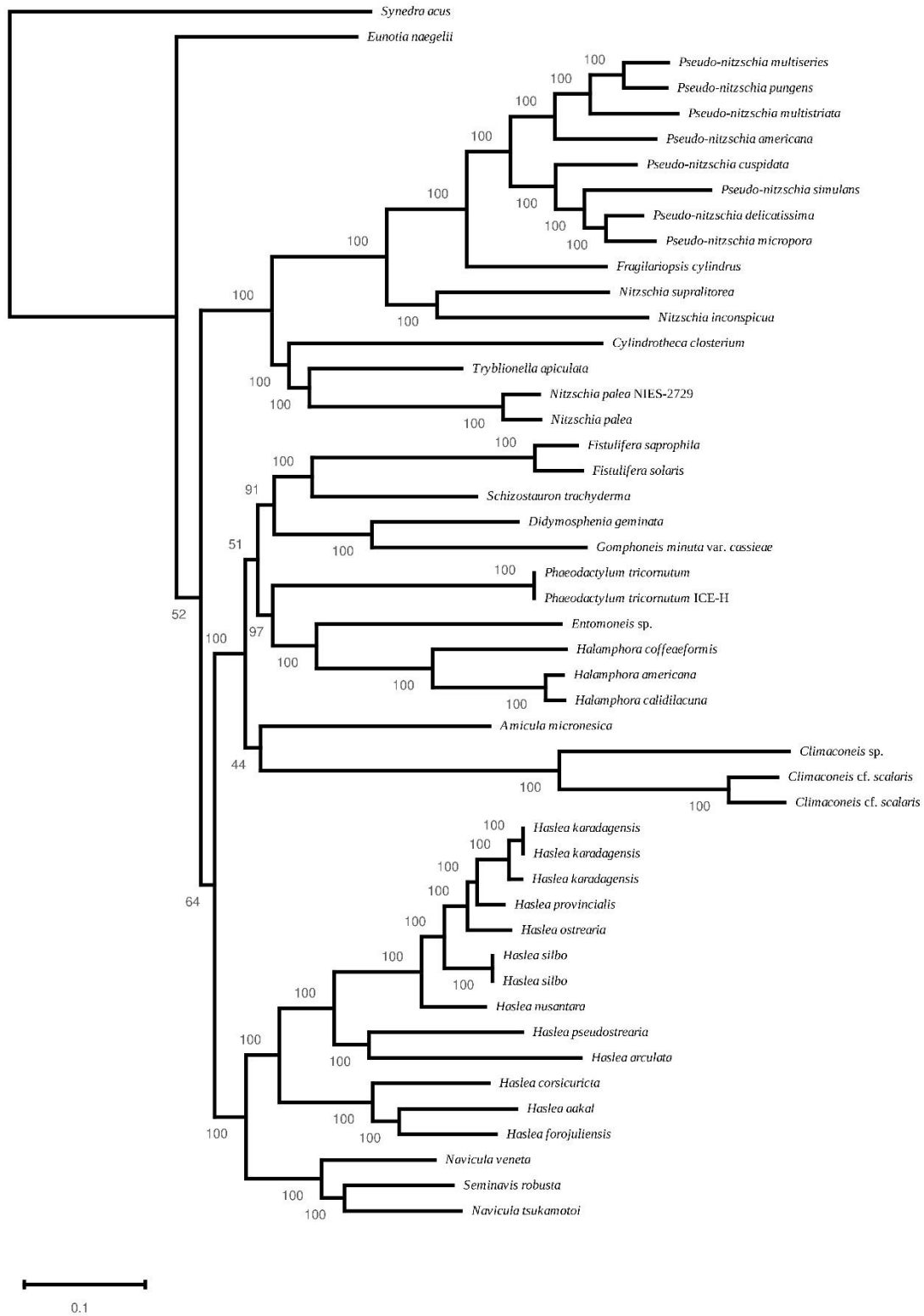


Figure 1-5: Maximum Likelihood tree obtained from plastome genes. The best tree out of 100 was computed for 1000 bootstrap replicates

5.3 Phylogeny

The multigene phylogeny derived from the alignment of all protein-coding genes of the plastome display very robust nodes for all species and genera belonging to the Naviculaceae family. The tree clearly separates *Haslea* spp. from other Naviculaceae (Figure 1-5). Inside the genus *Haslea*, the three new species described in the current article form a well-supported cluster, clearly separated from the other species, including for what concerns the non-blue species *H. pseudostrearia* and *H. arculata*, which are genetically closer to blue species.

5.4 Analysis of chloroplastic genomes

- **The plastome of *H. aakal***

The plastome is 134,979 bp long. The large single-copy (LSC) encodes for 71 conserved protein-coding genes, 4 non-conserved ORF and 16 tRNA. The small single-copy (SSC) encodes for 52 conserved protein-coding genes, 3 non-conserved open reading frames (ORF) and 7 tRNA (Figure 1-6a). The inverted repeat (IR) encodes for 2 conserved protein-coding genes, 3 rRNA and 3 tRNA. The *ycf45* gene overlaps the LSC and the IR. The *psaE*, *petF* and *ycf41* genes are missing. For what concerns *ycf41*, a blastx query made with standalone blast with the assembled plastid genome as a query, the query genetic code 11 and the sequence of the *ycf41* putative protein of *H. forojuliensis* returns with a e-value of 0.001 a potential match in the area that corresponds to a non-coding part between *psbI* and *ycf39*, which is the location of *ycf41* among other *Haslea* spp. sequenced so far. The alignment shows the presence of internal stop codons. Therefore, it can be considered that *ycf41* has turned into a pseudogene in *H. aakal*.

- **The plastome of *H. corsicuricta***

The plastome is 161,647 bp long. The LSC encodes for 73 conserved protein-coding genes, 31 non-conserved ORF, 1 putative *serC* gene, 1 putative *xerC* gene and 17 tRNA (Figure 1-6b). The plastome length is more important in *H. corsicuricta* due to the presence of 31 non-conserved ORF whereas *H. aakal* and *H. forojuliensis* have respectively 4 and 5 non-conserved ORF.

The SSC encodes for 53 conserved protein-coding genes, 6 non-conserved ORF and 7 tRNA. The supplementary conserved protein-coding genes compared to the other species is the *psbY* gene, which has been transferred from the IR to the SSC in *H. corsicuricta*. The IR encodes for 1 conserved protein-coding gene, 3 tRNA, 3 rRNA and a putative *serC* gene. The *psaE* gene is missing. The gene *ycf45* overlaps the LSC and the IR, and the non-conserved *orf150a* overlaps the SSC and the IR.

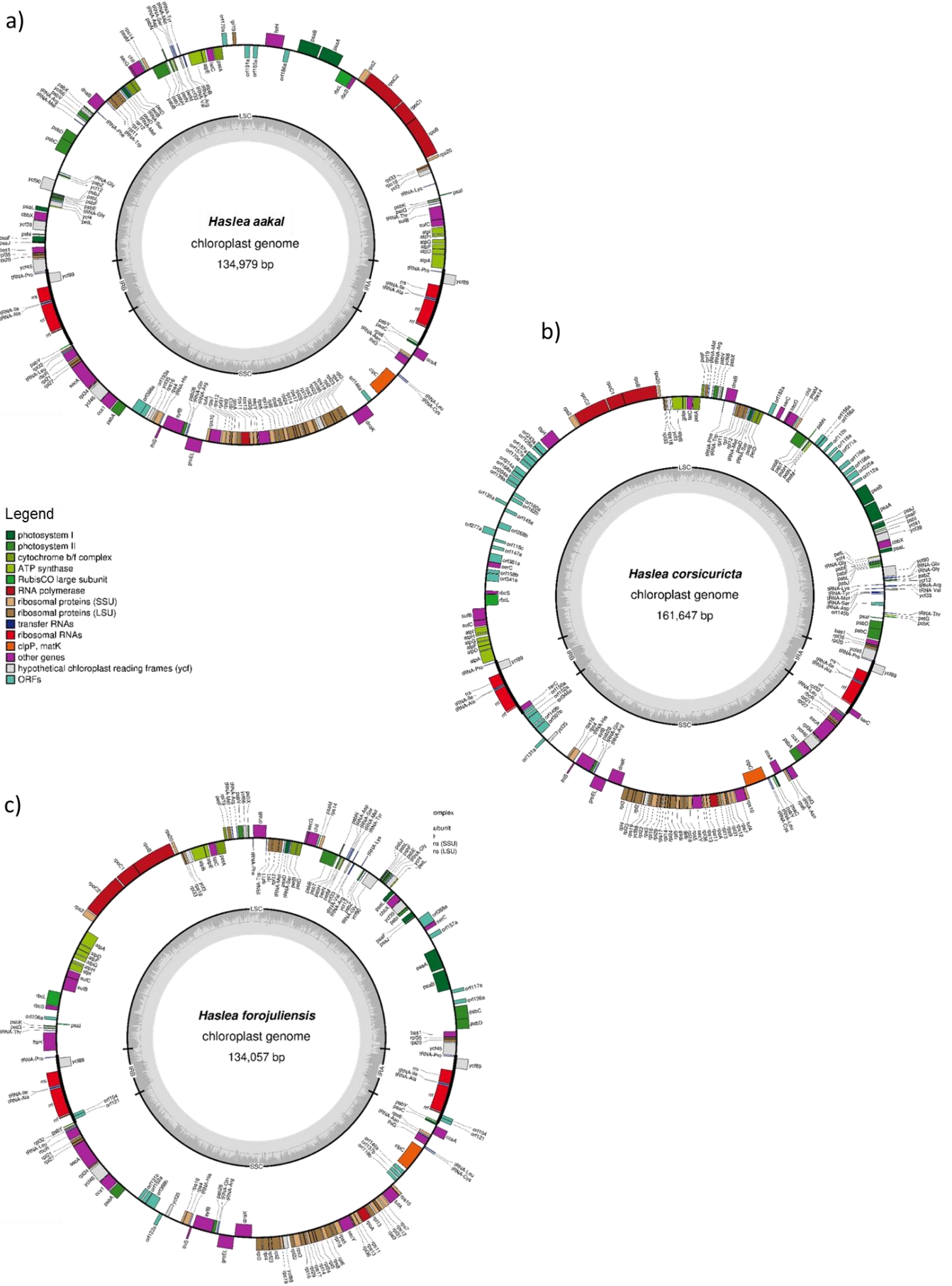


Figure 1-6: Plastome of the newly described species with their genes repartition a) *H. aakal*; b) *H. corsicuricta*; c) *H. forojuliensis*

- **The plastome of *H. forojuliensis***

The plastid genome is 134,057 bp long. The LSC is 70,701 bp long and encodes for 73 conserved protein-coding genes, 5 non-conserved ORF and 16 tRNA (Figure 1-6c). It also encodes for a more conserved ORF which is similar to a putative *serC* gene. However, this gene seems partial on its 5' extremity, cannot be extended, and the putative protein it encodes seems to lack catalytic residues. Therefore, it is annotated as *orf150a*. The SSC is 48,224 bp long and encodes for 52 conserved protein-coding genes, 7 non-conserved ORF and 7 tRNA. The IR is 7566 bp long and encodes for 2 conserved protein-coding genes, 2 non-conserved ORF, 3 rRNA and 3 tRNA. The *ycf45* gene overlaps the LSC and the IR. The *psaE* gene is missing as in *H. aakal* and *H. corsicuricata*.

6. Discussion

Recent studies expanded our knowledge on *Haslea* genus diversity. So far, the genus encompasses a total of 44 species with the newly described species and one species *H. quarnerensoides* described in the literature, which is not referred on Algaebase (Navarro *et al.*, 2000). These species can be differentiated through morphological characteristics such as general shape, shape of raphe endings, size, transapical and longitudinal striae. The molecular approach with the use of genetic markers is also effective, for species for which data are available. The use of both methods is probably advisable to better describe new species.

The three new *Haslea* species presented in this study inhabit the warm temperate waters of the Mediterranean Sea and the tropical waters of Caribbean Sea. As many other species of *Haslea* already described, little is known about their distribution area. Since its first occurrence in Corsica, France, *H. corsicurieta* has been frequently observed in the western Mediterranean Sea in the same environment as *Haslea* blue species, however blue species being more studied we have more information about their geographic distribution. For example, it has been confirmed that *H. ostrearia* is a cosmopolitan species, whereas *H. provincialis* seems endemic to the Mediterranean Sea. The increase of sampling in some areas also showed that in some localities (Canaries Island, France, Croatia) different species of blue and non-blue *Haslea* can be found at the same location and at the same time. Despite the recent observation of *H. ostrearia* in South Africa (Dąbek *et al.*, 2022), less information is available regarding the distribution of *Haslea* spp. in the South Hemisphere as compared to the North Hemisphere. This underlines the need to improve bioprospection in this part of the globe through collaboration. Sampling and identification of species is important to have a better understanding of their biotopes and ecology.

Table 1-2 will facilitate further identification of *Haslea* species based on their morphological traits. Including *Navicula avium*, *N. howeana*, *N. meterou* and *N. tsukamotoi* species formerly ascribed to the genus *Haslea* (Li *et al.*, 2017). In their recent article Lobban *et al.*, (2020) and Sterrenburg *et al.*, (2015) discussed if central bar is an morphological characteristic of the *Haslea* genus. This character is not observed in *H. aakal* frustule and it is also not mentioned in other species. Thus, this character can be used to discriminate species within the *Haslea* genus.

Based on the multigene and single gene *rbcl* analysis (unpublished data), the three new species described form one clade with the closest species being *H. arculata*. Based on morphological characteristics they have very different shapes, size range and number of striae. The multigene analysis also shows that *H. forojuliensis* is genetically closer to *H. aakal* than *H. corsicuricta*, even if *H. forojuliensis* and *H. corsicuricta* were sampled in geographically close environments.

The clade formed by the three new species of non-blue *Haslea* is supported by the loss of *psaE* gene among. This gene is usually found in a conserved cluster between *bas1* and *ftsH* among all other species of *Haslea* spp. *sensu stricto* already sequenced. The *psaE* gene is coding for protein of the photosystem I (PS1) reaction center subunit IV (Zhao *et al.*, 1993), PS1 is composed of various subunits which are different in between taxa. In *Fragilariopsis*, a pennate diatom, this gene has been moved into the nuclear genome (Sobotka *et al.*, 2017). It can be noticed that in *H. forojuliensis* plastome, genes *bas1* and *ftsH* are distant, and in *H. aakal* plastome, the *petF* gene is missing. The *petF* gene is coding for ferredoxin proteins (Neumann-Spallart *et al.*, 1990). It can be hypothesized that this gene has been transferred to the nuclear genome. So far in diatoms, the transfer of ferredoxin gene has been only known for the centric species *Thalassiosira oceanica* (Lommer *et al.*, 2010; Roy *et al.*, 2020) and the araphid pennate species *Astrosyne radiata* (Yu *et al.*, 2018). Extended research in the nuclear genome of *H. aakal* are required to assert this hypothesis. Moreover it is interesting to notice that the protein coded by *psaE* gene is known to interact with ferredoxin in the cyanobacteria *Synechococcus* (Sonoike *et al.*, 1993).

The loss of some of these subunits has already been observed among algae: for example *psaK* has been loss during the endosymbiosis, event that led to red algae (Jensen *et al.*, 2000). Throughout diatom evolution and during the various endosymbiosis significant genetic shuffling has taken place, with gene transfers from the endosymbiont to the host nuclear genome including photosystem genes (full review Scarsini *et al.*, 2019). These evolutionary phenomena have led to a complex organization of diatom gene content. Lommer *et al.*, (2010) hypothesizes that diatoms may transfer genes from the chloroplast to the nucleus in order to be able to improve their regulation in the face of varying environmental conditions. This hypothesis is consistent with the fact that the high genetic plasticity of diatoms allows them to adapt quickly to changing environmental conditions.

7. Conclusion

In order to be able to describe these three new species, an inventory of the diversity of the genus was carried out. *Haslea aakal*, *H. corsicuricta* and *H. forojuliensis* are characterized by a lanceolate shape and an absence of pseudostaurus; they form a cluster distinct from other *Haslea* (based on the multigene analysis Figure 1-5 and the chloroplastic marker *rbcL*: see phylogenetic tree of Ch2, Figure 2-8). This cluster composed of three new non-blue *Haslea* species seems to differ from other *Haslea* species due to the loss of the *psaE* gene, involved in photosystem I.

The combination of taxonomic observations and genomic methods used in this study, represent a very efficient process to study microalgae biodiversity. It also illustrates the diversity of *Haslea* species and increases our knowledge of the genus distribution area and ecology.

Acknowledgments

The authors acknowledge A. Caruso (BIOSSE, Le Mans) for collection of rock biofilm sample in the Fréjus Bay, France, and C. Falaise for isolating the non-blue Baška cell. L. & M. Vergnes who kindly provided the samples from Mexico. This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation program, under grant agreement No 734708 /GHANA / H2020-MSCA-RISE-2016.

Chapitre 2

Dynamique et environnement
des bloom d'*Haslea*

Partie 1 : Dynamique des blooms d'*Haslea*

1. Contexte

Un bloom représente un phénomène d'augmentation rapide de la densité populationnelle d'une ou quelques espèces, en général par reproduction clonale. Ce processus a lieu pour des conditions environnementales spécifiques. Cependant, l'eutrophisation des rivières et des eaux côtières tend à accroître la fréquence de ces événements, aboutissant parfois à des blooms d'organismes nuisibles ou toxiques (Paerl *et al.*, 2011).

Bien que connus depuis plusieurs siècles en claire ostréicole, les blooms de diatomées bleues *Haslea* ont été peu décrits en environnement ouvert (mer et océan). Les navicules bleues observées en microscopie optique étaient identifiées comme *H. ostrearia*. Avec l'amélioration des techniques moléculaires et la diminution de leurs coûts, des nouvelles souches d'*Haslea* bleues ont été identifiées. Ainsi les blooms d'*Haslea* observés sur la côte atlantique ouest (États-Unis) ont été attribués à la présence d'*H. silbo* (Gastineau *et al.*, 2021b). Ces blooms ont été observés dans des marais peu profonds, tels que des zones d'aquaculture où les branchies d'huîtres verdissent (dus à la fixation du pigment de la microalgue). Aux États-Unis, ces bivalves aux branchies vertes ont longtemps été considérées impropres à la consommation (Kemp, 1997). En effet, une pollution au cuivre peut aussi induire un verdissement des huîtres mais celui-ci sera présent sur tout l'organisme (Han and Hung, 1990).

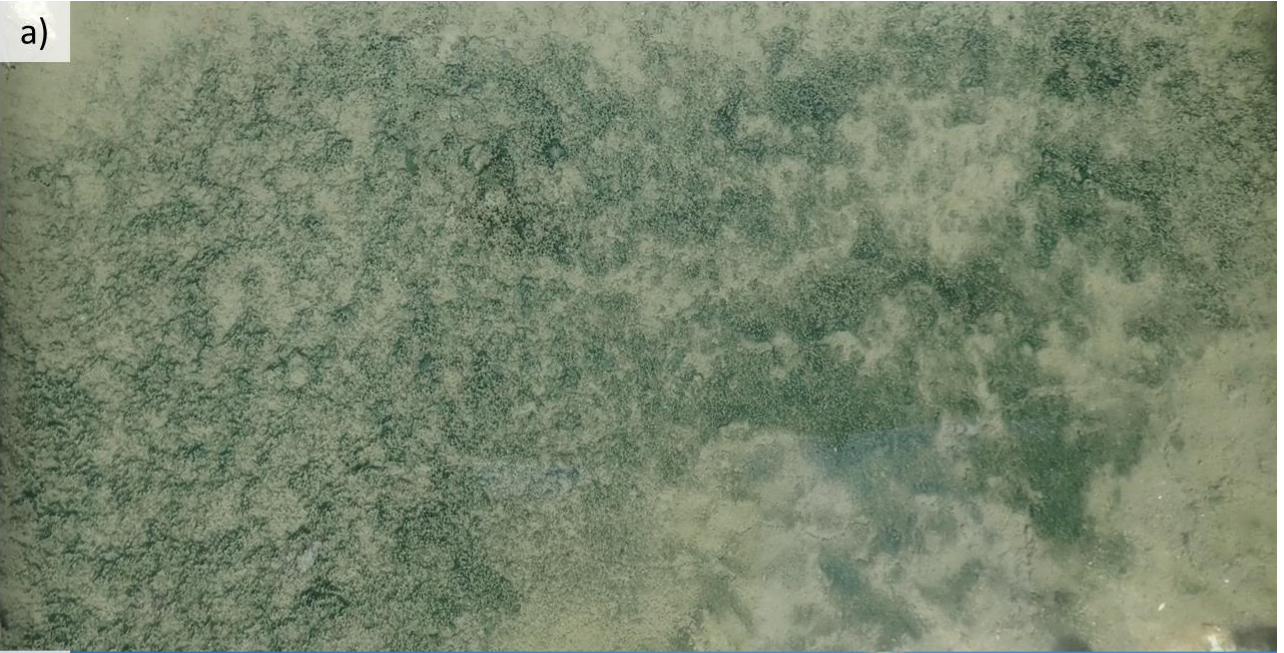
Des blooms d'*Haslea* bleues avaient également été observés, en milieu ouvert, comme par exemple en mer Méditerranée où des patchs de bleu avaient été observés sur *Colpomenia sinuosa* (Sauvageau, 1906). Les blooms ont été observé ensuite principalement sur *Padina* spp.

Les blooms d'*H. ostrearia* et *H. silbo* se développent principalement sur les sédiments vaseux des claires d'huîtres d'Atlantique (Figure 2-2a). Les blooms d'*H. ostrearia* observés en Méditerranée, se développent comme pour *H. provincialis* sur du turf et *Padina* (Figure 2-2b et c).

De par la diversité du genre avec de nombreuses espèces qui continuent d'être découvertes, l'intérêt de certaines espèces en aquaculture et les propriétés porteuses de la marennine, l'étude de ces blooms en environnement ouvert semble être un point clé pour continuer d'améliorer nos connaissances sur le genre *Haslea*.

Dans cette première partie de chapitre, nous allons essayer de comprendre les paramètres physico-chimiques impliqués dans cette dynamique, du début à la fin du bloom.

a)



b)



c)



Out of the blue, *Haslea* spp. responsible for benthic diatom blooms in western Mediterranean Sea

Séveno J.¹, Sirjacobs D.², Car A.³, Fullgrabe L.⁴, Dupcic I.³, Lejeune P.⁴, Leignel V.¹. and Mouget J-L.¹

(to be submitted)

1 BIOSSE Laboratory, Le Mans University, France

2 InBioS–PhytoSYSTEMS Laboratory, Liège University, Belgium

3 Institute for Marine and Coastal Research, University of Dubrovnik, Croatia

4 STARESO Research Station, Calvi, France

2. Abstract

Blue *Haslea* species are marine benthic pennate diatoms able to synthesize a blue-green water-soluble pigment like marennine produced by *H. ostrearia* (Gaillon) Simonsen 1974. Recently, new species of *Haslea* synthesizing blue pigments were described (*H. karadagensis*, *H. nusantara*, *H. provincialis* and *H. silbo*). Their marennine-like pigments have allelopathic, antioxidative, antiviral and antibacterial properties, which have been demonstrated in laboratory conditions. Marennine is also responsible for the greening of oysters from the Marennes Oléron area (France), a phenomenon that has economical and patrimonial values. While blue *Haslea* spp. blooms have been episodically observed in natural environments (*e.g.*: France, Croatia, United-States), their dynamics have been investigated only in oyster ponds.

This work is the first description of the dynamics of blue *Haslea* benthic blooms in open environments on the periphyton, covering turf and some macroalgae like *Padina*. Different sites were monitored in the Mediterranean Sea (Corsica, France, and Croatia) and two different blue *Haslea* species involved in these blooms were identified, *H. ostrearia* and *H. provincialis*. A non-blue *Haslea* species was also occasionally encountered. The benthic blooms of *Haslea* followed the phytoplankton spring bloom and occurred in shallow-calm waters, possibly indicating a prominent role of light to initiate the blooms. On the other hand, the end of blooms coincided with the warming of the upper water masses, which might be profitable for other microorganisms and ultimately lead to a shift in the biofilm community.

3. Introduction

Benthic blue *Haslea* blooms have been known to occur since the 19th century in oyster's ponds; along the north-west Atlantic coast in France (Gaillon, 1820). Blooms of microalgae are characterized by a rapid increase in cell density, in this case of *Haslea* spp., which outcompete the other diatoms present. The emblematic species *Haslea ostrearia* (Gaillon) Simonsen, produces marennine, a water soluble blue pigment. Marennine accumulates in cell apices (intracellular form) and is released in the environment (extracellular form). When blooms are occurring in ponds, shallow and semi-closed environments, extracellular marennine concentration in seawater increases. While oysters are filtering seawater to feed on microalgae, they mainly accumulate extracellular marennine in their gills' mucocytes, which turn green (Gastineau *et al.*, 2018). The color spectrum of marennine changes with the pH, from blue in acidic conditions (cell cytoplasm) to green in more basic conditions (seawater) (Gastineau *et al.*, 2014). Gastronomically, green-gilled oysters have been considered as a delicacy, which increases their commercial value. Therefore, the first records of blue *Haslea* blooms can be deduced from the description of the greening of oysters in Colchester Bay, England (Sprat, 1669), in Marennes Oléron, France (Arnou, 1688), in Denmark (Petersen, 1914), in Virginia, US (Mitchell and Barney, 1917) and in Tasmania, Australia (Hallegraeff, personal communication). Oyster basins are shallow and dynamic environments with important daily and seasonal variations of salinity and temperature. They are supplied with both tide, when coefficient is above 80-90 and fresh water (heavy rain, rivers). It was observed that when the flow is weak, the turbidity decreases and leads to shallow ponds with clear water that are in favor of the formation of *Haslea* blooms (Moreau, 1970). Moreover, gills of other bivalves such as scallops, mussels and clams, if present in bloom conditions also turn green. A green coloration can also occur in other animals such as anemones, polychaetes and crabs (Gaillon, 1820; Ranson, 1927).

Blooms or patches of blue *Haslea* have also been observed in open environments but their dynamics and impact have not been studied yet. It seems that "the blue diatoms" have been observed forming small blue patches on *Colpomenia sinuosa* in the Mediterranean Sea (Sauvageau, 1906). In Corsica, *Haslea* blooms have been regularly observed with varying intensity in the springtime since 1996 (Demoulin, personal communication). On the Dalmatian coast, according to the literature (Palińska and Surosz, 2018) and personal observations, blooms were usually observed during summer months but the species involved were not identified. In the Arabian Sea in March 2011, a planktonic bloom of the non-blue species, *Haslea gretharum* Simonsen has been observed (Thomas *et al.*, 2022).

Studies in laboratory conditions provided additional clues on bloom dynamics by examining how *Haslea* cultures were affected by changes in abiotic parameters. *Haslea ostrearia* is a euryhaline species (Neuville and Daste, 1978) able to acclimate well to high irradiance and UV (Mouget *et al.*,

2004, 1999; Rech *et al.*, 2005). Studies on *H. ostrearia* cultures demonstrated that extracellular marennine concentration does not depend on cell density but on light quantity and quality (Mouget *et al.*, 2005; Prasetya *et al.*, 2016; Tremblin *et al.*, 2000). As silica is recycled slower than nitrogen or phosphorus (Turpin, 1999), it is often one of the limiting nutrients and, thus, supplement of silica could favor *H. ostrearia* multiplication.

In open ecosystems, the link between environmental parameters and organisms is more complex. Anthropogenic nutrient enrichment result in coastal water eutrophication leading to an increase in bloom frequency, including Harmful Algal Blooms (HAB) (Paerl *et al.*, 2011). Climate change, especially warming, may modulate such phenomenon by affecting the structure of the water column and climatic events. However, *Haslea* blooms are not classified as HAB because no high mortality rate has been recorded for organisms in ponds or in open environments, and green-gilled seafood has been cleared for human consumption. Nevertheless, their impacts on microenvironments has yet to be unraveled.

The genus *Haslea* encompasses a total of 40 species (Guiry and Guiry, 2022). Before the now widespread use of genetic markers to identify species, all observed blue *Haslea* were attributed to *H. ostrearia*. More recently, the presence of blooms occurring in marshes of the North Carolina coast (US) were related to the presence of the species *Haslea silbo* Gastineau, Hansen & Mouget (Gastineau 2018). In addition to *H. ostrearia*, there are currently four other species of blue *Haslea*: *Haslea karadagensis* Davidovich, Gastineau & Mouget, *Haslea provincialis* Gastineau, Hansen & Mouget, *H. nusantara* Mouget, Gastineau & Syakti et *H. silbo*. To date, only *H. ostrearia*, *H. silbo* and *H. provincialis* have been known to form benthic blooms in either oyster ponds or open environments. It may also be mentioned that the formation of spores by *Haslea* spp. has not been observed either in laboratories or in natural environment. Microalgae spores can be an important factor initiating blooms (Eilertsen *et al.*, 1995).

This paper newly describes benthic blooms of *Haslea* spp. in the Mediterranean Sea, using descriptive, genetic and statistical analyses.

4. Methods

4.1 Study sites

Two sites were chosen in the Mediterranean Sea to study and compare blue *Haslea* blooms. These two sites are oligotrophic environments and are considered as non-polluted areas.

In France, blooms were monitored along the Revellata Cape (42°34'50.8"N, 8°43'30.8"E) in the Calvi Bay, Corsica (Figure 2-2). The Calvi Bay has an area of 22 km² and is located on the northwestern

coast of Corsica Island and opens to the Ligurian Sea. Sampling campaigns were realized during springtime between the end of February and June from 2019 to 2022 (no data in 2020 due to the global pandemic). Previous data also indicated that blooms in 2016 and 2018 were very intense and spread all along the coast.

In addition to this area, another bloom was observed in the Ligurian Sea, in Frioul islands, Marseille, France. It has been recorded on the 06/06/21, pictures were taken and samples were collected to identify *Haslea* species.

In Croatia, one campaign was completed in August 2019 on the Krk Island (North Adriatic) and a second campaign was done in late July 2020 along the Dalmatian coast, between Hvar Island and Dubrovnik (Figure 2-2). *Haslea* cells were isolated from both of these campaigns but diatoms samples were only collected in 2020. On the island of Hvar (Central Adriatic), samples were collected from the Bay of Stari Grad (43° 10' 54" N, 16° 35' 00" E). In the Southern Adriatic Sea, samples were taken in “Veliko Jezero” and “Malo Jezero” together with Gonoturska Bay (approximately 42°45'N, 17°23'E) are located on the western part of Mljet Island and are part of National Park Mljet. The “Veliko Jezero” (VJ) has a surface area of 1.45 km² and maximum depth of 46 m while the “Malo Jezero” (MJ) has a surface area of 0.25 km² and maximum depth of 29 m. Narrow and shallow straits (from the outer sea to “VJ”: 10 m wide, 2.5 m deep; from “VJ” to “MJ”: 3 m wide, 0.5 m deep) connect the lakes with the outer southern Adriatic Sea (Benovic *et al.*, 2000).

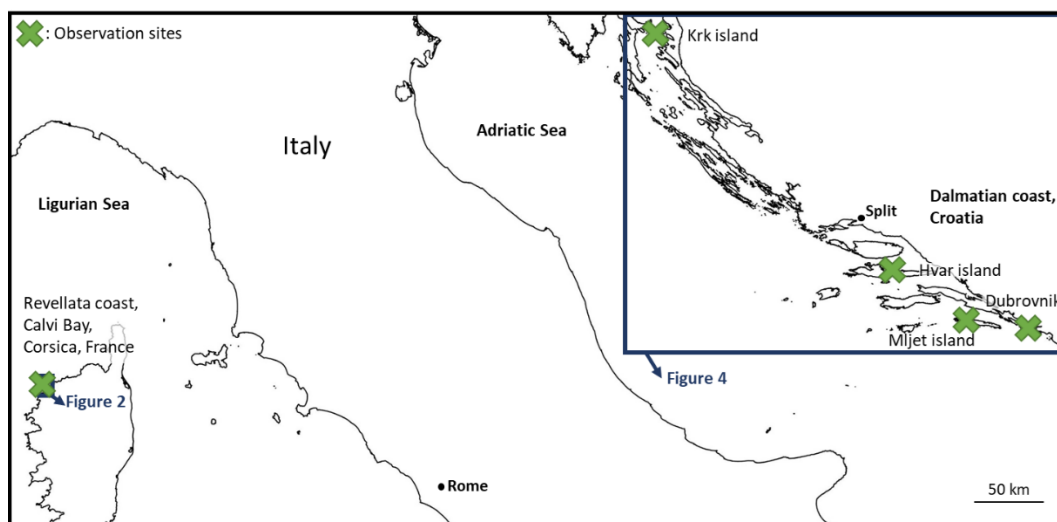


Figure 2-2: Study areas with the different observation sites, boxes represent frames for the next figures where blooms have been recorded

At all sampling sites, the survey of the blooms was carried out by following the bathymetric line of 4 m depth. Patches were photographed, their surface and density estimated. Benthic samples were collected in blue and control areas to verify the presence of blue *Haslea* cells under microscope.

4.2 Environmental parameters

In Calvi Bay (France), environmental parameters were recorded at the marine station of STARESO. Salinity, temperature and turbidity were measured using a CTD (Conductivity Temperature Depth) sensor (EXO 2, YSI). Data from the surface to a depth of 10 m, from 2016 to 2022, were analyzed for the present work. Sampling was done at 1 m depth for nutrients and chlorophyll a (Chla). Silicate (SiO_4), phosphate (PO_4), ammonium (NH_4^+), nitrate (NO_3^-) and nitrite (NO_2^-) were analyzed using a SAN-Skalar according to the method described by Strickland and Parsons (1972). The concentration of Chla was measured by fluorimetry using a Trilogy Turner Design Fluorimeter. Chla was used as a proxy for phytoplankton biomass. Zooplankton biomass was also studied, sub-surface horizontal hauls were taken at 3 m depth using a WP2 net of 200 μm mesh size, with a 60 cm opening diameter. Their biovolumes were determined using a graduated cylinder. When available, data were analyzed since 2016. Dashed lines represent the most favorable periods for blooms, from March to May.

For the Hvar and Mljet islands (Croatia), salinity and temperature were measured using a WTW Multiline P4 multiparametric sensor. Water samples were collected to measure silicate, phosphate, ammonium, nitrite, nitrate, total inorganic nitrogen ($\text{TIN} = \text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$) and Chla. Nutrients were analyzed by colorimetry according to Ivančić and Degobbis (1984). Chla was determined by fluorescence measurements using a Turner TD-700 Laboratory Fluorometer (Sunnyvale, CA) calibrated with pure Chla (Sigma-Aldrich, US).

4.3 Algal culture and DNA identification

Blue *Haslea* cells were isolated using glass Pasteur pipettes, cultured in filtered seawater and then transferred in artificial seawater medium. This medium used was made from Instant Ocean (Aquarium Systems, France) powder enriched with silicates, phosphates, nitrates, metals and vitamins. Three successive steps of re-isolation were performed before cultures were considered monoclonal. Cultures were grown and maintained in Erlenmeyer flasks under controlled conditions: temperature of 16 ± 1 °C, irradiance of 400 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$, with 14h:10h light/dark photoperiod, at Le Mans University. Irradiance was provided by fluorescent tubes (Philips TLD 36W/965) and measured using a Li-Cor LI-189 quantum meter coupled with a 2P Li-Cor Q21284 quantum sensor.

When culture reached 5E+05 cells/mL, 50 mL of the culture were centrifuged at 3500 g for 15 min. DNA extraction was performed on the pellet, using Plant II Nucleospin MN© kit and following manufacturer instructions. DNA quantity and quality were assessed using Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA). The chloroplastic marker *rbcl* was amplified using primers *rbcl*-forward (GACCGTTACGAATCTGGTG) and *rbcl*-reverse (GACCACATGTTTTAGCAGC) for a total length of 1330 pb for each fragment. To achieve a good yield 35 cycles of amplification were realized: denaturing 1 min at 94 °C, annealing 1 min at 54 °C, extension 1.5 min at 72 °C. PCR products were sent to Azenta genomics for sequencing.

4.4 Data analysis

Maps were done on QGIS software (version 3.16), using aerial orthophotography from IGN2017 and SHOM/IGN histolitt v2 2013 for Corsica and using Google Satellite, Map data 2015 and EEA coastline 2017 for Croatia.

The phylogenetic tree was obtained using our PCR amplification of the chloroplast marker *rbcl* sequences (DNA sequences have been submitted to Genbank to obtain a registration number) and the *rbcl* sequences available on Genbank database. Sequences were aligned by MUSCLE algorithm on MEGA X software (Version 10.1.8; Kumar *et al.*, 2018) and trimmed to a final length of 973 pb. The maximum likelihood (ML) phylogeny was done for 1000 bootstrap replicates (Felsenstein, 1985) and using *Navicula cryptocephala* to root the tree. Statistical analysis were done using R software (version 4.0.3), plots were created using the ggplot2 package.

5. Results

5.1 Corsica

The dynamics of blooms were studied over a three-year period (2019 – 2022) during which blue patches of different blue intensity (Figure 2-3) were observed on various substrates. The surface of patches varied from a few square centimeters to several square meters. The sites with maximum density (vast surface and high blue intensity) changed over the years (Figure 2-4). Blooms covered more areas and with higher intensity in 2022 than in 2021 and 2019.

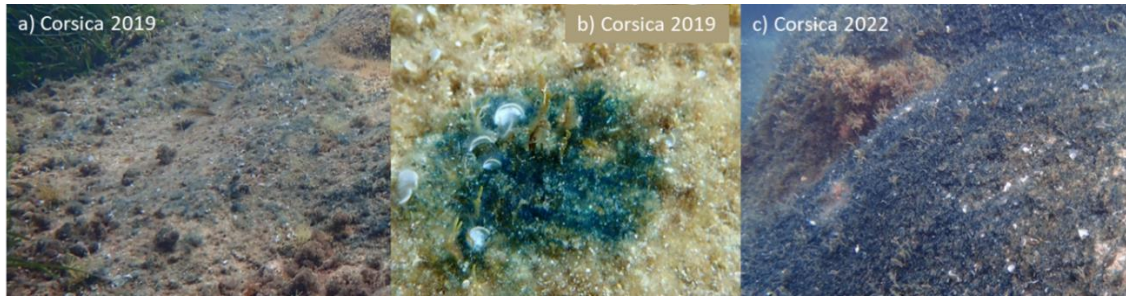


Figure 2-3: Bloom patches with different blue intensities a) light, b) medium, c) high

To estimate the importance of the bloom, the relationship between the intensity of the blue patches and the density of *Haslea* cells present in the patches was investigated. When there was no visible blue patches, *Haslea* cells represented, in average, 1 % of the total diatom community. When blue patches were visible, *Haslea* cells represented, in average, 24.6 % of the total diatom community (Table 2-1).

Table 2-1: Percentage of blue *Haslea* cells in the total diatom community, calculated in fresh fractions (N=125); Comparison between the color of patches and the kind of substrate

	Percentage of <i>Haslea</i> in the total diatom community						
	Patches intensity (color)					Substrate with blue coloration	
	Control	Tot blue	Light	Medium	High	<i>Padina</i> spp.	Turf
Average (%)	1.0	24.6	7.3	29.1	42.8	26.7	23.2

There were significant differences (T-test: p-value < 0.05) between the percentage of *Haslea* spp. in the diatom community and the intensity of the blue color of patches. For the samples with a very high blue intensity (Figure 2-3), *Haslea* spp. represented an average of 43 % of the whole diatom community (Table 2-1) and a maximum of 80 % has been observed in one sample. There were no significant differences (T-test: p-value > 0.05) in the representation of *Haslea* spp. between *Padina* and turf.

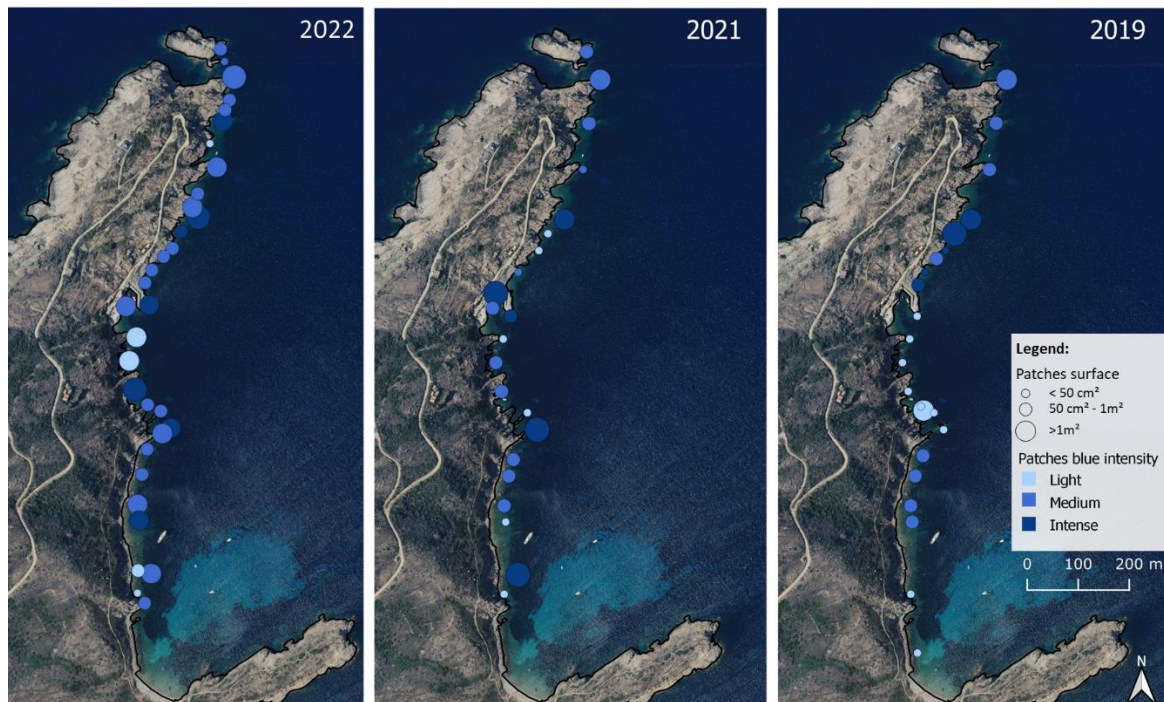


Figure 2-4: Observations of blue *Haslea* blooms along the Revellata Bay, Corsica, in spring 2019, 2021 and 2022. The blue intensity (see Legend) refers to the density of *Haslea* population, as illustrated in Figure 2-3

5.2 Croatia

Small blue patches were observed on Krk Island in late August 2019. During the sampling campaign from 17th to 26th of July 2020, patches were recorded along the coast from Dubrovnik to Hvar Island (Figure 2-5). The site where the maximum density was observed was in Šunj beach, Lopud Island, south Adriatic (Figure 2-5d). Along Dalmatian coast, blooms were localized on the thallus of *Padina*.

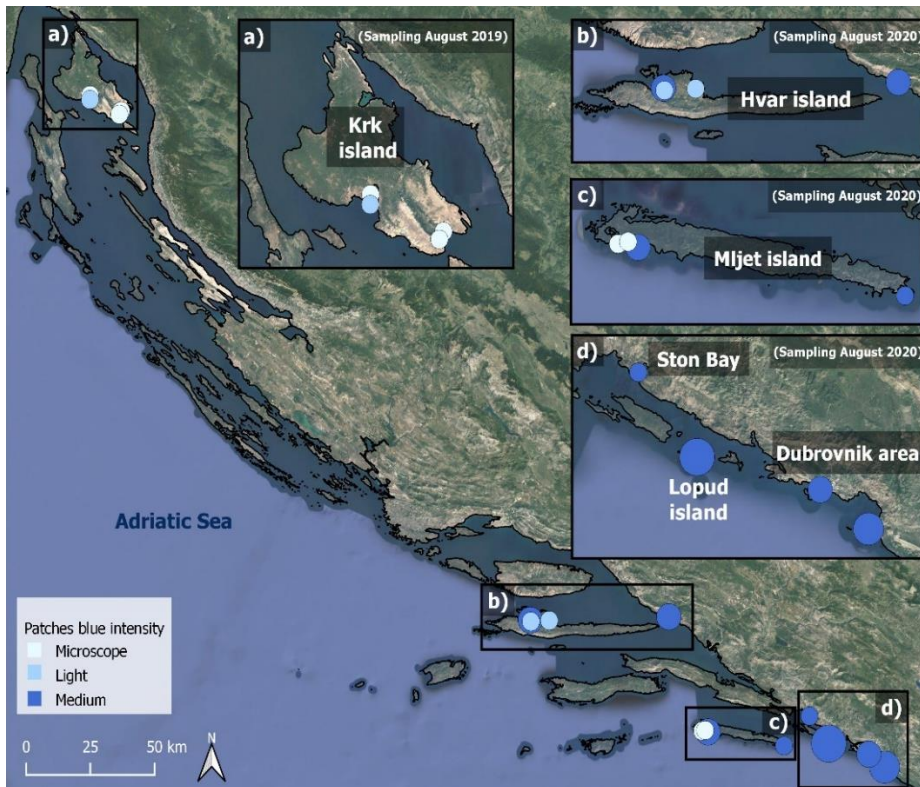


Figure 2-5: Observations of blue *Haslea* blooms along the Dalmatian coast in July 2020. The blue intensity (see Legend) refers to the density of *Haslea* population, as illustrated in Figure 2-3

5.3 Global blooms observations

Overall, blooms occurred in shallow, sunny and calm waters. The more intense zones were observed at a depth of around four meters on the non-exposed side of underwater dorsals.

Haslea blooms have been so far observed on Ochrophyta and Rhodophyta but not on Chlorophyta. It developed preferably on turf or *Padina*, besides it was recorded on *Halopteris scoparia*, *Jania* sp., *Colpomenia sinuosa*, *Liagora viscida* and filamentous algae like *Nematochryopsis marina* and *Acinetospora crinita* (Figure 2-6). The morphology types of these algae are characterized by wide thallus or with ramification and the presence of hairlines. *Haslea* blooms were observed close to sponges (Figure 2-6i) but never covering them.

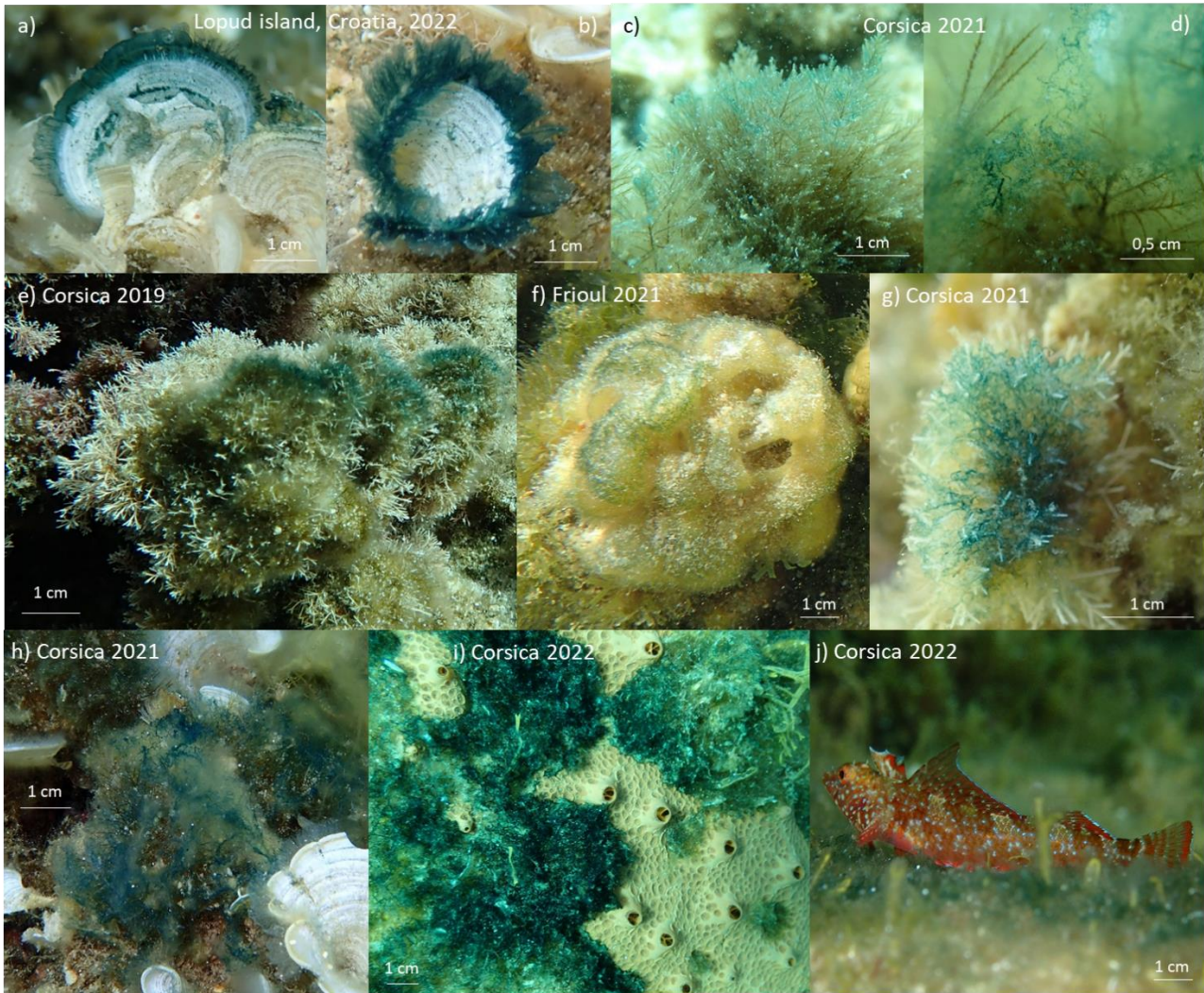


Figure 2-6: Diversity of blue *Haslea* patches on different substrates: a) and b) *Padina*, c) and d) *Halopteris scoparia*, e) *Jania* sp., f) *Colpomenia sinusoa*, g) *Liagora viscida*, h) filamentous algae, i) *Hemimyscale mediterranea*, j) *Tripterygion* sp.

Underwater macro pictures and microscope observations confirmed that the blue color of the blooms was due to an accumulation of blue *Haslea* cells and not due to the fixation of marennine pigment trapped in the biofilm (Figure 2-7). Cells gathered in the superior part of the biofilm and formed spherical structures with spike-like protrusions (Figure 2-7f). Blue *Haslea* cells highlighted the complex arrangement of the biofilm, constructing bridges between structures of turf (Figure 2-7c).

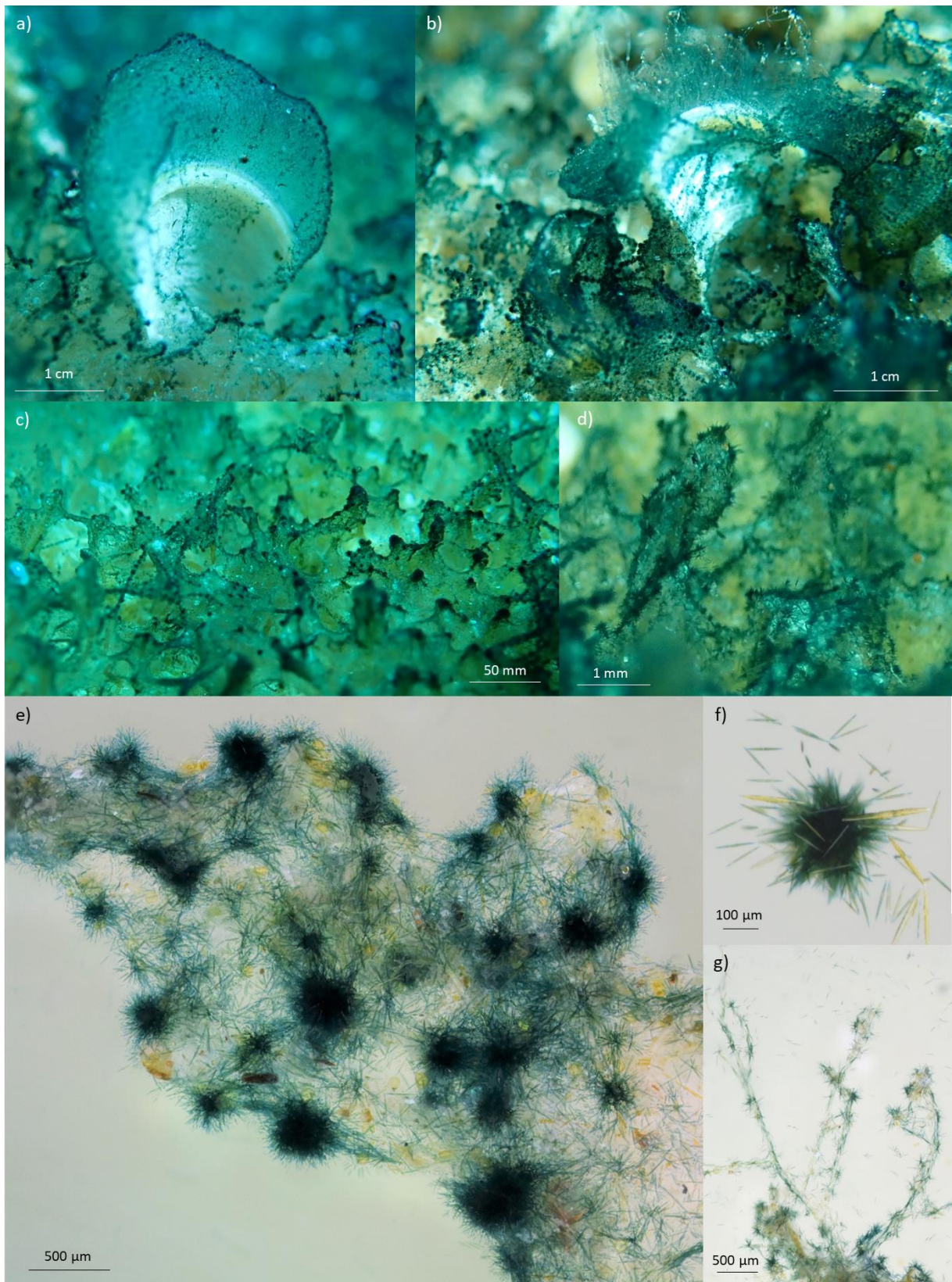


Figure 2-7: Pictures from Corsica, March 2021 a) to d) Underwater macro pictures of the blooms, covering: a) and b) *Padina* with *Haslea* cells covering their hairlines and c) and d) turf; e) to g) pictures taken using binocular magnifier e) accumulation of blue *Haslea* cell on the turf biofilm, f) *Haslea* accumulation forming a spiky ball, g) *Haslea* cells supported by macroalgae hairlines

5.4 Species of blue *Haslea* responsible for the blooms

Blue *Haslea* species present in the blooms were identified for each of the different survey locations. *Haslea ostrearia* was present in 2019, both in Corsican bloom and in Croatia samples. In Corsica 2021 and 2022 blooms, as well as in Croatia (2019) and on the Frioul Island (2021), several strains per location have been identified as *H. provincialis*. One non-blue species, *Haslea corsicuricta* Falaise, Mouget, Séveno sp. nov., was also sporadically found in Corsica and Croatia samples.

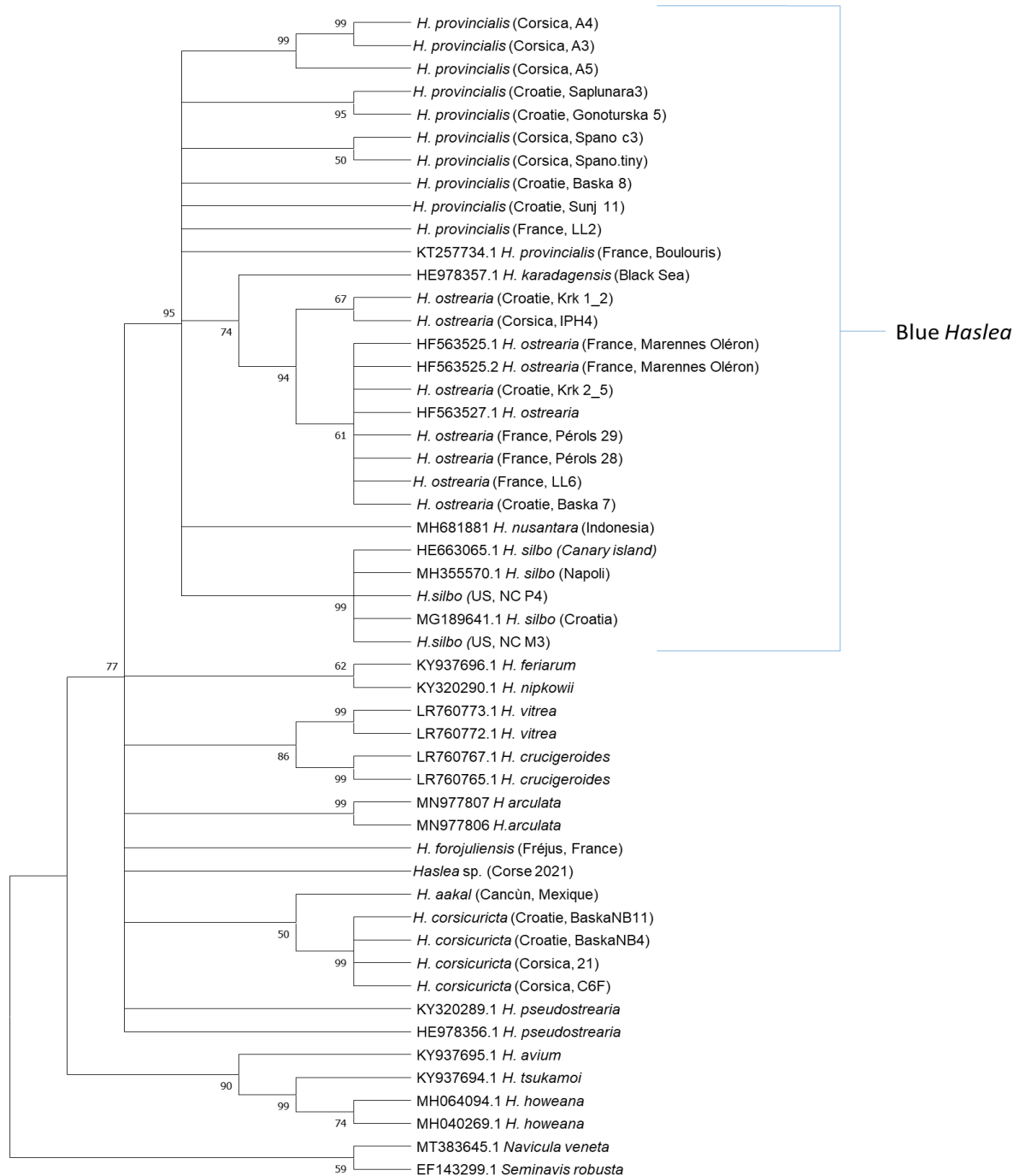


Figure 2-8: Phylogenetic maximum likelihood tree obtained from partial *rbcl* genes computed for 1000 bootstrap replicates. The tree is rooted with a *Navicula* and *Seminavis* species. Branches corresponding to partitions reproduced in less than 50% bootstrap replicates are collapsed.

The chloroplastic marker phylogenetic tree (Figure 2-8) shows that geographically close populations may be genetically distant. For instance, strains of *H. provincialis* from Gonoturska and Saplnara Bays, (Mljet Island, South Adriatic, Croatia), seems genetically closer to stains from Corsica than from the strain collected in Šunj Bay (Lopud Island, South Adriatic, Croatia).

5.5 Environmental parameters

Various environmental parameters were examined to provide a better understanding of the global dynamic of blue *Haslea* blooms. From 2016 to 2022, blooms of 2016, 2018 and 2022 were the most intense, the most scattered along the Revellata Cape and they lasted the longest, from March to June. Thus, variations of the environmental parameters before and after the blooms were also studied to identify the key ones carrying out a role in bloom development. In Calvi Bay over the seven last years, the temperature in the first 10 m in depth ranged from 12.6 °C (January 2019) to 28.8 °C (August 2018) (Figure 2-9). When the blooms started between late February and early March, the temperature was close to its minimum and when the blooms stopped on the beginning of June, the temperature ranged between 17.0 °C (June 2021) to 20.5 °C (June 2022). Salinity did not merely follow an annual variation with an average of 37.9 psu, extreme values varying from 35.61 to 41.9 psu (Supplementary material, Figure 2-11). Seawater in blooming sites in Croatia was saltier and warmer when compared with sites without blooms, 38.8 psu and 23.6 °C and 39.1 psu and 25.6 °C, respectively (Table 2-2).

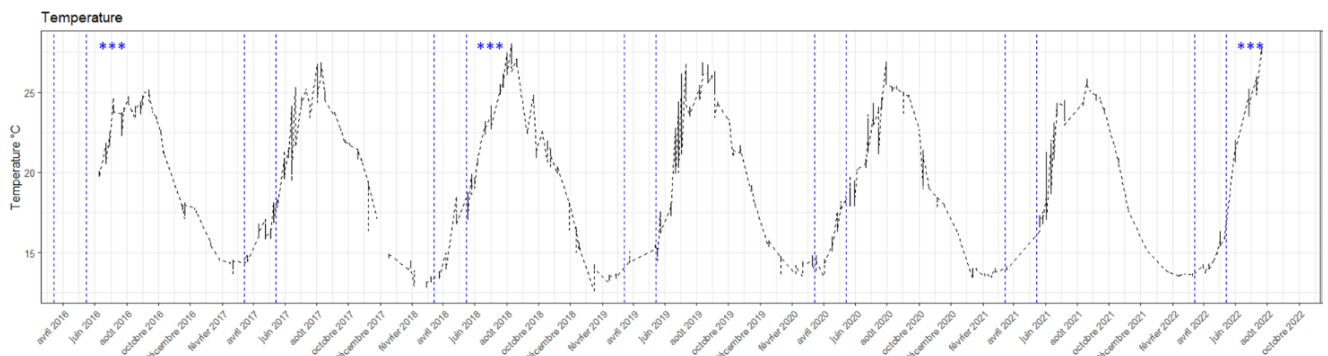


Figure 2-9: Temperature (°C) evolution over the last seven years in Calvi Bay, dashes lines represent the maximum blooms period, the asterisks refer to years with intense blooms

The concentration of silica in seawater was especially investigated, as it could be an important factor. The concentration of silica in seawater was investigated closely, as it could be an important factor for the development of benthic diatoms. We found that silicate concentration ranged from 0.16 μM to 4.69 μM with an average of 0.72 μM . The patterns of silica concentration did not follow those of blooms, nor was there a correlation between silica concentrations and bloom intensity (Figure 2-

10a). Along the Croatian coast, sites where the blooms were observed were not the ones with the highest silica values.

It has been noted that, in Calvi Bay, the favorable period for blooms was right after the nitrate and Chla peaks (Figure 2-10b and 2-10c). However, the intensity of nitrate and Chla peaks was not correlated with the intensity of the blooms. For example in 2016, the *Haslea* bloom was more intense than in 2019, though 2016 peaks of nitrate and Chla were lower. Nitrate concentration was constant between Croatian sites and nitrite concentration was higher in samples from blooming zones. In Gonoturska, the Chla was higher than in the other Croatian locations. The phytoplankton (pelagic) blooms was followed by the zooplankton blooms (Figure 2-10c and 2-10d). the peaks reaching their maximum in the same range as the benthic blooms of *Haslea*. Phosphate and ammonium concentrations did not vary much during or close to the period of blooms (Supplementary material, Figure 2-12). In Croatia, phosphate and ammonium were at their maximum in Gonoturska, 0.4 μM and 0.6 μM , respectively, but values were more homogenous between the three other sites.

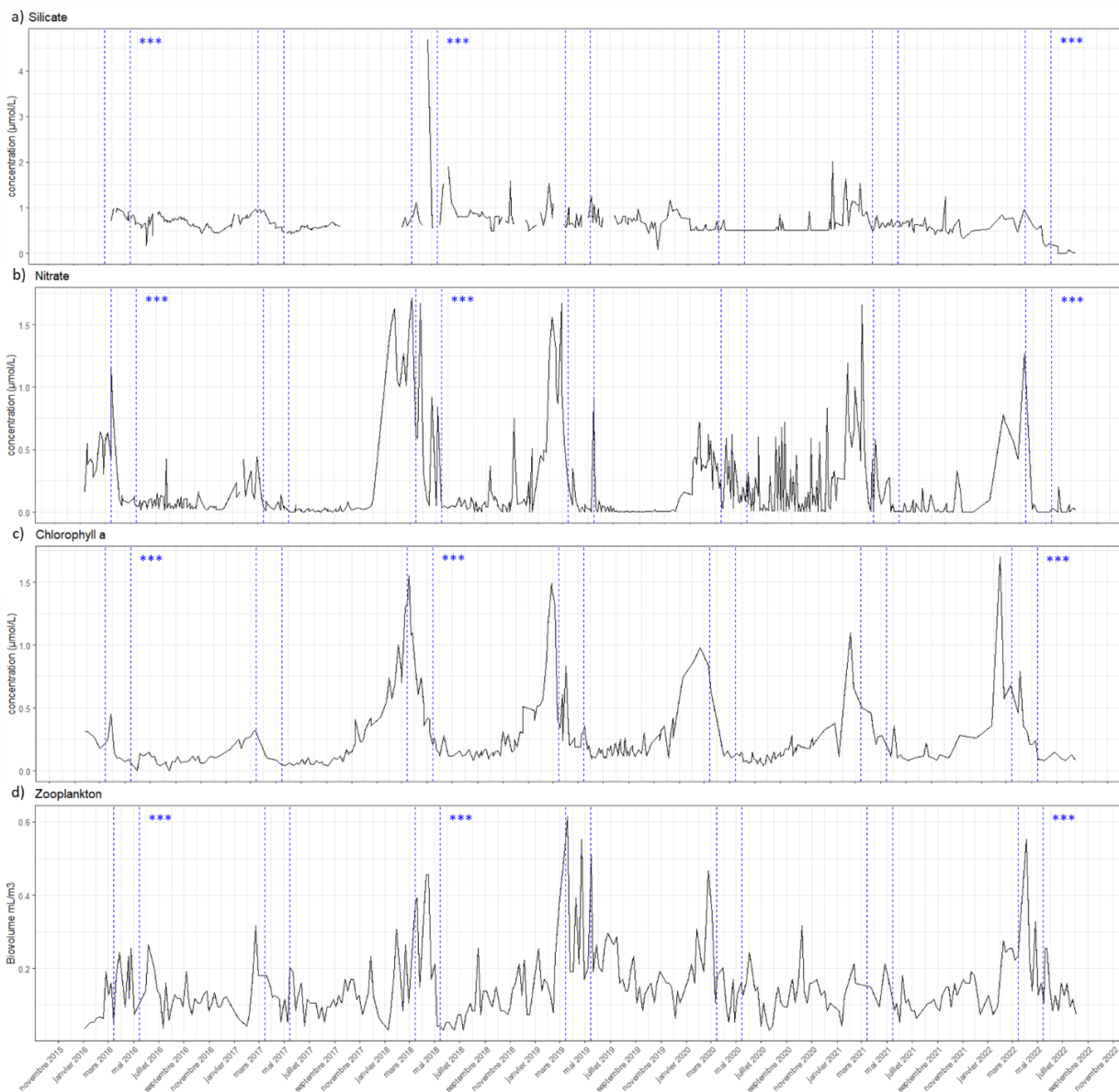


Figure 2-10: Silicate ($\mu\text{mol/L}$), Nitrate ($\mu\text{mol/L}$), Chlorophyll a (μg) and zooplankton biovolumes (mL/m^3) evolution in Calvi Bay over the last seven years, dashes lines represent the maximum blooms period, the asterisks refer to years with intense blooms

Table 2-2: Environmental parameters recorded on Croatian sites, in July 2020

	Sampling site	Haslea bloom	Haslea in microscopy	Date	Salinity	Temperature $^{\circ}\text{C}$	PO4 (μM)	SiO4 (μM)	NH4 (μM)	NO2 (μM)	NO3 (μM)	TIN (μM)	Chl a (μM)
Mljet island National Park	Malo jezero	no	no	17/07/2020	39.2	26.00	0.12675	3.37006	0.30134	0.01755	0.24145	0.56034	0.18
	Veliko jezero	no	yes	17/07/2020	39,00	25.3	0.1521	4.30843	0.34086	0.01365	0.26835	0.62286	0.16
	Gonoturska Bay	yes	yes	17/07/2020	38.8	23.6	0.36504	6.18517	0.62738	0.0273	0.2197	0.87438	0.42
Hvar island	Stari Grad Bay	yes	yes	21/07/2020	38.7	23.6	0.11154	2.63349	0.38532	0.02925	0.24475	0.65932	0.11

6. Discussion

The objective of this study was to understand the dynamics of *Haslea* blooms in two areas and at several time periods. The comparison between Mediterranean blooms and the ones previously described in Atlantic oyster ponds blooms is limited, as each environment are very contrasting. The oyster beds are closed, shallow environments and are therefore conducive to rapid variations in certain parameters such as salinity, which will vary according to the inflow of seawater via the high tides, the inflow of fresh water from the rivers irrigating these oyster beds or due to rainfall. Unlike the Atlantic Ocean, Mediterranean Sea is considered as an oligotrophic environment. The seasonality between the Atlantic and Mediterranean blooms are not the same, being respectively autumn and spring, therefore temperature optimums are different in between these two locations. Two open environment areas were chosen to study bloom, one in Calvi Bay, Corsica, France and one along the Adriatic coast, Croatia. In the Ligurian Sea, blooms usually begun late February/early March, reaching their maximum in intensity and coverage during April and starting to decrease in June. In the Adriatic Sea, blooms were observed during July and August. *Haslea* blooms were characterized by a blue color spreading on turf and macroalgae like *Padina*.

In laboratory conditions (e.g., *Haslea* culture in Erlenmeyers) or in semi-closed environments (e.g., oyster ponds), the blue-green color of cultures is partly due to the accumulation of extracellular marennine (Turpin, 1999). However, in open environments, the intensity of blue color resulted from the accumulation of *Haslea* cells containing intracellular marennine in benthic biofilms. Extracellular marennine does not seems to accumulate in these benthic biofilms but is instead being diluted in the water column. *Padina* algae constitute a substrate propitious to the development of such biofilms, because their absorbent hairlines can be used as a support and they release few allelopathic compounds (Pezzolesi *et al.*, 2021).

Molecular analysis of *Haslea* species in our samples, enabled to identify two blue species, *H. ostrearia* and *H. provincialis*, and one non-blue species *H. corsicuriecta* sp. nov. These species were found either at the same site at different times, at the same site simultaneously or individually at one site. Different species of *Haslea* were even identified at the same time, in equivalent ecological niche, for example in the Canary Islands and in Guam Islands (Gastineau *et al.*, 2021a; Lobban *et al.*, 2020). A parallel can therefore be drawn between these benthic species and the "paradox of the plankton" (Hutchinson, 1961). This theory was put forward because ecological models could not explain the large diversity of microorganisms inhabiting similar ecological niches in the water column. This theory has since been discussed (e.g.: Chase and Leibold, 2009).

Our observations revealed that only one species became predominant the Mediterranean blooms, *H. provincialis*. Previous prospections along the French coasts of the Ligurian Sea lead to

identify other strains of blue and non-blue *Haslea* in not blooming conditions. For instance, in the pond “Etang de l’Or”, Hérault (France), a zone known for shellfish farming, the presence of *H. ostrearia* species has been found. Along the French Riviera coast of La Londes-les-Maures, two strains of *Haslea* were identified in the same zone, *H. provincialis* and *H. ostrearia*. In this same area, *H. fejurio* sp. nov. Mouget & Caruso, a non-blue species from Fréjus, was described. The blue *H. silbo* has also been previously recorded in the Mediterranean Sea, in Napoli Bay and in the Adriatic Sea. These species can be transported by currents as they have tychopelagic phases (Robert, 1983). In addition, due to their close link with aquaculture, it is worth mentioning that oysters can also be a vector of transport for microalgae (Hégaret *et al.*, 2008).

In this study, the dynamics of benthic blue *Haslea* blooms were investigated in the Mediterranean Sea, by examining the favorable and unfavorable conditions for their establishment. The analysis of abiotic parameters over the last seven years in Calvi Bay showed that the timing of *Haslea* blooms followed the one of phytoplankton blooms. A study of Goffart *et al.*, 2015, has shown that the principal drivers of the spring phytoplankton blooms (starting in February) in Calvi Bay, were the strong wind events from the previous winter. In fact, Calvi Bay is connected to a deep-sea canyon (from 100 m right down to 1000 m deep) (Richir *et al.*, 2015) and during strong winter wind events, an upwelling brings deep sea nutrients up to the surface due to vertical mixing of the water column (Goffart, 1992). It results in an increase in nitrate and nitrite concentrations in the upper layers, which favors phytoplankton development. The end of the phytoplankton bloom is conditioned by the increase in grazing pressure from the zooplankton, usually characterized by a spring peak (increase in both abundance and biovolume) taking place at the end of March (Fullgrabe *et al.*, 2020). In the Adriatic Sea, phytoplankton blooms also followed a seasonal cycle, with a maximum in spring (May), a decrease through summer months and a second increase in autumn, phytoplankton abundance being at its minimum during winter (Cerino *et al.*, 2012 : mid-Adriatic ; Federica Cerino *et al.*, 2019: north-Adriatic). By blooming after the phytoplankton bloom, *Haslea* cells can benefit from an increase in light reaching the benthic environment. Moreover, as the *Haslea* blooms were observed in shallow waters and exposed to high irradiance, light seemed to be a key factor for the species development, as it has already been found to influence growth and marennine production (Mouget *et al.*, 2005). In addition, after the phytoplankton bloom, part of the organic matter escapes from the zooplankton and sinks, being eventually remineralized by the bacterial community of the benthic biofilm and then reutilized by the autotrophs. Such process, may ultimately promote *Haslea* development.

Regarding salinity, the small interannual and seasonal variations suggests a poor influence of salinity on bloom evolution. Concordantly, previous observations showed that *H. ostrearia* is a euryhaline organism, as demonstrated in oyster ponds where the salinity fluctuates due to their filling

with either tide or river. The euryhaline characteristic has also been demonstrated in laboratory conditions (Neuville and Daste, 1978; Wraige *et al.*, 1997).

Marine current circulation could also be a factor favoring *Haslea* blooms along the Revellata Cape. Indeed, in low wind conditions, subsurface currents create a small gyre on the east part of the Revellata Cape (Skiris *et al.*, 2001), favoring the accumulation of *Haslea* cells (Supplementary material, Figure 2-13).

Concerning the decrease and the end of *Haslea* blooms, it appears to be correlated to an increase in surface water temperatures. The rise in temperature could be directly deleterious to *Haslea* cells, *H. ostrearia* thermal limit has been recorded at 20 °C in laboratory (Adjout *et al.*, 2022). In Calvi Bay, the temperature of 20 °C is usually reached in early June. It could also be an indirect forcing factor, since changes in temperature affecting the physicochemical process and functioning of biological systems. A change in temperature could thus favor other diatoms with a higher thermic preferendum (Van der Grinten *et al.*, 2005). Moreover, a rise of temperature also enhances bacterial metabolisms which might induce changes in the community, with the possible occurrence of bacteria that could be deleterious to *Haslea* cells (Melo and Bott, 1997; Rao, 2010). The possible interactions between bacteria, blue *Haslea* spp. and other phytoplankton will be addressed specifically in an on-going work dealing with the impacts of *Haslea* blooms on the epiphytic biofilm communities.

Strong wind events resulting in a strong swell can also be unfavorable to the bloom development. In fact, the swell will mix the water column and will especially affect the shallow environments. This can lead to the resuspension of the blooms and this mixing of the waters can result to the “tychopelagic” observation of *Haslea* spp. In these unfavorable conditions the bloom might ultimately disappears. Such phenomenon was observed in April 2019, when stormy weathers were followed by a strong decline in the *Haslea* bloom which did not recover as no sign of it was visible in May (Supplementary material, Figure 2-14) (personal observation).

Even though the study of virus communities associated to the benthic biofilms was out of the scope of this work, it cannot be discarded that they could have an influence on the bloom dynamics. According to Thingstad (2000), the more abundant a species is, the more likely it can interact with a virus, meaning that viruses can play a key role in controlling populations and maintaining a high biodiversity. The interactions between viruses and microalgae have been studied in phytoplankton communities and related results showed that, for example, *Rhizosolenia setigera* Brightwell and *Chaetoceros socialis* Lauder viruses could induce cell lysis and therefore stop the bloom development (Nagasaki *et al.*, 2004; Tomaru *et al.*, 2009). In addition, it has been highlighted that vibriobenthos may display seasonal variations, with, for example, in Chesapeake Bay sediments, virus abundance being maximum in the end of spring, beginning of summer and being correlated with the bacterial abundance (Helton *et al.*, 2012; Helton and Wommack, 2009). Further studies could be done on *Haslea*

blooms, with a focus on the variations of viral community to determine if they play a role in the bloom dynamics.

7. Conclusion

The present work is the first investigation on the development of blue *Haslea* blooms in natural environments. Blooms of *H. ostrearia* have long been observed in autumn and to a lesser extent in spring, in oyster ponds along the French Atlantic coast, which are closed anthropized environments. In the Mediterranean Sea, *Haslea* spp. blooms occur in open environments. Species present on each coast are different, *H. ostrearia* is responsible for blooms in oyster beds and can be observed in the Mediterranean, whereas *H. provincialis* is the main species in the Mediterranean Sea and is endemic from there. These two species can thus have distinct optimums. Indeed, this study allowed us to better understand the environmental parameters related to *Haslea* spp. blooms in open area. A temporal lag was noticed between the Ligurian Sea and the Adriatic Sea, as blooms occurred during spring and during summer time, respectively. In both cases, they were recorded after the planktonic bloom. Therefore, the benthic bloom of *Haslea* could benefit to a better access to light. Temperature might, directly or indirectly, have an impact on the decrease of *Haslea* blooms, due to a possible shift in microorganism communities of the biofilm. Our results contribute to the improvement of the understanding of the dynamics in photoautotrophic biofilms.

Acknowledgments

This work was fund through Horizon 2020 Research and Innovation Program GHANA (The Genus *Haslea*, New marine resources for blue biotechnology and Aquaculture, grant agreement No [734708/GHANA/H2020-MSCA-RISE-2016] J.-L.M.). Thanks to the STARESO staff for diving support and the availability of data on Calvi Bay from the program STARECAPMED (STation of Reference and rEsearch on Change of local and global Anthropogenic Pressures on Mediterranean Ecosystem Drifts, supported by Territorial Collectivity of Corsica and the Rhone-Mediterranean and Corsica Water Agency). Observations along the Adriatic Sea coast were partly funded by the Croatian Science Foundation under project IP-2019-04-9043 (DiVMAd). We thanks Zoran Jurić, from Dubrovnik University for the field trip organization along Dalmatian coast and the analysis of environmental parameters. Thanks to Adeline Stewart for verifying the English.

8. Supplementary materials

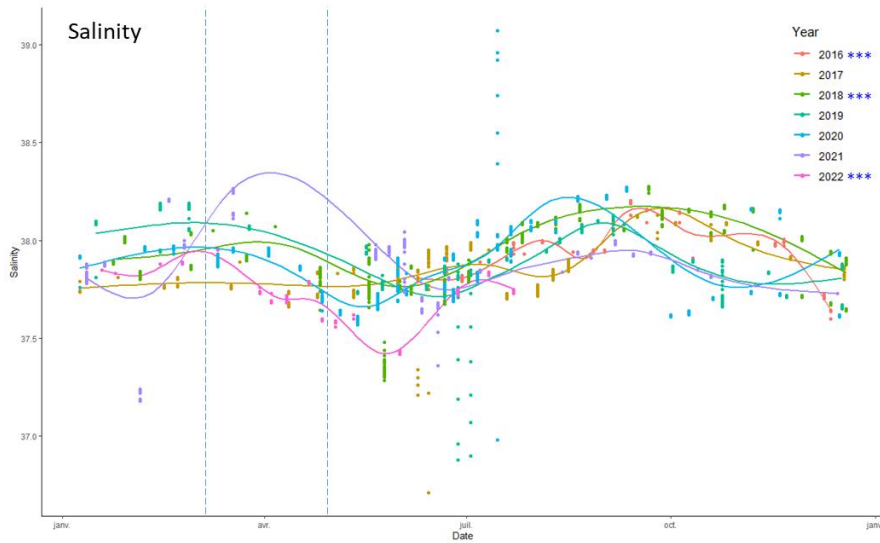


Figure 2-11 : Yearly salinity (PSU) evolution over the last seven years in Calvi Bay, dashes lines represent the maximum blooms period, the asterisks refer to years with intense blooms

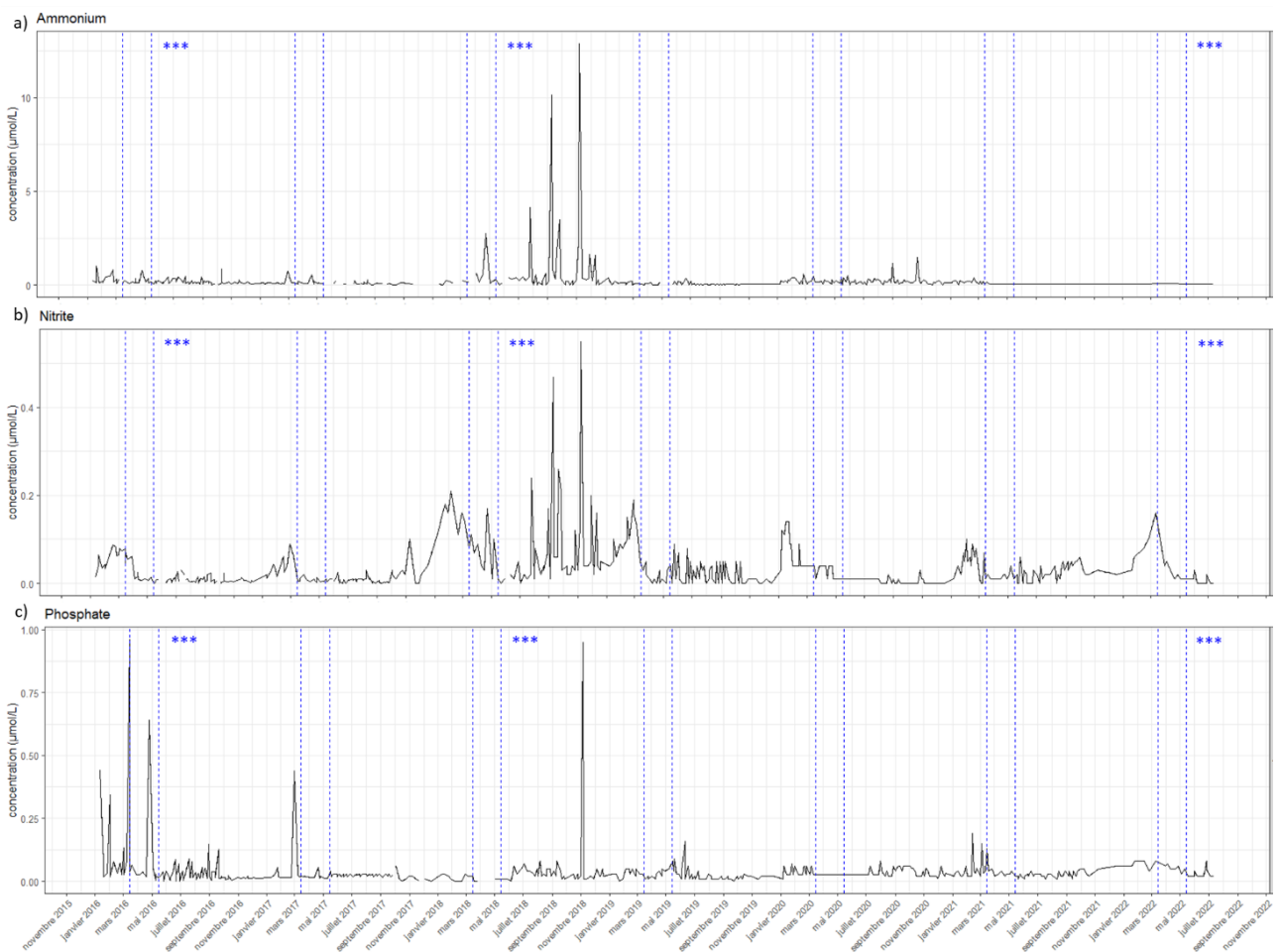


Figure 2-12: Ammonium, Nitrite and Phosphate concentrations, in $\mu\text{mol/L}$, evolution over the last seven years in Calvi Bay, dashes lines represent the maximum blooms period, the asterisks refer to years with intense blooms

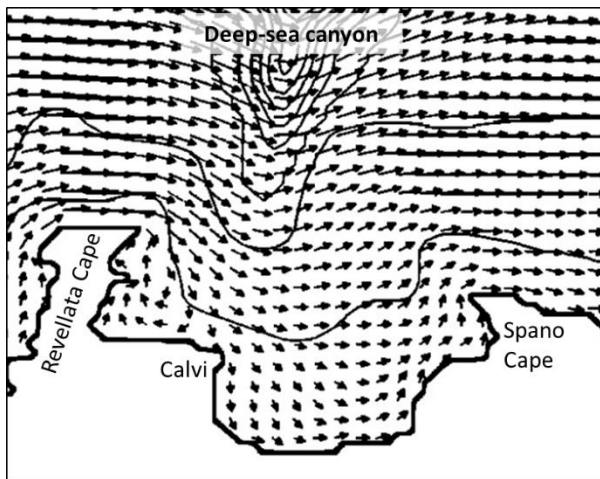


Figure 2-13: Subsurface current in Calvi Bay during low wind conditions (modelised by Skliris et al. 2001)

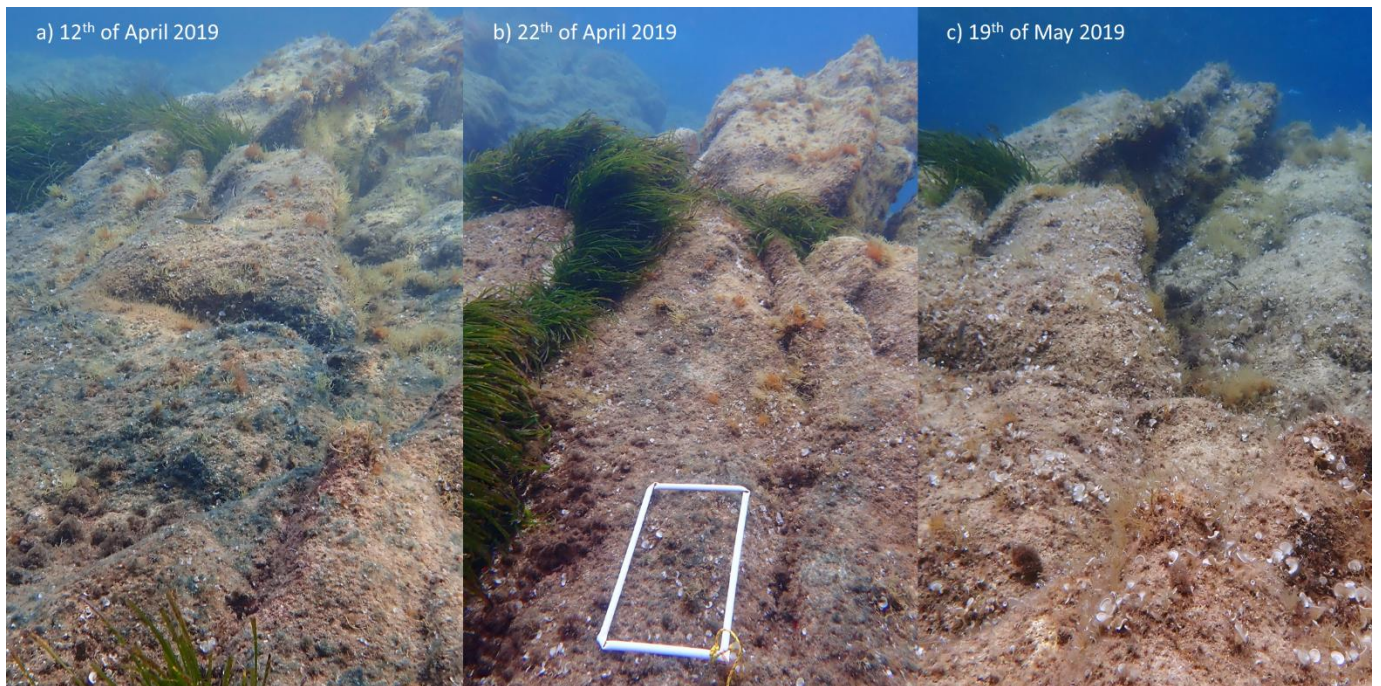


Figure 2-14: Decreased of the bloom, a) seasonal maximum of the bloom, b) bloom after the strong wind and swell event and c) ending of the bloom

Partie 2 : Lien entre état écologique, substrats et blooms d'*Haslea*

1. Contexte et introduction

Cette partie permet d'aborder le lien entre la qualité de l'eau et les macroalgues présentes. Ainsi, l'éventuel lien entre la qualité de l'eau et la présence des blooms d'*Haslea* spp. en Méditerranée pourra être déterminé.

La Méditerranée représente seulement 0,8 % de la superficie marine mondiale mais contribue à 7 % de la biodiversité globale, regroupant de nombreuses espèces endémiques (Tortonese, 1985). Cependant elle est souvent considérée comme la mer la plus polluée dû aux nombreuses pressions anthropiques qu'elle subit. En effet, depuis la création du canal Suez à la fin du 19^{ème} siècle avec, pour conséquence, les premières arrivées d'espèces non indigènes, la mer Méditerranée est également devenue un carrefour industriel important. Le littoral a également été grandement modifié pour répondre à la densification de la population et au développement du tourisme balnéaire. Ces différentes modifications ont entraîné une fragmentation des habitats et une augmentation de la pollution, liée en partie aux rejets en mer des eaux non traitées (Coll *et al.*, 2010).

Les communautés algales sont structurées en fonction des paramètres environnementaux et de la morphologie de l'habitat. Étant des organismes sessiles et pluriannuels, les macroalgues intègrent sur le long terme les effets des variations en nutriments ou polluants, ce qui en font de bons indicateurs écologiques (*e.g.* : Chakraborty *et al.*, 2014; Diez *et al.*, 1999; Littler and Murray, 1975).

Suite à l'augmentation de la pollution et de l'altération du milieu, des mesures ont été prises au niveau européen pour essayer de rétablir un bon statut écologique des masses d'eau. La directive européenne cadre sur l'eau (DCE, 2000/60/CE) demande une évaluation de la qualité des eaux côtières pouvant permettre la mise en place de plans de gestion empêchant leur détérioration ou de plans de remédiation. Pour répondre à ces problématiques, l'indice CARLIT (CARTographie LITtorale) a été développé par Ballesteros *et al.*, en 2007. Il mesure l'évolution de la communauté macroalgale des étages médio et infralittoral sur les côtes rocheuses méditerranéennes. Cet indice prend en compte des espèces d'algues pollusensibles (cystosaires : genres *Cystosaira* et *Ericaria*) et pollurésistantes (algues vertes) comme "proxy" de la qualité de l'eau et ainsi mesurer l'incidence de la pollution dans le milieu. La nature et la morphologie du substrat rocheux sont aussi prises en compte car certaines espèces ne peuvent pas se développer sur des substrats trop pentus. De plus, cet indice est basé sur l'observation et, de ce fait, est donc non-destructif.

L'indice CARLIT a été mesuré sur les côtes catalanes (Ballesteros *et al.*, 2007), la côte de ligurienne italienne (Asnaghi *et al.*, 2009; Fuente *et al.*, 2018), sur le littoral vénitien (Sfriso and Facca, 2011), sur la partie nord de la mer d'Alboran (Bermejo *et al.*, 2013), sur la côte nord-est de l'Adriatique (Nikolić *et al.*, 2013), le sud-est de la France et sur le littoral Corse (Blanfuné *et al.*, 2017), les côtes tyrrhéniennes est (Jona Lasinio *et al.*, 2017) et les côtes libanaises (Badreddine *et al.*, 2018).

En plus de réaliser un état des lieux de la qualité des eaux côtières en baie de Calvi, les relevés pour calculer l'indice CARLIT nous permettent de prospecter plus largement la présence des patches d'*Haslea*. En effet, les sites où les blooms ont été observés en baie de Calvi et sur les côtes croates de l'Adriatique, sont décrits comme des peu pollués.

2. Méthodes

Présentées dans le chapitre "Méthodes d'analyses"

3. Résultats et discussion

3.1 Mesure de l'indice

L'indice CARLIT a été déterminé pour 19 stations, dans la partie ouest de la baie de Calvi (Figure 2-15). Les valeurs de l'indice sont comprises entre 0,48 et à 0,94, ce qui équivaut à un statut écologique compris entre 'moyen' et 'très bon'. La moyenne de l'indice sur la baie est de 0,65, c'est-à-dire qu'il y a une 'bonne' qualité globale des masses d'eaux côtières sur la partie ouest de la baie de Calvi.

Les valeurs les plus basses de l'indice, ont été mesurées pour les stations 6, 7, 8, 13 et 18, représentant un état écologique 'moyen' des eaux côtières. Les stations 6, 7, 8 et 18 subissent des pressions anthropiques : eaux portuaires, habitations et relâchement des eaux usées. La station 13 quant à elle, est l'une des stations la plus exposée à l'hydrodynamisme quand le vent rentre dans la baie. Les stations 16 et 17 ont un statut écologique 'très bon' et sont les stations les plus abritées, avec un faible hydrodynamisme.



Figure 2-15 : Représentation des statuts écologiques liés à l'indice CARLIT ainsi que la présence des patches bleus d'*Haslea* spp., en 2021, en baie de Calvi (les stations 1 à 5 n'ont pas été mesurées en 2021)

L'hydrodynamisme n'a pas été pris en compte dans la mesure de l'indice, cependant, il joue un rôle important dans le recrutement de certaines espèces algales (e.g.: Dobretsov et Wahl, 2008; Eckman, 1983; Granhag *et al.*, 2004). Un hydrodynamisme important va ralentir la croissance des cystosaires par exemple, et en cas de grosse tempête peut participer à l'arrachage des thalles (Ballesteros *et al.*, 1998; Capdevila *et al.*, 2015).

D'autres facteurs tels que la pollution et l'hydrodynamisme peuvent également avoir un impact sur les valeurs de l'indice. Dans les zones de baignade et d'ancrage, on peut observer une pression mécanique d'arrachage. La baisse des stocks des tops-prédateurs, en lien avec la pêche professionnelle et récréative, peut conduire à un changement important au sein de la communauté algale. En effet, les prédateurs intermédiaires (broueteurs) vont alors prendre une place plus importante dans le réseau trophique et exercer une plus forte pression de pâturage (régulation *top-down*) (Piazzi and Ceccherelli, 2017).

Mesurer cet indice est aussi un bon moyen de surveiller l'arrivée d'espèces non-indigènes, pouvant devenir envahissantes. On observe au niveau mondial une augmentation des EVEC (Espèces Végétales Exotiques Envahissantes). En Méditerranée, cette augmentation est liée au réchauffement climatique, à l'ouverture du canal de Suez qui permet la remontée de spores venant de la mer Rouge,

au relâchement des eaux de ballast ou à un mauvais traitement des eaux relâchées en mer (Streftaris and Papathanassiou, 2005). Par exemple l'espèce *Caulerpa taxifolia*, algue tropicale devenue envahissante en Méditerranée, avait été accidentellement introduite à Monaco dans les années 1980 (Meinesz and Hesse, 1991), et à présent, elle est fréquemment retrouvée sur les stations du CARLIT. La plante marine *Halophila stipulacea*, indigène de l'océan indien, a commencé à se répandre en Méditerranée suite à l'ouverture du canal de Suez en 1869 (Lipkin, 1975). Elle a été, en particulier, observée près de la citadelle de Calvi en 2022.

3.2 Lien entre CARLIT et *Haslea*

Des patchs d'*Haslea* spp. ont été relevés entre les stations 21 et 24 et au niveau des stations 17, 9 et 7. Des patchs bleus ont donc été observés sur les trois niveaux écologiques, de 'moyen' à 'très bon'. Un bloom avait également été observé dans la calanque de la Crine au Frioul (Marseille) qui a un indice CARLIT 'moyen' (Blanfuné *et al.*, 2017). Ces patchs sont retrouvés sur le turf (indice écologique faible, représentation d'une végétation rase) et sur les thalles des *Padina*. *Padina* n'a pas d'indice écologique, ses thalles ont une croissance annuelle et n'intègrent donc pas les perturbations sur le long terme. Après plusieurs observations microscopiques, il semblerait qu'il n'y ait pas de cellules d'*Haslea* épiphytes des cystosaires. Comme décrit dans le chapitre précédent, les blooms d'*Haslea* spp. s'établissent préférentiellement sur les biofilms benthiques ou sur les algues présentant des poils absorbants. Le type de substrat semble être un paramètre plus important à l'établissement du bloom que la qualité des eaux côtières qui peut être comprise entre 'très bien' et 'moyenne'. Cependant, des patchs d'*Haslea* n'ont pas été vus sur des sites de qualité médiocre ou mauvaise.

4. Conclusion

L'indice CARLIT est un bon moyen de mesurer la qualité des eaux côtières le long des côtes rocheuses méditerranéennes. En 2021, la partie ouest de la baie de Calvi avait une bonne qualité d'eaux côtières car aucun transect n'avait une qualité en dessous de 'moyenne'. Il serait intéressant de mesurer cet indice sur des transects de la partie est de la baie, afin d'avoir une vue globale de la dynamique algale dans la baie de Calvi. De plus, afin de réduire les biais externes de l'indice, une valeur d'hydrodynamisme pourrait être intégrée au calcul.

En parallèle de l'étude sur la dynamique et les environnements propices à l'établissement du bloom, l'impact de ce dernier sur la communauté du biofilm a été mesuré.

Chapitre 3

Impact des blooms d'*Haslea*

1. Contexte

Le chapitre précédent a montré comment les paramètres physico-chimiques et la qualité des eaux pouvaient influencer la dynamique des blooms d'*Haslea* spp. On cherche maintenant à comprendre l'impact que peut avoir le bloom à l'échelle du micro environnement, dans le biofilm.

Le bon fonctionnement des cycles biogéochimiques dépend au niveau global d'un bon équilibre entre les organismes autotrophes et hétérotrophes (Paerl et Pinckney, 1996). Cet équilibre est aussi retrouvé au niveau local, par exemple à la surface des macroalgues qui ont une communauté épiphytique composée principalement de diatomées et de bactéries (Paling et McComb, 2000). Les organismes hétérotrophes recyclent les éléments exsudés par les autotrophes (forme organique), qui sont ensuite, de nouveau disponibles (forme minérale).

En environnement oligotrophe, les épiphytes associés aux macroalgues peuvent leur permettre d'améliorer l'absorption des nutriments nécessaires à leur développement. Par exemple, des bactéries appartenant aux embranchements Alpha-proteobacteria, Bacteroidetes et Gamma-proteobacteria sont spécialisées dans la décomposition de matières organiques issues des algues (Teeling *et al.*, 2012). Dans les environnements eutrophes, les épiphytes peuvent avoir un impact négatif sur leurs hôtes en raison d'une trop grande atténuation de la lumière (Short *et al.*, 1995). L'eutrophisation des eaux côtières va également induire une augmentation des blooms algaux, certains pouvant être toxiques.

La majorité des blooms de diatomées n'ont pas de conséquences néfastes sur l'environnement, il existe cependant certaines espèces nocives. La toxicité peut être liée directement aux composés synthétisés, par exemple l'acide domoïque chez *Pseudonitzschia* sp. Ces composés toxiques peuvent ensuite être absorbés et accumulés par différents organismes comme les bivalves qui filtrent de grande quantité d'eau. L'accumulation de toxines peut engendrer des mortalités chez les bivalves eux-même ou pour les maillons supérieurs du réseau trophique et créer un risque sanitaire potentiel si ces produits contaminés sont ingérés par l'homme. Les conséquences peuvent aussi être indirectes : dû aux blooms, certains nutriments ne sont plus accessibles pour les autres organismes vivants dans ce milieu, pouvant causer de grande mortalité à différents maillons du réseau trophique. Il est donc important de comprendre les interactions entre ces organismes lors d'un bloom. De plus, étudier les mécanismes qui influencent la biodiversité du milieu est une problématique centrale en écologie.

Afin d'étudier l'impact du bloom d'*Haslea* sur le biofilm, les communautés épiphytiques de *Padina* et du turf ont été suivies. Le focus dans cette étude est porté sur les diatomées et les bactéries au vu des propriétés allélopathique et antibactérienne de la marennine, principalement observées au laboratoire (Falaise *et al.*, 2019; Gastineau *et al.*, 2014; Pouvreau *et al.*, 2007a; Prasetya *et al.*, 2016). De plus, diatomées et bactéries sont les microorganismes majoritaires composant les biofilms marins phototrophes (Marshall *et al.*, 1971). De précédentes recherches avaient été conduites pour évaluer l'impact éventuel des blooms de *H. ostrearia* dans les claires ostréicoles en lien avec l'évolution de la communauté de diatomées. Une diminution d'abondance de certaines espèces avait été observée (Moreau, 1970; Turpin, 1999).

Ces propriétés biologiques ont aussi été investiguées *in vitro* chez *H. karadagensis*, une autre espèce d'*Haslea* bleue. Le pigment produit par *H. karadagensis* possède des propriétés spectrales différentes de celles de la marennine, mais a également la capacité de verdir les branchies d'huîtres, ainsi que des propriétés antibactérienne, antivirale et antifongique (Gastineau *et al.*, 2012a). Une étude exploratoire avait également été réalisée sur les pigments de types marennine produit par *H. nusantara* (Prasetya *et al.*, 2020), cependant les activités biologiques des autres pigments de type marennine produits par les différentes espèces d'*Haslea* "bleues" décrites depuis n'ont pas été étudiées.

Impact of benthic *Haslea* spp. blooms on periphyton, in the western Mediterranean Sea

Séveno J.¹, Witkowski A.², Car A.³, Gastineau G.², Sirjacobs D.⁴, Leignel V.¹ and Mouget J-L.¹

(to be submitted)

1 BIOSSE Laboratory, Le Mans University, France

2 Institute of Marine Sciences, University of Szczecin, Poland

3 Institute for Marine and Coastal Research, University of Dubrovnik, Croatia

4 InBioS–PhytoSYSTEMS Laboratory, Liège University, Belgium

2. Abstract

Related to climate change and eutrophication of coastal waters, blooms events, especially harmful algal blooms (HAB) tend to happen more frequently. *Haslea* blooms have been observed in oyster ponds for a long time, but their impact in the open environment is still poorly understood. The marennine pigment produced by *Haslea ostrearia* can display various biological properties in laboratory conditions, including antibacterial and allelopathic. The aim of this study is to understand how these bloom events can affect the underlying community of microorganisms that form biofilms. Morphological and molecular approaches were used to compare changes in the community. *Haslea* blooms occurrences do not seem to affect the diatom and bacterial communities in large proportions, either positively or negatively. However, overall, we observed an improvement of the alpha diversity in bloom conditions. This work also provided new perspectives on the biological interest for *Haslea* spp. to synthesize marennine-like pigments and their possible applications.

3. Introduction

Photoautotrophic benthic biofilms or periphyton are very dynamic microenvironments, at the base of benthic food webs and are formed by a succession of well-defined steps (Cooksey and Wigglesworth-Cooksey, 1995; Underwood and Kromkamp, 1999). Bacteria are usually the first colonizers, followed by pennate diatoms and other microorganisms such as cyanobacteria, fungi and micro-fauna (Gawne *et al.*, 1998; Tuji, 2000). Therefore, a hierarchy is established, reflecting the organization of the populations according to their needs in terms of access to light, nutrients concentration and grazing pressure (Brotas *et al.*, 1995; Wotton, 2004). Diatoms and heterotrophic bacteria are in tight association and can influence one another using chemotaxis (Barbara and Mitchell, 2003; Cole, 1982). To communicate with each others and synchronize their activity in the biofilm, bacteria use “quorum sensing”, which means they communicate via the secretion and sensing of chemical signaling molecules. These auto-inducers can regulate gene expression within the bacterial community (Waters and Bassler, 2005). Diatoms can also interact with each other through allelopathic compounds. Allelopathy has been defined by Ricel, 1984 as “any direct or indirect, harmful or beneficial effect by one plant (including microorganisms) on another through the release of chemicals that escape into the environment.” Benthic diatoms could be more acclimatized and resistant than planktonic diatoms, due to the chemical signaling molecules that are in high level in the biofilm (Hilt, 2006). In biofilms, lipophilic allelopathic compounds are often more effective as water-soluble compounds are more easily dissolved in the water column. These phototrophic biofilms maintain a rich diversity both inter- and intra-species, with several genotypes of the same species found in a same biofilm (Jyrkänkallio-Mikkola *et al.*, 2016). Biofilm composition can adapt quickly to changes due to abiotic (environmental parameters) and biotic (microorganisms compounds and density) factors. Under favorable conditions, one diatom species can outcompete the rest of the community with a faster cell division rate leading to a bloom formation. Algal blooms have increased in frequency and intensity worldwide often due to the increase in macronutrients in waters (Hallegraeff, 1993; Paerl *et al.*, 2011). Certain bloom-forming algae release toxic compounds resulting in HAB (Harmful algae bloom) which have ecological, economical and sanitary impacts. Therefore, it is important to understand bloom dynamics and their effect on associated communities.

So far, *Haslea* blooms and their impacts have been studied only in oyster ponds. *Haslea ostrearia* is the emblematic species of the genus and is known to produce a blue pigment called marennine. When oysters are filtrate water from a pond where a bloom of *H. ostrearia* occur, their gills turn green due to the fixation of marennine pigment (Gastineau *et al.*, 2018). The green-gilled oysters have a socio-economical value in the Marennes Oléron area in France, since they have been consumed for centuries and are considered more valuable than the regular oysters.

In addition, marennine has been shown to display allelopathic and antibacterial activities in laboratory conditions (one diatom or bacteria species tested at a time). The response was species-dependent for algae, with a decrease in density of *Nitzschia costatum*, *Chaetoceros calcitrans* and *Haslea crucigera* (Gastineau *et al.*, 2014; Pouvreau *et al.*, 2007a; Prasetya *et al.*, 2016). Previous studies in Atlantic oyster ponds during *H. ostrearia* blooms showed a diminution of the density of *Skeletonema costatum* population (Moreau, 1970; Turpin, 1999). Regarding the antibacterial effect against the genus *Vibrio*, the inhibition was also strain dependent for some species (Falaise *et al.*, 2019)

Blue *Haslea* blooms also occur in open environments, for instance in the Mediterranean Sea, where *H. ostrearia* and *H. provincialis* were identified. The biological activities of the pigment produced by *H. provincialis* have not been tested yet. However, it can be hypothesized that all marennine-like pigments have bioactive properties like marennine, as evidenced in *H. karadagensis* (Gastineau *et al.*, 2012a) and in *H. nusantara* (Prasetya *et al.*, 2020).

In natural open environments, the dynamics of blue *Haslea* blooms has recently been documented, but their possible impacts remain to be studied. Indeed, the biological effects of marennine-like pigments might be different in an open environment when compared to laboratory conditions or in oyster ponds. In these limited environments, marennine-like pigments can accumulate and reach a threshold at which impacts on organisms are noticeable, whereas in open environments, hydrophilic pigments could be rapidly diluted in the water column. Moreover, interactions between organisms within biofilms are very diverse and complex (*e.g.*: Cirri *et al.*, 2018; Pérez-Burillo *et al.*, 2022; Solano *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2016) which could modify biological responses, thus differing with the straightforward biological effects observed in laboratory conditions. The objectives of this study were to estimate the impact of a blue *Haslea* bloom on the main communities of the underlying photoautotrophic biofilm.

4. Methods

4.1 Study sites and sampling

Two areas were chosen in the Mediterranean Sea to study and compare the impact of blue *Haslea* blooms on biofilm communities developed on two different substrates, *Padina* thalli or turf. The same substrates without blue *Haslea* blooms were used as controls. The first area was in Calvi Bay, on the northwestern coast of Corsica Island (France) in the Ligurian Sea. Sampling was conducted on the 12th and 13th of April 2019 and on the 25th to 29th of March 2021. A second area was along the Dalmatian coast (Croatia), Adriatic Sea, between Hvar Island and Dubrovnik coast with sampling from the 21st to 26th of July 2020. These two areas are considered oligotrophic environments and are

referred to as non-polluted sites. Along Corsican coast, in 2019, two sampling sites were chosen, one with low intensity blue *Halslea* patches (Port site) and one where *Haslea* bloom was the most developed (Madrepore site). In 2021, the bloom was not as developed on the Madrepore site, so a third site was added where the bloom was the most developed (Oscelluccia site). In Corsica, sampling was done by scuba diving from the STARESO marine station. Along the Dalmatian coast, three sites were chosen and sampling was done by snorkeling at the three sites (Table 3-1).

Table 3-1: Summary table of the different Zones and sites samples according the years, samples were took on *Padina* and turf for further diatom and bacteria analysis

Area	Year	Site	Substrate	
			Diatom	Bacteria
Calvi Bay	2019	Port	Padina + Turf	
		Madrepore	Padina + Turf	
	2021	Port	Padina + Turf	Padina + Turf
		Madrepore	Padina + Turf	
		Oscelluccia	Padina + Turf	Padina + Turf
Dalmatian coast	2020	Šunj	Padina	
		Drvenik	Padina	
		Lanterna	Padina	

At each site, three quadrats were placed in the bluest zones and three quadrats were placed in the control zones (no *Haslea* visible). In each quadrat, one tube of 15 mL was filled with *Padina* thallus and in Corsica a second tube of 15 mL was filled with turf. Turf was not sampled in Croatia because the bloom was only observed on *Padina* thalli. For diatom observations, tubes were conserved in formaldehyde 4 %, at room temperature until further processing. In the same quadrat, when sampling for bacteria community was done, one tube of 50 mL was filled with *Padina* and one tube of 50 mL was filled with turf. These tubes were conserved in ethanol 96 % at -80 °C until DNA extraction. In each quadrat and for both substrates, a fresh fraction was taken to measure the blue *Haslea* spp. density, to compare it with the rest of the total diatom community.

4.2 Diatom process

To remove the organic matter, samples were boiled in the same quantity of hydrogen peroxide (30 %) for 24 hours and then washed several times with deionized water. Ten drops of the suspension were then air-dried onto coverslips, which were then mounted onto a glass slide using Naphrax glue (Brunel Microscopes Ltd, Wiltshire, UK). Slides were observed using light microscopy (LM), Zeiss Axio Scope A1 equipped with a x100 Plan Apochromatic immersion objective with differential interference

contrast (DIC) (Carl Zeiss Ltd, Oberkochen, Germany). Pictures were taken using a Zeiss Axio Cam ICc5 camera.

In LM, a minimum of 300 diatom valves was counted and identified (Schrader and Gersonde, 1978; Witkowski *et al.*, 2012). Taxonomic identification was mainly based on Witkowski *et al.*, (2000) and for additional information on *Mastogloia*, Diatom Monographs, Volume 16 (Loir and Novarino, 2016) was used. *Haslea* cells have very fine valves that are difficult to discern under LM so they were not counted; allowing us to better visualize the variation in the diatom community. Furthermore, the relative importance of *Haslea* cells is given by the observation of fresh samples.

Scanning electron microscopy (SEM) was used to verify the taxonomy of some species. Samples were pipetted onto polycarbonate membrane filters, Whatman Nuclepore with 1 μm pores then mounted onto aluminum stubs and sputter-coated with 20 nm of gold or gold-palladium alloy, using Q150T coater from Quorum Technologies (Laughton, UK). Observations were done using the ultra-high resolution scanning microscope SU8020 from Hitachi (Tokyo, Japan), from the University of Szczecin (Poland).

4.3 Bacterial DNA extraction, PCR amplification and Data processing

DNA extraction was performed using the Power Soil DNA isolation kit (Mo Bio, USA), according to the manufacturer's instructions. DNA quality and quantity were verified using a Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) and adjusted to 20 ng/ μL . The V3 and V4 hypervariable region of 16 rDNA were amplified by PCR. Libraries were done by Illumina-MiSeq sequencing 250 bp paired-end (Azenta, Germany). Cutadapt software (v1.9.1) was used to merge each read pair. Qiime software (1.9.1) (Caporaso *et al.*, 2010) was used to verify the quality of the sequencing and remove chimeric sequences. Sequences with more than 97 % of similarity to OTU were considered to be the same OTU. Total number of reads in each sample varied from 14,704 to 51,275. Species annotation was done by comparing OTU to Greengenes database using RDP classifier Bayesian algorithm on Qiime software (DeSantis *et al.*, 2006).

4.4 Statistical analysis

In taxonomy abundance bar plots, 'Other' represents phylum level with a relative abundance (RA) superior of 1%; the graphics were produced using ggplot2 package under R software (<https://www.r-project.org/>, version 4.0.3). A Hellinger transformation was done on total bacterial abundance (Legendre and Gallagher, 2001). In the analysis either the RA or Hellinger abundance (HA)

were used. Hopkins statistic was used to verify the cluster possibility. The K-means method was used to do the clustering on the PCA.

Alpha diversity was estimated using Shannon and Simpson indexes via the vegan package on R (Shannon, 1948; Somerfield *et al.*, 2008). The Shannon index can be compared between samples and the Simpson index can also be compared with indexes from other studies. T-tests were performed to verify the statistical significance between conditions. Beta-diversity was measured using unweighted unfrac (Lozupone and Knight, 2005) and weighted unfrac (Lozupone *et al.*, 2007). A Non-metric Multidimensional Scaling (NMDS) was done on the beta diversity distance matrix to visualize the clustering of samples, using the vegan package on R software. A permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) (Adonis3, package GUniFrac) based on Bray-Curtis dissimilarity with 999 permutations was done to verify the results of clustering.

5. Results

5.1 Diatoms

All the diatom community composition and corresponding micrographs is presented in supplementary material Plate 1 to 27.

In the 43 samples from the Mediterranean Sea (Corsican and Croatian samples), 95 genera of diatoms were identified in total, with 16 to 38 different genera per sample. The five most abundant genera, grouping 70 % of the total identified species, were *Cocconeis* (27 %), *Mastogloia* (23 %), *Navicula* (12 %), *Nitzschia* (5 %) and *Grammatophora* (3 %). In the samples from Corsica, *Cocconeis* and *Mastogloia* were the main genera whereas in Croatia the main genus was *Mastogloia* (Figure 1). *Cocconeis* was the only genus present in every sample. *Mastogloia* was the most diverse genus with 42 different species identified. In the samples, the top ten of the most abundant species other than blue *Haslea* sp., representing 46 % of the identified species were *Cocconeis scutellum* (15 %), *Cocconeis molesta* (5.5 %), *Cocconeis diaphana* (4.9 %), *M. cuneata* (4 %), *M. fimbriata* (3.7 %), *Toxarium undulatum* (3.1 %), *Navicula* cf. *normalis* (2.9 %), *Mastogloia binotata* (2.4 %), *Navicula* sp (2.3 %), *Mastogloia curcicula* (1.7 %).

Variations were observed in the diatom community according to the sampling location: *Amphora* spp., *Berkeleya* spp., *Licmophora* spp. and *Nitzschia* spp. had higher RA in Croatia while *Ardissonea* spp., *Cocconeis* spp., *Grammatophora* spp. and *Surirella* spp. had higher RA in Corsica (Figure 3-1). However, there were no significant differences between the alpha diversity indices (Shannon and Simpson) in the two locations. Substrates also played a role in structuring diatom communities. There were more *Rhopalodia* spp. on turf and more *Achnanthes* spp. and *Berkeleya* spp.

on *Padina*. Alpha diversity indices (Shannon and Simpson) were not significantly different between the epiphytic diatom community of turf and *Padina*. A difference in diatom community composition was also noted between samples with and without blue *Haslea* bloom. *Cocconeis* spp. represented an average of 31 % of the diatom community in control zones compared with an average of 20 % in blue zones. This difference was significant as demonstrated by a T-test on either RA (p-value = 1.3 %,) or the absolute abundance standardized by Hellinger method (p-value = 4 %). At the species level, *C. scutellum* and *C. molesta*, were less present in blue *Haslea* bloom samples, with respectively an average of 18 % and 6 % of the RA and 10 % and 3 % of RA in control zones (*C. scutellum* T-test p-value 1.8 %; *C. molesta* T-test p-value 3.9 %). On the contrary, *Diploneis* spp. (not identified to the species level) had a significant increase (1.9 %) in the RA in presence of *Haslea* bloom (RA p-value = 4 %; HA p-value = 0.9 %). *Mastogloia* being a species-rich genus, we investigated a change in the diatom community to the species level but there were no significant changes between samples with or without bloom, either at the genus or at the species level.

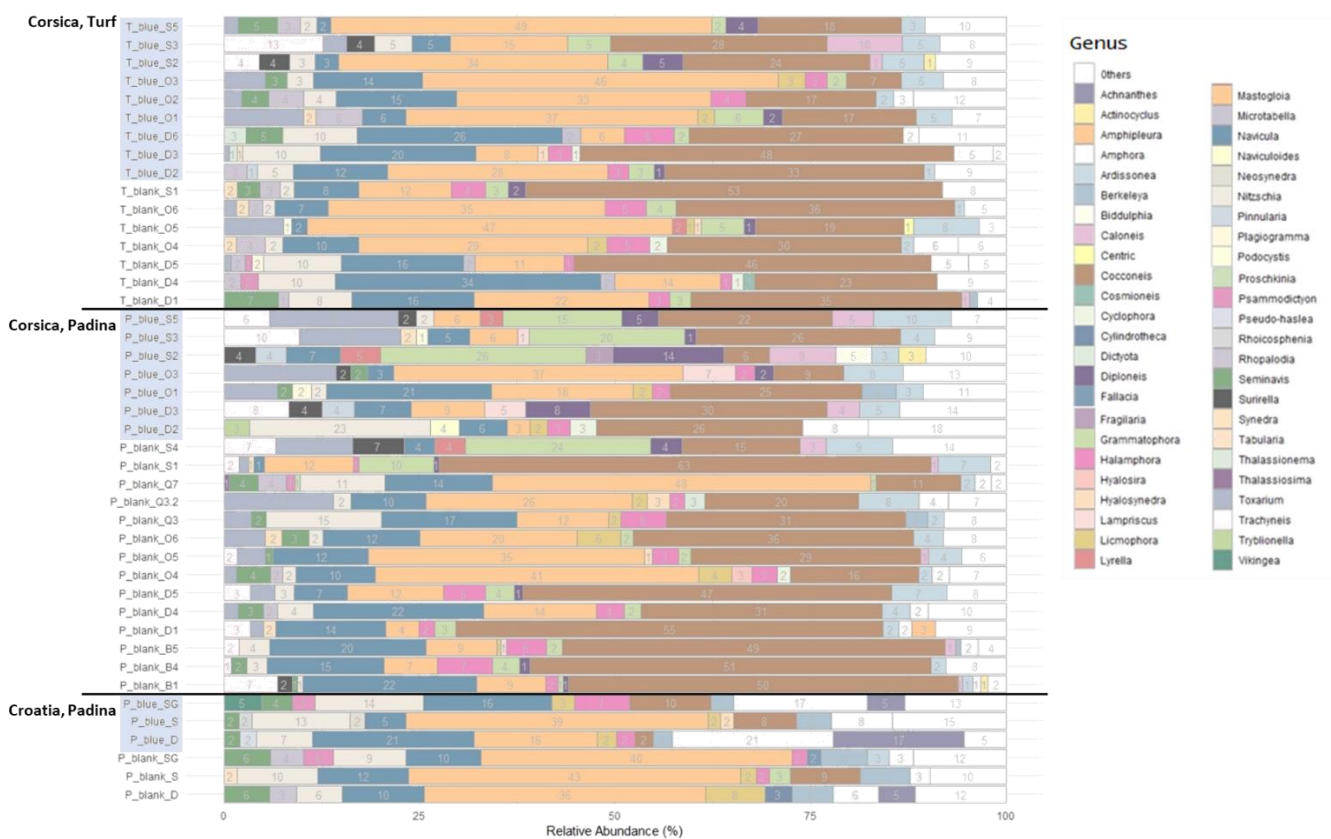


Figure 3-1: Diatom community of the 43 samples from the Mediterranean sea, samples taken during blue *Haslea* blooms are highlighted in blue, blank for the controls, the relative abundance of each genus is written in grey, "Others" regroups genera with a RA < 1 %

The diversity of samples taken during *Haslea* blooms was significantly higher in comparison with the control zones (Index values were summed up in supplementary material, Figure 3-5). The Simpson index ranged between 0.58 and 0.88 with an average score of 0.78.

Samples could be clustered according to their diatom repartition (Figure 3-2a). As illustrated in Figure 2a, Croatian samples were on the left part of the graph but not forming one cluster. There was an opposition of *Mastogloia* and *Cocconeis*, as the presence of *Mastogloia* was correlated with samples from Croatia where it was the main genus. *Cocconeis* spp. were more present in samples from Corsica. *Navicula* and *Grammatophora* were also important genera in terms of RA and they structured the population. The PCA shows that the presence or absence of *Haslea* was not the main component structuring the diatom community (Figure 3-2b), blue and control samples are mixed in the different groups.

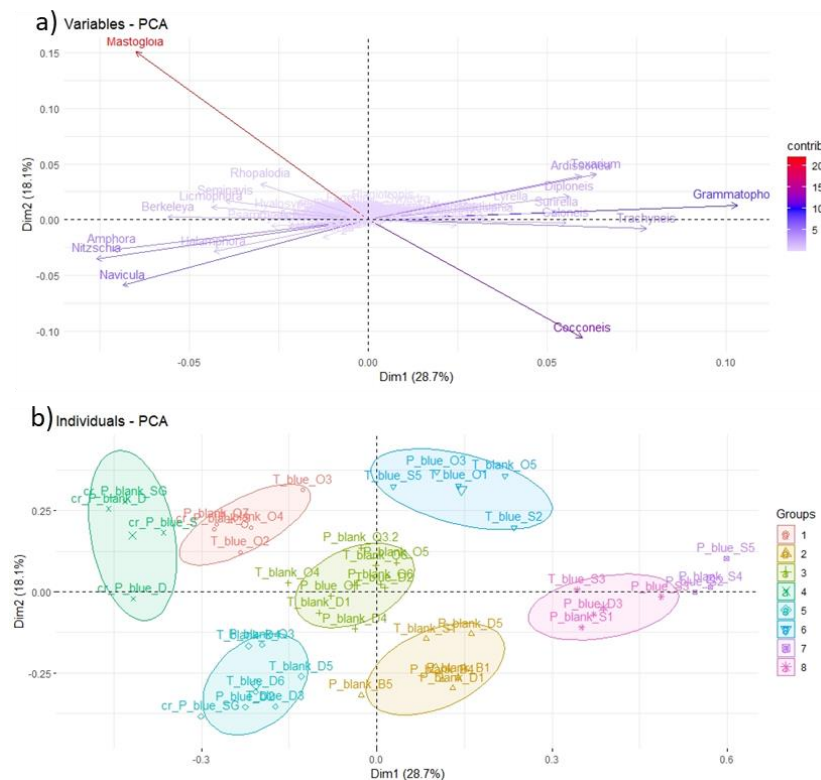


Figure 3-2: PCA analysis on diatom community from 43 Mediterranean samples a) clustering of the different sampling sites; b) the contribution of genera to the clustering

5.2 Bacteria

The bacterial community of the 24 samples taken from the Calvi Bay in 2021 was investigated from two different sites, two substrates (*Padina* and turf), in blue and control zones, with three replicates per conditions.

The order diversity had an average of 31.8 % unidentified and unassigned bacteria. Thus, in order not to overload the graphs they were not represented. (Graphics with raw data of the different phyla are in supplementary material, Figure3-6).

The main orders, representing more than 10 % of the bacterial community in at least one sample, were Acidobacteriales, Alteromonadales, Bacillales, Clostridiales, Flavobacteriales, HTCC2188, Legionellales, Rhizobiales, Rhodobacterales, Rickettsiales, Sphingomonadales, Vibrionales (Figure 3-3).

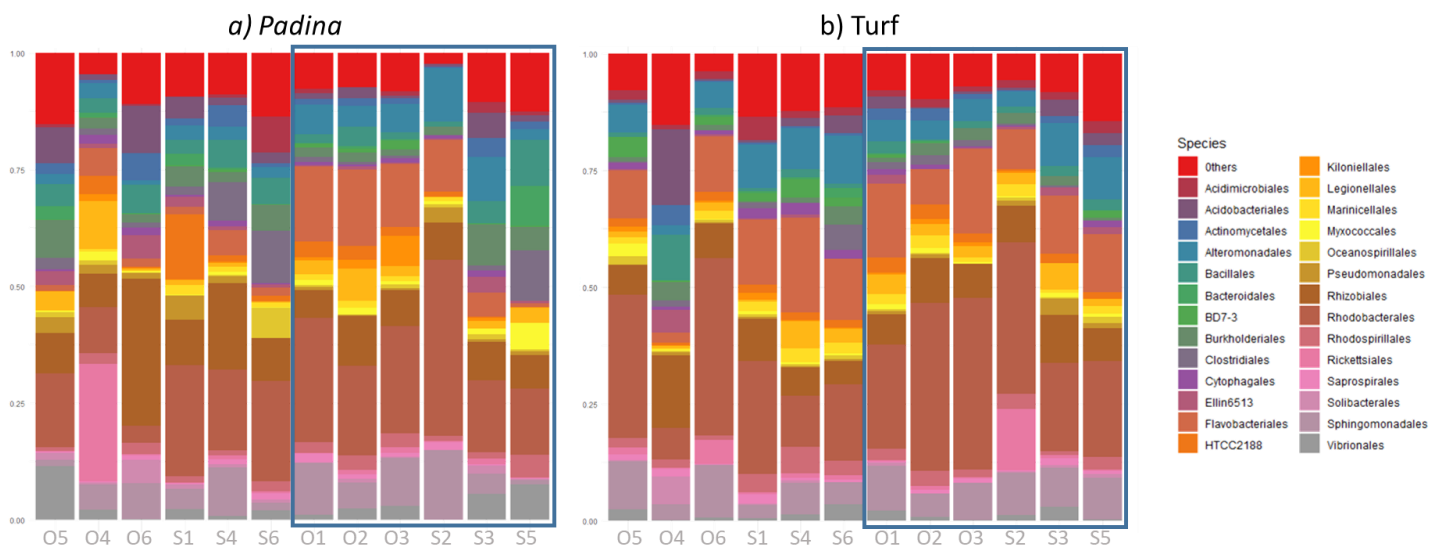


Figure 3-3: Relative Abundance of bacterial communities on turf and *Padina* on the two sites (O and S) with six quadrats in each one, blue squares represent samples from bloom sites, "Others" regroup orders with a relative abundance of less than 1 %

The two sites along the Revelleta Cape, Port and Oscelluccia, were 500 m away. Only the bacterial order Desulfobacterales was more present in the port site (p -value=2 %). Substrate also affected the bacterial community, the relative abundance of Bacillales and Burkholderiales was more important on *Padina*, in contrast to Cerasicoccales, Marinicellales, Thiotrichales, Thiohalorhabdales and Verrucomicrobiales that had a higher RA on turf. Nevertheless, the alpha diversity indices, Shannon and Simpson, were not significantly different between sites or substrates. The dominant orders in blue *Padina* samples were Rhodobacterales (22.6 %) and Flavobacteriales (10.5 %), whereas Rhodobacterales (15.3 %) and Rhizobiales (14.1 %) were dominant in control *Padina* (Figure 3a). On turf, in both bloom and control samples, Rhodobacterales (27.8 %: blue; 21.1 %: control) and Flavobacteriales (12.5 %: blue; 11.9 %: control) were the main orders (Figure 3b).

In bloom samples, the orders Alteromonadales, Flavobacteriales, Rhodobacterales and Sphingomonadales had a significantly higher RA compared to other orders. One objective of this study was to estimate if there was a difference in the bacterial community due to *Haslea* bloom, so we compared these samples at the genus level (although unidentified genera represented 85 % of the total bacterial community; Supplementary material, Table 3-2). The genera *Dinoroseobacter* and *Kordia* were more present in bloom conditions whereas *Hyphomicrobium* and *Leptolyngbya* had lower RA in bloom samples. *Anaerococcus* was only identified in bloom samples. In blooming zones, Shannon and Simpson indices had mean values of respectively 7.44 and 0.97 compared to 6.46 and 0.89 in control zones. The alpha diversity of bacterial communities was significantly higher in zones where the blooms were present (T-test p-value = 2.9 % for Shannon, p-value = 4 % for Simpson index: Supplementary material, Figure3-7). Some differences in the distribution of the bacterial community were previously identified between samples collected in the bloom zone versus the control zone. The NMDS appears to group, based on the second axis, the samples according to the presence or not of *Haslea* blooms (Figure 3-4). However, PERMANOVA analysis showed that the trend was not significant.

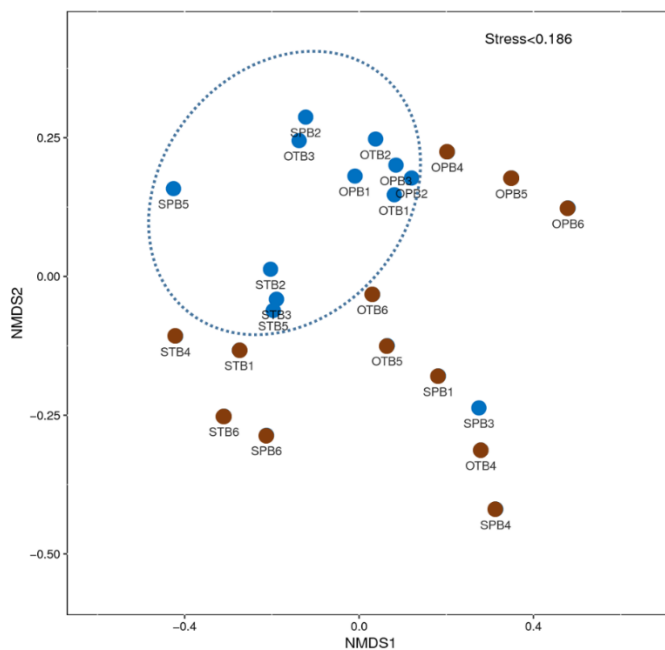


Figure 3-4: NMDS of the distribution of bacterial communities in each sample, blue dots represent samples from bloom sites, brown dots are the control samples. A stress value < 0.2 indicates that NMDS can accurately reflect the difference between the samples

6. Discussion

In this study, we described the diatom and bacterial communities of benthic periphyton in the western Mediterranean Sea and how these communities may be affected by the bloom of *Haslea* cells. This question has emerged from the detection of allelopathic and antibacterial properties associated with marennine-like pigments, synthesized by blue *Haslea* cells, in laboratory conditions. We sought to understand whether these effects were similar in natural conditions (in the Mediterranean Sea). The results did not indicate a critical shift of the communities, still some variations have been demonstrated, for example, the diversity was higher in bloom samples.

6.1 Diatom community associated with the biofilm

Diatoms are good environmental indicators as the community evolves rapidly in response to changing environmental parameters. Differences between locations can be due to the geographical distance and to the seasonal variations of environmental parameters. Samples from the Ligurian Sea were collected in March and the ones from the Adriatic Sea in July. Epiphytic diatom composition has been proven to be host-related (*e.g.*: Medlin, 1983; Ramm, 1977; Snoeijs, 1994). The study of Car *et al.*, (2019), analyzed the diatoms epiphytic community on *Padina* sp. and had analogous results, *Mastogloia* spp. represented an average 27% of the total diatom community in their samples, 29 % in average in our Croatian samples and 23 % in general. In the study mentioned previously, the authors also found that *Cocconeis*, *Hyalosynedra*, *Navicula* and *Nitzschia* represented in average more than 5 % of the total diatom community that is analog to what we found in Croatian samples.

By comparing the bloom samples with the control ones, we observed a diminution of the RA of *C. scutellum* and *C. molesta* and an increase of the RA of *Diploneis* genus. *Cocconeis* spp. are epiphytes strongly attached to algae and phanerogams, preferably with large thalli, or leaf-like: *Caulerpa* spp., *Posidonia oceanica*, *Zostera marina*, *Nymphaea alba* (Car *et al.*, 2012; Hafner *et al.*, 2013; Majewska *et al.*, 2014; Sieburth and Thomas, 1973). *Diploneis* spp. is a moderately attached diatom, epiphyte of periphyton, seagrass and sponges (Dobretsov *et al.*, 2004; Nenadović *et al.*, 2015). The study of *Haslea* blooms effects has shown a genera- or even species-dependent response. In fact, *Cocconeis* and *Diploneis* have been affected in opposite ways by *Haslea* blooms, even if they occupy a close ecological niche, as both being macroalgae and seagrass epiphytes.

In samples with the presence of *Haslea* bloom, an augmentation of the diversity was observed. The calculation of diversity indexes is based on the number of species and their distribution. A decrease in the abundance of the dominant species, *Cocconeis* spp., resulted in a more homogeneous

distribution of species abundance in the samples and therefore they had a better alpha diversity overall.

It has been demonstrated that the marennine pigment can have an impact on diatom communities in a semi-close system like oyster ponds, where it accumulates (Turpin *et al.*, 2001). In this kind of environment, it would be interesting to compare the change in diatom communities between benthic and planktonic species. In fact, in this very shallow environment concentrations of marennine can reach 5 µg/mL (Pouvreau *et al.*, 2007b) in the water column. In our Mediterranean samples, marennine and marennine-like pigments were in the cell (intracellular form) but they were not detectable in the samples, being probably quickly dissolved in the water column (extracellular form).

Blue *Haslea* cells were developing on top of the biofilm, producing a shading effect on the rest of the diatom community (Pouvreau *et al.*, 2007a) which can allow *Haslea* to outcompete other diatoms. Previous studies like (Moreau, 1970; Turpin *et al.*, 1999) noticed a poorer flora in oyster ponds during *Haslea* bloom, as *H. ostrearia* represents a high percentage of the benthic diatom community. Turpin (1999) also noticed that *H. ostrearia* was present in lower proportion in enriched environments. During blooms, cells have a fast reproduction rate and silica may become a limiting nutrient (Krause *et al.*, 2019; Nelson and Tréguer, 1992; Paasche, 1973). In our samples, we did observe some diatoms with dissolved valves (plates), suggesting that benthic bloom of *Haslea* might utilize a significant part of the silica resources. These observations could suggest that blue *Haslea* spp. are opportunistic species and outcompete the diatom community by provoking a shading effect and gaining a better access to light and nutrients, especially silica.

6.2 Bacteria associated with the biofilm

The three major orders found in our samples were Flavobacteriales, Rhizobiales, Rhodobacterales. Flavobacteriales have been also commonly associated with phytoplankton blooms (Buchan *et al.*, 2014; Landa *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2018). It has been demonstrated that they have the ability to efficiently degrade high molecular weight macromolecules produced by microalgae and thus can remineralize carbon (Cottrell and Kirchman, 2000). Rhizobiales bacteria are commonly associated with plant roots due to their capability to fix nitrogen (Peoples and Craswell, 1992). They have also been associated with mollusk microbiomes (Lawson *et al.*, 2022; Palladino *et al.*, 2021) and are epiphytes on various algae (Lachnit *et al.*, 2011). Rhodobacterales are usually an important part of the diatom microbiome (Goecke *et al.*, 2013a) because 90 % of their species are able to fully synthesize the essential vitamin B12 (Sañudo-Wilhelmy *et al.*, 2012). The other significant orders encountered in samples are part of the following phyla Acidobacteriota (Acidobacteriales and Acidomicrobiales),

Alpha-proteobacteria (Rickettsiales and Sphingomonadales), Gamma-proteobacteria (Alteromonadales, HTCC2188, Legionellales and Vibrionales) and Firmicutes (Bacillales and Clostridiales) and have been found to be frequently associated with algae (Goecke *et al.*, 2013b). The order HTCC2188 has been identified to regroup marine bacteria from oligotrophic seas like the Mediterranean Sea (Cho and Giovannoni, 2004). Acidobacteriales have also been reported in the Mediterranean Sea, in planktonic and soil environments (Quaiser *et al.*, 2008). The abundance of Vibrionales has been shown to be higher in blooms dominated by diatoms (Asplund *et al.*, 2011).

The same bacterial families (Rhodobacteraceae, Flavobacteriaceae, Saprospiraceae, and Verrucomicrobiaceae) were identified both in our samples and in those collected on the macroalgae *Cysoseira compressa* in the Mediterranean Sea (Mancuso *et al.*, 2016). In another study, on the prokaryotic community of *Taonia* sp. (Dictyotaceae family), sampled on the French Mediterranean coast, Saprospiraceae family has been shown to be dominant (Paix *et al.*, 2021) but this was not observed in our samples. The type of substrate also influenced the bacterial community in our samples: Bacillales (Firmicutes) and Burkholderiales (Beta-Proteobacteria) were only found on *Padina*. These phyla and orders have already been encountered as *Padina* epiphytes along the Tunisian coast (Ismail *et al.*, 2016).

Some significant differences were observed within bacterial communities depending on the presence of *Haslea* bloom or not. The genus *Anaerococcus* has only been found in *Haslea* bloom samples. This genus groups anaerobic species (Foubert and Douglas, 1948), so it is not unexpected given that there is an oxygen gradient within the biofilm and even more important during an active bloom (Paerl and Pinckney, 1996; Vadeboncoeur *et al.*, 2021). *Dinoroseobacter* is an aerobic genus with photosynthetic pigments, and has previously been found associated with phototrophic dinoflagellate blooms (Biebl *et al.*, 2005). We highlighted it was present in higher proportions during *Haslea* blooms as well. In biofilm, aerobic bacteria are closer to the boundary layer while anaerobic bacteria are more at the bottom of it. In general, some bacteria are important during bloom as they can remineralize the organic matter and provide essential co-factors like B12 vitamins to the microalgae. The genus *Kordia* present in higher proportions in bloom samples, has been identified as an algacide bacterium for some diatom species (*Skeletonema costatum*, *Thalassiosira weissflogii*, *Phaeodactylum tricornutum*) but it had no impact on others (*Chaetoceros didymus*) (Paul and Pohnert, 2011). It would be interesting to see if the RA of the genus will increase over time to see if it could precipitate the ending of the bloom.

Two bacterial genera less present in bloom conditions represent a low percentage of the global community: 0.1 % for *Leptolyngbya* and 0.02 % for *Hyphomicrobium*. The genus *Hyphomicrobium* is able to denitrify biofilm compounds in a salt-water treatment setting, some species are known to be methylotrophic (Giri *et al.*, 2021; Martineau *et al.*, 2013). The cyanobacteria *Leptolyngbya*, which have

a cosmopolitan distribution, are halotolerant and able to grow in extreme conditions. They were tested in agro-industrial wastewater treatments due to their ability to recycle nitrogen and phosphorus in high concentrations (Tsolcha *et al.*, 2018). Some species of the *Leptolyngbya* genus are known as worldwide coral pathogen agents (Myers *et al.*, 2007).

We wanted to compare the bacterial community found in our samples during a bloom of *Haslea* with the one from newly isolated cells of *H. ostrearia* (Mondeguer *et al.*, 2016) and from cells in the culture collection for longer (Gabed *et al.*, 2022). In both studies, *H. ostrearia* strains were collected along the French Atlantic coast. Orders Flavobacteriales, Oceanospirillales, Pseudomonadales, Rhodobacterales, Rickettsiales and Sphingomonadales were found associated to *H. ostrearia* and in the bacterial communities of our samples. Other orders and genera found associated to *H. ostrearia* in laboratory conditions were not detected in our samples or on the newly isolated cells. That might be due to different sampling locations or a different seasonality. Furthermore, in the present work, *H. provincialis* accounted for the majority of bloom events, and bacterial communities could vary according to the blue *Haslea* species present. In addition, it has been observed that after three months in laboratory culture, a shift is observable in the bacterial community of *H. ostrearia* (Lépinay *et al.*, 2016). It would be interesting to identify the bacterial community of the phycosphere from different *Haslea* species and compare their evolution from *in situ* conditions to culture in the laboratory. A study of Koedooder *et al.* (2019), showed that the effect of bacteria presence on diatoms and the effect of diatoms on bacteria are species-specific, so each species of diatom forms a specific holobiont.

7. Conclusion

Photoautotrophic benthic biofilms are very complex structures as numerous microorganisms compose them, all interdependent on each other and on the environmental conditions (Durham *et al.*, 2015; Bohórquez *et al.*, 2017). This microenvironment has its own dynamic separated from the water column. The aim of this study was to determine the impact of blue *Haslea* blooms based on two Mediterranean locations (localized along Corsican and Croatian coasts). As marennine displays allelopathic and antibacterial activities in laboratory conditions, we measured the putative effect on the diatom and bacterial community in the open environment. The result was that the presence of blue *Haslea* blooms did not cause any major or negative effects on the biofilm community, do not adversely affect aquaculture and have no negative effects on human health. Thus, these benthic blooms do not fall into the HAB category. On the contrary, an increase in diversity within diatoms and bacteria was observed. Biofilms were characterized by a high density of microorganisms, hence a high density of signaling chemical compounds. Therefore, benthic microorganisms tend to be more

resistant to allopathic compounds (Hilt, 2006 ; Larras *et al.*, 2013 ; Allen, 2016). Moreover, oysters and other bivalves in contact with *Haslea* blooms have been consumed for centuries and have a higher market value. There are, to our knowledge, no examples of pathology developed after consumption of green oysters.

The composition and role of marennine to *H. ostrearia* is not completely elucidated. As producing this pigment has an energetic cost it has to provide the cell some environmental benefits. The pigmented cells seem to have a shading effect on the underlying photosynthetic micro-community (Pouvreau 2007), reducing their access to light, which might affect the growth rate of other diatoms and other phototrophs microorganisms. Moreover, marennine being a hydrophilic pigment, its action may target planktonic diatoms, allowing *Haslea* cells on the upper part of the biofilm to have good access to light. This action could be verified in shallow oyster beds because in an open environment an inhibition of planktonic organisms by benthic organisms would have a very high energy cost. This type of action is possible in the context of blooms in oyster beds because it is a shallow environment, so the marennine can not be too diluted (Sinkkonen 2006; Renata Dondajewska and Agnieszka Budzyńska, 2009).

Overall, blue *Haslea* blooms seemed to positively affect the diversity of diatoms and bacteria, by decreasing the relative abundance of dominant diatoms.

Acknowledgments

This work was fund through Horizon 2020 Research and Innovation Program GHANA (The Genus *Haslea*, New marine resources for blue biotechnology and Aquaculture, grant agreement No [734708/GHANA/H2020-MSCA-RISE-2016] J.-L.M.). Thanks to the STARESO staff for diving support and the availability of data on Calvi Bay from the program STARECAPMED (STation of Reference and rEsearch on Change of local and global Anthropogenic Pressures on Mediterranean Ecosystem Drifts, supported by Territorial Collectivity of Corsica and the Rhone-Mediterranean and Corsica Water Agency). Observations along the Adriatic Sea coast were partly funded by the Croatian Science Foundation under project IP-2019-04-9043 (DiVMAd). We thank A.P., A.S. and A.W. for their statistical advices.

8. Supplementary materials

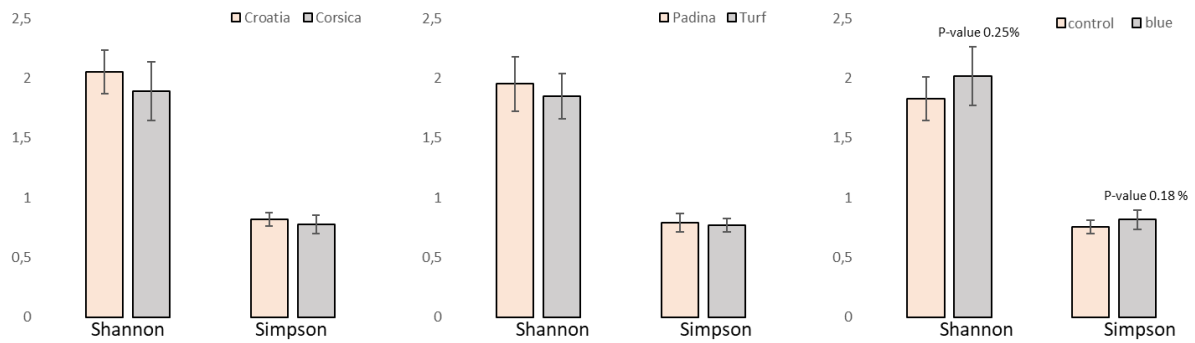


Figure 3-5: Simpson and Shannon indexes for the diatom community, T-test was done to verify the significant in between samples, there is a significant change in the diversity in between control and blue zones (p -value<5%)

Table 3-2: Percentage of unclassified and unidentified OTU per taxonomic level in the bacterial community

Taxonomic rank	Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species
Average % Unclassified	24.4	25.6	31.8	50.3	85,2	97.5

9. Diatoms Plates

The following is an illustration of the diatom community composition found in the epiphytic periphyton on turf and *Padina*, between a depth of 2 m and 5 m, at two sites, Calvi Bay, France and the Dalmatian coast, Croatia. Images were not available for all species. Light microscopy pictures were taken at the University of Szczecin and at the University of Le Mans, and scanning electron microscopy pictures were taken at the University of Szczecin (details of the equipment and references used for identification in the Methods section).

**Centric diatoms; super-class: *Coscinodiscophycidae*
class : *Coscinodiscophyceae***

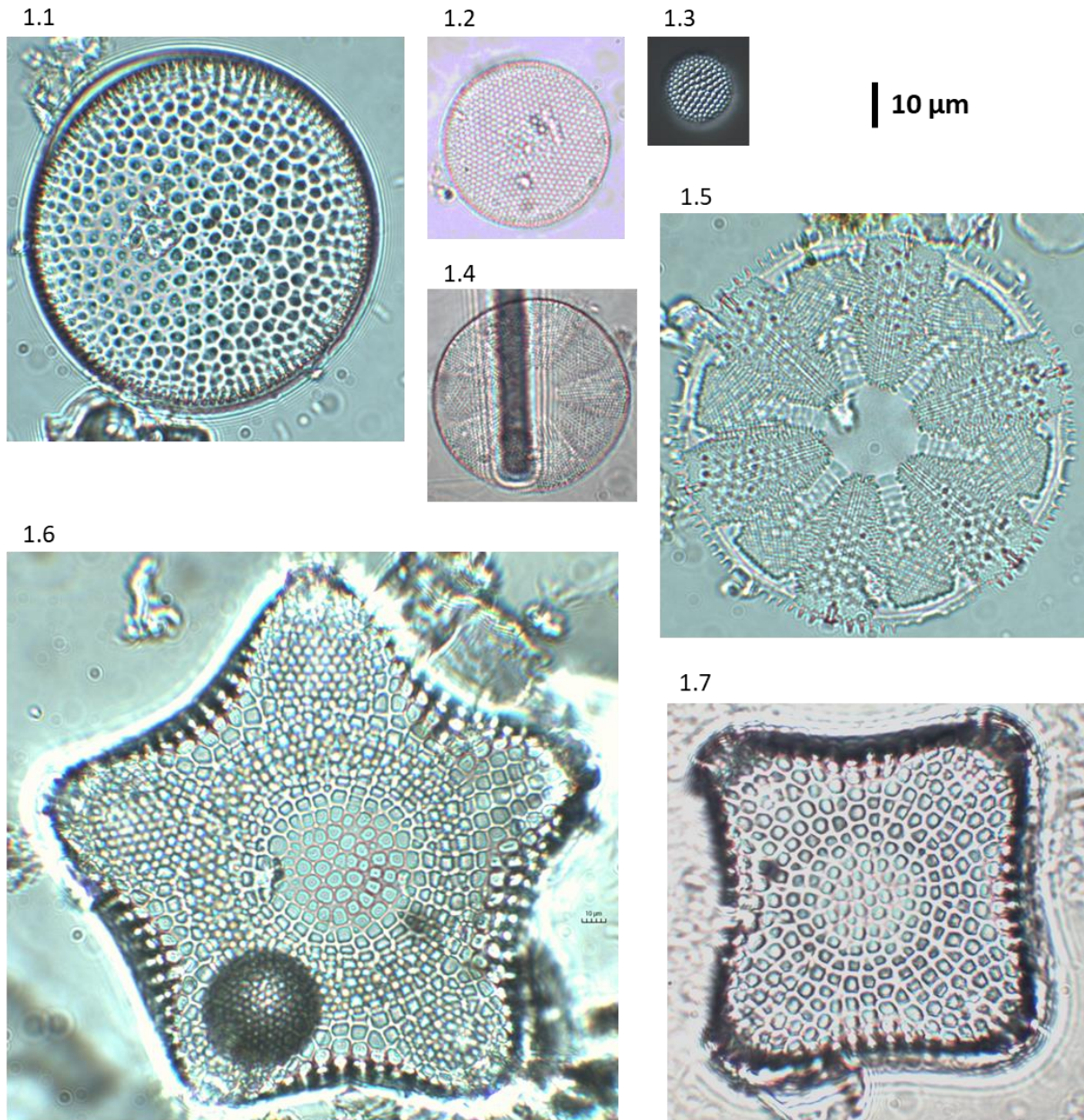


Plate 1 : 01 *Coscinodiscus sp*, 02 *Thalassiosira sp*, 03 *Thalassiosira oestrupii*,
04 *Actinoptychus sp1*, 05 *Actinoptychus sp2*, 06 *Triceratium pentacrinus*,
07 *Trigonium diaphanum*

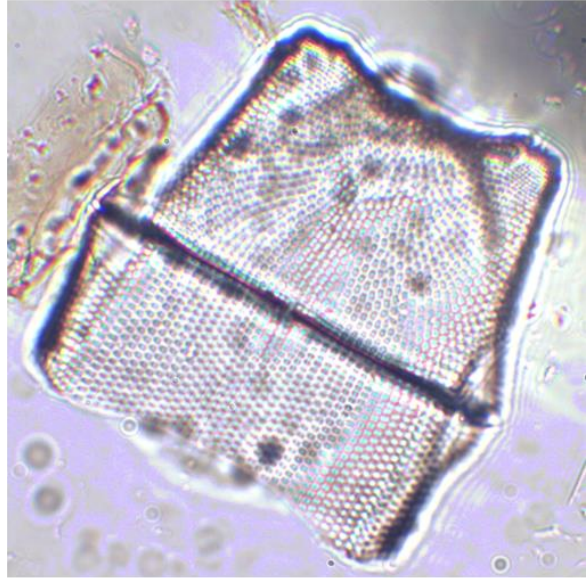
class : *Mediophyceae*

10 μm

2.1



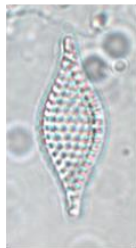
2.2



2.3



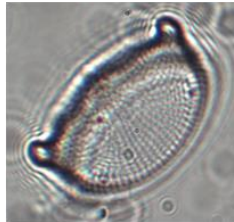
2.4



2.5



2.6



2.2 bis



2.7

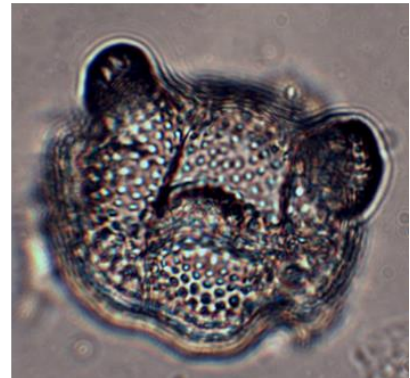
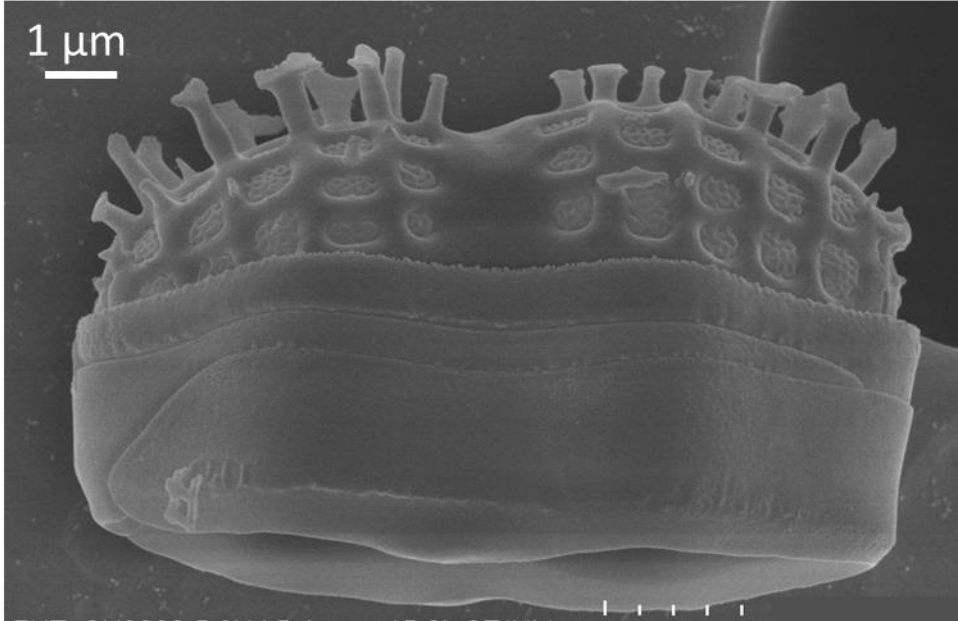


Plate 2 : 01 *Auliscus*, 02 *Lampriscus shadboltianum*,
03 *Biddulphia tridentula*, 04 *Cymatosira lorenziana*,
05 *Cyclostephanos* sp 06 *Odontella* sp, 07 *B. pulchella*

class : *Mediophyceae*

(SEM)

3.1



3.2

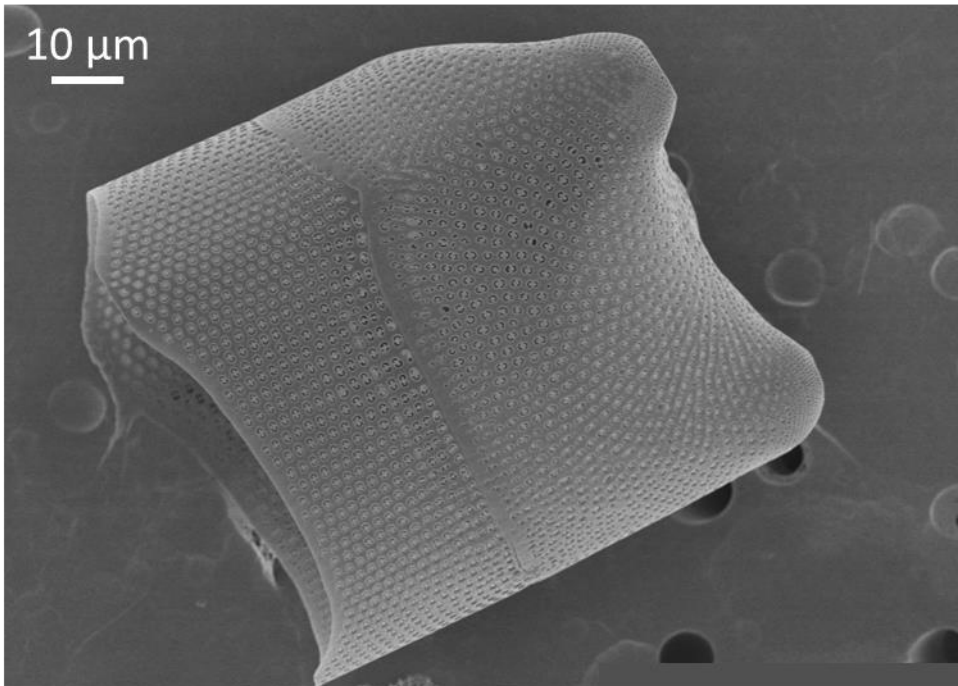
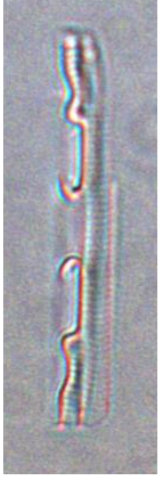


Plate 3 : 01 *Skeletonema* sp, 02 *Lampriscus shadboltianum*,

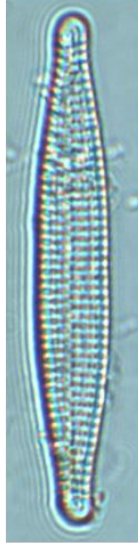
Pennate diatoms; super-class: *Bacillariophycidae*
 Araphid sub-class: *Fragilariophyceae*

4.9

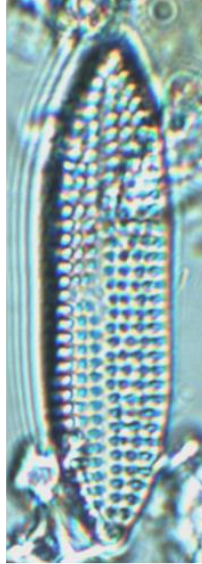
4.1



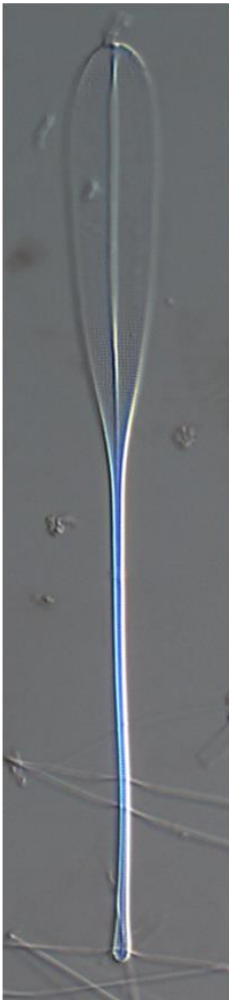
4.2



4.3



4.4

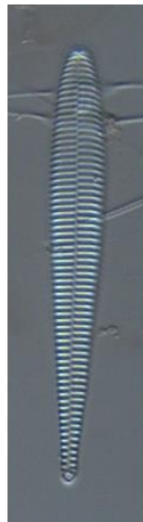


4.5



10 μm

4.6



4.7



4.8

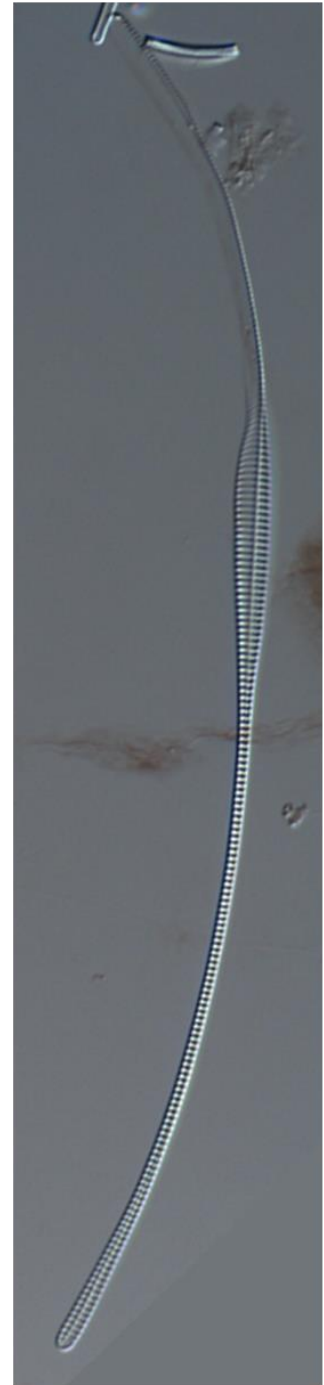
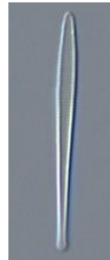


Plate 4 : 01 *Grammatophora* sp, 06 *Fragilaria* sp1,
 07 *Hendeyella* sp, 04 *Licmophora spatula*, 05 *Licmophora* sp1,
 06 *L. abbreviata*, 07 *Licmophora* sp2, 08 *Licmophora* sp3,
 09 *Licmosphenia* sp

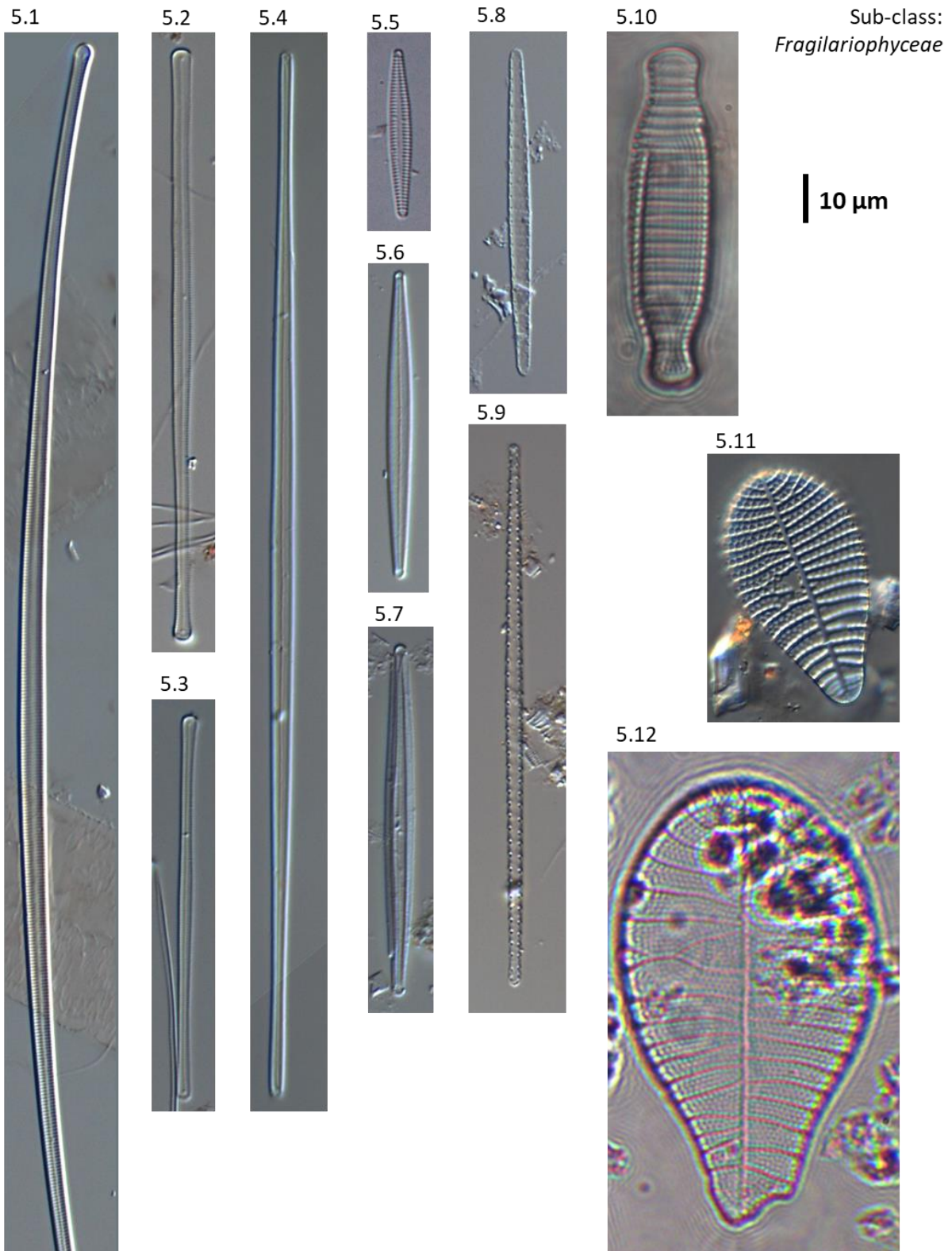
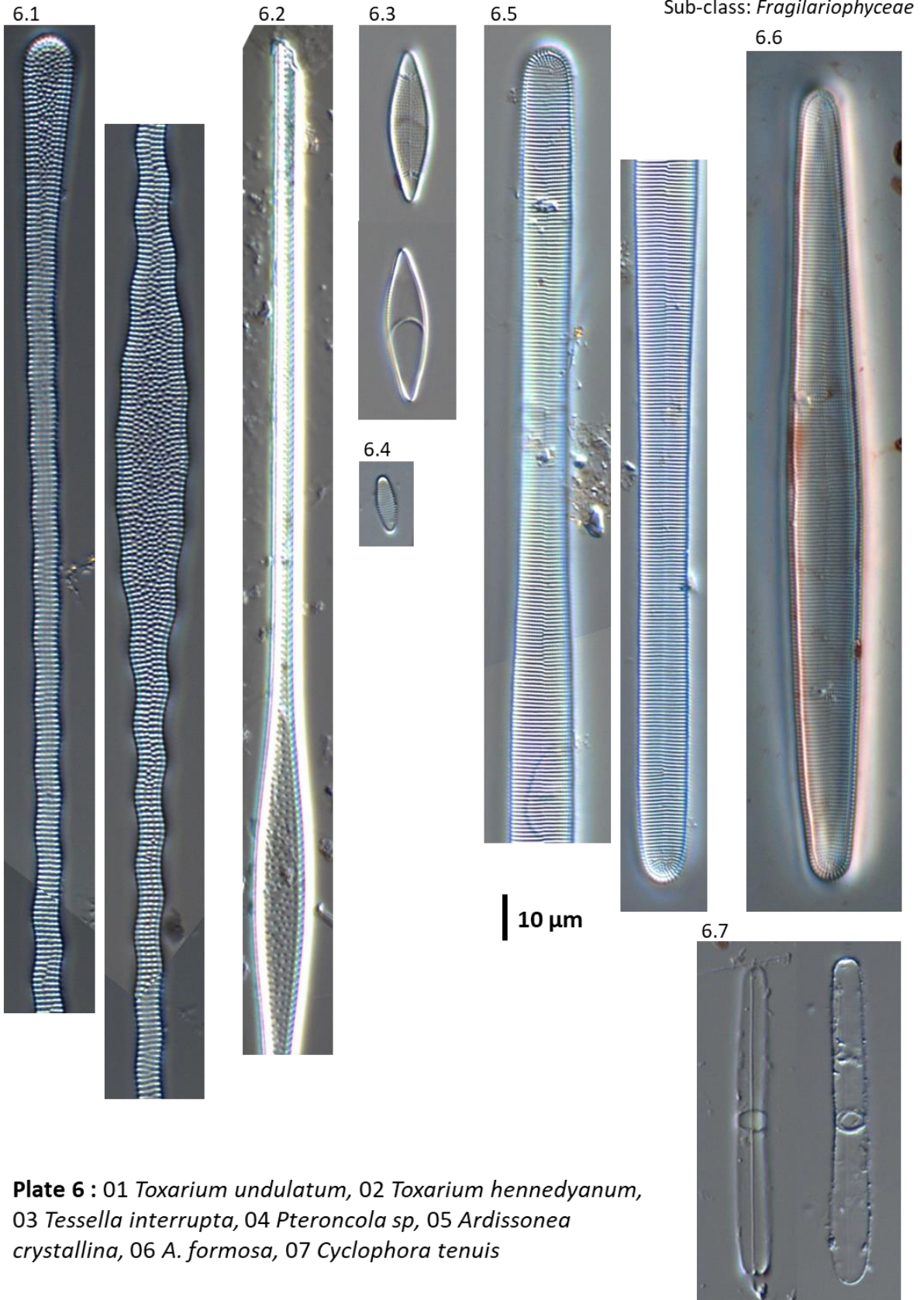


Plate 5 : 01 *Divergita toxoneides*, 02-04 *Neosynedra provincialis*,
 05 *Tabularia fasciculata*, 06-07 *Hyalosynedra* sp,
 08 *Thalassionema* sp1, 09 *Thalassionema* sp2, 10 *Diatoma* cf.
vulgaris , 11 *Hyalosira* sp., 11 *Podocystis adriatica*, 12 *Podocystis*
spathulata



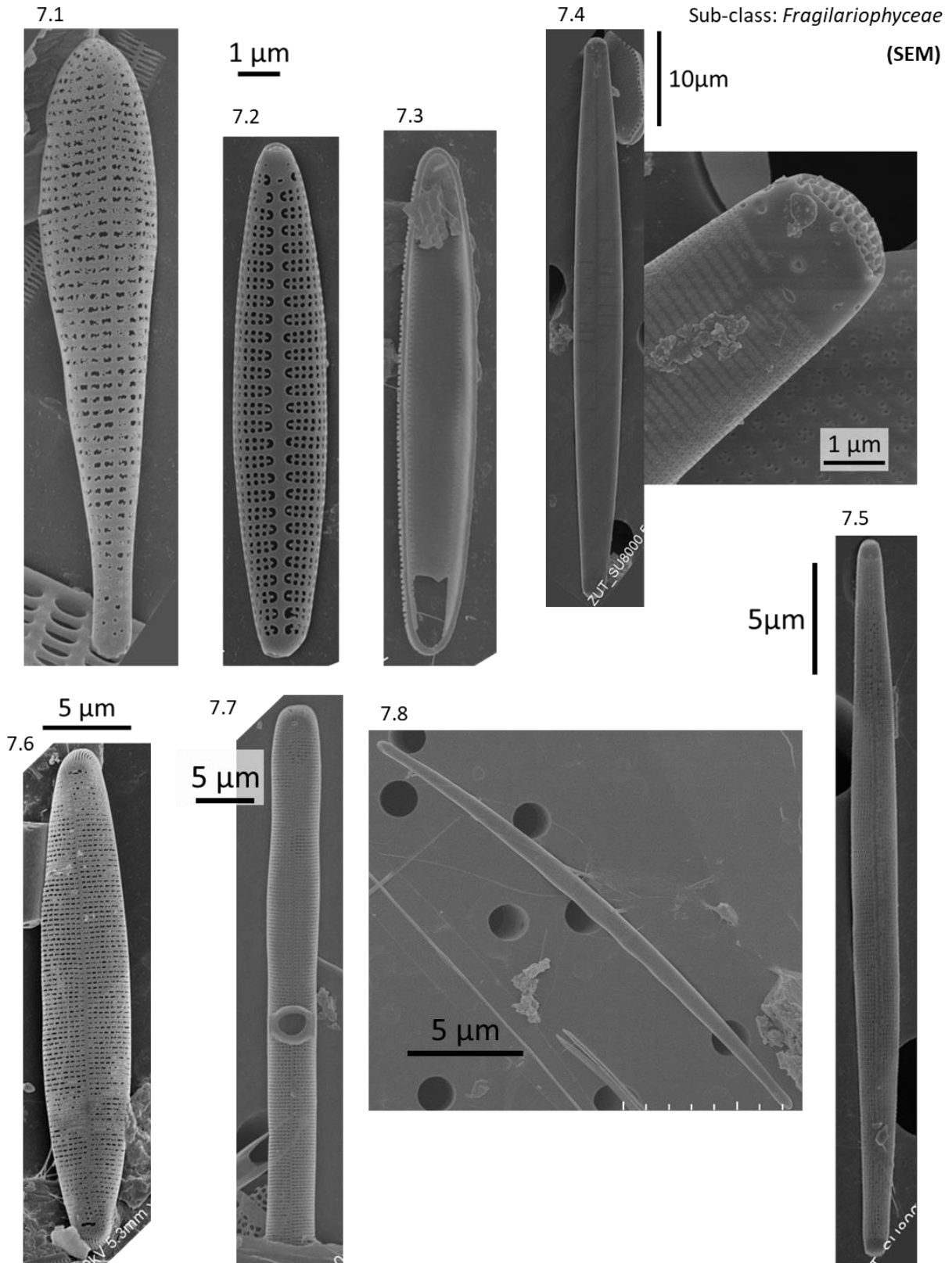


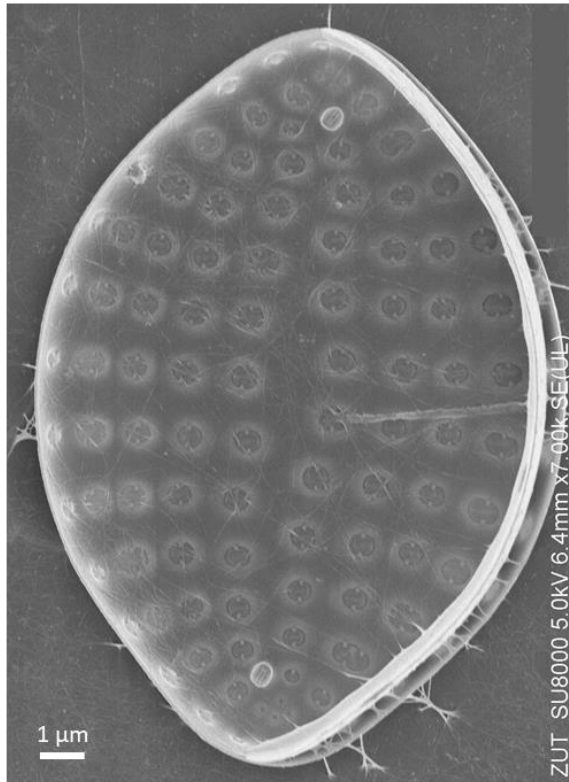
Plate 7 : 01 *Licmophora* sp, 02 *Tabularia fasciculata*, 03 *Pteroncola* sp,
04 *Hyalosynedra* sp, 05 *Hyalosynedra sublaevigata*, 06 *Protoraphis* sp,
07 *Cyclophora tenuis*, 08 *Falcula* sp

Araphid sub-class: *Urneidophycidae*

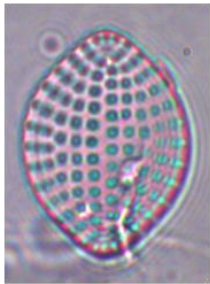
8.1



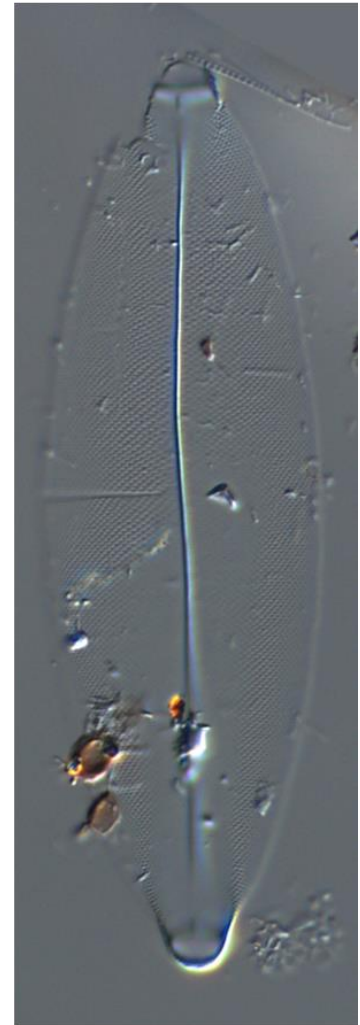
8.2 bis (SEM)



8.2



8.3



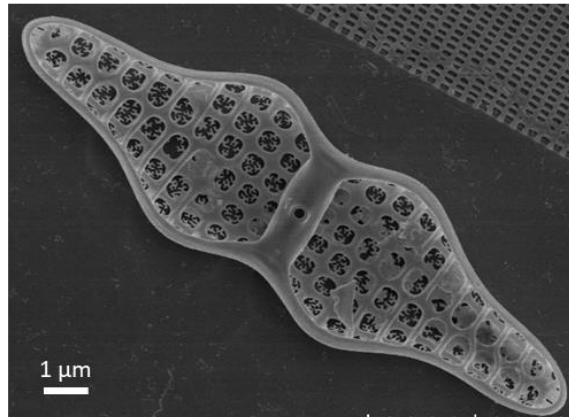
8.4



8.5



8.6 (SEM)



10 μm

Plate 8 : 01 *Delphineis australis*, 02 *Delphineis surella*, 03 *Striatella* sp,
04-06 *Plagiogramma* spp,

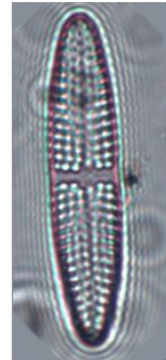
Monoraphid

Order : *Achnanthes*

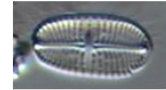
9.1



9.3



9.4



9.5



9.6



9.2



9.2 bis



10 μm

9.7 (SEM)

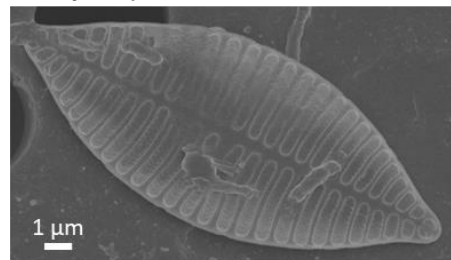


Plate 9 : 01-02 *Achnanthes longipes*, 03 *Achnanthes parvula*, 04 *Cocconeopsis sp.*, 05 *Planothidium sp1*, 06 *Planothidium sp2*, 07 *Planothidium sp3*

Order : *Achnanthes*

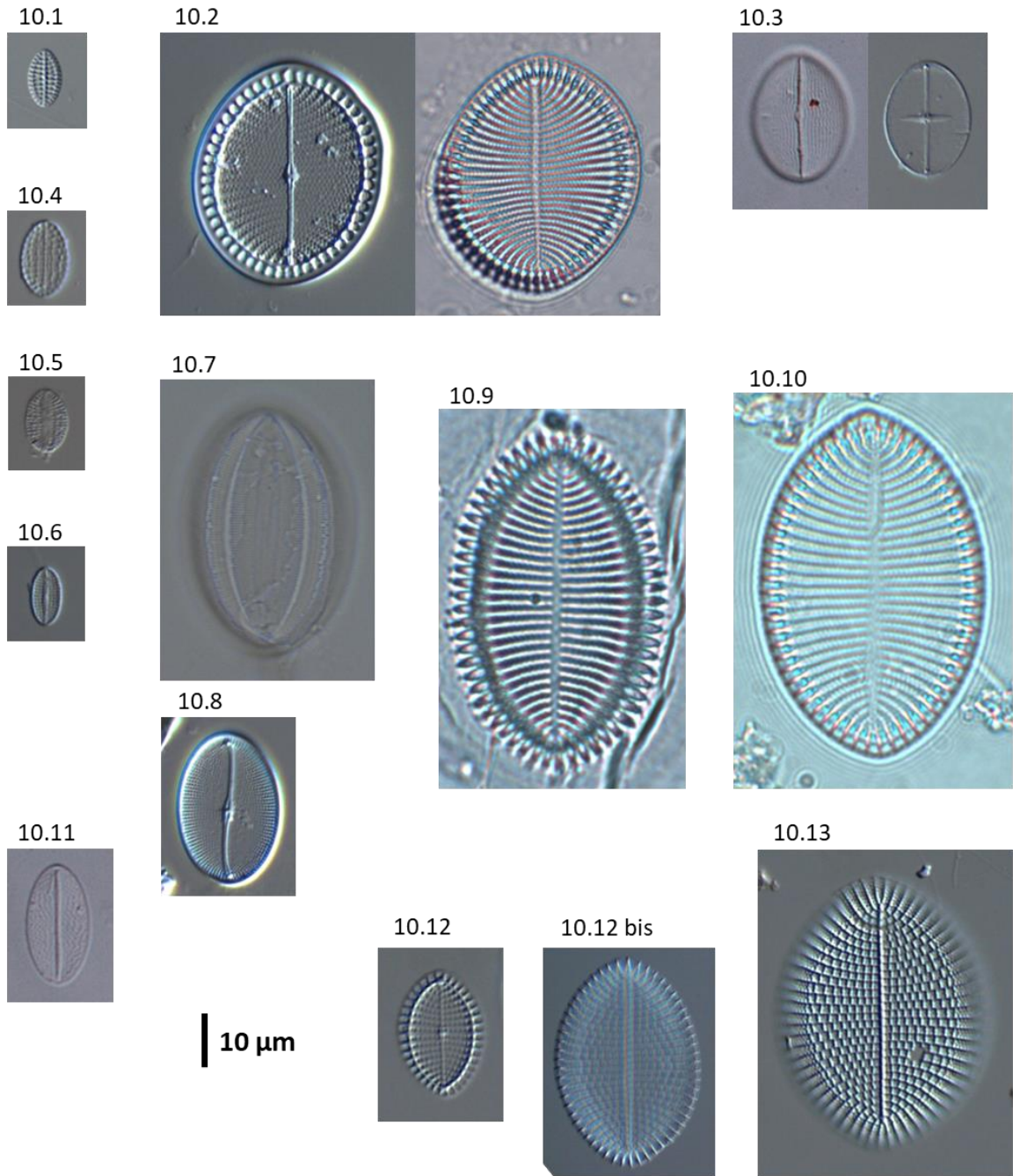


Plate 10 : 01 *Amphicocconeis* sp, 02 *Cocconeis britannica*, 03 *C. diaphana*,
 04 *Cocconeis* sp1, 05 *Cocconeis* sp2, 06 *Cocconeis neothumensis*, 07-08 *C. krammeri*,
 09-10 *Cocconeis* sp3, 11 *C. molesta*, 12 *C. scutellum*, 13 *C. scutellum* var *posidonniae*

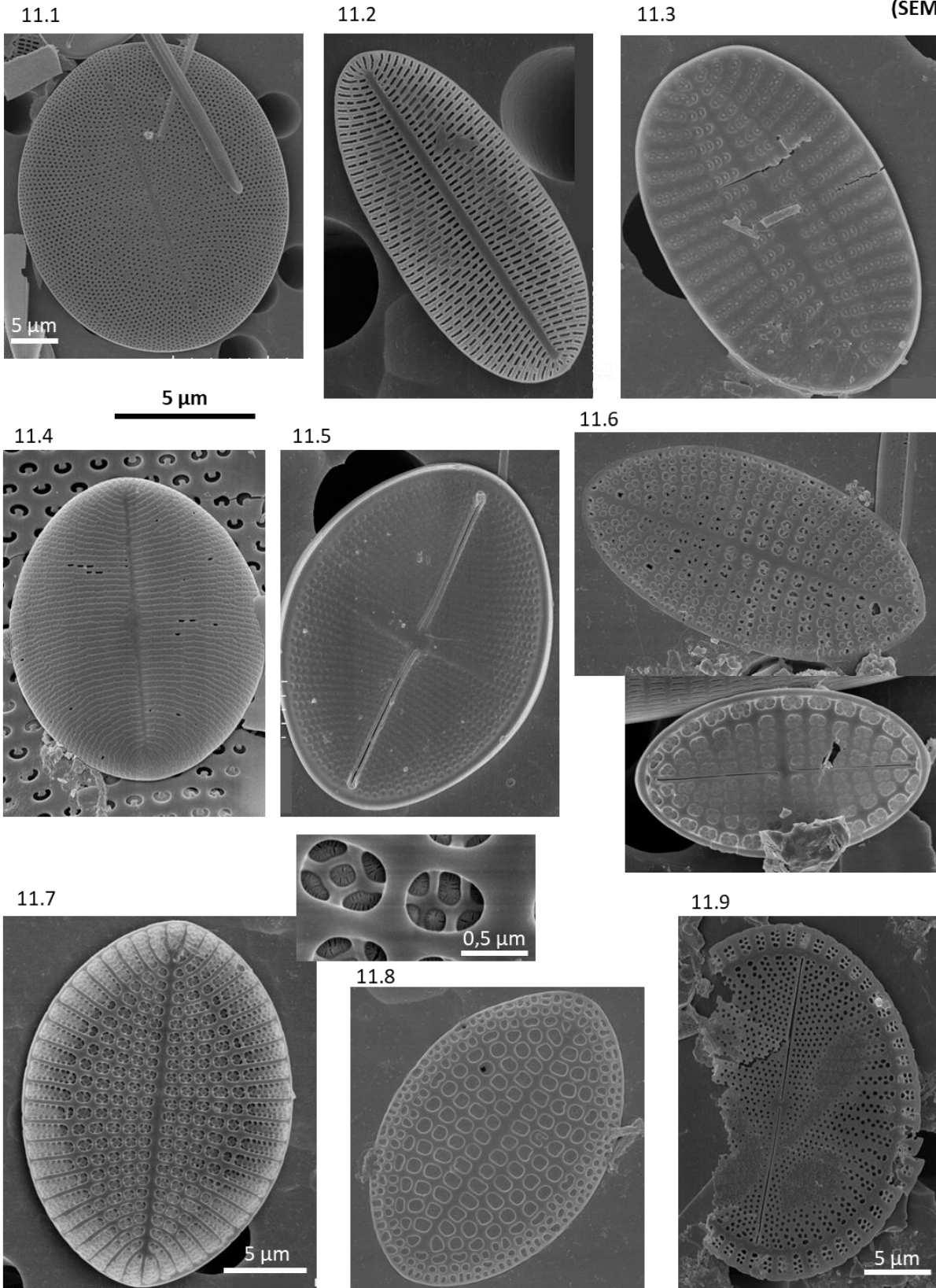


Plate 11 : 01 *Cocconeis britanica*, 02 *C. neothumensis* var *marina*, 03 *C. peltoides*,
04 *C. molesta*, 05 *C. diaphana*, 06 *C. stauroneiformis*, 07 *C. scutellum* var *posidoniae* +
pores details, 08 *C. scutellum*, 09 *C. scutellum* double-pored

Biraphid

12.1



12.2



12.3



12.4

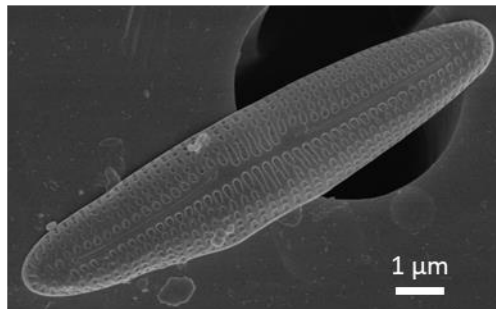


12.5

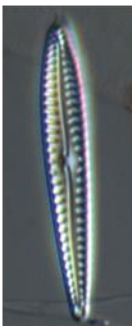


10 μm

12.6 (SEM)



12.7



12.8



12.3 (SEM)

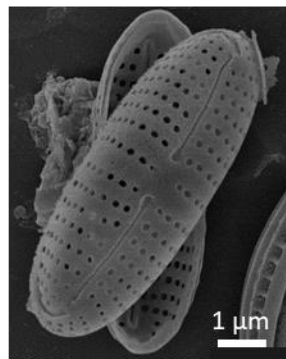
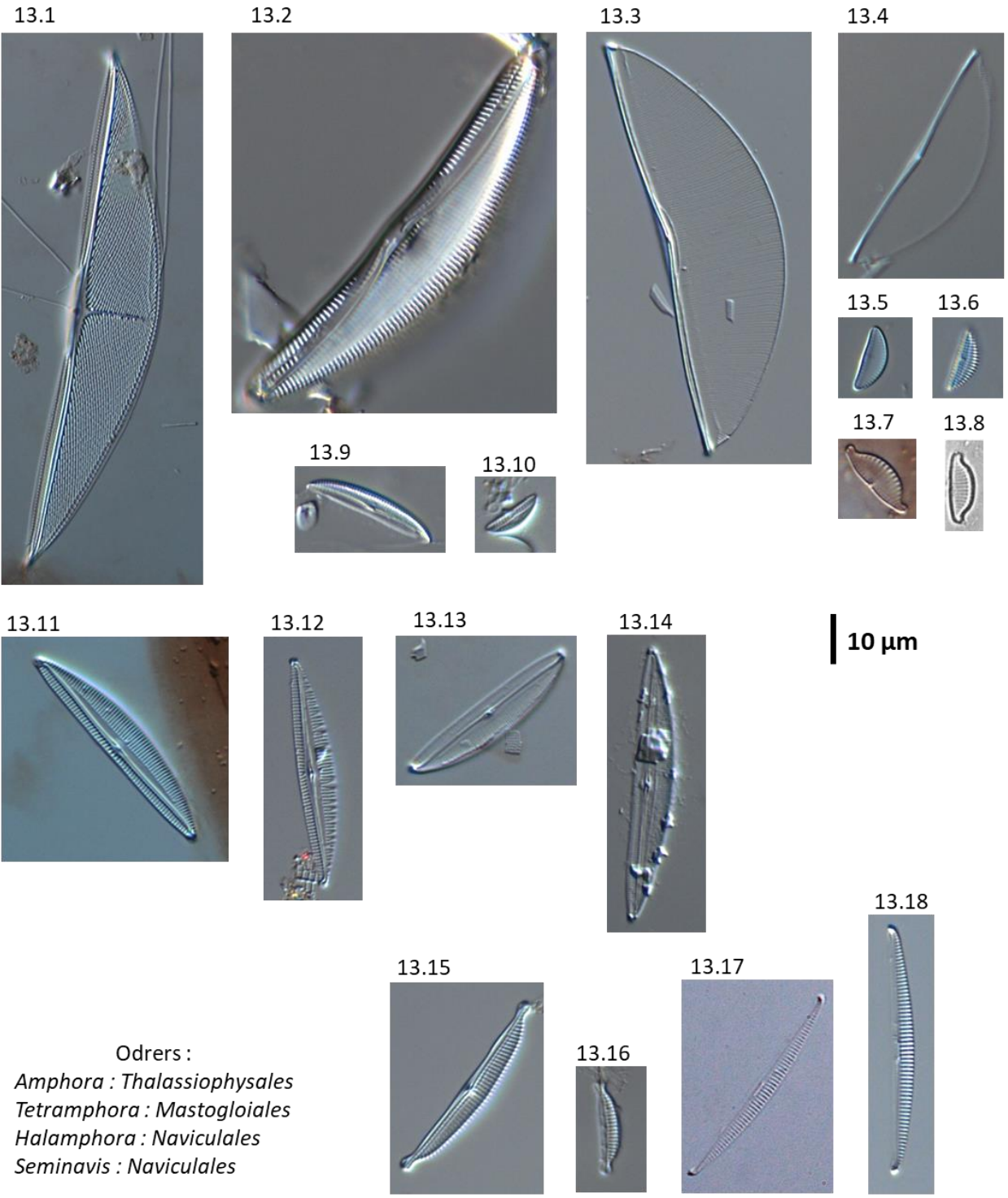


Plate 12 : 01 *Berkeleya cf. hyalina*, 02 *B. scopulorum*, 03 *Berkeleya sp.*,
04-06 *B. fennica*, 07 *Gomphonema sp.*, 08 *Gomphonemopsis sp.*,
09 *Rhoicoshenia sp.*,

Biraphid

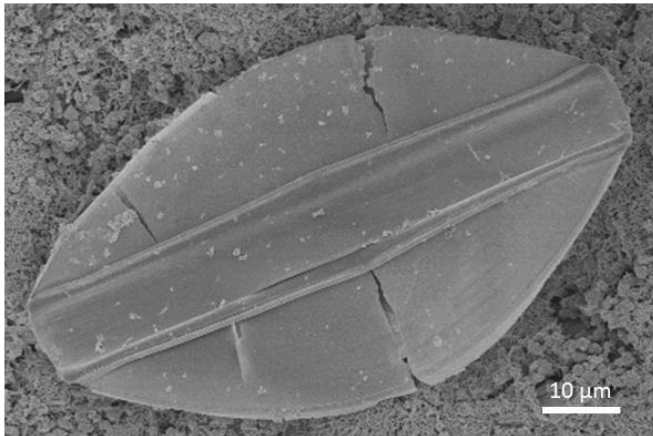


Odrers :
Amphora : *Thalassiophysales*
Tetramphora : *Mastogloiales*
Halamphora : *Naviculales*
Seminavis : *Naviculales*

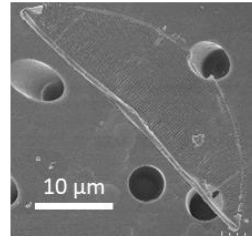
Plate 13 : 01 *Tetramphora decussata*, 02 *Amphora immarginata*, 03 *A. hyalina*,
 04 *A. pseudohylinea*, 05-06 *A. helenensis*, 07-08 *A. wisei*, 09 *A. marina*, 10 *Amphora* sp1,
 11-12 *Seminavis* cf *robusta*, 13 *Seminavis* sp1, 14 *Seminavis* sp2, 15 *Halamphora*
yundengensis, 16 *Halamphora* sp1, 17-18 *Halamphora* sp nov.

**Biraphid
(SEM)**

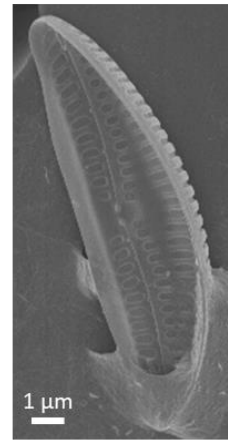
14.1



14.2



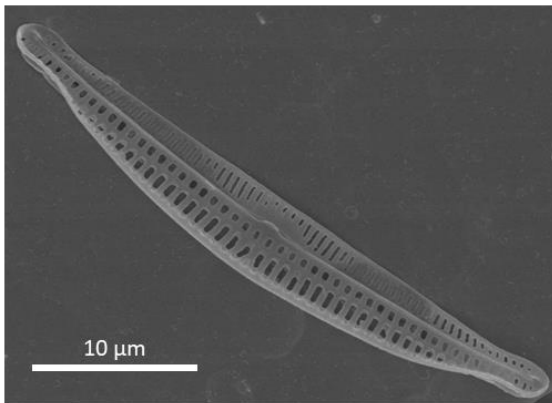
14.3



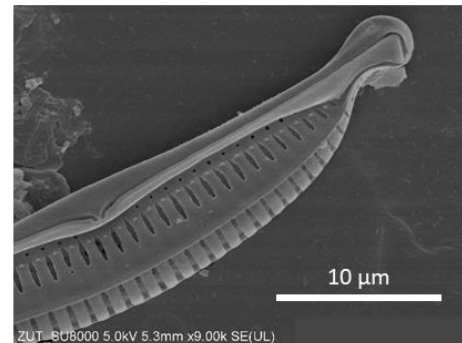
14.4



14.5



14.6



14.7

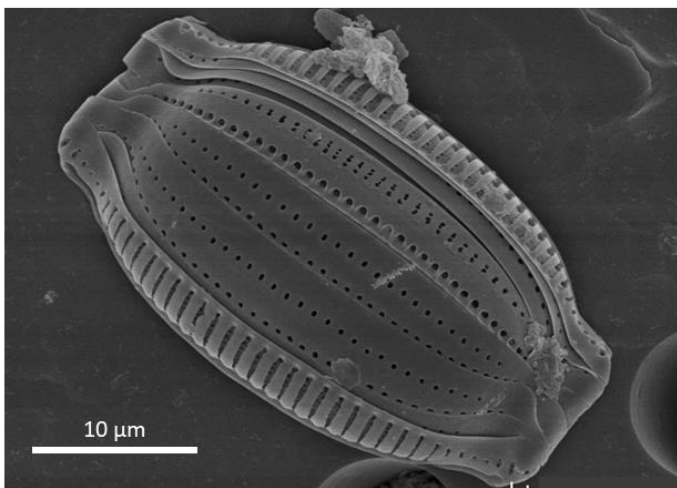


Plate 14 : 01 *Amphora hylina*, 02 *A. pseudhylina*, 03 *A. helenensis*, 04 *Amphora* sp.,
05 *H. luciae*, 06-07 *Halamphora yundengensis*

15.1



10 μm

Biraphid

Oders :

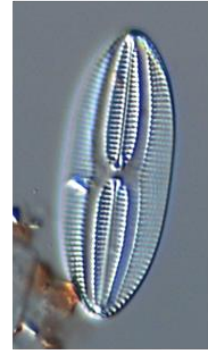
Diploneis, Fallacia : Naviculales

Lyrella : Lyrellales

15.2



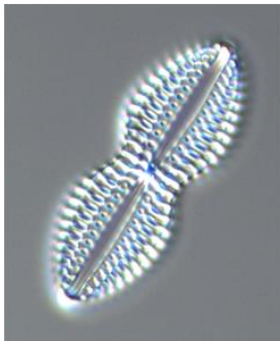
15.3



15.4



15.5



15.6



15.7



15.8



15.9



15.10

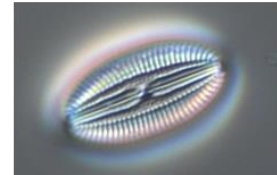


Plate 15 : 01 *Lyrella amphoroides*, 02 *L. spectabilis*, , 03 *Fallacia sp1*, 04 *Fallacia forcipata*, 05 *Diploneis crabo*, 06 *Diploneis sp1*, 07 *D. nitescens*, 08 *Diploneis sp2*, 09 *Diploneis sp3*, 10 *D. papula*

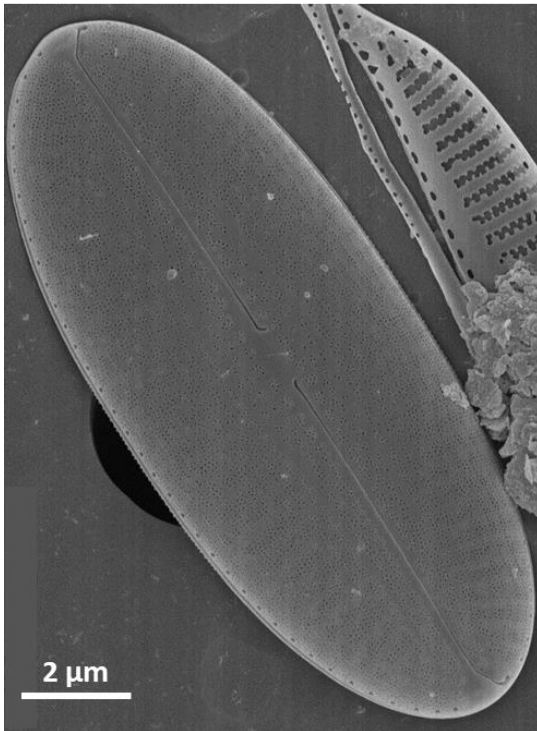
Biraphid
(SEM)

Oders :

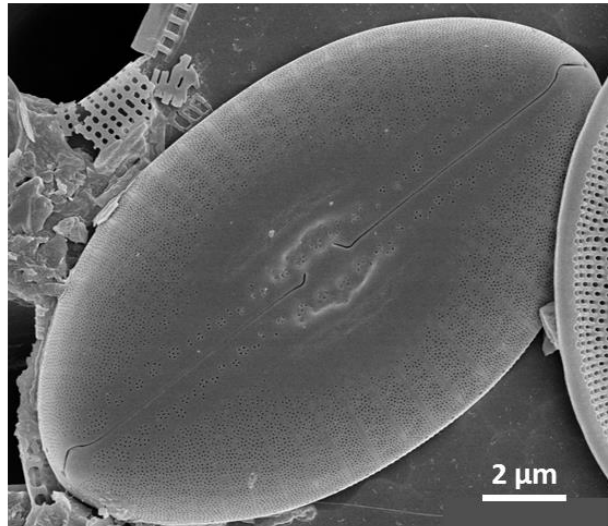
Diploneis, Fallacia : *Naviculales*

Lyrella : *Lyrellales*

16.1



16.2



16.3

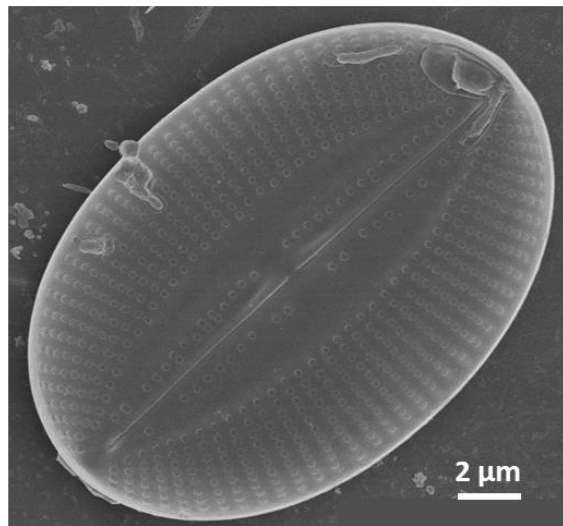
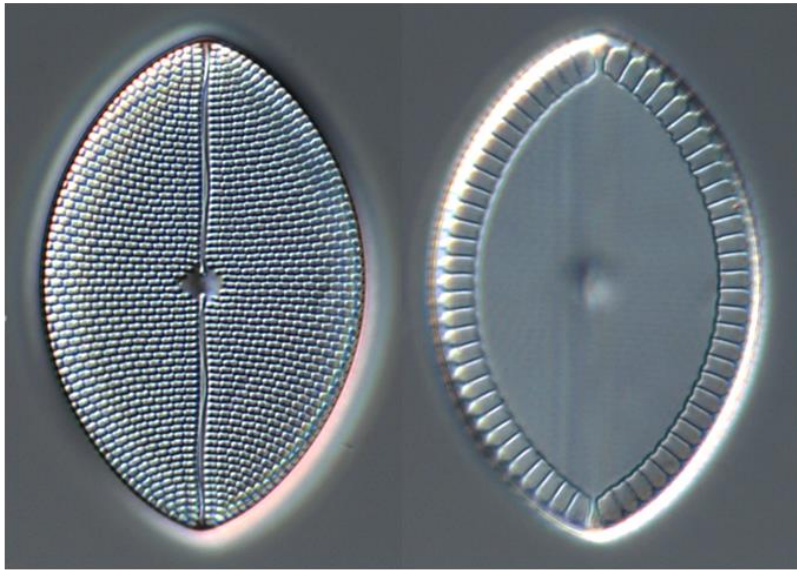


Plate 16 : 01 *Diploneis vacilans*, 02 *Diploneis* sp, 03 *Falacia* sp.

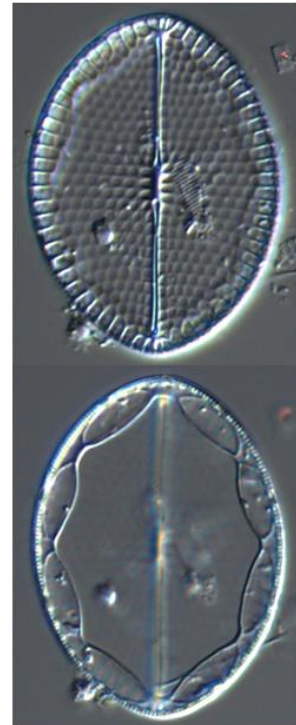
Biraphid

Order : *Mastogloiales*

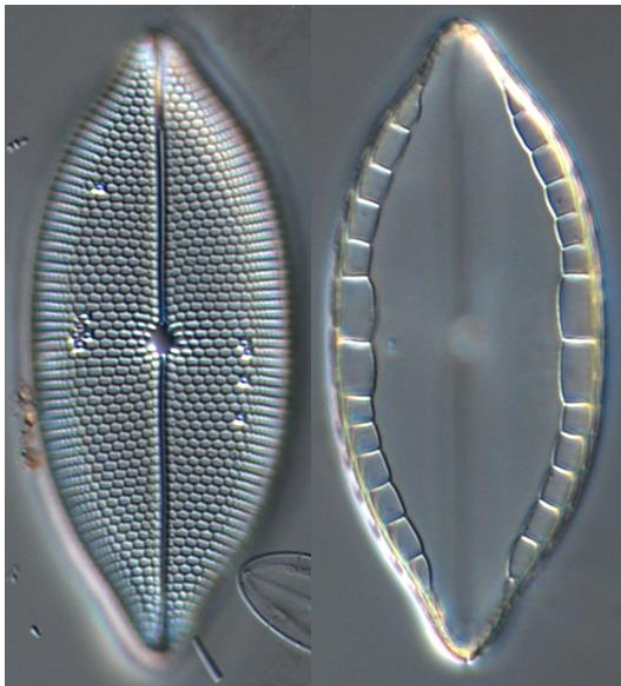
17.1



17.2

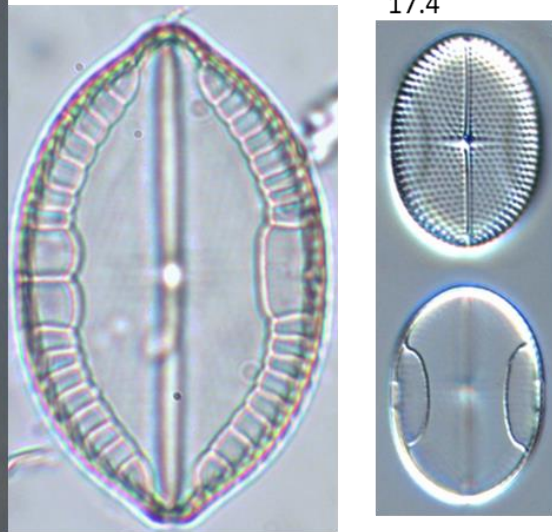


17.3

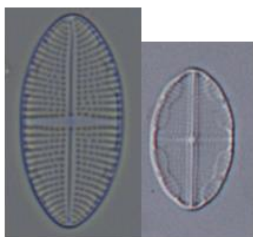


10 μm

17.4



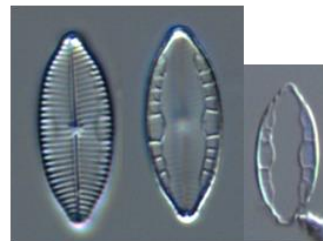
17.5



17.7



17.8



17.6



Plate 17 : 01 *Mastogloia horvathiana*, 02 *M. fimbriata*, 03 *M. angulata*, 04 *M. binotata*, 05 *M. crucicula*, 06 *M. crucicula* var. *alternans*, 07 *M. biocellata*, 08 *M. pumila*

Order : Mastogloiales

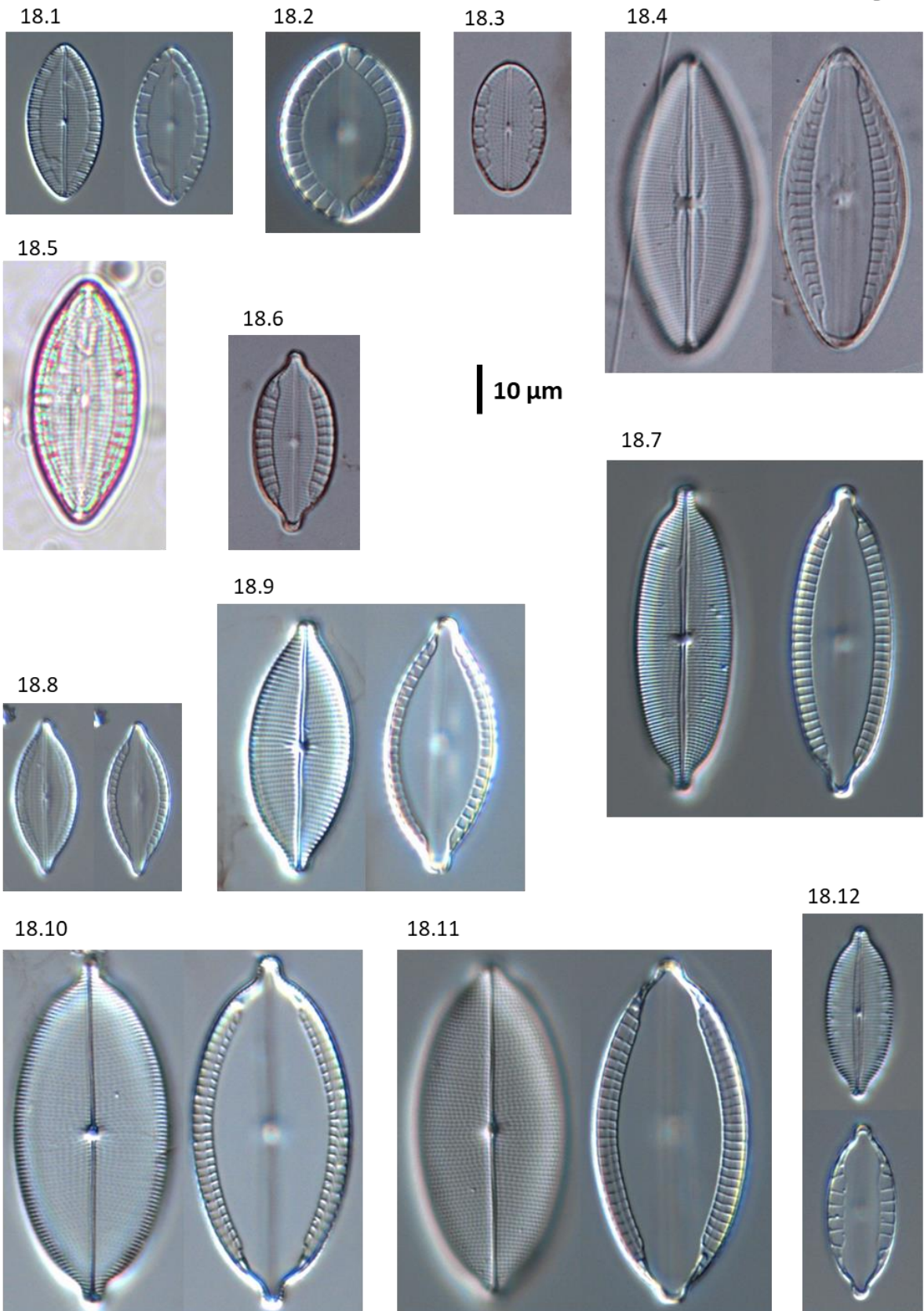


Plate 18 : 01 *Mastogloia emarginata*, 02 *M. ovata*, 03 *M. ovalis*, 04 *M. vasta*,
05 *M. adriatica*, 06 *M. corsicana*, 07 *M. decipiens*, 08 *M. cyclops*, 09 *M. ignorata*,
10 *M. asperula*, 11 *M. lanceolata*, 12 *M. laterostrata*

Order : *Mastogloiales*

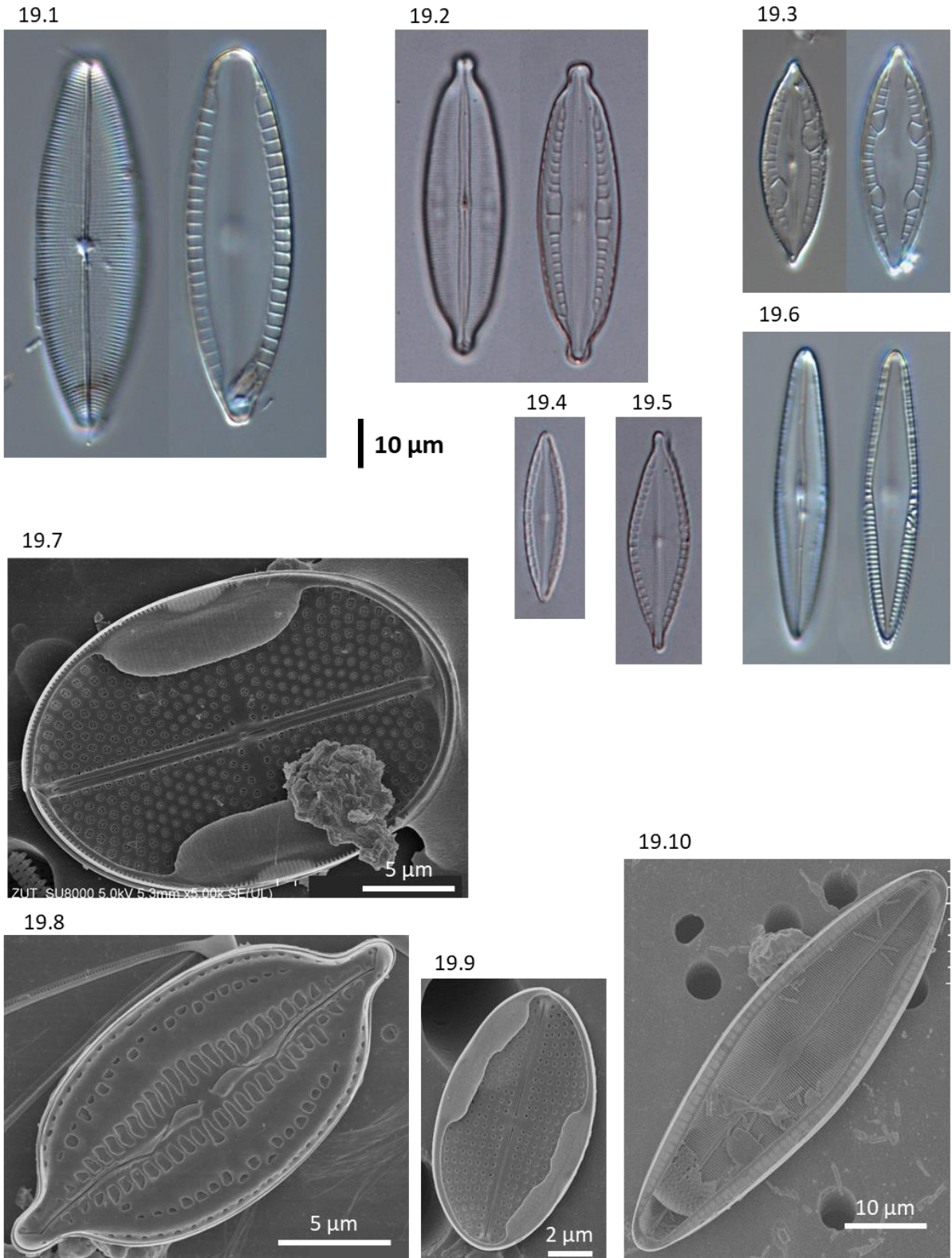


Plate 19 : 01 *Mastogloia* sp1, 02 *M. paradoxa*, 03 *M. erythraea*, 04 *M. regula*,
 05 *Masto* sp2, 06 *M. cuneata*,
SEM : 07 *M. binotata*, 08 *M. corsicana*, 09 *M. crucicula* var *alternans*, 10 *M. cuneata*

Biraphid

Orders : *Naviculales*

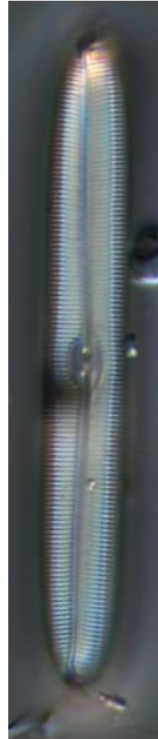
20.1



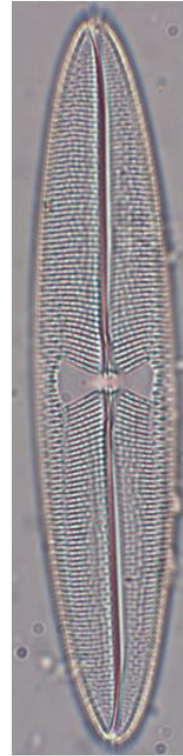
20.2



20.3



20.4

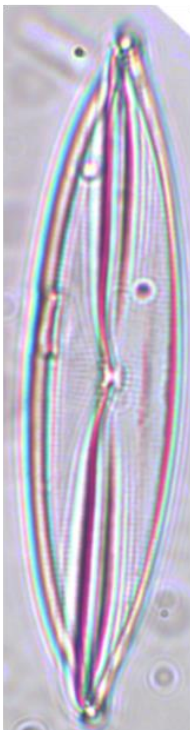


10 μ m

20.08



20.5



20.6



20.7



20.09



Plate 20 : 01 *Pinnularia* spp, 02 *Caloneis* sp1, 03 *Caloneis* sp2, 04 *Trachyneis aspera*, 05 *Plagiotropis* cf *lepidoptera*, 06 *Gyrosigma* sp., 07 *Haslea* sp1, 08 *Haslea* sp2, 09 *Haslea* sp3

Orders : *Naviculales*

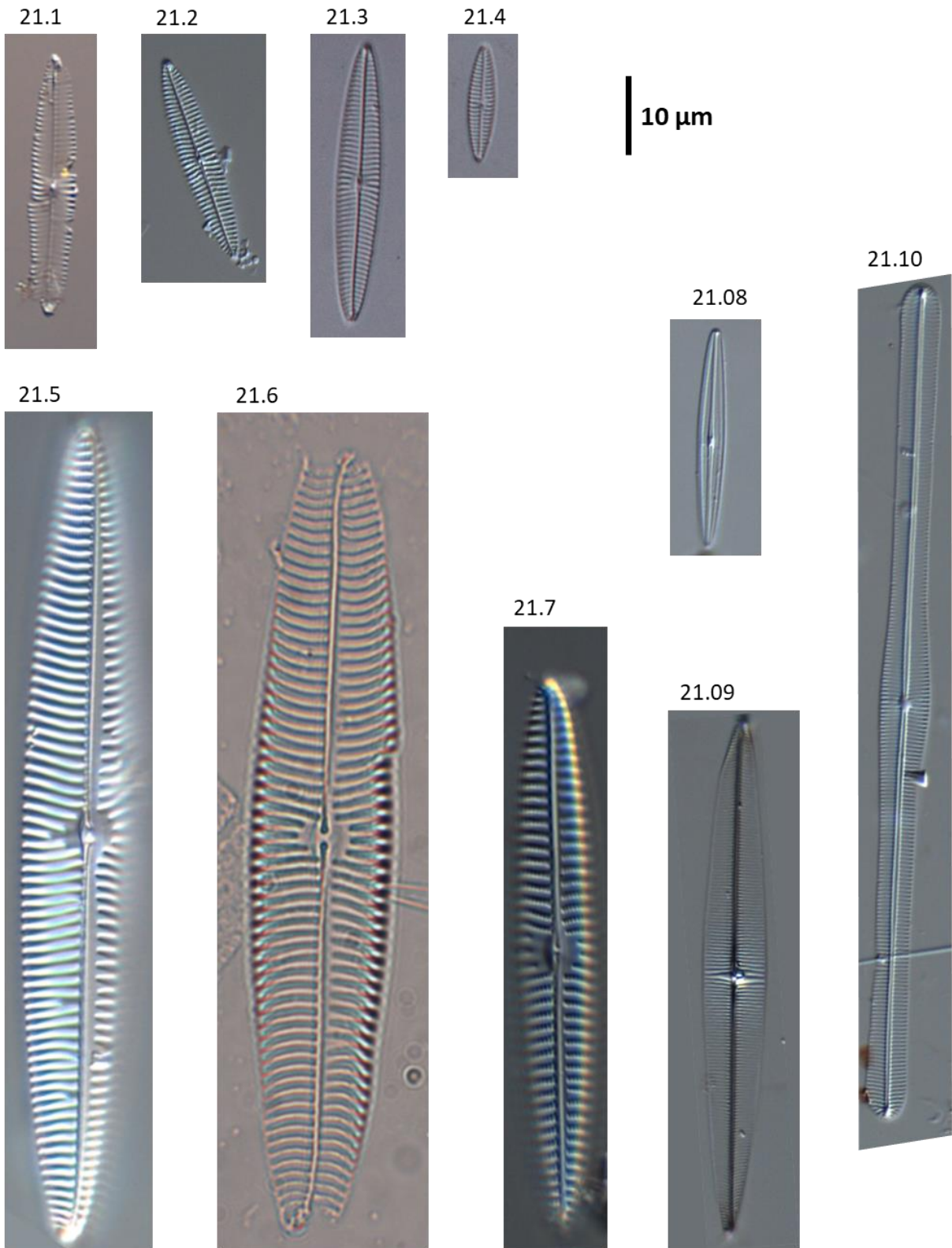
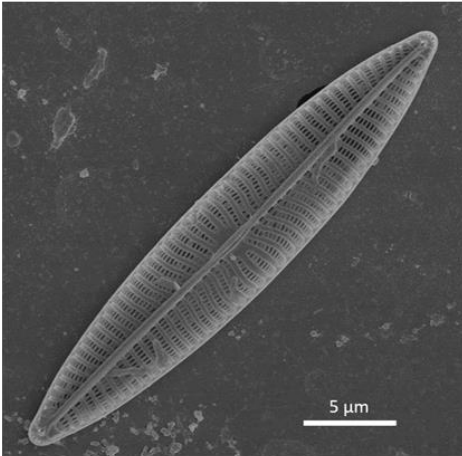
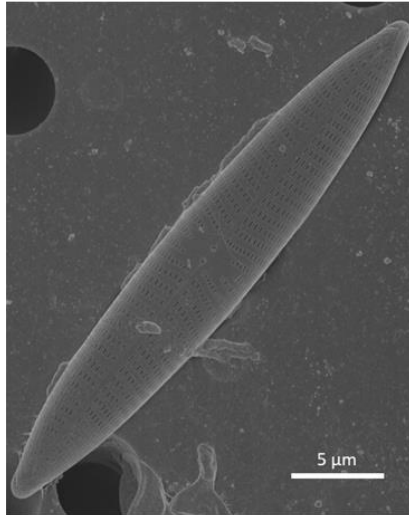


Plate 21 : 01-02 *Navicula normalis*, 03 *N. ramosissima*, 04 *Navicula sp1*,
05-06 *Navicula sp2* , 07 *Navicula sp3*, 08 *Brachysira estoniarum*, 09 *Proschkinia
complanatula*, 10 *Climaconeis sp*

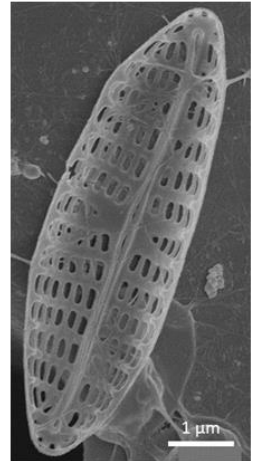
22.1



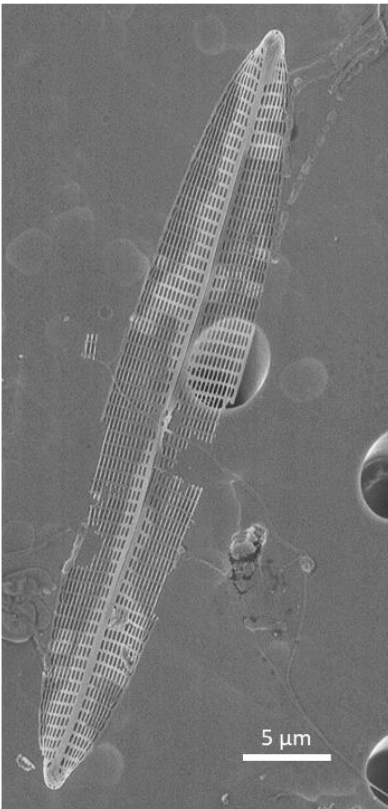
22.2



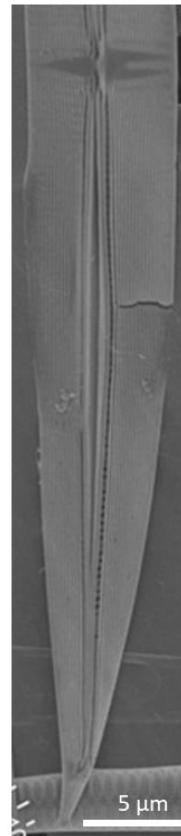
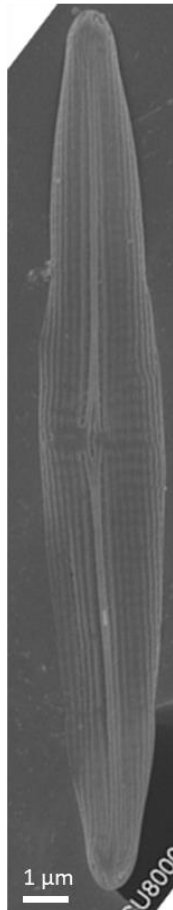
22.3



22.4



22.5



22.6



22.7

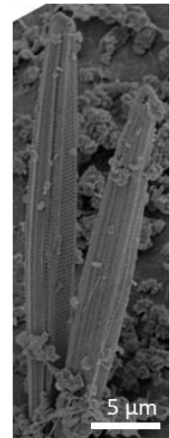
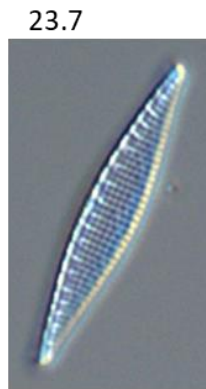
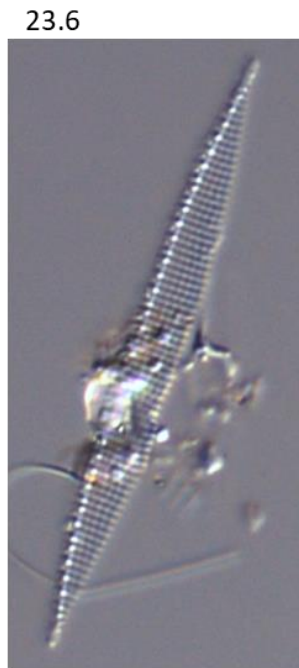
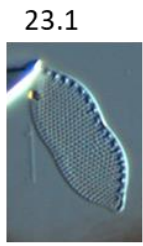


Plate 22 : 01 *Navicula ramosissima*, 02 *Navicula sp1*, 03 *Navicula sp2*, 04 *N. pavillardii*, 05 *Proschkinia complanatula*, 06 *Haslea sp.*, 07 *Brachysira estoniarum*

Biraphid

Orders : *Bacillariales*



10 μ m

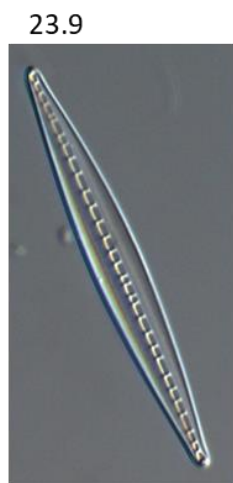
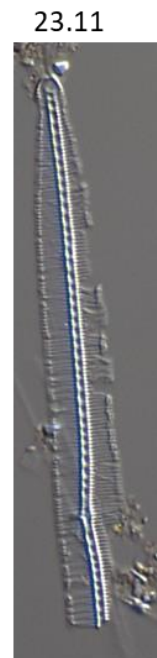


Plate 23 : 01 *Psammodictyon constrictum*, 02 *Nitzschia sp1*,
03 *N. aurariae*, 04 *Nitzschia sp2*, 05 *N. frustulum*, 06 *Nitzschia sp3*,
07 *Nitzschia sp4*, 08 *Nitzschia sp5*, 09 *N. dissipata*, 10 *Nitzschia sp6*,
11 *Nitzschia vidovichii*, 12 *Nitzschia rectilonga*

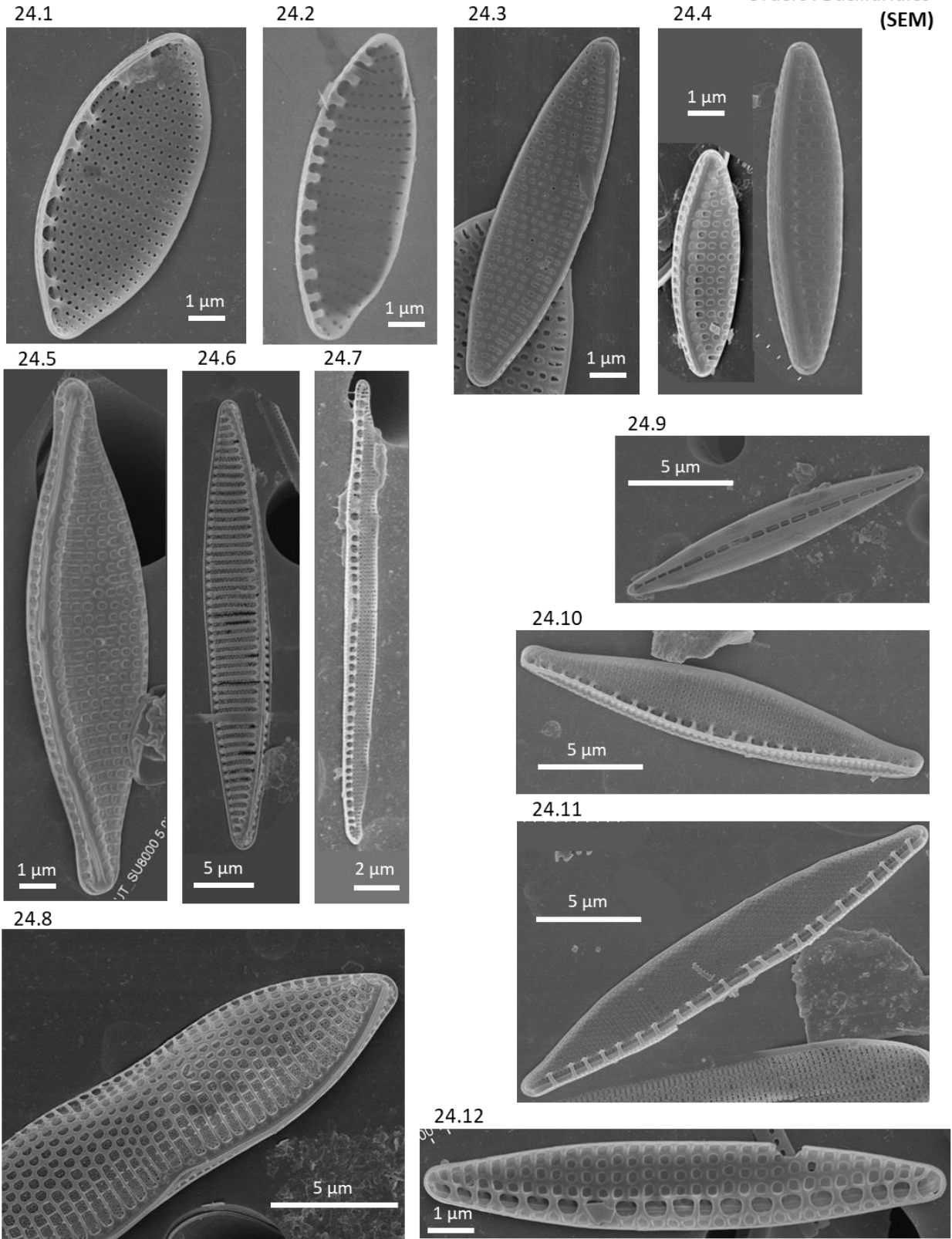


Plate 24 : 01 *Nitzschia amabilis*, 02 *N. aurarie* 03 *N. frustulum*, 04 *N. inconspicua*,
05 *Nitzschia sp1*, 06 *Pseudo-nitzschia sp1*, 07 *Pseudo-nitzschia sp2*, 08 *Psammodictyon sp*,
09 *Nitzschia sp3*, 10 *Nitzschia sp4*, 11 *Nitzschia sp5*, 12 *Nitzschia sp6*,

Biraphid

Orders :

Epithemia; *Protokeelia*, *Rhopalodia* :

Rhopalodiales

Auricula, *Entomoneis*, *Surirella* : *Surirellales*

25.1



25.2



25.3

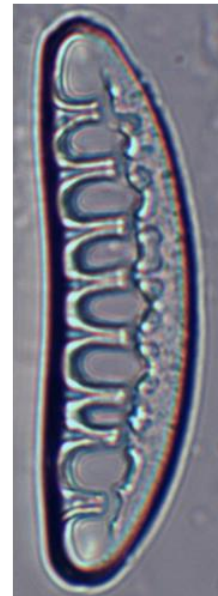


25.4



10 μm

25.5



25.6



25.7

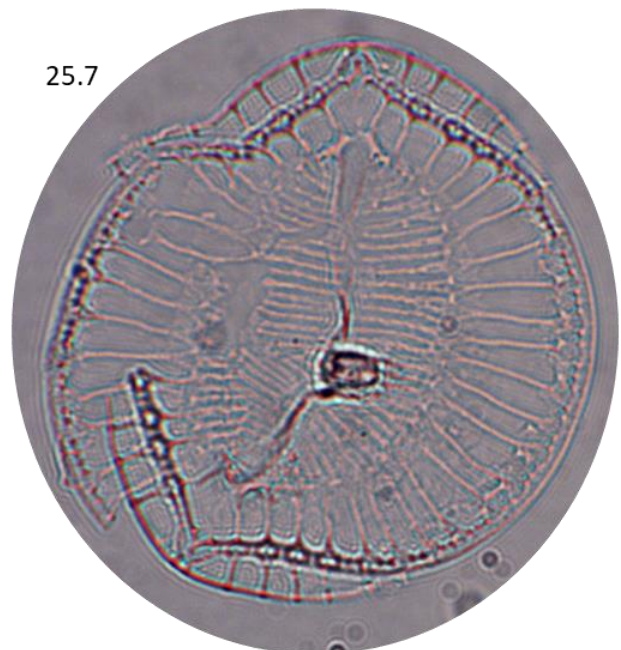
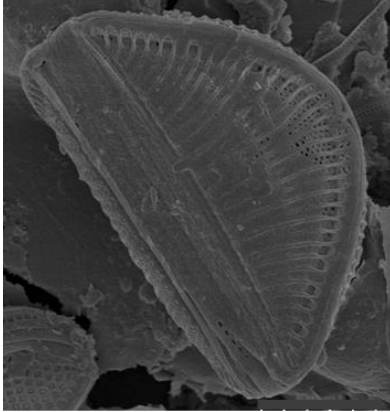


Plate 25 : 01 *Protokeelia* sp., 02 *Rhopalodia* *berbissoni*, 03 *Rhopalodia* sp., 04 *Auricula* *complexa*, 05 *Epithemia* sp., 06 *Surirella* sp1, 07 *Surirella* sp2

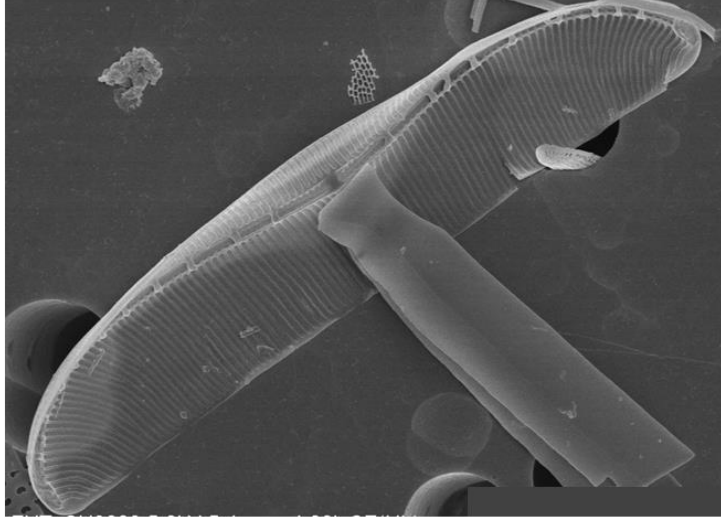
Biraphid

Orders :
Protokeelia, Rhopalodia : *Rhopalodiales*
Auricula, Entomoneis, Surirella : *Surirellales*
(SEM)

26.1



26.2



10 μ m

26.3

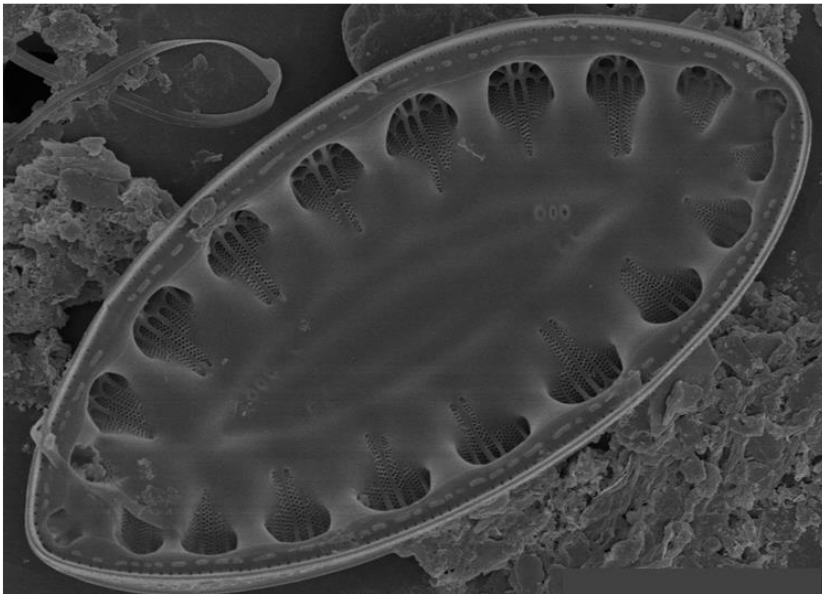
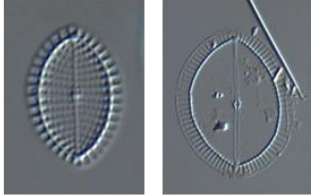


Plate 26 : 01 *Rhopalodia brebissonii* 02 *Auricula* sp, 03 *Surirella* sp

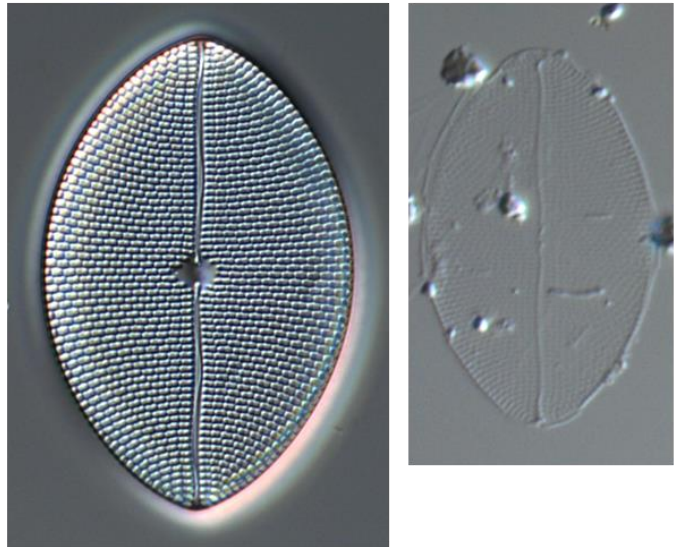
Plate 27 : Dissolved valves

(Figure on the left is the regular valve and on the right the valve appears dissolved)

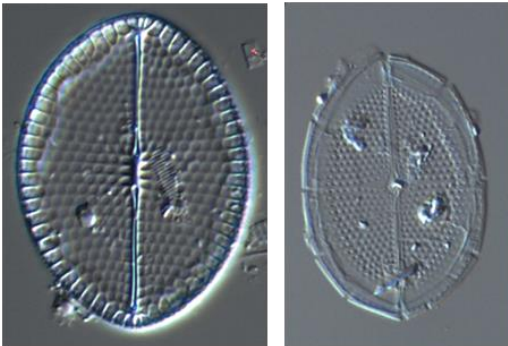
Cocconeis scutellum
var. posidoniae



Mastogloia horvathiana



Mastogloia fimbriata



Nitzschia dissipata



10 μ m

Diploneis nitescens



Conclusion générale

1. Résumé et contextualisation

Le but de ce travail de thèse était de mieux comprendre les blooms d'*Haslea* en environnements naturels avec deux aires de prospection en mer Méditerranée. Cette étude globale a permis d'identifier les espèces présentes et de décrire de nouvelles espèces d'*Haslea* ainsi que de mieux comprendre la dynamique et l'impact de leur bloom. Ces recherches ont été motivées par un intérêt grandissant pour le genre dû aux implications de certaines espèces en aquaculture et les propriétés des pigments de type marennine démontrées en laboratoire. Les blooms d'*Haslea* avaient jusqu'ici été principalement étudiés dans des milieux fermés comme les claires d'huîtres.

Les objectifs principaux étaient d'étudier les paramètres environnementaux clés impliqués dans la dynamique du bloom puis de vérifier si le bloom d'*Haslea* et la marennine exsudée altéraient les communautés associées. De par les travaux réalisés en milieu semi-fermé et en laboratoire, les hypothèses de départ étaient :

1/ L'augmentation de la photopériode et de l'intensité lumineuse pouvaient être des éléments déclencheurs du bloom,

2/ Connaissant les propriétés biologiques de la marennine et des pigments de types marennine, le bloom pouvait avoir un effet négatif sur les communautés constituant le biofilm, principalement composées de diatomées et bactéries.

L'étude des paramètres physico-chimiques, l'analyse taxonomique morphologique et moléculaire des communautés de diatomées et de bactéries ont permis de répondre à ces objectifs et ces hypothèses. Les résultats principaux sont, tout d'abord, que plusieurs d'espèces d'*Haslea* produisant des pigments bleus ou non ont été identifiées en Méditerranée : *H. corsicuricta* sp. nov., *H. forojuliensis* sp. nov., *H. ostrearia*, *H. provincialis*, *H. nipkowii* and *H. silbo*. Ces deux dernières espèces ont été identifiées dans des études précédentes (Gastineau *et al.*, 2021b; Poulin *et al.*, 2004). L'espèce majoritaire impliquée dans l'établissement des blooms méditerranéens est *H. provincialis*. Il a également été observé que le bloom benthique d'*Haslea* suivait le bloom phytoplanctonique printanier, en Méditerranée. Dans les claires ostréicoles, le bloom d'*Haslea* présent en hiver, fait également suite au bloom phytoplanctonique automnal. Cette suite permet aux autotrophes benthiques de profiter de plus de lumière et des nutriments rapidement reminéralisés par les hétérotrophes habitants le biofilm suite à la dégradation des cellules planctoniques. La fin du boom d'*Haslea* pourrait être liée à une augmentation des températures qui favoriseraient d'autres organismes du biofilm.

En parallèle de ces données acquises sur la biologie et la diversité des *Haslea* en milieu naturel, il a été montré que contrairement à notre hypothèse de départ, le bloom ne modifie pas

significativement la composition de la communauté de diatomées ou de bactéries du microenvironnement. Cette conclusion permet de confirmer que les blooms d'*Haslea* ne font pas partie des blooms toxiques (HAB).

2. Comparaison avec des blooms de diatomées

Les blooms phytoplanctoniques printaniers sont des phénomènes annuels, récurrents et mondiaux, avec des intensités plus importantes dans la partie Nord de l'Atlantique où ces phénomènes peuvent être visibles depuis l'espace (Behrenfeld, 2010; Ellertsen, 1993). Ces efflorescences planctoniques saisonnières sont multi-espèces et généralement dominées par des diatomées centriques (Percopo *et al.*, 2011). Ces événements sont favorisés par une remontée de nutriments profonds dans la zone photique couplée à une augmentation de l'intensité lumineuse qui en font donc des conditions favorables aux organismes photosynthétiques (*e.g.* : Mann et Lazier, 1996). Dans un environnement plus fermé comme la mer Méditerranée, l'intensité du bloom printanier sera d'autant plus dépendante de l'intensité des tempêtes hivernales (vent) qui permettent de favoriser la remontée des nutriments des eaux profondes (Goffart, 1992). Il y a également une variabilité annuelle temporelle importante entre les différents bassins où ces blooms peuvent être observés, entre le début du printemps et la fin de l'été (Zingone *et al.*, 1995). Les facteurs limitant la fin de ces blooms printaniers sont l'épuisement des nutriments disponibles dans la zone photique et l'augmentation de la pression de pâturage. En effet, cette production et l'accumulation rapide de biomasse est suivi d'un bloom de zooplancton, permettant d'alimenter les niveaux trophiques supérieurs (*e.g.*: Fullgrabe *et al.*, 2020).

En milieu planctonique, on observe également des blooms espèce-spécifique *e.g.* : *Ditylum brightwellii* (West) Grunow (Rynearson *et al.*, 2006), *Pseudo-nitzschia australis* Frenguelli. Cette dernière produit de l'acide domoïque, une phycotoxine qui exsudée en grande quantité lors des blooms entraîne des phénomènes de mortalités massives de la faune marine (oiseaux et mammifères marins, notamment les lions de mer) (Bejarano *et al.*, 2008; Scholin *et al.*, 2000). L'impact de ces blooms est généralement étudié au niveau global afin de déterminer s'ils sont classés ou non dans les HAB. L'impact à l'échelle du microenvironnement a été moins étudié.

En milieu benthique, les blooms multi-espèces ou espèce-spécifique ont été moins notés. Dans certains cas, une des espèces devient dominante au sein de la communauté. Des blooms benthiques ont pu être observés dans différents environnements. Un bloom automnal de *Gyrosigma fasciola* (Ehrenberg) Griffith & Henfrey a été noté dans les vasières intertidales de l'estuaire de la Loire (Ribeiro *et al.*, 2021). Dans le golfe de Californie, Mexique, un bloom de *Biddulphia biddulphiana* Smith a pu être observé. Ces diatomées peuvent être planctoniques et peuvent également former des chaînes

attachées aux substrats benthiques (Round *et al.*, 1990). Leur bloom a affecté négativement les espèces qu'elles ont recouvertes (Galland et Pennebaker, 2012). Un bloom combinant *Paralia sulcata* (Ehrenberg) Cleve, capable de former des chaînes et *Cocconeis* spp. a été observé recouvrant une partie importante de la faune et flore benthiques dans un fjord d'Antarctique (Ahn *et al.*, 2016).

La dynamique de ces blooms de diatomées benthiques ou planctoniques, n'est pas toujours étudiée mais s'explique principalement par des variations de la concentration en nutriments, de températures et de luminosité. En milieu benthique, les blooms sont peut-être moins fréquents dues à la forte compétition pour l'accès au substrat et la forte concentration de signaux chimiques (allélopathiques) qui rend plus complexe la possibilité pour une espèce de prendre le pas sur le reste de la communauté.

L'impact des blooms peut avoir des conséquences sur plusieurs niveaux du réseau trophique (HAB) ou agir à l'échelle du microenvironnement. Dans nos échantillons, il a été noté que les valves de diatomées issues des échantillons prélevés pendant le maximum du bloom d'*Haslea* apparaissent plus cassées et fines que celles des échantillons témoins (cf. Plate 27). Cette apparence de valves « dissoutes », moins silicifiées, pourrait être liée au développement du bloom qui limite temporairement la concentration en silice au sein du microenvironnement. Il a déjà été montré qu'un épuisement de la silice environnementale pouvait altérer la morphologie des frustules de diatomées (Hasle, 1960; Olli *et al.*, 2008; Paasche, 1973). Gouletquer, (1997) avait également évoqué que dans les claires d'huîtres, la silice pouvait être un facteur limitant les blooms de *H. ostrearia*.

3. Perspectives

3.1 Températures et adaptation des espèces au sein du biofilm

Les variations de température peuvent influencer le bloom de manière directe si les optimums de température des *Haslea* spp. présentes sont dépassés ou de manière indirecte en modifiant la communauté du biofilm. En effet, l'augmentation de la température favorise le métabolisme bactérien (Rao, 2010) ce qui peut être délétère pour la communauté de diatomées.

De plus, la répartition des différentes espèces d'*Haslea* et l'établissement de blooms pourraient être causés par des optimums de températures différents. L'impact de la température sur la reproduction sexuée a été étudié chez *H. ostrearia* (Davidovich *et al.*, 2018). Cependant, en période de bloom le mode de reproduction le plus actif est la reproduction végétative (Gallagher, 1980).

La reproduction sexuée est moins fréquente mais nécessaire pour maintenir une diversité et plasticité génétique au sein de la population (Rynewson et Armbrust, 2005).

Comparer les optimums de température entre des souches d'*H. ostrearia* d'Atlantique et de Méditerranée et des souches d'*H. provincialis* de mer de Ligure et de l'Adriatique serait pertinent pour mieux comprendre le lien entre la dynamique des blooms et les variations de températures. Ces optimums et gammes de températures définis pour les différentes espèces d'*Haslea*, pourraient également être comparés avec ceux d'autres diatomées du biofilm. En effet des diatomées ayant des optimums de températures plus hauts ou plus eurythermales pourraient profiter cette augmentation de température en fin de bloom pour prendre le dessus (*e.g.* : Claquin *et al.*, 2008; Salleh et McMinn, 2011).

Les blooms d'*H. ostrearia* dans les claires d'huîtres, côte Est Atlantique, sont maximum en automne où la température de l'eau diminue progressivement de 15 °C à 10 °C. En Méditerranée, où les blooms sont dominés par *H. provincialis* et plus fréquents au printemps, quand la température de l'eau augmente de 15 °C à 20 °C en mer de Ligure et en mer Adriatique quand le bloom est présent la température de l'eau peut atteindre les 28 °C. Alors que la température est un paramètre clé structurant les communautés habitant le biofilm, il est singulier d'observer ces blooms avec des saisonnalités opposées. En plus de potentiellement modifier la structure du biofilm, une augmentation de la température peut aussi aboutir à un amincissement des frustules de diatomées (Sheehan *et al.*, 2020).

En baie de Calvi, on observe des développements massifs d'algues filamenteuses épiphytes dont l'intensité et la fréquence ont augmenté avec la température (Hoffmann *et al.*, 2000). Ces algues filamenteuses colonisent les mêmes substrats que les blooms d'*Haslea* mais avec des optimums plus profonds, aux alentours des 15 - 20 m. Des patchs d'*Haslea* bleues ont été observés sur ces algues filamenteuses aux alentours de 10 m de profondeur.

3.2 Perspectives de terrain

Afin de continuer à comprendre les effets des blooms d'*Haslea* sur les communautés épiphytes, différentes perspectives sont envisageables.

Après avoir estimé l'impact possible des blooms d'*Haslea* entre différents sites et différents substrats, il serait pertinent d'évaluer l'évolution de la communauté bactérienne tout au long du bloom. Cela pourrait permettre de mesurer si l'augmentation des bactéries, en lien possible avec une augmentation saisonnière des températures serait une des causes annonçant la fin du bloom d'*Haslea*.

Également, il pourrait être profitable d'étudier les variations en silice dans le micro-environnement du bloom. Cela permettrait de vérifier le lien entre les valves de diatomées ayant un aspect « dissouts » et une possible limitation en silice due à la croissance rapide des *Haslea* spp.

3.3 Limites expérimentales

Cette étude sur le terrain fournit également des perspectives sur les limites de culture des souches d'*Haslea* en laboratoire. Par exemple, pour étudier les différentes activités biologiques de la marennine et les perspectives d'utilisation de *H. ostrearia*, il est préférable de réaliser les expériences avec des cultures axéniques. Ce processus permet en effet de vérifier si les propriétés sont bien spécifiques à la microalgue ciblée et son pigment et non pas à son consortium bactérien. Cependant, dans le cas d'*H. ostrearia*, la suppression de son microbiome et l'utilisation d'antibiotiques ralentit trop fortement sa croissance (données personnelles) et ne permet pas de mener à bien ces expériences. En effet, les cellules d'*Haslea* semblent se développer en lien étroit avec le biofilm. Il doit donc y avoir de nombreux échanges de vitamines et autres cofacteurs produits par les bactéries et nécessaires à la croissance des cellules. De manière générale, les diatomées benthiques sont souvent difficiles à axéniser en raison de la grande quantité de mucilage qu'elles produisent et qui complique l'élimination des bactéries qui y sont fixées (Bruckner *et al.*, 2008).

De plus, l'effet allélopathique des *Haslea* sur les diatomées du genre *Cocconeis* pourrait être vérifié en laboratoire. Toutefois, ces tests semblent difficiles à mettre en place car les *Cocconeis* sont des épiphytes fortement accrochés à leur substrat et donc difficiles à cultiver en culture monoclonale.

4. Directions à prendre

4.1 Identification du pigment

Au sein du genre *Haslea*, les blooms benthiques ont été observés seulement chez les espèces produisant des pigments de type marennine. La caractérisation chimique du pigment marennine, produit par *H. ostrearia*, permettrait d'appréhender sa voie de biosynthèse et de comprendre quel avantage écologique il apporte. Il serait ensuite intéressant de comparer la composition chimique des pigments de type marennine synthétisés par les différentes *Haslea* bleues (thèse en cours à ce sujet). Cela permettrait de tester et comparer les activités biologiques des différents pigments. De plus, en vérifiant si ces avantages écologiques sont similaires, on pourrait émettre des hypothèses entre les différences chimiques des pigments et la capacité de certaines espèces à former des blooms.

4.2 Médiation scientifique

Dans le but de mieux estimer l'aire de répartition des *Haslea* et des blooms ainsi que leur biotope et saisonnalité, il serait pertinent de mettre en place un suivi faisant appel à la science participative. Cela permettrait d'avoir un jeu de données plus large le long des côtes méditerranéennes et de récolter des informations (date, profondeur, température de l'eau) sur d'éventuels blooms observés par les plongeurs. Communiquer ses recherches au grand public est important pour pouvoir rendre la science et les données produites plus accessibles à tous. Dans notre cas, cela permet également de souligner que tous les blooms algaux ne sont pas nocifs et de potentiellement récolter des données clés sur ces phénomènes, leur fréquence et leur amplitude. En communiquant sur les blooms d'*Haslea* au cours de ma thèse, de nouveaux sites ont pu être identifiés le long de la côte méditerranéenne française, au niveau de Toulon, Antibes.

Pour conclure, ce projet a permis de décrire les blooms d'*Haslea* bleues présents en milieu naturel. Cette étude multi approches a permis de répondre aux questionnements de départ, et comme souvent en sciences, a soulevé de nouvelles interrogations et perspectives de recherches.

Références bibliographiques

- Adjout, R., Mouget, J., Pruvost, J., Chentir, I., Loiseau, C., Baba Hamed, M.B., 2022. Effects of temperature, irradiance, and pH on the growth and biochemical composition of *Haslea ostrearia* batch-cultured in an airlift plan-photobioreactor. *Appl Microbiol Biotechnol* 106, 5233–5247. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12055-1>
- Ahn, I.-Y., Moon, H.-W., Jeon, M., Kang, S.-H., 2016. First record of massive blooming of benthic diatoms and their association with megabenthic filter feeders on the shallow seafloor of an Antarctic Fjord: Does glacier melting fuel the bloom? *Ocean Sci. J.* 51, 273–279. <https://doi.org/10.1007/s12601-016-0023-y>
- Alverson, A.J., Beszteri, B., Julius, M.L., Theriot, E.C., 2011. The model marine diatom *Thalassiosira pseudonana* likely descended from a freshwater ancestor in the genus *Cyclotella*. *BMC Evol Biol* 11, 125. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-125>
- Amin, S.A., Hmelo, L.R., van Tol, H.M., Durham, B.P., Carlson, L.T., Heal, K.R., Morales, R.L., Berthiaume, C.T., Parker, M.S., Djunaedi, B., Ingalls, A.E., Parsek, M.R., Moran, M.A., Armbrust, E.V., 2015. Interaction and signalling between a cosmopolitan phytoplankton and associated bacteria. *Nature* 522, 98–101. <https://doi.org/10.1038/nature14488>
- Amin, S.A., Parker, M.S., Armbrust, E.V., 2012. Interactions between Diatoms and Bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 76, 667–684. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00007-12>
- Armbrust, E.V., 2009. The life of diatoms in the world's oceans. *Nature* 459, 185–192. <https://doi.org/10.1038/nature08057>
- Arnou, 1688. Mémoire de ce qui se pratique pour rendre verte(s) les huîtres communes.
- Asnaghi, V., Chiantore, M., Bertolotto, R.-M., Parravicini, V., Cattaneo-Vietti, R., Gaino, F., Moretto, P., Privitera, D., Mangialajo, L., 2009. Implementation of the European Water Framework Directive: Natural variability associated with the CARLIT method on the rocky shores of the Ligurian Sea (Italy). *Marine Ecology* 30, 505–513. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0485.2009.00346.x>
- Asplund, M.E., Rehnstam-Holm, A.-S., Atnur, V., Raghunath, P., Saravanan, V., Härnström, K., Collin, B., Karunasagar, I., Godhe, A., 2011. Water column dynamics of *Vibrio* in relation to phytoplankton community composition and environmental conditions in a tropical coastal area. *Environ Microbiol* 13, 2738–2751. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02545.x>
- Badreddine, A., Abboud-Abi Saab, M., Gianni, F., Ballesteros, E., Mangialajo, L., 2018. First assessment of the ecological status in the Levant Basin: Application of the CARLIT index along the Lebanese coastline. *Ecological Indicators* 85, 37–47. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.10.006>
- Ballesteros, E., Sala, E., Garrabou, J., Zabala, M., 1998. Community structure and frond size distribution of a deep water stand of *Cystoseira spinosa* (Phaeophyta) in the Northwestern Mediterranean. *European Journal of Phycology* 33, 121–128. <https://doi.org/10.1080/09670269810001736613>
- Ballesteros, E., Torras, X., Pinedo, S., García, M., Mangialajo, L., de Torres, M., 2007. A new methodology based on littoral community cartography dominated by macroalgae for the implementation of the European Water Framework Directive. *Marine Pollution Bulletin, Implementation of the Water Framework Directive in European marine waters* 55, 172–180. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2006.08.038>
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A.A., Dvorkin, M., Kulikov, A.S., Lesin, V.M., Nikolenko, S.I., Pham, S., Prjibelski, A.D., Pyshkin, A.V., Sirotkin, A.V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M.A., Pevzner, P.A., 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* 19, 455–477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
- Barbara, G.M., Mitchell, J.G., 2003. Bacterial tracking of motile algae. *FEMS Microbiology Ecology* 44, 79–87. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2003.tb01092.x>
- Barofsky, A., Vidoudez, C., Pohnert, G., 2009. Metabolic profiling reveals growth stage variability in diatom exudates. *Limnology and Oceanography: Methods* 7, 382–390. <https://doi.org/10.4319/lom.2009.7.382>
- Bedoshvili, Ye.D., Popkova, T.P., Likhoshway, Ye.V., 2009. Chloroplast structure of diatoms of different classes. *Cell Tiss. Biol.* 3, 297–310. <https://doi.org/10.1134/S1990519X09030122>

- Begon, M., 1698. Mémoire sur la généralité de la Rochelle.
- Behrenfeld, M.J., 2010. Abandoning Sverdrup's Critical Depth Hypothesis on phytoplankton blooms. *Ecology* 91, 977–989. <https://doi.org/10.1890/09-1207.1>
- Bejarano, A.C., VanDola, F.M., Gulland, F.M., Rowles, T.K., Schwacke, L.H., 2008. Production and Toxicity of the Marine Biotoxin Domoic Acid and Its Effects on Wildlife: A Review. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 14, 544–567. <https://doi.org/10.1080/10807030802074220>
- Bélanger, W., Arnold, A.A., Turcotte, F., Saint-Louis, R., Deschênes, J.-S., Genard, B., Marcotte, I., Tremblay, R., 2020. Extraction Improvement of the Bioactive Blue-Green Pigment "Marennine" from Diatom *Haslea ostrearia*'s Blue Water: A Solid-Phase Method Based on Graphitic Matrices. *Marine Drugs* 18, 653. <https://doi.org/10.3390/md18120653>
- Bell, W., Mitchell, R., 1972. Chemotactic and Growth Responses of Marine Bacteria to Algal Extracellular Products. *Biological Bulletin* 143, 265–277. <https://doi.org/10.2307/1540052>
- Benovic, A., Lucic, D., Onofri, V., Pehardia, M., Caric, M., Jasprica, N., Bobanovic-Colic, S., 2000. Ecological characteristics of the Mljet Islands seawater lakes (South Adriatic Sea) with special reference to their resident populations of medusae. *Scientia Marina* 64, 197–206. <https://doi.org/10.3989/scimar.2000.64s1197>
- Bere, T., Tundisi, J.G., 2011. The Effects of Substrate Type on Diatom-Based Multivariate Water Quality Assessment in a Tropical River (Monjolinho), São Carlos, SP, Brazil. *Water Air Soil Pollut* 216, 391–409. <https://doi.org/10.1007/s11270-010-0540-8>
- Berg, D.E., 1983. Improved double-multiple streamtube model for the Darrieus-type vertical-axis wind turbine (No. SAND-82-2479C; CONF-830622-8). Sandia National Labs., Albuquerque, NM (USA).
- Bermejo, R., de la Fuente, G., Vergara, J.J., Hernández, I., 2013. Application of the CARLIT index along a biogeographical gradient in the Alboran Sea (European Coast). *Marine Pollution Bulletin* 72, 107–118. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.04.011>
- Biebl, H., Allgaier, M., Tindall, B.J., Koblizek, M., Lünsdorf, H., Pukall, R., Wagner-Döbler, I. 2005, 2005. *Dinoroseobacter shibae* gen. nov., sp. nov., a new aerobic phototrophic bacterium isolated from dinoflagellates. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, 1089–1096. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63511-0>
- Blanfuné, A., Thibaut, T., Boudouresque, C.F., Mačić, V., Markovic, L., Palomba, L., Verlaque, M., Boissery, P., 2017. The CARLIT method for the assessment of the ecological quality of European Mediterranean waters: Relevance, robustness and possible improvements. *Ecological Indicators* 72, 249–259. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.07.049>
- Bory, J.B., 1824. *Encyclopédie méthodique. Histoire naturelle des zoophytes, ou animaux rayonnés, faisant suite à l'histoire naturelle des vers de Bruguière* 2, 562–565.
- Bowler, C., Allen, A.E., Badger, J.H., Grimwood, J., Jabbari, K., Kuo, A., Maheswari, U., Martens, C., Maumus, F., Otilar, R.P., Rayko, E., Salamov, A., Vandepoele, K., Beszteri, B., Gruber, A., Heijde, M., Katinka, M., Mock, T., Valentin, K., Verret, F., Berges, J.A., Brownlee, C., Cadoret, J.-P., Chiovitti, A., Choi, C.J., Coesel, S., De Martino, A., Detter, J.C., Durkin, C., Falciatore, A., Fournet, J., Haruta, M., Huysman, M.J.J., Jenkins, B.D., Jiroutova, K., Jorgensen, R.E., Joubert, Y., Kaplan, A., Kröger, N., Kroth, P.G., La Roche, J., Lindquist, E., Lommer, M., Martin-Jézéquel, V., Lopez, P.J., Lucas, S., Mangogna, M., McGinnis, K., Medlin, L.K., Montsant, A., Secq, M.-P.O., Napoli, C., Obornik, M., Parker, M.S., Petit, J.-L., Porcel, B.M., Poulsen, N., Robison, M., Rychlewski, L., Rynearson, T.A., Schmutz, J., Shapiro, H., Siaut, M., Stanley, M., Sussman, M.R., Taylor, A.R., Vardi, A., von Dassow, P., Vyverman, W., Willis, A., Wyrwicz, L.S., Rokhsar, D.S., Weissenbach, J., Armbrust, E.V., Green, B.R., Van de Peer, Y., Grigoriev, I.V., 2008. The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature* 456, 239–244. <https://doi.org/10.1038/nature07410>
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H., 2004. *Carotenoids: Handbook*. Springer Science & Business Media.

- Brotas, V., Cabrita, T., Portugal, A., Serôdio, J., Catarino, F., 1995. Spatio-temporal distribution of the microphytobenthic biomass in intertidal flats of Tagus Estuary (Portugal), in: Balvay, G. (Ed.), *Space Partition within Aquatic Ecosystems, Developments in Hydrobiology*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 93–104. https://doi.org/10.1007/978-94-011-0293-3_8
- Brown, T.A., Rad-Menéndez, C., Ray, J.L., Skaar, K.S., Thomas, N., Ruiz-Gonzalez, C., Leu, E., 2020. Influence of nutrient availability on Arctic sea ice diatom HBI lipid synthesis. *Organic Geochemistry* 141, 103977. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2020.103977>
- Bruckner, C.G., Bahulikar, R., Rahalkar, M., Schink, B., Kroth, P.G., 2008. Bacteria Associated with Benthic Diatoms from Lake Constance: Phylogeny and Influences on Diatom Growth and Secretion of Extracellular Polymeric Substances. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 7740–7749. <https://doi.org/10.1128/AEM.01399-08>
- Buchan, A., LeClerc, G.R., Gulvik, C.A., González, J.M., 2014. Master recyclers: features and functions of bacteria associated with phytoplankton blooms. *Nat Rev Microbiol* 12, 686–698. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3326>
- Buesseler, K.O., 1998. The decoupling of production and particulate export in the surface ocean. *Global Biogeochemical Cycles* 12, 297–310. <https://doi.org/10.1029/97GB03366>
- Burns, A., Ryder, D.S., 2001. Potential for biofilms as biological indicators in Australian riverine systems. *Ecological Management & Restoration* 2, 53–64. <https://doi.org/10.1046/j.1442-8903.2001.00069.x>
- Capdevila, P., Linares, C., Aspillaga, E., Navarro, L., Kersting, D.K., Hereu, B., 2015. Recruitment patterns in the Mediterranean deep-water alga *Cystoseira zosteroides*. *Mar Biol* 162, 1165–1174. <https://doi.org/10.1007/s00227-015-2658-0>
- Capella-Gutiérrez, S., Silla-Martínez, J.M., Gabaldón, T., 2009. trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics* 25, 1972–1973. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp348>
- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Peña, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., Huttley, G.A., Kelley, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C.A., McDonald, D., Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., Walters, W.A., Widmann, J., Yatsunenkov, T., Zaneveld, J., Knight, R., 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 7, 335–336. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>
- Car, A., Witkowski, A., Dobosz, S., Burfeind, D.D., Meinesz, A., Jasprica, N., Ruppel, M., Kurzydłowski, K.J., Płociński, T., 2012. Description of a new marine diatom, *Cocconeis caulerpacola* sp. nov. (Bacillariophyceae), epiphytic on invasive *Caulerpa* species. *European Journal of Phycology* 47, 433–448. <https://doi.org/10.1080/09670262.2012.735255>
- Car, A., Witkowski, A., Jasprica, N., Ljubimir, S., Čalić, M., Dobosz, S., Dupčić Radić, I., Hrustić, E., 2019. Epilithic diatom communities from areas of invasive *Caulerpa* species (*Caulerpa taxifolia* and *Caulerpa cylindracea*) in the Adriatic Sea, NE Mediterranean.
- Carbonnelle, D., Pondaven, P., Morançais, M., Masse, G., Bosch, S., Jacquot, C., Briand, G., Robert, J., Roussakis, C., 1999. Antitumor and antiproliferative effects of an aqueous extract from the marine diatom *Haslea ostrearia* (Simonsen) against solid tumors: lung carcinoma (NSCLC-N6), kidney carcinoma (E39) and melanoma (M96) cell lines. *Anticancer Res* 19, 621–624.
- Cavalier-Smith, T., 1999. Principles of Protein and Lipid Targeting in Secondary Symbiogenesis: Euglenoid, Dinoflagellate, and Sporozoan Plastid Origins and the Eukaryote Family Tree 1,2. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 46, 347–366. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1999.tb04614.x>
- Cavalier-Smith, T., 1982. The origins of plastids. *Biological Journal of the Linnean Society* 17, 289–306. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1982.tb02023.x>
- Cavalier-Smith, T., Chao, E.E., Allsopp, M.T.E.P., 1995. Ribosomal RNA Evidence for Chloroplast Loss within Heterokonta: Pedinellid Relationships and a Revised Classification of Ochrostran Algae. *Archiv für Protistenkunde* 145, 209–220. [https://doi.org/10.1016/S0003-9365\(11\)80316-7](https://doi.org/10.1016/S0003-9365(11)80316-7)

- Cerino, F., Bernardi Aubry, F., Coppola, J., La Ferla, R., Maimone, G., Socal, G., Totti, C., 2012. Spatial and temporal variability of pico-, nano- and microphytoplankton in the offshore waters of the southern Adriatic Sea (Mediterranean Sea). *Continental Shelf Research, Southern Adriatic Oceanography* 44, 94–105. <https://doi.org/10.1016/j.csr.2011.06.006>
- Chakraborty, S., Bhattacharya, T., Singh, G., Maity, J.P., 2014. Benthic macroalgae as biological indicators of heavy metal pollution in the marine environments: A biomonitoring approach for pollution assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 100, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.12.003>
- Chan, P.P., Lowe, T.M., 2019. tRNAscan-SE: Searching for tRNA Genes in Genomic Sequences, in: Kollmar, M. (Ed.), *Gene Prediction: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. Springer, New York, NY, pp. 1–14. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9173-0_1
- Chase, J.M., Leibold, M.A., 2009. *Ecological Niches: Linking Classical and Contemporary Approaches, Ecological Niches*. University of Chicago Press. <https://doi.org/10.7208/9780226101811>
- Chepurnov, V.A., Mann, D.G., 2004. Auxosporulation of *Licmophora communis* (Bacillariophyta) and a review of mating systems and sexual reproduction in araphid pennate diatoms. *Phycological Research* 52, 1–12. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1835.2003.00319.x>
- Cho, B., Azam, F., 1990. Biogeochemical significance of bacteria biomass in the ocean's euphotic zone. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 63, 253–259.
- Cho, J.-C., Giovannoni, S.J., 2004. Cultivation and Growth Characteristics of a Diverse Group of Oligotrophic Marine Gammaproteobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 432–440. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.1.432-440.2004>
- Cibic, T., Comici, C., Bussani, A., Del Negro, P., 2012. Benthic diatom response to changing environmental conditions. *Estuarine, Coastal and Shelf Science, Fluctuations and trends in the northern Adriatic marine systems: from annual to decadal variability* 115, 158–169. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2012.03.033>
- Cirri, E., Vyverman, W., Pohnert, G., 2018. Biofilm interactions—bacteria modulate sexual reproduction success of the diatom *Seminavis robusta*. *FEMS Microbiology Ecology* 94. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy161>
- Claquin, P., Probert, I., Lefebvre, S., Veron, B., 2008. Effects of temperature on photosynthetic parameters and TEP production in eight species of marine microalgae. *Aquatic Microbial Ecology* 51, 1–11. <https://doi.org/10.3354/ame01187>
- Cohn, S.A., Weitzell Jr., R.E., 1996. Ecological Considerations of Diatom Cell Motility. I. Characterization of Motility and Adhesion in Four Diatom Species1. *Journal of Phycology* 32, 928–939. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1996.00928.x>
- Cole, J.J., 1982. Interactions Between Bacteria and Algae in Aquatic Ecosystems. *Annual Review of Ecology and Systematics* 13, 291–314.
- Coll, M., Piroddi, C., Steenbeek, J., Kaschner, K., Lasram, F.B.R., Aguzzi, J., Ballesteros, E., Bianchi, C.N., Corbera, J., Dailianis, T., Danovaro, R., Estrada, M., Frogia, C., Galil, B.S., Gasol, J.M., Gertwagen, R., Gil, J., Guilhaumon, F., Kesner-Reyes, K., Kitsos, M.-S., Koukouras, A., Lampadariou, N., Laxamana, E., Cuadra, C.M.L.-F. de la, Lotze, H.K., Martin, D., Mouillot, D., Oro, D., Raicevich, S., Rius-Barile, J., Saiz-Salinas, J.I., Vicente, C.S., Somot, S., Templado, J., Turon, X., Vafidis, D., Villanueva, R., Voultsiadou, E., 2010. The Biodiversity of the Mediterranean Sea: Estimates, Patterns, and Threats. *PLOS ONE* 5, e11842. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011842>
- Connell, S.D., Foster, M.S., Airoidi, L., 2014. What are algal turfs? Towards a better description of turfs. *Marine Ecology Progress Series* 495, 299–307. <https://doi.org/10.3354/meps10513>
- Cooksey, K.E., Wigglesworth-Cooksey, B., 1995. Adhesion of bacteria and diatoms to surfaces in the sea: a review. *Aquatic Microbial Ecology* 9, 87–96. <https://doi.org/10.3354/ame009087>
- Cottrell, M.T., Kirchman, D.L., 2000. Community Composition of Marine Bacterioplankton Determined by 16S rRNA Gene Clone Libraries and Fluorescence In Situ Hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 5116–5122. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.12.5116-5122.2000>

- Crowell, R.M., Nienow, J.A., Cahoon, A.B., 2019. The complete chloroplast and mitochondrial genomes of the diatom *Nitzschia palea* (Bacillariophyceae) demonstrate high sequence similarity to the endosymbiont organelles of the dinotom *Durinskia baltica*. *Journal of Phycology* 55, 352–364. <https://doi.org/10.1111/jpy.12824>
- Dąbek, P., Gastineau, R., Bornman, T.G., Lemieux, C., Turmel, M., Hallegraeff, G., Mouget, J.-L., Witkowski, A., 2022. The blue diatom *Haslea ostrearia* from the Indian Ocean coast of South Africa, with comparative analysis of *Haslea* organellar genomes. *Frontiers in Marine Science* 1838.
- Darriba, D., Posada, D., Kozlov, A.M., Stamatakis, A., Morel, B., Flouri, T., 2020. ModelTest-NG: A New and Scalable Tool for the Selection of DNA and Protein Evolutionary Models. *Molecular Biology and Evolution* 37, 291–294. <https://doi.org/10.1093/molbev/msz189>
- Darwin, C., 1872. *On the Origin of Species by Means of Natural Selection*. (with additions and corrections). John Murray, London, UK.
- Davidovich, N.A., Mouget, J.-L., Gaudin, P., 2009. Heterothallism in the pennate diatom *Haslea ostrearia* (Bacillariophyta). *European Journal of Phycology* 44, 251–261. <https://doi.org/10.1080/09670260802710301>
- Davidovich, O.I., Davidovich, N.A., Mouget, J.-L., 2018. The Effect of Temperature on Vegetative Growth and Sexual Reproduction of Two Diatoms from the Genus *Haslea* Simonsen. *Russ J Mar Biol* 44, 8–13. <https://doi.org/10.1134/S1063074018010030>
- Demoulin, V., Janssen, M.P., Licot, P., 1980. Elaboration of a mapping method for seaweeds. Application to the Calvi area (Corsica). *Lejeunia* (Belgium). no. 102.
- DeSantis, T.Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E.L., Keller, K., Huber, T., Dalevi, D., Hu, P., Andersen, G.L., 2006. Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 5069–5072. <https://doi.org/10.1128/AEM.03006-05>
- Desbois, A.P., Mearns-Spragg, A., Smith, V.J., 2009. A Fatty Acid from the Diatom *Phaeodactylum tricornutum* is Antibacterial Against Diverse Bacteria Including Multi-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Mar Biotechnol* 11, 45–52. <https://doi.org/10.1007/s10126-008-9118-5>
- Diez, I., Secilla, A., Santolaria, A., Gorostiaga Jm, 1999. Structure de la communauté intertidale phytobenthique le long d'un gradient de pollution environnementale.
- Dobretsov, S., Dahms, H.-U., Qian, P.-Y., 2004. Antilarval and antimicrobial activity of waterborne metabolites of the sponge *Callyspongia* (*Euplaccella*) *pulvinata*: evidence of allelopathy. *Marine Ecology Progress Series* 271, 133–146. <https://doi.org/10.3354/meps271133>
- Dobretsov, S., Wahl, M., 2008. Larval recruitment of the blue mussel *Mytilus edulis*: The effect of flow and algae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 355, 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2007.12.018>
- Dorrell, R.G., Liu, F., Bowler, C., 2022. Reconstructing Dynamic Evolutionary Events in Diatom Nuclear and Organelle Genomes, in: Falciatore, A., Mock, T. (Eds.), *The Molecular Life of Diatoms*. Springer International Publishing, Cham, pp. 147–177. https://doi.org/10.1007/978-3-030-92499-7_6
- Douglas, A.E., Werren, J.H., 2016. Holes in the Hologenome: Why Host-Microbe Symbioses Are Not Holobionts. *mBio* 7, e02099. <https://doi.org/10.1128/mBio.02099-15>
- Doyle, J.J., Doyle, J.L. (Eds.), 1990. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19, 11–15.
- Drum, R.W., 1969. Light and Electron Microscope Observations on the Tube-Dwelling Diatom *Amphipleura Rutilans* (trentepohl) Cleve. *Journal of Phycology* 5, 21–26. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1969.tb02570.x>
- Durrett, R., Levin, S., 1997. Allelopathy in Spatially Distributed Populations. *Journal of Theoretical Biology* 185, 165–171. <https://doi.org/10.1006/jtbi.1996.0292>
- Eckman, J.E., 1983. Hydrodynamic processes affecting benthic recruitment1. *Limnology and Oceanography* 28, 241–257. <https://doi.org/10.4319/lo.1983.28.2.0241>

- Edgar, L.A., 1983. Mucilage secretions of moving diatoms. *Protoplasma* 118, 44–48. <https://doi.org/10.1007/BF01284745>
- Eilertsen, H.Chr., Sandberg, S., Tøllefsen, H., 1995. Photoperiodic control of diatom spore growth: a theory to explain the onset of phytoplankton blooms. *Marine Ecology Progress Series* 116, 303–307.
- Ellertsen, H.C., 1993. Spring blooms and stratification. *Nature* 363, 24–24. <https://doi.org/10.1038/363024a0>
- Falaise, C., James, A., Travers, M.-A., Zanella, M., Badawi, M., Mouget, J.-L., 2019. Complex Relationships between the Blue Pigment Marennine and Marine Bacteria of the Genus *Vibrio*. *Marine Drugs* 17, 160. <https://doi.org/10.3390/md17030160>
- Falaise, C., Zebiri, L., Jacqueline, B., Pasetto, P., Mouget, J.-L., 2018. Pigment bleu hydrosoluble de type marennine – *Haslea*. 1872316.
- Federica Cerino, Daniela Fornasaro, Martina Kralj, Michele Giani, Marina Cabrini, 2019. Phytoplankton temporal dynamics in the coastal waters of the north-eastern Adriatic Sea (Mediterranean Sea) from 2010 to 2017. *Nature conservation* 34, 343–372. <https://doi.org/10.3897/natureconservation.34.30720>
- Felsenstein, J., 1985. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution* 39, 783–791. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>
- Fenner, Juliane.M., 2015. Description of a new fossil diatom species, *Haslea antiqua* (Bacillariophyceae), with comments on its valve structure, and habitat. *Nova Hedwigia* 144, 107–124.
- Fiorini, F., Borgonuovo, C., Ferrante, M.I., Brönstrup, M., 2020. A Metabolomics Exploration of the Sexual Phase in the Marine Diatom *Pseudo-nitzschia multistriata*. *Marine Drugs* 18, 313. <https://doi.org/10.3390/md18060313>
- Foster, R.A., Zehr, J.P., 2006. Characterization of diatom–cyanobacteria symbioses on the basis of *nifH*, *hetR* and 16S rRNA sequences. *Environmental Microbiology* 8, 1913–1925. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01068.x>
- Foubert, E.L., Douglas, H.C., 1948. Studies on the Anaerobic Micrococci. *J Bacteriol* 56, 25–34.
- Francezon, N., Herbaut, M., Bardeau, J.-F., Cougnon, C., Bélanger, W., Tremblay, R., Jacqueline, B., Dittmer, J., Pouvreau, J.-B., Mouget, J.-L., Pasetto, P., 2021. Electrochromic Properties and Electrochemical Behavior of Marennine, a Bioactive Blue-Green Pigment Produced by the Marine Diatom *Haslea ostrearia*. *Marine Drugs* 19, 231. <https://doi.org/10.3390/md19040231>
- Fuente, G.D.L., Chiantore, M., Gaino, F., Asnaghi, V., 2018. Ecological status improvement over a decade along the Ligurian coast according to a macroalgae based index (CARLIT). *PLOS ONE* 13, e0206826. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206826>
- Fullgrabe, L., Fontaine, Q., Marengo, M., Donnay, A., Sirjacobs, D., Iborra, L., Cnudde, S., Mellet, N., Seveno, J., Boulenger, A., Lefebvre, L., Binard, M., Katz, L., Abadie, A., Boissery, P., Gobert, S., Lejeune, P., 2022. STARECAPMED (STation of Reference and rEsearch on Change of local and global Anthropogenic Pressures on Mediterranean Ecosystems Drifts) – Année 2021. Rapport de recherche.
- Fullgrabe, L., Grosjean, P., Gobert, S., Lejeune, P., Leduc, M., Engels, G., Dauby, P., Boissery, P., Richir, J., 2020. Zooplankton dynamics in a changing environment: A 13-year survey in the northwestern Mediterranean Sea. *Marine Environmental Research* 159, 104962. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2020.104962>
- Gabed, N., Verret, F., Peticca, A., Kryvoruchko, I., Gastineau, R., Bosson, O., Séveno, J., Davidovich, O., Davidovich, N., Witkowski, A., Kristoffersen, J.B., Benali, A., Ioannou, E., Koutsaviti, A., Roussis, V., Gâteau, H., Phimmaha, S., Leignel, V., Badawi, M., Khiar, F., Francezon, N., Fodil, M., Pasetto, P., Mouget, J.-L., 2022. What Was Old Is New Again: The Pennate Diatom *Haslea ostrearia* (Gaillon) Simonsen in the Multi-Omic Age. *Marine Drugs* 20, 234. <https://doi.org/10.3390/md20040234>
- Gaillon, B., 1820. Des huîtres vertes, et des causes de cette coloration. *J. de Physique, de Chimie, d'histoire Naturelle et des Arts* 91, 222–225.

- Gallagher, J.C., 1980. Population Genetics of *Skeletonema Costatum* (bacillariophyceae) in Narragansett Bay1. *Journal of Phycology* 16, 464–474. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1980.tb03061.x>
- Galland, G.R., Pennebaker, S.L., 2012. A benthic diatom bloom in the Gulf of California, Mexico. *BioInvasions Records* 1, 65–69.
- Gargouch, N., Touchard, R., Marec, H., Luc Mouget, J., Pruvost, J., Massé, A., 2022. Submerged membrane photobioreactor for the cultivation of *Haslea ostrearia* and the continuous extraction of extracellular marennine. *Bioresource Technology* 350, 126922. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.126922>
- Gastineau, R., 2011. Biodiversité, reproduction et phylogénie des diatomées bleues du genre *Haslea* et valorisation de leurs pigments de type marennine (phdthesis). Université du Maine.
- Gastineau, R., Hamedi, C., Baba Hamed, M.B., Abi-Ayad, S.-M.E.-A., Båk, M., Lemieux, C., Turmel, M., Dobosz, S., Wróbel, R.J., Kierzek, A., Lange-Bertalot, H., Witkowski, A., 2021a. Morphological and molecular identification reveals that waters from an isolated oasis in Tamanrasset (extreme South of Algerian Sahara) are colonized by opportunistic and pollution-tolerant diatom species. *Ecological Indicators* 121, 107104. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.107104>
- Gastineau, R., Hansen, G., Poulin, M., Lemieux, C., Turmel, M., Bardeau, J.-F., Leignel, V., Hardivillier, Y., Moraçais, M., Fleurence, J., Gaudin, P., Méléder, V., Cox, E.J., Davidovich, N.A., Davidovich, O.I., Witkowski, A., Kaczmarek, I., Ehrman, J.M., Soler Onís, E., Quintana, A.M., Mucko, M., Mordret, S., Sarno, D., Jacquette, B., Falaise, C., Séveno, J., Lindquist, N.L., Kemp, P.S., Eker-Develi, E., Konucu, M., Mouget, J.-L., 2021b. *Haslea silbo*, A Novel Cosmopolitan Species of Blue Diatoms. *Biology* 10, 328. <https://doi.org/10.3390/biology10040328>
- Gastineau, R., Hardivillier, Y., Leignel, V., Tekaya, N., Moraçais, M., Fleurence, J., Davidovich, N., Jacquette, B., Gaudin, P., Hellio, C., Bourgougnon, N., Mouget, J.-L., 2012a. Greening effect on oysters and biological activities of the blue pigments produced by the diatom *Haslea karadagensis* (Naviculaceae). *Aquaculture* 368–369, 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.09.016>
- Gastineau, R., Li, C., Ashworth, M.P., Witkowski, A., Turmel, M., Górecka, E., Frankovich, T.A., Wachnicka, A., Lobban, C.S., Theriot, E.C., Otis, C., Dąbek, P., Binczewska, A., Lemieux, C., 2022. A New Insight Into *Amicula*, a Genus of Tiny Marine Benthic Diatoms With the Description of Two New Tropical Species and the Largest Mitogenome Known for a Stramenopile. *Frontiers in Marine Science* 9.
- Gastineau, R., Pouvreau, J.-B., Hellio, C., Moraçais, M., Fleurence, J., Gaudin, P., Bourgougnon, N., Mouget, J.-L., 2012b. Biological Activities of Purified Marennine, the Blue Pigment Responsible for the Greening of Oysters. *J. Agric. Food Chem.* 60, 3599–3605. <https://doi.org/10.1021/jf205004x>
- Gastineau, R., Prasetya, F.S., Falaise, C., Cognie, B., Decottignies, P., Moraçais, M., Méléder, V., Davidovich, N., Turcotte, F., Tremblay, R., Pasetto, P., Dittmer, J., Bardeau, J.-F., Pouvreau, J.-B., Mouget, J.-L., 2018. Marennine-Like Pigments: Blue Diatom or Green Oyster Cult?, in: *Blue Biotechnology*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 529–551. <https://doi.org/10.1002/9783527801718.ch16>
- Gastineau, R., Turcotte, F., Pouvreau, J.-B., Moraçais, M., Fleurence, J., Windarto, E., Prasetya, F.S., Arsad, S., Jaouen, P., Babin, M., Coiffard, L., Couteau, C., Bardeau, J.-F., Jacquette, B., Leignel, V., Hardivillier, Y., Marcotte, I., Bourgougnon, N., Tremblay, R., Deschênes, J.-S., Badawy, H., Pasetto, P., Davidovich, N., Hansen, G., Dittmer, J., Mouget, J.-L., 2014. Marennine, Promising Blue Pigments from a Widespread *Haslea* Diatom Species Complex. *Marine Drugs* 12, 3161–3189. <https://doi.org/10.3390/md12063161>
- Gastineau, R., Yilmaz, E., Solak, C.N., Lemieux, C., Turmel, M., Witkowski, A., 2021c. Complete chloroplast genome of the mixotrophic chrysophyte *Poterioochromonas malhamensis* (Ochromonadales, Synurophyceae) from Van Lake in Eastern Anatolia. *Mitochondrial DNA Part B* 6, 2719–2721. <https://doi.org/10.1080/23802359.2021.1923416>

- Gawne, B., Wang, Y., Hoagland, K.D., Gretz, M.R., 1998. Role of bacteria and bacterial exopolymer in the attachment of *acnhanthes longipes* (Bacillariophyceae). *Biofouling* 13, 137–156. <https://doi.org/10.1080/08927019809378377>
- Giri, D.D., Singh, S.K., Giri, A., Dwivedi, H., Kumar, A., 2021. Chapter 17 - Bioremediation potential of methylotrophic bacteria, in: Kumar, A., Singh, V.K., Singh, P., Mishra, V.K. (Eds.), *Microbe Mediated Remediation of Environmental Contaminants*, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. Woodhead Publishing, pp. 199–207. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821199-1.00017-1>
- Goecke, F., Thiel, V., Wiese, J., Labes, A., Imhoff, J.F., 2013a. Algae as an important environment for bacteria – phylogenetic relationships among new bacterial species isolated from algae. *Phycologia* 52, 14–24. <https://doi.org/10.2216/12-24.1>
- Goecke, F., Thiel, V., Wiese, J., Labes, A., Imhoff, J.F., 2013b. Algae as an important environment for bacteria – phylogenetic relationships among new bacterial species isolated from algae. *Phycologia* 52, 14–24. <https://doi.org/10.2216/12-24.1>
- Goffart, A., 1992. Influence des contraintes hydrodynamiques sur la structure des communautés phytoplanctoniques du bassin Liguro-Provençal (secteur Corse).
- Goffart, A., Hecq, J.-H., Legendre, L., 2015. Drivers of the winter–spring phytoplankton bloom in a pristine NW Mediterranean site, the Bay of Calvi (Corsica): A long-term study (1979–2011). *Progress in Oceanography* 137, 121–139. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2015.05.027>
- Goldman, N., Paddock, T.B.B., Shaw, K.M., 1990. Quantitative Analysis of Shape Variation in Populations of *Surirella Fastuosa*. *Diatom Research* 5, 25–42. <https://doi.org/10.1080/0269249X.1990.9705090>
- Gordon, D., Abajian, C., Green, P., 1998. Consed: A Graphical Tool for Sequence Finishing. *Genome Res.* 8, 195–202. <https://doi.org/10.1101/gr.8.3.195>
- Gordon, J., Knowlton, N., Relman, D.A., Rohwer, F., Youle, M., 2013. Superorganisms and holobionts. *Microbe* 8, 152–153. <https://doi.org/10.1128/microbe.8.152.1>
- Górecka, E., Gastineau, R., Davidovich, N.A., Davidovich, O.I., Ashworth, M.P., Sabir, J.S.M., Lemieux, C., Turmel, M., Witkowski, A., 2021. Mitochondrial and Plastid Genomes of the Monoraphid Diatom *Schizostauron trachyderma*. *International Journal of Molecular Sciences* 22, 11139. <https://doi.org/10.3390/ijms222011139>
- Gould, S.B., Waller, R.F., McFadden, G.I., 2008. Plastid evolution. *Annu Rev Plant Biol* 59, 491–517. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092915>
- Gouletquer, P., 1997. Valorisation des claires ostréicoles. Dynamique des populations microalgales et prolifération d'*Haslea ostrearia* dans l'écosystème Claires ostréicoles . Projet d'étude.Phase II.
- Granhag, L., Finlay, J., Jonsson, P., Callow, J., Callow, M., 2004. Roughness-dependent Removal of Settled Spores of the Green Alga *Ulva* (syn. *Enteromorpha*) Exposed to Hydrodynamic Forces from a Water Jet. *Biofouling* 20, 117–122. <https://doi.org/10.1080/08927010410001715482>
- Grasshoff, K., Kremling, K., Ehrhardt, M., 1999. *Methods of seawater analysis* 3rd edn. Verlag Chemie.
- Greiner, S., Lehwark, P., Bock, R., 2019. OrganellarGenomeDRAW (OGDRAW) version 1.3.1: expanded toolkit for the graphical visualization of organellar genomes. *Nucleic Acids Res* 47, W59–W64. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz238>
- Grelon, M., 1978. *Saintonge, Pays des Huitres Vertes* (La Rochelle, France: Rupella).
- Guiry, M.D., 2012. How Many Species of Algae Are There? *Journal of Phycology* 48, 1057–1063. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2012.01222.x>
- Guiry, M.D., Guiry, G.M., 2022. *Haslea Simonsen, 1974*, AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <https://www.algaebase.org>.
- Hafner, D., Jasprica, N., Carić, M., 2013. Epiphytic diatoms on *Nymphaea alba* L. leaves in a Sub-Mediterranean wetland (South Bosnia and Herzegovina). *Natura Croatica : Periodicum Musei Historiae Naturalis Croatici* 22, 319–331.
- Hallegraeff, G.M., 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia* 32, 79–99. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-32-2-79.1>

- Han, B.-C., Hung, T.-C., 1990. Green oysters caused by copper pollution on the Taiwan coast. *Environmental Pollution* 65, 347–362. [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(90\)90126-W](https://doi.org/10.1016/0269-7491(90)90126-W)
- Hasle, G.R., 1960. The annual phytoplankton cycle at Drobak, Oslofjord. *Nytt. Mag. Bot.* 8, 53–75.
- Hassler, C.S., Schoemann, V., Nichols, C.M., Butler, E.C.V., Boyd, P.W., 2011. Saccharides enhance iron bioavailability to Southern Ocean phytoplankton. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 1076–1081. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010963108>
- Hégaret, H., Shumway, S.E., Wikfors, G.H., Pate, S., Burkholder, J.M., 2008. Potential transport of harmful algae via relocation of bivalve molluscs. *Marine Ecology Progress Series* 361, 169–179. <https://doi.org/10.3354/meps07375>
- Helton, R.R., Wang, K., Kan, J., Powell, D.H., Wommack, K.E., 2012. Interannual dynamics of viriobenthos abundance and morphological diversity in Chesapeake Bay sediments. *FEMS Microbiology Ecology* 79, 474–486. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01238.x>
- Helton, R.R., Wommack, K.E., 2009. Seasonal Dynamics and Metagenomic Characterization of Estuarine Viriobenthos Assemblages by Randomly Amplified Polymorphic DNA PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 2259–2265. <https://doi.org/10.1128/AEM.02551-08>
- Hilt, S., 2006. Allelopathic inhibition of epiphytes by submerged macrophytes. *Aquatic Botany* 85, 252–256. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2006.05.004>
- Hoagland, K.D., Rosowski, J.R., Gretz, M.R., Roemer, S.C., 1993. Diatom Extracellular Polymeric Substances: Function, Fine Structure, Chemistry, and Physiology. *Journal of Phycology* 29, 537–566. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1993.00537.x>
- Hoffmann, L., Billard, C., Janssens, M., Leruth, M., Demoulin, V., 2000. Mass Development of Marine Benthic Sarcinochrysidales (Chrysophyceae s.l.) in Corsica 43, 223–231. <https://doi.org/10.1515/BOT.2000.024>
- Holm-Hansen, O., Lorenzen, C.J., Holmes, R.W., Strickland, J.D.H., 1965. Fluorometric Determination of Chlorophyll. *ICES Journal of Marine Science* 30, 3–15. <https://doi.org/10.1093/icesjms/30.1.3>
- Hutchinson, G.E., 1961. The Paradox of the Plankton. *The American Naturalist* 95, 137–145. <https://doi.org/10.1086/282171>
- Ismail, A., Ktari, L., Ahmed, M., Bolhuis, H., Boudabbous, A., Stal, L.J., Cretoiu, M.S., El Bour, M., 2016. Antimicrobial Activities of Bacteria Associated with the Brown Alga *Padina pavonica*. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01072>
- Ivančič, I., Degobbis, D., 1984. An optimal manual procedure for ammonia analysis in natural waters by the indophenol blue method. *Water Research* 18, 1143–1147. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(84\)90230-6](https://doi.org/10.1016/0043-1354(84)90230-6)
- Ivanov, S.E., Belyakov, A.V., 2008. Diatomite and its applications. *Glass & Ceramics* 65.
- Jensen, P.E., Gilpin, M., Knoetzel, J., Scheller, H.V., 2000. The PSI-K Subunit of Photosystem I Is Involved in the Interaction between Light-harvesting Complex I and the Photosystem I Reaction Center Core *. *Journal of Biological Chemistry* 275, 24701–24708. <https://doi.org/10.1074/jbc.M000550200>
- John, J., 2015. *A beginner's guide to diatoms.*, Gantner. ed.
- Jona Lasinio, G., Tullio, M.A., Ventura, D., Ardizzone, G., Abdelahad, N., 2017. Statistical analysis of the distribution of infralittoral *Cystoseira* populations on pristine coasts of four Tyrrhenian islands: Proposed adjustment to the CARLIT index. *Ecological Indicators* 73, 293–301. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.09.038>
- Jyrkänkallio-Mikkola, J., Heino, J., Soininen, J., 2016. Beta diversity of stream diatoms at two hierarchical spatial scales: implications for biomonitoring. *Freshwater Biology* 61, 239–250. <https://doi.org/10.1111/fwb.12697>
- Kamikawa, R., Azuma, T., Ishii, K., Matsuno, Y., Miyashita, H., 2018. Diversity of Organellar Genomes in Non-photosynthetic Diatoms. *Protist* 169, 351–361. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2018.04.009>

- Kamp, A., de Beer, D., Nitsch, J.L., Lavik, G., Stief, P., 2011. Diatoms respire nitrate to survive dark and anoxic conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 5649–5654. <https://doi.org/10.1073/pnas.1015744108>
- Kemp, S., 1997. Green gill clam: The mystery shucked oper. *World aquaculture*.
- Koch, A.L., 2001. Oligotrophs versus copiotrophs. *BioEssays* 23, 657–661. <https://doi.org/10.1002/bies.1091>
- Koedooder, C., Stock, W., Willems, A., Mangelinckx, S., De Troch, M., Vyverman, W., Sabbe, K., 2019. Diatom-Bacteria Interactions Modulate the Composition and Productivity of Benthic Diatom Biofilms. *Frontiers in Microbiology* 10.
- Kooistra, W.H.C.F., De Stefano, M., Mann, D.G., Medlin, K., 2003. The Phylogeny of the Diatoms, in: Müller, W.E.G. (Ed.), *Silicon Biomineralization: Biology — Biochemistry — Molecular Biology — Biotechnology*, Progress in Molecular and Subcellular Biology. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 59–97. https://doi.org/10.1007/978-3-642-55486-5_3
- Kooistra, W.H.C.F., Gersonde, R., Medlin, L.K., Mann, D.G., 2007. CHAPTER 11 - The Origin and Evolution of the Diatoms: Their Adaptation to a Planktonic Existence, in: Falkowski, P.G., Knoll, A.H. (Eds.), *Evolution of Primary Producers in the Sea*. Academic Press, Burlington, pp. 207–249. <https://doi.org/10.1016/B978-012370518-1/50012-6>
- Krause, J.W., Schulz, I.K., Rowe, K.A., Dobbins, W., Winding, M.H.S., Sejr, M.K., Duarte, C.M., Agustí, S., 2019. Silicic acid limitation drives bloom termination and potential carbon sequestration in an Arctic bloom. *Sci Rep* 9, 8149. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44587-4>
- Kroth, P.G., Chiovitti, A., Gruber, A., Martin-Jezequel, V., Mock, T., Parker, M.S., Stanley, M.S., Kaplan, A., Caron, L., Weber, T., Maheswari, U., Armbrust, E.V., Bowler, C., 2008. A Model for Carbohydrate Metabolism in the Diatom *Phaeodactylum tricornutum* Deduced from Comparative Whole Genome Analysis. *PLOS ONE* 3, e1426. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001426>
- Kuczynska, P., Jemiola-Rzeminska, M., Strzalka, K., 2015. Photosynthetic Pigments in Diatoms. *Marine Drugs* 13, 5847–5881. <https://doi.org/10.3390/md13095847>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Nnyaz, C., Tamura, K., 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol* 35, 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Lachnit, T., Meske, D., Wahl, M., Harder, T., Schmitz, R., 2011. Epibacterial community patterns on marine macroalgae are host-specific but temporally variable. *Environmental Microbiology* 13, 655–665. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02371.x>
- Landa, M., Blain, S., Christaki, U., Monchy, S., Obernosterer, I., 2016. Shifts in bacterial community composition associated with increased carbon cycling in a mosaic of phytoplankton blooms. *ISME J* 10, 39–50. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.105>
- Lankester, E.R., 1886. On green oysters. *Q J Microsc Sci* 26, 71–94.
- Lawson, L.A., Atkinson, C.L., Jackson, C.R., 2022. The gut bacterial microbiome of the Threeridge mussel, *Amblyma plicata*, varies between rivers but shows a consistent core community. *Freshwater Biology* 67, 1125–1136. <https://doi.org/10.1111/fwb.13905>
- Legendre, P., Gallagher, E.D., 2001. Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. *Oecologia* 129, 271–280. <https://doi.org/10.1007/s004420100716>
- Lépinay, A., Capioux, H., Turpin, V., Mondeguer, F., Lebeau, T., 2016. Bacterial community structure of the marine diatom *Haslea ostrearia*. *Algal Research* 16, 418–426. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.04.011>
- Lewin, J.C., 1961. The dissolution of silica from diatom walls. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 21, 182–198. [https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(61\)80054-9](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(61)80054-9)
- Li, Y., Chen, X., Sun, Z., Xu, K., 2017. Taxonomy and molecular phylogeny of three marine benthic species of *Haslea* (Bacillariophyceae), with transfer of two species to *Navicula*. *Diatom Research* 32, 451–463. <https://doi.org/10.1080/0269249X.2017.1401008>
- Lipkin, Y., 1975. *Halophila stipulacea*, a review of a successful immigration. *Aquatic Botany* 1, 203–215. [https://doi.org/10.1016/0304-3770\(75\)90023-6](https://doi.org/10.1016/0304-3770(75)90023-6)

- Littler, M.M., Murray, S.N., 1975. Impact of sewage on the distribution, abundance and community structure of rocky intertidal macro-organisms. *Marine Biology* 30, 277–291. <https://doi.org/10.1007/BF00390633>
- Lobban, C.S., Perez, C.O., Ashworth, M.P., 2020. Non-blue *Haslea* species (Bacillariophyceae: Naviculaceae) in the benthic marine flora of Guam (Mariana Islands, Western Pacific Ocean). *Diatom Research* 35, 163–183. <https://doi.org/10.1080/0269249X.2020.1761887>
- Loir, M., Novarino, G., 2016. *Diatom Monographs, Volume 16: Marine Mastogloia Thwaites ex W. Sm. and Stigmaphora Wallich Species from the French Lesser Antilles.*
- Lommer, M., Roy, A.-S., Schilhabel, M., Schreiber, S., Rosenstiel, P., LaRoche, J., 2010. Recent transfer of an iron-regulated gene from the plastid to the nuclear genome in an oceanic diatom adapted to chronic iron limitation. *BMC Genomics* 11, 718. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-718>
- Lowe, R., 1974. Environmental requirements and pollution tolerance of freshwater diatoms, National Environmental Research Center, Office of Research and Development, US Environmental Protection Agency. ed.
- Lozupone, C., Knight, R., 2005. UniFrac: a New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 8228–8235. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8228-8235.2005>
- Lozupone, C.A., Hamady, M., Kelley, S.T., Knight, R., 2007. Quantitative and Qualitative β Diversity Measures Lead to Different Insights into Factors That Structure Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 1576–1585. <https://doi.org/10.1128/AEM.01996-06>
- Lunetta, P., Penttilä, A., Hällfors, G., 1998. Scanning and transmission electron microscopical evidence of the capacity of diatoms to penetrate the alveolo-capillary barrier in drowning. *Int J Legal Med* 111, 229–237. <https://doi.org/10.1007/s004140050159>
- Macdonald, J.D., 1869. I.—On the structure of the Diatomaceous frustule, and its genetic cycle. *Annals and Magazine of Natural History* 3, 1–8. <https://doi.org/10.1080/00222936908695866>
- MacIntyre, H.L., Geider, R.J., Miller, D.C., 1996. Microphytobenthos: The ecological role of the “secret garden” of unvegetated, shallow-water marine habitats. I. Distribution, abundance and primary production. *Estuaries* 19, 186–201. <https://doi.org/10.2307/1352224>
- Majewska, R., D’Alelio, D., De Stefano, M., 2014. *Cocconeis Ehrenberg* (Bacillariophyta), a genus dominating diatom communities associated with *Posidonia oceanica* Delile (monocotyledons) in the Mediterranean Sea. *Aquatic Botany* 112, 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2013.07.008>
- Mann, D.G., 1989. The diatom genus *Sellaphora*: Separation from *Navicula*. *British Phycological Journal* 24, 1–20. <https://doi.org/10.1080/00071618900650011>
- Mann, D.G., Vanormelingen, P., 2013. An Inordinate Fondness? The Number, Distributions, and Origins of Diatom Species. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 60, 414–420. <https://doi.org/10.1111/jeu.12047>
- Mann, K.H., Lazier, J.R.N., 1996. *Dynamics of Marine Ecosystems: Biological-Physical Interactions in the Oceans.* John Wiley & Sons.
- Marshall, K.C., Stout, R., Mitchell, R., 1971. Mechanism of the Initial Events in the Sorption of Marine Bacteria to Surfaces. *Microbiology* 68, 337–348. <https://doi.org/10.1099/00221287-68-3-337>
- Martineau, C., Villeneuve, C., Mauffrey, F., Villemur, R. 2013, 2013. *Hyphomicrobium nitratorans* sp. nov., isolated from the biofilm of a methanol-fed denitrification system treating seawater at the Montreal Biodome. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2, 3777–3781. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.048124-0>
- Mayr, E., 1976. Species Concepts and Definitions. *Topics in the Philosophy of Biology* 353–371. https://doi.org/10.1007/978-94-010-1829-6_16
- McFadden, G.I., 2001. Primary and Secondary Endosymbiosis and the Origin of Plastids. *Journal of Phycology* 37, 951–959. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2001.01126.x>
- Medlin, L.K., 2018. Mini review: Diatom species as seen through a molecular window. *Braz. J. Bot* 41, 457–469. <https://doi.org/10.1007/s40415-018-0444-1>

- Medlin, L.K., 2016. Evolution of the diatoms: major steps in their evolution and a review of the supporting molecular and morphological evidence. *Phycologia* 55, 79–103. <https://doi.org/10.2216/15-105.1>
- Medlin, L.K., 1983. Community analysis of epiphytic diatoms from selected species of macroalgae collected along the Texas coast of the Gulf of Mexico. Texas A&M University.
- Medlin, L.K., Fryxell, G.A., 1984. Structure, Life History and Systematics of *Rhoicosphenia* (bacillariophyta). Iv. Correlation of Size Reduction with Changes in Valve Morphology of *Rh. Genuflexa*1. *Journal of Phycology* 20, 101–108. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1984.00101.x>
- Meinesz, A., Hesse, B., 1991. Introduction et invasion de l'algue tropicale *Caulerpa taxifolia* en Méditerranée nord-occidentale. *Oceanologica Acta* 14, 415–426.
- Melo, L.F., Bott, T.R., 1997. Biofouling in water systems. *Experimental Thermal and Fluid Science* 14, 375–381. [https://doi.org/10.1016/S0894-1777\(96\)00139-2](https://doi.org/10.1016/S0894-1777(96)00139-2)
- Menesguen, A., Aminot, A., Belin, C., Chapelle, A., Guillaud, J.-F., Joanny, M., Lefebvre, A., Merceron, M., Piriou, J.-Y., Souchu, P., 2001. L'eutrophisation des eaux marines et saumâtres en Europe, en particulier en France.
- Minh, B., Trifinopoulos, J., Schrepf, D., Schmidt, H.A., Lanfear, R., 2020. IQ-TREE version 2.0: tutorials and Manual Phylogenomic software by maximum likelihood. University of Vienna 134.
- Mitchell, P.H., Barney, R.L., 1917. The occurrence in Virginia of green-gilled oysters similar to those of Marennes. Govt. print. off.
- Moeys, S., Frenkel, J., Lembke, C., Gillard, J.T.F., Devos, V., Van den Berge, K., Bouillon, B., Huysman, M.J.J., De Decker, S., Scharf, J., Bones, A., Brembu, T., Winge, P., Sabbe, K., Vuylsteke, M., Clement, L., De Veylder, L., Pohnert, G., Vyverman, W., 2016. A sex-inducing pheromone triggers cell cycle arrest and mate attraction in the diatom *Seminavis robusta*. *Sci Rep* 6, 19252. <https://doi.org/10.1038/srep19252>
- Molino, P.J., Wetherbee, R., 2008. The biology of biofouling diatoms and their role in the development of microbial slimes. *Biofouling* 24, 365–379. <https://doi.org/10.1080/08927010802254583>
- Mondeguer, F., Lepinay, A., Capiiaux, H., Turpin, V., Baron, R., Hess, P., Lebeau, T., Boug, 2016. First metabolomic approach of the epiphytic bacteria-marine diatom *Haslea ostrearia* relationships. Presented at the OCEANEXT, Interdisciplinary Conference. 8-10 juin 2016, Nantes, France.
- Moran, N.A., Sloan, D.B., 2015. The Hologenome Concept: Helpful or Hollow? *PLOS Biology* 13, e1002311. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002311>
- Moreau, J., 1970. Contribution aux recherches écologiques sur les claires à huîtres du bassin de Marennes-Oléron. *Revue des travaux de l'Institut des pêches maritimes* 34, 381–466.
- Morel, F.M.M., Price, N.M., 2003. The Biogeochemical Cycles of Trace Metals in the Oceans. *Science* 300, 944–947. <https://doi.org/10.1126/science.1083545>
- Mouget, J.-L., Gastineau, R., Davidovich, O., Gaudin, P., Davidovich, N.A., 2009. Light is a key factor in triggering sexual reproduction in the pennate diatom *Haslea ostrearia*. *FEMS Microbiol Ecol* 69, 194–201. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00700.x>
- Mouget, J.-L., Rosa, P., Tremblin, G., 2004. Acclimation of *Haslea ostrearia* to light of different spectral qualities - confirmation of "chromatic adaptation" in diatoms. *J Photochem Photobiol B* 75, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2004.04.002>
- Mouget, J.-L., Rosa, P., Vachoux, C., Tremblin, G., 2005. Enhancement of marennine production by blue light in the diatom *Haslea ostrearia*. *J Appl Phycol* 17, 437–445. <https://doi.org/10.1007/s10811-005-0561-7>
- Mouget, J.-L., Tremblin, G., Morant-Manceau, A., Moranchais, M., Robert, J.-M., 1999. Long-term photoacclimation of *Haslea ostrearia* (Bacillariophyta): effect of irradiance on growth rates, pigment content and photosynthesis. *European Journal of Phycology* 34, 109–115. <https://doi.org/10.1080/09670269910001736162>
- Muñoz-Gómez, S.A., Mejía-Franco, F.G., Durnin, K., Colp, M., Grisdale, C.J., Archibald, J.M., Slamovits, C.H., 2017. The New Red Algal Subphylum Proteorhodophytina Comprises the Largest and

- Most Divergent Plastid Genomes Known. *Current Biology* 27, 1677-1684.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.04.054>
- Myers, J.L., Sekar, R., Richardson, L.L., 2007. Molecular Detection and Ecological Significance of the Cyanobacterial Genera *Geitlerinema* and *Leptolyngbya* in Black Band Disease of Corals. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 5173–5182. <https://doi.org/10.1128/AEM.00900-07>
- Nagasaki, K., Tomaru, Y., Katanozaka, N., Shirai, Y., Nishida, K., Itakura, S., Yamaguchi, M., 2004. Isolation and Characterization of a Novel Single-Stranded RNA Virus Infecting the Bloom-Forming Diatom *Rhizosolenia setigera*. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 704–711. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.2.704-711.2004>
- Nassiri, Y., Robert, J.-M., Rincé, Y., Ginsburger-Vogel, T., 1998. The cytoplasmic fine structure of the diatom *Haslea ostrearia* (Bacillariophyceae) in relation to marennine production. *Phycologia* 37, 84–91. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-37-2-84.1>
- Navarro, N., Micheli, C.J., Navarro, A.O., 2000. Benthic diatoms of Mona Island (Isla de Mona), Puerto Rico. *Acta Cient.* 14, 103–143.
- Needham, D.M., Fuhrman, J.A., 2016. Pronounced daily succession of phytoplankton, archaea and bacteria following a spring bloom. *Nat Microbiol* 1, 1–7. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.5>
- Nelson, D.M., Tréguer, P., 1992. Role of silicon as a limiting nutrient to Antarctic diatoms: evidence from kinetic studies in the Ross Sea ice-edge zone. *Marine Ecology Progress Series* 80, 255–264.
- Nelson, D.M., Tréguer, P., Brzezinski, M.A., Leynaert, A., Quéguiner, B., 1995a. Production and dissolution of biogenic silica in the ocean: Revised global estimates, comparison with regional data and relationship to biogenic sedimentation. *Global Biogeochemical Cycles* 9, 359–372. <https://doi.org/10.1029/95GB01070>
- Nelson, D.M., Tréguer, P., Brzezinski, M.A., Leynaert, A., Quéguiner, B., 1995b. Production and dissolution of biogenic silica in the ocean: Revised global estimates, comparison with regional data and relationship to biogenic sedimentation. *Global Biogeochemical Cycles* 9, 359–372. <https://doi.org/10.1029/95GB01070>
- Nenadović, T., Šarčević, T., Čižmek, H., Godrijan, J., Marić Pfannkuchen, D., Pfannkuchen, M., Ljubešić, Z., 2015. Development of periphytic diatoms on different artificial substrates in the Eastern Adriatic Sea. *Acta Botanica Croatica* 74, 377–392. <https://doi.org/10.1515/botcro-2015-0026>
- Neumann-Spallart, C., Brandtner, M., Kraus, M., Jakowitsch, J., Bayer, M.G., Maier, T.L., Schenk, H.E., Löffelhardt, W., 1990. The *petFI* gene encoding ferredoxin I is located close to the *str* operon on the cyanelle genome of *Cyanophora paradoxa*. *FEBS Lett* 268, 55–58. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)80971-k](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)80971-k)
- Neuville, D., Daste, P., 1978. Recherches sur le déterminisme de la production de marennine par la Diatomée marine *Navicula ostrearia* (Gaillon) Bory en culture in vitro. *Rev. Gen. Bot.* 85, 255–303.
- Neuville, D., Daste, P., 1975. Observations préliminaires concernant l'auxosporulation chez la diatomée *Navicula ostrearia* (Gaillon) Bory en culture in vitro.
- Neuville, D., Daste, P., 1972. Production de pigment bleu par la diatomée *Navicula ostrearia* (Gaillon) Bory maintenue en culture uni-algale sur un milieu synthétique carencé en azote nitrique. *C R Acad Sci Paris* 274, 2030–2033.
- Newsome, A.G., Culver, C.A., van Breemen, R.B., 2014. Nature's Palette: The Search for Natural Blue Colorants. *J. Agric. Food Chem.* 62, 6498–6511. <https://doi.org/10.1021/jf501419q>
- Nghiem Xuan, R., Mouget, J.L., Turpin, V., Jaouen, P., Pruvost, J., 2021. Optimization of the growth and marennine production by the diatom *Haslea ostrearia* in photobioreactor. *Algal Research* 55, 102251. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102251>
- Nghiem Xuan, R., Safitri, I., Mouget, J.L., Pruvost, J., Turpin, V., Jaouen, P., 2020. Design of an artificial culture medium to optimize *Haslea ostrearia* biomass and marennine production. *Algal Research* 45, 101653. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101653>

- Nikolić, V., Žuljević, A., Mangialajo, L., Antolić, B., Kušpilić, G., Ballesteros, E., 2013. Cartography of littoral rocky-shore communities (CARLIT) as a tool for ecological quality assessment of coastal waters in the Eastern Adriatic Sea. *Ecological Indicators* 34, 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2013.04.021>
- Ni-Ni-Win, Hanyuda, T., Draisma, S.G.A., Furnari, G., Meinesz, A., Kawai, H., 2011. *Padina ditristromatica* sp. nov. and *Padina pavonicoides* sp. nov. (Dictyotales, Phaeophyceae), two new species from the Mediterranean Sea based on morphological and molecular markers. *European Journal of Phycology* 46, 327–341. <https://doi.org/10.1080/09670262.2011.614355>
- Ohwada, K., Taga, N., 1972. Distribution and seasonal variation of vitamin B12, thiamine and biotin in the sea. *Marine Chemistry* 1, 61–73. [https://doi.org/10.1016/0304-4203\(72\)90007-2](https://doi.org/10.1016/0304-4203(72)90007-2)
- Olli, K., Clarke, A., Danielsson, Å., Aigars, J., Conley, D.J., Tamminen, T., 2008. Diatom stratigraphy and long-term dissolved silica concentrations in the Baltic Sea. *Journal of Marine Systems, Silicon and the Baltic Sea* 73, 284–299. <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2007.04.009>
- Paasche, E., 1973. Silicon and the ecology of marine plankton diatoms. I. *Thalassiosira pseudonana* (*Cyclotella nana*) grown in a chemostat with silicate as limiting nutrient. *Marine Biology* 19, 117–126. <https://doi.org/10.1007/BF00353582>
- Paerl, H.W., Hall, N.S., Calandrino, E.S., 2011. Controlling harmful cyanobacterial blooms in a world experiencing anthropogenic and climatic-induced change. *Science of The Total Environment* 409, 1739–1745. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.02.001>
- Paerl, H.W., Pinckney, J.L., 1996. A mini-review of microbial consortia: Their roles in aquatic production and biogeochemical cycling. *Microb Ecol* 31, 225–247. <https://doi.org/10.1007/BF00171569>
- Paix, B., Vieira, C., Potin, P., Leblanc, C., De Clerck, O., Briand, J.-F., Culioli, G., 2021. French Mediterranean and Atlantic populations of the brown algal genus *Taonia* (Dictyotales) display differences in phylogeny, surface metabolomes and epibacterial communities. *Algal Research* 59, 102452. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102452>
- Paling, E.I., McComb, A.J., 2000. Autumn biomass, below-ground productivity, rhizome growth at bed edge and nitrogen content in seagrasses from Western Australia. *Aquatic Botany* 67, 207–219. [https://doi.org/10.1016/S0304-3770\(00\)00092-9](https://doi.org/10.1016/S0304-3770(00)00092-9)
- Palińska, K.A., Surosz, W., 2018. A blue-pigmented hasleoid diatom, *Haslea* sp., from the Adriatic Sea. *Oceanological and Hydrobiological Studies* 47, 60–66. <https://doi.org/10.1515/ohs-2018-0007>
- Palladino, G., Rampelli, S., Scicchitano, D., Musella, M., Quero, G.M., Prada, F., Mancuso, A., Seyfarth, A.M., Turrone, S., Candela, M., Biagi, E., 2021. Impact of Marine Aquaculture on the Microbiome Associated with Nearby Holobionts: The Case of *Patella caerulea* Living in Proximity of Sea Bream Aquaculture Cages. *Microorganisms* 9, 455. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020455>
- Pangestuti, R., Kim, S.-K., 2011. Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae. *Journal of Functional Foods* 3, 255–266. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.07.001>
- Parker, M.S., Mock, T., Armbrust, E.V., 2008. Genomic Insights into Marine Microalgae. *Annual Review of Genetics* 42, 619–645. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.42.110807.091417>
- Paul, C., Pohnert, G., 2011. Interactions of the Algicidal Bacterium *Kordia algicida* with Diatoms: Regulated Protease Excretion for Specific Algal Lysis. *PLoS One* 6, e21032. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021032>
- Peoples, M.B., Craswell, E.T., 1992. Biological nitrogen fixation: Investments, expectations and actual contributions to agriculture. *Plant Soil* 141, 13–39. <https://doi.org/10.1007/BF00011308>
- Percopo, I., Siano, R., Cerino, F., Sarno, D., Zingone, A., 2011. Phytoplankton diversity during the spring bloom in the northwestern Mediterranean Sea 54, 243–267. <https://doi.org/10.1515/bot.2011.033>
- Pérez-Burillo, J., Valoti, G., Witkowski, A., Prado, P., Mann, D.G., Trobajo, R., 2022. Assessment of marine benthic diatom communities: insights from a combined morphological–metabarcoding approach in Mediterranean shallow coastal waters. *Marine Pollution Bulletin* 174, 113183. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.113183>

- Perkins, R.G., Mouget, J.-L., Lefebvre, S., Lavaud, J., 2006. Light response curve methodology and possible implications in the application of chlorophyll fluorescence to benthic diatoms. *Mar Biol* 149, 703–712. <https://doi.org/10.1007/s00227-005-0222-z>
- Petersen, J., 1914. “Grüne Austern” in Dänemark in 1911—1912. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie* 7, 39–41. <https://doi.org/10.1002/iroh.19140070103>
- Pezzolesi, L., Accoroni, S., Rindi, F., Samori, C., Totti, C., Pistocchi, R., 2021. Survey of the allelopathic potential of Mediterranean macroalgae: production of long-chain polyunsaturated aldehydes (PUAs). *Phytochemistry* 189, 112826. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112826>
- Piazzini, L., Ceccherelli, G., 2017. Concomitance of oligotrophy and low grazing pressure is essential for the resilience of Mediterranean subtidal forests. *Marine Pollution Bulletin* 123, 197–204. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.08.061>
- Ploug, H., Stolte, W., Epping, E.H.G., Jørgensen, B.B., 1999. Diffusive boundary layers, photosynthesis, and respiration of the colony-forming plankton algae, *Phaeocystis* sp. *Limnology and Oceanography* 44, 1949–1958. <https://doi.org/10.4319/lo.1999.44.8.1949>
- Poulin, M., Massé, G., Belt, S.T., Delavault, P., Rousseau, F., Robert, J.-M., Rowland, S.J., 2004. Morphological, biochemical and molecular evidence for the transfer of *Gyrodinium aureolum* Meister to the genus *Haslea* (Bacillariophyta). *European Journal of Phycology* 39, 181–195. <https://doi.org/10.1080/0967026042000202136>
- Poulsen, N., Davutoglu, M.G., Zackova Suchanova, J., 2022. Diatom Adhesion and Motility, in: Falciatore, A., Mock, T. (Eds.), *The Molecular Life of Diatoms*. Springer International Publishing, Cham, pp. 367–393. https://doi.org/10.1007/978-3-030-92499-7_14
- Poulsen, N.C., Spector, I., Spurck, T.P., Schultz, T.F., Wetherbee, R., 1999. Diatom gliding is the result of an actin-myosin motility system. *Cell Motility* 44, 23–33. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0169\(199909\)44:1<23::AID-CM2>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0169(199909)44:1<23::AID-CM2>3.0.CO;2-D)
- Pouvreau, J.-B., Housson, E., Tallec, L.L., Morançais, M., Rincé, Y., Fleurence, J., Pondaven, P., 2007a. Growth inhibition of several marine diatom species induced by the shading effect and allelopathic activity of marennine, a blue-green polyphenolic pigment of the diatom *Haslea ostrearia* (Gaillon/Bory) Simonsen. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 352, 212–225. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2007.07.011>
- Pouvreau, J.-B., Michèle Morançais, Taran, F., Rosa, P., Laurent Dufossé, Fabienne Guérard, Pin, S., Fleurence, J., Pondaven, P., 2008. Antioxidant and Free Radical Scavenging Properties of Marennine, a Blue-Green Polyphenolic Pigment from the Diatom *Haslea ostrearia* (Gaillon/Bory) Simonsen Responsible for the Natural Greening of Cultured Oysters. *J. Agric. Food Chem.* 56, 6278–6286. <https://doi.org/10.1021/jf073187n>
- Pouvreau, J.-B., Morançais, M., Fleurence, J., Pondaven, P., 2007b. Method for the quantification of the blue-green pigment “marennine” synthesized by the marine diatom *Haslea ostrearia* (Gaillon/Bory) Simonsen using HPLC gel-filtration and photodiode-array detection. *J Appl Phycol* 19, 263–270. <https://doi.org/10.1007/s10811-006-9133-8>
- Pouvreau, J.-B., Morançais, M., Fleury, F., Rosa, P., Thion, L., Cahingt, B., Zal, F., Fleurence, J., Pondaven, P., 2006. Preliminary characterisation of the blue-green pigment “marennine” from the marine tythropelagic diatom *Haslea ostrearia* (Gaillon/Bory) Simonsen. *J Appl Phycol* 18, 757–767. <https://doi.org/10.1007/s10811-006-9087-x>
- Prasetya, F.S., Foret, M., Deschênes, J.-S., Gastineau, R., Mouget, J.-L., Tremblay, R., 2022. Semi-continuous system for benthic diatom cultivation and marennine production. *Algal Research* 62, 102633. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102633>
- Prasetya, F.S., Gastineau, R., Poulin, M., Lemieux, C., Turmel, M., Syakti, A.D., Hardivillier, Y., Widowati, I., Risjani, Y., Iskandar, I., Subroto, T., Falaise, C., Arsad, S., Safitri, I., Mouget, J.-L., Leignel, V., 2019. *Haslea nusantara* (Bacillariophyceae), a new blue diatom from the Java Sea, Indonesia: morphology, biometry and molecular characterization. *Plant Ecology and Evolution* 152, 188–202. <https://doi.org/10.5091/plecevo.2019.1623>
- Prasetya, F.S., Safitri, I., Widowati, I., Cognie, B., Decottignies, P., Gastineau, R., Morançais, M., Windarto, E., Tremblay, R., Mouget, J.-L., 2016. Does allelopathy affect co-culturing *Haslea*

- ostrearia with other microalgae relevant to aquaculture? *J Appl Phycol* 28, 2241–2254. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0779-y>
- Prasetya, F.S., Sunarto, S., Bachtiar, E., Agung, M.U.K., Nathanael, B., Pambudi, A.C., Lestari, A.D., Astuty, S., Mouget, J.-L., 2020. Effect of the blue pigment produced by the tropical diatom *Haslea nusantara* on marine organisms from different trophic levels and its bioactivity. *Aquaculture Reports* 17, 100389. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100389>
- Prentice, C., Farquhar, G., Fasham, M., Goulden, M., Heimann, M., Jaramillo, V., Kheshgi, H., Le Quere, C., Scholes, R., Wallace, D., 2001. The carbon cycle and atmospheric CO₂, in: Houghton, J., Yihui, D. (Eds.), *Climate Change: The Scientific Basis, The Contribution of WGI of the IPCC to the IPCC Third Assessment Report (TAR)*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 183–237.
- Quaiser, A., López-García, P., Zivanovic, Y., Henn, M.R., Rodriguez-Valera, F., Moreira, D., 2008. Comparative analysis of genome fragments of Acidobacteria from deep Mediterranean plankton. *Environmental Microbiology* 10, 2704–2717. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01691.x>
- Rabosky, D.L., Sorhannus, U., 2009. Diversity dynamics of marine planktonic diatoms across the Cenozoic. *Nature* 457, 183–186. <https://doi.org/10.1038/nature07435>
- Ramm, G., 1977. Structure of epiphytic diatom populations of the phytal of the Kiel Bight (western Baltic).
- Ranson, G., 1927. L'Absorption de matières organiques dissoutes par la surface expérieure du corps chez les animaux aquatiques., . Blondel La Rougery. ed.
- Rao, T.S., 2010. Comparative effect of temperature on biofilm formation in natural and modified marine environment. *Aquat Ecol* 44, 463–478. <https://doi.org/10.1007/s10452-009-9304-1>
- Raven, J.A., Waite, A.M., 2004. The evolution of silicification in diatoms: inescapable sinking and sinking as escape? *New Phytologist* 162, 45–61. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01022.x>
- Rech, M., Mouget, J.-L., Morant-Manceau, A., Philippe, R., Tremblin, G., 2005. Long-term acclimation to UV radiation: effects on growth, photosynthesis and carbonic anhydrase activity in marine diatoms. *Botanica Marina* 48, 407–420. <https://doi.org/10.1515/bot.2005.054>
- Rees, T.A.V., Syrett, P.J., 1979. The uptake of urea by the diatom, *Phaeodactylum*. *New Phytologist* - Wiley Online Library.
- Ribeiro, L., Benyoucef, I., Poulin, M., Jesus, B., Rosa, P., Méléder, V., Du, G., Barillé, L., 2021. Spatio-temporal variation of microphytobenthos biomass, diversity and assemblage structure in the Loire Estuary, France. *Aquatic Microbial Ecology* 87, 61–77. <https://doi.org/10.3354/ame01971>
- Ribeiro, L., Brotas, V., Rincé, Y., Jesus, B., 2013. Structure and diversity of intertidal benthic diatom assemblages in contrasting shores: a case study from the Tagus estuary1. *Journal of Phycology* 49, 258–270. <https://doi.org/10.1111/jpy.12031>
- Ricel, E., 1984. Chemical nature of allelopathic agents. *Allelopathy*.
- Richardson, L.L., Stolzenbach, K.D., 1995. Phytoplankton cell size and the development of microenvironments. *FEMS Microbiology Ecology* 16, 185–191. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1995.tb00282.x>
- Richir, J., Abadie, A., Binard, M., Biondo, R., Boissery, P., Borges, A., Cimiterra, N., Collignon, A., Champenois, W., Donnay, A., Fréjefond, C., Gobert, S., Goffart, A., Hecq, J.-H., Lepoint, G., Pelaprat, C., Pere, A., Sirjacobs, D., Thomé, J.-P., Volpon, A., Lejeune, P., 2015. STARECAPMED (STATION of Reference and rEsearch on Change of local and global Anthropogenic Pressures on Mediterranean Ecosystems Drifts) - Année 2014. Rapport de recherches.
- Rivkin, R.B., 1986. Radioisotopic Method for Measuring Cell Division Rates of Individual Species of Diatoms from Natural Populations †. *Applied and Environmental Microbiology* 51, 769–775. <https://doi.org/10.1128/aem.51.4.769-775.1986>
- Robert, J.-M., 1983. Fertilité des eaux des claires ostréicoles et verdissement: utilisation de l'azote par les diatomées dominantes (Doctoral dissertation).
- Rosenberg, E., Zilber-Rosenberg, I., 2018. The hologenome concept of evolution after 10 years. *Microbiome* 6, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0457-9>

- Rosenberg, E., Zilber-Rosenberg, I., 2016. Microbes Drive Evolution of Animals and Plants: the Hologenome Concept. *mBio* 7, e01395-15. <https://doi.org/10.1128/mBio.01395-15>
- Rosowski, J.R., Hoagland, K.D., Aloï, J.E., 1986. Chapter 17 Structural Morphology of Diatom-Dominated Stream Biofilm Communities Under the Impact of Soil Erosion, in: Evans, L.V., Hoagland, K.D. (Eds.), *Studies in Environmental Science, Algal Biofouling*. Elsevier, pp. 247–299. [https://doi.org/10.1016/S0166-1116\(08\)72183-6](https://doi.org/10.1016/S0166-1116(08)72183-6)
- Rothpletz, A., 1900. Ueber einen neuen jurassischen Hornschwamm und die darin eingeschlossenen Diatomeen. *Zeitschrift der Deutschen Geologischen Gesellschaft* 154–160.
- Rothpletz, A., 1896. Ueber die Flysch-Fucoiden und einige andere fossile Algen, sowie über liasische, Diatomeen führende Hornschwämme. *Zeitschrift der Deutschen Geologischen Gesellschaft* 854–914.
- Round, F.E., Crawford, R.M., Mann, D.G., 1990. *Diatoms: Biology and Morphology of the Genera*. Cambridge University Press.
- Roy, A.-S., Woehle, C., LaRoche, J., 2020. The Transfer of the Ferredoxin Gene From the Chloroplast to the Nuclear Genome Is Ancient Within the Paraphyletic Genus *Thalassiosira*. *Frontiers in Microbiology* 11.
- Rynearson, T.A., Armbrust, E.V., 2005. Maintenance of clonal diversity during a spring bloom of the centric diatom *Ditylum brightwellii*. *Molecular Ecology* 14, 1631–1640. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02526.x>
- Rynearson, T.A., Newton, J.A., Armbrust, E.V., 2006. Spring bloom development, genetic variation, and population succession in the planktonic diatom *Ditylum brightwellii*. *Limnology and Oceanography* 51, 1249–1261. <https://doi.org/10.4319/lo.2006.51.3.1249>
- Sabbe, K., Vyverman, W., Ector, L., Wetzel, C.E., John, J., Hodgson, D.A., Verleyen, E., Van de Vijver, B., 2019. On the identity of *Navicula gottlandica* (Bacillariophyta), with the description of two new species *Navicula eileencoxiana* and *Navicula bergstromiana* from the Australo-Pacific region. *Plant Ecology and Evolution* 152, 313–326. <https://doi.org/10.5091/plecevo.2019.1607>
- Salleh, S., McMinn, A., 2011. The Effects of Temperature on the Photosynthetic Parameters and Recovery of Two Temperate Benthic Microalgae, *Amphora* Cf. *Coffeaeformis* and *Cocconeis* Cf. *Sublittoralis* (bacillariophyceae)1. *Journal of Phycology* 47, 1413–1424. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2011.01079.x>
- Sañudo-Wilhelmy, S.A., Cutter, L.S., Durazo, R., Smail, E.A., Gómez-Consarnau, L., Webb, E.A., Prokopenko, M.G., Berelson, W.M., Karl, D.M., 2012. Multiple B-vitamin depletion in large areas of the coastal ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 14041–14045. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208755109>
- Sarthou, G., Timmermans, K.R., Blain, S., Tréguer, P., 2005. Growth physiology and fate of diatoms in the ocean: a review. *Journal of Sea Research, Iron Resources and Oceanic Nutrients - Advancement of Global Environmental Simulations* 53, 25–42. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2004.01.007>
- Sauer, J., Wenderoth, K., Maier, U.G., Rhiel, E., 2002. Effects of Salinity, Light and Time on the Vertical Migration of Diatom Assemblages. *Diatom Research* 17, 189–203. <https://doi.org/10.1080/0269249X.2002.9705538>
- Sauvageau, C., 1906. À propos du “*Colpomenia sinuosa*” signalé dans les huîtres de la rivière de Vannes. À propos de la présence de la diatomée bleue dans la Méditerranée.
- Scalco, E., Stec, K., Iudicone, D., Ferrante, M.I., Montresor, M., 2014. The dynamics of sexual phase in the marine diatom *Pseudo-nitzschia multistriata* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology* 50, 817–828. <https://doi.org/10.1111/jpy.12225>
- Scarsini, M., Marchand, J., Manoylov, K.M., Schoefs, B., 2019. Photosynthesis in Diatoms, in: *Diatoms: Fundamentals and Applications*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 191–211. <https://doi.org/10.1002/9781119370741.ch8>
- Scholin, C.A., Gulland, F., Doucette, G.J., Benson, S., Busman, M., Chavez, F.P., Cordaro, J., DeLong, R., De Vogelaere, A., Harvey, J., Haulena, M., Lefebvre, K., Lipscomb, T., Loscutoff, S., Lowenstine, L.J., Marin III, R., Miller, P.E., McLellan, W.A., Moeller, P.D.R., Powell, C.L., Rowles, T., Silvagni,

- P., Silver, M., Spraker, T., Trainer, V., Van Dolah, F.M., 2000. Mortality of sea lions along the central California coast linked to a toxic diatom bloom. *Nature* 403, 80–84. <https://doi.org/10.1038/47481>
- Schrader, H., Gersonde, R., 1978. Diatoms and silicoflagellates. In Zachariasse et al. Microplaeontological counting methods and techniques - an exercise on an eight metres section of the lower Pliocene of Capo Rossello. Sicily. *Utrecht Micropal. Bull.* 17: 129–176.
- Secq, M.-P.O.-L., Goër, S.L., Stam, W.T., Olsen, J.L., 2006. Complete mitochondrial genomes of the three brown algae (Heterokonta: Phaeophyceae) *Dictyota dichotoma*, *Fucus vesiculosus* and *Desmarestia viridis*. *Curr Genet* 49, 47–58. <https://doi.org/10.1007/s00294-005-0031-4>
- Secq, M.-P.O.-L., Green, B.R., 2011. Complex repeat structures and novel features in the mitochondrial genomes of the diatoms *Phaeodactylum tricornutum* and *Thalassiosira pseudonana*. *Gene* 476, 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.02.001>
- Sfriso, A., Facca, C., 2011. Macrophytes in the anthropic constructions of the Venice littorals and their ecological assessment by an integration of the “CARLIT” index. *Ecological Indicators* 11, 772–781. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2010.10.002>
- Shannon, C.E., 1948. A mathematical theory of communication. *The Bell System Technical Journal* 27, 379–423. <https://doi.org/10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x>
- Sharma, V., McKone, H.T., Markow, P.G., 2011. A Global Perspective on the History, Use, and Identification of Synthetic Food Dyes. *J. Chem. Educ.* 88, 24–28. <https://doi.org/10.1021/ed100545v>
- Sheehan, C.E., Baker, K.G., Nielsen, D.A., Petrou, K., 2020. Temperatures above thermal optimum reduce cell growth and silica production while increasing cell volume and protein content in the diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Hydrobiologia* 847, 4233–4248. <https://doi.org/10.1007/s10750-020-04408-6>
- Shibl, A., Isaac, A., Ochsenkühn, M., Cárdenas, A., Fei, C., Behringer, G., Arnoux, M., Drou, N., Santos, M., Gunsalus, K., Voolstra, C., Amin, S., 2020. Diatom Modulation of Microbial Consortia Through Use of Two Unique Secondary Metabolite. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1101/2020.06.11.144840>
- Short, F.T., Burdick, D.M., Kaldy III, J.E., 1995. Mesocosm experiments quantify the effects of eutrophication on eelgrass, *Zostera marina*. *Limnology and Oceanography* 40, 740–749. <https://doi.org/10.4319/lo.1995.40.4.0740>
- Sieburth, J.McN., Thomas, C.D., 1973. Fouling on Eelgrass (*Zostera Marina* L.)1. *Journal of Phycology* 9, 46–50. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1973.00046.x>
- Siever, R., 1992. The silica cycle in the Precambrian. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 56, 3265–3272. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(92\)90303-Z](https://doi.org/10.1016/0016-7037(92)90303-Z)
- Silva, P.C., 2008. Historical Review of Attempts to Decrease Subjectivity in Species Identification, with Particular Regard to Algae. *Protist* 159, 153–161. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2007.10.001>
- Simonsen, R., 1974. The diatom plankton of the Indian Ocean expedition of R/V “Meteor” 1964-1965. *Forschungsergebnisse, Reihe D: Biologie* 19, 1–107.
- Sims, P.A., Mann, D.G., Medlin, L.K., 2006. Evolution of the diatoms: insights from fossil, biological and molecular data. *Phycologia* 45, 361–402. <https://doi.org/10.2216/05-22.1>
- Skliris, N., Goffart, A., Hecq, J., Djenidi, S., 2001. Shelf-slope exchanges associated with a steep submarine canyon off Calvi (Corsica, NW Mediterranean Sea): A modeling approach. <https://doi.org/10.1029/2000JC000534>
- Smetacek, V., 2012. Making sense of ocean biota: How evolution and biodiversity of land organisms differ from that of the plankton. *J Biosci* 37, 589–607. <https://doi.org/10.1007/s12038-012-9240-4>
- Snoeijs, P., 1994. Distribution of Epiphytic Diatom Species Composition, Diversity and Biomass on Different Macroalgal Hosts Along Seasonal and Salinity Gradients in the Baltic Sea. *Diatom Research* 9, 189–211. <https://doi.org/10.1080/0269249X.1994.9705296>

- Sobotka, R., Esson, H.J., Koník, P., Trsková, E., Moravcová, L., Horák, A., Dufková, P., Oborník, M., 2017. Extensive gain and loss of photosystem I subunits in chromerid algae, photosynthetic relatives of apicomplexans. *Sci Rep* 7, 13214. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13575-x>
- Solano, C., Echeverz, M., Lasa, I., 2014. Biofilm dispersion and quorum sensing. *Current Opinion in Microbiology, Cell regulation* 18, 96–104. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.02.008>
- Somerfield, P.J., Clarke, K.R., Warwick, R.M., 2008. Simpson Index, in: Jørgensen, S.E., Fath, B.D. (Eds.), *Encyclopedia of Ecology*. Academic Press, Oxford, pp. 3252–3255. <https://doi.org/10.1016/B978-008045405-4.00133-6>
- Sonoike, K., Hatanaka, H., Katoh, S., 1993. Small subunits of Photosystem I reaction center complexes from *Synechococcus elongatus*. II. The *psaE* gene product has a role to promote interaction between the terminal electron acceptor and ferredoxin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1141, 52–57. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(93\)90188-L](https://doi.org/10.1016/0005-2728(93)90188-L)
- Sprat, T., 1669. The history of the generation and ordering of green oysters, commonly called Colchester oysters. *The history of the Royal-Society of London, for the Improving of natural knowledge*. The Royal Society, London, 307319.
- Stahl, W., Sies, H., 2005. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, Carotenoids and Dietary Lipids* 1740, 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2004.12.006>
- Steinman, A.D., McIntire, C.D., Gregory, S.V., Lamberti, G.A., 1989. Effects of Irradiance and Grazing on Lotic Algal Assemblages1. *Journal of Phycology* 25, 478–485. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1989.tb00253.x>
- Sterrenburg, F.A.S., Tiffany, M.A., Hinz, F., Herwig, W.E., Hargraves, P.E., 2015. Seven new species expand the morphological spectrum of *Haslea*. A comparison with *Gyrosigma* and *Pleurosigma* (Bacillariophyta). *Phytotaxa* 207, 143–162. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.207.2.1>
- Streftaris, N., Papathanassiou, A.Z. & E., 2005. Globalisation in Marine Ecosystems: The Story of Non-Indigenous Marine Species Across European Seas, in: *Oceanography and Marine Biology*. CRC Press.
- Strickland, J.D.H., Parsons, T.R., 1972. *A Practical Handbook of Seawater Analysis*, 2nd edition. <https://doi.org/10.25607/OBP-1791>
- Talgatti, D., Sar, E.A., Carvalho Torgan, L., 2014. *Haslea sigma* (Naviculaceae, Bacillariophyta) a newsigmoid benthic species from salt marshes of Southern Brazil. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.177.4.4>
- Teeling, H., Fuchs, B.M., Becher, D., Klockow, C., Gardebrecht, A., Bennke, C.M., Kassabgy, M., Huang, S., Mann, A.J., Waldmann, J., Weber, M., Klindworth, A., Otto, A., Lange, J., Bernhardt, J., Reinsch, C., Hecker, M., Peplies, J., Bockelmann, F.D., Callies, U., Gerdts, G., Wichels, A., Wiltshire, K.H., Glöckner, F.O., Schweder, T., Amann, R., 2012. Substrate-Controlled Succession of Marine Bacterioplankton Populations Induced by a Phytoplankton Bloom. *Science* 336, 608–611. <https://doi.org/10.1126/science.1218344>
- Tesson, S.V.M., Legrand, C., van Oosterhout, C., Montresor, M., Kooistra, W.H.C.F., Procaccini, G., 2013. Mendelian Inheritance Pattern and High Mutation Rates of Microsatellite Alleles in the Diatom *Pseudo-nitzschia multistriata*. *Protist* 164, 89–100. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2012.07.001>
- Thingstad, T.F., 2000. Elements of a theory for the mechanisms controlling abundance, diversity, and biogeochemical role of lytic bacterial viruses in aquatic systems. *Limnology and Oceanography* 45, 1320–1328. <https://doi.org/10.4319/lo.2000.45.6.1320>
- Thomas, L.C., Nandan, S.B., Padmakumar, K.B., 2022. First Report on the Bloom of Diatom *Haslea Gretharum* Simonsen, 1974 from the Arabian Sea. *Thalassas* 38, 527–534. <https://doi.org/10.1007/s41208-021-00369-2>
- Thornton, D.C.O., 2002. Diatom aggregation in the sea: mechanisms and ecological implications. *European Journal of Phycology* 37, 149–161. <https://doi.org/10.1017/S0967026202003657>

- Tomaru, Y., Takao, Y., Suzuki, H., Nagumo, T., Nagasaki, K., 2009. Isolation and Characterization of a Single-Stranded RNA Virus Infecting the Bloom-Forming Diatom *Chaetoceros socialis*. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 2375–2381. <https://doi.org/10.1128/AEM.02580-08>
- Tortonese, E., 1985. Distribution and Ecology of Endemic Elements in the Mediterranean Fauna (Fishes and Echinoderms), in: Moraitou-Apostolopoulou, M., Kiortsis, V. (Eds.), *Mediterranean Marine Ecosystems*, NATO Conference Series. Springer US, Boston, MA, pp. 57–83. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-2248-9_4
- Tréguer, P., Nelson, D.M., Bennekom, A.J.V., DeMaster, D.J., Leynaert, A., Quéguiner, B., 1995. The Silica Balance in the World Ocean: A Reestimate. *Science* 268, 375–379. <https://doi.org/10.1126/science.268.5209.375>
- Tréguer, P.J., De La Rocha, C.L., 2013. The World Ocean Silica Cycle. *Annual Review of Marine Science* 5, 477–501. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-121211-172346>
- Tremblin, G., Cannuel, R., Mouget, J.-L., Rech, M., Robert, J.-M., 2000. Change in light quality due to a blue-green pigment, marennine, released in oyster-ponds: effect on growth and photosynthesis in two diatoms, *Haslea ostrearia* and *Skeletonema costatum*. *Journal of Applied Phycology* 12, 557–566. <https://doi.org/10.1023/A:1026502713075>
- Tsolcha, O.N., Tekerlekopoulou, A.G., Akratos, C.S., Antonopoulou, G., Aggelis, G., Genitsaris, S., Moustaka-Gouni, M., Vayenas, D.V., 2018. A *Leptolyngbya*-based microbial consortium for agro-industrial wastewaters treatment and biodiesel production. *Environ Sci Pollut Res* 25, 17957–17966. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1989-z>
- Tuji, A., 2000. Observation of developmental processes in loosely attached diatom (Bacillariophyceae) communities. *Phycological Research* 48, 75–84. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1835.2000.00188.x>
- Turmel, M., Otis, C., Lemieux, C., 2017. Divergent copies of the large inverted repeat in the chloroplast genomes of ulvophycean green algae. *Sci Rep* 7, 994. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01144-1>
- Turpin, V., 1999. Etude des événements physicochimiques et biologiques présidant à la prolifération d'*Haslea ostrearia* (Simonsen) dans les claires ostréicoles de la région de Marennes-Oléron: implications dans la maîtrise du verdissement. (PhD Thesis). University of Nantes (Brittany, France).
- Turpin, V., Robert, J.-M., Gouletquer, P., 1999. Limiting nutrients of oyster pond seawaters in the Marennes-Oléron region for *Haslea ostrearia*: applications to the mass production of the diatom in mesocosm experiments. *Aquatic Living Resources* 12, 335–342. [https://doi.org/10.1016/S0990-7440\(99\)00114-X](https://doi.org/10.1016/S0990-7440(99)00114-X)
- Turpin, V., Robert, J.-M., Gouletquer, P., Massé, G., Rosa, P., 2001. Oyster greening by outdoor mass culture of the diatom *Haslea ostrearia* Simonsen in enriched seawater. *Aquaculture Research* 32, 801–809. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2001.00615.x>
- Underwood, G.J.C., Kromkamp, J., 1999. Primary production by phytoplankton and microphytobenthos in estuaries. *Advances in Ecological Research*. [https://doi.org/10.1016/S0065-2504\(08\)60192-0](https://doi.org/10.1016/S0065-2504(08)60192-0)
- Underwood, G.J.C., Smith, D.J., 1998. Predicting Epipellic Diatom Exopolymer Concentrations in Intertidal Sediments from Sediment Chlorophyll a. *Microb Ecol* 35, 116–125. <https://doi.org/10.1007/s002489900066>
- Vadeboncoeur, Y., Moore, M.V., Stewart, S.D., Chandra, S., Atkins, K.S., Baron, J.S., Bouma-Gregson, K., Brothers, S., Francoeur, S.N., Genzoli, L., Higgins, S.N., Hilt, S., Katona, L.R., Kelly, D., Oleksy, I.A., Ozersky, T., Power, M.E., Roberts, D., Smits, A.P., Timoshkin, O., Tromboni, F., Zanden, M.J.V., Volkova, E.A., Waters, S., Wood, S.A., Yamamuro, M., 2021. Blue Waters, Green Bottoms: Benthic Filamentous Algal Blooms Are an Emerging Threat to Clear Lakes Worldwide. *BioScience* 71, 1011–1027. <https://doi.org/10.1093/biosci/biab049>
- Van der Grinten, E., Janssen, A.P.H.M., de Mutsert, K., Barranguet, C., Admiraal, W., 2005. Temperature- and Light-Dependent Performance of the Cyanobacterium *Leptolyngbya*

- Foveolarum and the Diatom *Nitzschia Perminuta* in Mixed Biofilms. *Hydrobiologia* 548, 267–278. <https://doi.org/10.1007/s10750-005-5324-6>
- Vanellander, B., Paul, C., Grueneberg, J., Prince, E.K., Gillard, J., Sabbe, K., Pohnert, G., Vyverman, W., 2012. Daily bursts of biogenic cyanogen bromide (BrCN) control biofilm formation around a marine benthic diatom. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 2412–2417. <https://doi.org/10.1073/pnas.1108062109>
- Villareal, T.A., Pilskaln, C., Brzezinski, M., Lipschultz, F., Dennett, M., Gardner, G.B., 1999. Upward transport of oceanic nitrate by migrating diatom mats. *Nature* 397, 423–425. <https://doi.org/10.1038/17103>
- Vincent, F., Bowler, C., 2022. An Integrated View of Diatom Interactions. *The Molecular Life of Diatoms*. Springer 59–86.
- Volk, T., Hoffert, M.I., 1985. Ocean Carbon Pumps: Analysis of Relative Strengths and Efficiencies in Ocean-Driven Atmospheric CO₂ Changes, in: *The Carbon Cycle and Atmospheric CO₂: Natural Variations Archean to Present*. American Geophysical Union (AGU), pp. 99–110. <https://doi.org/10.1029/GM032p0099>
- Waters, C.M., Bassler, B.L., 2005. QUORUM SENSING: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 21, 319–346. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131001>
- Welschmeyer, N.A., 1994. Fluorometric analysis of chlorophyll a in the presence of chlorophyll b and pheopigments. *Limnology and Oceanography* 39, 1985–1992. <https://doi.org/10.4319/lo.1994.39.8.1985>
- Wetherbee, R., Lind, J.L., Burke, J., Quatrano, R.S., 1998. Minireview—the First Kiss: Establishment and Control of Initial Adhesion by Raphid Diatoms. *Journal of Phycology* 34, 9–15. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.1998.340009.x>
- Witkowski, A., Lange-Bertalot, H., Metzeltin, D., 2000a. *Iconographia Diatomologica, Diatom Flora of Marine Coasts*, I. Ruggell, Liechtenstein: AR Gantner Verlag.
- Witkowski, A., Lange-Bertalot, H., Metzeltin, D., 2000b. *Diatom Flora of marine coast*,. A. R. G. Gantner Verlag.
- Witkowski, A., Sullivan, M.J., Bogaczewicz-Adamczak, B., Bąk, M., Rhiel, E., Ribeiro, L., Richard, P., 2012. Morphology and distribution of a little known but widespread diatom (Bacillariophyceae), *Navicula spartinetensis* Sullivan et Reimer. *Diatom Research* 27, 43–51. <https://doi.org/10.1080/0269249X.2011.647772>
- Wotton, R.S., 2004. The essential role of exopolymers (EPS) in aquatic systems. *Oceanography and marine biology: an annual review* 42, 57–94.
- Wraige, E.J., Belt, S.T., Lewis, C.A., Cooke, D.A., Robert J.-M., Masse, G., Rowland, S.J., 1997. Variations in structures and distributions of C₂₅ highly branched isoprenoid (HBI) alkenes in cultures of the diatom, *Haslea ostrearia* (Simonsen). *Organic Geochemistry* 27.
- Yang, C., Song, G., Zhu, Q., Liu, S., Xia, C., 2016. The influence of bacterial quorum-sensing inhibitors against the formation of the diatom-biofilm. *Chemistry and Ecology* 32, 169–181. <https://doi.org/10.1080/02757540.2015.1120722>
- Yu, M., Ashworth, M.P., Hajrah, N.H., Khiyami, M.A., Sabir, M.J., Alhebshi, A.M., Al-Malki, A.L., Sabir, J.S.M., Theriot, E.C., Jansen, R.K., 2018. Chapter Five - Evolution of the Plastid Genomes in Diatoms, in: Chaw, S.-M., Jansen, R.K. (Eds.), *Advances in Botanical Research, Plastid Genome Evolution*. Academic Press, pp. 129–155. <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2017.11.009>
- Zhang, H., Wang, K., Shen, L., Chen, H., Hou, F., Zhou, X., Zhang, D., Zhu, X., 2018. Microbial Community Dynamics and Assembly Follow Trajectories of an Early-Spring Diatom Bloom in a Semienclosed Bay. *Applied and Environmental Microbiology* 84, e01000-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.01000-18>
- Zhao, J., Snyder, W.B., Mühlenhoff, U., Rhiel, E., Warren, P.V., Golbeck, J.H., Bryant, D.A., 1993. Cloning and characterization of the *psaE* gene of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002: characterization of a *psaE* mutant and overproduction of the protein in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 9, 183–194. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01680.x>

Zingone, A., Casotti, R., d'Alcalà, M.R., Scardi, M., Marino, D., 1995. 'St Martin's Summer': the case of an autumn phytoplankton bloom in the Gulf of Naples (Mediterranean Sea). *Journal of Plankton Research* 17, 575–593. <https://doi.org/10.1093/plankt/17.3.575>

Annexe 1 : Protocole d'extraction des ADN totaux au CTAB

Tampon CTAB (pour 100 mL)

- CTAB 2g/100 mL
- NaCl 1,4M
- EDTA pH8 20 mM
- Tris HCl pH 8 100 mM
- 0,2 mL de β -mercaptoethanol

A partir de l'échantillons broyé ajouter 600 μ L de tampon CTAB + 0,2 % de β -mercaptoethanol puis 20 μ L protéinase K (10 mg/ μ L)

Incuber 30 min à 65 °C

Ajouter 600 μ L de chloroforme/isoamylalcool 94/4

Agiter 2 min

Centrifuger 10 min à 15000g

Garder la phase aqueuse

} X2

Ajouter 30 μ L d'acétate de sodium (3 M) et 1,3 mL d'éthanol 100 %, Agiter

Laisser la nuit à -20 °C ou 30 min à -80 °C

Centrifuger 10 min à 15000 g à 4°C

Laver 2 fois avec 205 μ L d'éthanol 70 %

Sécher le culot

Reprendre dans 10 μ L d'eau nuclease-free

Titre : Déterminisme des blooms d'*Haslea* en environnement naturel

Mots clés : bloom, diatomée, *Haslea*, dynamique, impact

Résumé : Les blooms benthiques d'*Haslea* bleues sont connus depuis le 17^{ème} siècle dans les bassins ostréicoles, le long de la côte nord-ouest de l'Atlantique en Europe. L'espèce emblématique *Haslea ostrearia* (Gaillon) Simonsen, produit la marennine, un pigment bleu soluble dans l'eau. Les pigments de type marennine ont des propriétés allélopathiques, antioxydantes, antivirales et anti-bactériennes, qui ont été démontrées en conditions de laboratoire. La marennine est également responsable du verdissement des huîtres de la région de Marennes Oléron (France), un phénomène qui a des valeurs économiques et patrimoniales. Jusqu'à présent, la dynamique et l'impact de ces blooms d'*Haslea* n'avaient pas été étudiés en environnements ouverts. Des blooms ont cependant été régulièrement observés dans des environnements naturels, comme par exemple, en baie de Calvi, observé depuis le printemps depuis 1996. Ces blooms ont également été vus en été en Croatie.

Cette thèse étudie dans un premier temps les paramètres environnementaux initiant et impactant ces blooms d'*Haslea*. Ainsi, il a été mis en évidence un lien entre la fin des blooms planctoniques printaniers et le début des blooms benthiques d'*Haslea*. La température semble avoir un impact négatif sur la dynamique du bloom. Dans un second temps, l'impact de ces blooms sur les diatomées et bactéries habitant le biofilm sous-jacent a été étudié. Ces blooms n'ont pas d'impacts négatifs sur leur environnement, il n'y a pas eu de changement important des communautés. Cette étude a également permis de décrire de nouvelles espèces d'*Haslea* non-bleues en se basant sur une étude taxonomique morphologique et moléculaire. Ce travail de thèse a permis d'améliorer les connaissances sur le genre *Haslea* et plus généralement sur les dynamiques des blooms de diatomées.

Title: Determinism of blue *Haslea* blooms in natural environments.

Keywords : bloom, diatom, *Haslea*, dynamic, impact

Abstract: Benthic blooms of blue *Haslea* have been known since the 17th century in oyster ponds along the northwest Atlantic coast in Europe. The emblematic species *Haslea ostrearia* (Gaillon) Simonsen produces marennine, a water - soluble blue pigment. Other species of blue *Haslea* produce marennine - like pigments, which have allelopathic, antioxidant, antiviral and antibacterial properties, as demonstrated in laboratory conditions. Marennine is also responsible for the greening of oysters in the Marennes Oléron region (France), a phenomenon that has economic and patrimonial values. Until now, the dynamics and impacts of blue *Haslea* blooms had not been studied in open environments. Blooms have however been regularly observed in natural environments, as for example, in Spring in the bay of Calvi since 1996. These blooms have also been observed in Summer in

Croatia. This thesis is the first study of the environmental parameters initiating and impacting *Haslea* blooms. A correlation has been observed between the beginning of *Haslea* benthic blooms, which follow the spring planktonic blooms. The temperature seems to have a negative impact on the bloom dynamics. The impacts of these blooms on the diatoms and bacteria inhabiting the underlying biofilm have also been investigated. These blooms have no negative impacts on their environment with no significant change in the communities observed. This study also allowed describing new species of non-blue *Haslea* based on a morphological and molecular taxonomic study.

This thesis work has improved the knowledge on the genus *Haslea* and more generally on the dynamics of diatom blooms.