



Mohamed LAABIR (MC, UM2)
Estelle Masseret (MC, UM2)
Philippe Cecchi (CR, IRD)
Micheline GRIGNON-DUBOIS
(DR, CNRS)

Rapport d'activités ECOLAGUNES SUDOE INTERREG IV B Mars-Septembre 2010



Photo : Lyse Bérard-Therriault

Lagunaires UMR 5119
Laboratoire PhytoValBio,

Notre action se situe au niveau du GT5 Mise en évidence de substances allélopathiques produites par les plantes marines et les algues, limitant le développement du micro phytoplancton toxique, *Alexandrium catenella*

– Prélèvement d'échantillons de plantes marines *Zostera marina* et de *Zostera noltii* (lagune de Thau et bassin d'Arcachon) et de la macroalgue *Ulva lactuca* (lagune de Thau)

– Préparation d'extraits aqueux et méthanoliques à partir des échantillons de zostères récoltés sur tous les sites d'expérimentation :

– Etude de l'effet de substances allélopathiques produites par les plantes marines et les algues sur le développement du micro phytoplancton toxique *Alexandrium catenella*. Evaluation des extraits obtenus pour leur potentiel comme inhibiteur de la croissance et de l'activité photosynthétique d'*Alexandrium catenella*. Etude des processus physiologiques et cellulaires pouvant être affectés par les molécules allélochimique.

-Etude de l'effet de la macroalgue *Ulva lactuca* sur la croissance de plusieurs espèces microphytoplanctoniques

- Actions dans le cadre du GT1 : gestion administrative.

Les participants à cet axe de recherche sont :

Personnel permanent :

Mohamed LAABIR, Maître de conférences Université Montpellier II

Estelle Masseret, Maître de conférences Université Montpellier II

Micheline Grignon Dubois, Directeur de recherche au CNRS

Philippe Cecchi, Chargé de recherches à Insitut de Recherche pour le Développement

Fabien de Rieuvilleneuve, Technicien Université de Montpellier II

Trois étudiants ont participé aux différentes expérimentations :

Carla Di Santo , stage de DUT Université Montpellier II

Dounia Kheroufi, Stage de Master I, BIMP, BGAE, Montpellier 2

Jordan Miroir, Master 1, Université Blaise Pascal

Chloé Bernard, Stage PIFE STE3 Université Montpellier 2

Valorisation

Présentation d'un poster au congrès Ecologie organisé à Montpellier du 4 au 6 septembre 2010 (pdf mis dans l'application)

Ce travail a donné lieu à une publication en préparation devant être soumise en novembre 2010

Allelopathic effect of *Zostera noltii* and *Zostera marina* on the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*.

Mohamed Laabir^a, Micheline Grignon-Dubois^b, Philippe Cecchi, Bernadette Rezzonico^b, Manuel Rouquette^a, Fabien Rieuvilleuneuve^a and Estelle Masseret^a

a.UMR 5119 UM2-CNRS-IFREMER-IRD Ecosystèmes Lagunaires, Université Montpellier 2, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 05, France.

b.Phytochimie et Valorisation de la Biomasse (PhyValBio), Université Bordeaux I, 351, cours de la Libération, 33405 Talence cedex, France.

Abstract

Algicidal effects of several concentrations of both aqueous and methanolic extracts from two seagrass species (*Zostera marina* and *Zostera noltii*) on the red tide microalga *Alexandrium catenella* were evaluated. Extracts were obtained from detrital and fresh leaves of the two *Zostera* species collected from Arcachon bay and Thau lagoon, two areas frequently exposed to toxic events related to several noxious dinoflagellate. In Thau, *A. catenella* a paralytic shellfish poisoning toxin producer blooms regularly since 1998 and causes serious economic damages. Aqueous or methanolic crude extracts of *Zostera* leaves were assayed to determine their effects on the growth and morphology of the microalga. Chemical analyses showed the sampled seagrasses leaves contain large amounts of phenolic acids (PA) including rosmarinic acid (RA), flavonoids (Fl) and zosteric acid (ZA). RA (2.75-105.36 mg g⁻¹ dry weight) and Fl (7.02-82.87 mg g⁻¹ dry weight) presented the higher concentrations when ZA (0.17-1.3 mg g⁻¹ dry weight) was always the minor PA. *Z. noltii* contains the higher amounts of phenolic acids (65.51 for detrital leaves sampled in Andernos to 188.59 mg.g⁻¹ dry wt for fresh leaves from bouzigues). *Z. marina* was relatively less rich in phenolic acids with a maximum of 58.52 mg g⁻¹ dry weight for fresh leaves sampled in Arguin (Arcachon). A significant long-term inhibition of *A. catenella* growth was systematically observed without the need of continuous addition of extracts, suggesting that the allelochemicals produced by *Zostera* are stable in the medium. *Alexandrium* cells showed severe morphological anomalies and in acute cases membrane lysis when exposed to the tested extracts even at the lower concentrations. Inhibitory effects and cellular degradation were enhanced in function of the concentration and the exposition time to the extracts. This study suggests that *Zostera* allelopathic activity against *Alexandrium* cells can be mediated by secondary metabolites as phenol acids present abundantly in the leaves of these marine plants.

Key words: *Allelopathy*, *growth inhibition*, *photosynthesis*, *harmful algal bloom*, , *Alexandrium catenella*, *Zostera noltii*, *Z. marina*,

Partie I

Interactions Allélopathiques entre les Zostères et *Alexandrium catenella*

Résumé

Dans la lagune de Thau des efflorescences récurrentes du dinoflagellé toxique *Alexandrium catenella* apparaissent au printemps et en automne depuis 1998. De fortes concentrations de cette espèce microphytoplanctonique sont observées (jusqu'à $5 \cdot 10^6$ cellules/l) qui induisent des épisodes de toxicité avec une fermeture des zones ostréicoles. Le bassin d'Arcachon est soumis à des efflorescences de *Dinophysis sp.* et *Alexandrium minutum*, deux espèces toxiques. L'allélopathie est un processus impliquant des métabolites secondaires excrétés par les plantes et des micro-organismes qui affectent plusieurs processus physiologiques des espèces cibles. *Zostera marina* et *Zostera noltii* produisent des molécules bioactives comme l'acide zostérique et l'acide rosmarinique qui sont des composés phénoliques possédant un large spectre d'action. La présente étude a porté sur l'effet des extraits bruts de ces deux plantes marines échantillonnées dans le bassin d'Arcachon et la lagune de Thau sur la croissance et l'activité photosynthétique d'*A. catenella*. Les résultats montrent clairement que les extraits bruts testés possèdent un effet négatif sur la croissance et l'efficacité photosynthétique de ce dinoflagellé avec à certaines concentrations une immobilisation des cellules et une importante lyse. Ces résultats doivent être validés par des bio-essais avec des feuilles de zostères excisant en permanence ces allélochimiques. Nos résultats suggèrent l'intérêt potentiel à réimplanter les phanérogames qui ont subi beaucoup de dégradation dans les espaces lagunaires.

Mots clés : Zostères, *Alexandrium catenella*, allélopathie, croissance, efficacité photosynthétique

SOMMAIRE

INTRODUCTION

- 1- L'allélopathie
- 2- *Alexandrium Catenella*
- 3- Les Zostères
- 4- Objectifs et enjeux

MATERIEL ET METHODES

- 1- Sites de prélèvement des zostères : Etang de Thau et Bassin d'Arcachon
- 2- Souches d'*Alexandrium catenella* et milieu de culture
- 3- Dénombrement
- 4- Expérimentations

RESULTATS

- 1- Effet des extraits de *Z. marina* et *Z. noltii* de Thau sur la croissance d'*A. catenella* et détermination des concentrations efficaces
- 2- Effet des extraits de *Z. marina* et *Z. noltii* du Bassin d'Arcachon sur la croissance d'*A. catenella*
- 3- Effet des extraits sur l'efficacité photosynthétique d'*A. catenella*

DISCUSSION

BIBLIOGRAPHIE

RESUME/ABSTRACT

ANNEXES

INTRODUCTION

Depuis maintenant plusieurs années, la présence d'algues phytoplanctoniques toxiques est connue dans les lagunes méditerranéennes. Parmi ces algues, on rencontre notamment les dinoflagellés du genre *Alexandrium*. Ces dernières sont responsables d'efflorescences toxiques qui contaminent les coquillages filtreurs. Plusieurs conséquences en découlent, notamment du point de vue de la santé des consommateurs, mais également vis-à-vis de la viabilité des installations aquacoles. Nous nous intéresserons ici au cas d'*Alexandrium catenella* dans la lagune de Thau, et verrons qu'il existe des interactions allélopathiques, entre ces microalgues et des plantes aquatiques, les Zostères.

1-L'allélopathie

Le terme d'allélopathie a été défini en 1984 par Rice, comme étant :

"Tout effet direct ou indirect, positif ou négatif, d'une plante (micro-organismes inclus) sur une autre, par le biais de composés biochimiques libérés dans l'environnement". Cependant, la plupart des auteurs utilisent ce terme de façon restrictive : uniquement pour les effets négatifs.

Ces composés biochimiques, appelés « allélochimiques » (Whittaker and Feeny, 1971) sont pour la plupart des métabolites secondaires, c'est-à-dire qu'ils n'interviennent pas directement dans les processus essentiels à la survie de la plante. La plupart sont des acides phénoliques, des flavonoïdes, des terpènes et des alcaloïdes. Ils sont libérés par la plante dans l'environnement au moyen de quatre processus écologiques décrits pour le milieu terrestre : volatilisation, lixiviation, exsudat racinaire et décomposition des résidus de la plante. Le plus souvent les interactions allélopathiques sont le résultat d'actions jointes de plusieurs composés différents qui ne sont efficaces qu'à partir d'un certain seuil de concentration, sachant qu'une plante peut émettre plusieurs composés allélopathiques différents.

Ils jouent un rôle important dans la compétition vis-à-vis des ressources environnementales que sont l'eau, la lumière et les substances nutritives, dans les processus de défense des plantes contre leurs prédateurs, et dans la coopération intra- et interspécifique. Les facteurs environnementaux et relatifs à l'état des organismes influencent bien sûr l'efficacité des agents allélopathiques.

L'allélopathie explique en partie le caractère invasif de certaines espèces. Les invasions biologiques sont considérées par l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature (UICN) comme la seconde cause de dégradation des écosystèmes et de régression de la biodiversité. Une espèce invasive peut fortement modifier le peuplement dans lequel elle apparaît, en inhibant le développement de certaines espèces, et en favorisant d'autres.

1- *Alexandrium catenella*

Alexandrium catenella appartient à la classe des Dinophycées, à l'ordre des Gonyaulacales, à la famille des Gonyaulacacées et au genre *Alexandrium*. Cette espèce, d'une taille de 10 à 50 µm, vit exclusivement en milieu marin et produit des toxines paralysantes, essentiellement des saxitoxines (Lilly et al 2007). Cette toxine est responsable du syndrome PSP (Paralytic Shellfish Poisoning), intoxication pouvant causer la mort par paralysie des muscles respiratoires. La dose létale humaine est de 1 à 4 mg de toxine. Un mollusque contaminé peut en contenir jusqu'à 100 mg.

Ces microalgues peuvent proliférer à des concentrations très importantes (plusieurs millions de cellules par litre), formant alors des phénomènes de « marées rouges ». La production énorme de biomasse peut entraîner un phénomène d'anoxie au sein de l'écosystème lors de sa décomposition qui participe voire amplifie le phénomène d'eutrophisation. Elles sont cependant très sensibles à la turbulence, la stabilité de la colonne d'eau stimulant leur croissance et leur permettant de former des voiles de cellules à la surface de l'eau au cours des périodes de calme, lorsqu'il y a peu de vent.

Les coquillages filtreurs, comme les moules et les huîtres, en se nourrissant, absorbent ce phytoplancton et concentrent après digestion cette toxine dans leur chair. Les coquillages contaminés qui deviennent toxiques pour le consommateur, sont alors interdits à la vente et génèrent de lourdes pertes économiques pour les

professionnels. La norme européenne impose une concentration maximale autorisée de 80µg d'équivalente toxine pour 100 g de chair de coquillage.

Les mécanismes qui régissent l'apparition de ces efflorescences sont mal connus, en effet, beaucoup de paramètres biotiques et abiotiques rentrent en jeu tels que le vent, la température, la présence de ressources nutritionnelles, les compétitions avec d'autres espèces *via* notamment des interactions allélopathiques.

3-Les Zostères

Les Zostères (genre *Zostera*) sont des plantes aquatiques marines vivaces, de la famille des Zosteraceae appartenant à la division des Magnoliophytes. Elles forment des herbiers, importants réservoirs de biodiversité. Selon la classification classique ce sont des Phanérogames : leurs organes de reproduction sont apparents, ici, au niveau de la fleur, contrairement aux Cryptogames ; et appartiennent au sous-embanchement des Angiospermes. En annexe sont mis les traits biologiques et écologiques de ces plantes marines.

Il est reconnu que les herbiers ont des rôles écologiques majeurs. Grâce à leur système racinaire et leur canopée, ils constituent l'habitat d'une nombreuse faune et jouent un rôle de protection pour les juvéniles. Ils se trouvent à la base de chaînes alimentaires, par leur production de biomasse (producteurs primaires et secondaires). La présence d'herbier tend à stabiliser le sédiment grâce au réseau très dense formé par les racines, ils contribuent de ce fait à améliorer la transparence de l'eau. Ils participent à l'enrichissement de l'eau en oxygène dissous. Enfin, ils constituent une source de nourriture pour certains oiseaux migrateurs ou en période d'hivernage (GIPREB, 2009). Ainsi, leur présence dans les étangs est généralement le signe d'une bonne qualité de l'eau.

Malheureusement la surface occupée par ces herbiers est en régression. Il est estimé que 18 % des herbiers de magnoliophytes ont disparu à travers le monde. C'est d'autant plus vrai à Thau où les herbiers sont réellement menacés par différents facteurs. D'une part, la présence d'algues opportunistes. Ces algues se développent lorsque l'eau de la lagune est riche en éléments nutritifs (nitrates et phosphate) et lorsque les conditions de température et d'ensoleillement sont favorables (en général au printemps). Lorsque ces algues prolifèrent de façon excessive, elles limitent le développement des herbiers : une véritable compétition pour la lumière, l'espace et les éléments nutritifs s'instaure alors entre les zostères et les algues opportunistes. D'autre part, des pratiques peu respectueuses des pêcheurs et touristes (ancres, récolte de palourdes...).

Zostera marina et *Zostera noltii* sont les deux espèces présentes sur le site de la lagune de Thau. La profondeur influe sur le développement de ces espèces. A Thau, la profondeur maximale est d'environ 10m (la profondeur moyenne est de 4,50m et 35% des fonds sont situés à plus 5,50m). *Z. marina* se développe dans la zone infralittorale, du bas de l'estran à 3-4 m de profondeur (exceptionnellement 10m) (Hily *et al.* 2003a), tandis que *Z. noltii* se développe au milieu de la zone médiolittorale (zone de balancement des marées).

4-Objectifs et enjeux

Des observations réalisées sur le bassin d'Arcachon, ont mis en évidence que le genre *Alexandrium* n'était pas observé dans les prélèvements effectués au niveau des herbiers de Zostères. Il est connu que les Zostères produisent et excrètent des composés phénoliques dans le milieu aquatique. La question s'est donc posée de savoir s'il existait un lien entre le potentiel allélopathique des Zostères et l'absence constatée d'*Alexandrium* dans certains échantillons. Le but de notre travail est ainsi de tester l'action d'extraits issus de Zostères, sur le développement d'*Alexandrium* et sa capacité photosynthétique. Il s'agit d'extraits bruts de feuilles de *Z. marina* et de *Z. noltii* récoltées dans le bassin d'Arcachon et la lagune de Thau. Ces extraits issus de séparations chromatographiques (Université de Bordeaux, Labo PhyValBio) sont riches en acides phénoliques. A terme, il s'agit de comprendre l'action des herbiers sur la communauté phytoplanctonique et en particulier sur *A. catenella* et ainsi de voir s'il serait possible de lutter contre les blooms à Thau en réimplantant les herbiers de Zostères et en utilisant les propriétés allélopathiques de ceux-ci. Des expériences de réimplantation sont menées actuellement à l'étang de Berre.

MATERIEL ET METHODES

1- Sites de prélèvement des zostères : Etang de Thau et Bassin d'Arcachon

La description de ces deux sites d'étude est en Annexe 5.

2- Souche d'*A. catenella* et milieu de culture

L'étude a été menée sur des cultures d'*A. catenella* (souche ACT3) isolée à partir de prélèvements dans la colonne d'eau lors de la floraison automnale de 2003 dans la crique de l'Angle de l'étang de Thau. Elles sont cultivées dans un milieu de culture ESAW (Harrison 1980) fabriqué à partir d'eau de la lagune de Thau filtrée sur 0,2µm puis autoclavée. Les éléments nutritifs (filtrés sur 0,2µm) suivants sont ensuite ajoutés à 1 litre d'eau naturelle : - 1 ml de NaNO₃ (source d'azote), - 1 ml de Na₂HPO₄ (source de phosphore), - 1 ml de Vitamines, - 1 ml d'oligo-éléments, - 1 ml de fer. Les cultures sont maintenues en phase de croissance exponentielle dans des ballons de 3 ou 5L placés dans une chambre de culture thermostatée (20°C) où une photopériode est mise en place (12h/12h).

3- Dénombrement

Il est indispensable de réaliser un dénombrement cellulaire par microscopie photonique de la culture mère de façon à inoculer par la suite la même densité de cellules dans chacune des flasques lors des expérimentations, soit 1000 cellules par ml. Ces comptages sont effectués en microplaque 96 puits. Un volume variable d'échantillon variant 50 µl à 100 µl est ajouté à 100 µl d'eau de Thau filtrée sur 0,2µm formolée. L'ensemble des cellules du puits est compté. Le comptage est effectué en triplicatas et une concentration est déterminée en nombre de cellules par ml. Trois comptages seront réalisés sur chaque prélèvement.

4- Expérimentations

Lors de chacune des expériences réalisées, les différents traitements sont testés en triplicatas afin de tenir compte de la variabilité inhérente aux expérimentations sur les cultures. Les sels nutritifs seront apportés en totalité, via le milieu de culture, au temps t_0 sans être renouvelés par la suite (culture batch).

Extraits testés provenant de *Z. marina* et *Z. noltii* :

Les extraits ont été obtenus à partir de Zostères échouées sur le rivage dans la baie d'Arcachon et à partir de feuilles fraîches de zostères prélevées dans la lagune de Thau (Bouzigues). L'extraction est réalisée par Dr. Micheline Grignon-Dubois du laboratoire PhylValBio de l'Université Bordeaux I (Achlal et al. 2009a,b). Tous les extraits ne se dissolvent pas identiquement. Les extraits bruts sont conservés dans des flacons hermétiques avec un gel absorbant l'humidité. Avant chaque expérience, les extraits sont dissous dans le solvant correspondant (voir Annexe 2), passés au Vortex et filtrés sur des filtres sans azote de porosité 0,2 µm pour éviter toute contamination bactérienne des cultures.

Les concentrations (volume de la solution mère d'extrait testé/volume d'échantillon) suivantes sont réalisées :

Extraits des zostères d'Arcachon: **BR2174** (*Z. noltii* : 0,035%, 0,07%, 0,13%, 0,27%) ; **BR2097** (*Z. marina* : 0,025%, 0,05%, 0,1%, 0,2%) ; **BR2098** (*Z. marina* : 0,025%, 0,05%, 0,1%, 0,2%).

Extraits des zostères de Thau : **BR2250** (*Z. noltii* : 0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,4%, 0,6%, 0,8%, 1%) ; **BR2280** (*Z. noltii* : 0,05% , 0,1%, 0,2%, 0,4%, 0,6%, 0,8%, 1%) ; **BR2253**: (*Z. marina* : 0,05% , 0,1%, 0,2%, 0,4%, 0,6%, 0,8%, 1%) ; **BR2285** : (*Z. marina* : 0,05% , 0,1%, 0,2%, 0,4%, 0,6%, 0,8%, 1%).

Deux types de témoin sont réalisés, d'abord une culture sans extrait et sans solvant et puis une culture sans extrait mais avec le solvant ayant été utilisé pour dissoudre l'extrait testé (DMSO ou DMSO/Eau MilliQ, 4/1). Une fois les inoculations faites avec une concentration cellulaire de 1000 cellules /ml, les cultures sont placées délicatement (le taux de croissance d'*Alexandrium* est affecté par la turbulence à petite échelle) dans une enceinte thermostatée (20°C) et où une photopériode est mise en place (12h/12h). Les échantillons sont placés sur un plateau tournant de manière à ce que chacun reçoive la même quantité de lumière par jour.

Des premières expérimentations ont été réalisées en microplaques avec des volumes de cultures de 8 ml et une gamme de concentrations élargie (0,05% à 1%) sur les extraits des zostères de Thau (BR2250, BR2280, BR2253 et BR2285). Le but était de déterminer les concentrations d'extraits les plus faibles exerçant une activité allélopathique, de sorte à resserrer (et restreindre) par la suite la gamme des concentrations testées à l'aide du Phyto-PAM (étude de l'impact éventuel sur l'activité photosynthétique). Le but était également de s'approcher le plus possible des concentrations de molécules actives pouvant être exsudées *in situ* et correspondant à la couverture de zostères.

Des expériences ultérieures ont porté sur des volumes de culture de 30 ml dans des flasques et un suivi des concentrations cellulaires est réalisé en plus des mesures de l'efficacité photosynthétique, cela concerne les extraits d'Arcachon (BR 2174, BR 2097, BR2097) et un extrait de zostères de Thau (BR2285).

Suivi de l'efficacité photosynthétique

L'efficacité photosynthétique est représentative de l'état physiologique de la plante. Elle est mesurée *via* la mesure de la fluorescence à l'aide d'un appareil de mesure : le Phyto PAM. Les mesures sont effectuées 4h, 24h et 72h après l'inoculation puisqu'on considère qu'après, les molécules actives de l'extrait ont disparu par dégradation ou assimilation. Après 4h, 24h et 72h de mise en contact, des séquences de mesure au Phyto-PAM ont été réalisées selon la méthodologie suivante. L'échantillon est placé dans le noir pendant 30 minutes afin que la chaîne de transport d'électron ne fonctionne plus et que les centres réactionnel soient ouverts. Après la mesure du gain (amplification de l'instrument) et du zéro (de sorte à tenir compte de la fluorescence résiduelle), l'échantillon placé dans l'appareil de mesure est soumis à une lumière non actinique : le transport d'électron n'a toujours pas lieu et on mesure la fluorescence de base F_0 . L'application d'un flash de saturation induit la fluorescence maximale F_m , qui permet ensuite le calcul du rendement photosynthétique théorique maximal. L'échantillon est ensuite soumis à une lumière actinique pendant 1 minute (même intensité que celle utilisée pour les expérimentations dans la chambre de culture), pour activer la chaîne de transport d'électron et placer les algues en condition de photosynthèse. Cinq flashes de saturation sont successivement appliqués, toutes les 30 secondes, afin de mesurer l'efficacité photosynthétique effective. La moyenne des 5 mesures consécutives est alors prise en considération, ce qui permet de lisser la variabilité des signaux de fluorescence mesurés dans de telles conditions. La séquence de mesure dure au maximum 10 minutes par échantillon, c'est pourquoi il a été nécessaire de décaler chaque inoculation de 10 minutes pour obtenir exactement les mêmes temps d'incubation et d'exposition à la lumière.

Traitements statistiques : Des analyses de variance à un ou deux facteurs ont été réalisées pour tester l'effet des extraits testés sur les performances photosynthétiques de l'algue cible. Les pourcentages au témoin ont été utilisés pour ce faire de sorte à rendre les expérimentations comparables les uns aux autres. Des tests post hoc ont été réalisés pour regrouper les traitements en classes d'efficacité comparables. Tous ces tests ont été réalisés à l'aide du logiciel Statistix 8.0 (Analytical Software, USA)

RESULTATS

1- Effet des extraits de *Z. marina* et *Z. noltii* de Thau sur la croissance d'*A. catenella* et détermination des concentrations efficaces, les graphes sont mis en Annexe 1.

Traitements correspondant aux extraits de *Z. marina* (BR2253 et BR2285 dissous dans du DMSO/eau milliQ 4 :1), de *Z. noltii* (BR2280 et BR2250 dissous dans du DMSO) prélevés dans la lagune de Thau:

Ces premières expériences ont été conduites dans des microplaques de 8 ml et vont servir à définir les concentrations d'extraits les plus faibles possédant un effet négatif sur la croissance d'ACT3. Les concentrations d'extraits testées sont les suivantes : 0,05% ; 0,1% ; 0,2% ; 0,4% ; 0,6% ; 0,8% et 1%. Un témoin DMSO ou DMSO/eau milliQ est réalisé correspondant à la plus forte concentration de l'extrait. Un deuxième témoin avec 0 % d'extrait et sans DMSO est mis en place. Les résultats placés en annexe 1 montrent pour tous les extraits testés qu'une diminution importante du nombre de cellules est observée dès 0,05 % et cela durant les 3 jours de l'expérience. La croissance est donc négative ce qui correspond à une mortalité des cellules. L'observation au microscope montre une grande proportion de cellules lytiques. Les cultures témoin en absence d'extrait et celles avec uniquement le DMSO montrent une stabilisation ou une légère augmentation des concentrations cellulaires au bout de 72 d'incubation. Nous pouvons aussi observer une légère diminution du nombre de cellules est observée au bout de 24h ou 48h, sûrement due aux turbulences de l'inoculation, *Alexandrium* y étant très sensible. Il aurait fallu continuer l'expérimentation plus longtemps car la phase de latence semble particulièrement longue. En tout cas, nous n'observons pas de mortalité chez les cultures témoin et les cellules nagent et sont en très bon état morphologique.

A partir de ces premiers résultats nous avons choisi pour nos expérimentations portant sur l'efficacité photosynthétique des concentrations des extraits assez faibles puisque l'effet était visible à partir de 0,05% .

Traitement au BR-2285 extrait brut de *Z. marina* de Thau.

Ces expériences ont été réalisées dans des flasques de 30 ml pour suivre l'effet de d'extrait BR2285 sur l'activité photosynthétique. Au niveau de la croissance cellulaire, les dénombrements journaliers montrent une croissance négative à partir de 0,13 % et qui est confirmée pour 0,27%. Une lyse cellulaire est notée et très peu de cellules survivent à ce traitement en fin d'expérience.

1- Effet des extraits de *Z. marina* et *Z. noltii* du Bassin d'Arcachon sur la croissance d'*A. catenella*, les graphes sont en Annexe 1.

Traitement au BR-2174 extrait aqueux brut de *Z. noltii*:

Les concentrations testées sont les suivantes 0% ; 0,035% ; 0,07% ; 0,13% et 0,27% et comme cet extrait se dissout uniquement dans ce solvant, en plus du témoin (cultures ACT3 seules), un témoin supplémentaire contenant 0,27 % de DMSO (la plus forte concentration d'extrait testée) est ajouté. Le suivi de la concentration cellulaire des cultures d'*A. catenella* au cours de ces différents traitements montre qu'il existe un effet croissant de l'extrait BR-2174 sur la croissance de cette microalgue. Cet effet est visible à partir de 72h et à partir de la concentration 0,13%. Au huitième jour de l'expérience une très forte mortalité a toutefois été observée avec une lyse totale des cellules.

Traitement au BR-2097 et BR 2098 extraits méthanoliques et aqueux bruts, respectivement. (*Z.marina*)

Les concentrations testées sont les suivantes 0% ; 0,025% ; 0,05% ; 0,1% et 0,2%. Les témoins sont préparés comme indiqué pour le BR2174. Le suivi des concentrations d'ACT3 montre un effet inhibiteur de la croissance due dinoflagellé à partir de l'extrait 0,1%. Cet effet survient dans le cas de BR2098 à partir de 0,05%. Nous avons noté des anomalies morphologiques et une lyse au troisième jour de l'expérience à partir de 0,1% pour les deux extraits.

2- Effet des extraits sur l'efficacité photosynthétique

Les effets éventuels de trois extraits de zostères sur l'activité photosynthétique d'*A. catenella* ont fait l'objet d'investigations à l'aide d'un Phyto PAM. Les résultats seront présentés en détail pour l'un des extraits (figures, puis Anova). Pour les deux autres, seuls les résultats des Anova seront commentés, pour mettre en exergue les effets les plus significatifs révélés par ces traitements.

Extrait BR2285 (extraits de *Z. marina* de Thau)

Quatre traitements à des concentrations croissantes (0,035% ; 0,07% ; 0,13% ; 0,027%) plus deux témoins (avec/sans DMSO). Mesure des rendements de fluorescence (a) sur des échantillons préalablement adaptés au noir (Y : pas de photosynthèse, pas de transport d'électron = rendement théorique maximal), puis (b) sur des échantillons replacés en condition d'éclairement normale (ALY : photosynthèse active, transport d'électron = rendement effectif). Trois dates : après 4h, 24h et 72h.

Deux commentaires :

- comme annoncé précédemment (valeurs brutes), les rendements de fluorescence après exposition à la lumière actinique renvoient une image plus contrastée et donc plus "lisible" que les rendements mesurés sur des échantillons adaptés au noir.

- si l'on admet que la première concentration à partir de laquelle un effet est observable correspond ici à la LOEC (Lowest Observed Effect Concentration), il semble qu'au cours du temps, cette valeur diminue : 0,27% à T4;0,13% à T24;0,07% à T72...

(3) Analyses de variance

Y	Après 4 h		Après 24 h		Après 72 h	
	F	P	F	P	F	P
(470 nm)	1,86	0,18	2,03	0,16	11,3	0,00
(520 nm)	3,06	0,06	5,11	0,01	7,41	0,00

(645 nm)	2,13	0,14	4,84	0,02	52,2	0,00
(665 nm)	1,58	0,24	1,79	0,20	7,26	0,00

ALY	Après 4 h		Après 24 h		Après 72 h	
	F	P	F	P	F	P
(470 nm)	6,23	0,01	12	0,00	12,9	0,00
(520 nm)	5,37	0,01	11,3	0,00	9	0,00
(645 nm)	3,33	0,04	29,8	0,00	10,4	0,00
(665 nm)	4,29	0,02	6,41	0,01	3,89	0,03

L'extrait exerce rapidement un effet significatif sur l'activité photosynthétique, qui n'est d'abord (après 4h) perceptible que lors des mesures en lumière actinique, qui reste permanent ensuite. Cet effet est sensiblement plus prononcé sur des échantillons préalablement exposés à de la lumière actinique et donc mis en situation de photosynthèse.

L'effet du BR2285 paraît cumulatif et durable : il est d'autant plus prononcé que la durée d'exposition augmente. Les Anova croisées réalisées sont toutes significatives tout en indiquant un tassement de l'effet de l'extrait puisque certains des traitements après 24h et après 72h ne sont plus distinguables : les regroupements post hoc réalisés réunissant les traitements au sein des mêmes classes :

EXPO	canal1	canal2	canal3	canal4
4	A	A	AB	A
24	B	B	B	B
72	B	AB	A	AB

Extrait BR2097

Analyse de variance

Y	Après 4 h		Après 24 h		Après 72 h	
	F	P	F	P	F	P
(470 nm)	0.25	0.934	0.45	0.804	0.7	0.634
(520 nm)	0.83	0.550	0.68	0.650	0.76	0.598
(645 nm)	2.76	0.070	1.04	0.438	1.91	0.166
(665 nm)	3.09	0.051	0.2	0.955	1.1	0.408

ALY	Après 4 h		Après 24 h		Après 72 h	
	F	P	F	P	F	P
(470 nm)	2.52	0.089	4.13	0.02	9.91	0.00
(520 nm)	2.84	0.064	2.5	0.09	8.25	0.00
(645 nm)	2.62	0.080	9.14	0.00	7.95	0.00
(665 nm)	6.17	0.005	2.81	0.07	4.15	0.02

Aucun des traitements n'apparaît statistiquement différent des autres lorsque les rendements de fluorescence sont mesurés sur les échantillons préalablement adaptés au noir. Des différences significatives commencent à apparaître après 24h, qui deviennent importantes après 72h. Seul le traitement à 0,20% est statistiquement toujours différent des autres traitements, et notamment de la référence ESAW (ce qui est indiqué ici par les astérisques, figure x).

1/ aucun effet sur le rendement photosynthétique maximal (sur des échantillons préalablement adaptés au noir, Y), quel que soit le traitement et quelle que soit la durée d'exposition.

2/ léger effet délétère de l'extrait à 72h se traduisant par un moindre rendement photosynthétique effectif sur trois des canaux. Cette érosion n'est pas perceptible sur le canal 4 (665 nm) indiquant que la dérégulation s'exerce au niveau de l'équipement pigmentaire accessoire. Des mesures spécifiques seraient à réaliser (HPLC par exemple) de sorte à mieux comprendre et décrire la nature de cette reconstitution. Les effets les plus forts (traitement à 0,20% après 72h) entraînent une diminution du rendement qui ne dépasse pas 15%.

Il n'existe aucun effet croisé « temps d'exposition x traitement » qui soit statistiquement significatif ($P < 0,05$).

Extrait Br2098

Y	Après 4 h		Après 24 h		Après 72 h	
	F	P	F	P	F	P
(470 nm)	4.52	0.02	0.7	0.63	23	0.00
(520 nm)	4.44	0.02	0.76	0.60	50.9	0.00
(645 nm)	14.9	0.00	1.91	0.17	30.2	0.00
(665 nm)	15.6	0.00	1.1	0.41	15.7	0.00

ALY	Après 4 h		Après 24 h		Après 72 h	
	F	P	F	P	F	P
(470 nm)	2.81	0.07	2.09	0.14	101	0.00
(520 nm)	1.88	0.17	2.02	0.15	79.1	0.00
(645 nm)	4.13	0.02	1.15	0.39	97.7	0.00
(665 nm)	1.88	0.17	1.24	0.35	88.7	0.00

L'extrait BR2098 se caractérise par des effets apparemment contradictoires (figure x).

1/ un léger effet stimulant du BR2098 est mesuré à court terme (4h) pour les concentrations intermédiaires, le traitement le plus fort « ramenant » les valeurs de l'efficacité photosynthétique à une valeur proche de celle du témoin. Cet effet est sensiblement plus prononcé sur les échantillons préalablement adaptés au noir (Y) et il s'exprime plus fortement sur les canaux d'excitation mettant en œuvre les longueurs d'onde les plus élevées (645 et 665 nm), dont notamment le canal d'excitation de la chlorophylle a (canal 4).

2/ après 72h, en revanche, l'effet du traitement le plus concentré est manifestement inhibant, cette inhibition étant l'une des plus fortes mesurées durant ces expérimentations : l'efficacité théorique du traitement à 0,5% mesurée après 72h est 50% plus faible que celle du témoin. Cette tendance est validée pour les deux mesures d'efficacité réalisées, et elle affecte indifféremment les quatre canaux : c'est tout le métabolisme photosynthétique qui est concerné.

3/ il existe un effet croisé très significatif ($P = 0,0032 ; 0,0079 ; 0,0276 ; 0,0128$ respectivement pour les canaux 1 à 4) qui témoigne de l'évolution temporelle de l'effet de cet extrait.

Comparaison des trois extraits entre eux.

Après 72h, l'effet le plus fort qui a été observé est associé au BR2098, qui inhibe à près de 50 % l'efficacité photosynthétique effective des échantillons lorsqu'il est utilisé à la concentration de 0,5%. Cet effet délétère fait suite à une phase de stimulation, au moins pour les concentrations les moins élevées.

L'extrait BR2285 induit également une inhibition des performances photosynthétiques, moins prononcées puisque n'excédant pas 25% de réduction par rapport au témoin. Contrairement à l'extrait précédent, l'effet est immédiat et d'autant plus prononcé que la durée d'exposition augmente.

L'extrait BR2097 n'induit que de très faibles effets (15% d'érosion des performances photosynthétiques au maximum).

DISCUSSION

Nos résultats montrent clairement que les extraits bruts de *Z. marina* et *Z. noltii* provenant de la lagune d'Aracachon et de Thau possèdent une activité allélopathique contre *A. catenella*. Cet effet négatif est variable en fonction du niveau de concentrations testées, de la durée de l'exposition aux extraits et de leurs natures (extraits aqueux ou méthanoliques) mais dépend aussi de l'espèce de zostère à partir de laquelle l'extrait est préparé.

Les extraits au dessus de concentrations bien déterminées inhibent la capacité de division des cellules d'*A. catenella*, les immobilisent et peuvent induire leur lyse. L'efficacité photosynthétique processus physiologique vital pour ces micro-organismes est négativement affectée.

L'étude des interactions allélopathiques est très délicate car elle met en jeu des molécules à de très faibles concentrations. L'influence des communautés algales benthiques sur les communautés phytoplanctoniques est très peu étudiée. Dans ce contexte, l'étude des interactions allélopathiques entre une espèce phytoplanctonique et des extraits issus de Zostères est novatrice. La nature des molécules produites par les Zostères ainsi que leur concentration dans le milieu naturel sont mal connues. Il est donc difficile de choisir au mieux les concentrations les plus intéressantes à étudier. De plus, dans la nature, les Zostères ne rejettent pas un seul type de molécules, mais un véritable « cocktail » de composés, qui réagissent peut être en synergie selon une action combinée au niveau des cellules cibles que sont les microalgues. Ainsi, il pourrait être intéressant de réaliser des manipulations supplémentaires pour visualiser les impacts de mélanges d'extraits sur *Alexandrium*.

Les feuilles des zostères *Z. noltii* et *Z. marina* collectés à Arcachon (échouages) ont été analysées durant trois années consécutives et montrent des niveaux importants en acide zostérique (acide phénolique sulfaté) et en acide rosmarinique (un acide phénolique bioactif) (Achamlale et al. 2009a, b). Nous avons voulu tester les concentrations les plus faibles possibles des extraits pour que nos bio-essais soient les plus proches des conditions d'exsudation des molécules actives *in situ*. Toutefois, les cellules d'*A. catenella* peuvent se déplacer dans la colonne d'eau et échapper ainsi à la sphère de présence des métabolites excrétées par les zostères. Néanmoins, nous pensons que la première phase du début des efflorescences correspondant à la germination des kystes de résistance d'*A. catenella* et l'inoculation de la colonne d'eau avec un patch de cellules proche de l'interface eau-sédiment peut être assez sensible à l'effet allélopathique des phanérogames mais aussi des macroalgues.

Le Phyto PAM est un outil intéressant puisqu'il permet d'obtenir des résultats sur l'état physiologique de la plante rapidement, dans notre cas au bout de 4h après inoculation, contrairement aux dénombrements au microscope inversé qui permet le suivi de la croissance à moyen et long termes. En effet, un changement dans l'environnement chimique proche des algues est perçu beaucoup plus tôt lorsque l'on étudie l'efficacité photosynthétique que lorsque l'on suit une croissance cellulaire.

L'effet des extraits paraît cumulatif et durable : il est d'autant plus prononcé que la durée d'exposition augmente. Il serait intéressant de voir l'effet des zostères sur l'appareil photosynthétique à travers des mesures pigmentaires par HPLC.

En parallèle aux mesures de la croissance et de l'activité photosynthétique d'*A. catenella*, nous avons entrepris des observations morphologiques avec le microscope photonique ainsi que des marquages au DAPI des cellules soumises à différents concentrations d'extraits durant plusieurs jours. Ces données ne seront pas présentées dans ce rapport.

BIBLIOGRAPHIE

- Achamlale S., Rezzonico B., Grignon-Dubois M. 2009a. Evaluation of *Zostera detritus* as a potential new source of zosteric acid. *J. App. Phy.* 21:347-352.
- Achamlale S., Rezzonico B., Grignon-Dubois M. 2009b. Rosmarinic acid from beach waste: Isolation and HPLC quantification in *Zostera detritus* from Arcachon lagoon. *Food .Chem.* 113:878-883.

- Bachelet G., de Montaudouin X., Auby I., Labourg P.J. 2000. Seasonal changes in macrophyte and macrozoobenthos assemblages in three coastal lagoons under varying degrees of eutrophication. *ICES J. Mar. Sci.*, 57: 1495-1506
- Bhattacharya D, Medlin L. 1998. Algal phylogeny and the origin of lands plants, *Plant Physiol.* 116 (1998) 9-15.
- Buchsbaum R.N., Short F.T., Cheney D.P. 1990. Phenolic-nitrogen interactions in eelgrass *Zostera marina*.: possible implications for disease resistance. *Aquat. Bot.* 37: 291-297.
- Carmichael W.W. 2001. The cyanotoxins-bioactive metabolites of *cyanobacteria*: occurrence, ecological role, taxonomic concerns and effects on human. *J. Phycol.* 37(s3): 9-10.
- Dawes C.J., Guiry M.D., 1992. Proximate constituents in the seagrasses *Zostera marina* and *Z. noltii* in Ireland. *Marine Ecology*, 13: 307-315.
- De Wit R., Leibreich J., Vernier F. , Delmas F. ,Beuffe H. ,Maison P., Chossat J.C., Laplace-Treyture C., Laplana R., Torre M., Auby I , Trut G., Maurer D., Capdeville P. 2005. Relationship between land-use in the agro-forestry system of les Landes, nitrogen loading to and risk of macro-algal blooming in the Bassin d'Arcachon coastal lagoon (SW France). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 62, 453-465.
- Einhellig, F.A., Rasmussen, J.A. 1979. Effects of three phenolic acids on chlorophyll content and growth of soybean and grain sorghum seedlings. *Journal of Chemical Ecology* 5, 815.
- Gross E. .2003. Allelopathy of aquatic Autotrophs .Critical reviews in Plant sciences 22(3&4):326
- Manuel utilisation Phyto-PAM, 2003, System components Principles of operation
- Schmitt-Jansen M., Altenburger R. 2008. Community-level microalgal toxicity assessment by multiwavelength-excitation PAM fluorometry. *Aquatic Toxicology* 86: 49-58.
- Whittaker R., Feeny P. 1971. Allelochemicals : chemical interactions between species. *Science* 171, 757-770

Annexes

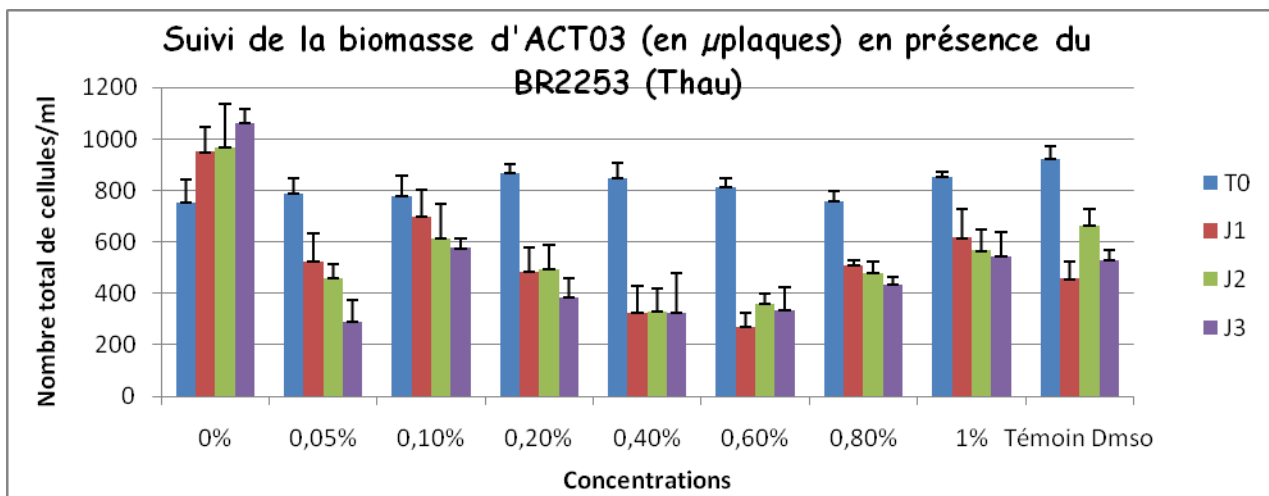
- 1- Annexe 1 : Résultats du suivi des concentrations d'*A. catenella* soumis aux différents extraits**
- 2- Annexe 2 : Les herbiers de zostères, traits biologiques et écologiques**
- 3- Annexe 3 : Exemples d'agents allélopathiques et modes d'actions**
- 4- Annexe 4 : Présentation de la lagune de Thau et du Bassin d'Arcachon**

Annexe 1

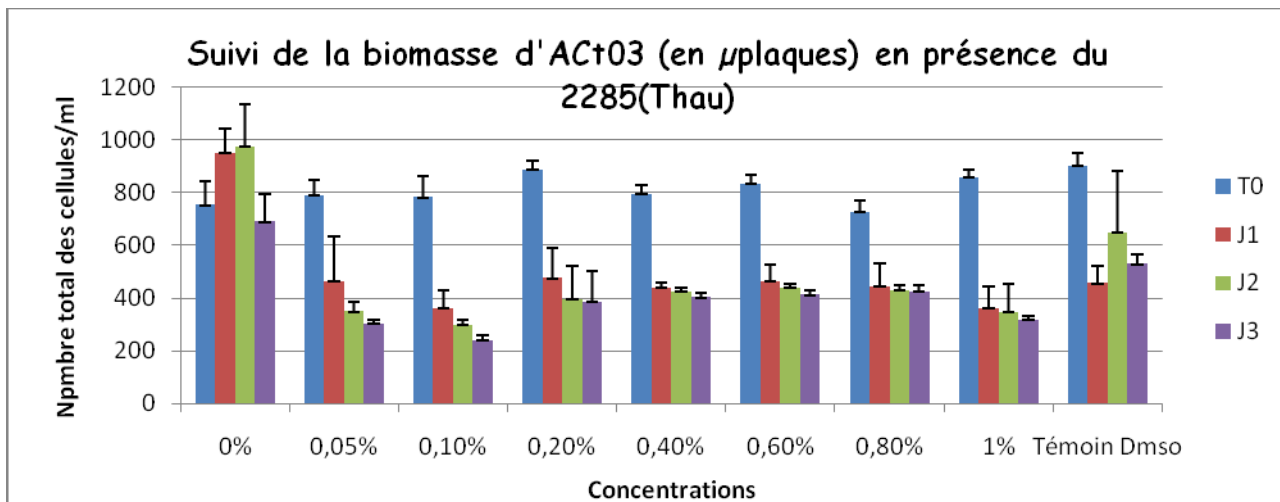
Résultats du suivi de la concentration d'*Alexandrium catenella* soumis à différents extraits

Les inoculations des flasques ou des microplaques ont été réalisées avec des cellules d'*A. catenella* en phase exponentielle donc en bon état physiologique. La concentration théorique au départ (Jo) est de 1000 cellules/ml.

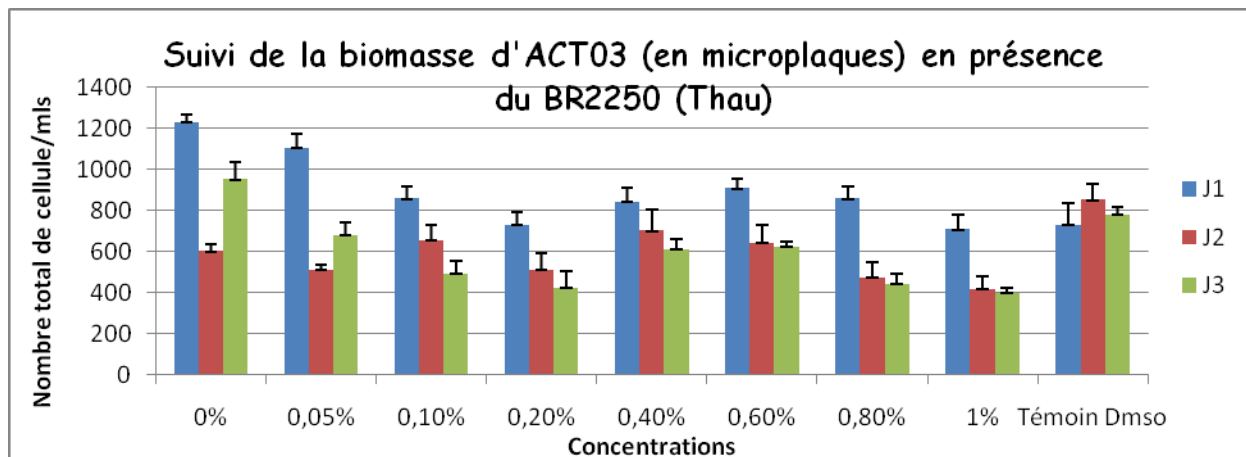
Extrait de Thau : *Z. marina* (BR2253)



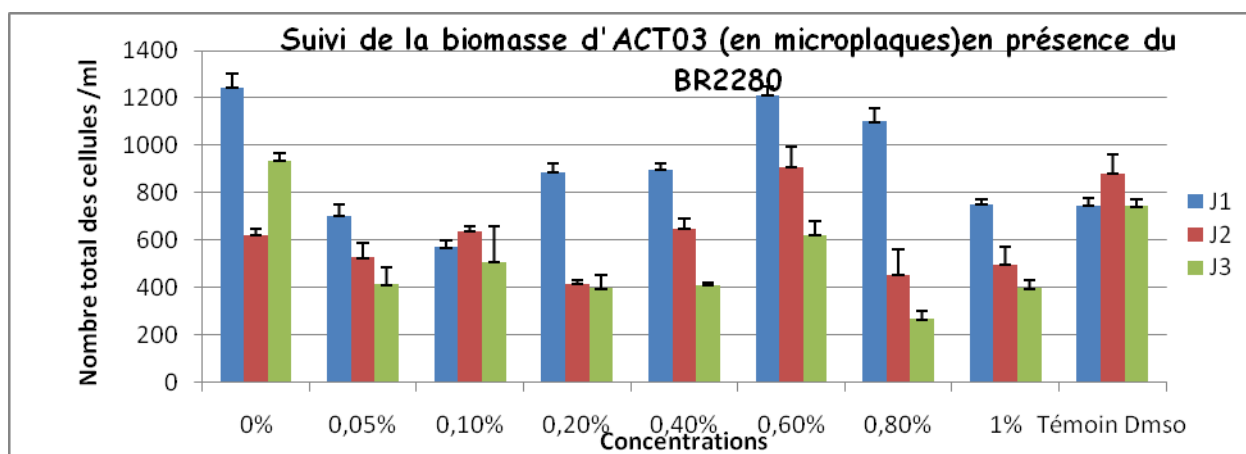
Extrait de Thau : *Z. marina* (BR2285)



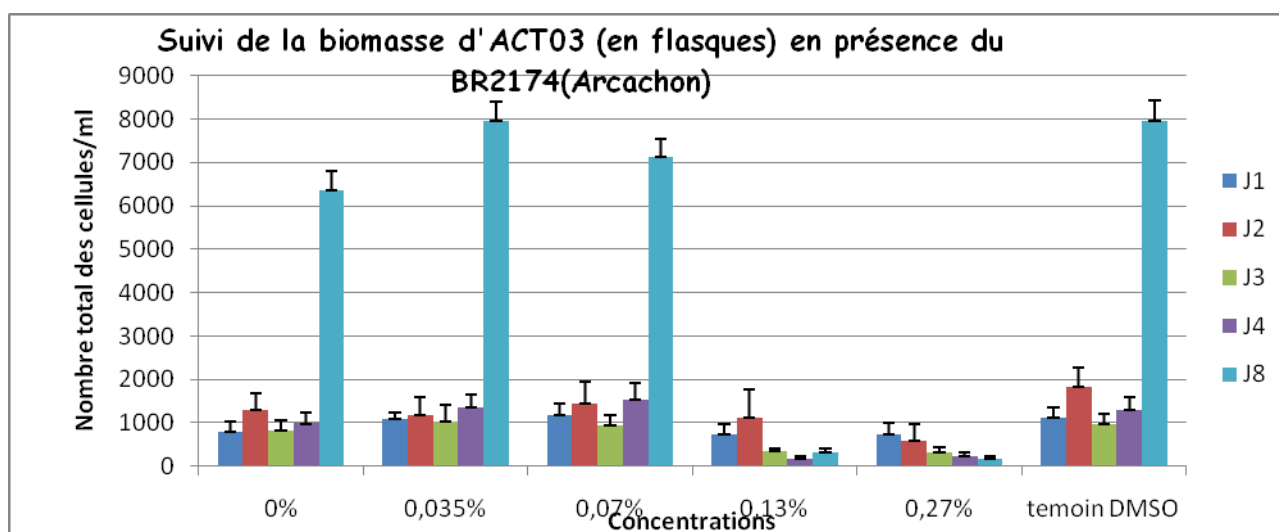
Extrait de Thau : *Z. noltii* (BR 2250)



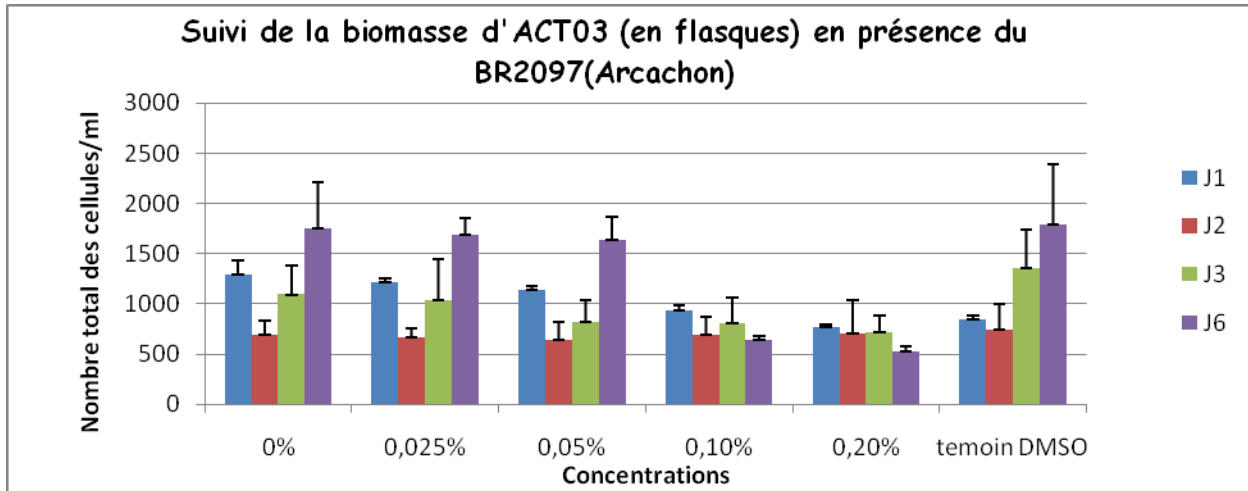
Extrait de Thau : *Z. noltii* (BR 2280)



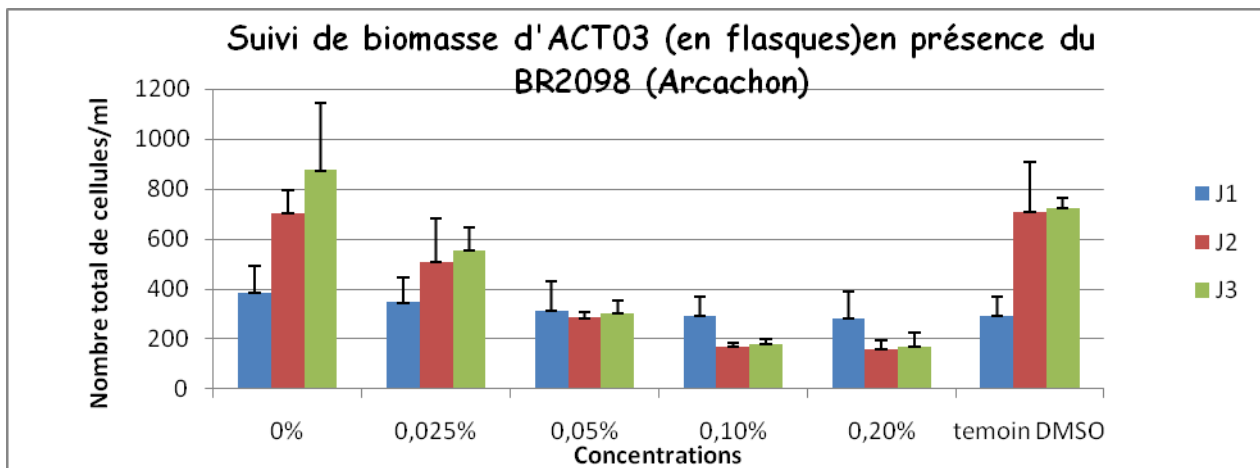
Extrait du bassin d'Arcachon (BR 2174)



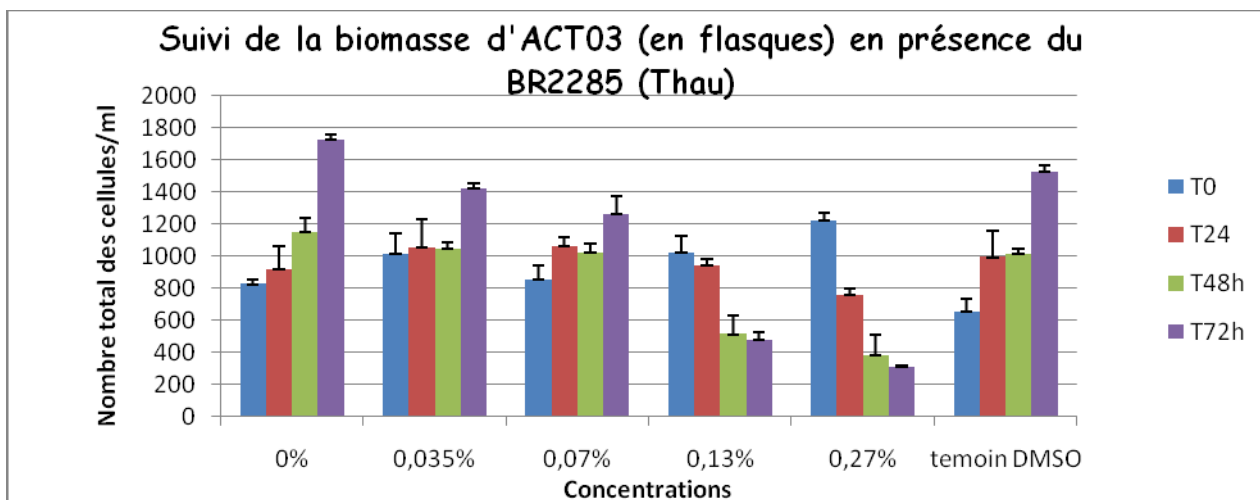
Extrait du bassin d'Arcachon (BR 2097)



Extrait du bassin d'Arcachon (BR 2098)



Extrait de Thau : *Z. marina* (BR 2285)



Annexe 2

Les Herbiers de Zostères, traits biologiques et écologiques

Les zostères sont des plantes marines phanérogames qui se développent sur des sédiments sablo-vaseux intertidaux et subtidaux des mers de l'hémisphère nord. Elles forment des herbiers denses qui peuvent aller de quelques dizaines de m² à plusieurs hectares.

A- Principaux traits biologiques

La phanérogame *Zostera noltii* est présente le long des côtes atlantiques de l'Europe et en Méditerranée, depuis la Norvège méridionale au nord jusqu'à la Mauritanie au sud. Liée aux conditions d'eau saumâtre (lagunes, baies côtières, embouchures des fleuves) dans la Méditerranée et dans la Mer Noire, elle est la seule plante aquatique de la Mer Caspienne et de la Mer d'Aral (Marlin, 2005).

La croissance des macrophytes est généralement limitée par les radiations solaires et par la température de l'eau (Philippart, 1995). *Zostera noltii* est plus tolérante aux hautes intensités de lumière et à la dessiccation, conditions liées aux basses mers, que *Zostera marina*, ce qui lui permet de coloniser les milieux intertidaux. Les variations saisonnières de biomasse suivent généralement un schéma unimodal, avec un maximum en été et un minimum en hiver, essentiellement basé sur une reproduction végétative. De nouvelles feuilles apparaissent au printemps, et l'herbier se développe par augmentation de la densité des pousses dérivant de la continue ramification du rhizome. Une densité de 1000-23000 pousses/m² a été reportée pour l'estuaire du Zandkreek, aux Pays Bas (Vermaat et Verhagen, 1996), de 4000-22000 pousses/m² pour le Bassin d'Arcachon (Auby et Labourg, 1996). Le nombre de feuilles subit une chute vers septembre/octobre : Nacken et Reise (2000) reportent une perte de 50 % des feuilles due à l'arrivée de l'hiver, tandis que le reste était mangé par certains oiseaux. Certaines pousses survivent à la saison froide, tandis que d'autres perdent complètement leurs feuilles et restent à l'état de rhizome (Jacobs et al., 1983) ; au printemps suivant, la repousse des plantes commence à partir des rhizomes survivants.

Le rhizome de *Zostera noltii* est plus fin et fragile que celui de *Zostera marina*, sa croissance est rapide et de nature éphémère, et il tire davantage des augmentations saisonnières de lumière et de nutriments, plutôt que des métabolites stockés dans le tissu végétal (Dawes et Guiry, 1992). D'après une étude de De Wit et al (2001), la surface des rhizomes de *Zostera noltii* supporte des biofilms bactériens et des diatomées. D'une manière générale, les rhizomes et les racines des phanérogames marines font office d'habitat pour les bactéries sulfato-réductrices et fixatrices d'azote (Donnelly et Herbert, 1999 ; Nielsen et al, 2001). Les pousses des macrophytes se développent en même temps que la croissance du rhizome, qui est le processus qui règle le taux de formation et la distribution spatiale des pousses dans l'herbier (Marbà et Duarte, 1998) : la connaissance du processus de croissance du rhizome est donc d'une importance centrale pour la compréhension de la productivité de ces macrophytes.

La croissance clonale (ou végétative) dépend d'une série de paramètres, tels que le taux d'allongement ou bien la nature de la ramification du rhizome, et présente des réponses adaptatives au milieu, les variations de lumière et de température, la disponibilité en nutriments (Marbà et Duarte, 1994 ; Marbà et al, 1996 ; Pérez et al, 1994). Les informations sur la croissance et les stratégies de ramification du rhizome sont encore maigres (Duarte, 1991 ; Marbà et al, 1996 ; Marbà et Duarte, 1998) : la plupart des recherches sur la croissance des phanérogames étant en effet focalisées sur la croissance des feuilles.

Deux espèces composent ces herbiers :

- La zostère marine (*Zostera marina*), qui présente des feuilles larges (0,5 à 1 cm) pour quelques dizaines de centimètres de long (50 cm et parfois plus). Elle se développe dans la partie basse de l'estran et les premiers mètres du domaine subtidal.
- la zostère naine (*Zostera noltii*) qui possède des feuilles plus fines et plus courtes. Elle vit à des niveaux plus hauts, généralement situés autour de la mi-marée. Ces herbiers, en particulier ceux à *Z. marina*, sont reconnus au niveau international et européen comme habitats remarquables, en raison de leur très grand intérêt

écologique, patrimonial et économique, ainsi que de leurs fonctions de réservoir de biodiversité et de zone de reproduction et de nurserie (Hily, 2004).

B-Principaux traits écologiques

La distribution locale des deux espèces dans leur environnement marin est très différente : *Z. marina* se développe dans la zone infralittorale, du bas de l'estran à 3-4 m de profondeur (exceptionnellement 10 m) (Hily et al, 2003a), tandis que *Z. noltii* se développe au milieu de la zone médiolittorale. Ainsi le recouvrement de l'aire de répartition des deux espèces ne se produit que rarement au niveau des limites de leur extension verticale sur l'estran. Ce cas de figure ne se produit en réalité que lorsque la surface du sédiment se présente sous forme d'une succession de cuvettes et de zones surélevées, les *Z. marina* s'implantant dans les cuvettes qui retiennent de l'eau pendant la basse mer tandis que les *Z. noltii* se cantonnent aux parties les plus hautes. Il est généralement admis que les herbiers de *Z. marina* subtidiaux sont pérennes tandis que les herbiers les plus hauts sur l'estran peuvent être annuels et dépendent pour se maintenir de la germination des graines. Jusqu'à présent il n'a pas été établi que ces différences de comportement avaient une base génétique. Dans les zones où les espèces se développent les populations tendent à être denses et leur rôle écologique est important dans le fonctionnement de l'écosystème côtier. Par contre inexplicablement les espèces restent absentes de nombreux sites où les conditions écologiques paraissent favorables à leur développement.

Annexe 3

Exemples d'agents allélopathiques et modes d'action

Les composés allélochimiques représentent une multitude de composés chimiques. Ces métabolites secondaires appartenant à plusieurs familles de molécules solubles dans l'eau ou dans un milieu organique.

- Acides gras à longue chaîne et polyacétylènes
- Quinones, naphthoquinone, anthroquinones
- Phénols simples
- L'acide benzoïque et ses dérivés
- l'acide cinnamique et ses dérivés
- Les flavonoïdes
- Tanins
- Terpénoïdes et stéroïdes
- Les acides aminés et polypeptides
- Alcaloïdes et cyanhydrines
- Sulfures et glucosides
- Purines et nucléotides
- Thiocyanates
- Lactones

La plupart des molécules allélochimiques sont des métabolites secondaires et des sous-produits des voies métaboliques (Rice, 1984; Putnam et Tang, 1986 ; Rizvi et al, 1992). Ces composés n'ont aucune fonction physiologique essentielle nécessaire au maintien de la vie (Aldrich, 1984). Ils freinent ou inhibent la germination et la croissance (Rizvi et al., 1992). Les substances allélochimiques peuvent avoir des effets physiologiques sur divers processus importants de la croissance et du métabolisme de l'organisme cible. Nous pouvons énumérer quelques exemples impliquant ces métabolites secondaires.

- **Absorption minérale** : certaines substances allélochimiques peuvent modifier la vitesse à laquelle les ions sont absorbés par les plantes. Une réduction de l'absorption des macro- et micronutriments est rencontrée en présence d'acides phénoliques (Rice, 1974).
- **Cytologie et ultrastructure** : certaines molécules inhibent les mitoses dans les racines des végétaux (Rice, 1974).
- **Phytohormones et équilibre des hormones de croissance** : l'acide indole acétique (IAA) et les gibbérellines (GA) sont importantes pour le développement des plantes ; plusieurs molécules allélochimiques perturbent le fonctionnement de ces hormones de croissance.
- **Membranes et perméabilité membranaire** : de nombreux composés biologiques exercent leur action par des changements dans la perméabilité des membranes et provoquent des lyses membranaires.
- **Photosynthèse** : des composés allélochimiques peuvent agir comme inhibiteurs ou découpleurs du transfert d'électrons perturbant ainsi l'activité photosynthétique (Einhellig et Rasmussen, 1979 ; Patterson, 1981)
- **Respiration** : certaines molécules peuvent stimuler ou inhiber la respiration, les deux pouvant être nocifs pour le processus de production d'énergie (Rice, 1974)
- **Synthèse protéique** : des études utilisant des éléments marqués ont mis en évidence une inhibition de la synthèse protéique.
- **Activité enzymatique** : Certaines enzymes sont inhibées de manière spécifique par certains composés allélochimiques.

Annexe 4

Présentation de la lagune de Thau et du Bassin d'Arcachon

Etang de Thau

L'étang de Thau se situe à environ 30 km au sud-ouest de Montpellier, c'est la plus grande lagune du Languedoc Roussillon (7500 hectares).

L'Etang de Thau est situé sur la côte méditerranéenne française, avec une surface d'environ 75 km environ avec une profondeur moyenne de 4,5 m. Il est en forte influence marine. La lagune est reliée à la mer par le canal de Sète (90% des échanges) et par le Grau de Pisse Saumes (10% des échanges). Les marées sont de très faibles amplitudes, toutefois, le taux de renouvellement des eaux dans la lagune est relativement élevé, puisqu'il a été estimé qu'environ 12% du volume est échangé tous les trois jours (Souchu et al., 1997)¹. Son bassin versant est environ 280 km². Il est drainée par de nombreux petits cours d'eau à flux intermittent. La géologie de ce bassin est très contrastées: le nord est principalement constitué par le calcaire karstique tout marnes argileuses. Environ 80.000 personnes vivent autour de la lagune, la moitié d'entre eux à Sète. Toutefois, la population double durant l'été et des efforts importants ont été menés pour l'amélioration des procédés d'épuration sur le bassin versant depuis les années 1970, tels que le raccordement de la population, la mise en service de stations d'épuration et le traitement des effluents industriels. Ainsi les concentrations en azote et en phosphore dans les eaux de l'étang sont relativement acceptables.

Le climat méditerranéen impose de larges fluctuations saisonnières de température et de salinité, avec des minima de 5° C en Février pour une salinité proche de 27, et des maxima de 29 °C en août associés à une salinité de parfois voisine de 40. Les précipitations montrent de grandes variations interannuelles (de 200 à 1000 mm par an). Le vent est souvent levé et souvent fort, avec en moyenne près de 120 jours par an durant lesquels il souffle à plus de force 5 sur l'échelle de Beaufort, notamment durant les épisodes de tramontane de secteur Nord Est (Dueri et al 2010)².

L'étang est classé Natura 2000 et fait l'objet d'une surveillance régulière par l'Ifremer dans le cadre de quatre réseaux : le RNO (Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin), le REMI (Réseau de contrôle Microbiologique), le REPHY (Réseau Phytoplancton et des phycotoxines), le RSL (Réseau de suivi lagunaire), réseau régional de suivi de l'eutrophisation dans les milieux lagunaires. Cette surveillance rapprochée permet de certifier un bon état des eaux de la lagune. Comme toute lagune, l'étang de Thau est caractérisé par une forte production biologique. Celle-ci est exploitée, puisque Thau est le premier site de production méditerranéen de coquillages et participe à hauteur de 10% à la production nationale d'huîtres. Les parcs à huîtres et moules couvrent environ 20% de la lagune et, chaque année, de l'ordre de 15000 tonnes sont produits : ces activités constituent un des moteurs économiques de la région.

Bassin d'Arcachon

Le Bassin d'Arcachon (44°40N, 01°10W) est une lagune côtière située au sud-ouest de Bordeaux, qui couvre une surface d'environ 155 km². Ce bassin triangulaire est relié à l'Océan Atlantique par une ouverture de 3 km de large, où transitent d'importantes masses d'eau, environ 130 x 10⁶ m³ pendant les marées de coefficients inférieurs à 70 (mortes eaux) et 400 x 10⁶ m³ pendant les marées de coefficients supérieurs à 70 (vives eaux) (Auby et Labourg, 1996). Les herbiers de *Zostera noltii* dans le Bassin d'Arcachon occupaient 70,1 km² en 1984, (Auby 1991). Même si des bateaux transitent aux alentours, le site est peu perturbé, car il est recouvert par l'eau pendant la plus grande partie de la journée.

¹ Souchu, P., Gasc, A., Cahet, G., Vaquer, A., Collos, Y., Deslous-Paoli, J.M., 1997. Biogeochemical composition of Mediterranean waters outside Thau lagoon. *Estuarine Coastal and Shelf Sciences*, 44: 275-284.

² Dueri Sibylle, Marinov Dimitar, Fiandrino Annie, Tronczynski Jacek, Zaldivar Jose-Manuel (2010). Implementation of a 3D Coupled Hydrodynamic and Contaminant Fate Model for PCDD/Fs in Thau Lagoon (France): The Importance of Atmospheric Sources of Contamination. *International Journal Of Environmental Research And Public Health*, 7(4), 1467-1485.

Le long des côtes Manche/Atlantiques, les herbiers de zostères (*Zostera marina* et *Zostera noltii*) se rencontrent depuis les côtes Ouest-Cotentin jusqu'au Bassin d'Arcachon où leurs peuplements sont luxuriants. Le rôle écologique des herbiers revêt des aspects très divers et explique l'intérêt tout particulier porté à ces angiospermes, dans le cadre de la gestion et de la protection de l'environnement côtier.

Le Bassin d'Arcachon constitue un écosystème complexe et diversifié où les herbiers jouent un rôle essentiel dans la dynamique sédimentaire. L'un des enjeux majeurs actuels du Bassin réside dans l'évaluation des causes et des conséquences de la réduction de la surface des herbiers sur la dynamique de l'écosystème de la lagune, tout particulièrement en termes de flux sédimentaires.

En ce sens, le Bassin d'Arcachon est tout à fait représentatif des spécificités des écosystèmes littoraux. En effet, il se caractérise par une production primaire relativement élevée (Auby, 1991 ; Soriano-Sierra, 1992 ; Guillocheau, 1988; Glé, 2007) correspondant, pour une bonne part, à celle de *Zostera noltii*, phanérogame marine qui occupe la grande majorité des estrans de la lagune (+/- 75%), constituant ainsi le plus vaste herbier de phanérogames des côtes européennes. Depuis 2005, les observateurs ont constaté une diminution importante des surfaces occupées par l'herbier à *Zostera noltii*, notamment. Les estimations réalisées par l'IFREMER sur la base de cartographies datant de 1989 confirment en effet une diminution des surfaces occupées par ces phanérogames de près d'1/3 en 2007 (Dalloyeau et al, en préparation).

Partie 2

Interactions allélopathiques entre plusieurs espèces microphytoplanctoniques et les Ulves

Introduction

L'abondance, la structure et la diversité des communautés phytoplanctoniques peut être expliquée par un ensemble de facteurs biotiques et abiotiques tels que la turbulence, le parasitisme, la prédation (sélective dans le cas d'espèces toxiques) ou encore la compétition pour les ressources. La compétition pourrait aussi induire une activité allélopathique qui peut être définie comme un effet d'un organisme sur un autre, par le biais de composés chimiques ou biochimiques libérés dans l'environnement.

Les macroalgues (en particulier les algues vertes) présentent des biomasses importantes dans la lagune de Thau notamment au printemps et peuvent être compétitrices pour la ressource avec le phytoplancton de la lagune, d'autant plus que les éléments nutritifs (azote et phosphate inorganique dissous) sont présentes en faibles concentrations. Les herbiers et les macroalgues de la lagune peuvent également interagir avec les espèces phytoplanctoniques colonisant celle-ci.

Malheureusement, très peu d'études au niveau mondial ont porté sur l'activité allélopathique des macroalgues et des phanérogames sur le microphytoplancton et en particulier sur les espèces responsables des efflorescences toxiques. Les quelques travaux recensés ont montré un effet négatif des macroalgues *Ulva pertusa* et *Gracilaria lemaneiformis* sur la croissance de quatre dinoflagellés responsables d'efflorescences (Wang et al. 2007). Ces mêmes auteurs montrent un effet allélopathique négatif de plusieurs espèces de macroalgues sur deux dinoflagellés toxiques, à savoir *Heterosigma akashivo* et *Alexandrium tamarense* (Wang et al. 2007). L'objectif principal de cette étude est d'étudier l'effet d'*Ulva lactuca* une des espèces de macroalgues les plus répandue dans la lagune de Thau sur la croissance des principales espèces microphytoplanctoniques responsables d'efflorescences dans Thau (*Alexandrium catenella* et *Alexandrium tamarense*) ainsi que sur deux autres dinoflagellés (*Alexandrium minutum* et *Scrippsiella trochoidea*). Les résultats issus de ce projet mettront la lumière sur le rôle joué par les macroalgues au niveau du déterminisme des efflorescences et donc la structuration de la diversité microphytoplanctonique.

- **Algues et conditions expérimentales :**

La macroalgue *Ulva lactuca* a été collectée dans l'étang de Thau. *Ulva lactuca* a ensuite été mise en culture, dans des bacs préalablement lavés, avec de l'eau de Thau récupérée en même temps que les algues. Puis avant les différentes expériences les algues furent soigneusement rincées avec de l'eau de Thau autoclavée et filtrée sur 0.2 µm, ceci plusieurs fois afin d'enlever le zooplancton et tout ce qui aurait pu se coller ou se déposer sur l'algue. Le tout sans endommager l'algue.

Les cultures de microalgues ont été obtenues à partir de souche isolée au sein du laboratoire. Toutes les cultures de microalgues sont conservées dans du milieu ESAW afin de maintenir une phase de croissance exponentielle, à une température de 20°C et sous 100 µmol photons m⁻² s⁻¹ avec une photopériode de (12h : 12h) dans une chambre de culture. Le milieu ESAW est obtenu à partir d'eau de Thau autoclavée et filtrée sur 0.2µm à laquelle on rajoute 1ml pour 1L de NaNO₃ (Source d'azote), Na₂HPO₄ (Source de phosphore), d'oligo-éléments, de vitamines et d'ETDA fer. Le pH de l'eau de mer était de 8.35.

Toutes les expériences et mesures de cette étude ont été effectuées séparément et en triplicats.

- **Co-culture macroalgue/microalgue :**

150 mL de milieu ESAW a été préparé puis disposé dans différentes flasques de 200 mL. Après avoir rincé les macroalgues, on a déposé 0.08g 0.16g 0.5g et 1g d'algue (en poids frais) dans les différentes flasques en triplicats. Plusieurs espèces de microalgues ont été testées : on a utilisé ACT3 (*Alexandrium catenella* isolée à Thau en 2003) ACT6 (*Alexandrium catenella* isolée à Thau en 2006) et une espèce non toxique Atam (*Alexandrium tamarense* isolée dans Thau). Dans chacune des flasques les microalgues ont été mises en co-culture à une concentration de 100 cellules par mL. Le pH, l'O₂ et la concentration en nitrate ont été mesurés chaque jour pour s'assurer qu'ils n'étaient pas limitants pour la croissance des deux algues. Par ailleurs le comptage a été effectué à partir de 1 mL d'échantillon formolé avec du formaldéhyde 40% puis compté dans des puits de 100 µL d'une plaque 96. Ces comptages ont été réalisés à l'aide d'un microscope Zeiss Axiovert 25. On a aussi prélevé des échantillons pour une étude morphologique ainsi que pour une étude de la charge bactérienne qui ne sera pas traitée dans ce rapport.

Dosage des Nitrates :

Pour ce faire un échantillon a été prélevé chaque jour, après avoir été filtré sur 0.2µm à l'aide d'un filtre sans nitrates un volume de 3mL a été déposé dans une cuve Quartz de 1cm d'épaisseur pour être analysé par un spectrophotomètre Hitachi 300 réglé sur une longueur d'onde de 220nm. L'appareil nous indique alors la valeur d'absorbance de l'échantillon, celle-ci est convertie en µmol grâce à l'équation de droite reliant l'absorbance a la concentration : $y = 0.0040x + 0.1533$, ou x représente la concentration et y l'absorbance, nous obtenons ainsi une valeur en µmol.

NB : Cette équation est obtenue après calibration de l'appareil et ce grâce à des courbes étalons.

Mesure pH et O₂ :

Pour ce faire nous disposons d'un pH mètre HACH HQd field case. La sonde à pH était alors plongée dans la flasque, la mesure prise en compte était celle obtenue une fois l'appareil stabilisé. Ensuite avant toute autre mesure la sonde était rincée dans de l'eau miliQ. Nous avons fait de même pour la sonde à O₂.

Les espèces microphytoplanctoniques utilisées pour ces expériences sont :

- ACT3 : Souche monoclonale d'*A. catenella* qui a été prélevée à l'automne 2003 dans l'étang de Thau (Crique de l'Angle) et maintenue en culture.
- ACT6 : Souche monoclonale d'*A. catenella* qui a été prélevée à l'automne 2006 dans l'étang de Thau (Crique de l'Angle) et maintenue en culture.
- A. tam : Souche monoclonale d'*A. tamarense* isolée dans la lagune de Thau
- A.min souche monoclonale d'*A. minutum* isolée dans l'Estuaire de Penzé en Bretagne, responsable d'efflorescences toxiques

Un autre dinoflagellé a également été utilisé :

- *Scrippsiella trochoidea* : Souche monoclonale, isolée dans la lagune de Thau.
- Cette expérience a comporté 5 essais :
- ACT3 en présence de 0.16g, 0.5g et 1g d'Ulve.
- ACT6 en présence de 0.08g, 0.16g et 0.5g d'Ulve.
- A.Tam en présence de 0.08g, 0.16g et 0.5g d'Ulve.
- *A. minutum* en présence de 0.08g et 0.16g d'Ulve.
- *S. trochoidea* en présence de 0.08, 0.16g et 0.5g d'Ulve.

Pour les trois souches utilisées un témoin a aussi été réalisé. Pour ce faire chaque souche amenée à 100 cellules par mL placées dans 150 mL de milieu ESAW.

• Microalgue en culture dans du filtrat d'Ulve :

Le filtrat d'*Ulva lactuca* a été préparé comme suit : *U. lactuca* a été cultivée dans de l'eau de Thau filtrée et autoclavée, pendant 7 jours à une concentration de 0.5g, 1g et 8g. A une température de 20°C sous 60µmol m⁻² s⁻¹ avec une photopériode (12 :12). Puis les macroalgues ont été retirées, et le milieu de culture a été filtré 0.2µm. Le milieu a ensuite été enrichi conformément à la préparation du milieu ESAW, et le pH réajusté à 8.35. Chaque espèce de microalgue (ACT3 ACT6 et A.Tam) a été immédiatement inoculée à une concentration de 100 cellules par µL dans les flasques de 200 mL contenant le milieu filtré enrichi. Comme pour la co-culture le pH, l'O₂ et le nitrate ont été contrôlés chaque jour. Un comptage journalier a aussi été effectué en suivant la même méthode que citée plus haut.

Cette expérience comportée 5 essais :

- ACT3 en présence de filtrat obtenu à partir d'une culture de 0.5g d'Ulve.
- ACT3 en présence de filtrat obtenu à partir d'une culture de 1g d'Ulve.
- ACT3 en présence de filtrat obtenu à partir d'une culture de 8g d'Ulve.
- ACT6 en présence de filtrat obtenu à partir d'une culture de 8g d'Ulve.
- A.Tam en présence de filtrat obtenu à partir d'une culture de 8g d'Ulve.

Des témoins on aussi été réalisés, les microalgues étaient alors cultivés dans des flasques de 200 mL contenant 150 mL d'ESAW à une concentration de 100 cellules par μL .

- **Microalgue en culture dans du milieu issus de co-culture :**

Ulva lactuca a d'abord été incubée en présence d'ACT6 ou de *S.trochoidea* à 0.16g et 0.5g pendant 7 jours. Ensuite le milieu a été filtré sur 0.2 μm . Le taux de Nitrate a été réajusté ainsi que le pH. Ce milieu a été ensuite placé dans des flasque de 200 mL ou l'on a inoculé ACT3 toujours à une concentration de 100 cellules par mL. Comme pour la co-culture le pH, l' O_2 et les nitrates ont été contrôlés chaque jour. Un comptage journalier a aussi été effectué en suivant la même méthode citée plus haut.

Cette expérience comportée 4 essais :

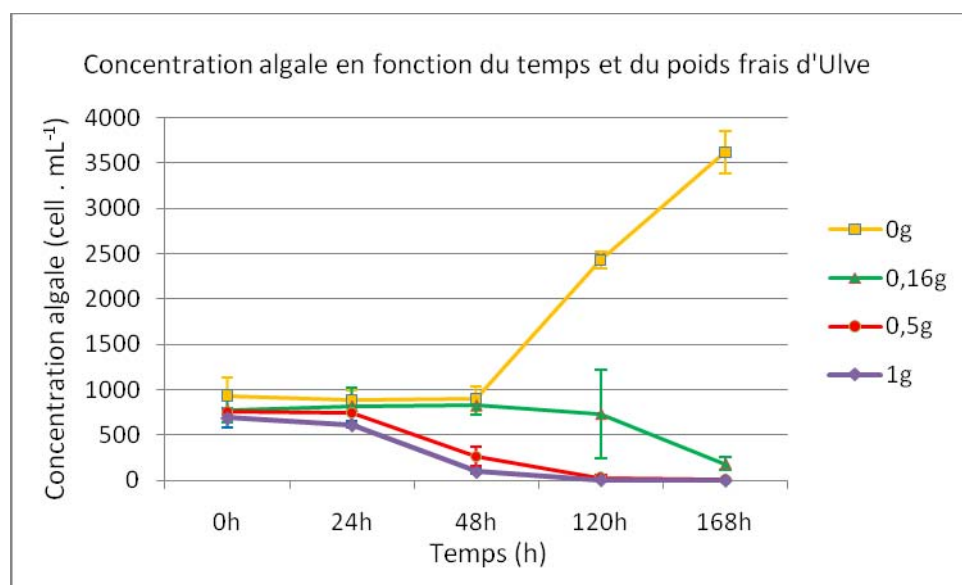
- ACT3 en présence du milieu obtenu à partir d'une co-culture ACT6 avec 0.16g d'Ulve.
- ACT3 en présence du milieu obtenu à partir d'une co-culture ACT6 avec 0.5g d'Ulve.
- ACT3 en présence du milieu obtenu à partir d'une co-culture *S.trochoidea* avec 0.16g d'Ulve.
- ACT3 en présence du milieu obtenu à partir d'une co-culture *S.trochoidea* avec 0.5g d'Ulve.

Des témoins ont également été réalisés, les microalgues étaient alors cultivées dans des flasques de 200 mL contenant 150 mL d'ESAW à une concentration de 1000 cellules par mL.

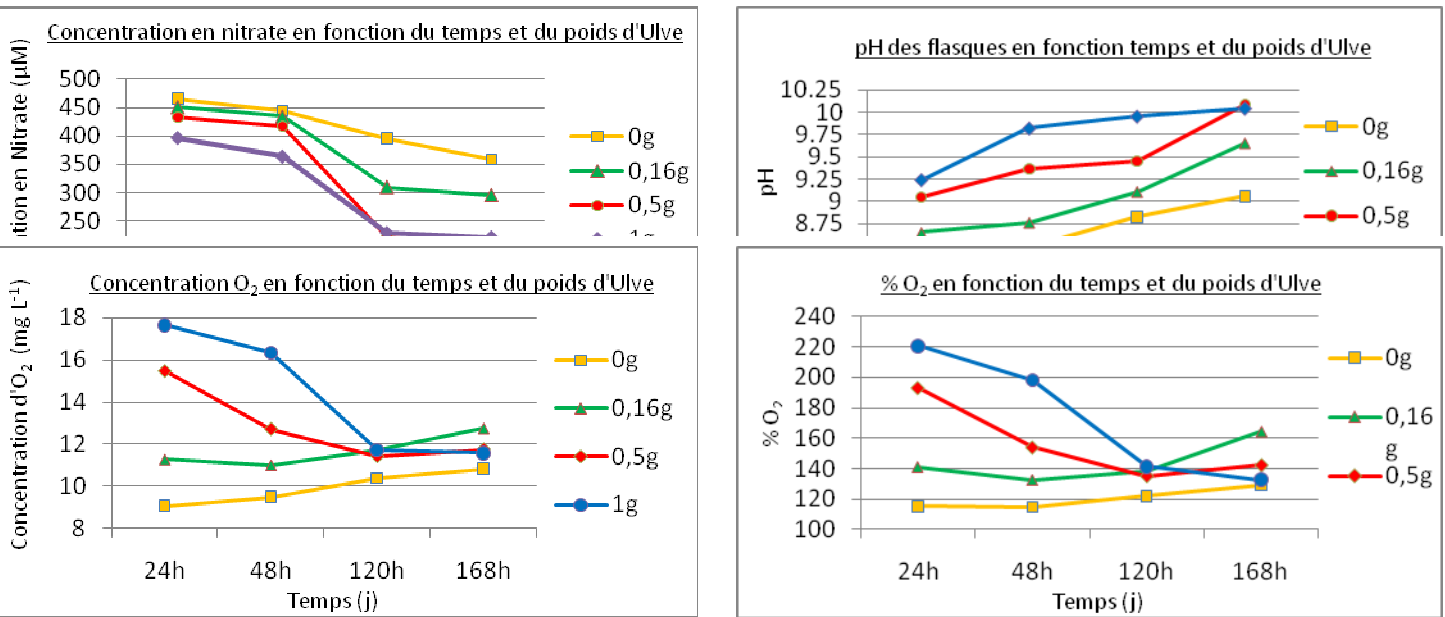
Résultats

- **Exemple de résultats : incubation d'ACT3 en présence d'*U.lactuca***

ACT3 :



- Nitrate, pH et O₂ :



Discussion

L'allélopathie, en tant que phénomène naturel, a été beaucoup étudié chez les plantes terrestre. Des études sur le terrain et en laboratoire montrent que l'allélopathie existe aussi dans les habitats aquatiques (eaux douces et marines), et que les producteurs primaires (cyanobactéries, micro et macroalgues) sont capable de produire et de sécréter des composés allélopathique (Gopal et Goel, 1993 ; Körner et Nicklish, 2002 ; Gross, 2003). Durant cette étude, nos expériences furent réalisées en laboratoire, avec des conditions physicochimiques stables. Ainsi les nutriments et la lumière était réglés de sorte qu'il n'interfèrent en aucun cas sur la croissance de la microalgue. Le pH a lui aussi été contrôlé afin qu'il n'agisse pas sur l'un ou l'autre des protagonistes. En effet les macroalgues peuvent faire varier le pH de leur milieu de culture, pouvant le rendre incompatible avec une croissance de microalgue (Schmidt et Hansen, 2001). Dans les essais de co-culture, le pH a été mesuré tout au long de l'expérience. L'augmentation de celui-ci a été trop faible pour inhiber la croissance des microalgues. De plus les morceaux de thalle des Ulves étaient, de part leurs poids, toujours au fond des flasques, c'est pourquoi l'hypothèse d'une compétition défavorable pour la lumière peut être écartée. Quand aux nutriments leur mesures nous a montré qu'ils étaient en quantité suffisante lors des essais (NO₃-N : 200 µmol L⁻¹ en fin d'expérience) ce qui nous permet également de rejeter l'hypothèse d'une compétition pour les nitrates (Sharp et al., 1979 ; Nan et al., 2004). Prenant tout ceci en compte nous en avons donc conclu qu'une sécrétion de molécules allélopathiques était l'hypothèse la plus probable pour expliquer l'inhibition de croissance des microalgues.

Gross (1999) a montré que le contact cellule-cellule était nécessaire pour avoir un effet inhibiteur de la cyanobactérie *Fischerella muscicola* sur plusieurs autres organismes. D'après nos expériences avec le filtrats on peut aller dans ce sens même si d'autres études ont montré le contraire (Uchida et al., 1999 ; Nakai et al., 2000 ; Schagerl et al., 2002 ; Jin et Dong, 2003 ; Wang et al., 2006). En effet les expériences avec seulement du filtrat obtenu a partir d'une culture d'Ulve n'ont pas été concluantes et n'ont pas montré d'effet inhibiteur sur la croissance des microalgues. Tandis que le filtrat obtenu à partir d'une co-culture Ulve/microalgue s'est avéré lui concluant et a montré un effet inhibiteur sur la croissance des microalgues. Il aurait été intéressant lors des expériences avec le filtrat de rajouter le filtrat à intervalle. Pour ce qui est de la molécule allélopathique, certaines études tendent à penser qu'il s'agirait de molécule dont la polarité serait relativement importante (Wang et al., 2007). De plus en plus d'études montrent que les macroalgues produisent des défenses chimiques contre les herbivores (Van Alstyne et al., 2001) et que leur extraits ont des propriétés allélopathiques (Nelson et al., 2003). Au cours de cette étude nous avons donc mis le doigt une activité allélopathique de l'Ulve sur plusieurs espèces microphytoplanctoniques. Utiliser l'allélopathie dans le contrôle de blooms de microalgues requiert néanmoins l'identification de ces molécules, qui est souvent très difficile.

Bibliographie

- Adachi M., Sako Y., Ishida Y. (1994). Restriction fragment length polymorphism of ribosomal DNA internal transcribed spacer and 5.8S regions in Japanese *Alexandrium* species (Dinophyceae). *Journal of Phycology* 30: 857–865.
- Bais H.P, Vepachu R, Gilroy S, Callaway R.M, Vivanco J.M 2003. Allelopathy and exotic plant invasion : from molecules and genes to species interactions. *Science* 301, 1377-1380.
- Beer S., Israel A., Drechsler Z., et Cohen Y. Photosynthesis in *Ulva fasciata* V. Evidence for an Inorganic Carbon Concentrating System, and Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase CO₂ Kinetics
- Benavides H., Prado L., Diaz S., Carreto J.J. (1995). An exceptional bloom of *Alexandrium catenella* in the Beagle Channel, Argentina. In: Lassus P., Arzul G., Erard-Le Denn E., Gentien P., Marcaillou-Le Baut C. (eds). Harmful marine algal blooms. Lavoisier, Paris : 113–119.
- Collos Y., Vaquer A., Laabir M., Abadie E., Laugier T., Pastoureaud A., Souchu P. (2007). Contribution of several nitrogen sources to growth of *Alexandrium catenella* during blooms in Thau lagoon, southern France. *Harmful Algae* 6(6): 781-789.
- Collos Y., Bec B., Jauzein C., Abadie E., Laugier T., Lautier J., Pastoureaud A., Souchu P., Vaquer A. (2009). Oligotrophication and emergence of picocyanobacteria and a toxic dinoflagellate in Thau lagoon, southern France. *Journal Sea Research* 61: 68-75.
- Cordova J.L., Muller I. (2002). Use of PCR and partial sequencing of the large-subunit rRNA gene to identify *Alexandrium catenella* (Dinophyceae) from the South of Chile. *Harmful Algae* 1: 343–350.
- De Casabianca M.-L., Laugier T., et Marinho-Soriano E. (1996). Seasonal changes of nutrients in water and sediment in a Mediterranean lagoon with shellfish farming activity (Thau Lagoon, France). *ICES Journal of Marine Science*, 54: 905–916. 1997
- Genovesi-Giunti B., Mouillot D., Vaquer A., Laabir M., Pastoureaud A. (2007). Towards an optimal sampling strategy for *Alexandrium catenella* (Dinophyceae) benthic resting cysts. *Harmful Algae* 6: 837-848.
- Gopal B, Goel U, 1993. Competition and alléopathie in aquatic plant communities. *Bot. Rev.* 59, 155-210.
- Gross E.M, 1999. Allelopathy in benthic and littoral areas : Case studies on allelochemicals from benthic cyanobacteria and submerged macrophytes. In : Inderjit, Dakshini K.M.M, Foy C.L (Eds.), Principles and Practices in Plant Ecology : Allelochemical Interactions. CRC Press, LLC, pp. 179-199.
- Gross E.M, 2003. Allelopathy of aquatic autotrophs. *Crit. Rev. Plant Sci.* 22, 313-339.
- Guillard R.R.L, Ruyther J.H, 1962. Studies on marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* (Hustedt) and *Detonula confervacea* (Cleve). *Can. J Microbiol.* 8, 229-239.
- Hallegraeff G.M., Bolch C.J., Blackburn S.I., Oshima Y. (1991). Species of toxigenic dinoflagellate genus *Alexandrium* in south-eastern Australian waters. *Botanica Marina* 34:575–587
- Krause G.H., Weis E. (1991). Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42: 313-349.
- Inderjit, Del Moral R, 1997. Is separating resource competition from alléopathie realistic ? *Bot. Rev.* 63, 221-230.

- Jasser I, 1995. The influence of macrophyte on a phytoplankton community in experimental conditions. *Hydrobiologia* 306, 21-32.
- Jin Q, Dong S, 2003. Comparative studies on the allelopathic effects of two different strains of *Ulva pertusa* and *Ulva linza* on *Heterosigma akashiwo* and *Alexandrium tamarense*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 293, 41-55.
- Keating K.L, 1977. Allelopathic influence on blue-green bloom sequence in a Eutrophic Lake. *Science* 196, 885-887.
- Kröner S, Nicklisch A, 2002. Allelopathic growth inhibition of selected phytoplanktonic species by submerged macrophytes. *J. Phycol.* 38, 862-871.
- Laabir M., Génovési-Giunti B., Barré N., Vaquer A., Collos Y., Erard Le Denn E., Cecchi P., Pons V. et Bibent B. (2002). The resting cyst of *Alexandrium catenella*, a dinoflagellate responsible for harmful algal blooms in Thau Lagoon (Western French Mediterranean coast). Xth international conference St. Pete Beach, Florida, USA, October 2002, 26-28.
- Laabir M., Amzil Z., Lassus P., Masseret E., Tapilatu Y., De Vargas R., Grzebyk D. (2007). Viability, growth and toxicity of *Alexandrium catenella* and *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) following ingestion and gut passage in the oyster *Crassostrea gigas*. *Aquatic Living Resources* 20: 51-57.
- Lugliè A., Giacobbe M.G., Sannio A., Fiocca F., Sechi N. (2003b). First record of the dinoflagellate *Alexandrium catenella* (Whedon & Kofoid) Balech (Dinophyta), a potential producer of paralytic shellfish poisoning, in Italian waters (Sardinia, Tyrrhenian Sea). *Bocconea* 16:1045-1052.
- Nagayama K, Shibata T, Fujimoto K, Honjo T, Nakamura T, 2003. Algicidal effect of phlorotannins from the brown alga *Ecklonia kurome* on the red tide microalgae. *Aquaculture* 218, 601-611.
- Nakai S, Inoue Y, Hosomi M, Murakami A, 2000. *Myriophyllum spicatum* released allelopathic polyphenols inhibiting growth of blue-green algae *Microcystis aeruginosa*. *Water Res.* 34, 3026-3032.
- Nelson T.A, Lee D, Smith B.C, 2003. Toxic extracts from ulvoid macroalgae : Are “green tides” harmful algal blooms ? *J.Phycol.* 39, 874-879.
- McMinn A., Hegseth E.N. (2004). Quantum yield and photosynthetic parameters of marine microalgae from the southern Arctic Ocean, Svalbard. *Journal of the Marine Biological Association of the UK* 84: 865-871.
- Masseret E., Grzebyk D., Nagai S., Genovesi-Giunti B., Lasserre B., Laabir M., Collos Y., Vaquer A., Berrebi P. (2009). Unexpected biodiversity among and within populations of the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* revealed with nuclear microsatellite markers. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 2037-2045.
- Nan C., Zhang H., Lin S., Zhao G. et Liu X. (2008). Allelopathic effects of *Ulva lactuca* on selected species of harmful bloom-forming microalgae in laboratory cultures. *Aquatci Botany* 89 (2008) 9-15.
- Plus M. (2001). Thèse : Etude et modélisation des populations de macrophytes dans la lagune de Thau (Hérault, France).
- Ruiz Sebastián C., Etheridge S.M., Cook P.A., O’Ryan C., Pitcher G.C. (2005). Phylogenetic analysis of toxic *Alexandrium* (Dinophyceae) isolates from South Africa: implications for the global phylogeography of the *Alexandrium tamarense* species complex. *Phycologia* 44: 49-60.

Schagerl M, Unterrieder I, Angeler D.G, 2002. Allelopathy among cyanoprokaryota and other algae originating from Lake Neusiedlersee (Austria). *Int. Rev. Hydrobiol.* 87, 365-374.

Scholin C.A., Anderson D.M. (1994). Identification of group and strain-specific genetic markers for globally distributed *Alexandrium* (Dinophyceae). *Journal of Phycology* 30: 744–754.

Schmidt L.E Hansen P.J, 2001. Allelopathy in the prymnesiophyte *Chrysochromulina polylepis* : effect of cell concentration, growth phase and pH. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 216, 67-81.

Sharp J.H, Underhill P.A, Hughes D, 1979. Interaction (allélopathie) between marine diatoms: *Thalassiorira pseudonana* and *Phaeodactylum tricornutum*. *J. Phycol.* 15, 1-14.

Silkina A., Bazesa A., Vouvéb F., Le Tillyc V., Douzeneld P., Mouget JL. et Bourgougnon N. (2009) Antifouling activity of macroalgal extracts on *Fragilaria pinnata* (Bacillariophyceae): A comparison with Diuron. *Aquatic Toxicology* 94 (2009) 254-255.

Smayda T.J. (2007). Reflections on the ballast water dispersal-harmful algal bloom paradigm. *Harmful Algae* 6(4): 601-622.

Smayda T.J. (2008). Complexity in the eutrophication–harmful algal bloom relationship, with comment on the importance of grazing. *Harmful Algae* 8(1): 140-151.

Sukenik A, Eshkol R, Livne A, Hadas O, 2002. Inhibition of growth and photosynthesis of the dinoflagellate *Peridinium gatunense* by *Mirocystis* sp. (cyanobacteria) : a novel allelopathic mechanism. *Limnol. Oceanogr.* 47, 1656-1663.

Uchida T, Toda S, Matsuyama Y, Yamaguchi M, Kotani Y, Honjo T, 1999. Interactions between the red tide dinoflagellates *Heterocapsa circularisquama* and *Gymnodinium mikimotoi* in laboratory culture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 241, 285-299.

Van Alstyne K.L, Wolfe G.V, Freidenburg T.L, Neill A, Hicken C, 2001. Activated defense systems in marine macroalgae : evidence for an ecological role for DMSP cleavage. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 213, 53-65.

Vila M., Camp J., Garces E., Masó M., Delgado M. (2001). High resolution spatio-temporal detection of HABs in confined waters of the NW Mediterranean. *Journal of Plankton Research* 23:497-514.

Wang D.Z., Lin L., Gu H.F., Chan L.L., Hong H.S. (2008). Comparative studies on morphology, ITS sequence and protein profile of *Alexandrium tamarense* and *A. catenella* isolated from the China Sea. *Harmful Algae* 7(1): 106-113.

Wang R., Xiao H., Wang Y., Zhou W and Tang X. (2007). Effects of three macroalgae, *Ulva linza* (Chlorophyta), *Corallina pilulifera* (Rhodophyta) and *Sargassum thunbergii* (Phaeophyta) on the growth of the red tide microalga *Procentrum donghaiense* under laboratory conditions. *Journal of Sea Research* 58 (2007) 189-197.

Wang Y., Yu Z., Song X., Tang X., Zhang S., (2006). Effects of macroalgae *Ulva pertusa* (Chlorophyta) and *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta) on growth of four species of bloom-forming dinoflagellates. *Aquatic Botany* (2007) 139-147.

Yeung P.K.K., Wong F.T.W., Wong J.T.Y. (2002). Large subunit rDNA sequences from *Alexandrium catenella* strains isolated during algal blooms in Hong Kong. *Journal of Applied Phycology* 14:147-150.