

# THESE

Présentée en vue de l'obtention du grade de :

Docteur de l'Université Aix-Marseille

par :

**Julia VERGALLI**

---

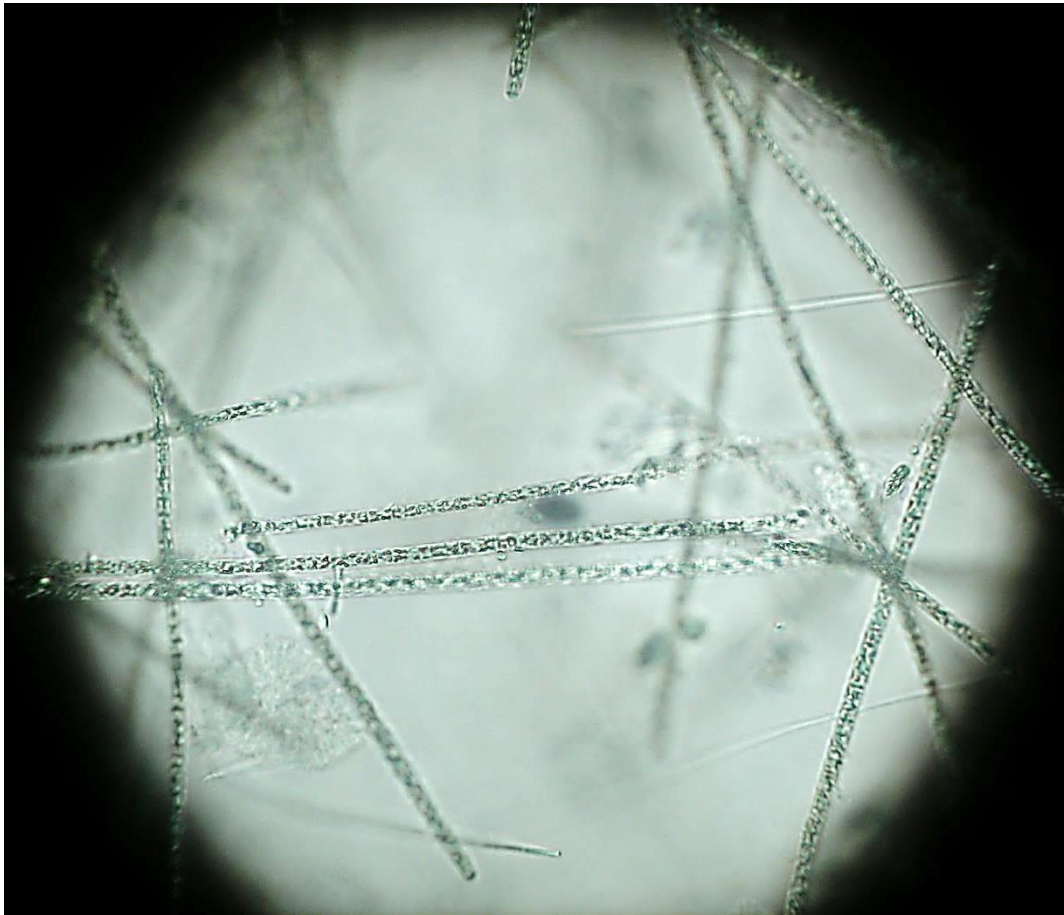
**Versatilité écologique de la cyanobactérie  
potentiellement toxique *Planktothrix agardhii* :  
Influence de la salinité?**

---

Soutenue le 12 juillet 2013 devant le comité d'examen :

<b>Evelyne FRANQUET</b>	Professeur, Université d'Aix-Marseille	<b>Directrice de thèse</b>
<b>Stéphanie FAYOLLE</b>	Maître de conférences, Université d'Aix-Marseille	<b>Co-directrice de thèse</b>
<b>Vanina PASQUALINI</b>	Professeur, Université de Corte	<b>Rapporteur</b>
<b>Suzana ROMO</b>	Professeur, Université de Valence, Espagne	<b>Rapporteur</b>
<b>Céline BERTRAND</b>	Maître de conférences, Université d'Aix-Marseille	<b>Examineur</b>
<b>Pierre MARMONIER</b>	Professeur, Université de Lyon 1	<b>Examineur</b>
<b>Hichem NASRI</b>	Maître de conférences, Université d'El Tarf, Algérie	<b>Examineur</b>
<b>Olivier RADAKOVITCH</b>	Maître de conférences, Université d'Aix-Marseille	<b>Examineur</b>







## Remerciements

---

Alors voilà...On y est ! L'aventure touche à sa fin ! Je remercie les personnes qui, de près ou de loin, ont participé à ce travail :

Je tiens à remercier avant tout, les membres de mon jury qui ont accepté d'évaluer ce travail, Vanina Pasqualini, Susanna Romo, Pierre Marmonier, Hichem Nasri, et Olivier Radakovitch.

Je remercie mes directrices de thèse Stéphanie Fayolle et Evelyne Franquet, ainsi que ma 'troisième directrice de thèse', Céline Bertrand, qui ont permis à ce travail d'aboutir, au-delà des périodes de doute!

Je remercie Mr Thierry Tatoni qui m'a accueillie au sein l'IMEP, (devenu IMBE) et a permis que cette thèse se réalise dans de bonnes conditions.

Je remercie les membres de l'équipe Ecologie des Eaux Continentales de l'IMBE pour l'aide qu'ils ont pu m'apporter et particulièrement Robert Garnier qui a contribué à la réalisation de mes très nombreuses analyses physico-chimiques en maniant le 'technicon' comme personne.

Je remercie Mireille du service commun de l'IMBE de s'être rendue disponible pour moi à chaque fois que j'en avais besoin.

Je remercie Katia Comte du Muséum d'Histoire Naturelle de Paris de m'avoir apporté son aide dans l'élaboration de mes protocoles expérimentaux, et d'avoir suivi mon travail lors de mes comités de pilotage de thèse.

Je remercie également Christophe Leboulanger de m'avoir guidé lors de ces comités.

Je remercie vivement Luc Brun, directeur du SIBOJAI, pour sa gentillesse et d'avoir œuvré au bon déroulement de mes missions de terrain.

Ces terrains n'auraient jamais été possibles sans l'aide de mon pilote sur le Bolmon, Philippe Giabiconi. Ta gentillesse et ta bonne humeur ont rendus ces terrains très attendus! Ta constante disponibilité et ton ingéniosité de Mac Gyver m'ont facilité la vie pendant ces deux années de terrain. Merci pour ces petits moments agréables !

Je remercie également le capitaine et le vice capitaine de la caserne de pompiers d'Istres d'avoir facilité mes sorties sur l'Olivier et d'avoir supporté les imprévisions météorologiques de

## Remerciements

---

l'organisation de ces terrains. J'en profite pour remercier tous les pompiers qui m'ont piloté et qui m'ont souvent aidé sur le terrain.

Un grand merci à mes deux acolytes-doctorants qui m'ont accompagné durant cette aventure :  
Merci à monsieur Roumieux, docteur, mon petit Camille, qui, le premier, m'a fait découvrir ma terre d'accueil. Peut-être, un jour, Lisbonne ?

Je ne sais pas comment remercier Stéphane Charpentier, qui, de collègue que je devais haïr, est devenu un ami très cher. Les raisons pour lequel je dois te dire merci est longue, alors  
...Merci pour tout ! Garde le Flex !

Je ne serais pas en train d'écrire ces lignes sans l'immense soutien que m'a apporté sans relâche mon précieux entourage :

Je dois à ma famille une infinité de mercis pour m'avoir supporté, dans les deux sens du terme, et d'avoir beaucoup plus cru en moi que moi. Vous avez vécu cette thèse de loin mais pourtant vous y êtes partout.

Merci à ma moitié de cerveau, ma colloque (c'est la fin d'une ère !), « ma femme », ma meilleure amie, d'être tout ça.

Merci à mes deux piliers qui apportent la preuve qu'un trio n'est pas bancal, Clotilde et Sandra, pour leur indéfectible amitié. Je dois à la science de vous compter dans ma vie.

Merci à mes amis de longues dates qui, bien que je me sois éloignée et ai été peu disponible durant cette thèse sont toujours à mes côtés.

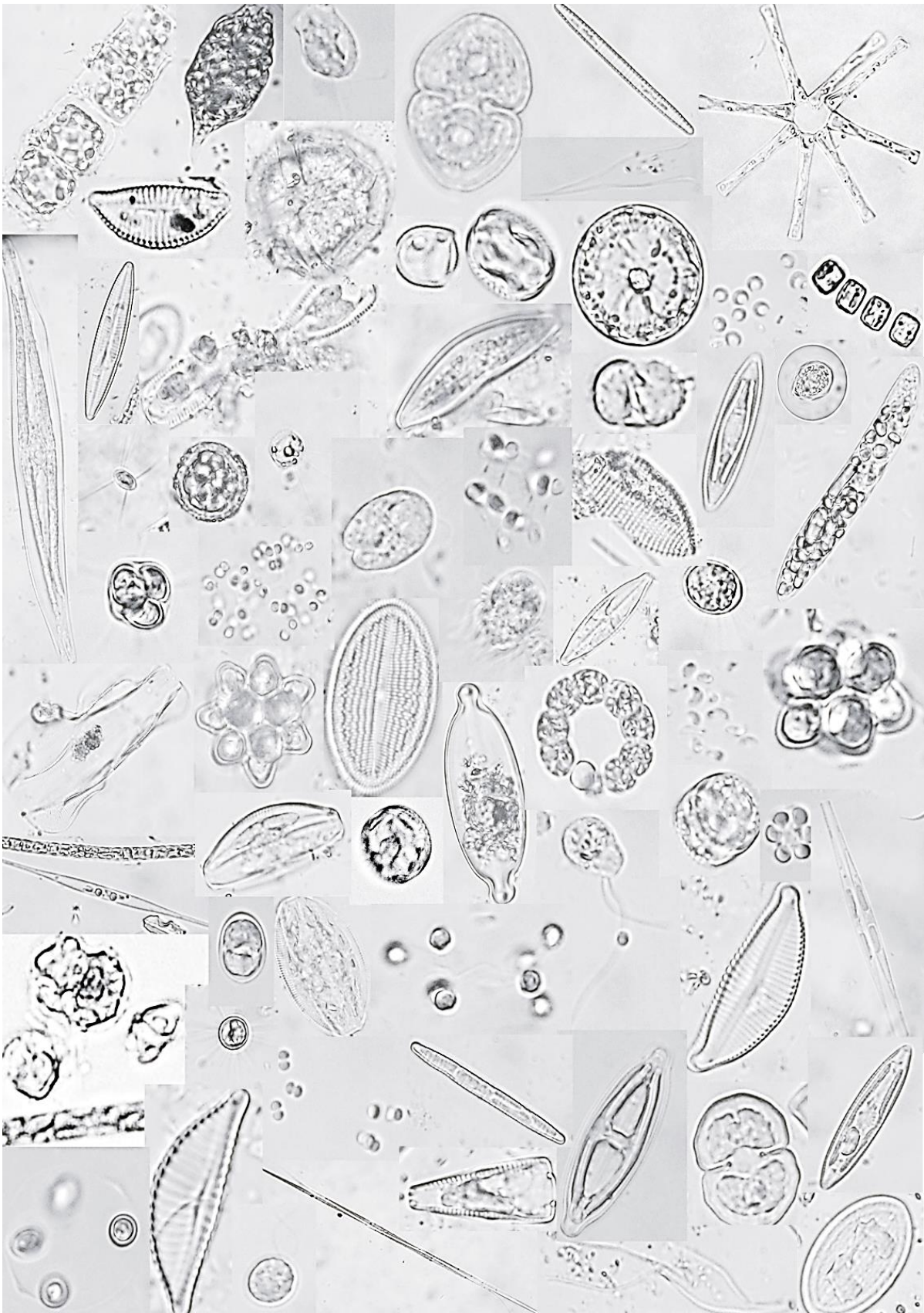
Et un merci à toi, qui ne savais pas dans quoi tu mettais les pieds, mais qui les a mis comme il fallait en me donnant tout le soutien et le réconfort dont j'avais besoin.

Ce travail n'aurait pas vu le jour sans vous, il vous est dédié.











*« Le commencement de toutes les sciences, c'est l'étonnement de ce que les choses sont ce qu'elles sont. »*

Aristote



<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>25</b>
1. Proliférations phytoplanctoniques.....	25
2. Le succès des cyanobactéries .....	26
2.1. Des cyanobactéries « Ecostratégistes ».....	26
2.2. L'acclimatation des cyanobactéries à la salinité .....	28
2.3. Les cyanotoxines .....	30
3. <i>Planktothrix agardhii</i> .....	32
4. Sites naturels et contexte de l'étude .....	34
5. contexte de réalisation de la recherche, objectif et questions posées .....	37
6. Annonce du plan .....	39

## CHAPITRE I

---

<b>Performance écologique d'une cyanobactérie dulçaquicole, <i>Planktothrix agardhii</i>, dans un milieu saumâtre .....</b>	<b>43</b>
A. INTRODUCTION.....	45
B. MATERIEL ET METHODES.....	49
1. Site d'étude.....	49
2. Stratégie d'échantillonnage .....	51
3. Paramètres environnementaux.....	52
3.1. Analyses réalisées sur le terrain .....	52
3.2. Analyses réalisées au laboratoire.....	53
4. Détermination et dénombrement des taxons phytoplanctoniques .....	54
4.1. Détermination spécifique .....	55
4.2. Densité cellulaire spécifique .....	55
4.3. Biovolume spécifique .....	56
5. Détermination des concentrations en microcystines (MC) .....	56
6. Analyses statistiques .....	57
C. RESULTATS .....	58
1. Variabilité des paramètres environnementaux .....	58
1.1. Variations des conditions climatiques .....	58
1.2. Variations des paramètres physico-chimiques de l'eau .....	61
1.1.1. Variations horizontales .....	61
1.1.2. Variations verticales.....	66

1.3. Distribution des stations échantillonnées en fonction des variables environnementales .....	68
2. Structure du peuplement phytoplanctonique .....	70
2.1. Richesse spécifique .....	70
2.2. Indices de Shannon (IS) et d'Equitabilité (IE) .....	71
2.3. Fréquence d'occurrence des espèces .....	72
3. Dynamique spatio-temporelle phytoplanctonique .....	75
3.1. Densités cellulaires et biovolumes phytoplanctoniques .....	75
3.2. Dynamiques spatio-temporelle du phytoplancton .....	77
3.2.1. <b>Dynamique horizontale</b> .....	78
3.2.2. <b>Dynamique verticale</b> .....	79
3.3. Succession saisonnière des espèces communes .....	83
4. Dynamique spatio-temporelle de la morphométrie de <i>Planktothrix agardhii</i> .....	84
5. Dynamique spatio-temporelle de la concentration en microcystines .....	87
6. Relations entre la concentration en MC et différents descripteurs du peuplement et de l'environnement.....	88
D. DISCUSSION.....	92

## CHAPITRE II

---

Détermination expérimentale de la valence écologique et du comportement toxinique de <i>Planktothrix agardhii</i> vis-à-vis du facteur salinité .....	109
---	-----

### PARTIE A

Salt tolerance of <i>Planktothrix agardhii</i> (Gomont) ANAGNOSTIDIS & KOMAREK (cyanoprokaryota) brackish strains in batch cultures.....	113
<b>INTRODUCTION</b> .....	116
<b>MATERIAL AND METHODS</b> .....	118
<b>RESULTS</b> .....	121
<b>DISCUSSION</b> .....	124

### PARTIE B

Salt acclimation allows the microcystin production of <i>Planktothrix agardhii</i> in brackish environments .....	139
<b>INTRODUCTION</b> .....	142
<b>MATERIAL AND METHODS</b> .....	144
<b>RESULTS</b> .....	147
<b>DISCUSSION</b> .....	149

### CHAPITRE III

---

## Quels sont les effets d'un stress halin sur le devenir de la cyanobactérie dominante *Planktothrix agardhii* dans un étang méditerranéen eutrophe ..... 165

A. INTRODUCTION.....	167
B. MATERIEL ET METHODES.....	170
1. Etang de Bolmon : site de validation .....	170
2. Stratégie d'échantillonnage .....	173
3. Base de données environnementales et phytoplanctoniques.....	174
4. Analyses statistiques .....	174
C. RESULTATS .....	176
1. Modification des paramètres environnementaux.....	176
1.1. Variation de la salinité moyenne de l'étang de Bolmon .....	176
1.2. Variation des paramètres environnementaux.....	176
2. Modifications de la dynamique saisonnière phytoplanctonique .....	178
2.1. D'un point de vue structural .....	178
2.2. D'un point de vue fonctionnel .....	181
3. Elargissement de la valence écologique de <i>Planktothrix agardhii</i> vis à vis du facteur salinité.....	186
D. DISCUSSION.....	188

## DISCUSSION GENERALE ..... 197

1. Originalité et intérêt de l'étude .....	197
2. Les populations de <i>Planktothrix agardhii</i> des étangs saumâtres de l'Olivier et de Bolmon sont acclimatées et/ou adaptées à la salinité .....	198
3. La morphométrie des filaments de <i>Planktothrix agardhii</i> comme un potentiel témoin de sa plasticité face à la salinité .....	201
4. Implications de l'acclimatation à la salinité de <i>Planktothrix agardhii</i> .....	203
4.1. L'acclimatation/adaptation à la salinité de <i>Planktothrix agardhii</i> assure sa suprématie en milieu saumâtre.....	203
4.2. L'acclimatation à la salinité de <i>Planktothrix agardhii</i> garantit sa production de MC en milieu saumâtre .....	205
5. L'effondrement de la suprématie de <i>Planktothrix agardhii</i> entraîne la rupture d'équilibre de la communauté phytoplanctonique de l'étang de Bolmon .....	212

6. Réflexions sur l'issue de la recherche dans son contexte local de réhabilitation des milieux.....	214
7. Réflexions sur l'issue de la recherche dans un contexte de changement global .....	217
Références bibliographiques .....	223
Annexes.....	247
Résumé.....	255



### INTRODUCTION

Figure 1. Exemple des processus cellulaires et protéines impliqués dans l'acclimatation à la salinité de la cyanobactérie halotolérante <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803. -----	29
Figure 2. Photos d'un filament (A) et d'une culture mono-spécifique (B) de <i>Planktothrix agardhii</i> prises avec un microscope optique, x 400. -----	32
Figure 3 Localisation de l'hydrosystème Olivier-Berre-Bolmon. -----	34
Figure 4 Photos de fleurs d'eau à <i>Planktothrix agardhii</i> sur l'étang de l'Olivier, 09 avril 2009. ----	36

### CHAPITRE I

Figure 1 Localisation de l'étang de l'Olivier. -----	49
Figure 2 Carte de l'hydrosystème Entressen-Olivier-Berre présentant leurs connexions hydriques. -----	50
Figure 3 Localisation des stations échantillonnées. -----	51
Figure 4 Variations des paramètres climatiques de février 2009 à octobre 2010. -----	59
Figure 5 Fréquence moyenne des vents dans les différents secteurs de la rose des vents. -----	60
Figure 6 Dynamique temporelle des paramètres physico-chimiques de l'eau mesurés de février 2009 à octobre 2010 au niveau des stations de surface échantillonnées. -----	61
Figure 7 Valeurs médianes, 1er et 3ème quartiles des paramètres physico-chimiques de l'eau mesurés au niveau des différentes stations échantillonnées. -----	63
Figure 8 Concentrations en nitrate et phosphate mesurées de février 2009 à octobre 2010 au niveau des stations de surface. -----	65
Figure 9 Variation des paramètres physico-chimiques de l'eau en fonction de la profondeur de la colonne d'eau centrale C de février 2010 à août 2010. -----	67
Figure 10 Concentrations en nitrate et phosphate mesurées de février à août 2010 au niveau des différentes profondeurs des colonnes d'eau C et D. -----	68
Figure 11 Ordination des stations échantillonnées en fonction des caractéristiques physico-chimiques de l'eau à partir d'une analyse en composante principale. -----	69
Figure 12 Proportion des espèces représentatives des différentes divisions phytoplanctoniques déterminées de février 2009 à octobre 2010. -----	70
Figure 13 Valeurs médianes, 1er et 3ème quartiles des indices de diversité au niveau de chaque station échantillonné. -----	71

## Liste des figures

---

Figure 14 Dynamique temporelle des valeurs médianes, 1er et 3ème quartiles des indices de diversité de février 2009 à octobre 2010 -----	72
Figure 15 Fréquence de l'occurrence moyenne des espèces par division phytoplanctonique --	73
Figure 16 Proportion des catégories d'espèces phytoplanctoniques selon leur constance. -----	73
Figure 17 Fréquence d'occurrence des espèces communes et accessoires de l'étang de l'Olivier de février 2009 à octobre 2010. -----	74
Figure 18 Valeurs médianes, 1er et 3ème quartiles des biovolumes (A) et des densités phytoplanctoniques (B) déterminées au niveau des stations de surface. -----	75
Figure 19 Corrélations entre les densités cellulaires et les biovolumes des différentes divisions phytoplanctoniques -----	76
Figure 20 Dynamique temporelle des biovolumes phytoplanctoniques mesurés au niveau des stations de surface (n=5), de février 2009 à octobre 2010. -----	76
Figure 21 Dynamique saisonnière des biovolumes phytoplanctoniques de l'hiver 2009 à l'automne 2010 en surface (A) et de février à août 2010 eu niveau des colonnes D (B) et C (C). -----	81
Figure 22 Proportion relative du biovolume de <i>Planktothrix agardhii</i> parmi le phytoplancton total de février 2009 à octobre 2010 au niveau des stations S1, S2 et S3 (A) et des colonnes D(B) et C (C).-----	82
Figure 23 Analyse factorielle des correspondances inter-dates entre les 21 espèces communes et accessoires. -----	83
Figure 24 Dynamique temporelle des biovolumes moyens des filaments de <i>P. agardhii</i> -----	84
Figure 25 Variations spatio-temporelles des longueurs et largeurs moyennes des filaments de <i>Planktothrix agardhii</i> -----	86
Figure 26 Concentrations en microcystines mesurées au niveau des différentes stations échantillonnées de mars à août 2010 -----	87
Figure 27 Comparaison des variations toxiques et du biovolume (BV) moyen des filaments de <i>Planktothrix agardhii</i> (A), du biovolume de la population de <i>Planktothrix agardhii</i> (B), du biovolume des cyanobactéries (C), et du biovolume phytoplanctonique (D). -----	88
Figure 28 ACP de la concentration en MC, des descripteurs de la population de <i>Planktothrix agardhii</i> et du peuplement total, et de 13 variables environnementales. -----	90

## CHAPITRE II

### PARTIE A

Figure 1 Effect of salinity on growth of *P. agardhii* 'Fresh' and 'Brack' strains. -----131

Figure 2 Mean lengths and widths of 'Fresh' and 'Brack' *P. agardhii* filaments over a 20-day period. -----131

### PARTIE B

Figure 1 Differences of the 'Brack' growth between salinities. -----157

Figure 2 LC-ESI-MS determination of the individual MC-variants detected in the 'Brack' strain. 157

Figure 3 Means of total MC concentrations ( $\mu\text{g.l}^{-1}$ ) in the 'Brack' populations in function of time. 157

Figure 4 Means of the 'Brack' MC quota ( $\mu\text{g}/\mu\text{m}^3$ ) in salinities ranging from 0 to 7.5  $\text{g.l}^{-1}$  in function of time.-----157

Figure 5 Correlation between the 'Brack' MC quota ( $\mu\text{g}/\mu\text{m}^3$ ) and the biomass ( $\text{chl}_a$  in  $\text{mg.l}^{-1}$ ) of the various experimental populations in salinities ranging from 0 to 7.5  $\text{g.l}^{-1}$  (n=36).-----157

Figure 6 Growth rates and MC production rates during the lag, the acceleration and the exponential growth phase of 'Brack' populations according to salinity.-----157

## CHAPITRE III

Figure 1 Localisation de l'étang de Bolmon.-----170

Figure 2 Localisation de l'hydrosystème Rove - Etang de Berre - Etang de Bolmon et de leurs connexions hydriques. -----171

Figure 3 Localisation des rejets d'eau douce de l'usine hydro-électrique EDF de Saint Chamas.172

Figure 4 Localisation des stations échantillonnées de l'étang de Bolmon. -----173

Figure 5 Variations de la salinité moyenne saisonnière de l'Etang de Bolmon de l'hiver 2005 (H05) à l'hiver 2007 (H07) et de l'hiver 2008 (H08) à l'automne 2010 (A10).-----176

Figure 6 Différences entre les moyennes annuelles de 2007, 2009 et 2010 des caractéristiques physico-chimiques de l'étang de Bolmon.-----177

Figure 7 Corrélation des différents paramètres physico-chimiques de l'eau avec le premier axe de l'ACP réalisée sur les stations échantillonnées durant les campagnes de 2007, 2009 et 2010.-----178

Figure 8 Modification de la dynamique saisonnière du phytoplancton d'un point de vue structural parallèlement aux variations de salinité observées de l'hiver 2005 à l'automne 2010.-----179

Figure 9 Modification de la dynamique saisonnière du phytoplancton d'un point de vue fonctionnel parallèlement aux variations de salinité observées de l'hiver 2005 à l'automne 2010.-----	182
Figure 10 Analyse factorielle des correspondances inter-dates entre les groupes fonctionnels déterminés au cours des saisons de 2006, 2007, 2009 et 2010. -----	183
Figure 11 Evaluation de l'état écologique de l'étang de Bolmon selon l'Indice d'assemblage phytoplanctonique (Q) défini par Padisák <i>et al.</i> [2006].-----	184
Figure 12 Relation entre la densité de <i>Planktothrix agardhii</i> et la salinité de l'étang de Bolmon en 2006, 2007, 2009 et 2010.-----	187

## DISCUSSION

Figure 1 Schéma envisageant les processus métaboliques impliqués dans les variations morphométriques des filaments d'une population de <i>Planktothrix agardhii</i> acclimatée à la salinité de l'environnement (A) et d'une population dulçaquicole (B), en milieu saumâtre.201	
Figure 2 Schéma présentant l'impact de l'environnement sur les différents niveaux de toxicité d'une population de cyanobactéries -----	205
Figure 3 Hypothèse de la conséquence de l'acclimatation à la salinité de <i>Planktothrix agardhii</i> sur sa performance à produire des efflorescences toxiques.-----	211

### Tables

---

#### CHAPITRE I

Table 1. Liste non exhaustive des travaux rapportant la présence de <i>Planktothrix agardhii</i> dans différents milieux. ....	47
--	----

#### CHAPITRE II

Table 1 Differences between 'Brack' and 'Fresh' growth descriptive parameters in different salinities. ....	132
Table 2 Differences in 'Brack' and 'Fresh' growth descriptive parameters between salinities. ---	133
Table 3 Differences between 'Brack' and 'Fresh' filament sizes in different salinities. ....	134

#### CHAPITRE III

Table 1 Listing des espèces phytoplanctoniques communes et accessoires déterminées durant la période d'étude dans l'étang de Bolmon. ....	185
---	-----

### Annexes

---

Annexe. A. Photos des différentes stations d'échantillonnage de l'étang de l'Olivier. ....	249
Annexe. B. Relevé des espèces phytoplanctoniques déterminées dans l'étang de l'Olivier de février 2009 à octobre 2010, de fréquence d'occurrence > 5%. ....	250
Annexe. C. Tableau non exhaustif des études réalisées dans le but de tester l'effet de l'environnement sur les différents niveaux de toxicité des cyanobactéries. ....	252









# INTRODUCTION GENERALE

## 1. Proliférations phytoplanctoniques

Le travail principal des écologistes consiste à tenter de prévoir la structure et la dynamique des communautés selon les conditions environnementales afin d'identifier les processus régissant le fonctionnement des écosystèmes.

L'étude de la communauté phytoplanctonique, en particulier, présente un intérêt évident ; celle-ci constituant la moitié de la production primaire, étant susceptible d'influencer le climat de la planète, impactant les cycles des éléments biogéochimiques, les réseaux trophiques des écosystèmes aquatiques et la qualité des eaux [Edwards, *et al.* 2013].

Dans un contexte de changement global impactant les écosystèmes, une meilleure compréhension des processus structurant les communautés phytoplanctoniques est indispensable. En effet, le phytoplancton constitue un bon indicateur des perturbations affectant les milieux aquatiques. Le phytoplancton est directement impacté par les facteurs physiques et chimiques. De plus, son taux de reproduction étant généralement rapide et son cycle de vie court, le phytoplancton répond vite aux changements. Les changements des assemblages phytoplanctoniques, qui vont avoir un impact direct sur la bio-intégrité du système entier, fournissent donc une estimation à fine échelle des changements dus aux impacts écologiques [Nöges, *et al.* 2010].

L'eutrophisation accélérée des milieux, due à l'anthropisation, augmente la fréquence et l'importance des proliférations phytoplanctoniques menant à la désorganisation du réseau trophique des écosystèmes aquatiques [Graneli & Turner 2006]. Ainsi, de nombreux écosystèmes aquatiques sont sujets à des proliférations phytoplanctoniques à travers la planète entière [Graneli & Turner 2006]. Celles-ci sont, à l'origine, une manifestation naturelle caractéristique d'un niveau trophique indissociable de l'évolution d'un corps d'eau. Cependant, aujourd'hui, la majorité des proliférations phytoplanctoniques sont devenues indicatrices d'un milieu ayant subi une pollution, ou, plus largement, une perturbation d'origine anthropique (les manifestations d'une eutrophisation naturelle étant par comparaison beaucoup plus rares) [Graneli & Turner 2006].

Il s'ajoute désormais au fait que les communautés phytoplanctoniques reflètent l'eutrophisation des milieux, l'intérêt de l'étude du phytoplancton en tant qu'indicateur et cible de premier plan du changement climatique dans les systèmes aquatiques [Huertas, *et al.* 2011]. En effet, les modifications climatiques affectent la composition et la taille des espèces, et favorisent les espèces dotées de caractéristiques les mieux adaptées aux conditions changeantes [Winder & Sommer 2012].

### 2. Le succès des cyanobactéries

Les efflorescences de cyanobactéries, notamment, présentent une intensité et une fréquence d'apparition accrues ces dernières décennies, en raison de l'eutrophisation accélérée des milieux aquatiques particulièrement favorable au développement des cyanobactéries [Heisler, *et al.* 2008] ; et conséquemment au changement climatique [Moore, *et al.* 2008; O'Neil, *et al.* 2012]. En effet, celui-ci procure un avantage écologique aux cyanobactéries sur les autres organismes phytoplanctoniques [Markensten, *et al.* 2010; Paerl & Huisman 2008; Paul 2008]. Le changement climatique prévu est considéré comme un catalyseur de l'expansion des efflorescences de cyanobactéries, principalement dans les milieux eutrophisés [Dokulil & Teubner 2000; Paerl & Huisman 2009; Paerl & Paul 2012].

#### 2.1. Des cyanobactéries « Ecostratégistes »

Les cyanobactéries colonisent la plupart des habitats de la planète, dont beaucoup sont considérés comme extrêmes [Seckbach 2007]. Elles colonisent les milieux aquatiques marins, saumâtres et continentaux [Whitton & Potts 2002], les zones arides, polaires, les sources chaudes, les cavernes ; elles peuvent être thermophiles, psychrophiles, halophiles, acidophiles, alcalinophiles, ou encore résistantes à la dessiccation et aux radiations UV [Chorus & Bartram 1999; Seckbach 2007].

Les cyanobactéries seraient apparues sur la planète il y a 2.15 milliards d'années [Rasmussen, *et al.* 2008]. Elles sont responsables de l'oxygénation de l'atmosphère terrestre, figurent parmi les producteurs primaires les plus importants et combinent la fixation du gaz carbonique et de l'azote atmosphérique.

Les cyanobactéries présentent une capacité à s'adapter et à s'acclimater à une grande variété de conditions, induisant le succès de ces compétiteurs performants dans les milieux aquatiques présents [Bhaya, *et al.* 2002; Dadheech 2010; Dokulil & Teubner 2000] ou futurs [Carey, *et al.* 2012]. Ce succès est assuré par la génération d'écotypes performants et par la plasticité des cyanobactéries [Stal 2007].

L'appartenance au monde bactérien des cyanobactéries leur confère une capacité à évoluer rapidement afin de coloniser un nouvel environnement. La grande taille des populations bactériennes, doublée d'un faible temps de génération, leur procure la capacité de générer rapidement des écotypes avec des tolérances environnementales différentes, renforçant leur comportement invasif et leur succès au sein du phytoplancton.

La supra-dominance des cyanobactéries est toutefois principalement due à la plasticité exceptionnelle de leurs traits morphologiques et physiologiques provenant de leur versatilité métabolique (expression différentielle des gènes selon le choix entre différentes voies métaboliques) [Stal 2007]. Celle-ci permet aux cyanobactéries de répondre à l'environnement et donc de maintenir une forte 'fitness' dans une grande gamme de conditions environnementales [Litchman, *et al.* 2010]. De plus, cette flexibilité de réponse se produit rapidement, intégrant instantanément la situation écologique. C'est au cours de leur longue évolution, que les cyanobactéries ont développé cette plasticité leur conférant des avantages compétitifs sur le reste de la communauté phytoplanctonique.

Par exemple, les cyanobactéries sont capables de capter les faibles luminosités dans une large gamme de longueurs d'ondes, de s'adapter chromatiquement en changeant la proportion des pigments de leurs phycobilisomes, de résister à la dénaturation thermique en déplaçant le maximum d'absorption de la lumière. Certaines espèces peuvent aussi passer en mode anoxygène ou sont capables de fermenter. Les cyanobactéries produisent de nombreux composés de stockage, comme du glycogène (Carbone), des polyphosphates, et les phycobiliprotéines peuvent également servir de stock d'azote. Elles peuvent avoir des vésicules gazeuses leur permettant de contrôler leur flottaison. Les cyanobactéries peuvent aussi différencier des cellules : Elles peuvent former des hétérocystes, cellules fixatrices d'azote atmosphérique, des cellules de résistance comme les akinètes qui germent lorsque les conditions de l'environnement sont redevenues favorables à l'organisme, et des hormogonies

qui assurent la dispersion de l'organisme. Les cyanobactéries ont également développé des stratégies d'assemblage et de reproduction (fission binaire, divisions multiples, divisions dans plusieurs plans) induisant leur diversité morphologique : Certaines espèces s'organisent en colonies formant des plaquettes ou des cubes dont le contrôle de la position permet d'adapter la réception de la lumière, elles peuvent former des biofilms en ancrant leurs cellules dans une matrice mucilagineuse (Substances Polymériques Extracellulaires, cas des espèces unicellulaires) ou une gaine (cas des espèces filamenteuses) qui leur permettent une vie benthique, de retenir de l'eau ou des nutriments et de se protéger des fortes luminosités ou des composés toxiques [Stal 2007].

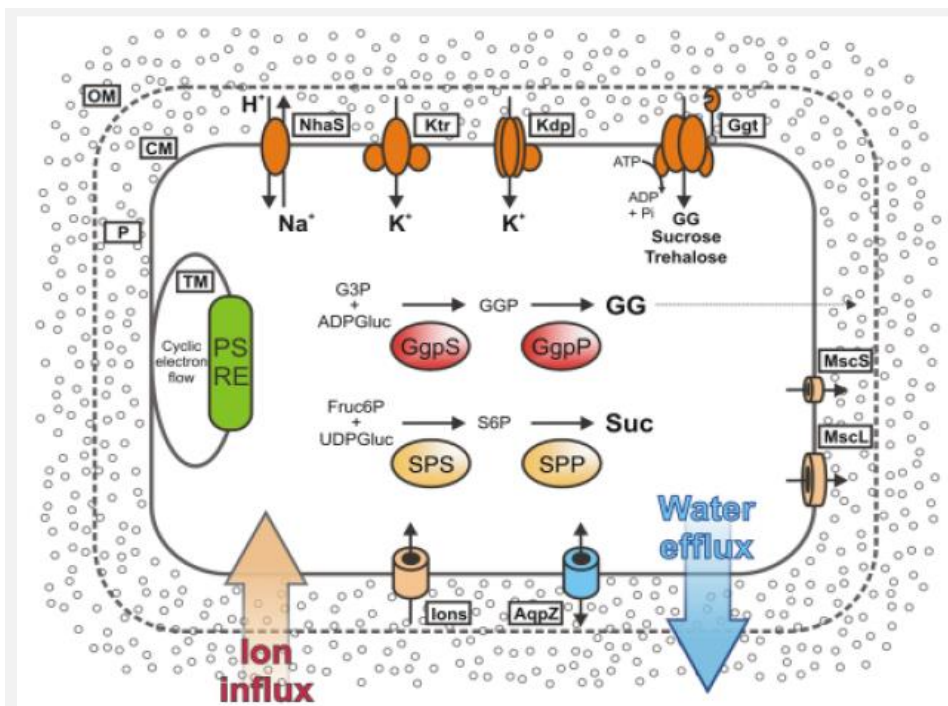
Les cyanobactéries se définissent donc comme des organismes « écostratégistes » pouvant adopter plusieurs comportements qui les conduisent à dominer les peuplements phytoplanctoniques à travers le monde entier.

### 2.2. L'acclimatation des cyanobactéries à la salinité

La stratégie utilisée par les cyanobactéries lorsque la salinité de leur environnement augmente, consiste majoritairement à maintenir l'équilibre osmotique entre le cytoplasme cellulaire et le milieu par un 'efflux' actif des sels alors considérés comme toxiques pour la cellule, et à accumuler dans le cytoplasme des composés osmotiques organiques de faibles poids moléculaires appelés 'compatible solutes'. Cette appellation provient du fait que leur présence, même en grande quantité, n'inhibe pas l'activité enzymatique et n'interfère donc pas avec le métabolisme cellulaire [Oren 2007]. Les cyanobactéries synthétisent une grande variété de 'compatible solutes'. La limite de l'halotolérance des cyanobactéries varie principalement en fonction du type de 'compatible solute' synthétisé. Ainsi, il est habituel que les cyanobactéries de faible halotolérance produisent des molécules de sucrose et/ou de tréhalose, celles présentant une halotolérance modérée produisent du glucosylglycérol, et les cyanobactéries halophiles accumulent des molécules de glycine betaine ou de glutamate betaine [Oren 2007]. Si ces composés sont les plus communément retrouvés, il en existe une variété d'autres qui, ajoutés aux premiers, permettent aux cyanobactéries d'augmenter leur halotolérance. Les génomes de cyanobactéries connus encodent tous au moins une enzyme permettant la synthèse de

sucrose, expliquant pourquoi toutes les cyanobactéries peuvent tolérer une certaine salinité [Hagemann 2011].

L'acclimatation au sel des cyanobactéries est un processus dynamique qui consiste en l'activation/inactivation de nombreuses enzymes et transporteurs, impliquant la modification de l'expression d'une multitude de gènes (**Figure 1**). Ce processus mène, au bout de 24 heures seulement, à l'acclimatation des cellules de cyanobactérie à la nouvelle salinité du milieu, cellules se caractérisant par une très faible concentration ionique cellulaire et une forte concentration de 'compatibles solutes' [Hagemann 2011].



**Figure 1.** Exemple des processus cellulaires et protéines impliqués dans l'acclimatation à la salinité de la cyanobactérie halotolérante *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Sont schématisées les protéines impliquées dans :

Les flux d'eaux après un choc hyper- ou hypo-osmotique (AqpZ, NhaS, Kdp),

l'homéostasie ionique (Ktr, Nha, Kdp),

la biosynthèse (GgpS, GgpP, Sps, Spp) et le transport (Ggt) des 'compatibles solutes',

les processus bioénergétiques (PS et RE).

(PS : photosynthèse, RE : Respiration, ADPGluc : ADP-Glucose, UDPGluc : UDP-Glucose, S6P:sucrose-6-phosphate, Fru6P : fructose-6-phosphate, OM : membrane externe, CM : membrane cytoplasmique, TM : membrane des thylakoïdes, P : périplasme).

Source : [Hagemann 2011].

Peu de gènes et protéines impliqués dans l'acclimatation à la salinité des cyanobactéries sont à ce jour identifiés ; cependant, il apparaît certain que cette acclimatation est due à de nombreux processus cellulaires impliquant de nombreux gènes.

Le degré de tolérance à la salinité d'une cyanobactérie est le résultat de l'acquisition et/ ou de la perte de plusieurs gènes, phénomènes se produisant relativement fréquemment par des transferts latéraux de gènes entre cyanobactéries et/ou d'autres procaryotes [Hagemann 2011].

### 2.3. Les cyanotoxines

Les efflorescences de cyanobactéries entraînent de nombreuses nuisances qui sont à l'origine de perturbations de l'ensemble du réseau trophique, telles que l'apparition de crises d'anoxie, la diminution de la diversité phytoplanctonique, le déséquilibre de l'ensemble de la chaîne trophique, l'augmentation de la turbidité de l'eau et de la production primaire, et la production de composés odorants [Havens 2008]. A ces conséquences néfastes pour l'écosystème, s'ajoute la capacité des cyanobactéries à produire des toxines qui sont une source de danger pour la faune et l'homme [Carmichael 2001; Chorus & Bartram 1999; Codd, *et al.* 2005; Ibelings & Chorus 2007].

Des efflorescences toxiques de cyanobactéries sont recensées depuis une centaine d'années [Sivonen & Jones 1999]. Le type de toxine et la quantité de toxine produite lors de ces efflorescences sont extrêmement variables. De nombreux genres de cyanobactéries peuvent synthétiser plusieurs types de toxines, et un même type de toxine peut être produit par plusieurs genres de cyanobactéries [Sivonen & Jones 1999]. La structure et la synthèse des cyanotoxines sont aujourd'hui connues, témoignant de la complexité et la diversité de ces métabolites secondaires. Au moins 75 espèces de cyanobactéries sont décrites comme productrices de toxine [Thomazeau 2010]. Cependant, des cyanotoxines et des variants de cyanotoxines continuent d'être découverts, pointant l'absence d'un listing exhaustif et masquant la réelle diversité existant au sein des cyanotoxines. Les cyanotoxines peuvent être regroupées en quatre classes majeures selon leur mode d'action toxicologique : Les neurotoxines, les hépatotoxines, les cytotoxines et les dermatotoxines [Pearson, *et al.* 2010].

La microcystine (MC), une hépatotoxine, est la cyanotoxine la plus fréquemment rencontrée dans les milieux tempérés touchés par les efflorescences de cyanobactéries [Sivonen & Jones 1999], les genres *Microcystis* et *Planktothrix* étant les plus fréquemment mis en cause [Chorus & Bartram 1999]. Elle consiste en une molécule heptapeptidique cyclique synthétisée de façon non-ribosomale par un complexe enzymatique multifonctionnel. Les microcystines présentent

la plus grande hétérogénéité structurale parmi les cyanotoxines. Aujourd'hui, environ 90 isoformes de toxicité différente sont répertoriés ; ils se distinguent par leur séquence peptidique, leur stéréochimie et le degré de méthylation du cycle peptidique [Pearson, *et al.* 2010].

La MC a été impliquée dans plusieurs épisodes d'empoisonnement animal et humain [Carmichael 1992]. Après ingestion, la MC est transportée vers le foie où les 2 groupements communs aux MCs (groupements Adda et Mdha) se lient aux protéines phosphatases, bloquant ainsi l'activité phosphatase des protéines eucaryotes. Cette inhibition mène à la phosphorylation excessive des filaments d'actine et donc à la dégradation du cytosquelette et de la structure du foie. Une exposition chronique à la MC peut également induire des tumeurs, ainsi qu'un carcinome hépatique chez l'homme [Pearson, *et al.* 2010].

Les microcystines ne sont pas des molécules nécessaires au métabolisme primaire des cyanobactéries (d'où l'appellation de métabolite secondaire) [Carmichael 1992]. Cependant, leur fonction biologique reste inconnue et le sujet de nombreuses hypothèses [Kurmayer, *et al.* 2011]. La principale hypothèse consiste à considérer que la production de toxine augmenterait la compétitivité des cyanobactéries dans le milieu. Selon cette hypothèse, les toxines limiteraient le développement de potentiels compétiteurs pour les ressources ainsi que des prédateurs via un fonctionnement allélopathique [Leao, *et al.* 2009]. Une autre hypothèse, classiquement envisagée, consiste à donner aux MCs un rôle de régulateur des fonctions métaboliques des cyanobactéries tel que la capture du fer ou la régulation de la photosynthèse [Jahnichen, *et al.* 2007; Lyck 2004; Rapala, *et al.* 1997]. D'autres hypothèses envisagent la possibilité d'un processus de communication entre les cellules de type 'quorum sensing', ou simplement la réponse face à un stress environnemental.

La recherche reste également confrontée à la problématique complexe du déterminisme des efflorescences de cyanobactéries toxiques afin d'évaluer le risque qu'elles constituent et tenter de les contrôler, ou, à défaut, de les prévoir [Jones & Chorus 2001]. Cette étude de gestion des efflorescences toxiques apparaît difficile, notamment en raison de la variabilité du niveau de toxicité *in situ*.

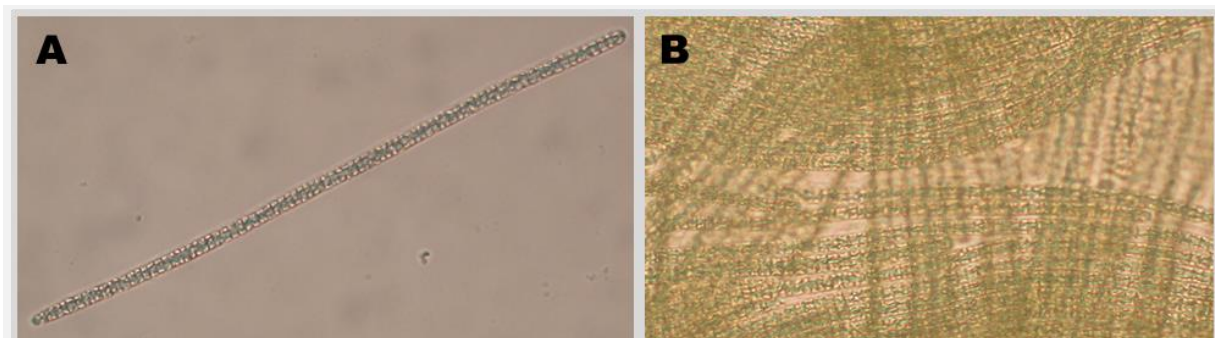
La concentration de cyanotoxine dans un environnement aquatique est dépendante du turnover des espèces de cyanobactéries possédant les gènes fonctionnels de biosynthèse de la toxine (diversité génétique des populations) [Mbedi, *et al.* 2005], de la biomasse des

cyanobactéries potentiellement productrices de cyanotoxine, et des concentrations produites par les cellules des organismes producteurs (état physiologique de l'individu) [Downing, *et al.* 2005; Orr & Jones 1998]. Enfin, le niveau de toxicité est non seulement dépendant de la cyanotoxine d'un point de vue quantitatif, mais également d'un point de vue qualitatif puisqu'il varie selon les types de variants de toxine en présence [Rapala, *et al.* 1997; Tonk, *et al.* 2005]. La coexistence de ces différents facteurs est sous la dépendance des conditions environnementales.

### 3. *Planktothrix agardhii*

*Planktothrix agardhii* est une des cyanobactéries formant des efflorescences hépatotoxiques les plus communément rencontrées dans les lacs peu profonds [Nixdorf, *et al.* 2003; Paerl, *et al.* 2011] des milieux tempérés [Scheffer, *et al.* 1997].

*Planktothrix agardhii* est une espèce de cyanobactérie filamenteuse, droite et isolée, de l'ordre des Oscillatoriales [Anagnostidis & Komárek 1988] (**Figure 2**).



**Figure 2.** Photos d'un filament (A) et d'une culture mono-spécifique (B) de *Planktothrix agardhii* prises avec un microscope optique, x 400.

*Planktothrix agardhii* fait partie du groupe fonctionnel 'S1' [Reynolds, *et al.* 2002] contenant les espèces tolérant des conditions de luminosité limitantes [Havens, *et al.* 1998] et dont les habitats sont caractérisés par une forte turbidité, une colonne d'eau continuellement brassée [Kruk, *et al.* 2002], sans stratification [Rücker, *et al.* 1997]. Elle se développe préférentiellement dans les milieux aquatiques dulçaquicoles peu profonds, d'où son profil écologique d'«espèce à stratégie démographique d'eau douce» [Mur, *et al.* 1999].



D'une manière générale, l'espèce prolifère et domine le phytoplancton en été et/ou en automne [Budzynska, *et al.* 2009; Chorus & Bartram 1999; Rucker, *et al.* 1997]. Le plus souvent, elle forme des efflorescences mono-spécifiques et persiste tout au long de l'année. Cependant, *Planktothrix agardhii*, étant pourvue de vacuoles gazeuses qui lui permettent de réguler son niveau de flottaison et de produire d'importantes biomasses dans la colonne d'eau, sa dynamique verticale ne doit pas être négligée pour expliquer ses efflorescences et donc sa supra-dominance [Sivonen & Jones 1999].

L'espèce peut être un composant rare comme dominant du phytoplancton, avec une possibilité d'un passage très rapide d'un état à l'autre. Toutefois l'espèce est généralement dominante dans des milieux eutrophes avec une persistance et une résilience expliquées par un processus hystérétique [Scheffer, *et al.* 1997]. Sa dominance parmi le phytoplancton est souvent corrélée à des concentrations en phosphore  $> 50 \mu\text{g.l}^{-1}$  [Bonilla, *et al.* 2012] avec une contribution au phytoplancton qui augmente à partir de  $30 \mu\text{g.l}^{-1}$  [Dokulil & Teubner 2000].

La luminosité du milieu est un des paramètres principaux conduisant à la dominance de *Planktothrix agardhii*, l'espèce tolérant de très faibles luminosités expliquant sa prédisposition à être recensée en milieu turbide [Dokulil & Teubner 2000], comme le sont typiquement les Oscillatoriales [Scheffer, *et al.* 1997]. Les communautés phytoplanctoniques dominées par *Planktothrix agardhii* présentent alors une faible diversité en raison de la capacité de l'espèce à générer des conditions limitantes pour les compétiteurs potentiels (elle crée une forte turbidité par auto-ombrage, diminuant ainsi l'intensité lumineuse).

*Planktothrix agardhii* tolère également une large gamme de températures ( $< 2^\circ\text{C}$  à  $31^\circ\text{C}$ ), jusqu'à être capable de se maintenir sous la glace [Sivonen & Jones 1999], et supporte de grandes variations de température [Bonilla, *et al.* 2012]. Son optimum de température est situé entre  $20$  et  $25^\circ\text{C}$  [Oberhaus, *et al.* 2007a].

#### 4. Sites naturels et contexte de l'étude

L'étude de ce manuscrit s'appuie sur deux sites d'études : Les étangs méditerranéens de Bolmon et de l'Olivier. Ces deux étangs sont situés en France, respectivement à environ 20 et 60 km au nord-ouest de Marseille. Ils sont tous les deux localisés sur le pourtour de l'étang de Berre (Figure 3).

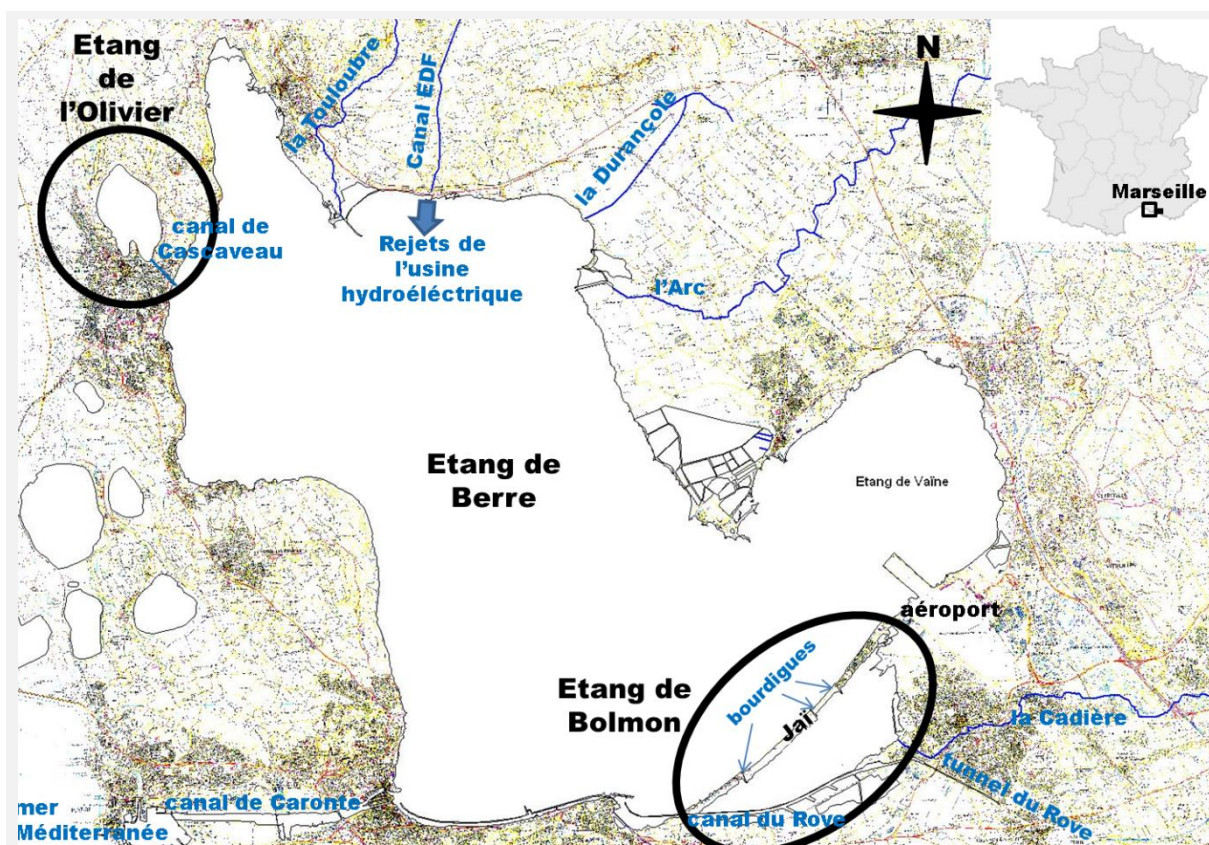


Figure 3 Localisation de l'hydrosystème Olivier-Berre-Bolmon.

Source de la carte avant modification : GIPREB ([http://www.pole-lagunes.org/ftp/web/Carte\\_Berre\\_bolmon.jpg](http://www.pole-lagunes.org/ftp/web/Carte_Berre_bolmon.jpg))

L'étang de Berre, avec ses 15500 hectares (profondeur moyenne de 6 mètres, 900 millions de m<sup>3</sup>) est l'un des plus grands étangs d'eau saumâtre d'Europe. Creusé par l'érosion il y a 8000 ans, il est alimenté en eau douce par la Touloubre, l'Arc et la Durançole, et en eau salée par le canal de Caronte (Il était également alimenté en eau salée par le canal du Rove jusqu'à l'éboulement d'une partie de son tunnel en 1963). Depuis 1966, un canal usinier EDF établi à Salon-Saint-Chamas, rejette des limons et de l'eau douce dans l'étang, modifiant ainsi l'écosystème. De plus, le bassin versant de l'étang de Berre (1630 km<sup>2</sup>) a été fortement investi par les activités humaines : Il est le lieu d'une forte urbanisation et d'un fort développement industriel, avec l'installation de raffineries, de complexes pétrochimiques et sidérurgiques.

L'étang de Berre subit ainsi trois types de pollution : l'eutrophisation du milieu, la contamination par des éléments chimiques (hydrocarbures et métaux lourds (plomb, mercure, cadmium, cuivre, chrome, Arsenic, Nickel)) et la diminution et la variabilité de la salinité induite par les rejets d'eau douce de l'usine hydro-électrique. Des efforts de gestion pour la réhabilitation de l'étang, coordonnés par le GIPREB (Groupement Intérêt Public pour la Réhabilitation de l'étang de Berre), ont été réalisés afin d'améliorer la qualité de l'eau, de la faune et de la flore de l'écosystème. Pour se mettre en conformité avec les dispositions de la réglementation européenne, la France a modifié le cahier des charges de la concession EDF pour l'exploitation des centrales de Salon-Saint-Chamas. Depuis 2006, EDF a mis en place une nouvelle régulation des rejets d'eau douce à l'échelle hebdomadaire visant à atténuer les variations de salinité. Pour l'essentiel, les nouvelles mesures consistent à baisser les apports d'eau douce de 2,1 à 1,2 milliards de m<sup>3</sup>/an et les rejets de limons de 100000 à 60000 tonnes/an, ainsi qu'à mettre en œuvre un contrôle réglementaire strict sur la qualité des eaux. Cependant, l'étang de Berre reste dans un mauvais état écologique, avec, notamment, une faible transparence de l'eau, la disparition des herbiers, une faune benthique pauvre, une faible diversité zooplanctonique et la prolifération d'ulves. Le problème de gestion des rejets d'eaux douces reste au centre des préoccupations actuelles. En 2011, la salinité de l'étang variait encore entre 14 et 35 g.l<sup>-1</sup>. Différentes solutions de gestion sont à l'étude, comme la dérivation du canal EDF vers le Rhône ou la réouverture du tunnel du Rove qui permettrait l'arrivée d'eau salée en provenance de la mer.

L'étang de l'Olivier et l'étang de Bolmon présentent également un état avancé d'eutrophisation et sont régulièrement le siège de proliférations algales.

**L'étang de Bolmon** est une lagune secondaire de 578 hectares, peu profonde (profondeur maximale de 2 mètres), semi-fermée. L'étang est connecté au nord à l'étang de Berre via 3 bourdigues (petits canaux) (une seule ouverte pendant la période d'étude) creusées dans le cordon sableux du Jaï séparant les deux étangs, et connecté au sud via deux passes dans le canal du Rove (canal reliant l'étang de Berre à la rade de Marseille avant l'éboulement de sa partie souterraine en 1963). Il reçoit également 30 millions de m<sup>3</sup>/an d'eau douce provenant de la Cadière. L'étang de Bolmon est une zone d'intérêt écologique (ZNIEFF et Natura 2000). Il présente depuis plusieurs années un état très dégradé avec de fréquents épisodes de

prolifération phytoplanctonique, la quasi-absence des herbiers et de la faune benthique, une faible diversité du zooplancton et des poissons.

L'étang est fermé aux activités de pêche et de baignade depuis 2000. La restauration de cet étang est l'un des objectifs programmés par le Conservatoire du littoral et son gestionnaire le SIBOJAI (Syndicat Intercommunal du Bolmon et du Jaï) en vue d'un retour à un meilleur état écologique. Cette restauration repose, entre autres, sur des modifications qualitatives et quantitatives du peuplement phytoplanctonique. Tout comme pour l'étang de Berre, la réouverture du canal du Rove est également envisagée comme potentialité de gestion de l'étang de Bolmon.

**L'étang de l'Olivier** est un étang saumâtre de 225 hectares avec une profondeur maximale de 11 mètres. Il reçoit des eaux douces de l'étang d'Entressen, étang limnique situé au nord-ouest de l'étang de l'Olivier, et des eaux saumâtres de l'étang de Berre via le canal de Cascaveau. Cependant, les échanges hydriques avec ce dernier se font dans le sens de l'étang de l'Olivier vers l'étang de Berre sous l'action des vents dominants. L'étang de l'Olivier est fortement eutrophisé. Il présente un état dégradé marqué par une forte turbidité, des périodes d'anoxie du milieu et des proliférations récurrentes de *Planktothrix agardhii* (**Figure 4**).



**Figure 4** Photos de fleurs d'eau à *Planktothrix agardhii* sur l'étang de l'Olivier, 09 avril 2009.

Les deux étangs sont le lieu d'activités récréatives ; ils constituent un fort attrait touristique et une richesse écologique. Le retour à des conditions écologiques acceptables de ces étangs est indispensable dans une perspective de développement durable.

Afin de répondre aux questions posées dans cette recherche les étangs de Bolmon et de l'Olivier servent de sites d'étude : Ces deux étangs sont saumâtres, dominés par *Planktothrix*

*agardhii* depuis plusieurs années, soumis à un climat méditerranéen et sont situés en zone littorale, ils constituent de bons systèmes pour l'étude du phytoplancton dans un contexte de changement global.

### 5. contexte de réalisation de la recherche, objectif et questions posées

Le déterminisme des proliférations phytoplanctoniques et de la toxicité de ces efflorescences devient d'une importance croissante sous des conditions environnementales se modifiant rapidement sous l'action du changement global anthropogénique.

Dans ce contexte, quelques questions nous ont interpellées :

Quelles seront la composition et la dynamique phytoplanctoniques dans un futur plus ou moins proche ? Y-aura-t-il des espèces nocives et létales pour l'écosystème ou l'homme? Quels sont les processus régissant leur prolifération ? Quelle gestion pour limiter ces proliférations ?

Si le changement global risque d'accentuer l'eutrophisation croissante des milieux et le réchauffement climatique, il inclue également la salinisation progressive des milieux et l'augmentation de la fréquence d'évènements climatiques constituant un stress pour les écosystèmes. De plus en plus d'études arrivent à la conclusion que les cyanobactéries, écostratégistes assurant leur succès parmi le phytoplancton, sont susceptibles de persister et d'être avantagées sous l'action de l'eutrophisation persistante des milieux et du réchauffement climatique à venir. Sont-elles également susceptibles de tolérer la salinisation des milieux ? Quelle sera leur capacité toxique dans ce nouvel environnement ?

Les écosystèmes aquatiques côtiers constituent des sites appropriés à l'étude de l'effet d'un environnement changeant. Les zones côtières, déjà particulièrement affectées par l'eutrophisation et l'anthropisation en général, seront de plus en plus susceptibles d'être affectées par l'augmentation des températures de l'eau, l'augmentation de fréquence des raz de marées, et les modifications de précipitation [IPCC 2007]. Le fonctionnement des écosystèmes aquatiques côtiers risque vraisemblablement d'être particulièrement touché par le changement climatique global. Quel sera le comportement des cyanobactéries peuplant ces milieux en cas de stress halin ?

L'objectif de l'étude est d'évaluer l'effet de la salinité sur la performance et la supra-dominance au sein de la communauté phytoplanctonique d'une cyanobactérie dulçaquicole formant des efflorescences toxiques, à savoir *Planktothrix agardhii*. Ceci dans le but d'apporter des précisions sur l'écologie de l'espèce face à des paramètres physico-chimiques majeurs dans deux milieux naturels (un étang ne subissant pas de variations de salinité et un étang soumis à de fortes variations de salinité) et en milieu contrôlé.

Les questionnements et hypothèses seront les suivants :

- (i) Quel succès écologique révèle *Planktothrix agardhii* dans un écosystème profond et oligohalin (étang de l'Olivier) ? Ces paramètres sont-ils un facteur clé dans sa production toxinique ?
- (ii) Quelles sont les limites de tolérance à la salinité de cette cyanobactérie en milieu contrôlé ? Adopte-t-elle une morphologie différente selon la salinité de son milieu ?
- (iii) En milieu contrôlé, la production toxinique de *Planktothrix agardhii* répond-elle de la même façon selon la salinité de son milieu ?

Ces trois points de questionnement reposent sur les hypothèses imbriquées suivantes : (i) la salinité ne constitue pas un frein ni à la supra-dominance du phytoplancton de l'étang de l'Olivier par *Planktothrix agardhii*, ni à sa production de toxines; car (ii) *Planktothrix agardhii* vivant en milieu saumâtre s'acclimate ou s'adapte à la salinité de son milieu et élargit et/ou décale sa valence écologique vis-à-vis du facteur salinité, et car (iii) sa production toxinique étant indirectement reliée à sa croissance, *Planktothrix agardhii* acclimaté à la salinité conserve sa capacité à produire des toxines en milieu saumâtre.

- (iv) Quels seront les effets d'un stress halin en milieu naturel sur l'ensemble de la communauté phytoplanctonique d'un point de vue structural et fonctionnel ?

L'hypothèse de départ répondant à cette question repose sur l'observation de la disparition de *Planktothrix agardhii* durant l'année 2007, consécutivement à une forte augmentation de la salinité dans l'étang de Bolmon suite à une modification de gestion des rejets d'eau douce dans l'étang de Berre. Inversement, l'étang de l'Olivier n'a pas été impacté par la nouvelle politique de gestion, et présente des conditions abiotiques et une dynamique du peuplement, dominé par *Planktothrix agardhii*, relativement stable depuis plusieurs années. L'hypothèse fondée sur ces

observations est alors que la salinité est le facteur environnemental principal expliquant les différences phytoplanctoniques qui existent aujourd'hui entre les deux étangs : Elle a franchi, dans l'étang de Bolmon uniquement, le seuil de tolérance à la salinité de *Planktothrix agardhii* préalablement dominante, entraînant la modification structurale et fonctionnelle du peuplement phytoplanctonique total.

Les questions posées dans cette recherche s'intègre dans un contexte général de changement global, ainsi que dans un contexte de réhabilitation de l'étang de Bolmon, pour lequel se pose la question de savoir si un mode de gestion par ajustement d'entrée d'eau salée va réguler la biomasse phytoplanctonique, modifier le peuplement phytoplanctonique et rétablir une bonne qualité d'eau.

### 6. Annonce du plan

Ce manuscrit s'articule en trois chapitres qui s'organisent de la façon suivante :

Dans un premier temps, l'autoécologie et la concentration de microcystines produites par la cyanobactérie *Planktothrix agardhii* dans l'étang de l'Olivier seront étudiées. On s'interrogera sur le succès de *Planktothrix agardhii* parmi le phytoplancton et sur sa capacité à présenter des caractéristiques écologiques similaires à celles de l'espèce vivant en milieu dulçaquicole tempéré des pays de l'hémisphère Nord.

Dans un deuxième temps, la valence écologique vis-à-vis du facteur halin de souches de *Planktothrix agardhii* vivant en milieu saumâtre sera établie expérimentalement. Cette valence écologique sera comparée à celle de souches de *Planktothrix agardhii* issues d'eaux douces. On s'interrogera ensuite sur l'effet de la salinité du milieu sur la production qualitative et quantitative de microcystines par cet écotype saumâtre.

Dans un troisième et dernier temps, la valence écologique, établie expérimentalement, de *Planktothrix agardhii* vivant en milieu saumâtre sera validée *in situ*, dans l'étang de Bolmon. Cette dernière partie étudiera la conséquence sur la communauté phytoplanctonique, préalablement dominée par *Planktothrix agardhii*, du stress halin qui a eu lieu dans l'étang en 2007.









# CHAPITRE I

Performance écologique d'une cyanobactérie  
dulçaquicole, *Planktothrix agardhii*, dans un milieu  
saumâtre



## A. INTRODUCTION

L'eutrophisation croissante des milieux aquatiques s'accompagne le plus souvent de l'apparition de proliférations phytoplanctoniques causant de nombreuses nuisances pour l'écosystème [Sivonen & Jones 1999; Smith 2003]. Ces communautés phytoplanctoniques sont susceptibles d'être fortement influencées par les changements climatiques à venir [Floder, *et al.* 2010; Jaanus, *et al.* 2011; O'Neil, *et al.* 2012]. Les cyanobactéries en particulier, répondent aux changements climatiques [Johnk, *et al.* 2008; Moore, *et al.* 2008]; l'intensité et la fréquence de leurs efflorescences risquent d'augmenter avec l'augmentation de la température [Markensten, *et al.* 2010; Paerl & Paul 2012]. Bien que la concentration des éléments nutritifs constitue généralement la première cause de sélection spécifique du phytoplancton, la température et la salinité expliquent également fortement la composition et les biomasses phytoplanctoniques, particulièrement celles des cyanobactéries [Bonilla, *et al.* 2012; de Figueiredo, *et al.* 2006; Jaanus, *et al.* 2011; Muylaert, *et al.* 2000]. La communauté cyanobactérienne est également influencée par les caractéristiques morphologiques du milieu, comme la profondeur. Ainsi les milieux aquatiques peu profonds sont généralement dominés par des espèces filamenteuses de cyanobactéries comme celle du genre *Planktothrix* [Nixdorf, *et al.* 2003; Paerl, *et al.* 2011].

L'espèce *Planktothrix agardhii* est l'espèce la plus communément recensée comme dominante dans de nombreux lacs hypereutrophes dulçaquicoles du nord du continent Européen [Briand, *et al.* 2002; Mur, *et al.* 1999; Scheffer, *et al.* 1997; Sivonen & Jones 1999]. Cette espèce est, par conséquent, le sujet de nombreuses études hydrobiologiques. La dominance de cette cyanobactérie étant due à la synergie de plusieurs facteurs [Dokulil & Teubner 2000]; la dynamique saisonnière, le cortège phytoplanctonique accompagnateur et les préférences environnementales de *Planktothrix agardhii* sont encore aujourd'hui particulièrement étudiés [Budzynska, *et al.* 2009; Hasler & Poulickova 2003; Mankiewicz-Boczek, *et al.* 2011; Poulickova, *et al.* 2004; Rucker, *et al.* 1997].

Le grand nombre d'études portant sur l'espèce *Planktothrix agardhii* provient également de sa capacité à produire d'importantes concentrations de cyanotoxines, principalement des microcystines (MC) [Fastner, *et al.* 1999b; Sivonen & Jones 1999]. La MC, une hépatotoxine, est la cyanotoxine la plus fréquemment rencontrée dans les écosystèmes aquatiques touchés par

les efflorescences de cyanobactéries [Sivonen & Jones 1999], et constitue un réel danger pour la faune et l'homme [Carmichael 2001; Chorus & Bartram 1999; Codd, *et al.* 2005]. Prévoir les concentrations de MC dans une masse d'eau reste difficile en raison de la synergie de facteurs en présence. Toutefois, d'une manière générale, la concentration de MC dans un écosystème est généralement corrélée à la taille de la population cyanobactérienne même si les pics de développement de cyanobactéries ne correspondent pas forcément aux pics de MC [Janse, *et al.* 2005].

Bien que *Planktothrix agardhii* soit intensément étudiée dans les lacs tempérés dulçaquicoles de l'hémisphère Nord, l'espèce peut toutefois être rencontrée dans une grande variété de conditions environnementales [Bonilla, *et al.* 2012]. Des efflorescences permanentes de *Planktothrix agardhii* ont été notamment recensées dans des milieux saumâtres, sous un climat méditerranéen (**Table 1**). Les études de *Planktothrix agardhii* et de son environnement soumis à des conditions halines et méditerranéennes sont rares et portent sur des milieux lagunaires présentant des variations de salinité. Celles-ci démontrent cependant la capacité de l'espèce à être dominante dans des conditions hors de ses *preferenda* avec une dynamique saisonnière toutefois différente (**Table 1**) [Chomerat, *et al.* 2007]. En effet, *Planktothrix agardhii* est capable de développer des stratégies adaptatives afin de former des biomasses aussi importantes que dans des conditions optimales dans des conditions où les températures, intensités lumineuses et nutritionnelles sont sous-optimales pour sa croissance [Halstvedt, *et al.* 2007]. *Planktothrix agardhii* est même capable de compétitivement exclure une autre espèce dominante [Jaanus, *et al.* 2011].

Dans un contexte de changement global, d'augmentation de la salinité et de la température, on s'interroge sur le comportement de l'espèce *Planktothrix agardhii* face à une augmentation des paramètres salinité et température au-dessus de ses *preferenda* écologiques thermiques et halins. On se propose d'étudier la dynamique saisonnière, l'abondance relative et le cortège spécifique de *Planktothrix agardhii* d'un étang oligohalin situé en zone méditerranéenne et présentant des caractéristiques environnementales relativement stables au cours des années. La dynamique des concentrations de MC est également étudiée, celle-ci reflétant l'écologie de l'espèce productrice [Fastner, *et al.* 1999b]. De même, la dynamique

morphométrique des filaments de *Planktothrix agardhii* est étudiée, afin de tester la potentialité d'une réponse fonctionnelle de l'espèce face à la variable salinité.

L'étude part de l'hypothèse que *Planktothrix agardhii* est capable de se maintenir dans un étang saumâtre méditerranéen par l'adaptation de sa dynamique temporelle et de sa stratégie de colonisation dans des conditions de salinité et de température typiques des milieux méditerranéens. *Planktothrix agardhii* serait alors aussi performante dans un milieu saumâtre méditerranéen qu'elle l'est dans les milieux dulçaquicoles tempérés de l'Europe du nord.

**Table 1.** Liste non exhaustive des travaux rapportant la présence de *Planktothrix agardhii* dans différents milieux.

M : milieu soumis à un climat méditerranéen ; S : milieux saumâtres ; si rien n'est indiqué le milieu est dulçaquicole sous un climat tempéré non méditerranéen. Le tableau indique les saisons durant lesquelles sont rapportées les pics de proliférations ou de dominance de *Planktothrix agardhii* H : hiver ; P : printemps ; E : été ; A : automne

Nom du Milieu	Pays	Type de milieu	saisons	Références
Warnow	Allemagne	rivière	E	[Bahnwart, <i>et al.</i> 1998]
Schlachtensee	Allemagne	lac	E	[Chorus & Schlag 1993]
Kiessee	Allemagne	lac		[Christiansen, <i>et al.</i> 2008]
Plußsee	Allemagne	lac		[Christiansen, <i>et al.</i> 2008]
Wannsee	Allemagne	lac	A	[Fastner, <i>et al.</i> 1998],
Zeuthener See	Allemagne	lac		[Fastner, <i>et al.</i> 1998]
Tjeukemeer	Allemagne	lac	E	[Janse, <i>et al.</i> 2005]
Zeuthen	Allemagne	lac	E-A	[Keil, <i>et al.</i> 2002]
Langer See	Allemagne	lac	E	[Fastner, <i>et al.</i> 1998], [Mischke & Nixdorf 2003], [Nixdorf, <i>et al.</i> 2003]
Melangsee	Allemagne	lac	E	[Mischke & Nixdorf 2003], [Nixdorf, <i>et al.</i> 2003], [Rücker, <i>et al.</i> 1997]
Wolziger See	Allemagne	lac		[Rücker, <i>et al.</i> 1997]
Lebbiner See	Allemagne	lac		[Rücker, <i>et al.</i> 1997]
Jägerteich	Autriche			[Christiansen, <i>et al.</i> 2008]
Dianchi	Chine	lac		[Lin, <i>et al.</i> 2010]
South lake	Chine	lac		[Lin, <i>et al.</i> 2010]
Hang-Yong	Chine	canal		[Lin, <i>et al.</i> 2010]
Yuyuantan	Chine	parc		[Lin, <i>et al.</i> 2010]
East lake	Chine	lac		[Lin, <i>et al.</i> 2010]
Guangqiao	Chine	étang		[Lin, <i>et al.</i> 2010]
Ulungur	Chine	lac		[Lin, <i>et al.</i> 2010]
Nuoshan	Chine	réservoir		[Lin, <i>et al.</i> 2010]
pond near Kuming city	Chine	étang		[Lin, <i>et al.</i> 2010]
Bagsvaerd So	Danemark	lac		[Christiansen, <i>et al.</i> 2008]
Arresø	Danemark	lac		[Christiansen, <i>et al.</i> 2008], [Kurmayer & Gumpenberger 2006]

## CHAPITRE I INTRODUCTION

El porcal lake	Espagne	lac	M	E	[Rojo & Alvarez Cobelas 1994]
Las Tablas de Daimiel	Espagne	étang	Euryhalin	E	[Rojo, <i>et al.</i> 2000]
<b>Albufera de Valencia</b>	<b>Espagne</b>	<b>lagune</b>	<b>M - S</b>	<b>H - P</b>	[Romo & Miracle 1993], [Villena & Romo 2003a], [Vicente & Miracle 1992]
Verevi	Estonie	lac		H + E	[Kangro, <i>et al.</i> 2005]
Markusbölefjärden	Finlande	lac			[Christiansen, <i>et al.</i> 2008]
Langsjön	Finlande	lac			[Christiansen, <i>et al.</i> 2008], [Kurmayer & Gumpenberger 2006], [Rohrlack & Utkilen 2007]
Vargsundet	Finlande	lac	S		[Lindholm, <i>et al.</i> 1999]
Base de loisir de Viry-Chatillon	France	lac			[Briand, <i>et al.</i> 2002], [Catherine, <i>et al.</i> 2008], [Yepremian, <i>et al.</i> 2007]
<b>Bolmon</b>	<b>France</b>	<b>lagune</b>	<b>M - S</b>	<b>H - P</b>	[Chomerat, <i>et al.</i> 2007]
Vert-le-Petit	France	étang			[Christiansen, <i>et al.</i> 2008]
Nantua	France	lac			[Oberhaus, <i>et al.</i> 2008]
Windermere	Grande Bretagne	lac			[Christiansen, <i>et al.</i> 2008], [Suda, <i>et al.</i> 2002],
Esthwaite water	Grande Bretagne	lac			[Christiansen, <i>et al.</i> 2008]
Blelham Tarn	Grande Bretagne	lac			[Christiansen, <i>et al.</i> 2008], [Kurmayer & Gumpenberger 2006], [Davis & Walsby 2002]
White Lough	Grande Bretagne	lac			[Christiansen, <i>et al.</i> 2008], [Kurmayer & Gumpenberger 2006]
Lough Neagh	Irlande du Nord	lac			[Christiansen, <i>et al.</i> 2008]
Kasumigaura	Japon	lac			[Christiansen, <i>et al.</i> 2008], [Kurmayer & Gumpenberger 2006], [Nagai, <i>et al.</i> 2007]
Curonian	Mer Baltique (Pologne/Lituanie)	lagune	S	E	[Jaanus, <i>et al.</i> 2011]
Gjersjoen	Norvège	lac			[Christiansen, <i>et al.</i> 2008]
Steinsfjorden	Norvège	lac		H + E	[Halstvedt, <i>et al.</i> 2007]
Klinckenberger Plas	Pays-Bas				[Christiansen, <i>et al.</i> 2008]
Veluwermeer	Pays-Bas	lac			[Christiansen, <i>et al.</i> 2008]
Uzarszewskie	Pologne	lac		E-A	[Budzynska, <i>et al.</i> 2009]
Bninskie	Pologne	lac			[Mankiewicz-Boczek, <i>et al.</i> 2006]
Lubosinskie	Pologne	lac		E-A	[Mankiewicz-Boczek, <i>et al.</i> 2011]
Bytynskie	Pologne	lac		A	[Mankiewicz-Boczek, <i>et al.</i> 2011]
Zemborzycki	Pologne	réservoir			[Sieroslawska, <i>et al.</i> 2010]
Syczyńskie	Pologne	lac		E	[Toporowska, <i>et al.</i> 2010]
Czarne et Krasne	Pologne	lacs		H-P	[Wojciechowska 2004]
BilaLhota	République Tchèque	étang		E	[Hasler & Poulickova 2003], [Poulickova, <i>et al.</i> 2004]
Garasi et Bukulja	Serbie	réservoirs		E-A	[Karadzic, <i>et al.</i> 2010]
Bir M'cherga , Nebhana, Sidi Saâd, Joumine	Tunisie	réservoirs	M		[Fathalli, <i>et al.</i> 2011]

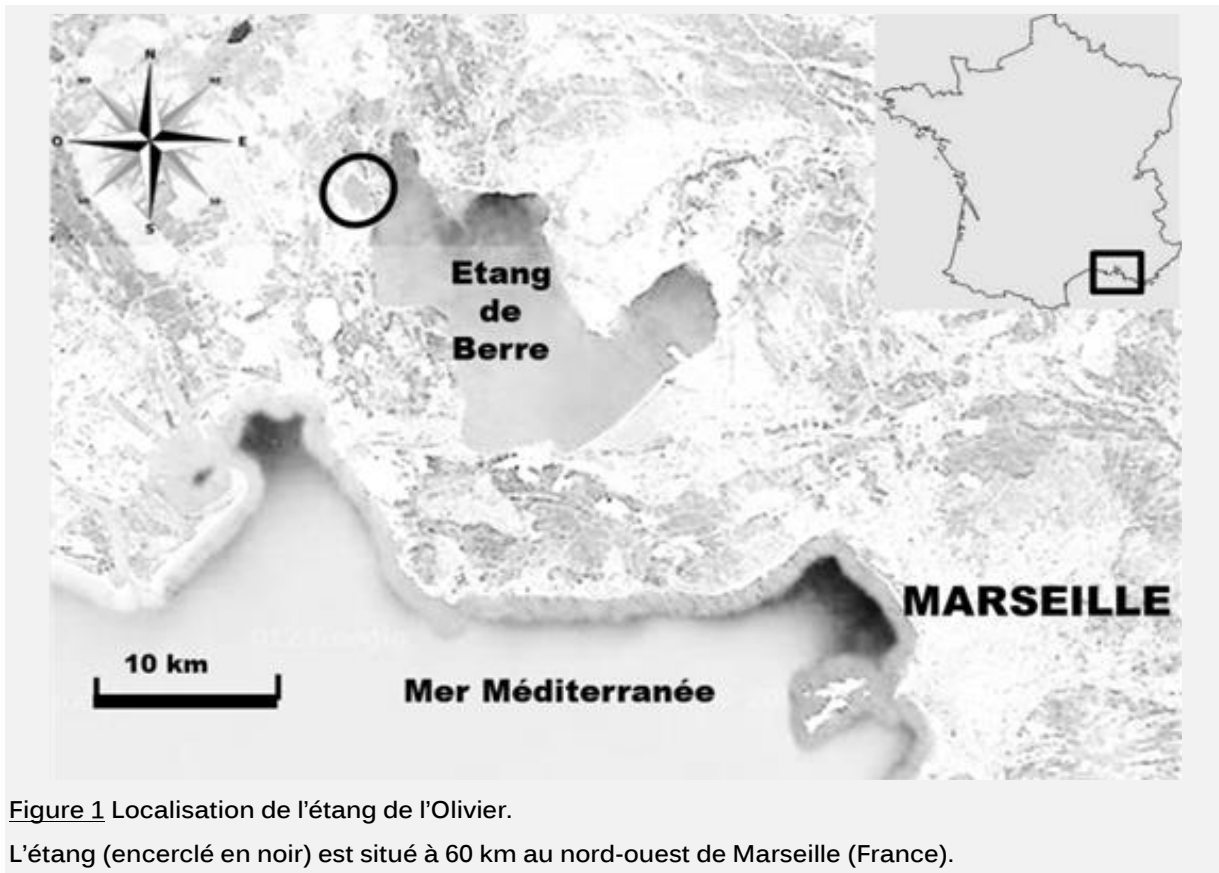


## B. MATERIEL ET METHODES

### 1. Site d'étude

L'étang de l'Olivier est situé sur la commune d'Istres, à environ 60 km au Nord-Ouest de Marseille dans le département des Bouches du Rhône ( $43^{\circ} 30' 46''$  N  $4^{\circ} 59' 17''$  E) (**Figure 1**).

L'étang de l'Olivier est un étang saumâtre de forme ovale de 225 ha et de profondeur maximale de 10 mètres.



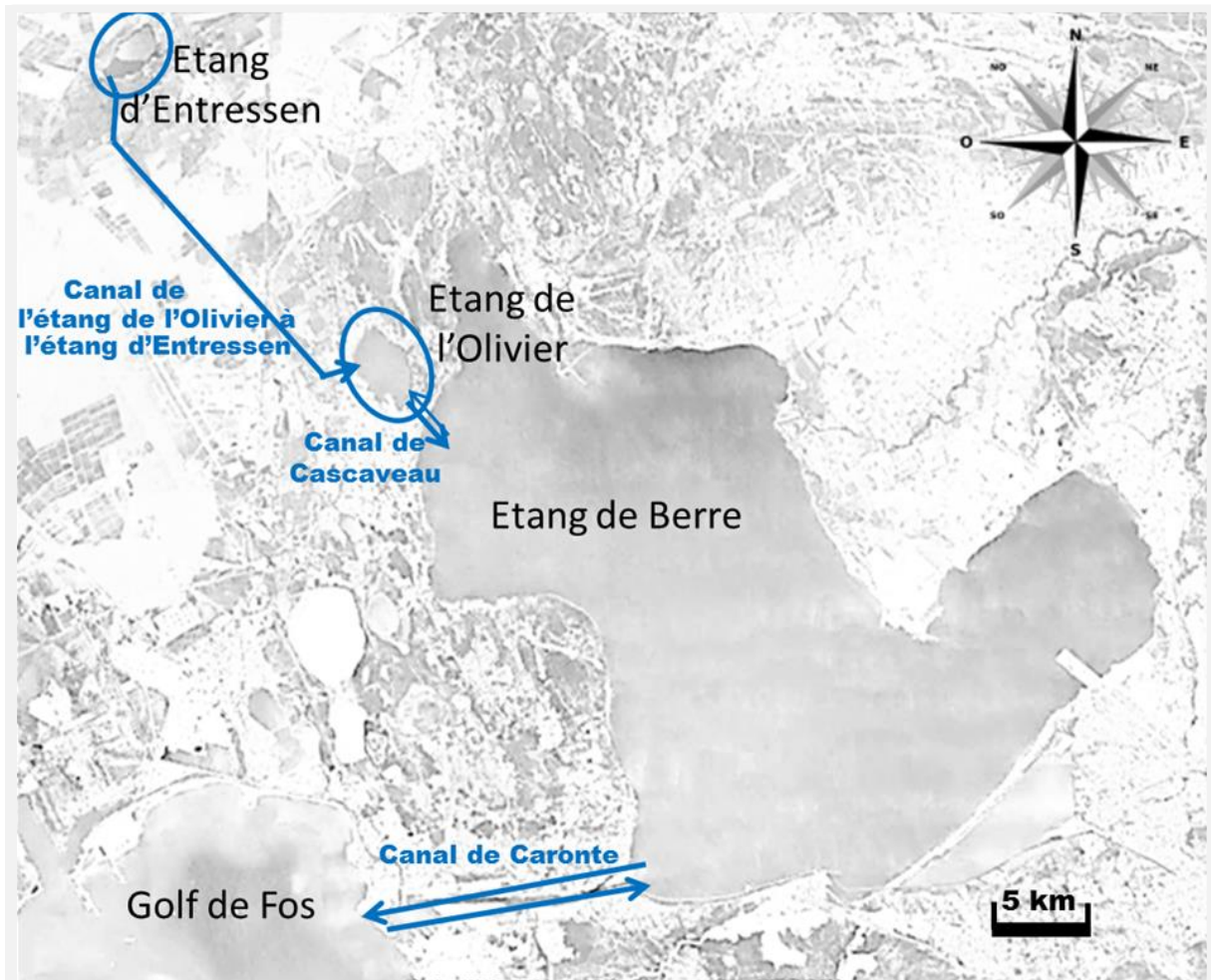
**Figure 1** Localisation de l'étang de l'Olivier.

L'étang (encerclé en noir) est situé à 60 km au nord-ouest de Marseille (France).

La salinité de l'étang provient de sa connexion avec l'Etang de Berre dont la salinité annuelle varie entre 15 et 25 g.l<sup>-1</sup>, étant lui-même relié à la mer Méditerranée par le canal de Caronte (**Figure 2**).

L'étang de l'Olivier reçoit des eaux douces par un canal de jonction avec l'étang d'Entressen, un étang limnique situé au Nord-Ouest de l'étang de l'Olivier. L'étang est aussi le réceptacle des ruissellements des eaux de pluie du bassin versant. L'Olivier est un milieu eutrophisé ; il est le lieu de fréquentes proliférations de cyanobactéries et plusieurs crises d'anoxie du milieu sont chaque année à l'origine de mortalités piscicoles récurrentes. L'étang de l'Olivier est classé en

ZNIEFF et est un milieu aquatique récréatif. La pêche y est autorisée mais le commerce des produits de la pêche est interdit. Toutefois, certaines circonstances exceptionnelles induisent parfois l'interdiction de pêcher, comme par exemple une pollution extrême suite à un épandage de lindane en 1967, ou une mortalité exceptionnelle de centaines de poissons emprisonnés par la glace au cours de l'hiver 2011. Une base nautique permet de pratiquer du canoë-kayak et de l'aviron sur l'étang de l'Olivier.

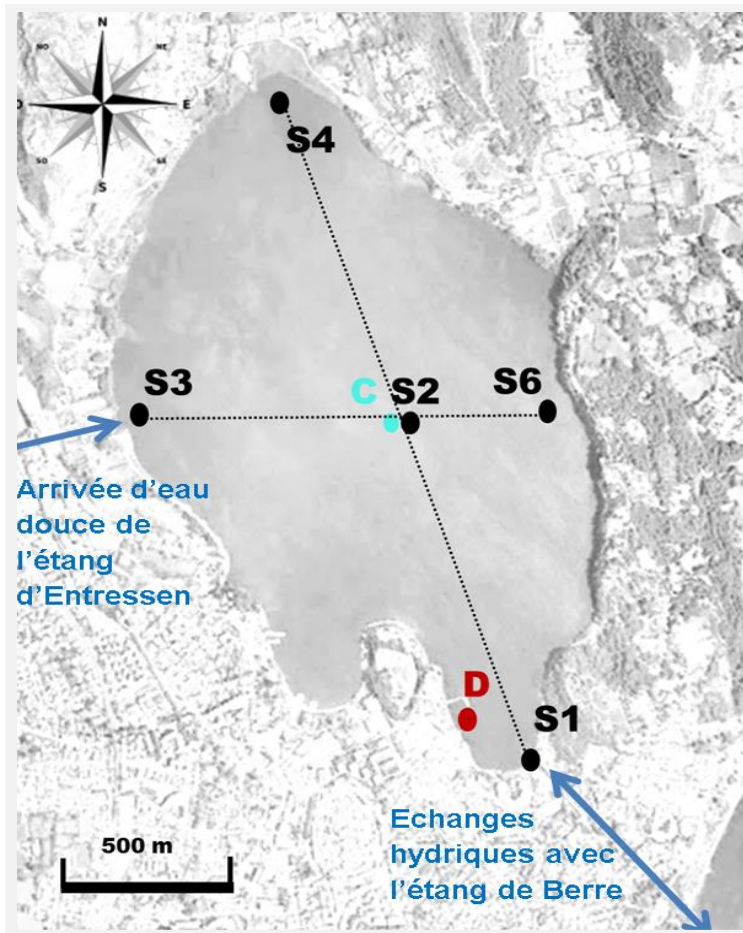


**Figure 2** Carte de l'hydrosystème Entressen-Olivier-Berre présentant leurs connexions hydriques. L'étang d'Entressen communique avec l'étang de l'Olivier par le canal «de l'étang de l'Olivier à l'étang d'Entressen», l'étang de l'Olivier est connecté avec l'étang de Berre par le canal de Cascaveau, et l'Etang de Berre communique avec la mer Méditerranée via le canal de Caronte. Le sens des échanges principaux est indiqué par des flèches ; la majorité des échanges entre l'étang de l'Olivier et l'étang de Berre se font dans le sens Olivier vers Berre en raison du sens des vents dominants ; et les échanges de l'étang de Berre avec la mer sont dépendants des marées.

## 2. Stratégie d'échantillonnage

Les 5 stations échantillonnées en sub-surface ont été choisies selon les connexions de l'étang avec son environnement, et selon la morphologie de l'étang qui peut influencer sur l'hétérogénéité de la composition de l'eau (**Figure 3**).

La station S1 est située dans le canal de communication de l'étang de l'Olivier avec l'étang de Berre. La station S2 est approximativement située (du fait des contours non géométriques de l'étang) au centre de l'étang. La station S3 est localisée à proximité de l'arrivée du canal reliant l'étang d'Entressen (étang limnique) à l'étang de l'Olivier. La station S4 est située à l'extrémité nord de l'étang et constitue un transect avec les stations S2 et S1 (longueur). La station S6 est décrite un deuxième transect perpendiculaire (largeur) avec les stations S2 et S3.



Les campagnes de prélèvement s'échelonnent sur 8 saisons durant les années 2009 et 2010, à raison d'un prélèvement par mois (total de 20 campagnes d'échantillonnage) : hiver 2009 (H09), printemps 2009 (P09), été 2009 (E09), automne 2009 (A09), hiver 2010 (H10), printemps 2010

(P10), été 2010 (E10), automne 2010 (A10) (3 campagnes d'échantillonnage sont donc réalisées par saison, exceptées les saisons H09 et A10 qui sont représentées par un seul mois).

Des prélèvements supplémentaires ont été réalisés en 2 points de l'étang nommés C et D. Au niveau de ces deux sites des échantillons ont été prélevés le long de la colonne d'eau de l'étang. Le point C (« Centre ») d'une profondeur de 10 mètres, est au niveau de la station centrale S2 de l'étang. Les échantillons ainsi recueillis sont nommés C1 pour un prélèvement réalisé à 1 mètre de profondeur ; C2, à 2 mètres ; etc. jusqu'à C10, dernier prélèvement au fond de l'étang. Le point D (« Digue »), d'une profondeur de 3 mètres (3 échantillons nommés D1, D2, D3 selon le même principe qu'au point C) a été ajouté en raison d'observations attestant de la présence d'efflorescences phytoplanctoniques récurrentes dans cette zone. Ce phénomène est dû à la proximité de la digue qui crée un confinement et limite le brassage des eaux ; la faible profondeur de cette station permet le recrutement rapide des cyanobactéries réparties le long de la colonne d'eau. Les profils verticaux aux points C et D sont réalisés de février à août 2010 (regroupés durant P10 et E10) dans le but de compléter la dynamique spatiale horizontale (établit par l'échantillonnage des stations de surface) avec une dynamique verticale. 191 échantillons résultent de cette campagne d'échantillonnage. Les mesures des paramètres environnementaux ont été réalisées au niveau du site de prélèvement de chacun de ces échantillons.

Les analyses toxiques ont été réalisées au niveau des stations S1, S2, S3 et C2, C4, C6, C8, C10, D1 et D3 durant le printemps et l'été 2010.

### 3. Paramètres environnementaux

#### 3.1. Analyses réalisées sur le terrain

A chaque station énumérée dans le paragraphe précédent, les mesures de différents paramètres physico-chimiques de l'eau, susceptible d'influencer la dynamique spatio-temporelle du phytoplancton, ont été effectuées. Chaque campagne d'échantillonnage a été réalisée en conservant l'ordre des stations prospectées et en s'efforçant de maintenir la période horaire entre 8h et 15h.

L'exploration des stations de surface a été réalisée de février 2009 à octobre 2010, celle des stations des profils verticaux C et D, de février 2010 à août 2010.

Au niveau de chaque station de surface et aux différentes profondeurs des colonnes C et D, la température (TEMP en °C), la conductivité (COND en Ms/cm) et la salinité de l'eau (SAL en g.l<sup>-1</sup>) ont été mesurées avec un conductimètre WTW LF330.

La saturation (SAT en %) et la concentration en oxygène dissous de l'eau (O2 en mg.l<sup>-1</sup>) ont été mesurées avec un oxymètre WTW.

La transparence de l'eau des stations de surface a été estimée grâce à un disque de Secchi, en faisant la moyenne des profondeurs de disparition et de réapparition du disque dans la colonne d'eau. La station S3, peu profonde, subit les variations des rejets de l'étang d'Entressen et il a été parfois impossible de rendre compte d'une mesure de transparence de l'eau.

La turbidité de l'eau aux différentes profondeurs des colonnes C et D, ainsi qu'en surface à partir de janvier 2010, a été mesurée avec un turbidimètre.

Deux litres d'eau destinés aux analyses de laboratoire ont été prélevés à chaque station. Les prélèvements aux différentes profondeurs des colonnes C et D ont été réalisés avec une bouteille de type Niskin.

### *3.2. Analyses réalisées au laboratoire*

Les analyses ont été effectuées sur les prélèvements dès le retour au laboratoire.

Le pH a été mesuré à température ambiante avec un pH-mètre Metrohm-Herisau Titriskop E516.

Les concentrations en matière en suspension (MES en mg.l<sup>-1</sup>) ont été estimées par pesée sur une balance de précision, après filtration d'un volume de 100 à 500 ml d'échantillon sur un filtre de verre Whatman GF/C de porosité 1.2 µm, et séchage à l'étuve à 105°C. Les filtres ont ensuite été placés durant une heure à 550 °C dans un four à moufle puis repesés afin d'estimer les concentrations en matière minérale et organique (MM et MO en mg.l<sup>-1</sup>).

Les pigments chlorophylliens ont été extraits des échantillons après filtration de 250 à 500 ml d'échantillon (selon la charge en matière en suspension susceptible de colmater les filtres) sur des filtres de verre Whatman GF/C de porosité de 1,2 µm, puis immersion des filtres dans 7 ml d'une solution d'acétone à 90 %. Les filtres ont alors été placés dans une chambre froide à 4°C à l'obscurité durant 24 heures. Les filtres récupérés ont ensuite été rincés avec 3 ml d'acétone à 90 % afin de récupérer l'excédent de pigment restant sur les filtres. Après centrifugation des

échantillons (10 min. à 2000 tours.min<sup>-1</sup>), la mesure des absorbances des échantillons a été réalisée dans une cuve de quartz par un spectrophotomètre à double faisceaux (Shimadzu UV-1700). Les absorbances des échantillons ont été mesurées à 665, 663, 645 et 630 nm contre une valeur de référence fournie par la lecture de l'absorbance à 750 nm d'une cuve remplie d'acétone à 90 %. Une dernière mesure à 665 nm a été réalisée après adjonction de 2 gouttes d'acide chlorhydrique 0,1 N [Lorenzen 1967]. A partir des valeurs mesurées, les teneurs en chlorophylle *a* active et en phéopigments ont été calculées avec les équations de Lorenzen [1967].

Les concentrations en sulfate (SO<sub>4</sub> en mg.l<sup>-1</sup>) ont été dosées de façon gravimétrique par précipitation des sulfates par le chlorure de baryum.

Les concentrations en orthophosphate (PO<sub>4</sub> en mg.l<sup>-1</sup>) ont été déterminées à partir de l'absorbance à 680 nm du bleu de molybdène issu de la réduction de l'acide phosphomolybdique lui-même résultant de la réaction entre l'orthophosphate et le molybdate d'ammonium.

Les Nitrites (NO<sub>2</sub>), les nitrates (NO<sub>3</sub>) et l'ammonium (NH<sub>4</sub>) ont été dosés par colorimétrie de façon automatisée avec un Autoanalyzer II (Technicon).

Les concentrations en nitrite ont été mesurées après la réaction de diazotation de la sulfanilamide en milieu acide. Le sel diazonium alors obtenu est ensuite couplé avec une amine et forme un complexe coloré rouge dont l'absorbance est mesurée à 543 nm.

Les nitrates ont été dosés de la même manière après réduction des nitrates en nitrites sur une colonne cadmium-cuivre.

Les concentrations en ions ammonium ont été déterminées à partir de l'absorbance à 635 nm de la coloration bleue résultante de la réaction de l'ammonium avec le dichloroisocyanate et le salicylate en milieu basique.

#### **4. Détermination et dénombrement des taxons phytoplanctoniques**

Les analyses taxonomiques ont été privilégiées sur les stations présentant le plus d'hétérogénéité afin de mieux appréhender le peuplement phytoplanctonique de l'étang. Ainsi la totalité des échantillons des stations de surface S1, S2 et S3 a été analysée ; la station S2 étant considérée comme la station approximant la globalité de l'étang du fait de sa position centrale,

les stations S1 et S3 étant les plus susceptibles de représenter la variabilité spatiale de l'étang en raison de leur localisation à proximité immédiate des connexions avec les deux autres hydrosystèmes que sont l'étang de Berre et l'étang d'Entressen. L'analyse d'un échantillon par saison des stations S4 et S6 a été ajoutée afin de s'affranchir d'une potentielle diversité non perçue dans l'analyse des autres stations de surface (cf. paragraphe B.2 Stratégie d'échantillonnage).

Quant aux profils verticaux, il a été privilégié les analyses taxonomiques des échantillons provenant d'un prélèvement tous les 2 mètres au point C (C2, C4, C6, C8, C10).

Les échantillons utilisés pour le dénombrement ont été fixés au formaldéhyde à 5 %.

Un petit volume d'échantillon restant des analyses au laboratoire a été conservé non fixé pour les déterminations des espèces.

#### 4.1. *Détermination spécifique*

Plusieurs techniques ont été utilisées pour déterminer les espèces de l'étang de l'Olivier : L'observation au microscope d'une goutte d'échantillon frais sur une lame creuse ou d'une goutte d'échantillon fixé entre lame et lamelle. La détermination des diatomées a été réalisée entre lame et lamelle après avoir été nettoyées par « grillage » puis montées dans du Naphrax afin de visualiser les ornements.

Les déterminations ont été réalisées à partir des ouvrages de Anagnostidis & Komarek [1988] et Komarek & Anagnostidis [Komárek & Anagnostidis 1999, 2005], de Bourrelly [Bourrelly 1981, 1985, 1990], et de Krammer & Lange-Bertalot [Krammer & Lange-Bertalot 1986, 1988, 1991a, b].

Les ouvrages suivants ont également été consultés : « Identification of freshwater diatoms from live material » [Cox 1996], « Taxonomic and environmental studies on Euglenophytes » [Wotowski 1998], « Freshwater algae » [Bellinger & Sigeo 2010], « Freshwater algae of North America » [Wehr & Sheath 2003].

#### 4.2. *Densité cellulaire spécifique*

La densité cellulaire des espèces a été calculée suivant la méthode d'Uthermöhl [1958]. Au vu du nombre important de cellules et la grande charge en matières en suspension dans les échantillons d'eau, des sous-échantillons ont été dilués du 10<sup>ème</sup> au 200<sup>ème</sup>. Les échantillons

ainsi dilués ont été laissés à sédimenter dans des cuves à sédimentation durant au minimum 12 heures. Les échantillons ont été observés sous un microscope inversé (Olympus IX 70) et comptés avec un objectif x40 (oculaires x10). Toutes les cellules des espèces unicellulaires isolées et coloniales ; ainsi que les cellules des espèces filamenteuses quand les cellules étaient discernables ; comprises dans les champs parcourant la moitié du diamètre du fond de la cuve, ont été dénombrées. Dans le cas où les espèces filamenteuses présentaient des limites cellulaires difficilement discernables, les filaments ont été mesurés afin de déduire un nombre moyen de cellules constituant ces filaments. Lorsque le nombre de 400 cellules n'était pas atteint, la totalité du diamètre du fond de la cuve a été comptée, puis d'autres diamètres afin d'obtenir le nombre de 400 cellules comptées maximisant ainsi l'intervalle de confiance à 95 % [Lund, *et al.* 1958]. Finalement, la surface du fond de la cuve a été balayée avec l'objectif x20 afin de rechercher les espèces non comptées. La densité cellulaire est exprimée en cellule.ml<sup>-1</sup>.

#### 4.3. *Biovolume spécifique*

Les dimensions de chaque cellule comptée ont été mesurées. Le biovolume de chaque organisme a ensuite été calculé selon les formules développées par Sun & Liu [2003], Hillebrand *et al.* [1999], Reavie *et al.* [2010], et les formules rapportées dans les protocoles d'analyse du phytoplancton de l'INRA [Druart & Rimet 2008]. Les formules des biovolumes utilisées pour les espèces déterminées dans cette étude sont rapportées dans le tableau en annexe (**Annexe. B**). Un biovolume moyen spécifique a été calculé pour chaque échantillon. Le biovolume occupé par une espèce dans un échantillon a été calculé en multipliant le biovolume moyen spécifique par le nombre d'individus compté, puis le biovolume a été ramené en  $\mu\text{m}^3.\text{ml}^{-1}$ .

#### 5. Détermination des concentrations en microcystines (MC)

Les concentrations en MC sont dosées par ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Les cellules des échantillons ont été séparées du milieu par centrifugation à 4000 g à 4°C puis conservées à -20°C jusqu'à l'analyse. Les ELISA ont été réalisés selon les instructions du fabricant (Abraxis, LLC) après avoir lysé les cellules par plusieurs chocs thermiques (10 cycles d'immersion eau bouillante / azote liquide). Le kit ELISA anti-Adda consiste en un antisérum



dirigé contre le groupement Adda ( $\beta$ -amino acid, 3-amino-9-methoxy-2,6,8-triméthyl-10-phenyldeca-4,6-dienoic acid) qui est commun aux variants de MC connus [Pearson, *et al.* 2010]. Chaque échantillon est représenté en duplicat sur une microplaque de 96 puits. La limite de détection de l'ELISA est de 0.10 ppb ( $\mu\text{g.l}^{-1}$ ). La quantification de 6 standards permet d'établir une courbe étalon qui définit la relation entre l'absorbance à 450 nm et la concentration en MC. Les concentrations en MC des échantillons sont déterminées à partir de la formule de la courbe étalon.

## 6. Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques, ainsi que la majorité des graphiques ont été réalisées dans l'environnement R (version 2.15.1) avec l'interface Rstudio (v0.96).

Les différences entre les échantillons ont été testées par des ANOVA. Lorsque la normalité et/ou l'homoscédasticité n'étaient pas vérifiées les tests non paramétriques de Kruskal-Wallis (package « *pgirmess* »), et de Mann-Whitney ont été utilisés. Les tests post-hoc de Tukey et les comparaisons multiples par paires (méthode de Dunn) ont été utilisés pour visualiser les différences significatives.

Les différences entre les stations de surface et les points verticaux des stations ont été testées en prenant en compte uniquement les campagnes communes.

Les indices de diversité ont été calculés avec le package « *vegan* ».

Les Analyses en Composantes principales (ACP) et l'analyse factorielle des correspondances (AFC) ont été réalisées à l'aide du package « *ade4* » afin de visualiser les corrélations entre les variables. Les facteurs de corrélation de Pearson ou de Spearman ont été utilisés pour tester la corrélation entre les différentes variables de l'étude. Les packages, « *ggplot2* », « *lattice* » et « *RColorBrewer* » ont été utilisés dans la réalisation des graphiques.

## C. RESULTATS

### 1. Variabilité des paramètres environnementaux

Les paramètres environnementaux ont un impact direct sur l'assemblage phytoplanctonique. Afin de rendre compte de la composition phytoplanctonique dans l'ensemble de l'étang de l'Olivier, plusieurs stations présentant différentes caractéristiques environnementales sont étudiées. Les variations des paramètres environnementaux des différentes stations ainsi que les variations climatiques durant la période d'échantillonnage sont exposées dans le paragraphe suivant.

#### *1.1. Variations des conditions climatiques*

L'effet potentiel des conditions climatiques sur la composition phytoplanctonique de l'étang de l'Olivier a été évalué à partir des moyennes des paramètres calculées sur les 4 jours précédents chaque campagne de prélèvement et le jour de celui-ci; excepté pour les données de pluviométrie qui sont représentées à partir des mesures journalières.

#### **Température**

La température moyenne journalière au cours de la période d'étude varie d'un minimum en janvier 2010 ( $-5.5^{\circ}\text{C}$ ) à un maximum en août 2009 ( $37.7^{\circ}\text{C}$ ). La température moyenne des jours des campagnes d'échantillonnage montre de même une variation saisonnière avec un minimum en hiver 2010 ( $4.38 \pm 2.13^{\circ}\text{C}$ ) et des maxima en été 2009 ( $26.6 \pm 0.9^{\circ}\text{C}$ ) et 2010 ( $26.1 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ ) (**Figure 4A**). La température moyenne annuelle est de 15.6 (avec un écart thermique de  $7.2^{\circ}\text{C}$ ).

#### **Rayonnement solaire globale et durée de l'insolation journalière**

Le rayonnement solaire global et la durée d'insolation journalière suivent globalement une dynamique saisonnière identique à celle de la température lors de la période d'étude avec des maxima en juin (rayonnement solaire de 318 et 305  $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$ , et une insolation journalière de 884 et 849  $\text{min}\cdot\text{j}^{-1}$  en juin 2009 et juin 2010) et un minimum en janvier 2010 ( $54 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$  et 0  $\text{min}\cdot\text{j}^{-1}$ ). Les moyennes des paramètres durant les campagnes d'échantillonnage présentent des différences

entre les années 2009 et 2010 (**Figure 4B**). Les durées d'insolation moyennes sont aussi faibles en avril et mai 2009 ( $307 \text{ min.j}^{-1}$ ) qu'en automne 2009 et en hiver. Les durées d'insolation et le rayonnement solaire varient très peu durant l'automne et l'hiver ( $285 \pm 69 \text{ min.j}^{-1}$  et  $810 \pm 177 \text{ W.m}^{-2}$  en moyenne d'octobre 2009 à mars 2010). . La campagne estivale de juin 2009 est la seule de l'année 2009 à être soumise à un ensoleillement maximal ( $\text{W.m}^{-2}$ ), alors qu'en été 2010 l'ensoleillement est maximal durant plusieurs campagnes successives, en mai, juin et juillet 2010 ( $292 \pm 53 \text{ W.m}^{-2}$  et  $817 \pm 5 \text{ min.j}^{-1}$ ).

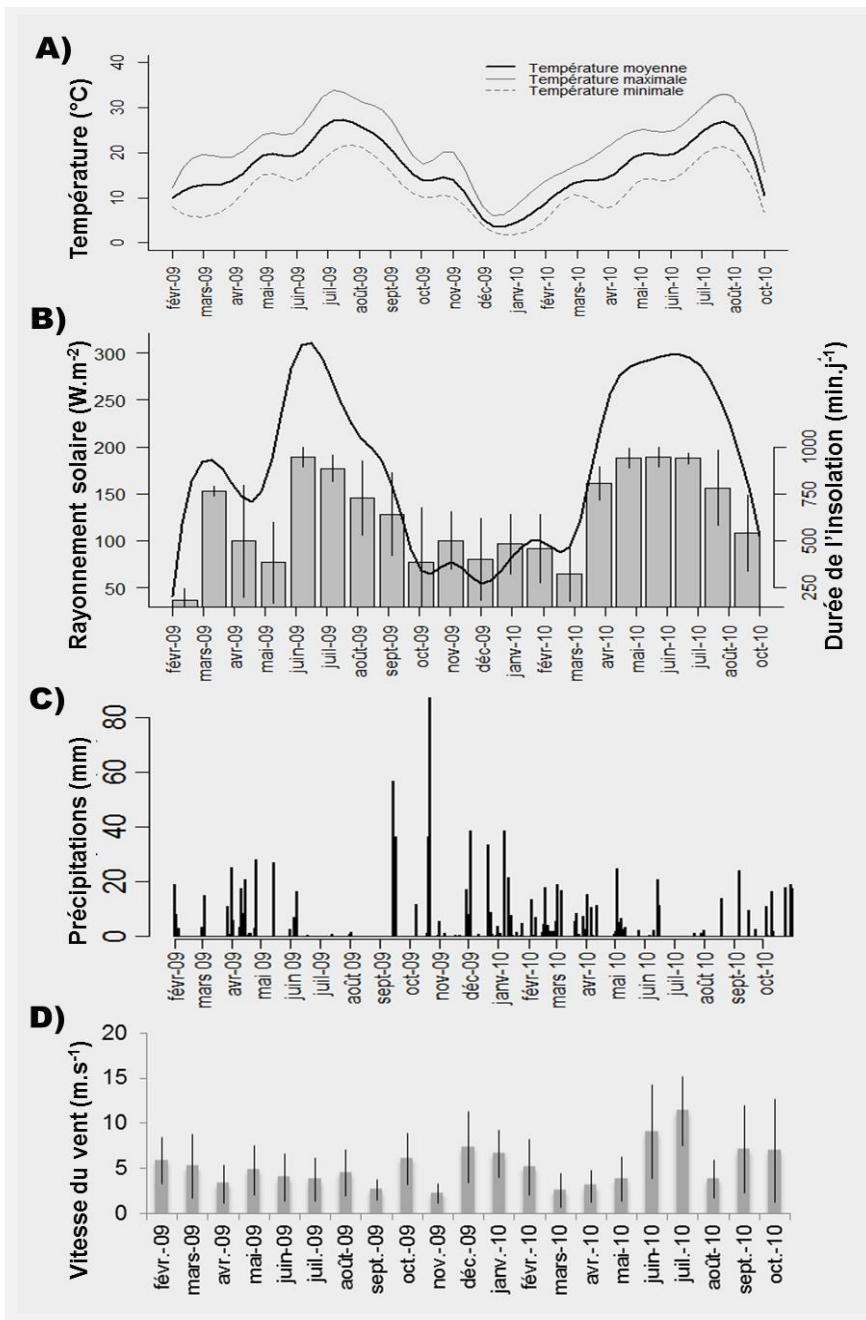


Figure 4 Variations des paramètres climatiques de février 2009 à octobre 2010.

Les données (exceptées celles de la pluviométrie) sont moyennées sur les 4 jours précédant chaque campagne mensuelle de prélèvements et le jour de celle-ci ( $n=5$  en (A) et (B) et  $n=40$  en (C)).

(A) températures moyennes, maximales et minimales journalières (°C)

(B) Rayonnement solaire global journalier (courbe, en  $\text{W.m}^{-2}$ ) et de la durée d'insolation journalière (histogramme, en  $\text{min.j}^{-1}$ )

(C) Précipitation journalière (mm)

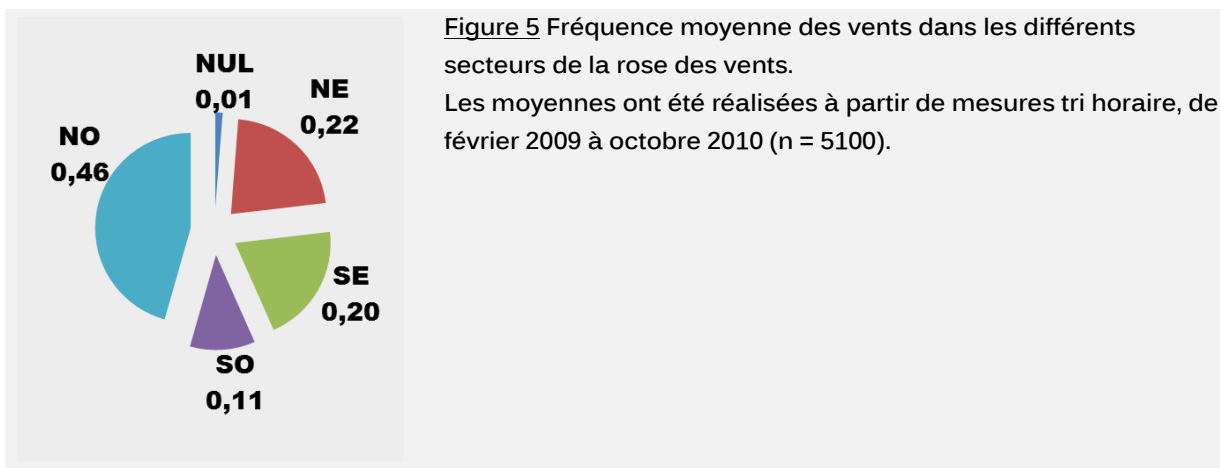
(D) Vitesse moyenne du vent ( $\text{m.s}^{-1}$ ) calculée à partir de mesures tri-horaires ( $n=40$ ).

## Précipitations

Les précipitations présentent une variation saisonnière marquée par des fortes pluies ponctuelles en automne 2009 (jusqu'à 87 mm le 22 octobre 2009), des précipitations un peu moins fortes mais plus régulières en hiver ( $3.3 \pm 7.9$  mm), et des précipitations modérées au printemps ( $2.0 \pm 5.8$  mm en 2009 et  $1.8 \pm 4.5$  mm en 2010). L'été est sec avec une très faible pluviométrie ( $0.3 \pm 1.9$  mm et  $0.6 \pm 2.9$  mm en 2010) (**Figure 4C**).

## Vitesse et direction des vents

D'une manière générale le vent dominant de l'étang de l'Olivier est un vent de Nord-Ouest (**Figure 5**). La fréquence de ce vent est de 0.46 parmi 5100 mesures tri-horaires des directions des vents durant la période d'étude ; de février 2009 à octobre 2010. Ce vent dominant tend à influencer les échanges hydriques de l'étang de l'Olivier vers l'Etang de Berre.



La direction des vents précédant et durant chaque campagne de prélèvement a été également prise en compte (données non représentées).

La vitesse moyenne des vents est similaire durant les campagnes de prélèvements de 2009 (**Figure 4D**). Durant les campagnes de l'année 2010 les vents ont été un peu plus forts en hiver et en automne 2010 (par rapport à 2009), relativement faibles durant les campagnes du printemps 2010, et on note une vitesse maximale durant les campagnes de juin et juillet 2010.

1.2. Variations des paramètres physico-chimiques de l'eau

1.1.1. Variations horizontales

Température de l'eau

La température de l'eau de surface de l'étang durant la période de l'étude varie entre 3.9 °C (janvier 2010) et 27.7 °C (août 2009) (**Figure 6A**).

Les 5 stations de surface montrent la même dynamique saisonnière de température avec deux pics de température durant les deux étés de la période d'étude (pics centrés sur les mois d'août), et un minimum durant l'hiver centré sur le mois de janvier 2010.

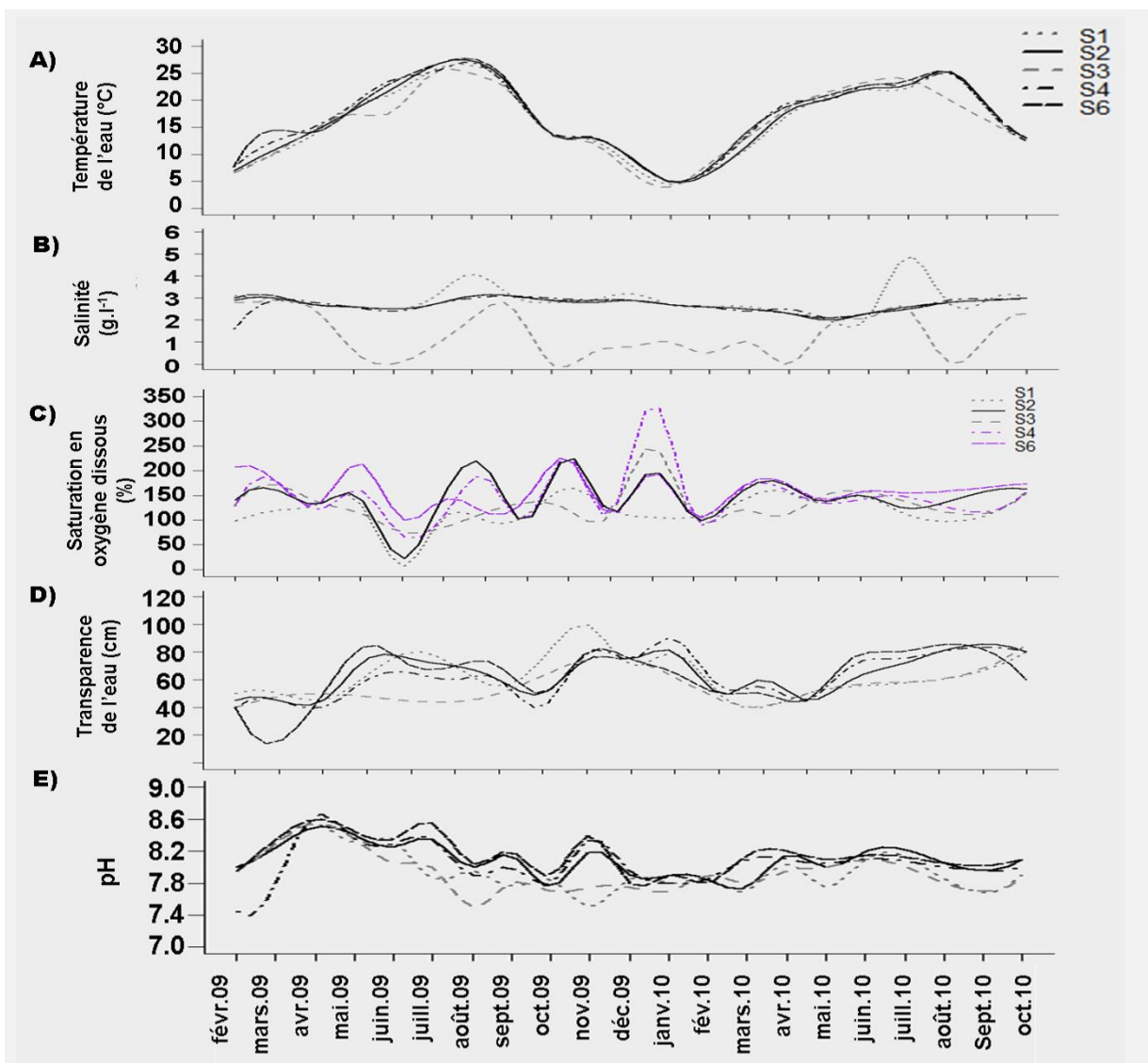


Figure 6 Dynamique temporelle des paramètres physico-chimiques de l'eau mesurés de février 2009 à octobre 2010 au niveau des stations de surface échantillonnées.

(A) température de l'eau (°C), (B) salinité (g.l<sup>-1</sup>), (C) saturation en oxygène dissous (%), (D) transparence de l'eau (cm), (E) pH

## Salinité

La salinité et la conductivité de l'eau aux différentes stations présentent des dynamiques similaires (corrélation des 2 paramètres avec un coefficient de corrélation de 0.92). La conductivité de l'eau en surface varie de 0.12 à 12.47 mS.cm<sup>-1</sup> avec une moyenne de 4.73 ± 1.68 mS.cm<sup>-1</sup> durant la période d'échantillonnage. La salinité de l'eau varie de 0 à 4.9 g.l<sup>-1</sup> avec une moyenne de 2.46 ± 0.82 g.l<sup>-1</sup>. Les stations S2, S4 et S6 présentent des salinités similaires entre elles tout au long de la période d'étude (coefficients de corrélation de 0.91 à 0.97) (**Figure 6B**). La salinité de l'eau au niveau de ces stations varie peu dans le temps (entre 2 et 3,1 g.l<sup>-1</sup>) ; cependant, il existe une saisonnalité faiblement marquée par l'augmentation de la salinité à la fin de l'été. Cette dynamique saisonnière se caractérise par des minima durant le printemps et des maxima mesurés à la fin de l'été et en automne, consécutivement à la période des plus fortes températures entraînant l'augmentation de la concentration des sels dans l'étang. La station S3 est la station dont la salinité est la plus variable dans le temps sans saisonnalité marquée, en raison des arrivées fluctuantes d'eaux douces provenant de l'étang d'Entressen. La salinité de la station S1 suit globalement la même dynamique saisonnière que celles des stations S2, S4 et S6 ; cependant, des petites variations ponctuelles sont observées et les pics de salinités mesurés durant l'été et le début de l'automne sont de plus grandes amplitudes (de 2.1 à 4.9 g.l<sup>-1</sup> en juin-juillet 2010).

La station S1 possède la salinité moyenne la plus élevée (2.9 ± 0.64 g.l<sup>-1</sup>) en raison de sa proximité avec l'étang de Berre dont la salinité est plus élevée que celle de l'étang de l'Olivier; la station S3 est la moins salée (1.35 ± 1.05 g.l<sup>-1</sup>, p < 0.05, n=112, ANOVA, (**Figure 7A**) en raison de sa localisation au niveau de l'arrivée des eaux douces de l'étang limnique d'Entressen ; les stations S2, S4 et S6 ont une salinité moyenne intermédiaire de 2.7 ± 0.29 g.l<sup>-1</sup>.

Les faibles variations de salinité observées permettent de classer l'étang de l'Olivier parmi les milieux homoïohalins (eaux à salinité stable). La salinité moyenne de l'étang permet de définir sa catégorie haline. La salinité moyenne annuelle des 3 stations représentatives de l'ensemble de l'étang est de 2.78 ± 0.28 g.l<sup>-1</sup> ; celle des 5 stations de surface est de 2.52 ± 0.82 g.l<sup>-1</sup>. L'étang de l'Olivier est catégorisé comme milieu mixo-oligohalin [Por 1972].

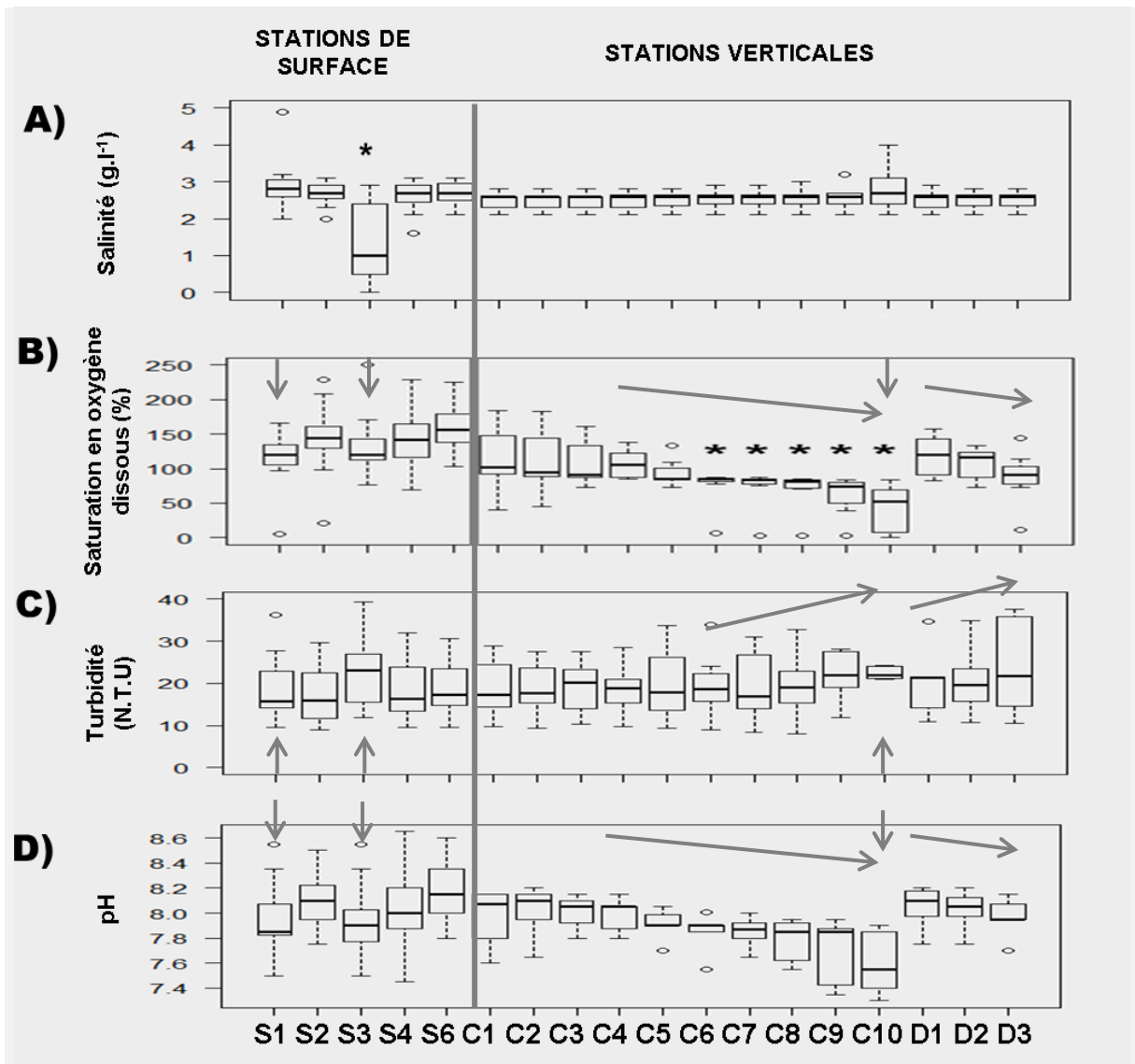


Figure 7 Valeurs médianes, 1er et 3ème quartiles des paramètres physico-chimiques de l'eau mesurés au niveau des différentes stations échantillonnées.

(A) salinité ( $\text{g.l}^{-1}$ ), (B) saturation en oxygène dissous (%), (C) turbidité (N.T.U), (D) pH.

Les «\*» indiquent les moyennes significativement différentes calculées sur les 7 mois d'échantillonnage commun aux différentes stations ( $p < 0.05$ ,  $n = 112$ , ANOVA).

### Concentration et saturation en oxygène dissous

Les concentrations et les pourcentages d'oxygène dissous dans l'eau suivent les mêmes dynamiques au niveau de toutes les stations échantillonnées (corrélation des 2 paramètres avec un coefficient de corrélation de 0.93). La saturation en oxygène des eaux de surface de l'étang de l'Olivier varie entre 5.8 (en juillet 2009, en S1) et 339 % (en janvier 2010, en S4) avec une moyenne de  $141 \pm 44$  % (Figure 6C). Les eaux de surface sont saturées entre 100 et 200 % d'oxygène sur la majorité de la période d'étude.

Une période d'anoxie a eu lieu en juillet 2009, anoxie particulièrement prononcée en S2 et S1 (5.8% d'oxygène). Inversement, plusieurs épisodes de forte oxygénation de l'eau ont lieu au cours de la période d'étude ; au printemps 2009 en S6 ; en automne 2009 en S2, S4 et S6 ; et la plus importante en hiver 2010 (maximum de 339 %) qui a lieu au niveau de toutes les stations exceptée en S1.

Les stations représentatives de l'ensemble de l'étang (S2, S4 et S6) tendent à être les plus saturées en oxygène (**Figure 7B**).

### **Turbidité et transparence de l'eau**

La transparence de l'eau varie de 40 à 100 cm avec une moyenne de  $63 \pm 15$  cm d'avril 2009 à octobre 2010 (**Figure 6D**). La dynamique temporelle de la transparence de l'eau montre une saisonnalité avec une eau plus claire en été et au début de l'automne 2009 et 2010, ainsi que durant l'hiver 2010. La turbidité de l'eau est la plus forte durant le printemps.

La turbidité de l'eau ne varie pas significativement entre les différentes stations échantillonnées (**Figure 6C**).

### **PH**

Le pH de l'eau de l'étang de l'Olivier varie entre 7.30 et 8.65 (**Figure 6E**). Il est globalement plus faible en hiver et plus élevé en avril 2009, avril et juillet 2010.

Les pH des différentes stations de surface sont similaires ( $p > 0.05$ ,  $n=100$ , ANOVA), avec, toutefois, des pH sensiblement plus faibles aux stations S1 et S3 (**Figure 7D**).

### **Concentrations en éléments minéraux**

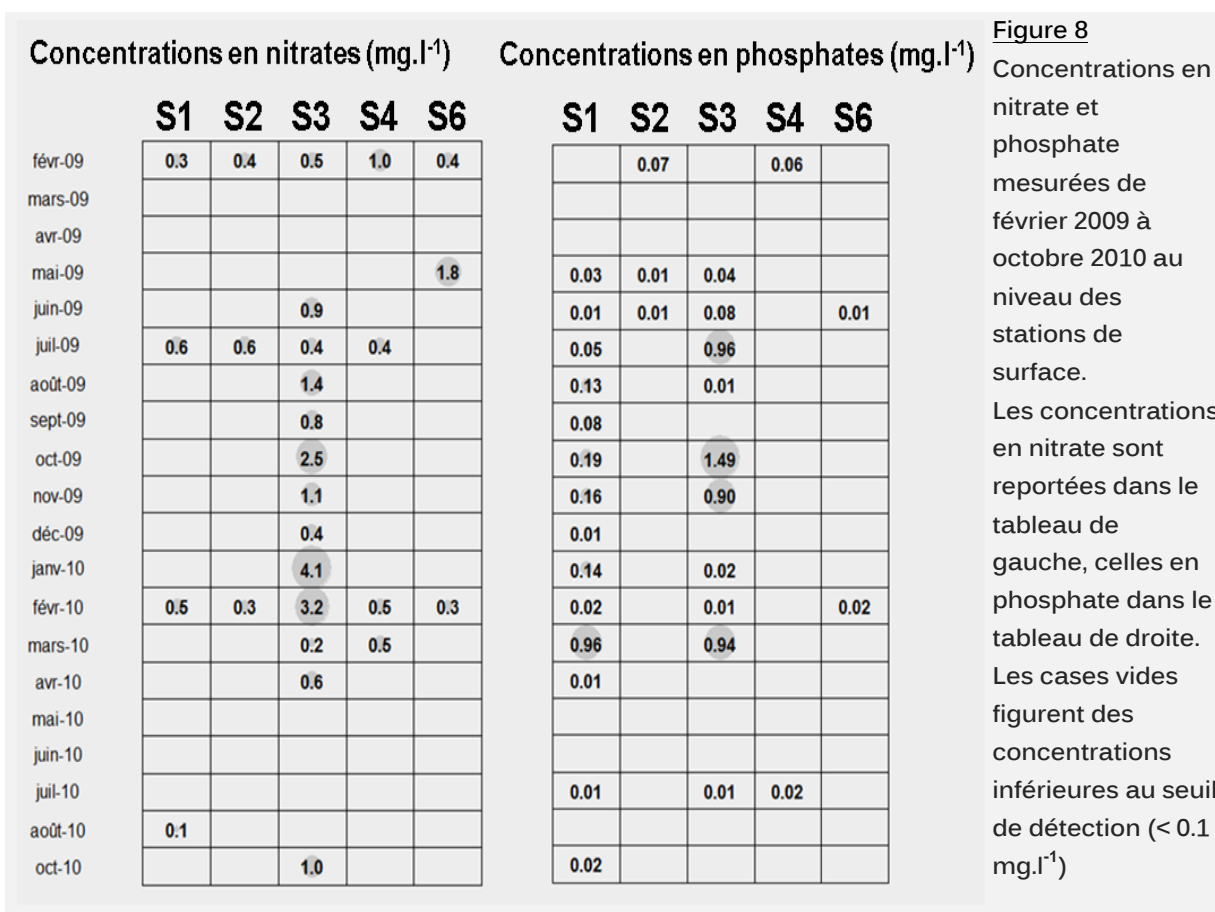
#### Eléments azotés

Des concentrations en nitrite ( $\text{NO}_2$ ) égales au seuil de détection ( $0.01\text{mg.l}^{-1}$ ) ont été détectées trois fois au cours de la période d'étude ; en S6 au mois de mai 2009 et en S3 aux mois d'octobre 2009 et février 2010.

Une seule concentration en ion ammonium ( $\text{NH}_4$ ) égale au seuil de détection ( $0.1\text{mg.l}^{-1}$ ) a été mesurée en S3 au mois de juillet 2009. Tous les autres échantillons présentent des concentrations en nitrite et ammonium inférieures aux seuils de détection.



Les nitrates (NO<sub>3</sub>) sont le plus fréquemment détectés au niveau de la station S3 avec des concentrations supérieures au seuil de détection mesurées 12 fois sur les 20 mois de l'étude alors qu'ils sont détectés 3 ou 4 fois au niveau des autres stations de surface (**Figure 8**).



La station S3 est également la station la plus fortement chargée en nitrates ( $p < 0.05$ ,  $n=112$ , ANOVA) avec une concentration moyenne de  $0.86 \pm 1.15$  mg.l<sup>-1</sup> et une concentration maximale de 4.1 mg.l<sup>-1</sup> en janvier 2010. Les nitrates sont principalement présents en hiver (concentration moyenne de  $0.52 \pm 0.27$  mg.l<sup>-1</sup> en février 2009 et de  $0.96 \pm 1.26$  mg.l<sup>-1</sup> en février 2010).

La concentration moyenne en nitrate durant la période d'étude est de  $0.25 \pm 0.64$  mg.l<sup>-1</sup>. Le niveau trophique de l'étang de l'Olivier est oligo-mésotrophe selon la classification du niveau trophique des étangs [Wetzel 1983].

#### Eléments phosphatés

Les orthophosphates (PO<sub>4</sub>) sont le plus fréquemment détectés aux stations S1 et S3 (14 et 10 fois sur 20 mois) (**Figure 8**). Les concentrations au niveau de ces stations sont très variables

dans le temps et peuvent atteindre de très fortes concentrations ;  $0.96 \text{ mg.l}^{-1}$  en S1 en mars 2010, et jusqu'à  $1.49 \text{ mg.l}^{-1}$  en S3 en octobre 2009.

La concentration moyenne en phosphates de l'étang durant la période d'étude est de  $0.065 \pm 0.035 \text{ mg.l}^{-1}$ , l'étang fait donc partie des milieux eutrophes selon la classification de Wetzel *et al.* [1983].

#### Eléments sulfatés

Les sulfates sont retrouvés à toutes les stations échantillonnées sans de saisonnalité marquée. La station S3 se différencie des autres stations par une concentration moyenne en sulfate plus faible ( $213 \pm 86 \text{ mg.l}^{-1}$ ) que celle au niveau des autres stations ( $309 \pm 57 \text{ mg.l}^{-1}$ ), ( $p < 0.05$ ,  $n=112$ , ANOVA).

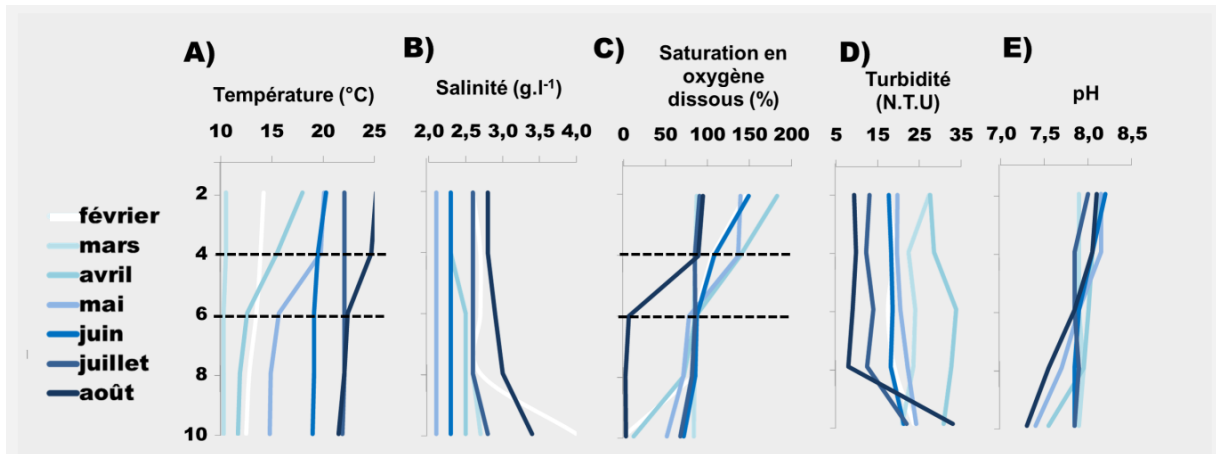
### 1.1.2. Variations verticales

#### Température, salinité, saturation en oxygène dissous, turbidité et pH

La salinité moyenne ne varie pas selon la profondeur des deux colonnes d'eau C et D excepté une salinité légèrement plus élevée en C10 (**Figure 7A**). La saturation en oxygène diminue avec la profondeur, les différences sont significatives entre les 5 premiers mètres et les 5 mètres du fond de la colonne d'eau C (**Figure 7B**). De même, bien que les différences ne soient pas significatives, le pH de l'eau a tendance à diminuer avec la profondeur contrairement à la turbidité qui a tendance à augmenter avec la profondeur des colonnes d'eau (**Figure 7C et D**).

Les mois d'avril, mai et août 2010 sont marqués par une petite stratification thermique le long de la colonne d'eau centrale de l'étang (colonne C) avec la formation d'un métalimnion entre 4 et 6 mètre de profondeur (**Figure 9A**). Cette stratification thermique s'accompagne de celle de la saturation en oxygène (diminution de 140 à 80% en avril et mai et de 90 à 6% en août) (**Figure 9C**). Les mêmes mois sont marqués par une diminution du pH de l'eau entre 4 mètres et le fond de l'étang (diminution de 0.6 en avril et de 0.75 en mai et août). Le mois de février est marqué par une période d'anoxie (0% d'oxygène dissous) et une petite augmentation de salinité (de  $2.7$  à  $4 \text{ g.l}^{-1}$ ) au fond de l'étang. Mis à part cette augmentation, la salinité ne varie pas le long de la colonne d'eau (écart maximal de salinité de  $0,6 \text{ g.l}^{-1}$  en août) (**Figure 9B**). La turbidité le long de

la colonne d'eau varie peu, elle augmente principalement en août entre 8 mètres et le fond de l'étang (de 8 à 33 N.T.U) (**Figure 9D**).



**Figure 9** Variation des paramètres physico-chimiques de l'eau en fonction de la profondeur de la colonne d'eau centrale C de février 2010 à août 2010.

A) température de l'eau (°C), (B) salinité (g.l<sup>-1</sup>), (C) saturation en oxygène dissous (%), (D) turbidité (N.T.U), (E) pH.

La colonne d'eau D, en raison de sa faible profondeur, ne présente pas de stratification des paramètres vus ci-dessus.

### Concentrations en éléments minéraux

#### Eléments azotés

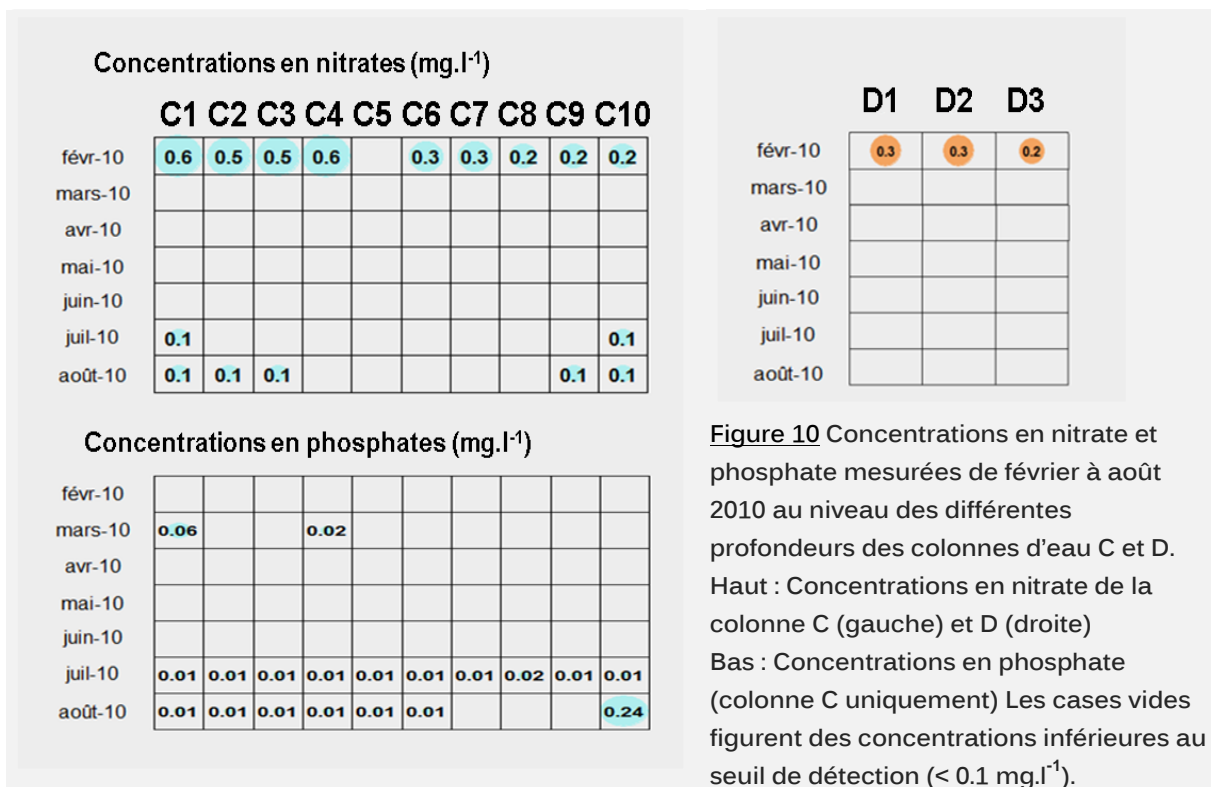
Les concentrations en nitrite et ammonium sont inférieures aux seuils de détection le long des deux colonnes d'eau.

Les nitrates sont principalement concentrés au mois de février le long des deux colonnes d'eau (concentration moyenne de  $0.34 \pm 0.20$  mg.l<sup>-1</sup> en C et de  $0.27 \pm 0.06$  mg.l<sup>-1</sup> en D) avec une concentration qui diminue avec la profondeur (**Figure 10**). Des concentrations en nitrate égales au seuil de détection sont également détectées en juillet et en août à proximité de la surface et au fond de la colonne d'eau C.

#### Eléments phosphatés

Les orthophosphates sont peu concentrés le long de la colonne d'eau C et sous le seuil de détection le long de la colonne D (**Figure 10**). Les concentrations en phosphate égales au seuil de détection ( $0.01$  mg.l<sup>-1</sup>) sont détectées tout le long de la colonne C en juillet 2010, et dans les 6 premiers mètres de la colonne C en août. Une forte concentration ( $0.24$  mg.l<sup>-1</sup>) est cependant

détectée au fond de l'étang au mois d'août surement dû à un relargage par le sédiment. Des concentrations à 1 et 4 mètre de fond sont également détectées en mars.



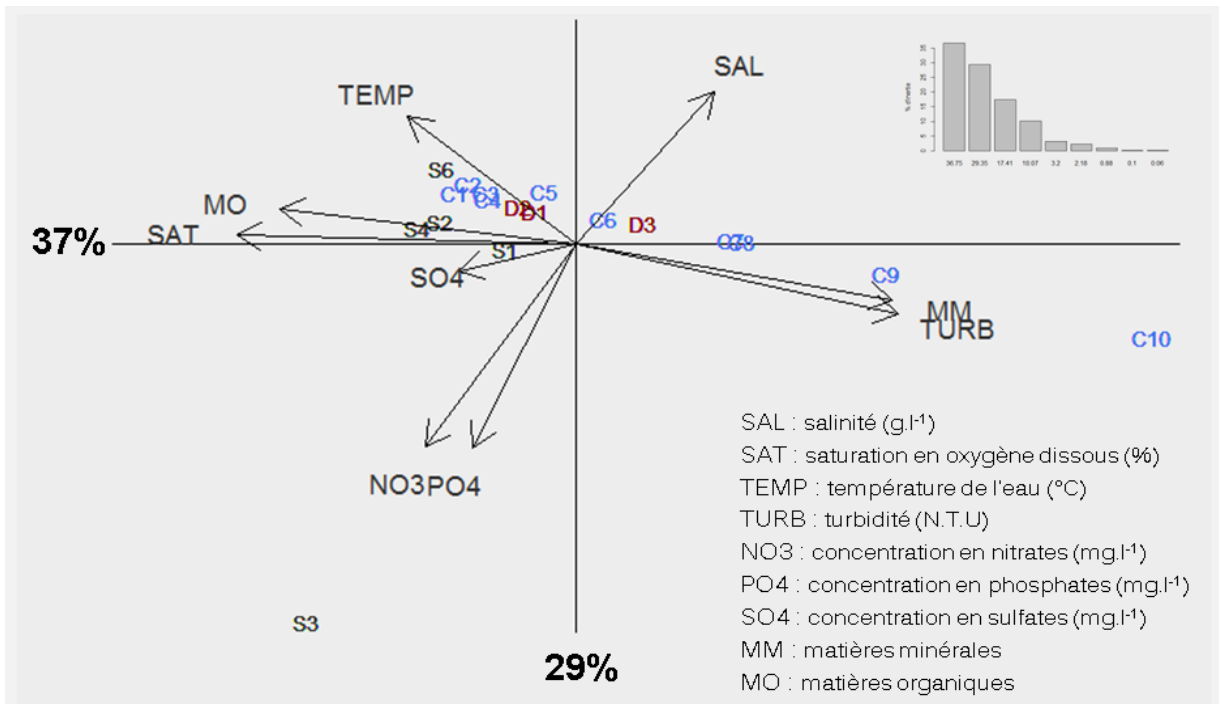
**Figure 10** Concentrations en nitrate et phosphate mesurées de février à août 2010 au niveau des différentes profondeurs des colonnes d'eau C et D. Haut : Concentrations en nitrate de la colonne C (gauche) et D (droite) Bas : Concentrations en phosphate (colonne C uniquement) Les cases vides figurent des concentrations inférieures au seuil de détection (< 0.1 mg.l<sup>-1</sup>).

### Eléments sulfatés

Les sulfates sont, de même qu'en surface, retrouvés à toutes les stations sans de différence spatiales ni temporelles le long des deux colonnes d'eau.

### 1.3. Distribution des stations échantillonnées en fonction des variables environnementales

Afin d'apprécier la variabilité de l'environnement physico-chimique des stations échantillonnées de l'étang de l'Olivier, une analyse en composante principale a été réalisée sur les moyennes temporelles (**Figure 11**).



**Figure 11** Ordination des stations échantillonnées en fonction des caractéristiques physico-chimiques de l'eau à partir d'une analyse en composante principale.

L'ébouilissement des valeurs propres de l'ACP est représenté en haut à gauche. Les stations de surface sont indiquées en noires, celles de la colonne C en bleu et celles de la colonne D en marron.

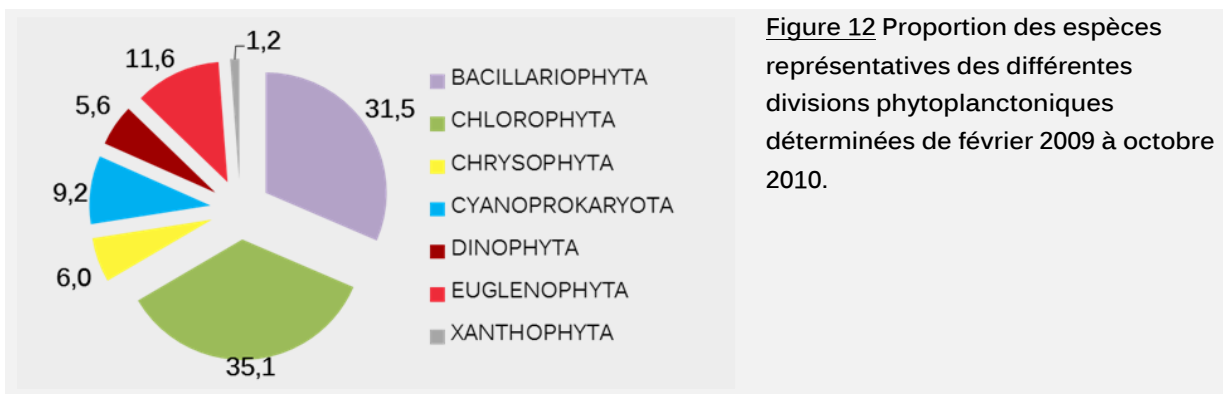
Le premier axe de l'ACP rend compte de 37 % de l'inertie totale. L'axe est fortement corrélé avec la concentration en matière minérale et la turbidité du côté positif et avec la saturation de l'eau en oxygène et la concentration en matière organique du côté négatif de l'axe. Il oppose les stations des profondeurs de la colonne C qui sont troubles et chargées en matières minérales, aux stations de faible profondeur de la colonne C et aux stations de surface qui sont fortement saturées en oxygène dissous et chargées en matières organiques. Plus la station de la colonne C est profonde, plus l'eau est trouble et chargée en matières minérales. La température différencie la station S6 des stations S2 et S4 ; tandis que la concentration en sulfate différencie la station S1 des stations S2, S4 et S6. Le deuxième axe rend compte de 29% de l'inertie de l'ACP. Il est corrélé avec la salinité et la température et rend compte du gradient d'eutrophisation des stations échantillonnées. Il différencie la station S3 des autres stations, la station S3 étant la plus riche en éléments nutritifs et la moins salée.

## 2. Structure du peuplement phytoplanctonique

Les différences entre les stations ont été testées (i) en prenant en compte les 20 mois d'échantillonnage lorsque la différence est testée entre les stations de surface (S1, S2, S3, S4, S6) ; (ii) en prenant en compte les 7 mois d'échantillonnage lorsque les différences sont testées entre toutes les stations échantillonnées (C1 à C10, D1, D2, D3 et S1, S2, S3, S4, S6).

### 2.1. Richesse spécifique

249 espèces phytoplanctoniques ont été déterminées dans l'étang de l'Olivier, sur l'ensemble des stations. La division des Chlorophytes est la plus représentée en nombre d'espèces (88), Les Bacillariophytes constituent la deuxième division la plus représentée en nombre d'espèce (79), suivi de celle des Euglenophytes (29), des Cyanoprokaryota (23), des Chrysophytes et des Dinophytes (14) et des Xanthophytes (3) (**Figure 12**). La totalité des espèces est listée dans le tableau en annexe (**Annexe. B**).



**Figure 12** Proportion des espèces représentatives des différentes divisions phytoplanctoniques déterminées de février 2009 à octobre 2010.

La richesse spécifique ne varie pas selon les différentes stations horizontales et verticales de l'étang de l'Olivier (**Figure 13A**,  $p < 0.05$ , ANOVA). Il a été déterminé en moyenne 23 espèces par station et par mois avec un minimum de 11 espèces en S2 en mai 2009 et un maximum de 85 espèces en S3 en juillet 2009.

Le nombre d'espèces varie au cours du temps (**Figure 14A**). La richesse spécifique est minimale au printemps avec en moyenne 21 espèces détectées par mois aux différentes stations échantillonnées de mars à avril 2009 ; et 17 espèces du mois d'avril à juin 2010. La richesse spécifique au cours de la période d'étude est maximale à la fin de l'été et au début de

l'automne 2009 avec en moyenne 36 espèces détectées par mois dans les prélèvements effectués de juillet à septembre 2009. Bien que la richesse spécifique ne varie pas significativement entre les différentes stations, la dynamique moyenne de la richesse spécifique le long des colonnes d'eau a été analysée. Le minimum de richesse est retrouvé, comme au niveau des stations de surface, en mai et juin 2010. Cependant un petit pic de richesse est observé en mars où 25 espèces sont déterminées alors que 16 seulement sont recensées en mai et juin.

## 2.2. Indices de Shannon (IS) et d'Équitabilité (IE)

Les indices de Shannon (IS) et d'Équitabilité (IE) moyens ne varient pas spatialement dans l'étang de l'Olivier ; la diversité moyenne est similaire au niveau des différentes stations échantillonnées, sans différence significative ( $p > 0.05$ , Kruskal-Wallis), indiquant une homogénéité spatiale horizontale et verticale de la diversité phytoplanctonique de l'étang (Figure 13B et C).

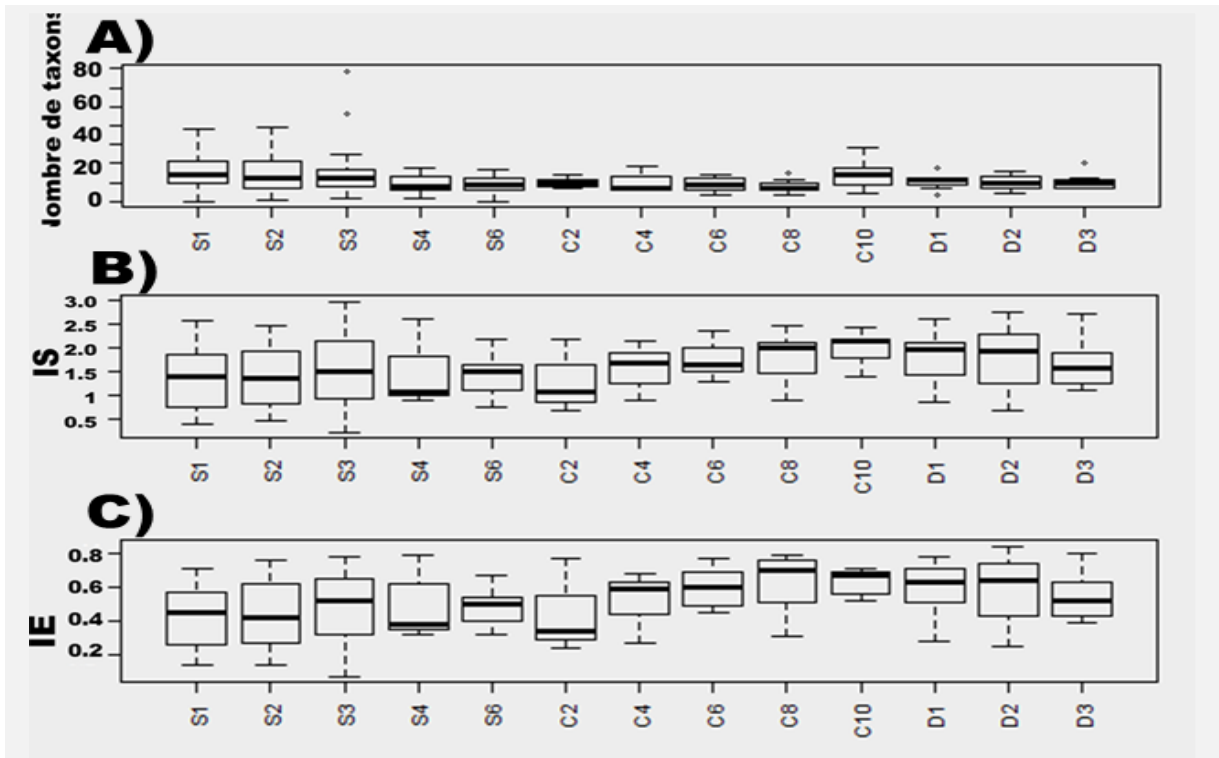


Figure 13 Valeurs médianes, 1er et 3ème quartiles des indices de diversité au niveau de chaque station échantillonné.

(A) richesse spécifique, (B) indice de Shannon, (C) Indice d'équitabilité de Pielou (IE)

Les IS et IE varient au cours du temps de façon équivalente (coefficient de corrélation entre les deux indices de 0.96,  $p < 2.10^{-16}$ ,  $n=130$ ) selon une tendance saisonnière similaire en 2009 et en 2010 avec des pics de diversité à la fin de l'été et au début de l'automne, et des minima au printemps (Figure 14B et C).

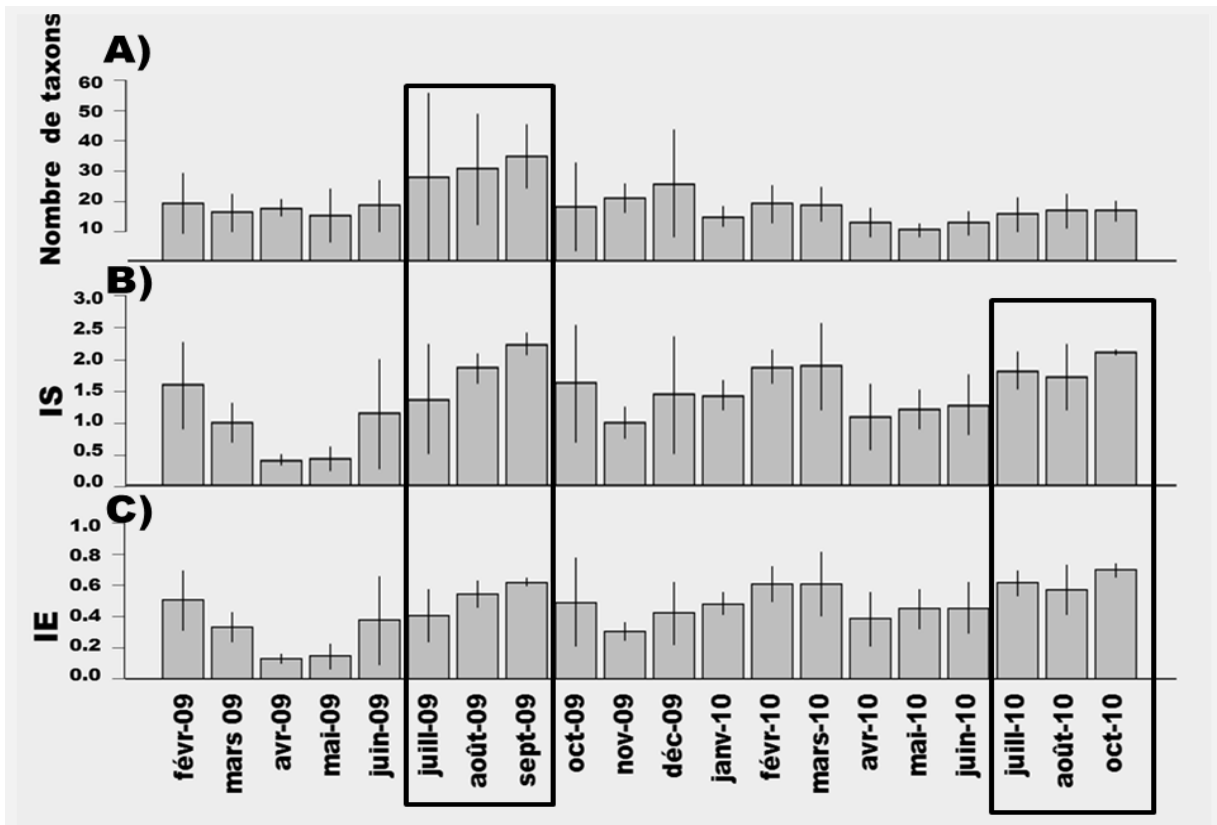


Figure 14 Dynamique temporelle des valeurs médianes, 1er et 3ème quartiles des indices de diversité de février 2009 à octobre 2010  
 (A) richesse spécifique, (B) indice de Shannon (IS), (C) Indice d'équitabilité de Pielou (IE)

### 2.3. Fréquence d'occurrence des espèces

Les cyanobactéries sont les plus fréquemment rencontrées dans l'étang de l'Olivier, alors que celles-ci représentent seulement 9 % des espèces déterminées (Figure 15). De même pour les Dinophytes qui sont aussi fréquentes que les Chlorophytes. Le phénomène inverse est observé pour les divisions des Bacillariophytes et des Euglenophytes qui sont composées de beaucoup d'espèces mais sont relativement peu fréquentes.



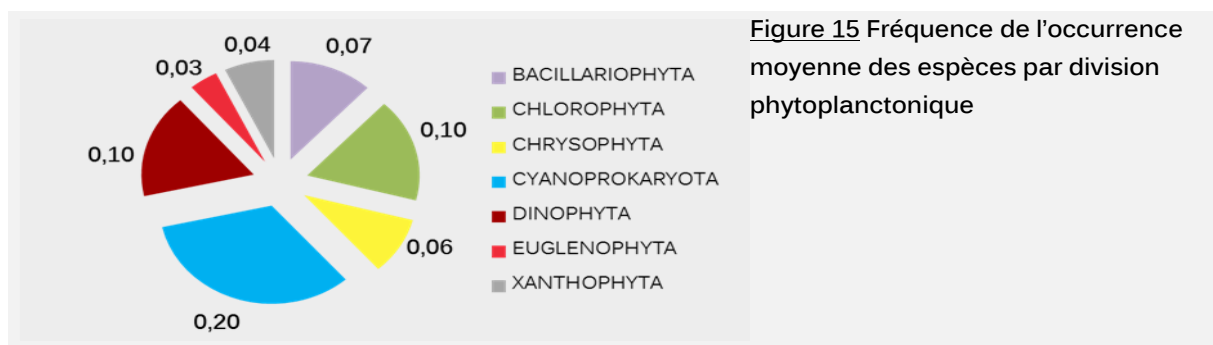


Figure 15 Fréquence de l'occurrence moyenne des espèces par division phytoplanctonique

La fréquence d'occurrence des espèces permet de les regrouper en 3 catégories d'espèces selon leur constance dans le peuplement [Dajoz 1985]. Les espèces présentes dans plus de 50 % des échantillons sont des espèces communes, les espèces qui sont retrouvées dans 25 à 49 % des échantillons sont qualifiées d'accessoires, et les espèces présentes dans moins de 25 % des échantillons sont des espèces accidentelles. Plus de 91 % des espèces peuplant l'étang de l'Olivier en 2009 et 2010 sont des espèces accidentelles ; seulement 3,6 % du peuplement est constitué d'espèces accessoires et 4,8 % d'espèces constantes (Figure 16). Parmi les espèces accidentelles, 82 % sont présentes dans moins de 10 % des échantillons.

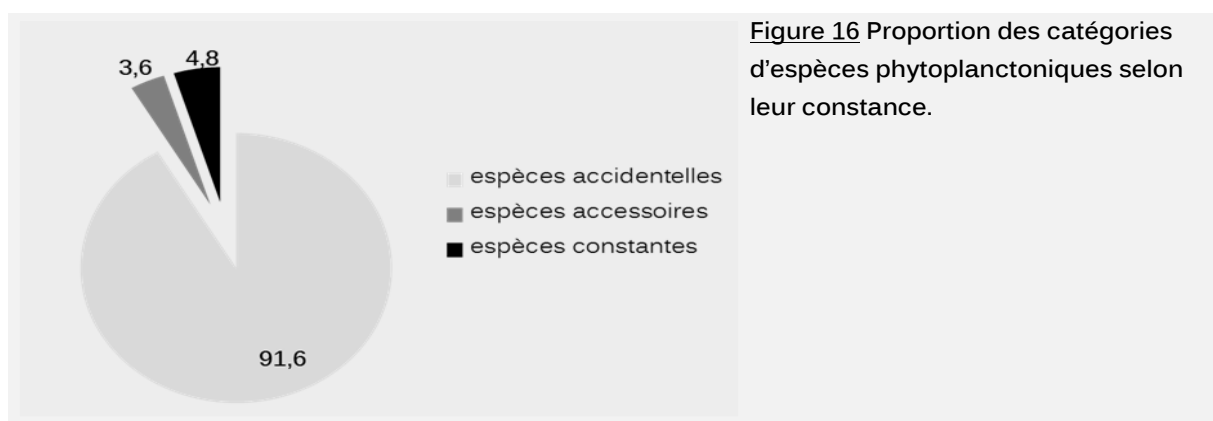


Figure 16 Proportion des catégories d'espèces phytoplanctoniques selon leur constance.

Des espèces de Chlorophytes, Bacillariophytes, cyanobactéries et Dinophytes constituent les espèces communes et accessoires. Parmi les 12 espèces communes, 4 espèces de cyanobactéries sont présentes dans plus de 95 % des échantillons, dont 3 sont les espèces les plus fréquemment retrouvées (Figure 17). Celles-ci sont des Oscillatoriales : *Planktothrix agardhii* qui est omniprésente (occurrence de 100%), *Planktolyngbya limnetica* et *Limnothrix planctonica*. 6 espèces de Chlorophytes (*Monoraphidium griffithii*, *Monoraphidium dybowski*, *Kirchneriella obesa*, *Pyramimonas cordata*, *Dictyosphaerium pulchellum* et *Oocystis lacustris*) et 2 espèces de *Cyclotella* (*C. atomus* et *C. meneghiniana*) complètent le groupe des espèces

communes. Le cortège d'espèces accessoires est composé de 4 espèces de Chlorophytes (*Planktonema lauterbornii*, *Monoraphidium contortum*, *Oocystis solitaria* et *Golenkinia radiata*), 3 espèces de *Nitzschia* (*N. paleacea*, *N. closterium* et *N. palea*) et 2 Dinophytes (*Prorocentrum minimum* et *Heterocapsa rotundata*). Près de la moitié des espèces communes et accessoires sont des Chlorophytes (10 espèces) dont 8 sont des chlorococcales. Les 5 diatomées de ces 2 groupes sont de 2 genres ; *Cyclotella* et *Nitzschia*.

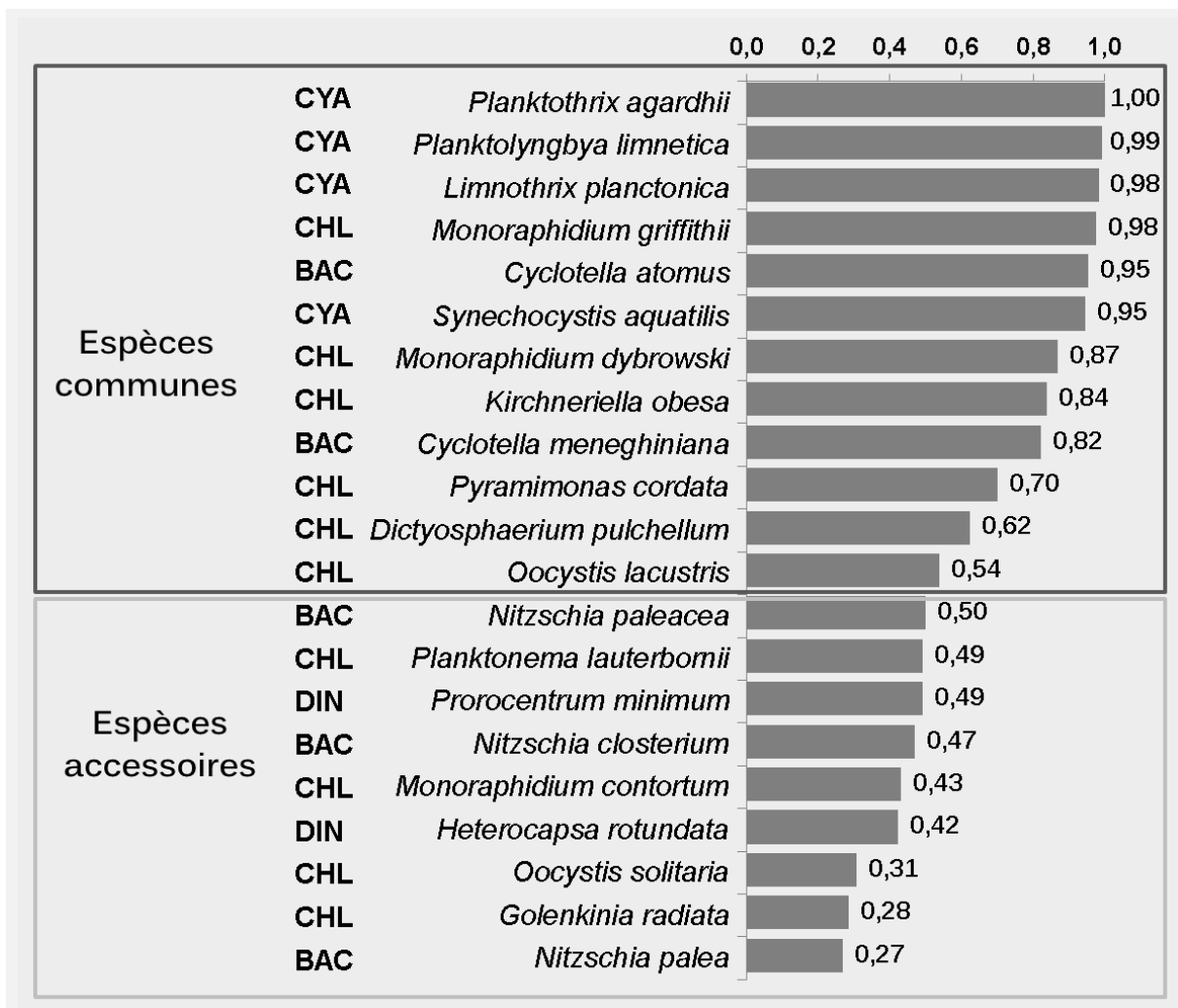


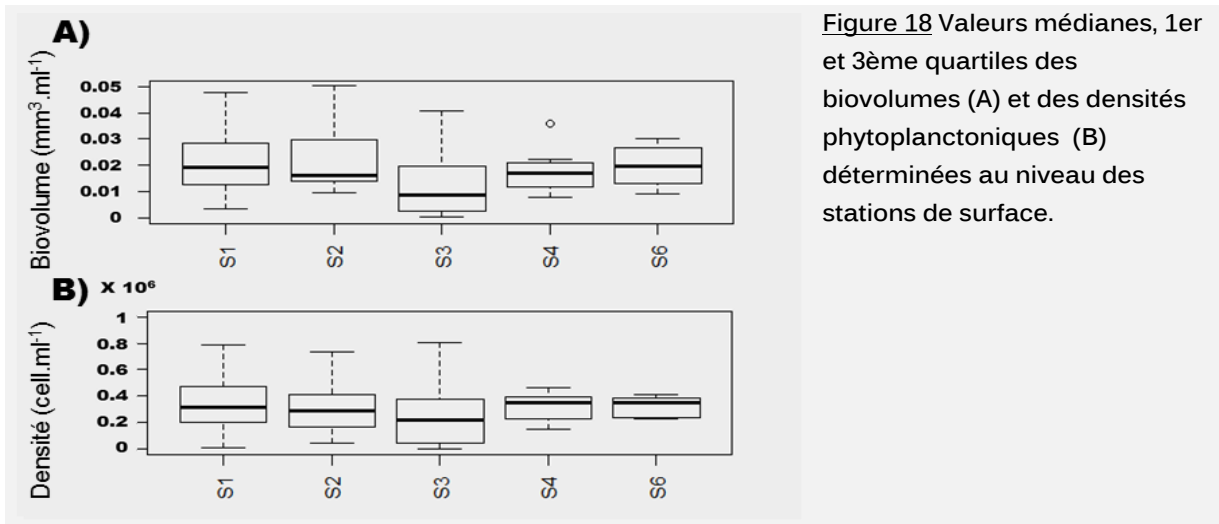
Figure 17 Fréquence d'occurrence des espèces communes et accessoires de l'étang de l'Olivier de février 2009 à octobre 2010.

CYA: Cyanobacteria; CHL: Chlorophyta; BAC: Bacillariophyta; DIN: Dinophyta

### 3. Dynamique spatio-temporelle phytoplanctonique

#### 3.1. Densités cellulaires et biovolumes phytoplanctoniques

Les densités cellulaires et les biovolumes phytoplanctoniques ne diffèrent pas significativement entre les différentes stations de surface ( $p > 0.05$ , ANOVA,  $n=82$ ) (**Figure 18**). Les densités cellulaires phytoplanctoniques en sub-surface de l'étang de l'Olivier varient entre  $4.4 \cdot 10^3$  et  $1.3 \cdot 10^6$  cell.ml<sup>-1</sup>, avec une densité moyenne sur l'année de  $0.29 \cdot 10^6 \pm 0.26 \cdot 10^6$  cell.ml<sup>-1</sup>. Les biovolumes phytoplanctoniques varient entre  $0.51 \cdot 10^{-3}$  et  $0.11$  mm<sup>3</sup>.ml<sup>-1</sup> en surface, avec un biovolume moyen annuel de  $0.019 \pm 0.017$  mm<sup>3</sup>.ml<sup>-1</sup>.



**Figure 18** Valeurs médianes, 1er et 3ème quartiles des biovolumes (A) et des densités phytoplanctoniques (B) déterminées au niveau des stations de surface.

Les densités cellulaires totales des stations de surface sont corrélées avec les biovolumes totaux aux différents temps échantillonnés (coefficients de corrélation de 0.80,  $p < 2 \cdot 10^{-16}$ ,  $n=72$ ). Cependant, les densités des différentes divisions phytoplanctoniques sont différemment corrélées avec les biovolumes : Les Chlorophytes et les Bacillariophytes présentent des biovolumes moins bien corrélés avec les densités (coefficients de corrélation de 0.6 et 0.67, respectivement), tandis que les coefficients de corrélation des biovolumes avec les densités cellulaires des autres divisions phytoplanctoniques varient entre 0.93 et 0.98 ( $n=72$ ) (**Figure 19**). Les résultats seront présentés par la suite en biovolume (mm<sup>3</sup>.ml<sup>-1</sup>).

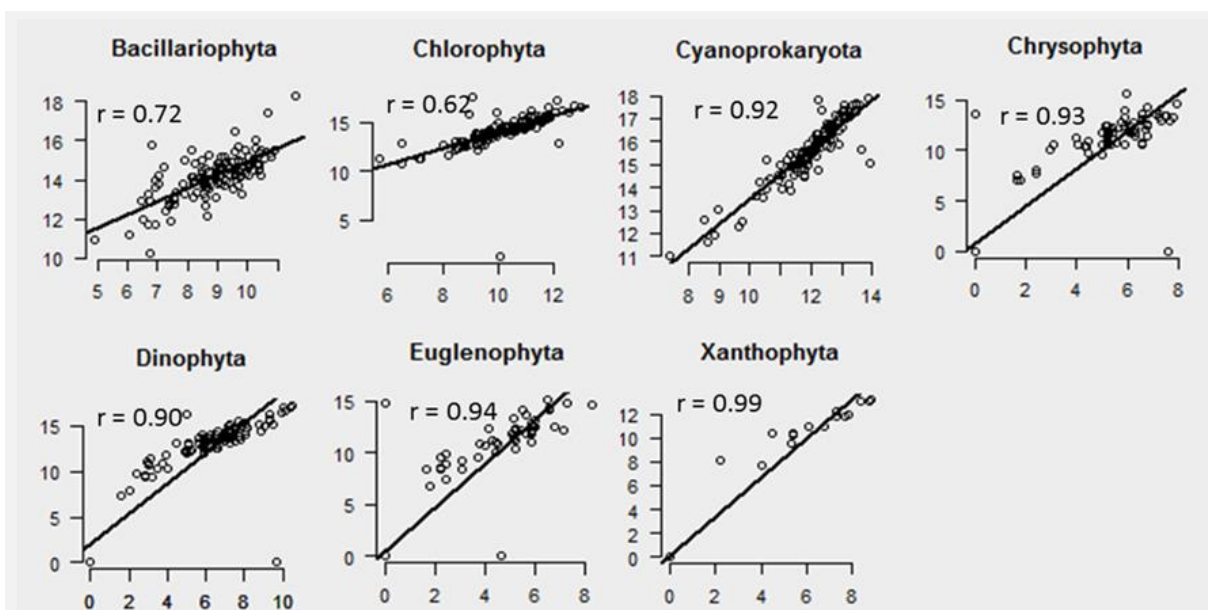


Figure 19 Corrélations entre les densités cellulaires et les biovolumes des différentes divisions phytoplanctoniques

Les données de densités et de biovolumes sont transformées par la relation  $\log(x + 1)$ .  
 Les coefficients de Pearson de chaque corrélation sont indiqués sur les graphiques.

La dynamique temporelle du biovolume phytoplanctonique aux stations de surface montre trois pics de biovolume (Figure 20).

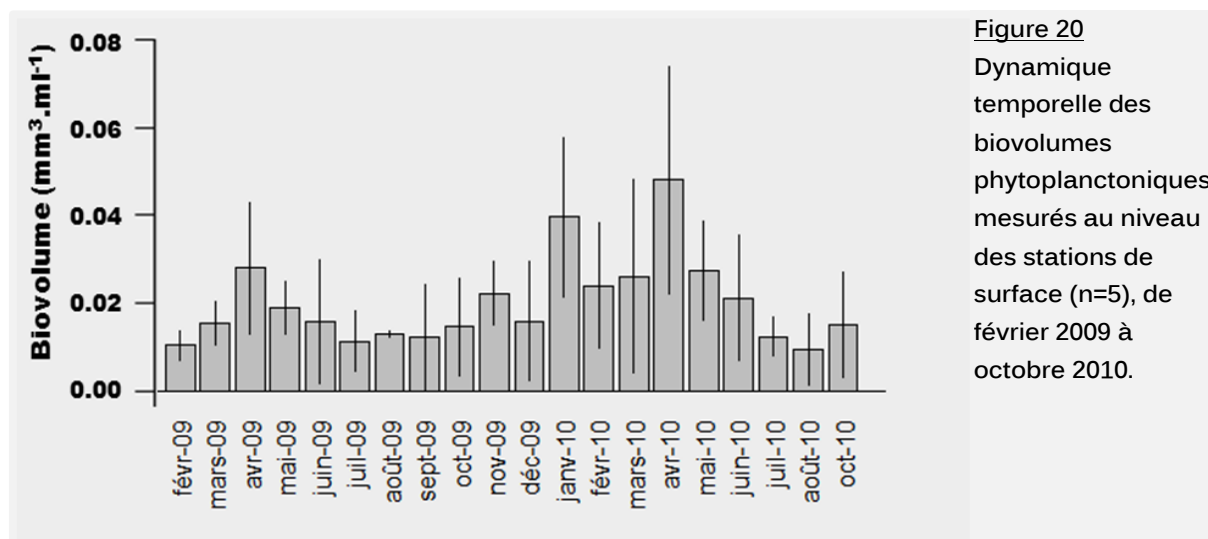


Figure 20  
 Dynamique temporelle des biovolumes phytoplanctoniques mesurés au niveau des stations de surface (n=5), de février 2009 à octobre 2010.

Un pic de biovolume a lieu en janvier 2010 qui atteint  $0.039 \pm 0.017 \text{ mm}^3.\text{ml}^{-1}$ , les deux autres pics ont lieu au printemps, en avril 2009 ( $0.029 \pm 0.015 \text{ mm}^3.\text{ml}^{-1}$ ) et en avril 2010 ( $0.044 \pm 0.029 \text{ mm}^3.\text{ml}^{-1}$ ). Les minima sont observés en été ; en juillet et août 2009 ( $0.015 \pm 0.007 \text{ mm}^3.\text{ml}^{-1}$ ) et en juillet et en août 2010 ( $0.009 \pm 0.008 \text{ mm}^3.\text{ml}^{-1}$ ). Les écarts-types sont faibles en août 2009 ( $0.0008 \text{ mm}^3.\text{ml}^{-1}$ ) et en juillet 2010 ( $0.004 \text{ mm}^3.\text{ml}^{-1}$ ) démontrant une homogénéité spatiale du

minimum de biovolume phytoplanctonique en été. Les mois de mai et juin 2009 et 2010 montrent un biovolume moyen qui décroît du pic printanier au minimum estival. Au contraire, les biovolumes phytoplanctoniques moyens augmentent progressivement durant l'automne et ce jusqu'au pic printanier mis à part le pic de biovolume observé en janvier 2010.

### 3.2. *Dynamiques spatio-temporelle du phytoplancton*

Les dynamiques temporelles du phytoplancton sont analysées aux 3 stations S1, S2 et S3 en raison de leur diversité physico-chimique (exposée au paragraphe 1, p. 61) susceptible d'influencer la structure du peuplement. Les dynamiques observées en S4 et S6 ont été analysées de la même façon, afin de s'assurer que la dynamique ne présentait pas de différence majeure avec la station S2, cette station présentant des caractéristiques abiotiques similaires à celles de S4 et S6. Seules les dynamiques temporelles en S1, S2 et S3 de février 2009 à octobre 2010 sont présentées. Les dynamiques temporelles du phytoplancton au niveau des colonnes sont analysées durant 7 mois ; de février 2010 à août 2010 afin d'appréhender les variabilités verticales du phytoplancton lors d'un pic et d'un minimum de biovolume phytoplanctonique en surface. Le phytoplancton de la colonne C a été analysé tous les 2 mètres, i.e. en C2, C4, C6, C8 et C10.

Afin de mieux rendre compte de la dynamique spécifique du phytoplancton dans l'étang de l'Olivier, les espèces rares (fréquence d'occurrence inférieure à 5%) ont été sommées et représentées ensemble. Ainsi, les dynamiques des biovolumes de 68 espèces sont présentées (**Figure 21**). Seules quelques espèces phytoplanctoniques constituent la majorité du biovolume total de chaque division phytoplanctonique. Ainsi le biovolume des cyanobactéries est constitué principalement de l'espèce *Planktothrix agardhii* (qui représente environ 85 % du biovolume des cyanobactéries durant la période d'étude) ; tout comme le biovolume des Chlorophytes est occupé principalement par des *Monoraphidium sp.* ; les Bacillariophytes par des *Cyclotella sp.*, et les Dinophytes par *Heterocapsa rotundata* et *Prorocentrum minimum*. Ces espèces sont toutes des espèces communes (cf. **Figure 17**) ; les espèces phytoplanctoniques les plus fréquentes sont donc également les plus nombreuses. Les espèces accidentelles constituent quant à elles une part minime du biovolume phytoplanctonique total ( $5 \pm 11$  % en moyenne au cours de la période d'étude, dans les 130 échantillons traités).

### 3.2.1. Dynamique horizontale

Les pics principaux de biovolume phytoplanctonique au printemps et en hiver sont retrouvés aux 3 stations de surface (**Figure 21A**). Des pics secondaires de biovolume en surface ont lieu en été et en automne. Le pic du printemps 2009 a lieu en avril en S2 et S3 et est décalé en S1 (mai-juin). Ce pic atteint le biovolume maximum observé en S3 ( $0.043 \text{ mm}^3 \cdot \text{ml}^{-1}$ ),  $0.030 \text{ mm}^3 \cdot \text{ml}^{-1}$  en S1, et  $0.028 \mu\text{m}^3 \cdot \text{ml}^{-1}$  en S2. Le pic du printemps 2010 est observé en avril au niveau des stations S1 et S2, il perdure jusqu'en juin en S1. Ce pic atteint maximum en S2 avec  $0.074 \text{ mm}^3 \cdot \text{ml}^{-1}$ , il atteint  $0.048 \text{ mm}^3 \cdot \text{ml}^{-1}$  en S1. Un plus faible pic est également observé en mai 2010 en S3 ( $0.015 \text{ mm}^3 \cdot \text{ml}^{-1}$ ).

Ces pics printaniers de biovolume sont majoritairement composés de cyanobactéries et particulièrement de l'espèce *Planktothrix agardhii* qui constitue alors entre 69 et 95% du biovolume phytoplanctonique total (**Figure 22A**). La proportion relative de *Planktothrix agardhii* par rapport au biovolume phytoplanctonique total est cependant plus importante au printemps 2009 qu'en 2010 (moyennes de  $90 \pm 6\%$  en 2009 et de  $70 \pm 16\%$  en 2010).

Le pic hivernal est également dominé par *Planktothrix agardhii* en S3 qui constitue entre 54 et 71 % du biovolume phytoplanctonique de décembre 2009 à février 2010. Le pic de janvier 2010 est également observé au niveau des stations S1 et S2, il atteint le biovolume maximal observé en S1 ( $0.072 \text{ mm}^3 \cdot \text{ml}^{-1}$ ) et  $0.035 \text{ mm}^3 \cdot \text{ml}^{-1}$  en S2. Le pic hivernal des stations S1 et S2 est constitué de *Planktothrix agardhii* et d'une espèce de Dinophyte, *Heterocapsa rotundata* qui constituent à elles deux  $37 + 38\%$  en S1, et  $32 + 36\%$  en S2 du biovolume phytoplanctonique total.

*Heterocapsa rotundata* est à l'origine des pics de biovolume secondaires qui atteignent  $0.012 \text{ mm}^3 \cdot \text{ml}^{-1}$  en S1 (67% du biovolume total) et  $0.024 \text{ mm}^3 \cdot \text{ml}^{-1}$  (79% du biovolume total) en S2 en novembre 2009.

Deux autres pics secondaires de biovolume ont lieu en été 2009 ; ils atteignent  $0.014 \text{ mm}^3 \cdot \text{ml}^{-1}$  en S1 en septembre 2009 et  $0.043 \text{ mm}^3 \cdot \text{ml}^{-1}$  en S3 en août 2009. Ils sont majoritairement constitués de diatomées accidentelles en S2 et de diatomées du genre *Cyclotella* en S3.

Les Chlorophytes sont surtout présente en 2010: De mars à octobre 2010 en S1 (moyenne de  $0.006 \text{ mm}^3.\text{ml}^{-1}$ ) ; d'avril à octobre 2010 (moyenne de  $0.009 \text{ mm}^3.\text{ml}^{-1}$ ) en S2; et en mars 2010 en S3.

### 3.2.2. Dynamique verticale

Les dynamiques temporelles au niveau des colonnes C et D présentent également des pics de biovolume de *Planktothrix agardhii* au printemps (**Figure 21B et C**). Deux pics de biovolume ont lieu en D1 et C2 ; en avril et en juillet en D1 ( $0.022$  et  $0.023 \text{ mm}^3.\text{ml}^{-1}$ ) et en avril et mai en C2 ( $0.038$  et  $0.035 \text{ mm}^3.\text{ml}^{-1}$ ). Des pics de biovolumes importants ont lieu en mai à 2 et 3 mètres de profondeur au point D ( $0.059$  et  $0.038 \text{ mm}^3.\text{ml}^{-1}$ ) et à 4 et 6 mètres de profondeur au point C ( $0.053$  et  $0.047 \text{ mm}^3.\text{ml}^{-1}$ ). Ces dynamiques tendent à montrer que l'espèce *Planktothrix agardhii* migre entre la surface et les premiers mètres de profondeur de la colonne d'eau. En effet, les stations situées à 8 et 10 mètres de profondeur ne présentent pas de pic de biovolume de *Planktothrix agardhii*. Ces deux dernières stations ne présentent pas de variation du biovolume phytoplanctonique total qui est relativement faible par rapport aux autres stations, mis à part un pic très important au fond de l'étang en juillet et août 2010 atteignant  $0.11 \text{ mm}^3.\text{ml}^{-1}$ . Ce pic de biovolume provient du relativement grand biovolume des *Cyclotella sp.* par rapport aux biovolumes des autres espèces phytoplanctoniques peuplant l'étang (fines Oscillatoriales, petites Chlorococcales). Excepté ce pic de diatomées, le cortège d'espèces peuplant les profils verticaux sont similaires à ceux observés en surface avec des faibles quantités de *Cyclotella sp.*, de *Monoraphidium sp.* et d'*Heterocapsa rotundata*. On note toutefois la présence plus importante de la Dinophyte *Prorocentrum minimum*.

La proportion du biovolume de *Planktothrix agardhii* par rapport au biovolume phytoplanctonique total au points D et C jusqu'à 6 mètres de fond est similaire à celle observée en surface pour la même période de temps ; à savoir un peuplement dominé par *Planktothrix agardhii* d'avril à juin 2010 (moyenne de  $70 \pm 17\%$  en D, C2, C4 et C6 ;  $70 \pm 16\%$  en surface) puis une diminution progressive de l'espèce parmi le biovolume phytoplanctonique jusqu'à un minimum en août 2010 (**Figure 22B et C**). La proportion de *Planktothrix agardhii* en C8 et C10 est plus variable, l'espèce partage la domination du peuplement phytoplanctonique avec les diatomées (moyenne de  $32 \pm 25\%$  de *Planktothrix agardhii* et  $31 \pm 24\%$  de diatomées).

D'une manière générale la division des cyanobactéries est dominante (9 mois sur 12 en S1, 7 mois sur 12 en S2, 10 mois sur 12 en S3). Les cyanobactéries constituent en moyenne 60% du peuplement en surface au cours d'une année et  $55 \pm 27\%$  du biovolume phytoplanctonique total sur les 130 échantillons analysés (profils horizontaux et verticaux) (**Figure 22**). Les diatomées constituent en moyenne  $17.6 \pm 17\%$  du biovolume phytoplanctonique total, les Chlorophytes  $16.1 \pm 15.3\%$ , et les Dinophytes  $9.0 \pm 15.6$ . Les Euglenophytes, les Chrysophytes et les Xanthophytes sont minoritaires ; ces divisions constituent en moyenne  $1.4 \pm 4.7\%$ ,  $1.2 \pm 2.7\%$  et  $0.2 \pm 0.8\%$  du biovolume phytoplanctonique total sur les 130 échantillons analysés.

L'espèce *Planktothrix agardhii* domine le peuplement spécifique phytoplanctonique dans 99 des 130 échantillons analysés, et constitue en moyenne  $49 \pm 27\%$  du biovolume phytoplanctonique total, sans différence significative entre les stations ( $p < 0.05$ , Kruskal-Wallis).



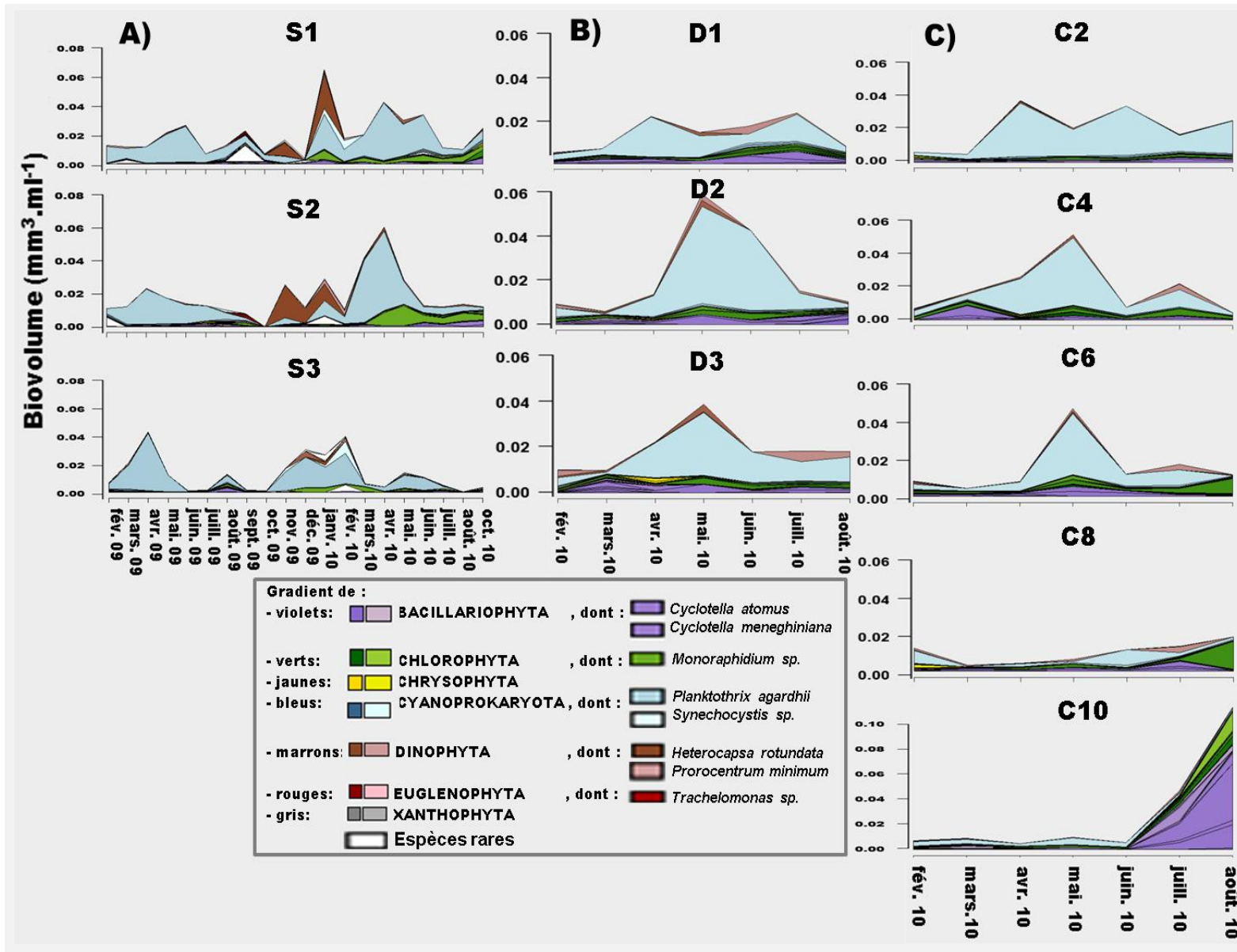


Figure 21 Dynamique saisonnière des biovolumes phytoplanctoniques de l'hiver 2009 à l'automne 2010 en surface (A) et de février à août 2010 eu niveau des colonnes D (B) et C (C). Les espèces d'une division phytoplanctonique sont représentées par un gradient d'une même couleur. Les biovolumes des espèces rares (< 5 % d'occurrence) ont été sommés et sont représentés en blanc. Les espèces dont les biovolumes sont assez conséquents pour apparaître sur les graphiques sont légendées.

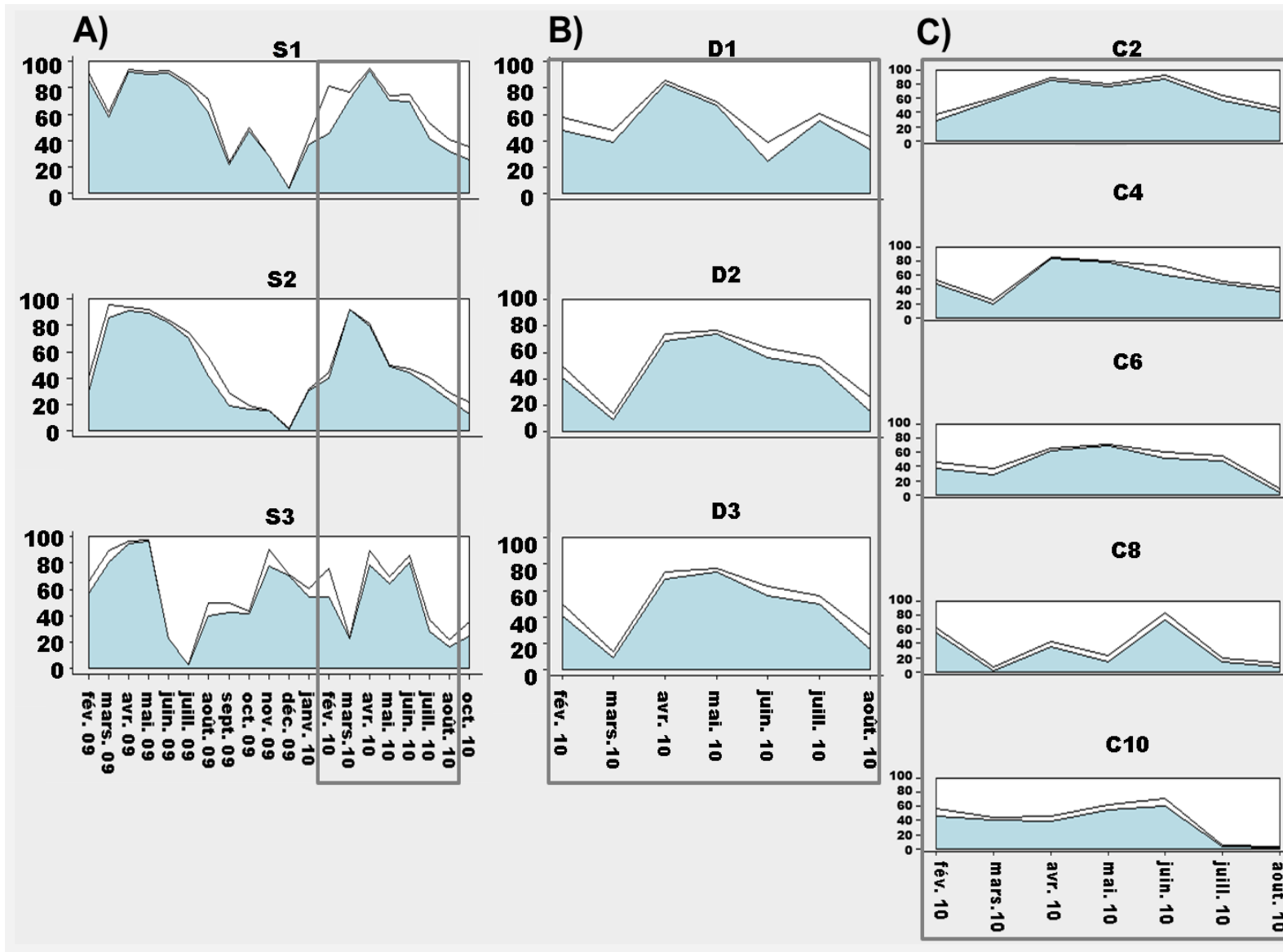
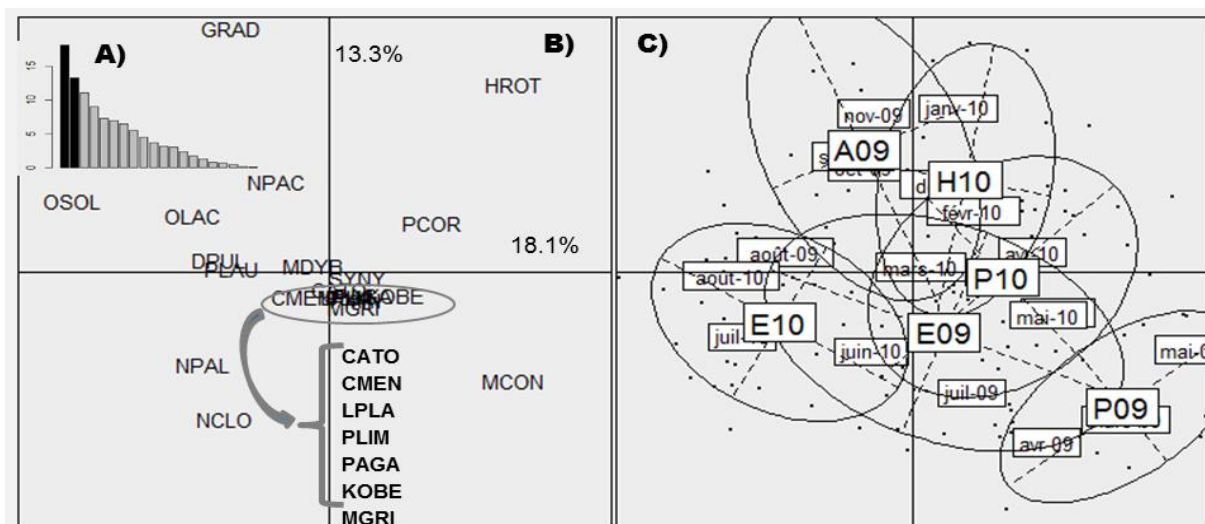


Figure 22  
 Proportion relative du biovolume de *Planktothrix agardhii* parmi le phytoplancton total de février 2009 à octobre 2010 au niveau des stations S1, S2 et S3 (A) et des colonnes D(B) et C (C). La dynamique des biovolumes de *Planktothrix agardhii* est figurée en bleu. La proportion du biovolume du phytoplancton autre que *Planktothrix agardhii* est figurée en blanc, la ligne noire indiquant la proportion du biovolume occupée par les cyanobactéries.

### 3.3. Succession saisonnière des espèces communes

Une analyse multivariée séparant les différentes campagnes de prélèvement a été réalisée afin d'analyser la succession saisonnière des espèces communes et accessoires (**Figure 23**).



**Figure 23** Analyse factorielle des correspondances inter-dates entre les 21 espèces communes et accessoires.

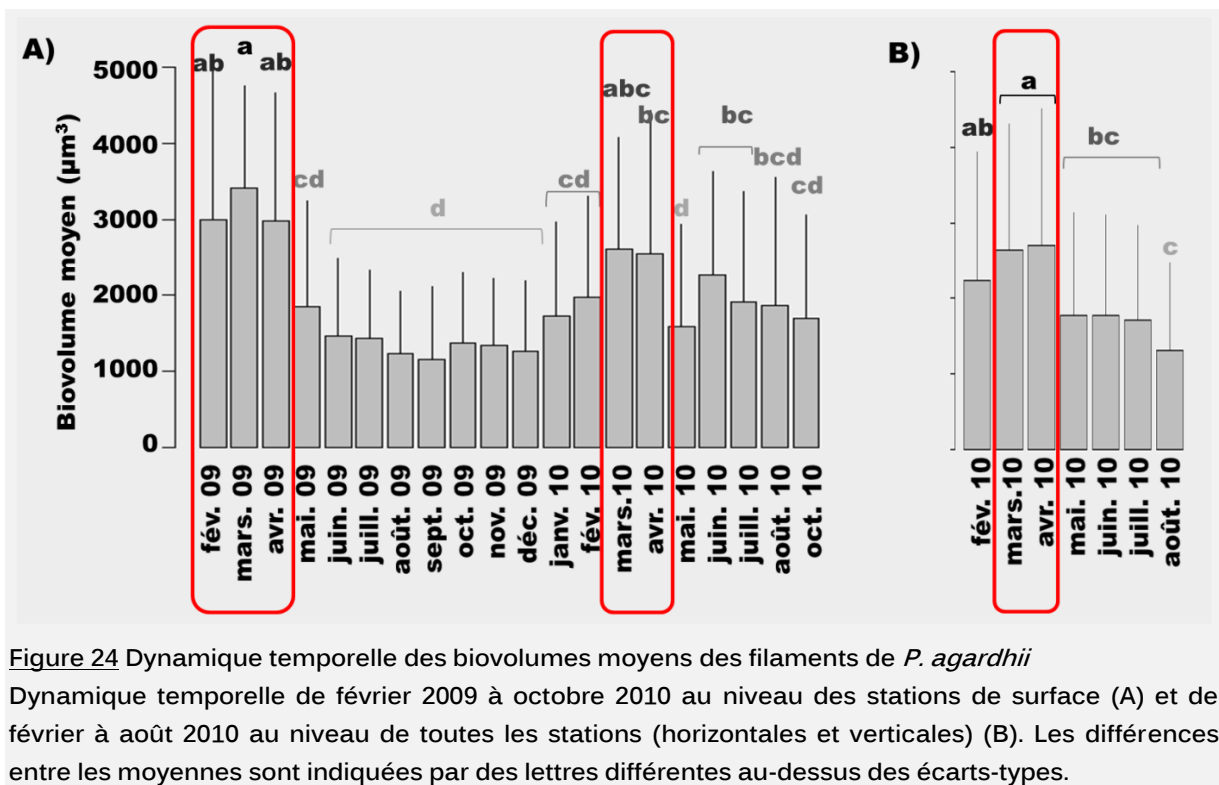
(A) Graphe des valeurs propres (en %) ; (B) carte factorielle des espèces communes (code des espèces indiqués dans le tableau en Annexe. B) ; (C) carte factorielle des relevés dont les étiquettes indiquent le centre de dispersion des relevés par date et par saisons (centre des ellipses) ; P09 et P10 : printemps 2009 et 2010, E09 et E10 : été 2009 et 2010, A09 : automne 2009, H10 : hiver 2010.

L'analyse est réalisée sur les biovolumes transformés en  $\log(x+1)$  des 21 espèces communes et accessoires (cf. **Figure 17**). Le premier axe de l'AFC rend compte de 18.1 % de l'inertie totale, il est principalement défini par les espèces de Chlorophytes : les 2 *Oocystis*, *Dictyosphaerium pulchellum*, et *Planktonema lauterbornii* dans la partie négative et *Pyramimonas cordata* et *Monoraphidium contortum* dans la partie positive. L'axe 2 rend compte de 13.3 % de l'inertie de l'AFC ; il est majoritairement défini par *Golenkinia radiata* et par les deux espèces de *Nitzschia*. Les 4 cyanobactéries sont groupées ensemble et avec les 2 espèces de *Cyclotella*, *Monoraphidium dybowski*, et *Kirchneriella obesa*. Ces espèces ne contribuent pas ou très peu aux axes de l'AFC démontrant leur occurrence tout au long de l'année. *Planktothrix agardhii* est donc accompagnée toute l'année du même cortège de 8 espèces déterminées préalablement comme les plus fréquentes. Ce cortège se définit par *Monoraphidium contortum* au printemps ; les *Nitzschia* en été ; *Oocystis*, *Dictyosphaerium pulchellum*, *Planktonema lauterbornii* et *Golenkinia radiata* en été et en automne ; *Pyramimonas cordata* et *Heterocapsa rotundata* en hiver.

4. Dynamique spatio-temporelle de la morphométrie de *Planktothrix agardhii*

Le biovolume moyen des filaments de *Planktothrix agardhii* dans l'étang de l'Olivier est de  $2027 \pm 1545 \mu\text{m}^3$ , le biovolume minimal est de  $53 \mu\text{m}^3$ , le biovolume maximal de  $17610 \mu\text{m}^3$ . Les biovolumes moyens des filaments ne sont pas différents entre les différentes stations échantillonnées ; que ce soit entre les stations de surface échantillonnées sur 20 mois (ANOVA,  $p > 0.05$ ,  $n = 1142$ ) ou entre toutes les stations, horizontales et verticales échantillonnées durant 7 mois, de février à août 2010 (ANOVA,  $p > 0.05$ ,  $n = 1037$ ).

Le biovolume moyen de *Planktothrix agardhii* présente une dynamique saisonnière marquée par des biovolumes maximaux au printemps (de février à avril 2009 et en mars et avril 2010) et des biovolumes minimaux en été, automne et au début de l'hiver (de juin à décembre 2009 et en octobre 2010 (au niveau des stations de surface) et août 2010 (au niveau de toutes les stations horizontales et verticales) (**Figure 24**).



Cette dynamique apparaît plus marquée en 2009 qu'en 2010 avec des pics de biovolumes moyens plus élevés au printemps 2009 ( $3172 \pm 416 \mu\text{m}^3$ ) qu'au printemps 2010 ( $2576 \pm 301 \mu\text{m}^3$  et  $2672 \pm 95 \mu\text{m}^3$ ). De même, le biovolume moyen minimal est atteint plus rapidement et présente un niveau plus faible de juin à décembre 2009 ( $1324 \pm 113 \mu\text{m}^3$ ) qu'en octobre 2010

( $1690 \pm 1360 \mu\text{m}^3$ , stations de surface). Les variations au cours du temps du biovolume moyen des filaments de *Planktothrix agardhii* proviennent majoritairement des variations de leurs longueurs moyennes (Corrélation entre les biovolumes et les longueurs,  $r=0.93$ ,  $p<2.10^{-16}$ ,  $n=2034$ ).

La longueur moyenne des filaments de *Planktothrix agardhii* est de  $169 \pm 108 \mu\text{m}$  avec une longueur minimale de  $10 \mu\text{m}$  et une longueur maximale de  $1108 \mu\text{m}$ . La largeur des filaments est comprise entre  $3$  et  $6 \mu\text{m}$  avec une moyenne de  $4.0 \pm 0.6 \mu\text{m}$ .

Les longueurs et les largeurs des filaments de *Planktothrix agardhii* ne sont pas significativement différentes entre les stations ( $p > 0.05$ , Kruskal-Wallis,  $n=1150$  (20 mois) et  $n=1045$  (7mois)) (**Figure 25A**).

La dynamique temporelle de la longueur moyenne des filaments au niveau des 3 stations de surface présente des maxima au printemps (février, mars et avril 2009 et avril 2010) et des minima en automne 2009 et en mai 2010 (**Figure 25B**). De même que pour la dynamique des biovolumes moyens, celles des longueurs moyennes apparaît plus marquée en 2009 qu'en 2010 avec des maxima plus élevés en 2009 ( $270 \pm 38 \mu\text{m}$  en 2009 et  $201 \pm 17 \mu\text{m}$  en 2010), et une diminution plus régulière vers le minimum de 2009.

La dynamique temporelle de la largeur moyenne des filaments de *Planktothrix agardhii* au niveau des stations de surface suit globalement celle de la longueur moyenne ; elle présente des maxima en avril 2009 ( $4.2 \pm 0.2$ ) et en mars et avril 2010 ( $4.2 \pm 0.2$ ). La largeur moyenne minimale ( $3.7 \pm 0.2$ ) a toutefois lieu plus tard dans l'année, en décembre 2009. Les dynamiques temporelles des longueurs et des largeurs moyennes des filaments de *Planktothrix agardhii* au niveau de toutes les stations (horizontales et verticales), de février à août 2010, présentent, de même qu'au niveau des stations de surface, des maxima au printemps 2010 (longueur maximale de  $198 \pm 53 \mu\text{m}$  en février, mars et avril ; largeur maximale de  $4.1 \pm 0.4 \mu\text{m}$  en mars et avril) (**Figure 25C**).

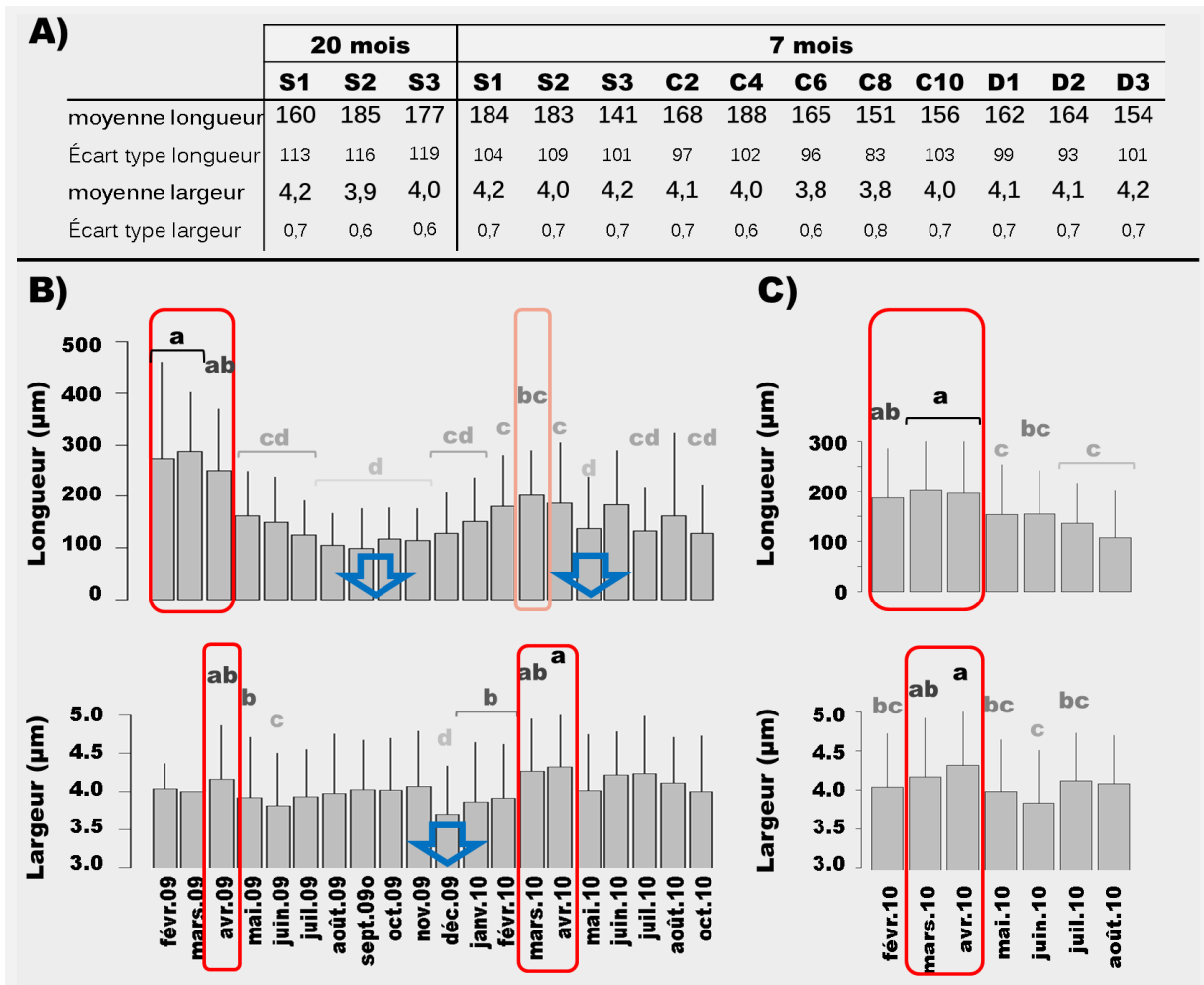


Figure 25 Variations spatio-temporelles des longueurs et largeurs moyennes des filaments de *Planktothrix agardhii*

(A) Longueurs et largeurs moyennes mesurées au niveau des stations S1, S2 et S3 durant 20 mois et au niveau de toutes les stations (verticales et horizontales) durant 7 mois (de février à août 2010).

$p > 0.05$  entre les stations, Kruskal-Wallis,  $n = 1150$  (20 mois) et  $n = 1045$  (7 mois)

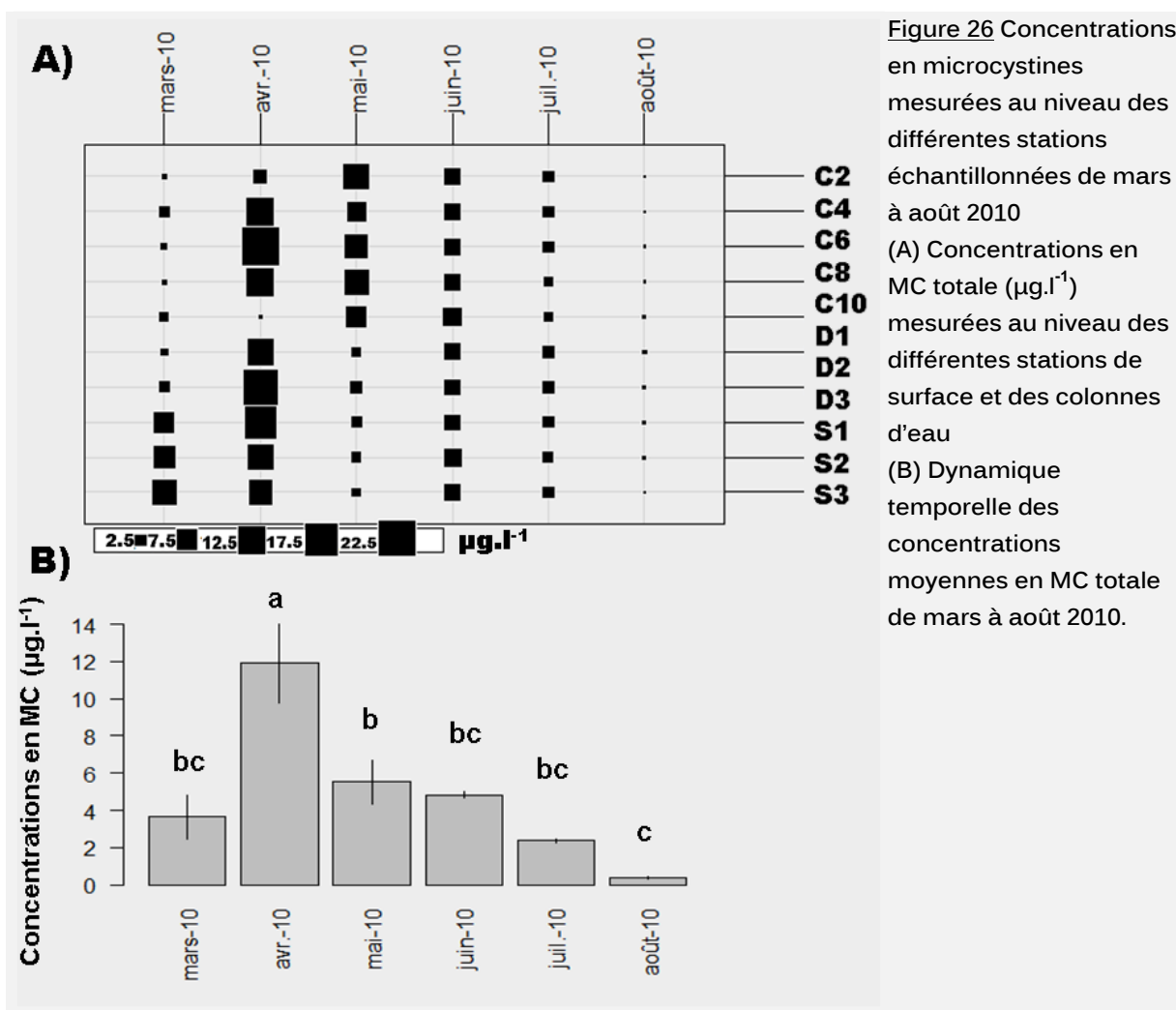
(B) et (C) Dynamiques temporelles de février 2009 à octobre 2010 au niveau des stations de surface (B) ; et de février à août 2010 au niveau de toutes les stations (C).

Les moyennes significativement différentes ( $p < 0.05$ ) sont indiquées par des lettres différentes au-dessus des écart-types. Les moyennes non annotées ne sont pas différentes des autres moyennes.

5. Dynamique spatio-temporelle de la concentration en microcystines

Les concentrations en microcystines (MC) de l'eau de l'étang mesurées de mars 2010 à août 2010 varient entre 0.1 et 22.4  $\mu\text{g.l}^{-1}$  et sont en moyenne de  $4.9 \pm 4.9 \mu\text{g.l}^{-1}$ . Les concentrations en MC ne varient pas significativement spatialement dans l'étang, bien que les stations de surface soient un peu plus concentrées en toxines que les stations des colonnes d'eau C et D en mars ( $8.9 \pm 1.8 \mu\text{g.l}^{-1}$  en surface et  $1.4 \pm 0.6 \mu\text{g.l}^{-1}$  au niveau des colonnes d'eau), et inversement en mai ( $2.0 \pm 0.3 \mu\text{g.l}^{-1}$  en surface et  $7.0 \pm 3.5 \mu\text{g.l}^{-1}$  au niveau de la colonne d'eau C) (**Figure 26A**).

La dynamique temporelle des concentrations moyennes en MC de mars à août 2010 présente une concentration maximale en avril de  $11.9 \pm 6.6 \mu\text{g.l}^{-1}$ , puis une diminution progressive de la concentration jusqu'à atteindre  $0.4 \pm 0.1 \mu\text{g.l}^{-1}$  en août (**Figure 26B**).



**Figure 26** Concentrations en microcystines mesurées au niveau des différentes stations échantillonnées de mars à août 2010 (A) Concentrations en MC totale ( $\mu\text{g.l}^{-1}$ ) mesurées au niveau des différentes stations de surface et des colonnes d'eau (B) Dynamique temporelle des concentrations moyennes en MC totale de mars à août 2010.



## 6. Relations entre la concentration en MC et différents descripteurs du peuplement et de l'environnement.

*Planktothrix agardhii* étant l'espèce dominante de l'étang et productrice de MC, les dynamiques du biovolume moyen de ses filaments et du biovolume total de sa population dans l'étang ont été comparées à celle de la concentration moyenne en MC ([Figure 27A et B](#)).

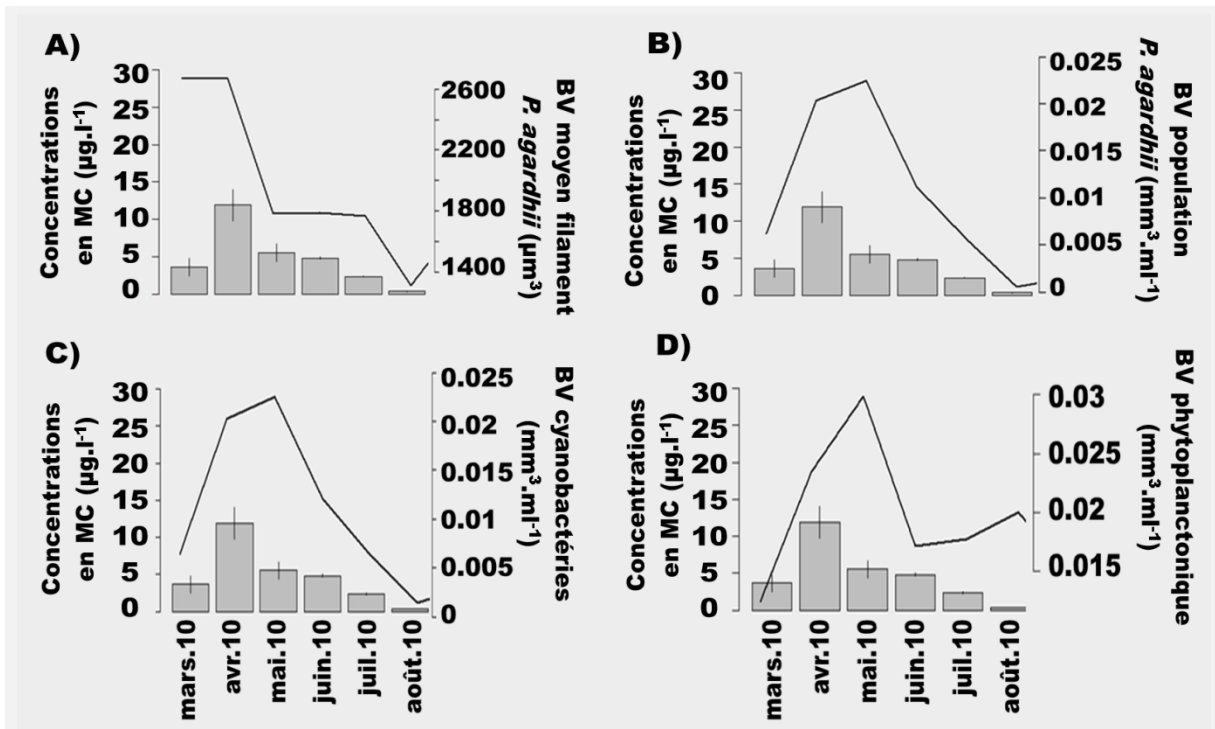


Figure 27 Comparaison des variations toxiques et du biovolume (BV) moyen des filaments de *Planktothrix agardhii* (A), du biovolume de la population de *Planktothrix agardhii* (B), du biovolume des cyanobactéries (C), et du biovolume phytoplanctonique (D).

Les filaments de *Planktothrix agardhii* de petits biovolumes sont présents alors que la concentration en MC est la plus faible (août) et les filaments de grands biovolumes sont présents alors que la concentration en MC est maximale (avril) avec des filaments de biovolumes intermédiaires alors que la concentration en MC est également intermédiaire (mai, juin, juillet) ([Figure 27A](#)). Cependant, le biovolume moyen des filaments est peu corrélé avec la concentration en MC ( $r=0.37$ ,  $p=0.004$ ,  $n=58$ ).

Le biovolume de la population de *Planktothrix agardhii* est également peu corrélée avec la concentration en MC ( $r=0.46$ ,  $p=0.0001$ ,  $n=61$ ) ; bien qu'on observe une tendance similaire entre les deux paramètres ([Figure 27B](#)).



Les MC étant potentiellement synthétisées par plusieurs espèces de cyanobactéries, la dynamique du biovolume des cyanobactéries a également été comparée à celle de la MC. L'espèce *Planktothrix agardhii* étant dominante parmi les espèces de cyanobactérie, la dynamique temporelle des cyanobactéries est quasi identique à celle de *Planktothrix agardhii* (corrélation entre le biovolume des cyanobactéries et le biovolume de *Planktothrix agardhii* avec un  $r=0.99$ ,  $p < 2.10^{-16}$ ,  $n=128$ ) ; le biovolume des cyanobactéries est donc également peu corrélée avec les concentrations en MC ( $r=0.44$ ,  $p=0.0003$ ,  $n=61$ ) (**Figure 27C**).

La dynamique du biovolume phytoplanctonique total ne montre aucune corrélation avec les concentrations en MC ( $r=0.20$ ,  $p=0.01$ ,  $n=61$ ) (**Figure 27D**).

Une analyse en composante principale (ACP) a été réalisée dans le but de visualiser les relations entre différents descripteurs de la population de *Planktothrix agardhii* et du peuplement phytoplanctonique total, de la MC et les variables environnementales. La concentration en MC (TOX), le biovolume moyen des filaments de *Planktothrix agardhii* (BV.PAGA), le biovolume de la population de *Planktothrix agardhii* (BVtotPAGA), la biomasse chlorophyllienne (CHLA), le biovolume phytoplanctonique total (BVtot), l'indice de Shannon (IS) et la richesse spécifique (RS) ont été intégrés à une matrice de 13 variables environnementales (**Figure 28**).

L'axe 1 rend compte de 22.3 % de l'inertie totale ; il oppose les précipitations, le biovolume moyen des filaments de *Planktothrix agardhii* et la concentration en MC dans l'eau aux paramètres climatiques (la température de l'air et de l'eau, la durée d'insolation et la vitesse du vent). Cet axe correspond au gradient saisonnier allant du début du printemps à la fin de l'été (mars à août) du côté positif au côté négatif de l'axe 1 (**Figure 28C**). Il apparaît que les filaments de *Planktothrix agardhii* sont plus volumineux dans des eaux relativement fraîches et peu remuées. Ces conditions sont réunies au début du printemps ce qui confirme l'observation de plus long filaments de *Planktothrix agardhii* en février-mars et-avril. L'axe 1 tend également à relier positivement le volume des filaments de *Planktothrix agardhii* et la concentration en MC.

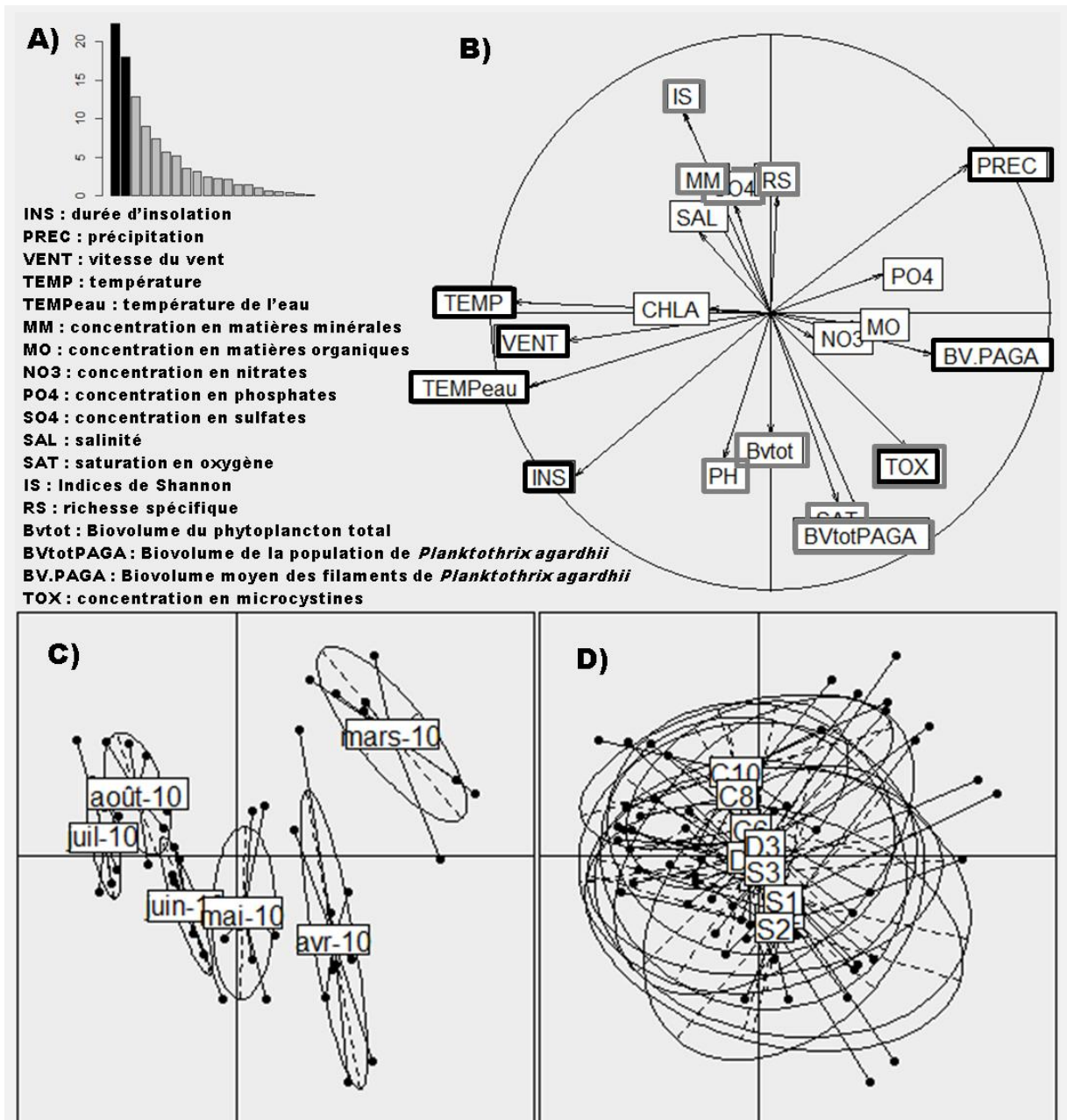


Figure 28 ACP de la concentration en MC, des descripteurs de la population de *Planktothrix agardhii* et du peuplement total, et de 13 variables environnementales.

(A) Valeurs propres de l'ACP (en %), (B) cercles des corrélations des variables aux axes 1 et 2, (C) et (D) Cartes factorielles des relevés où chaque ellipse correspond à une campagne de prélèvement (C) ou à une station (D).

L'axe 2 de l'ACP rend compte de 18.0 % de l'inertie totale. Il oppose la concentration en matière minérale et en sulfate, l'indice de diversité et la richesse spécifique à la saturation de l'eau en oxygène, le pH, le biovolume phytoplanctonique, le biovolume de *Planktothrix agardhii*, et la concentration en MC. La forte corrélation du biovolume phytoplanctonique et du biovolume de *Planktothrix agardhii* à l'axe 2 dans le même sens indique la domination du phytoplancton par

*Planktothrix agardhii*. La corrélation des variables à l'axe 2 présente une diversité et une richesse du peuplement phytoplanctonique faible alors que les biovolumes du phytoplancton et de *Planktothrix agardhii* sont grands. L'observation des cartes factorielles permet de confirmer la prolifération importante de *Planktothrix agardhii* au printemps entraînant sa domination au sein du peuplement phytoplanctonique et la diminution de la diversité qui a lieu à la fin de l'été et au début de l'automne. Les plus grandes concentrations en MC sont également retrouvées au printemps, principalement en avril (**Figure 28C**). La corrélation de la concentration en MC, du biovolume phytoplanctonique et de *Planktothrix agardhii* à l'axe 2 laisse apparaître une relation positive entre ces paramètres. Les paramètres analysés sont répartis de façon homogène entre les stations horizontales de l'étang (**Figure 28D**). L'axe 2 de l'ACP laisse apparaître des grands biovolumes de *Planktothrix agardhii* concomitants avec une eau saturée en oxygène. Finalement, l'axe 2 indique une plus grande occurrence de grands biovolumes de *Planktothrix agardhii* dans des eaux relativement basiques. On note la faible explication du plan factorielle F1 x F2 de l'ACP par les concentrations en nitrate, phosphate, sulfate, et la salinité démontrant que ces variables sont relativement moins explicatives que celles exposées ci-dessus. Néanmoins une ACP relatant le plan factoriel F1 x F3 a permis de vérifier que ces dernières variables sont corrélées avec le 3<sup>ème</sup> axe de l'ACP.

## D. DISCUSSION

### Suprématie de *Planktothrix agardhii*

*Planktothrix agardhii* est la seule espèce phytoplanctonique présente dans la totalité des échantillons analysés. L'espèce domine le peuplement phytoplanctonique plus de la moitié de l'année. Ceci correspond à la tendance générale observée ; *Planktothrix agardhii* constitue une proportion importante du biovolume phytoplanctonique total des milieux où l'espèce est installée [Bonilla, *et al.* 2012]. Cependant, il a été trouvé sur 199 échantillons provenant de plusieurs écosystèmes une proportion médiane de 6.56 % [Bonilla, *et al.* 2012]. La proportion médiane de *Planktothrix agardhii* parmi le phytoplancton de l'étang de l'Olivier sur 130 échantillons est sept fois plus élevée (47.9%) démontrant que l'étang de l'Olivier se situe parmi les milieux où *Planktothrix agardhii* domine fortement le phytoplancton, de façon persistante dans le temps, entraînant la réduction de la biodiversité et l'appauvrissement du milieu, comme il l'est observé dans la plupart des milieux dulçaquicoles de l'hémisphère nord.

### *Planktothrix agardhii* en milieu saumâtre

L'espèce est bien installée dans l'étang de l'Olivier, elle persiste et prolifère aussi bien dans des eaux douces (station S3) que dans les eaux légèrement saumâtres avec quelques variations de salinité (station S1). Les cyanobactéries ont développées des stratégies de régulation osmotique afin de tolérer une certaine salinité [Oren 2007]. Ainsi, bien que le niveau de tolérance soit espèce-dépendante, toutes les cyanobactéries peuvent tolérer une légère salinité [Hagemann 2011].

D'autres espèces constitutives du peuplement phytoplanctonique de l'Olivier plus fréquemment retrouvées dans des habitats saumâtres voire marins seraient susceptibles de devenir dominantes au détriment de *Planktothrix agardhii*. Or, *Planktothrix agardhii* reste compétitif dans un milieu saumâtre. Ceci corrobore les observations rapportées sur les capacités de *Planktothrix agardhii*, qui, une fois installée, domine dans des milieux saumâtres, voire même qui subissent des variations de salinité [Chomerat, *et al.* 2007; Jaanus, *et al.* 2011]. De même, Carstensen *et al.* [2007] observent une forte probabilité de présence de l'espèce dans la mer Baltique en présence d'azote et de phosphore lorsque les salinités sont autour de 3.5 g.l<sup>-1</sup> ; et Jaanus *et al.* [2011] observent des relations entre les espèces dominantes inchangées dans

une salinité supérieure à 5 p.s.u. Notre étude démontre l'omniprésence de *Planktothrix agardhii* dans un milieu saumâtre, oligo-mésotrophe pour l'azote et eutrophe pour le phosphore, ce qui va dans le même sens que les observations de Jaanus *et al.* [2011] et Carstensen *et al.* [2007]. La salinité de l'étang de l'Olivier ne constitue pas un frein à la suprématie de *Planktothrix agardhii*.

#### *Planktothrix agardhii* et les paramètres morphométriques du milieu

L'étang présente une surface plus grande (225 ha) que la plupart des milieux sujets aux proliférations de *Planktothrix agardhii* (surface médiane de 1.30 ha) [Bonilla, *et al.* 2012]. Cette grande surface participe au mélange des eaux de l'étang offrant une plus grande exposition aux vents particulièrement fréquents dans les bouches du Rhône. Notre étude montre cependant que la force du vent serait corrélée négativement avec les biovolumes de *Planktothrix agardhii*, une espèce affectionnant pourtant les eaux remuées [Rücker, *et al.* 1997]. En effet, *Planktothrix agardhii* est qualifiée de 'turbulent species' ou 'mixed species' par opposition aux espèces formant des colonies comme les espèces du genre *Microcystis*, aux espèces stratifiantes comme *Planktothrix rubescens* ou les espèces fixatrices d'azote comme *Aphanizomenon flos-aquae* [Mur, *et al.* 1999]. Cependant, *Planktothrix agardhii* est capable de proliférer à différentes profondeurs de la colonne d'eau dans l'étang de l'Olivier et sa prolifération est indépendante du vent.

L'étang de l'Olivier a également une profondeur maximale (10m) plus grande que la plupart des milieux sujets aux proliférations de *Planktothrix agardhii* (profondeur maximale médiane de 1.30m) [Bonilla, *et al.* 2012]. Les grands biovolumes de *Planktothrix agardhii* de l'étang de l'Olivier, rentrant dans la gamme de ceux rapportés dans d'autres écosystèmes où *Planktothrix agardhii* prolifère [Bonilla, *et al.* 2012], tendent à contredire l'observation de Dokulil *et al.* [2000] qui rapportent la faible abondance des 'turbulent species' dans les lacs de profondeurs supérieures à 8 mètres, démontrant que la profondeur du milieu n'est pas un facteur limitant pour le succès de *Planktothrix agardhii*.

Dokulil *et al.* [2000] observent cependant que, lorsque les 'mixed species' parviennent néanmoins à s'installer dans des milieux profonds (>8 m), leur présence est indépendante des concentrations en phosphore contrairement aux milieux peu profonds (<8m). Cette observation

est surprenante car, en général, le phosphore est rapporté comme la variable la plus explicative de la présence de *Planktothrix agardhii*: Par exemple, l'espèce n'est jamais recensée dans les échantillons contenant des concentrations en phosphore inférieures à 0.05 mg.l<sup>-1</sup> lors de l'étude de Bonilla *et al.* [2012]. L'étang de l'Olivier est classé parmi les milieux méso-eutrophes selon les concentrations moyennes en phosphates; le milieu est considéré comme favorable à la croissance de *Planktothrix agardhii*. Or, les biovolumes de *Planktothrix agardhii* sont peu corrélés avec les concentrations en phosphate, confirmant l'observation de Dokulil *et al.* [2000]; à savoir que les proliférations de *Planktothrix agardhii* sont indépendantes des concentrations en phosphate dans un milieu profond.

De plus, Scheffer *et al.* [1997] observent que, de manière général, la lumière, plutôt que les éléments nutritifs, explique la dominance des Oscillatoriales. La turbidité de l'eau est en effet favorable à la croissance de *Planktothrix agardhii* qui, en proliférant, va elle-même augmenter la turbidité de son environnement et assurer ainsi sa compétitivité reposant sur sa capacité à exploiter les faibles intensités lumineuses [Scheffer, *et al.* 1997]. La transparence de l'eau très faible dans l'étang de l'Olivier (63 cm) favorise ainsi le succès de *Planktothrix agardhii* qui participe elle-même à cette turbidité, phénomène démontré par l'observation concomitante des minima de la transparence de l'eau et des grands biovolumes de *Planktothrix agardhii* dans l'étang de l'Olivier.

L'ensemble de ces résultats met en évidence la stratégie de colonisation de *Planktothrix agardhii* dans l'étang de l'Olivier lui permettant d'exploiter la majorité du grand volume de l'étang, indépendamment de la disponibilité en phosphates, en favorisant elle-même son succès par sa prolifération qui entraîne l'augmentation de la turbidité du milieu. Cette capacité d'expansion de la niche de *Planktothrix agardhii* est également observée dans les études de Kangro *et al.* [2005] et Halstvedt *et al.* [2007], qui rapportent la dominance de *Planktothrix agardhii* dans des milieux de profondeurs supérieures à 10 mètres.

#### **Dynamique temporelle de *Planktothrix agardhii***

*Planktothrix agardhii* forme des biovolumes importants au printemps, et, dans une moindre importance, en hiver. Elle domine alors jusqu'à 95% le peuplement phytoplanctonique total au printemps mais est dominante en hiver uniquement en S3. Les proliférations de *Planktothrix*

*agardhii* ont également lieu au printemps et en hiver dans les milieux saumâtres méditerranéens [Chomerat, *et al.* 2007; Romo & Miracle 1994b] ; tandis qu'elles sont toutes observées en été et/ou en automne dans les lacs d'eaux douces de l'hémisphère Nord (cf. **Table 1**). Les plus fortes températures et intensités lumineuses du climat méditerranéen tendraient à expliquer les proliférations précoces. D'une manière générale les proliférations des cyanobactéries ont tendance à proliférer durant 2 à 4 mois à la fin de l'été et au début de l'automne dans les milieux tempérés et à commencer plus tôt sous un climat méditerranéen [Sivonen & Jones 1999]. De plus, la gamme de température retrouvée de mars à juillet lors des proliférations printanières de *Planktothrix agardhii* correspond au préférendum de l'espèce ; son optimum de croissance est situé dans des températures comprises entre 20 et 25°C [Sivonen 1990] avec un taux de croissance augmentant entre 15 et 25°C [Oberhaus, *et al.* 2007a]. L'efflorescence de *Planktothrix agardhii* en hiver est induite par les températures douces du climat méditerranéen, l'espèce exerçant sa compétitivité dans des faibles températures et des faibles intensités lumineuses [Dokulil & Teubner 2000; Nixdorf, *et al.* 2003]. Toutefois, on observe une différence de dynamique entre les stations S1-S2 et la station S3 : En S1 et S2, la proportion de *Planktothrix agardhii* parmi le phytoplancton est faible en automne et en hiver avec un minimum en décembre; alors qu'au niveau de S3 *Planktothrix agardhii* forme une efflorescence et domine le peuplement. Les fortes pluies automnales, ayant lessivées les terres agricoles bordant le canal d'Entressen à l'étang de l'Olivier, ont enrichi les eaux en azote de la station S3 (située à proximité de l'arrivée d'eaux douces d'Entressen). Les nitrates, étant donc particulièrement concentrés en S3 uniquement, celle-ci est plus propice au développement de *Planktothrix agardhii* durant l'hiver, et la faible profondeur de la station (< 1 mètre) entraîne la concentration de l'espèce et donc la formation d'efflorescences. L'observation de Chomérat *et al.* [2007] d'une concentration maximale en azote en hiver qui est concomitante avec la prolifération de *Planktothrix agardhii*, va dans le sens de notre observation. Au niveau de S1 et S2, de même qu'au niveau des stations S4 et S6, cette prolifération hivernale est limitée ; l'espèce de dinophyte *Heterocapsa rotundata* entrant en compétition avec *Planktothrix agardhii*. Au vu de l'ensemble de ces résultats, on peut expliquer la prolifération hivernale en milieu méditerranéen (comme vue en S3) par l'interaction des températures douces hivernales et des fortes concentrations en azote. Dans le cas où l'azote est en faible quantité (comme dans les

autres stations de surface) d'autres espèces peuvent concurrencer *Planktothrix agardhii* (ici, dans un milieu saumâtre, *Heterocapsa rotundata*). Carstensen *et al.* [2007] observent une forte probabilité de présence de *Planktothrix agardhii* et d'*Heterocapsa rotundata* aux faibles salinités en présence d'azote. L'auteur ajoute que la probabilité d'occurrence de *Planktothrix agardhii* nécessite une plus forte concentration en azote, confirmant notre résultat. Cependant, comme il l'a été dit plus haut, le biovolume de *Planktothrix agardhii* dans l'étang de l'Olivier est fortement corrélé avec l'intensité lumineuse mais peu corrélé avec les concentrations en nitrate et phosphate. Ainsi, la domination du milieu par *Planktothrix agardhii* est principalement expliquée par la température et l'ensoleillement méditerranéen, puis, secondairement, par la concentration en azote qui permet d'assurer son maintien et sa compétitivité par rapport aux autres espèces en hiver. L'impact de la salinité s'exerce également secondairement sur la dynamique temporelle de *Planktothrix agardhii* en milieu saumâtre méditerranéen ; elle sélectionne les espèces susceptibles de concurrencer *Planktothrix agardhii*.

#### *Planktothrix agardhii* et son cortège d'espèces accompagnatrices

Les pics printaniers de biovolume de *Planktothrix agardhii* s'accompagnent d'une diminution de la richesse spécifique et de la diversité du peuplement phytoplanctonique. Il est généralement observé une très faible diversité concomitante avec les fortes densités de *Planktothrix agardhii* [Hasler & Poulickova 2003; Scheffer, *et al.* 1997]. Cette diminution de richesse phytoplanctonique s'explique par une stratégie de l'espèce qui, par sa prolifération, va augmenter la turbidité et diminuer ainsi l'intensité lumineuse du milieu [Bonilla, *et al.* 2012]. Ces conditions sont alors limitantes pour les espèces accompagnatrices, et procure un avantage compétitif à *Planktothrix agardhii*. En effet, *Planktothrix agardhii* possède une bonne antenne réceptrice de lumière lui permettant de mieux tirer profit des faibles intensités lumineuses que les autres espèces phytoplanctoniques [Scheffer, *et al.* 1997].

Les nombreuses espèces accidentelles recensées dans l'étang de l'Olivier (228 espèces sur 249 au total) proviennent vraisemblablement des connexions de l'étang avec un étang dulçaquicole (Etang d'Entressen) et avec un étang saumâtre (étang de Berre, mésohalin). Ces écosystèmes apportent des espèces à l'étang de l'Olivier, qui ne parviennent cependant pas à se développer



dans celui-ci comme en témoigne la faible contribution de ces espèces au biovolume phytoplanctonique total ( $5 \pm 11$  %).

Les espèces communes et accessoires font partie des groupes fonctionnels S1, X1, F, D, B, Lo, Y et T selon Reynolds *et al.* [2002]. Les espèces appartenant aux groupes fonctionnels D, S1, X1 vivent dans des eaux riches en nutriments. De même, l'habitat de type II des deux Dinophytes [Smayda & Reynolds 2001] est défini comme relativement riches en nutriments. Ces espèces sont symptomatiques d'un écosystème eutrophisé. Les groupes fonctionnels S1, X1, F et D sont les plus représentés en biovolume et en nombre d'espèces communes et accessoires ; ils sont symptomatiques des milieux turbides, peu profonds, avec une forte biomasse phytoplanctonique [Izaguirre, *et al.* 2012]. La définition de la niche écologique de ses espèces est donc similaire à celle de *Planktothrix agardhii*. En effet, toutes les espèces communes et accessoires sont communément rapportées comme accompagnatrices de *Planktothrix agardhii* suggérant que les milieux comportant *Planktothrix agardhii* possèdent également les caractéristiques écologiques des niches de ces espèces [Jaanus, *et al.* 2011; Kangro, *et al.* 2005; Karadzic, *et al.* 2010; Nixdorf, *et al.* 2003; Rojo & Álvarez-Cobelas 2003; Romo & Miracle 1994a; Solis, *et al.* 2009; Toporowska, *et al.* 2010; Wojciechowska 2004].

*Planktothrix agardhii* est accompagné dans 98% des échantillons de deux autres espèces d'Oscillatoriales ; *Planktolyngbya limnetica* et *Limnothrix planctonica*, deux espèces qui, comme *Planktothrix agardhii*, appartiennent au groupe fonctionnel S1. Ces trois espèces affectionnent les milieux brassés et turbides [Reynolds, *et al.* 2002], elles possèdent la capacité de réguler leur flottaison et sont considérées comme symptomatiques des milieux eutrophisés [Moustaka-Gouni, *et al.* 2007]. L'étang de l'Olivier, avec ces eaux turbides, brassées et riches en nutriments, présente les préférences de ces espèces. *Planktothrix agardhii* est toutefois plus performante à remplir cette niche, sûrement en raison de sa meilleure compétitivité vis-à-vis des faibles luminosités [Mur, *et al.* 1999] et de sa meilleure performance (par rapport aux *Limnothrix sp.*) en présence de grandes concentrations de phosphore [Nixdorf, *et al.* 2003]. Le brassage important de l'eau, favorisé par la grande surface du milieu, permet la re-suspension du phosphore du sédiment propice à la compétitivité de *Planktothrix agardhii* sur *Limnothrix planctonica*. En effet, Rucker *et al.* [1997] observent que les '*Limnothrix*-lakes' se distinguent des '*Planktothrix*-lakes' par la grande surface du milieu et un brassage plus fort dans les '*Planktothrix* lakes'.

Une autre espèce de cyanobactérie accompagne également *Planktothrix agardhii* dans 95% des cas, la chroococcale *Synechocystis aquatilis*. Ces 3 cyanobactéries font également parti du cortège accompagnant *Planktothrix agardhii* dans l'étang saumâtre étudié par Chomérat *et al.* [2007]. Les 3 cyanobactéries citées précédemment, les *Cyclotella sp.*, les *Monoraphidium sp.* et *Kirchneriella obesa* sont les 8 espèces les plus fréquentes ; elles constituent le cortège d'espèces accompagnatrices de *Planktothrix agardhii* tout au long de l'année. *Monoraphidium contortum* accompagne *Planktothrix agardhii* au printemps, cette espèce est couramment retrouvée en milieu saumâtre et dulçaquicole [Jaanus, *et al.* 2011; Kangro, *et al.* 2005] ; de même pour les *Nitzschia spp.* qui accompagnent *Planktothrix agardhii* en été [Romo & Miracle 1994b]. Les *Nitzschia spp.*, qui affectionnent les grandes concentrations en phosphore, apparaissent alors que le biovolume de *Planktothrix agardhii* est le plus faible, rendant les nutriments disponibles pour les autres espèces. Les *Oocystis spp.*, *Dictyosphaerium pulchellum* et *Planktonema lauterbornii* accompagnent *Planktothrix agardhii* en été et automne. Les *Oocystis spp.* et *Planktonema lauterbornii* sont également rapportée en été en milieu saumâtre [Jaanus, *et al.* 2011], dulçaquicole [Hu, *et al.* 2012] et méditerranéen [Rojo & Álvarez-Cobelas 2003] ; *Dictyosphaerium pulchellum* est également rapporté comme constitutif d'une part importante du phytoplancton en automne en milieu méditerranéen [Rojo & Álvarez-Cobelas 2003]. Ces espèces font parties des groupes fonctionnels F et T dont la particularité est d'affectionner un épilimnion clair [Reynolds, *et al.* 2002], condition qui est approchée en été où la transparence de l'eau est maximale. La dinophyte *Heterocapsa rotundata* accompagne *Planktothrix agardhii* en automne et en hiver en S1 et S2. Cependant, la prolifération d'*Heterocapsa* disparaît en février au profit de *Planktothrix agardhii* qui domine alors le peuplement et va proliférer jusqu'à atteindre un pic de biovolume au printemps. L'occurrence de ces 2 espèces dans un même milieu a déjà été observée dans les eaux saumâtres de la mer Baltique [Carstensen & Heiskanen 2007]. L'occurrence d'*Heterocapsa rotundata*, une espèce mésohaline, dans des salinités d'environ 3 g.l<sup>-1</sup> est en accord avec l'étude de Carstensen *et al.* [2007] qui relie la probabilité d'occurrence de l'espèce avec des faibles salinités. L'auteur note que la forte abondance de l'espèce a lieu alors que *Planktothrix agardhii* a la plus faible probabilité de présence. Cette observation est confirmée dans notre étude, la prolifération

d'*Heterocapsa rotundata* elle a lieu alors que *Planktothrix agardhii* occupe la plus faible proportion du peuplement phytoplanctonique.

### Répartition verticale de *Planktothrix agardhii*

La colonne d'eau centrale de l'étang de l'Olivier présente une stratification au printemps et en été résultant de l'association de fortes températures, faibles précipitations, et des vents faibles (inférieurs à  $5 \text{ m.s}^{-1}$ ). Cette condition est remplie aux mois d'avril mai et août ; durant lesquels se forme un métalimnion entre 4 et 6 mètres de profondeur. Les eaux du fond étant plus froides et plus faiblement oxygénées que les eaux de surface, *Planktothrix agardhii* ne forme pas de grands biovolumes à ces profondeurs, préférant la température et l'ensoleillement des eaux de surface, sa température optimale étant située à  $20^{\circ}\text{C}$  [Sivonen 1990]. Bonilla *et al.* [2012] rapportent la présence de *Planktothrix agardhii* dans des milieux de profondeur maximale de 6 mètres ce qui correspond à la profondeur limite à laquelle les grands biovolumes de *Planktothrix agardhii* sont retrouvées dans l'étang de l'Olivier. De plus, le pH de l'épilimnion et du métalimnion (8.1) plus élevé que dans l'hypolimnion (pH plus faible dans l'hypolimnion en raison de la faible quantité phytoplanctonique et de la faible saturation en oxygène due au non mélange des eaux), est identique au pH médian des milieux dominés par *Planktothrix agardhii* (8.18) ; il est favorable à la croissance de l'espèce [Bonilla, *et al.* 2012]. Aucune autre espèce phytoplanctonique ne prolifère à ces profondeurs et n'entre en compétition avec la population de *Planktothrix agardhii*, en raison de la turbidité que l'espèce crée dans les eaux de surface [Scheffer, *et al.* 1997]. Une prolifération de diatomées a toutefois lieu en juillet et en août au fond de l'étang, les espèces profitant de la diminution des biovolumes de *Planktothrix agardhii* en surface et des fortes concentrations en nutriment relarguées par le sédiment sous l'action des vents forts de juin et juillet.

Des biovolumes de *Planktothrix agardhii* situés dans l'épilimnion et le métalimnion sont similaires à ceux observés en surface en S1 et S2, il en va de même pour sa domination du peuplement phytoplanctonique. Toutefois *Planktothrix agardhii* migre le long de la colonne d'eau entre la surface et le métalimnion. Elle prolifère en surface et dans l'épilimnion en avril, bénéficiant alors d'un ensoleillement et d'une température optimale, descend dans le métalimnion en mai, puis remonte à la surface en juin alors que la colonne d'eau n'est plus

stratifiée. *Planktothrix agardhii* possède des vacuoles gazeuses qui lui permettent d'adapter son niveau de flottaison dans la colonne d'eau à la recherche des conditions environnementales les plus favorables à sa croissance ou sa survie [Reynolds 1975]. L'espèce profite donc de la stratification de la colonne d'eau au printemps pour s'éloigner des fortes intensités lumineuses afin d'affirmer sa compétitivité vis-à-vis des faibles intensités lumineuses tout en restant dans des conditions de température et de pH optimaux pour sa croissance [Sivonen 1990]. *Planktothrix agardhii* est décrite comme espèce typique des habitats peu profonds aux eaux bien mélangées et turbides [Rücker, *et al.* 1997; Scheffer, *et al.* 1997]. L'espèce peut toutefois être retrouvée dans le métalimnion des lacs stratifiés [Halstvedt, *et al.* 2007; Kangro, *et al.* 2005; Rojo & Alvarez Cobelas 1994]. *Planktothrix agardhii* exploite donc la profondeur de l'étang de l'Olivier, en profitant des périodes de stratification de la colonne d'eau afin d'exprimer sa compétitivité vis-à-vis des faibles luminosités et d'assurer ainsi son succès aussi bien dans un milieu brassé que dans un milieu stratifié.

#### **Stratégie morphométrique de *Planktothrix agardhii***

Les longueurs et largeurs moyennes des filaments de *Planktothrix agardhii* ne varient pas spatialement dans l'étang de l'Olivier, que ce soit horizontalement ou verticalement. Hasler *et al.* [2003] rapportent cependant une longueur maximale des filaments à la surface et des filaments plus courts au fond du lac. Les auteurs expliquent ce phénomène par l'intensité lumineuse qui, influençant la position des cyanobactéries possédant des vacuoles gazeuses [Van Liere & Walsby 1982], induit la présence de plus longs filaments (et donc, contenant plus de vacuoles gazeuses) à proximité de la surface. Cependant, le milieu concerné a une profondeur plus faible (1 mètre) que celle de l'étang de l'Olivier (10 mètres). La diminution de la longueur des filaments est le signe d'une détérioration due à une condition limitante de l'environnement comme une température ou une intensité lumineuse trop forte [Hasler & Poulickova 2003], ou encore une faible concentration en nutriment [Kruskopf & Flynn 2006]. Or, *Planktothrix agardhii* est performante et domine le phytoplancton dans la majorité de la colonne d'eau de l'étang de l'Olivier. On peut donc penser que l'espèce maintient une longueur de ses filaments identique le long de la colonne d'eau afin d'exploiter sa capacité à capter les faibles intensités lumineuses indépendamment de sa proximité avec la source de lumière [Mur, *et al.* 1999; Scheffer, *et al.*

1997] , tout en conservant l'avantage procuré par les vacuoles gazeuses qui lui permettent de migrer le long de la colonne d'eau à la recherche des conditions optimales à sa croissance et donc de coloniser une grande partie du milieu.

Les filaments de *Planktothrix agardhii* de l'étang de l'Olivier sont les plus longs au printemps, lorsque les biovolumes de *Planktothrix agardhii* sont maximaux, et les plus courts en automne. Les longueurs moyennes maximales ont également été observées au printemps en milieu saumâtre Méditerranéen par Romo *et al.* [1994b] et dans un lac dulçaquicole en république tchèque par Poulickova *et al.* [2004]. Ces auteurs observent également une diminution de la longueur moyenne des filaments durant l'automne. La longueur des filaments de *Planktothrix agardhii* est dépendante des conditions thermiques : elle est maximale alors que la température avoisine les 15°C, corroborant l'observation de Poulickova *et al.* [2004] d'une longueur moyenne maximale dans des températures comprises entre 12 et 16°C. De plus, le taux de croissance et la longueur des filaments de *Planktothrix agardhii* sont corrélés [Poulickova, *et al.* 2004], expliquant pourquoi la longueur maximale des filaments est concomitante avec la prolifération de l'espèce. De la même façon, la diminution de la longueur moyenne des filaments durant l'automne est expliquée par les faibles températures. La période durant laquelle sont observés les filaments les plus courts est toutefois plus courte dans notre étude que dans celle de Poulickova *et al.* [2004] observant des filaments courts jusqu'à la fin de l'hiver (Août à décembre vs septembre à février). L'hiver est, dans l'étude de Poulickova *et al.* [2004], caractérisé par la formation d'hormogonies permettant à la population de *Planktothrix agardhii* de résister aux faibles températures, phénomène qui n'est pas observé dans notre étude, sûrement en raison des températures hivernales plus douces en région méditerranéenne. Ainsi l'optimum thermique pour la longueur des filaments de *Planktothrix agardhii* dans l'étang de l'Olivier est situé autour de 15°C ; les températures estivales étant trop élevées, celles automnales et hivernales trop faibles pour l'élaboration de longs filaments. Le même optimum thermique étant retrouvé dans un milieu d'eau douce, la salinité de l'étang de l'Olivier ne semble pas avoir d'influence sur la stratégie morphométrique des filaments de *Planktothrix agardhii*.

### Concentrations en MC

Les concentrations en MC mesurées dans l'étang de l'Olivier dépassent largement la valeur guide de la 'World Health Organization' pour les eaux d'alimentation ( $1 \mu\text{g.l}^{-1}$ ) mais sont légèrement inférieures à celle indiquée pour les eaux de récréation ( $20 \mu\text{g.l}^{-1}$ ) (mis à part une exception qui a lieu à 6 mètres de fond en avril). Les concentrations en MC sont situées dans la gamme des concentrations habituellement retrouvées pour *Planktothrix agardhii*; cependant elles sont situées parmi les faibles concentrations de cette gamme et sous la moyenne des concentrations recensées dans les milieux dominés par *Planktothrix agardhii* [Sivonen & Jones 1999]. On peut s'interroger sur l'impact potentiel de la salinité du milieu sur la production de MC par *Planktothrix agardhii*.

La concentration en MC mesurée du mois de février au mois d'août dans l'étang de l'Olivier est maximale en avril, concomitamment avec le maximum de biovolume de *Planktothrix agardhii*, puis diminue jusqu'à atteindre un minimum en août, alors que le biovolume de *Planktothrix agardhii* est le plus faible. D'une manière générale, dans les milieux dulçaquicoles, les pics de concentrations de *Planktothrix agardhii* sont observés en été et en automne [Sivonen & Jones 1999], et sont accompagnés d'un pic de concentration en MC en automne [Fastner, *et al.* 1999b]. Ainsi, le climat méditerranéen tend à avancer la période d'occurrence des pics de MC, via l'occurrence plus précoce des proliférations de *Planktothrix agardhii*.

La concomitance des maxima et minima des biovolumes de *Planktothrix agardhii* et des concentrations en MC tend à aller dans le sens des observations qui rapportent un effet indirect de l'environnement sur la production de toxines par les cellules, via l'effet des conditions environnementales sur la croissance des cellules [Downing, *et al.* 2005; Orr & Jones 1998]. Ainsi, un minimum de production de MC a été observé pour des températures supérieures à  $30^{\circ}\text{C}$  et pour des concentrations en phosphore et en azote très faibles [Sivonen 1990]. Ces conditions sont rencontrées lors du minimum de concentration en MC dans l'étang de l'Olivier : Les concentrations en azote et phosphate sont inférieures au seuil de détection et la température est maximale en août.

L'étang de l'Olivier étant soumis à des conditions environnementales saisonnières stables et présentant une dynamique cyanobactérienne relativement stables au cours du temps, il paraît possible de surveiller la concentration en MC dans le milieu par la détermination de la

dynamique de *Planktothrix agardhii*, comme le proposent Janse *et al.* [2005]. Cependant, cette surveillance risque d'apporter des résultats très approximatifs qui seraient donc à prendre avec précaution, comme en témoigne la faible corrélation entre les biovolumes de *Planktothrix agardhii* et celles des MC. En effet, d'autres espèces de cyanobactéries que *Planktothrix agardhii* peuvent aussi produire des MC. De plus, toutes les cellules de *Planktothrix agardhii* ne produisent pas des MC ; les gènes *mcy* (gène de biosynthèse des MC) étant distribués en mosaïque au sein d'une population de *Planktothrix agardhii* [Akcaalan 2006]. Enfin, le quota cellulaire en toxine des souches productrices peut varier d'une souche à l'autre ; il peut être jusqu'à 5 fois impacté par des conditions environnementales changeantes [Sivonen & Jones 1999]. Ainsi, selon les génotypes à l'origine des efflorescences et la production de MC par les cellules toxiques, la concentration en MC peut subir des variations.

La concentration en MC est maximale lorsque le biovolume est maximal, et minimale lorsque le biovolume est minimal. En considérant le raccourcissement des filaments comme un signe physiologique de dommage, et la corrélation entre les longs filaments de *Planktothrix agardhii* et un grand taux de croissance de l'espèce [Poulickova, *et al.* 2004], nos résultats semblent aller dans le sens d'une production de MC liée à l'état physiologique de *Planktothrix agardhii* (et donc à son taux de croissance). On peut donc estimer un optimum de production de MC dans des températures situées aux environs de 15°C, les filaments de *Planktothrix agardhii* étant les plus longs à cette température (avril), et le taux de croissance de l'espèce commençant à augmenter à cette température [Bonilla, *et al.* 2012]. Les MC, et les cyanotoxines en général, sont généralement considérées comme étant des métabolites secondaires, cependant leur fonction n'est toujours pas établie. Plusieurs hypothèses sont avancées, dont une des plus probables consiste à envisager les cyanotoxines comme n'importe quels composés oligopeptidiques produit par les cellules, et ayant donc une fonction similaire pour les cellules [Repka, *et al.* 2004]. Cette hypothèse est étayée par des travaux génétiques démontrant un mécanisme commun de synthèse de plusieurs oligopeptides [Christiansen, *et al.* 2003] ; [Rohrlack & Utkilen 2007]. Le résultat de notre étude semble aller dans le sens de cette hypothèse, celle-ci reposant sur un lien entre le taux de croissance de l'organisme producteur de MC et la concentration en MC produite. Toutefois le fait que *Planktothrix agardhii* est capable de produire d'autres cyanotoxines n'a pas été pris en compte dans notre étude. En effet,

l'espèce *Planktothrix agardhii* peut également synthétiser des dermatotoxines (aplysiatoxines) et des neurotoxines (anatoxine-a et PSP) [Sivonen & Jones 1999].

On note finalement que d'autres espèces phytoplanctoniques de l'étang de l'Olivier peuvent être toxiques et donc dangereuses ; comme par exemple l'espèce de Dinophyte accessoire *Prorocentrum minimum*, également retrouvée en mer Méditerranée, qui peut produire des neurotoxines [Vila & Masó 2005].

### Conclusions et perspectives

L'étude démontre la performance de *Planktothrix agardhii* en milieu saumâtre méditerranéen de la même façon qu'en milieu dulçaquicole tempéré. Pour assurer sa suprématie, *Planktothrix agardhii* exploite ses nombreux avantages adaptatifs qui la rendent plus compétitive que les espèces qui l'accompagnent. Ainsi, la capacité de *Planktothrix agardhii* à capter les faibles luminosités [Havens 2008], à former d'importantes biomasses lui permettant de favoriser sa propre compétitivité vis-à-vis des faibles luminosités [Scheffer, *et al.* 1997], à migrer le long de la colonne d'eau, et à tolérer les faibles températures [Sivonen & Jones 1999] ; assurent son succès et sa dominance parmi le phytoplancton tout au long de l'année, et ceci aussi bien dans un milieu d'eau douce tempéré que dans un milieu d'eau saumâtre méditerranéen.

L'étude démontre également la performance de *Planktothrix agardhii* dans un milieu de plus grand volume (grande surface et profondeur) que ceux où l'espèce est rapportée comme dominante [Bonilla, *et al.* 2012]. Bien que *Planktothrix agardhii* soit qualifiée de 'turbulent species' [Reynolds, *et al.* 2002], de symptomatique des milieux eutrophisés, et colonisant les milieux peu profonds [Scheffer, *et al.* 1997] ; l'espèce tourne à son avantage les propriétés du milieu souvent caractérisées comme non propices à son succès (profondeur, stratification thermique), afin de coloniser et dominer le phytoplancton dans la majorité du volume de l'étang, indépendamment de sa proximité à la lumière, du vent, et des concentrations en nutriment.

La salinité du milieu n'a pas d'effet sur la population de *Planktothrix agardhii* et impact seulement secondairement la communauté phytoplanctonique en participant à la sélection des espèces lorsque les autres conditions environnementales ne mènent pas à la domination de *Planktothrix agardhii*. Toutefois, les concentrations en MC apparaissent dans la gamme basse



de celles mesurées dans les milieux dominés par *Planktothrix agardhii*. On peut s'interroger sur un impact potentiel de la salinité sur la production de microcystines synthétisée par *Planktothrix agardhii*.

Il est pronostiqué que, dans un contexte de changement climatique, l'augmentation de la température va entraîner un changement des communautés phytoplanctoniques et favoriser la dominance des cyanobactéries [Jaanus, *et al.* 2011; Paerl & Paul 2012]. Dans le cas des milieux dominés par *Planktothrix agardhii*, une augmentation de la température modifie la dynamique temporelle des efflorescences de *Planktothrix agardhii* et son comportement dans la colonne d'eau. En effet, dans un milieu relativement profond, la température plus élevée favorisant la stratification des eaux au printemps et en été, *Planktothrix agardhii* va exercer sa compétitivité vis-à-vis des autres espèces qui ne possèdent pas sa capacité à flotter à différentes hauteurs de la colonne d'eau. La dynamique temporelle de *Planktothrix agardhii* dans des températures plus élevées devient la suivante : L'espèce forme des efflorescences au printemps en surface (ainsi que dans l'épilimnion et le métalimnion des milieux profonds), bénéficiant d'une température et d'un ensoleillement optimal. Son taux de croissance est alors maximal ; il induit la production de très longs filaments et la production maximale de microcystines. Les fortes températures estivales induisent ensuite le déclin des proliférations de l'espèce, la diminution de la production de toxine et celle de la longueur des filaments qui atteint un minimum en automne. Les douces températures hivernales mènent à une seconde prolifération de *Planktothrix agardhii* (l'espèce étant compétitive pour les faibles températures) ; ou, si les concentrations en nutriment sont limitantes, à la prolifération d'une espèce qui entre en compétition avec *Planktothrix agardhii*.

Une légère salinité ne limitant pas le succès de l'espèce, son action concomitante avec l'augmentation de la température et de l'eutrophisation semble aller dans le sens d'une persistance de l'espèce à l'avenir. Bien que la présence de l'espèce dans d'autres milieux saumâtres va dans le sens de cette constatation [Carstensen & Heiskanen 2007; Chomerat, *et al.* 2007; Romo & Miracle 1994b], il apparaît toutefois nécessaire d'étudier d'autres écosystèmes dominées par *Planktothrix agardhii* afin de généraliser cette interprétation. Il serait également intéressant de mener des études similaires sur des milieux dominés par d'autres espèces de cyanobactéries, les préférences environnementales variant entre les espèces. La plasticité

physiologique des cyanobactéries leur permettant de s'adapter à des variations graduelles de certaines conditions environnementales, cette étude participe à la conclusion de leur dominance future parmi le phytoplancton. Ainsi, des études complémentaires doivent prendre en compte une acclimatation des espèces à certaines conditions environnementales acquise au long terme. Dans de telles conditions, l'étude de la limite des conditions environnementales, telles que la température et la salinité, pour la croissance des différentes espèces de cyanobactérie paraît nécessaire avant de pouvoir faire plus de prévisions. Inversement, des stress environnementaux brutaux risquent, à l'avenir, d'impacter les milieux aquatiques. Des modifications abruptes de salinité étant notamment susceptibles d'influencer les communautés phytoplanctoniques des milieux côtiers, l'étude de leurs effets sur ces communautés apparaît également nécessaire.





## CHAPITRE II

Détermination expérimentale de la valence  
écologique et du comportement toxinique de  
*Planktothrix agardhii* vis-à-vis du facteur salinité



Ce chapitre consiste en deux expérimentations en « batch cultures », qui reposent sur l'étude de trois souches monoclonales isolées de l'étang de l'Olivier : deux souches non productrices de microcystines, les souches 'Brack0' et 'Brack1', et une souche productrice de microcystines, la souche 'Brack2'.

Le chapitre se décompose en deux parties, chacune consistant en une publication :

- La partie A (article soumis à la revue « *Journal of Applied phycology* ») repose sur l'étude des 3 souches 'Brack' ('Brack0', 'Brack1' et 'Brack2'), qui sont comparées à trois souches de *Planktothrix agardhii* isolées d'un milieu dulçaquicole voisin de l'étang de l'Olivier, les souches 'Fresh0', 'Fresh1' et 'Fresh2'.
- La partie B (article soumis à la revue « *Harmful Algae* ») repose sur l'analyse toxinique de la souche productrice de microcystines, 'Brack2'. Dans un souci de lisibilité de l'article, elle est simplement dénommée 'Brack' dans cette partie.





## PARTIE A

Salt tolerance of *Planktothrix agardhii* (Gomont)  
ANAGNOSTIDIS & KOMAREK (cyanoprokaryota)  
brackish strains in batch cultures



## Salt tolerance of *Planktothrix agardhii* (Gomont) ANAGNOSTIDIS & KOMAREK (cyanoprokaryota) brackish strains in batch cultures

Julia Vergalli<sup>1\*</sup>, Céline Bertrand<sup>1</sup>, Katia Comte<sup>2</sup>, Andreea Borla<sup>1</sup>, Evelyne Franquet<sup>1</sup>, Stéphanie Fayolle<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie Marine et continentale (IMBE) UMR 7263 CNRS / 237 IRD, Ecologie des Eaux Continentales, FST de St Jérôme, 13397 Marseille cedex 20, France

<sup>2</sup>Museum National d'Histoire Naturelle de Paris, UMR 7245 Département RDDM, USM505 Cyanobactéries et environnement, 75005 Paris cedex 5, France

\*Corresponding author:

Julia Vergalli

[julia.vergalli@imbe.fr](mailto:julia.vergalli@imbe.fr)

IMBE - Ecologie des eaux continentales

Faculté des Sciences de St-Jerôme, service 421, Avenue Escadrille Normandie-Niemen, 13397 Marseille cedex 20, France

Tel: +33 6 04 28 82 80 – Fax: +33 6 04 91 28 86 68

### Abstract

*Planktothrix agardhii* (*P. agardhii*), a filamentous cyanobacterium commonly found in freshwater environments, has also been reported in brackish areas. In order to test the hypothesis of an acclimation of *P. agardhii* to its environmental salinity, we monitored growth and morphometry of *P. agardhii* brackish and freshwater strains under various salinities (0 to 15 g l<sup>-1</sup>). Despite differences in their behavior under increasing salinities, the brackish strains show: (i) growth less gradually inhibited by increasing salinities than the freshwater strains; (ii) growth nearly optimal in the salinity of their natural environment (iii) a salt tolerance range wider (0 to [12.5-15 g l<sup>-1</sup>]) than that of freshwater *P. agardhii* (0 to [7.5-10 g l<sup>-1</sup>]); (iv) a filaments morphometry less affected by increasing salinities than the one of freshwater *P. agardhii*. Our findings suggest that this tolerance may be due to an acclimation of the strains to their environment by effective salt extrusion and compatible solutes accumulation. This salt acclimation, just as the population response to various salinities, is well reflected by the filaments morphometry. This study highlights the ability of potentially harmful cyanobacteria to acclimate to salinity in a salinization context.

KEY WORDS: *Planktothrix agardhii* – Acclimation – salinity - Growth – Morphometry

## INTRODUCTION

*P. agardhii* is a filamentous cyanobacterium considered as the major bloom-forming species encountered in temperate shallow lakes of the Northern Hemisphere [Catherine, *et al.* 2008; Fastner, *et al.* 1998; Janse, *et al.* 2005]. *P. agardhii* is found forming blooms in freshwater habitats and is therefore considered a typical freshwater species [Anagnostidis & Komárek 1988]. Unexpectedly, several authors also report blooms of *P. agardhii* in brackish waters [Chomerat, *et al.* 2007] [Carstensen & Heiskanen 2007; Romo & Miracle 1994b].

The success of a species suggests that it has characteristics needed to maximize net growth under the environmental conditions [Oliver & Ganf 2002]. Generally speaking, cyanobacteria tolerate a wide range of environmental conditions [Stal 2007], and this ability to acclimate even to extreme conditions is generally attributed to their metabolic versatility and flexibility [Seckbach & Oren 2007; Stal 1991]. Indeed, cyanobacteria use a variety of metabolic pathways and physiologies to take advantage of their environment, as revealed by their responses to various stresses [Stal 2007].

Faced with salinity, all cyanobacteria can withstand the challenge to their cells from salt stress resulting in reduced water availability and high inorganic ion content. Cyanobacteria use a salt-out strategy to regulate their intracellular osmotic pressure, involving an extrusion of toxic ions and an accumulation of osmotic compounds, generally termed 'compatible solutes' [Allakhverdiev & Murata 2008; Dadheech 2010; Oren 2007; Sakamoto, *et al.* 2009]. Accumulating compatible solutes does not require extensive adaptation of the enzymatic machinery. It has been reported that the type of compatible solute accumulated as a reaction to increased salinity is correlated with the salt tolerance of the cyanobacterium [Hagemann 2011]. Thus, freshwater strains with low halotolerance tend to produce disaccharides, moderately halotolerant strains produce glucosylglycerol and halophilic strains produce glycine betaine [Oren 2007]. These basic processes of cyanobacteria salt acclimation explain why all cyanobacteria display a certain degree of salt tolerance [Hagemann 2011]. This acclimation strategy involves many stress signals and the differential expression of hundreds of genes leading to a complex response [DasSarma & DasSarma 2001; Hagemann 2011; Zorina, *et al.* 2011]. Indeed, general salt resistance is based on many cellular processes involving multiple genes [Hagemann 2011]. Point mutation can lead to changes in the regulation of one or more genes involved in the salt acclimation strategy, with the resulting emergence of ecotypes. This type of change can produce a strain that is more efficient with respect to its new salt environment, and therefore may be selected by the environment. However, Stal *et al.* [2007] explains that these mechanisms only lead to microdiversity and that the efficiency of such strains is low compared to that of a strain which has acquired, by a lateral gene transfer, the new metabolic capabilities necessary to exploit new environments. Indeed, the degree of salt tolerance of a strain is the result of multiple genes lost, vertically acquired or laterally acquired among cyanobacteria and other prokaryotes during the long adaptation to environments characterized by different salinities or water availabilities [Hagemann 2011].

In the case of *P. agardhii*, the exploitation of brackish environments can be explained mainly by acclimation to the environment, either because of the plasticity ascribed to the cyanobacteria due to their metabolic flexibility [Stal 2007] which allows them to widen their salt tolerance ranges ; or

because of the selection by these brackish environments of *P. agardhii* ecotypes, thereby showing that their salt tolerance range has shifted from that of freshwater ecotypes.

Investigations on cyanobacteria salt tolerance show that it varies according to where strains are located [Bergmann, *et al.* 2008], and highlight the necessity of determining salt tolerance in strains of interest [Kirkwood, *et al.* 2008].

How a species grows in response to environmental conditions is reflected in its morphology, since morphometric characteristics of species reflect their physiological responses and life strategies [Bonilia, *et al.* 2005]. Roughly speaking, increasing salinity in the medium induces the plasmolysis of organisms, decreasing their cytoplasmic volume and so reducing their cell size [Kanesaki, *et al.* 2002; Shapiguzov, *et al.* 2005]. It has been observed that salinity induces instability of the morphological traits of unicellular cyanobacteria, with different patterns observed depending on the strains studied [Garcia-Pichel, *et al.* 1998; Tonk, *et al.* 2007]. Little is known about the effect of salinity on the morphology of filamentous cyanobacteria, but studies on the effect of other environmental factors such as light, temperature or nutrient concentrations suggest that trichomes length depends on growth conditions [Hasler & Poulickova 2003; Poulickova, *et al.* 2004; Romo & Miracle 1994b].

This study starts from the presence of this freshwater species in brackish environments and aims to answer the following assumptions: (i) The salt tolerance range of monoclonal populations of *P. agardhii* living in brackish waters is wider than that of freshwater *P. agardhii* (ii) The filament morphology, at individual scale, vary within this salt tolerance range differently in brackish and freshwater populations.

## MATERIAL AND METHODS

### *Study site and sampling procedure*

The studied brackish strains of *P. agardhii* (the 'Brack' strains) were originally isolated and purified from the Olivier pond, in the vicinity of Istres, a town located near the city of Marseille in the south of France (43° 30' 46" N 4° 59' 17" E). The Olivier pond is a eutrophic and oligohaline (average salinity 3 g.l<sup>-1</sup>) area of 225 ha, with a maximum depth of 10 m. *P. agardhii* is the dominant cyanobacteria throughout the year. Three strains of *P. agardhii* were used as reference (the 'Fresh' strains); they were originally isolated from a freshwater pond located near the brackish one. Water samples were collected on the ponds surface inside spring blooms of *P. agardhii* in order to isolate filaments to be grown as clonal cultures.

### *Medium and culture conditions*

Water samples were inoculated on semi-solid Z8 medium [Kotai 1972]. After migration by phototactism towards a single light source, trichomes were obtained by picking out single filaments using a sterile glass Pasteur pipettes with a narrow opening under an inverted microscope, and inoculated repeatedly in sterile liquid Zehnder growth medium (Z8) to obtain non-axenic monoclonal cultures [Rippka 1988]. Filaments were assigned to the species *P. agardhii*, according to the morphological criteria provided by Anagnostidis and Komárek [1988]. Monoclonal cultures of *P. agardhii* were maintained under sterile conditions in 250 mL flasks containing Z8 medium with bubbling air to ensure homogeneous mixing and to provide sufficient quantities of inorganic carbon at 22°C on a 14h:10h Light-Dark cycle.

### *Experimental outline*

In order to prepare the brackish strain cells for the above experimental conditions, three of the monoclonal cultures were maintained in the average salinity of the original environment (3 g l<sup>-1</sup>) until transfer to the different salinity regimes. An identical amount of the three acclimated monoclonal pre-cultures and the three freshwater ones was then inoculated under sterile conditions in five replicates each in 250 mL flasks at each salinity regime (0, 3, 5, 7.5, 10, 12.5 and 15 g l<sup>-1</sup>). The salinities were obtained by adding different concentrations of NaCl to the nutrient medium and checked with a conductivity meter (WTW LF330). Inoculum size was adjusted giving ca. 1/10 (v/v) of the pre-culture to obtain an initial absorbance at a wavelength of 750 nm ( $abs_{750}$ ) around 0.1 in all experimental flasks. Batch cultures were maintained in growth chambers under sterile conditions at 22°C on a 14:10h Light-Dark cycle with bubbling air and were shaken manually daily to ensure homogenization of the flask contents. They were randomly repositioned relative to the light source each day, in order to ensure homogeneity of the light regime.

### *Growth kinetics*

Samples for the monitoring of cultures growth were realized over a 26-day period under sterile conditions in the middle of the light cycle for ten days (days 0-10), and subsequently on days 12, 14, 16, 18 20 and 23. Growth was monitored by measuring absorbance at 750 nm ( $abs_{750}$ ) with a Shimadzu UV-1700 spectrophotometer and chlorophyll a ( $chl_a$ ). The  $chl_a$  concentration (mg.l<sup>-1</sup>) was determined spectrophotometrically at 665 nm after extraction with 90% methanol. Concordance between  $abs_{750}$  and population biovolume (BV) was checked from measurements of *P. agardhii*

filament volume in an equal subsample volume per sample, in a counting chamber using a micrometer scale, with objective x40, under a Nikon Labphoto2 microscope. The *P. agardhii* filament BV was calculated according to the following geometrical formula:

$$BV [\mu m^3] = \frac{\pi}{4} l^2 w \quad [\text{Sun \& Liu 2003}]$$

where  $l$  is the length of the filament ( $\mu m$ ) and  $w$  the width ( $\mu m$ )

BVs counted in the counting chamber were then converted into BV per liter of sample and mean BV for each salinity was used for the growth study.

#### *Filament size measurements*

Samples for the morphometric study were realized under sterile conditions in the middle of the light cycle at time 0 (immediately after adding the inocula), and then on days 4 (lag growth phase), 8 (beginning of the exponential growth phase), 12 (exponential growth phase), and 20 (beginning of the stationary growth phase).

Twenty filaments per salinity of the six studied strains were randomly selected in counting chambers for the morphometric study (as it was done in the study of Yepremian *et al.* [2007], so as to obtain the same number of observations for each experimental sample. Means of filament widths and lengths of 'Brack' (N=60) and 'Fresh' (N=60) *P. agardhii* strains were used for the morphometric study.

#### *Data analysis*

A logistic model with three parameters was used to fit growth curves. The logistic model was implemented with the 'grofit' package [Kahm, *et al.* 2010]. Growth curves were fitted with the best trend approximation as determined by  $abs_{750}$  measured at different time points from the following formula:

$$y(t) = \frac{A}{1 + \exp\left(\frac{4\mu}{A}(\lambda - t) + 2\right)} \quad [\text{Kahm, et al. 2010}]$$

Characteristic parameters of the fitted growth curves were obtained with the 'grofit' package. Specific growth rate ' $\mu$ ' is equal to the maximal slope of the growth curve. This parameter represents the maximal increase of absorbance in a time unit and characterizes the exponential growth phase. The ' $\lambda$ ' parameter represents the lag-phase period of the growth. The ' $A$ ' parameter is equal to the asymptote in the curve and is an estimation of the maximal density of the population reached during the life cycle. An additional parameter, 'whole growth', which does not appear in the logistic formula, is equal to the area under the growth curve, thus representing growth during the whole life cycle of the population.

Characteristic growth parameters (growth rate, maximal density and whole growth) derived from the fitted growth curves were then compared between the 'Brack' and the 'Fresh' strains and among the various salinity conditions. Significant differences between the 'Brack' and the 'Fresh' strains were tested on the growth curve parameters (N = 30) for each salinity separately; and on the filament lengths and widths (N = 120) in each experiment time. Significant differences between salinities for both 'Brack' and 'Fresh' strains were tested on the growth curve parameters (N = 90 and 60); and on the filaments size (N = 360 and 240) in each experiment time. ANOVAs were performed to test differences among parameters or filaments size. Differences among means were obtained via the post-hoc Tukey test. Normality was checked using the Shapiro-Wilk test. Homogeneity of variances

was checked using the Fligner-killeen test. In cases where normality or homoscedasticity were not verified, Kruskal-Wallis tests were performed. Pearson correlation coefficients were calculated between growth variables ( $abs_{750}$  with chl\_a and BV).

All statistical tests were carried out in R-2.14.0 environment.



## RESULTS

*Salt effect on P. agardhii growth*

The linear correlation between  $abs_{750}$  and biomass (i.e. chl\_a) is significant, as is that between  $abs_{750}$  and BV, during all growth and during each growth phase, with Pearson correlation coefficients of 0.92 ( $p < 2e^{-16}$ ,  $n=187$ ) and 0.83 ( $p < 2e^{-16}$ ,  $n=201$ ) respectively, during all growth (0.81,  $p < 2e^{-16}$ ,  $n=76$  and 0.78,  $p < 2e^{-16}$ ,  $n=83$  during the lag phase; 0.88,  $p < 2e^{-16}$ ,  $n=56$  and 0.79,  $p = 5.8e^{-12}$ ,  $n=51$  during the exponential phase; 0.81,  $p < 2e^{-16}$ ,  $n=69$  and 0.82,  $p = 8e^{-07}$ ,  $n=53$  during the stationary phase. This shows that growth curves with one of the three parameters are consistent and can be biologically interpreted. Measurements of  $abs_{750}$  were used to establish the growth curves of the *P. agardhii* monoclonal populations under various salinities.

All the *P. agardhii* cultures grew until the 26<sup>th</sup> day of the experiment in salinities ranging from 0 to 7.5g.l<sup>-1</sup>. All the 'Brack' cultures grew in salinities ranging from 0 to 12.5g.l<sup>-1</sup>. The 'Fresh' populations died between the 10<sup>th</sup> and the 18<sup>th</sup> day of the experiment. The Brack1 and Brack2 populations died between the 8<sup>th</sup> and the 20<sup>th</sup> day in the 15 g.l<sup>-1</sup> salinity.

No growth curve for any of the 'Fresh' *P. agardhii* strains in salinities of 10, 12.5 and 15 g.l<sup>-1</sup>; just as the 'Brack' ones in a salinity of 15 g.l<sup>-1</sup>, could be modeled in a satisfactory way. The logistic model is not applicable in this case because the curve shows an almost linear relationship with time and so cannot be fitted by a growth curve model of this nature. So, the 'Fresh' and the 'Brack' strains present a growth in salinities up to 7.5 and 12.5 g.l<sup>-1</sup>, respectively (**Figure 1**). However, although the growth curves have been modeled in a logistic way, the 'Fresh' cultures in 7.5g.l<sup>-1</sup> hardly show an exponential growth phase, as well as the growth curves of 'Brack' cultures in 12.5g.l<sup>-1</sup>.

The growth rates are not different between the 'Brack' strains and the 'Fresh' strains in salinities of 0, 3 and 5 g.l<sup>-1</sup> (**Table 1**). However, the 'Brack' strains grow faster than the 'Fresh' ones in the 7.5 g.l<sup>-1</sup> salinity. The maximal density and the whole growth parameters are not different between the 'Brack' and the 'Fresh' populations in salinities of 0, 5 and 7.5g.l<sup>-1</sup>. In the natural salinity of the 'Brack' strains, these ones reach a greater density in the stationary phase than the 'Fresh' strains. The whole growth shows a reverse trend, explained by an exponential phase coming later for the 'Brack' strains than for the 'Fresh' ones, phenomenon particularly marked in the 3 g.l<sup>-1</sup> salinity. These two parameters have the same behavior in the other salinities, but since it is less marked, the differences are not significant. In addition, the Brack2 growth higher to others induces the parameters variability (**Figure 1**).

Salinity has a different impact on the three 'Brack' strains growth and on the three 'Fresh' one, with a cross effect of salinity and strain on the three growth descriptive parameters ( $p < 0.05$ , Two-way ANOVA). However, the three brackish strains growth decreases more slowly face to salinity increasing from freshwater to a salinity of 7.5 g.l<sup>-1</sup> than the freshwater strains growth (roughly 1.5 and 2-fold, respectively).

We observe a significant gradual salt effect on the growth of the 'Brack' and the 'Fresh' strains (**Figure 1**), with all the descriptive parameters decreasing as salinity increases (**Table 2**). The 'Brack' strains growth parameters are maximal when salinity is 0 g.l<sup>-1</sup>, and minimal when salinity is 12.5 g.l<sup>-1</sup>,

as well as the 'Fresh' strains growth parameters are maximal when salinity is  $0 \text{ g.l}^{-1}$  and minimal when salinity is  $7.5 \text{ g.l}^{-1}$ .

Four and three salinity tolerance ranges can be distinguished for the 'Brack' and the 'Fresh' strains according to patterns of growth in the different salinities. The growth of brackish *P.agardhii* populations is optimal in freshwater, is nearly optimal in  $3 \text{ g.l}^{-1}$  salinity, non-optimal but still successful in intermediate salinities [ $5 - 10 \text{ g.l}^{-1}$ ], and limited in  $12.5 \text{ g.l}^{-1}$ . The growth of freshwater *P.agardhii* populations is optimal in freshwater, non-optimal in intermediate salinities [ $3 - 5 \text{ g.l}^{-1}$ ], and limited in  $7.5 \text{ g.l}^{-1}$  salinity.

#### *Salt effect on P. agardhii filament morphometry*

*P. agardhii* filaments length varies differently according to salinity during the growth cycle of the both 'Fresh' and 'Brack' populations (**Figure 2**).

The 'Fresh' strains filaments lengthen a double in intermediate salinities from day0 ( $398 \pm 31 \mu\text{m}$ ) to day4 ( $821 \pm 71 \mu\text{m}$ ) and keep lengthening during the exponential growth phase ( $1145 \pm 145 \mu\text{m}$ , day12). The 'Fresh' strains filaments in optimal salinity lengthen later and more gradually than in intermediate salinities; filaments length reaches  $575 \pm 62 \mu\text{m}$  and  $1014 \pm 119 \mu\text{m}$  at days8 and 12. Then, the 'Fresh' filaments in optimal and intermediate salinities shorten in the stationary growth phase ( $677 \pm 36 \mu\text{m}$ ). The 'Fresh' filaments length does not vary in the  $7.5 \text{ g.l}^{-1}$  salinity.

The 'Fresh' strains filaments width varies according to salinity during the exponential and the stationary growth phases. The filaments width in optimal salinity does not change during the whole growth cycle ( $3.6 \pm 0.6 \mu\text{m}$ ) while filaments widen in intermediate salinities during the exponential growth phase ( $3.6 \pm 0.6 \mu\text{m}$  to  $4.5 \pm 0.5 \mu\text{m}$  from day0 to day12), and, inversely, become slimmer in the limited salinity ( $3.7 \pm 0.6 \mu\text{m}$  at day0 to  $3.0 \pm 0.5 \mu\text{m}$  at days12 and 20).

The 'Brack' filaments length only slightly increases in freshwater from day0 ( $283 \pm 34 \mu\text{m}$ ) to day12 ( $381 \pm 40 \mu\text{m}$ ). The 'Brack' filaments length in nearly optimal and intermediate salinities increases at day4 and day8, with a maximal length in the  $5 \text{ g.l}^{-1}$  salinity ( $280 \pm 28 \mu\text{m}$ , day0 to  $521 \pm 157 \mu\text{m}$ , day12). Then, in day 12, the filaments length in  $3$  to  $10 \text{ g.l}^{-1}$  salinities decreases to a similar size to that of day 0. Finally, the filaments length decreases in stationary phase, much more severely in intermediate salinities ( $123 \pm 70 \mu\text{m}$ ) than in the nearly optimal salinity ( $244 \pm 88 \mu\text{m}$ ). The 'Brack' filaments length does not vary in the limited salinity until severely decrease at day20 ( $266 \pm 119 \mu\text{m}$  to  $73 \pm 37 \mu\text{m}$ , from day0-12 to day 20).

No significant difference is observed in the widths of *P. agardhii* filaments at the various salinities. The mean width remains constant during the 12 first days of growth ( $3.1 \pm 0.4 \mu\text{m}$ ), and increases on the 20<sup>th</sup> day ( $3.8 \pm 0.5 \mu\text{m}$ ).

Overall, the mean filaments length and width differs between the 'Fresh' and the 'Brack' strains (**Table 3**). The 'Fresh' filaments size is bigger in width and length than the 'Brack' one in salinities 0, 3 and  $5 \text{ g.l}^{-1}$ .

The 'Fresh' filaments length is roughly 2-fold bigger than the 'Brack' filaments length and exhibit greater variability. Indeed, at the start of the experiment, filaments length is the same for both populations, subsequently increasing much more in 'Fresh' populations in salinities of 3 and  $5 \text{ g.l}^{-1}$  (from day4) and  $0 \text{ g.l}^{-1}$  (from day8). The 'Fresh' filaments length is also bigger than the 'Brack' one in the  $7.5 \text{ g.l}^{-1}$  salinity in the stationary growth phase.

The filaments width is the same for both populations in freshwater at the beginning of the experiment. However, the 'Fresh' filaments width is bigger than the 'Brack' one at day0 in salinities of 3, 5 and 7.5 g.l<sup>-1</sup>. It remains true at days 4, 8 and 12 in salinities 0 to 5 g.l<sup>-1</sup>, and at days 4 and 8 in the 7.5 g.l<sup>-1</sup> salinity. Inversely, the 'Brack' filaments width is bigger than the 'Fresh' one in salinity 0 and 7.5g.l<sup>-1</sup> in the stationary phase since the 'Brack' filaments width increases at this day in all salinities.

## DISCUSSION

The significant linear correlations between variables BV and  $\text{abs}_{750}$  and between chl\_a and  $\text{abs}_{750}$  here confirm the relevance of using the  $\text{abs}_{750}$  values to establish and interpret the growth of these brackish *P. agardhii* strains. This parameter is widely used in experimental studies to monitor growth [Bergmann, *et al.* 2008; Mazur-Marzec, *et al.* 2005; Nagai, *et al.* 2007].

### *Salt effect on P. agardhii growth*

All the freshwater populations are able to grow in salinities ranging from 0 to  $7.5\text{g.l}^{-1}$ , with a limited growth without marked exponential growth phase (the proliferating phase leading to blooms *in situ*) at salinity of  $7.5\text{g.l}^{-1}$ . This result is consistent with the *P. agardhii* halotolerance limit found in literature. Indeed, Suda *et al.* [2002] have established that *P. agardhii* strains isolated from freshwaters are able to grow in salinities ranging up to  $7.8\text{g.l}^{-1}$ .

The three brackish strains of *P. agardhii* are able to grow in salinities ranging from 0 to  $12.5\text{g.l}^{-1}$  with a limited growth in  $12.5\text{g.l}^{-1}$ , and no *P. agardhii* strains are able to enter the exponential phase of growth at  $15\text{g.l}^{-1}$  salinity. We thus conclude that the salt tolerance limit of *P. agardhii* living in the studied brackish area is situated between  $12.5$  and  $15\text{g.l}^{-1}$ , probably slightly above  $12.5\text{g.l}^{-1}$ . This result indicates that these strains of *P. agardhii* are relatively salt tolerant for a freshwater species. Previous studies reported that most cyanobacteria can tolerate a narrow range of salinity due to their metabolic flexibility which, in particular, allows cyanobacteria to use the salt-out strategy and the compatible solutes accumulation under increased salinities [Hagemann 2011; Wetzel 1983]. A relatively high salt tolerance range was also found for another freshwater species, *Microcystis aeruginosa*, as revealed by experimental studies [Tonk, *et al.* 2007].

The three 'Brack' strains and the three 'Fresh' strains of *P. agardhii* studied here are likely to be different ecotypes. Indeed, the populations show differences in their growth, with, in particular, a better growth for Brack2 populations than for Brack0 and Brack1 populations. However, despite the differences among ecotypes, the growth patterns in media of different salinities allow us to conclude on the salinity optimal for their growth and on their salt tolerance limit, both of which are identical for all three brackish strains on the one hand, and for the three freshwater strains on the other hand.

Thus, these results confirm the hypothesis of a wider salt tolerance range for *P. agardhii* brackish strains than for freshwater *P. agardhii* strains. Indeed, face to increasing salinities the brackish *P. agardhii* strains growth is less reduced than the freshwater strains growth. This would be consistent with the hypothesis that environmental variations select ecotypes [Kirkwood, *et al.* 2008].

Moreover, our findings indicate that, although the ecological optimum regarding salinity for *P. agardhii* brackish strains is still in freshwater, growth in the  $3\text{g.l}^{-1}$  salinity, the environmental salinity from which the studied strains were isolated, is nearly optimal leading to the same maximal density as in freshwater. Therefore, the hypothesis of an environmental acclimation to the conditions of the natural environment is supported. This result is in agreement with several studies which point to salt acclimation for cyanobacteria species. Reed *et al.* [1985] report that cyanobacteria introduced into a brackish environment from freshwater may not be able to compensate for increasing salinities, whereas indigenous populations are often able to adjust to varying salinities, in particular by producing compatible solutes. The brackish strains studied here seem to have acclimated to their environment,

enabling them to cope better with salt stress than freshwater strains. For example, metabolic flexibility and versatility could enable them to improve their ionic extrusion or accumulation of compatible solutes by regulating the expression of the stress-responsive genes involved in these mechanisms. They could also accumulate a different type of compatible solutes than freshwater strains, although the salt tolerance limit found in this study is still situated within the salt tolerance range (from 0 to 0.6M NaCl) established for species considered freshwater strains accumulating disaccharides, according to the Hagemann classification [Hagemann 2011]. It would be interesting to compare the amount of osmotic compound accumulated in *P. agardhii* brackish and freshwater strains in order to elucidate the greater ability of brackish strains to cope with salinity.

Over time, cyanobacteria may adapt to a change in salinity [Barron, *et al.* 2002]. It is more likely that brackish strains are acclimated rather than adapted to salinity since the optimal salinity is not shifted. However, the possibility that the brackish ecotypes are different genotypes more efficient towards salinity than freshwater genotypes cannot be ruled out. Indeed, the brackish ecotypes may consist of one or more genotypes that have previously undergone point mutations or lateral gene transfer among cyanobacteria and other prokaryotes in their genomes, enabling the strains to better counteract salinity and thus giving them an advantage in brackish environments. Hagemann [2011] shows that in the strain *Microcystis* NIES-843, the absence of genes potentially involved in compatible solute synthesis is probably the result of gene loss (because the gene involved in disaccharide biosynthesis is normally present in the genome of all cyanobacteria), explaining why the strain is limited to freshwater or very slightly brackish waters. The *P. agardhii* brackish strains may have maintained this gene in a propitious environment, whereas the freshwater strains lost it, as in the case of the strain of *Microcystis* NIES-843.

#### *Salt effect on P. agardhii filament morphometry*

Another important result concerning the physiology of the *P. agardhii* strains is that dynamic of filaments size in the course of the population growth cycle varies according to the medium salinity, and between brackish and freshwater strains.

Salinity seems to determine the growth strategy adopted by the monoclonal populations: In freshwater, the populations of both kind of strains grow quickly by producing new filaments which lengthen slightly and gradually; in the nearly-optimal salinity (3 g.l<sup>-1</sup>, brackish strains only), the brackish strains grow slightly slower but provide the same population density by producing longer filaments; in intermediate salinities (3 - 5 g.l<sup>-1</sup> for the freshwater strains, 5 – 10 g.l<sup>-1</sup> for the brackish strains), both brackish and freshwater strains grow by significantly and rapidly lengthening their filaments rather than by forming new ones, and in the limited salinities (7.5 g.l<sup>-1</sup> for the freshwater strains, 12.5 g.l<sup>-1</sup> for the brackish strains), they grow slowly without lengthening their filaments.

An increase in *Planktothrix* filament lengths with increasing light intensities has already been observed *in situ* [Hasler & Poulickova 2003] and a link has been established between filament elongation and increased temperature [Poulickova, *et al.* 2004]. Our results also reveal a link between filament length and salinity. An interesting question is why, in intermediate salinities, filaments lengthen and new filaments are not formed. The weak turn-over of the monoclonal populations in intermediate salinities may not be sufficient for the filament to split up and form new filaments. The strategy that usually ensures the dissemination of filamentous species is forming new filaments. Thus, not splitting up

would lead to an energy gain. Bergmann *et al.* [2008] also found an increase in filament lengths of *Prochlorothrix hollandica* at high salinities. The authors suggest that this phenomenon involves the synthesis of sucrose, the compatible solute accumulated by the strain during its acclimation process. This compatible solute has been shown to cause cell division in the presence of increased salinity [Ferjani, *et al.* 2003]. This observation, combined with the fact that the *P. agardhii* growth rate is positively correlated with the filaments length, provides another explanation for the lengths dynamic differences according to salinity [Poulickova, *et al.* 2004]. Indeed, face to salinity, the filaments length may be the result of the balance between the filaments lengthening promoting by the growth rate and compatible solute accumulation, and the filaments shortening induced by the cost for the growth rate of the active ionic extrusion plus other metabolic process affected by salinity. Consequently, in a freshwater medium the filaments lengthen progressively during the exponential phase of growth, in intermediate salinities the filaments lengthen rapidly due to the compatible solutes accumulation with a maximal length in salinity inducing ionic extrusion not too much costly for growth, and in limited salinities the salt-out extrusion cost too much to the cells for lengthen the filaments. Thus, this hypothesis would also explain why the freshwater strains filaments lengthen more than the brackish strains in freshwater and intermediate salinities: In freshwater, they are in their natural environment and the lengthening is better promoted than for the brackish strains filaments, while in intermediate salinities they have to accumulate much more compatible solutes to cope with salinity.

Our results therefore appear to be in line with the hypothesis of acclimation to salinity of the brackish strains by the accumulation of compatible solutes.

It should be added that this variation in morphology may affect the trophic network. Indeed, filament morphology has a recognized effect on grazing efficiency [Oberhaus, *et al.* 2007b].

The morphometric study shows no salt impact on cell widths of *P. agardhii* brackish strains whereas the width of the freshwater strains filaments varies according to the salinity. Osmotic shock, which increases linearly with NaCl concentration in the medium [Ladas & Papageorgiou 2000], is expected to induce a modification in cell volume. Indeed, species without a rigid cell membrane will at least slightly equilibrate their intracellular osmotic pressure by shrinkage or enlargement of the cells via movement of water through the membrane [Oren 2007]. Clearly, the unaltered brackish cell volume observed here indicates ionic equilibrium, since only isosmotic balance between cell and medium allows cell volume to be maintained [Dadheech 2010]. Inversely, the freshwater strains enlarged their cells directly after adding the inocula in the salty mediums, and decrease the cell widths during the stationary growth phase. This result is therefore consistent with a good acclimation to salinity of the brackish strains which show a better performance to cope with increasing salinity than the freshwater strains.

An acclimation of the brackish strains to their environment may explain the ecological success of this species in brackish ecosystems, since species with a capacity for adaptation can dominate other cyanobacteria populations [Prinsloo & Pieterse 1994]. Although the optimal growth of the brackish strains still occurs in freshwater or slightly brackish waters, the fact that they form blooms indicates that *P. agardhii* is still more efficient than the other species present in brackish habitats. This is consistent with a study which reports a similar level of salt tolerance *in situ* [Chomerat, *et al.* 2007]. Indeed, these authors report that *P. agardhii* proliferated in Bolmon pond (France) despite salinities

fluctuating up to  $11 \text{ g l}^{-1}$ , and seemed to be able to persist not only in brackish water but at fluctuating salinities. Further studies on *P. agardhii* isolated from environments with differing salinity levels will be needed to provide further confirmation. For example, it would be interesting to assess the salt tolerance ranges of other strains isolated from brackish waters with different salinities, in order to see if the tendency of brackish strains to widen their salt tolerance is confirmed, and, in this case, if the salinity of the strain habitat is positively correlated with the salt tolerance limit range. In the same way, achieving continuous *P. agardhii* cultures subjected to a gradual increase in salinity would assess to what extent P can acclimate to salinity.

In a context of global climate change including the environments salinization, this study demonstrates the acclimation ability to salinity of a potentially toxic cyanobacterium which forms densities as important in the salinity of its environment as in freshwaters, suggesting the persistence of harmful cyanobacteria blooms in the future.

### **Conclusion**

The findings of this study validate the hypothesis of a salt tolerance range of *P. agardhii* living in brackish areas wider than that of *P. agardhii* living in freshwaters, suggesting that the *P. agardhii* brackish strains are acclimated to their environment, and therefore demonstrate the plasticity response of cyanobacteria towards their environment. In addition, this study reveals that the morphometric dynamic of the *P. agardhii* filaments reflects the salt acclimation of the population and its response face to salinity. The salt tolerance range established in this study means that *P. agardhii* blooms might well be found in bodies of water whose salinity is as high as  $12.5 \text{ g l}^{-1}$ . This raises doubts about the salt tolerance limits commonly attributed to other freshwater species, and suggests the persistence of high biomass of freshwater harmful cyanobacteria in a salinization context.

**References**

- Allakhverdiev, S. & N. Murata, 2008. Salt stress inhibits photosystems II and I in cyanobacteria. *Photosynthesis Research* 98:529-539.
- Anagnostidis, K. & J. Komárek, 1988. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 3 - Oscillatoriales *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes* No. 50-53:327-472.
- Barron, S., C. Weber, R. Marino, E. Davidson, G. Tomasky & R. Howarth, 2002. Effects of varying salinity on phytoplankton growth in a low-salinity coastal pond under two nutrient conditions. *Biological Bulletin* 203:260-261.
- Bergmann, I., U. Geiss-Brunschweiler, M. Hagemann & A. Schor, 2008. Salinity tolerance of the chlorophyll b-synthesizing cyanobacterium *Prochlorothrix hollandica* strain SAG 10.89. *Microbial Ecology* 55:685-696.
- Bonilia, S., D. Conde, L. Aubriot & M. D. Perez, 2005. Influence of hydrology on phytoplankton species composition and life strategies in a subtropical coastal lagoon periodically connected with the Atlantic Ocean. *Estuaries* 28:884-895.
- Catherine, A., C. Quiblier, C. Yepremian, P. Got, A. Groleau, B. Vincon-Leite, C. Bernard & M. Troussellier, 2008. Collapse of a *Planktothrix agardhii* perennial bloom and microcystin dynamics in response to reduced phosphate concentrations in a temperate lake. *Fems Microbiology Ecology* 65:61-73.
- Chomerat, N., R. Garnier, C. Bertrand & A. Cazaubon, 2007. Seasonal succession of cyanoprokaryotes in a hypereutrophic oligo-mesohaline lagoon from the South of France. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 72:591-602.
- Dadheech, N., 2010. Desiccation tolerance in cyanobacteria. *African Journal of Microbiology Research* 4:1584-1593.
- DasSarma, S. & P. DasSarma, 2001. *Halophiles*. John Wiley & Sons, Ltd.
- Fastner, J., I. Flieger & U. Neumann, 1998. Optimised extraction of microcystins from field samples - A comparison of different solvents and procedures. *Water Research* 32:3177-3181.
- Ferjani, A., L. Mustardy, R. Sulpice, K. Marin, I. Suzuki, M. Hagemann & N. Murata, 2003. Glucosylglycerol, a compatible solute, sustains cell division under salt stress. *Plant Physiology* 131:1628-1637.
- Garcia-Pichel, F., U. Nubel & G. Muyzer, 1998. The phylogeny of unicellular, extremely halotolerant cyanobacteria. *Archives of Microbiology* 169:469-482.
- Hagemann, M., 2011. Molecular biology of cyanobacterial salt acclimation. *Fems Microbiology Reviews* 35:87-123.
- Hasler, P. & A. Poulickova, 2003. Diurnal changes in vertical distribution and morphology of a natural population of *Planktothrix agardhii* (Gom.) Anagnostidis et Komarek (Cyanobacteria). *Hydrobiologia* 506:195-201.



- Janse, I., W. E. A. Kardinaal, M. Kamst-van Agterveld, M. Meima, P. M. Visser & G. Zwart, 2005. Contrasting microcystin production and cyanobacterial population dynamics in two *Planktothrix*-dominated freshwater lakes. *Environmental Microbiology* 7:1514-1524.
- Kahm, M., G. Hasenbrink, H. Lichtenberg-Frate, J. Ludwig & M. Kschischo, 2010. gRfit: Fitting biological growth curves with R. *Journal of Statistical Software* 33:1-21.
- Kanesaki, Y., I. Suzuki, S. I. Allakhverdiev, K. Mikami & N. Murata, 2002. Salt stress and hyperosmotic stress regulate the expression of different sets of genes in *Synechocystis* sp PCC 6803. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 290:339-348.
- Kirkwood, A. E., J. A. Buchheim, M. A. Buchheim & W. J. Henley, 2008. Cyanobacterial diversity and halotolerance in a variable hypersaline environment. *Microbial Ecology* 55:453-465.
- Komárek, J. & K. Anagnostidis, 2005. Cyanoprokaryota 2. Teil/ 2nd Part: Oscillatoriales. Süßwasserflora von Mitteleuropa 19/2. Elsevier/Spektrum Akademischer Verlag, Munich.
- Ladas, N. P. & G. C. Papageorgiou, 2000. Cell turgor: A critical factor for the proliferation of cyanobacteria at unfavorable salinity. *Photosynthesis Research* 65:155-164.
- Mazur-Marzec, H., L. Zeglinska & M. Plinski, 2005. The effect of salinity on the growth, toxin production, and morphology of *Nodularia spumigena* isolated from the Gulf of Gdansk, southern Baltic Sea. *Journal of Applied Phycology* 17:171-179.
- Nagai, T., A. Imai, K. Matsushige & T. Fukushima, 2007. Growth characteristics and growth modeling of *Microcystis aeruginosa* and *Planktothrix agardhii* under iron limitation. *Limnology* 8:261-270.
- Oberhaus, L., M. Gelinas, B. Pinel-Alloul, A. Ghadouani & J. F. Humbert, 2007. Grazing of two toxic *Planktothrix* species by *Daphnia pulex*: potential for bloom control and transfer of microcystins. *Journal of Plankton Research* 29:827-838.
- Oliver, R. & G. Ganf, 2002. Freshwater blooms. In Whitton, B. & M. Potts (eds) *The ecology of cyanobacteria*. Springer Netherlands, 149-194.
- Oren, A., 2007. Diversity of organic osmotic compounds and osmotic adaptation in cyanobacteria and algae. In Seckbach, J. (ed) *Algae and cyanobacteria in extreme environments. Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology*, vol 11. Springer Netherlands, 639-655.
- Poulickova, A., P. Hasler & M. Kitner, 2004. Annual cycle of *Planktothrix agardhii* (Gom.) ANAGN. & KOM. Nature population. *International Review of Hydrobiology* 89:278-288.
- Prinsloo, J. F. & A. J. H. Pieterse, 1994. Preliminary-observations on the effect of increased concentrations of total dissolved salts on growth and photosynthetic rates in different algal species. *Water Sa* 20:219-222.
- Reed, R. H., S. R. C. Warr, D. L. Richardson, D. J. Moore & W. D. P. Stewart, 1985. Multiphasic osmotic adjustment in a euryhaline cyanobacterium. *Fems Microbiology Letters* 28:225-229.
- Rippka, R., 1988. Isolation and purification of Cyanobacteria. *Methods in Enzymology* 167:3-27.
- Rojo, C. & M. A. Cobelas, 1994. Population-dynamics of *Limnothrix redekei*, *Oscillatoria lanceaeformis*, *Planktothrix agardhii* and *Pseudanabaena limnetica* (Cyanobacteria) in a shallow hypertrophic lake (Spain). *Hydrobiologia* 276:165-171.

- Romo, S. & M. R. Miracle, 1993. Long-term periodicity of *Planktothrix agardhii*, *Pseudanabaena galeata* and *Geitlerinema sp.* in a shallow hypertrophic lagoon, the Albufera of Valencia (Spain). *Archiv Fur Hydrobiologie* 126:469-486.
- Romo, S. & M. R. Miracle, 1994. Population dynamics and ecology of subdominant phytoplankton species in a shallow hypertrophic lake (Albufera of Valencia, Spain). *Hydrobiologia* 273:37-56.
- Sakamoto, T., T. Yoshida, H. Arima, Y. Hatanaka, Y. Takani & Y. Tamaru, 2009. Accumulation of trehalose in response to desiccation and salt stress in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *Phycological Research* 57:66-73.
- Seckbach, J. & A. Oren, 2007. Oxygenic photosynthetic microorganisms in extreme environments. In Seckbach, J. (ed) *Algae and cyanobacteria in extreme environments. Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology*, vol 11. Springer Netherlands, 3-25.
- Shapiguzov, A., A. A. Lyukevich, S. I. Allakhverdiev, T. V. Sergeyenko, I. Suzuki, N. Murata & D. A. Los, 2005. Osmotic shrinkage of cells of *Synechocystis sp* PCC 6803 by water efflux via aquaporins regulates osmostress-inducible gene expression. *Microbiology-Sgm* 151:447-455.
- Stal, L. J., 1991. The metabolic versatility of the mat-building cyanobacteria *Microcoleus chthonoplastes* and *Oscillatoria limosa* and its ecological significance *Archiv Fur Hydrobiologie*:453-467.
- Stal, L. J., 2007. Cyanobacteria: Diversity and versatility, clues to life in extreme environments. In Seckbach, J. (ed) *Algae and cyanobacteria in extreme environments. Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology*, vol 11. Springer Netherlands, 659-680.
- Suda, S., M. M. Watanabe, S. Otsuka, A. Mahakahant, W. Yongmanitchai, N. Nopartnaraporn, Y. D. Liu & J. G. Day, 2002. Taxonomic revision of water-bloom-forming species of oscillatoriid cyanobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52:1577-1595.
- Sun, J. & D. Y. Liu, 2003. Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. *Journal of Plankton Research* 25:1331-1346.
- Tonk, L., K. Bosch, P. M. Visser & J. Huisman, 2007. Salt tolerance of the harmful cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Aquatic Microbial Ecology* 46:117-123.
- Villena, M. J. & S. Romo, 2003. Phytoplankton changes in a shallow Mediterranean lake (Albufera of Valencia, Spain) after sewage diversion. *Hydrobiologia* 506:281-287.
- Yepremian, C., M. F. Gugger, E. Briand, A. Catherine, C. Berger, C. Quiblier & C. Bernard, 2007. Microcystin ecotypes in a perennial *Planktothrix agardhii* bloom. *Water Research* 41:4446-4456.
- Zorina, A., K. Mironov, N. Stepanchenko, M. Sinetova, N. Koroban, V. Zinchenko, E. Kupriyanova, S. Allakhverdiev & D. Los, 2011. Regulation systems for stress responses in cyanobacteria. *Russian Journal of Plant Physiology* 58:749-767.

**Figure captions**

**Figure 1** Effect of salinity on growth of *P. agardhii* 'Fresh' and 'Brack' strains.

Gray asterisk: Fresh0; gray diamond: Fresh1; empty gray triangles: Fresh2; black asterisk: Brack0; black diamond: Brack1; empty black triangles: Brack2). Growth curves represent the time course of  $\text{abs}_{750}$  means under different salinities ( $\text{g.l}^{-1}$ ) over a 26-day period. Error bars indicate standard deviation (N = 5)

**Figure 2** Mean lengths and widths of 'Fresh' and 'Brack' *P. agardhii* filaments over a 20-day period.

Increasing salinity ( $\text{g.l}^{-1}$ ) is represented by the gray gradient in every experiment time. Filament lengths and widths are represented by length histograms for each salinity in every experiment time. Error bars indicate standard deviation (N = 60). Means with different letters (a, b, c) are significantly different among salinities ( $p < 0.05$ , ANOVA, Tukey post-hoc test).

**Table 1** Differences between 'Brack' and 'Fresh' growth descriptive parameters in different salinities. Values are the parameters means ( $\pm$  SD) obtained with the 'grofit' function from the fitted growth curves of the 'Brack' and 'Fresh' strains salinity replicates (N=15).

'ns': not significant differences; '\*': 0.01<p-value<0.05, '\*\*': 0.001<p-value<0.01, ANOVAs.

strain	Salinity (g.l <sup>-1</sup> )	Growth rate (d <sup>-1</sup> )			Maximal density			Whole growth		
<b>Brack</b>	0	0,15	0,08	<b>ns</b>	1,7	0,6	<b>ns</b>	19	6	<b>ns</b>
<b>Fresh</b>		0,12	0,03		1,4	0,6		26	6	
<b>Brack</b>	3	0,13	0,05	<b>ns</b>	1,7	0,5	*	15	2	*
<b>Fresh</b>		0,11	0,06		1,0	0,3		23	7	
<b>Brack</b>	5	0,13	0,06	<b>ns</b>	1,5	0,8	<b>ns</b>	16	7	<b>ns</b>
<b>Fresh</b>		0,10	0,04		1,1	0,4		21	7	
<b>Brack</b>	7.5	0,10	0,05	*	1,5	1,0	<b>ns</b>	13	6	<b>ns</b>
<b>Fresh</b>		0,06	0,02		0,7	0,2		11	4	
<b>Brack</b>	10	0,08	0,04		1,4	0,8		13	5	
<b>Fresh</b>		NA	NA		NA	NA		NA	NA	
<b>Brack</b>	12.5	0,04	0,02		0,7	0,6		8	3	
<b>Fresh</b>		NA	NA		NA	NA		NA	NA	

**Table 2** Differences in 'Brack' and 'Fresh' growth descriptive parameters between salinities.

Values are the parameters means ( $\pm$  SD) obtained with the 'grofit' function from the fitted growth curves of the 'Brack' and 'Fresh' strains salinity replicates (N=15). Parameters with different letters (a, b, c) are significantly different between salinities ( $p < 0.05$ , Kruskal-Wallis test).

strain	Salinity (g.l <sup>-1</sup> )	Growth rate (d <sup>-1</sup> )			Maximal density			Whole growth		
<b>Brack</b>	0	0,15	0,08	<b>a</b>	1,7	0,6	<b>a</b>	19	6	<b>a</b>
	3	0,13	0,05	<b>ab</b>	1,7	0,5	<b>a</b>	15	2	<b>a</b>
	5	0,13	0,06	<b>ab</b>	1,5	0,8	<b>ab</b>	16	7	<b>a</b>
	7.5	0,10	0,05	<b>abc</b>	1,5	1	<b>ab</b>	13	6	<b>ab</b>
	10	0,08	0,04	<b>bc</b>	1,4	0,8	<b>ab</b>	13	5	<b>ab</b>
	12.5	0,04	0,02	<b>c</b>	0,7	0,6	<b>b</b>	8	3	<b>b</b>
<b>Fresh</b>	0	0,12	0,03	<b>a</b>	1,4	0,6	<b>a</b>	26	6	<b>a</b>
	3	0,11	0,06	<b>ab</b>	1	0,3	<b>ab</b>	23	7	<b>ab</b>
	5	0,10	0,04	<b>ab</b>	1,1	0,4	<b>ab</b>	21	7	<b>ab</b>
	7.5	0,06	0,02	<b>b</b>	0,7	0,2	<b>b</b>	11	4	<b>b</b>

**Table 3** Differences between 'Brack' and 'Fresh' filament sizes in different salinities.

Gray box indicate significant higher values than the blank box.

'ns': not significant differences, '\*\*': 0.01<p-value<0.05, '\*\*\*': 0.001<p-value<0.01, ANOVA.

strain	Salinity (g.l <sup>-1</sup> )	all days		day0	day4	day8	day12	day20
<b>LENGTH</b>								
Brack	<b>0</b>	340	38					
Fresh		596	263	***	ns	ns	**	**
Brack	<b>3</b>	317	66					
Fresh		824	286	***	ns	**	***	***
Brack	<b>5</b>	335	156					
Fresh		827	314	***	ns	***	***	***
Brack	<b>7.5</b>	296	142					
Fresh		325	56	ns	ns	ns	ns	ns
<b>WIDTH</b>								
Brack	<b>0</b>	3,3	0,4					
Fresh		3,6	0,2	***	ns	***	***	***
Brack	<b>3</b>	3,3	0,3					
Fresh		3,9	0,3	***	**	***	***	***
Brack	<b>5</b>	3,3	0,3					
Fresh		4,0	0,3	***	***	***	***	***
Brack	<b>7.5</b>	3,3	0,3					
Fresh		3,3	0,3	ns	***	***	*	ns

Figure 1

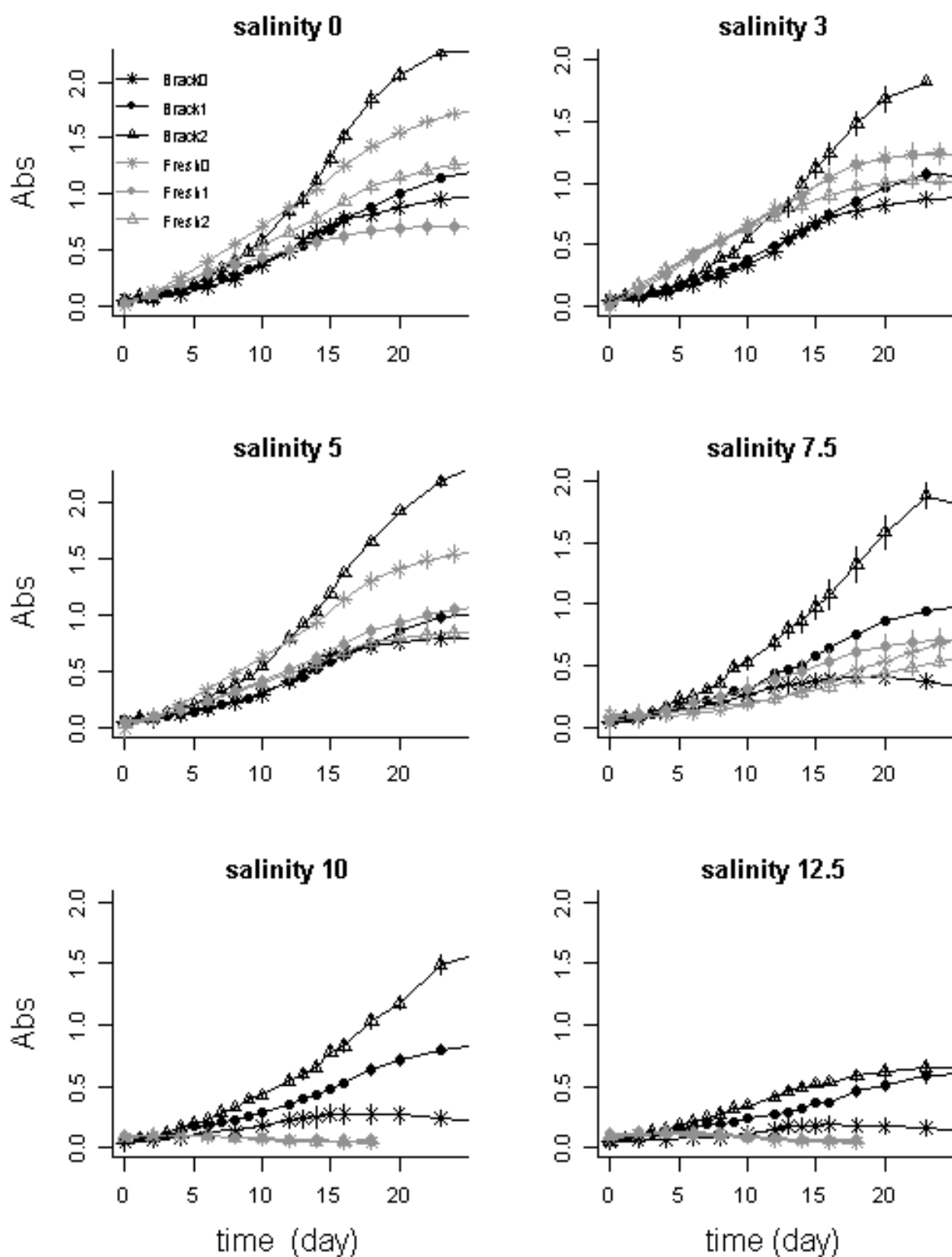
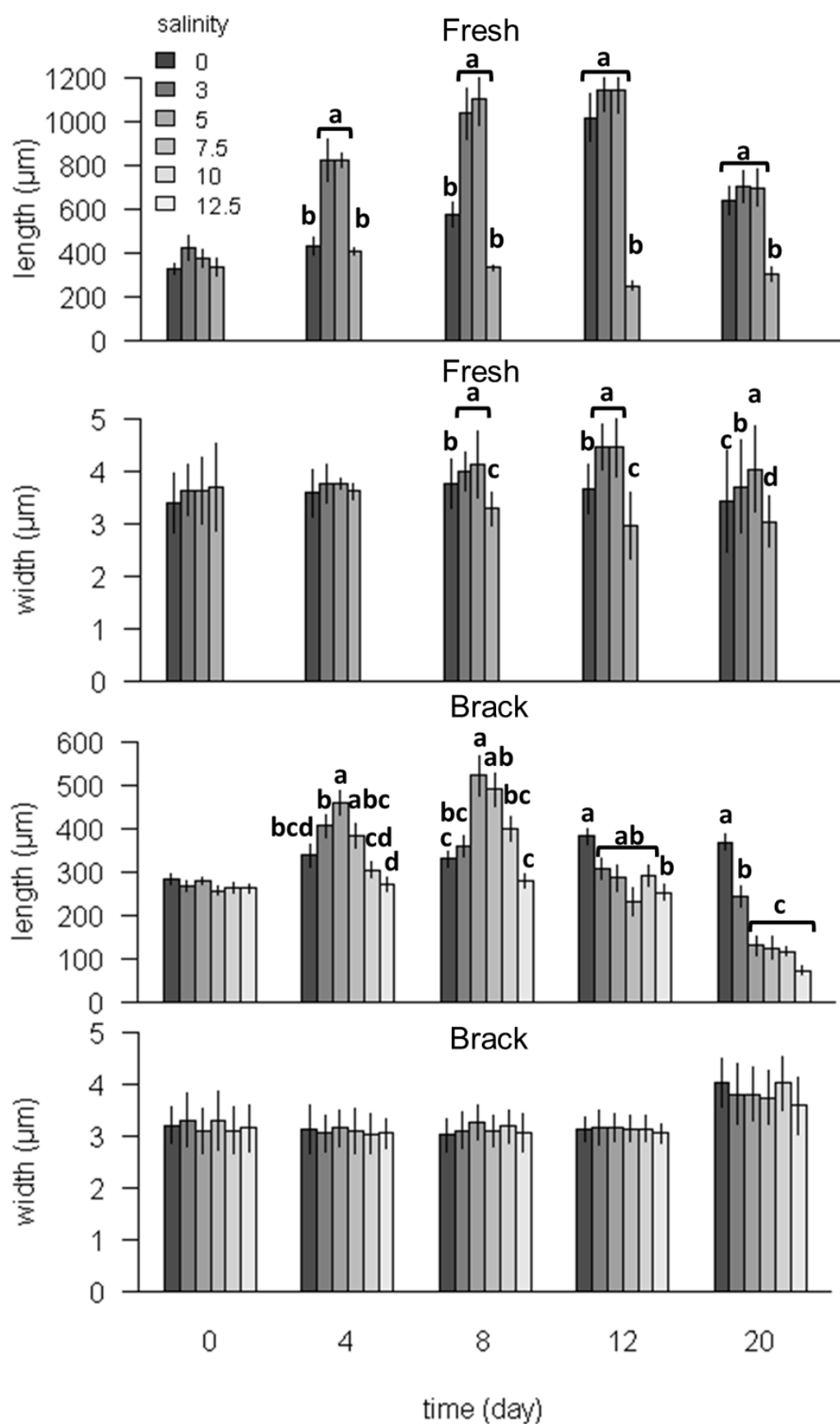


Figure 2









## PARTIE B

Salt acclimation allows the microcystin production of *Planktothrix agardhii* in brackish environments



## Salt acclimation allows the microcystin production of *Planktothrix agardhii* in brackish environments

Julia Vergalli<sup>1\*</sup>, Katia Comte<sup>2</sup>, Céline Bertrand<sup>1</sup>, Evelyne Franquet<sup>1</sup>, Stéphanie Fayolle<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie Marine et continentale (IMBE) UMR 7263 CNRS / 237 IRD, Ecologie des Eaux Continentales, FST de St Jérôme, 13397 Marseille cedex 20, France

<sup>2</sup>Museum National d'Histoire Naturelle de Paris, UMR 7245 Département RDDM, USM505 Cyanobactéries et environnement, 75005 Paris cedex 5, France

### Abstract

Harmful cyanobacteria are predicted to be favored in the salinization context because of their ability to tolerate salinity. The harmful freshwater cyanobacterium *Planktothrix agardhii* (*P. agardhii*) has been shown to form blooms in brackish areas. Since *P. agardhii* is a common microcystin (MC) producer (cyanotoxin) this study asks about its MC production in a brackish environment. The salt tolerance range and the MC variants composition of a brackish MC-producing *P. agardhii* strain were characterized and batch cultures were performed to assess the MC production along the population development under various salinities. The study demonstrates the salt acclimation of the brackish *P. agardhii* which produces MC in salty mediums as much as the population grow. Optimal and sub-optimal salinities (0 to 7.5g.l<sup>-1</sup>) lead to a higher MC production rate during the beginning of the population growth whereas non optimal salinities for growth (10 to 12.5g.l<sup>-1</sup>) still allow a low MC production during the proliferating growth phase. This study suggests that brackish environments do not prevent the MC production of *P. agardhii* and asks about the hazard persistence due to MC production by freshwater harmful cyanobacteria in a context of environments salinization.

KEY WORDS: *Planktothrix agardhii* – microcystin – salinity – acclimation – batch cultures

## INTRODUCTION

Mass development of cyanobacteria is detrimental to ecosystems and is a threat to animals and human via their ability to produce cyanotoxins [Chorus & Bartram 1999].

Microcystins (MCs) are the most frequently found cyanobacterial toxins in brackish areas and freshwaters from all continents [Sivonen & Jones 1999]. MCs are cyclic heptapeptide hepatotoxins whose toxicity is exerted via the inhibition of eukaryotic protein phosphatases type 1 and 2A [Pearson, *et al.* 2010]. The inhibition of the phosphatase activity leads to the degradation of hepatic structure ultimately resulting in organ failure and haemorrhagic shock [Pearson, *et al.* 2010]. Several animal poisoning by contaminated water ingestion were reported [Ressom, *et al.* 1994] and the more important example of human contamination by MCs is the case of 76 persons who died after a dialysis with contaminated water [Pouria, *et al.* 1998]. The MC physiological function for the producing organism, as well as the MC ecological regulation remain subject to questions, although several hypothesis have been advanced such as an allelopathic function or a role in the primary metabolism [Kaebernick & Neilan 2001; Leao, *et al.* 2009].

One of the most interesting questions is how environment influence the changes in MC concentration during cyanobacterial blooms. Indeed, comprehend the variations in MC concentrations during a cyanobacterial bloom remains important for predicting potential health hazards. It has been found that environment induce change in MC concentration during a cyanobacterial bloom by influencing the density and the proportion of MC-producing cells [Briand, *et al.* 2008a; Vezie, *et al.* 2002], and the MC amount produced by the toxic cells [Sivonen & Jones 1999]. It has also been reported that environment can act on the MC variant proportion and then influences the bloom toxicity since varying levels of toxicity have been reported for each MC variants [Pearson, *et al.* 2010; Tonk, *et al.* 2005].

Numerous studies have demonstrated the influence of the environment on the MC content in toxic cells; with an influence of the nutrient concentration [Downing, *et al.* 2005], temperature [Yepremian, *et al.* 2007] light [Wiedner, *et al.* 2003], iron [Sevilla, *et al.* 2008], pH [Song, *et al.* 1998]. While the results are sometimes inconsistent, a trend emerges from numerous studies, which consists in observing a negative correlation between MC content in cells and the toxic population densities; and a positive correlation between the MC production rate and the cell growth rate. It was suggested that environment have an indirect effect on the MC production via the direct effect on the physiological state and so the cell growth of the producing cells [Briand, *et al.* 2008a; Briand, *et al.* 2008b; Downing, *et al.* 2005; Kurmayer 2011; Long, *et al.* 2001; Orr & Jones 1998; Tonk, *et al.* 2005].

It is increasingly accepted that global environmental change is likely to bring to the dominance of harmful cyanobacteria in aquatic ecosystems [Davis, *et al.* 2009; Paerl & Paul 2012]. Indeed, the eutrophication accelerated by anthropisation, coupled with rising temperatures, increased rainfall, enhanced stratification of the water column and salinization will favor the harmful cyanobacteria in aquatic environments [Paerl & Otten 2013], and so will induce the increasing of frequency, biomass, duration and distribution of the harmful cyanobacterial proliferations [Carey, *et al.* 2012]. Harmful cyanobacteria are predicted to be favored in the salinization context because of their ability to tolerate salinity, despite the fact that they are most of the time reported to form blooms in freshwaters [Hagemann 2011; Paerl & Otten 2013].

*P. agardhii* is a common MC producer [Fastner, *et al.* 1999a], which generally form recurrent toxic blooms in freshwater bodies of the Northern hemisphere [Fastner, *et al.* 1999b]. However, *P. agardhii* was reported to perform blooms in several brackish water bodies [Carstensen & Heiskanen 2007; Chomerat, *et al.* 2007; Romo & Miracle 1994b].

In a general way, there is no much data about the influence of salinity on the MC production, likely due to the fact that the widespread MC-producing species are mainly encountered in freshwater species. However, since *P. agardhii* proliferates in brackish areas, it appears of importance to establish if the environment salinity influences the ability of *P. agardhii* to produce MC. An acclimation to brackish waters, involving the differential expression of many genes [Hagemann 2011], is likely to induce a different physiology of the brackish ecotypes compared to that of the freshwater ecotypes. Thus, in the case of a link between the MC production rate and the toxic cells physiological state, this acclimation process could interact with the regulation of the MC synthesis by *P. agardhii*. Moreover, Orr and Jones [1998] suggest that the MC production rate can be used to reveal the cells physiology.

Additionally, assessing the MC variants produced by *P. agardhii* living in brackish areas, as well as determining the salt impact on its MC production, will deliver clues on the toxicity of harmful cyanobacteria in the context of environments salinization.

This study aims to characterize the MC production of a brackish strain of *P. agardhii*. Its MC variants composition is characterized, and batch cultures were performed to simulate its blooms in various brackish environments allowing the assessment of i) the salinity range in which a brackish *P. agardhii* can perform toxic blooms; ii) the MC production along the brackish *P. agardhii* bloom development; iii) the influence of salinity on its MC production.

## MATERIAL AND METHODS

### *Strain isolation and cultivation*

The *P. agardhii* studied strain ('Brack' strain) was isolated from the Olivier pond, in the vicinity of Istres, a town located near the city of Marseille in the south of France (43° 30' 46" N 4° 59' 17" E). The Olivier pond is a eutrophic and oligohaline area (average salinity of 3) of 225 ha, with a maximum depth of 10 m. *P. agardhii* is the dominant cyanobacterium throughout the year. Water samples were collected on the pond surface inside a *P. agardhii* bloom in order to isolate filaments to be grown as clonal cultures. Water samples were inoculated on semi-solid Z8 medium. After migration by phototactism towards a single light source, filaments were obtained by picking out single filaments using a sterile glass Pasteur pipette with a narrow opening under an inverted microscope. The trichomes were then transferred and inoculated repeatedly in sterile Z8 liquid medium to obtain non-axenic monoclonal cultures [Rippka 1988]. Filaments were assigned to the species *P. agardhii*, according to the morphological criteria provided by Anagnostidis and Komárek [1988]. The monoclonal pre-culture of the 'Brack' strain was acclimatized at the salinity of its original environment (salinity of 3) during at least three months, in growth chambers under sterile conditions at 22°C on a 14:10h Light-Dark cycle with bubbling air to ensure homogeneous mixing and to provide sufficient quantities of inorganic carbon.

### *Experimental outline*

The experiment was carried out in 250 mL Erlenmeyer flasks containing modified Z8 medium with NaCl added to produce final salinities of 0, 3, 5, 7.5, 10, 12.5 and 15. This method, instead of diluting seawater, eliminated the possible effects of other water components [Mazur-Marzec, *et al.* 2005]. Salinity was checked with a conductivity meter (WTW LF330). 'Brack' pre-culture was inoculated in 5 replicates, in 250 mL flasks for each salinity regime (N = 35). Inoculum size of 'Brack' pre-culture was adjusted to obtain an initial absorbance at a wavelength of 750 nm (abs) of around 0.1 in all experimental flasks. Batch cultures were maintained in growth chambers under sterile conditions at 22°C on a 14:10h Light-Dark cycle with bubbling and were shaken manually daily to ensure homogenization of the flask contents. They were randomly repositioned relative to the light source each day, in order to ensure homogeneity of the light regime.

### *Growth kinetics*

Growth was monitored by measuring absorbance at a wavelength of 750 nm (Shimadzu UV-1700 spectrophotometer), and chlorophyll *a* (chl<sub>a</sub>). The chl<sub>a</sub> concentration (mg.l<sup>-1</sup>) was determined spectrophotometrically at 665 nm after extraction with 90% methanol. The biovolume has been estimated from abs measurements since a preliminary study has established a good linear correlation between the abs variations of the *P. agardhii* culture growth and the total biovolume of the *P. agardhii* population regardless the salinity of the culture medium and in the different growth phases.

### *MC analysis*

LC-MS (MS) was used for the characterization of the 'Brack' MC variants and ELISA for the assays of the total concentration of MC and MC content in cells during the experiment.



### Template preparation

3 ml of mature culture of the 'Brack' strain were centrifuged (4000g X 10min). The supernatant was discarded and the cell pellet was resuspended with 1 ml MeOH: H<sub>2</sub>O (90:10, v/v) and sonicated on ice for 4 pulses of 30 seconds. The mixture was centrifuged at 10000 rpm for 15 minutes at 4°C. The supernatant was collected, filtered (GF/C 1.2 µm) and evaporated to dryness (speed-vac concentrator 40°C). The extract was dissolved in 100µl water with 0.1% of formic acid and centrifuged (5000 rpm X 5 minutes, 4°C). The supernatant was directly injected into the LC/ESI-MS system.

### Mass spectrometric analysis

LC/ESI MS and LC/ESI-MS/MS experiments were performed on a liquid chromatography (LC) (UltiMate 3000®, Dionex) coupled to a Quadrupole-Time of flight (Q-TOF) hybrid mass spectrometer (pulsar i, Applied Biosystems) equipped with an electrospray ionization source (ESI). The chromatographic separation was conducted on a ACE3-C18 reverse-phase column (3 µm x 10 cm x 1 mm). Mobile phases were milliQ water containing 0.1% (v/v) formic acid (A), acetonitrile 0.07% (v/v) and formic acid (B). The LC separation was achieved at a flow rate of 40 µl.min<sup>-1</sup> using a gradient elution from 10 to 30%, solvent B in 5 minutes, 30 to 70% B in 17 minutes, 70% B in 5 minutes, 70 to 10% B in 3 minutes and 10% B in 15 minutes. The mass spectrometer was operated with an electrospray ionization source in a positive ion mode. For mass spectra, the capillary voltage was set to 2500 V with a declustering potential of 20 V. Full scan mass spectra were performed from 100 to 1500 m/z at 1s/scan in continuum mode. Tandem mass spectra (Production) were obtained using nitrogen as a collision gaz, with collision energy automatically determined according to their mass-to-charge ratio (m/z) values.

### LC/ESI-MS et LC/ESI MS/MS data analysis

MS/MS data were analysed manually for highlighted spectra which contained the characteristic fragment ion (m/z= 135.1) of MCs fragmentation. All others ions fragments were used to elucidate the structure of the MCs. The LC/ESI-MS data were processed using BioAnalyst 1.1 software and the molecular weight distribution of species (ranging from 100Da to 2 kDa) observed in each sample were generated using the LC-MS reconstruct option. Proportion of each variant was calculated by comparing one single peak area of MC-variant to the total peak area of all MCs in sample.

### MC concentration and production assays

Samples for the assessment of total MC concentrations and MC production were performed directly after the inoculation (day 0), during the lag phase (2<sup>nd</sup> day), during the acceleration phase (6<sup>th</sup> and 8<sup>th</sup> days), in the beginning and in the end of the exponential phase (10<sup>th</sup> and 18<sup>th</sup> days).

The ELISA was performed according to the manufacturer's instructions after disrupting *P. agardhii* cells by sonication. The anti-Adda ELISA Kit (Abraxis LLC) is based on an antiserum raised against the unique β-amino acid, 3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4,6-dienoic acid (Adda), which is common to the majority of known MC variants [Pearson, *et al.* 2010]. The assessment of MC concentrations were performed on 'Brack' duplicates and each replicate was analyzed using duplicate measurements on a 96-well microtiter plate yielding mean MC content per culture. The detection limit for this assay is 0.10 ppb (µg.l<sup>-1</sup>).

The MC content in cells per density, biomass and biovolume unit (named MC quota) were assessed from the intracellular MC concentrations. The MC production rate has been calculated with the formula:

$$\mu = \frac{\ln x_2 - \ln x_1}{t_2 - t_1}$$

where  $x_2$  and  $x_1$  are MC quotas in times  $t_2$  and  $t_1$  with  $t_2 > t_1$

#### *Data analysis*

'Brack' growth curves were fitted with the best trend approximation from abs measurements in function of time as logistic functions whose formula is the following:

$$y(t) = \frac{A}{1 + \exp\left(\frac{4\mu}{A}(\lambda - t) + 2\right)} \quad \text{[Kahm, et al. 2010]};$$

where 'A' is the asymptote in the curve and is an estimation of the maximal density of the population reached during the life cycle; ' $\mu$ ' is the maximal slope of the growth curve and characterizes the exponential growth phase; ' $\lambda$ ' is the lag-phase period of the growth.

Three parameters obtained from the resulting logistic curves implemented with the 'grofit' package [Kahm, et al. 2010] were used to compare the 'Brack' growth among the various salinity conditions; the maximal density (A), the growth rate ( $\mu$ ) and the whole growth which is equal to the area under the growth curve, thus representing growth during the whole life cycle of the population. Significant differences between salinities were tested by ANOVAs (N = 5) on the growth characteristic parameters. Differences among means were obtained via the Tukey's post-hoc test. Pearson correlation coefficients were calculated between growth variables (abs and  $ch\_a$ ) and MC parameters. Differences of MC parameters between salinities were tested by ANOVA or by Kruskal-Wallis test if the necessary conditions for ANOVA were not reached. Differences among means were obtained by the Tukey's post-hoc test if normality and homoscedasticity were reached; otherwise the Wilcox test with a Bonferonni correction for pairwise comparisons was used instead. Normality was checked using the Shapiro-Wilk test and homoscedasticity was checked using the Fligner-Killeen test.

All statistical tests were carried out in R-2.14.0 environment.

## RESULTS

### *Growth in the various salinities*

All the 'Brack' monoclonal cultures grew in salinities ranging from 0 to 12.5 until the 26<sup>th</sup> day whereas populations in the salinity of 15 died between the 20<sup>th</sup> and the 23<sup>rd</sup> day. Moreover, no growth curve of 'Brack' cultures in a salinity of 15 could be modeled in a satisfactory way because the curves show an almost linear relationship with time and so cannot be fitted by logistic models. However, all the growth curves in salinities of 0 to 10 present an exponential phase of growth and the salinity of 12.5 allows only a limited growth without marked exponential growth phase (**Figure 1A**). The analysis of the 'Brack' growth curves parameters according to salinity shows that growth decreases with salinity increasing from 0 to 12.5 (ANOVA,  $p < 0.05$ ,  $n=30$ ) (**Figure 1B**). Growth in salinities of 0, 3 and 5 presents the higher growth rates in exponential phase. The 'Brack' growth in salinities of 0 and 5 reaches the higher densities and shows a whole growth higher than in other salinities. The growth in the natural salinity ( $3\text{g.l}^{-1}$ ) shows a maximal density a little reduced compared to those observed in optimal salinities. Growths in salinities of 7.5 and 10 are intermediates between the growth in the nearly optimal salinities and the growth in the limiting salinity for the 'Brack' growth (12.5).

### *MC-variants characterization*

Five MCs, two major types and three minor (one undetermined) variants were detected in 'Brack' strain by liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry (LC/ESI-MS/MS) (**Figure 2**). All the ions possessed the Adda fragment signal of  $m/z$  135.1 on their fragmentation spectra and were consequently assigned as MCs (since Adda has been regarded as the key structural component of this cyanotoxin [Carmichael 1992]). Other ions fragments on MS/MS spectra and retention time were used to identify the MC-variant. According, to their retention time and their MS/MS spectra, the two major ions doubly charged  $[M+ 2H]^{2+}$ , with  $m/z = 512.8$  and  $m/z = 491.3$ , and respective retention time (RT) of 16.8 min (peak 1) and 19.2 min (peak 3) were identified as [Asp3]MC-RR and [Asp3]MC-LR. The both types represent 93% of MCs present in this strain (respectively 83% and 10%).

Among the three minor ions, (identified as MCs according to the Adda fragment in their MS/MS spectra), only one was clearly characterized as the demethylated [Asp3]MC-HtyR with a RT of 18.7 (peak 2) and a  $m/z = 523.3$ . The MS/MS spectra for the two other minor ions with  $m/z = 502.2$  and  $m/z = 516.2$  and RT of respectively 19.2min (peak 3) and 21min (peak4) had a very low ion fragments making the identification difficult to perform. However, the doubly charged  $[M+ 2H]^{2+}$ , with  $m/z = 516.2$  was assigned to be either [Asp3]MC-YR or [Asp3,dha7]MC-HtyR.

### *Total MC concentrations*

The MC concentration measured in the 'Brack' cultures does not vary according to salinity (Kruskal Wallis,  $p > 0.05$ ). The MC concentration increases along the life cycle of the clonal population with a similar pattern in all studied salinities. The mean MC concentration in 'Brack' cultures is significantly different depending in the period of the life cycle of the monoclonal populations (Kruskal Wallis,  $p < 0.05$ ) (**Figure 3**). It remains constant from the inoculation time to the lag phase, then the MC concentration increases around four-fold from the lag growth phase to the acceleration and the beginning of the exponential growth phase with no significant difference in days 6, 8 and 10 ( $8.5 \pm 1.7$

$\mu\text{g.l}^{-1}$ ). The MC concentration reaches highest levels at the end of the exponential phase of 'Brack' growth ( $20.8 \pm 1.8 \mu\text{g.l}^{-1}$ ). The total MC concentration in all salinities is so well correlated with the 'Brack' growth, with Pearson's correlation coefficients of 0.88 ( $p=3.9*10^{-13}$ ,  $n=36$ ) between the cultures abs and the MC concentration, and of 0.93 ( $p=2.5*10^{-16}$ ,  $n=36$ ) between the cultures chl\_a and the MC concentration.

#### *MC production*

MC quota shows not significant difference among salinities ( $p>0.05$ , Kruskal-Wallis). However, MC quota shows a different pattern with time according to the medium salinity (two-way anova,  $p<0.05$ ). The MC quota varies in function of the culture development in salinities ranging from 0 to 7.5 (**Figure 4**). In these optimal and sub-optimal salinities the MC quota increases roughly 2-fold during the lag phase and subsequently gradually decreases during the acceleration and the exponential growth phases while no such pattern can be made out in salinities of 10 and 12.5, in which MC quotas do not vary along the growth cycle. MC quota is negatively correlated with the logarithm of biomass ( $r=-0.82$ ,  $p=5.8e^{-11}$ ,  $n=42$ ) and biovolume ( $r=-0.76$ ,  $p=5.2e^{-09}$ ,  $n=42$ ), in salinities ranging from 0 to 7.5, from day2 to day18. So, it reveals a biomass threshold from which the MC quota is minimal and no longer varies (**Figure 5**).

The MC production rate during the lag growth phase seems to be proportional to the populations growth rates, thus revealing a maximal production in freshwater and salinity 5, a production little lower in the salinity 3 and further reduced in 7.5 (**Figure 6**). Although the 'Brack' *P. agardhii* shows production rates more than 5-fold reduced than in salinities ranging from 0 to 7.5, it still produces MC during the exponential growth phase in salinities of 10 and 12.5.

## DISCUSSION

### *Halotolerance of the P. agardhii brackish strain*

The halotolerance of the MC-producing *P. agardhii* brackish strain is wider than that established for freshwater strains in literature (7.8) since it still grows in the 12.5 salinity [Suda, *et al.* 2002]. The result of a salt tolerance wider in brackish environments is consistent with observations *in situ* of *P. agardhii* recurrent blooms in brackish waters which salinity varies up to 11 [Chomerat, *et al.* 2007]. In addition, the 'Brack' *P. agardhii* optimal growth is in the freshwater as well as in the 5 salinity. The *P. agardhii* 'Brack' strain seems to be acclimated rather than adapted to salinity. Adaptation is a process that ensures the survival of an organism in an environmental condition far from its optimal preference while acclimation occurs when the habitat changes are 'low' [Huertas, *et al.* 2011]. Thus, the slightly salty water of the Olivier pond is likely to have induced the acclimation to salinity of the *P. agardhii* 'Brack' strain. It has been previously found that cyanobacteria may acclimate to salinity with time [Barron, *et al.* 2002] leading to the observation of salt tolerances variables according to where strains are located [Bergmann, *et al.* 2008]. Indeed, cyanobacteria show a great plasticity due to their metabolic flexibility [Stal 2007] and have the ability to cope with salinity by accomplishing an ionic extrusion and osmolytes accumulation demonstrating why all cyanobacteria display a certain degree of salt tolerance [Hagemann 2011]. Since one of the main ways of cyanobacteria to acclimate to salinity is the synthesis of osmotic compounds, it would be of interest to investigate the synthesis of osmotic compounds that probably allow *P. agardhii* to proliferate in brackish waters [Oren 2007]. Moreover, the determination of the *P. agardhii* acclimation limit to salinity in other brackish areas would anticipate the areas in which *P. agardhii* may form harmful blooms.

### *Characterization of the MC Variants produced by the P. agardhii brackish strain*

Kurmayer *et al.* [2005] found that the synthesis of specific MC variants is associated with DNA polymorphisms within specific regions of adenylation domains of *mcy* synthetase genes. The author highlights the necessity to combined ecology of *Planktothrix* with its MC variants production in order to provide clues about the abundance of defined MC ecotypes in nature since various ecotypes species are potentially producing different MC variants. Moreover, the environment has been seen to influence the composition of the MC variants synthesized by cyanobacteria, like the amino acid availability in the medium [Tonk, *et al.* 2008]. In a general way, the three determined MC variants of the brackish *P. agardhii* in this study are known to be the most abundant in natural freshwater *Planktothrix* populations [Fastner, *et al.* 1999a] and they are reported to be synthesized by many of the *P. agardhii* strains studied [Briand, *et al.* 2008a; Briand, *et al.* 2005; Kurmayer, *et al.* 2005; Luukkainen, *et al.* 1993; Sivonen & Jones 1999; Tonk, *et al.* 2005]. It is noted that the three MC variants determined and the fourth potentially determined as [Asp<sup>3</sup>, Dha<sup>7</sup>]MC-HtyR are demethyl forms and therefore variants of low toxicity (DL<sub>50</sub> of the three determined variants ranging from 160 to 300 µg.kg<sup>-1</sup>) since the demethyl forms on Asp<sup>3</sup> and dha<sup>7</sup> are five to ten less toxic than the methyl forms [Sivonen & Jones 1999]. The MC variants proportion produced by the 'Brack' strain also appears similar to that found synthesized by *P. agardhii* in freshwaters. Indeed, the main MC variant of the *P. agardhii* brackish strain is the [Asp<sup>3</sup>]MC-RR variant, which is often characterized as dominant among the MC variants synthesized by *P. agardhii* [Kurmayer, *et al.* 2005; Laub, *et al.* 2002; Mazur-Marzec, *et al.* 2008; Sivonen 1990; Tonk,

*et al.* 2005]; and it is known to be the main MC variant synthesized by *P. agardhii* [Fastner, *et al.* 1999a; Luukkainen, *et al.* 1993]. So, the composition and relative abundance of the MC variants of the *P. agardhii* brackish strain is similar to that of freshwater *P. agardhii* ecotypes, suggesting that this level of *P. agardhii* bloom toxicity would be the same in brackish areas as the one reported in freshwaters. However, further investigations of the MC variants produced by other strains from Oliver pond and from other brackish areas are necessary to conclude on the non-influence of the brackish environment on the quality of MC variant synthesized by *P. agardhii*. Similarly, Tonk *et al.* [2005] found changes in MC variants production by a *P. agardhii* population during transient state in six to eight days, highlighting the necessity to further perform the analysis in natura sample. It was observed that increasing the photon intensity will cause an increase in the amount of MC-LR and a decrease of MC-RR, thereby increasing the toxicity of the variant population since the MC-LR is five-fold more toxic than the variant MC-RR [Tonk, *et al.* 2005]. Thus, further analysis of the MC composition in the Mediterranean pond, benefiting from strong sunlight, may provide new insights of the *P. agardhii* bloom toxicity.

#### *MC production during the P. agardhii brackish strain proliferation in various salinities*

In a general way, the MC concentrations during the 'Brack' *P. agardhii* growth cycle are of the same order of magnitude as those reported for *P. agardhii* in freshwater environments although the MC concentrations may vary widely from an ecosystem to another [Briand, *et al.* 2002; Catherine, *et al.* 2008; Janse, *et al.* 2005; Mankiewicz-Boczek, *et al.* 2011; Mazur-Marzec, *et al.* 2008; Sivonen & Jones 1999].

The total MC concentration during the 'Brack' proliferation is well correlated with the *P. agardhii* biomass in all salinities. Since the batch cultures system simulates a bloom development, this result provides an overview on the MC concentrations occurring during a bloom of *P. agardhii* in brackish water bodies. The MC concentrations are often correlated with the concentrations of the producing organisms [Dolman, *et al.* 2012; Paerl & Otten 2013] since the MC content in cells is balanced by the loss of the daughter cells in the time course of growth [Lyck 2004]. This fact also explains why the MC concentrations are not different according to the salinity and suggests that, as much as *P. agardhii* is able to grow, it produces MC in brackish areas. However, further analyses are needed to conclude of the MC concentration during *P. agardhii* blooms in brackish waters since in natural *P. agardhii* population, MC-producing cells co-occur with non-MC-producing cells [Kurmayer, *et al.* 2004]. Futures researches will test the potential cross effect of the genetic ability to produce MC and the acclimation to salinity. Briand *et al.* [2008b] suggests that limiting environmental factors for growth favor the MC-producing strains over the non-producing ones, and inversely. It would be so of interest to monitor the relative abundance of MC-producing cells *in situ* in order to see if the brackish area will tend to favor one kind of cell over another.

The maximal MC production of the 'Brack' cells occurs during the lag phase when they are in optimal (0 and 5) or sub-optimal (3 and 7.5) salinities for growth, explaining the negative correlation of the MC quota in these salinities with the biomass development of the brackish *P. agardhii* population. The maximal MC content in cells would occur during the onset of the bloom and subsequently decreases along the bloom development with a minimum at the *P. agardhii* biomass peak. This result is consistent with the experimental study of Song *et al.* [1998] who found that the toxin production

correlates with the growth phase, with the higher toxins production occurring at the growth beginning. A similar dynamic has already been reported in freshwaters by several studies which found that the MC content per cell during a cyanobacterium bloom gradually declines from high levels at the onset of the bloom to low levels at the height of the bloom [Janse, *et al.* 2005; Kardinaal, *et al.* 2007]. Janse *et al.* [2005] provide several hypothesis to explain this phenomenon: The high level of production in cells during the onset of the bloom exerts a bottom-up control on the population growth or a top-down control on the grazers, the low densities favor cells with high content in MC or favor the MC production by toxic cells or favor the toxic cells over the non-toxic ones. The 'Brack' MC quota dynamic, assessed on monoclonal strain batch cultures, would be in line with the hypothesis of a MC production stimulation in low biomasses or the assumption of the MC as a signal enhancing the population growth. Anyway, a brackish environment which salinity is optimal or sub-optimal for the *P. agardhii* growth leads to the same dynamic of the MC quota in *P. agardhii* cells than the one observed in freshwaters.

Although the low availability of data does not allow us to conclude on a significant correlation, the MC production rate during the beginning of the *P. agardhii* growth in optimal and sub-optimal salinities appears proportional to the growth rate of the population. Several studies have previously reported that the environmental factors, such as phosphate concentrations [Briand, *et al.* 2005] or photon irradiance [Tonk, *et al.* 2005] has an indirect effect on the toxin production through the growth rate of the cyanobacteria. In the present study this pattern is observed only in low salinities (salinities 0, 3, 5 and 7.5) while in non-optimal salinities for growth, *P. agardhii* cells do not present this peak of MC production during the onset of the bloom but still performs a lower MC production during the exponential growth phase. Lyck *et al.* [2004] also show a MC production in unfavorable conditions of light for the *Microcystis aeruginosa* growth. The authors explain that unfavorable conditions for growth do not prevent the production of cells metabolites since they just induce the extension of the G1 phase of the interphase during the cell division [Lyck 2004]. This hypothesis would explain the later MC production rates in non-optimal salinities than in optimal and sub-optimal salinities for the *P. agardhii* growth.

In conclusion, the brackish *P. agardhii* strain acclimated to salinity synthesizes common freshwaters *P. agardhii* MC variants and is able to produce MC as much as the population grows, with a maximal MC production in optimal and sub-optimal salinities during the beginning of the population growth, and a lower MC production in non-optimal salinities during the exponential growth phase. Caution is needed in extrapolating the results of this study to other strains of *P. agardhii* living in brackish areas since one single strain was investigated. Moreover, only the production of MC by 'Brack' *P. agardhii* was studied. It would be of interest to characterize its potential production of other cyanotoxins since *P. agardhii* can also produce aplysiatoxins, anatoxins and saxitoxins thereby increasing the risk of the *P. agardhii* blooms toxicity [Sivonen & Jones 1999]. Finally, in a context of the environments salinization, this study suggests a toxicity risk of *P. agardhii* blooms in brackish waters due to its MC production similar to that found in freshwaters.

## References

- Allakhverdiev, S. & N. Murata, 2008. Salt stress inhibits photosystems II and I in cyanobacteria. *Photosynthesis Research* 98:529-539.
- Anagnostidis, K. K., Jirřı, 1988. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 3 - Oscillatoriales *Algalogical Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes No. 50-53:327-472.*
- Barron, S., C. Weber, R. Marino, E. Davidson, G. Tomasky & R. Howarth, 2002. Effects of varying salinity on phytoplankton growth in a low-salinity coastal pond under two nutrient conditions. *Biological Bulletin* 203:260-261.
- Bergmann, I., U. Geiss-Brunschweiler, M. Hagemann & A. Schoor, 2008. Salinity tolerance of the chlorophyll b-synthesizing cyanobacterium *Prochlorothrix hollandica* strain SAG 10.89. *Microbial Ecology* 55:685-696.
- Bonilia, S., D. Conde, L. Aubriot & M. D. Perez, 2005. Influence of hydrology on phytoplankton species composition and life strategies in a subtropical coastal lagoon periodically connected with the Atlantic Ocean. *Estuaries* 28:884-895.
- Briand, E., M. Gugger, J. C. Francois, C. Bernard, J. F. Humbert & C. Quiblier, 2008a. Temporal variations in the dynamics of potentially microcystin-producing strains in a bloom-forming *Planktothrix agardhii* (cyanobacterium) population. *Applied and Environmental Microbiology* 74:3839-3848.
- Briand, E., C. Yepremian, J. F. Humbert & C. Quiblier, 2008b. Competition between microcystin- and non-microcystin-producing *Planktothrix agardhii* (cyanobacteria) strains under different environmental conditions. *Environmental Microbiology* 10:3337-3348.
- Briand, J. F., S. Jacquet, C. Flinois, C. Avois-Jacquet, C. Maissonette, B. Leberre & J. F. Humbert, 2005. Variations in the Microcystin Production of *Planktothrix rubescens* (Cyanobacteria) Assessed from a Four-Year Survey of Lac du Bourget (France) and from Laboratory Experiments. *Microbial Ecology* 50:418-428.
- Briand, J. F., C. Robillot, C. Quiblier-Lloberas & C. Bernard, 2002. A perennial bloom of *Planktothrix agardhii* (Cyanobacteria) in a shallow eutrophic French lake: limnological and microcystin production studies, Schweizerbart edn. Schweizerbart, Stuttgart, ALLEMAGNE.
- Carey, C. C., B. W. Ibelings, E. P. Hoffmann, D. P. Hamilton & J. D. Brookes, 2012. Eco-physiological adaptations that favour freshwater cyanobacteria in a changing climate. *Water Research* 46:1394-1407.
- Carmichael, W. W., 1992. Cyanobacteria secondary metabolites—the cyanotoxins. *Journal of Applied Microbiology* 72:445-459.
- Catherine, A., C. Quiblier, C. Yepremian, P. Got, A. Groleau, B. Vincon-Leite, C. Bernard & M. Troussellier, 2008. Collapse of a *Planktothrix agardhii* perennial bloom and microcystin dynamics in response to reduced phosphate concentrations in a temperate lake. *Fems Microbiology Ecology* 65:61-73.
- Chomerat, N., R. Garnier, C. Bertrand & A. Cazaubon, 2007. Seasonal succession of cyanoprokaryotes in a hypereutrophic oligo-mesohaline lagoon from the South of France. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 72:591-602.
- Chorus, I. & J. Bartram, 1999. Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. E & FN Spon, London and New York.
- Dadheech, N., 2010. Desiccation tolerance in cyanobacteria. *African Journal of Microbiology Research* 4:1584-1593.



- DasSarma, S. & P. DasSarma, 2001. Halophiles. John Wiley & Sons, Ltd.
- Davis, T. W., D. L. Berry, G. L. Boyer & C. J. Gobler, 2009. The effects of temperature and nutrients on the growth and dynamics of toxic and non-toxic strains of *Microcystis* during cyanobacteria blooms. *Harmful Algae* 8:715-725.
- Dolman, A. M., J. Rücker, F. R. Pick, J. Fastner, T. Rohrlack, U. Mischke & C. Wiedner, 2012. Cyanobacteria and Cyanotoxins: The Influence of Nitrogen versus Phosphorus. *Plos One* 7:e38757.
- Downing, T. G., C. S. Sember, M. M. Gehringer & W. Leukes, 2005. Medium N : P ratios and specific growth rate comodule microcystin and protein content in *Microcystis aeruginosa* PCC7806 and *Microcystis aeruginosa* UV027. *Microbial Ecology* 49:468-473.
- Fastner, J., M. Erhard, W. W. Carmichael, F. Sun, K. L. Rinehart, H. Ronicke & I. Chorus, 1999a. Characterization and diversity of microcystins in natural blooms and strains of the genera *Microcystis* and *Planktothrix* from German freshwaters. *Archiv Fur Hydrobiologie* 145:147-163.
- Fastner, J., I. Flieger & U. Neumann, 1998. Optimised extraction of microcystins from field samples - A comparison of different solvents and procedures. *Water Research* 32:3177-3181.
- Fastner, J., U. Neumann, B. Wirsing, J. Weckesser, C. Wiedner, B. Nixdorf & I. Chorus, 1999b. Microcystins (hepatotoxic heptapeptides) in German fresh water bodies. *Environmental Toxicology* 14:13-22.
- Ferjani, A., L. Mustardy, R. Sulpice, K. Marin, I. Suzuki, M. Hagemann & N. Murata, 2003. Glucosylglycerol, a compatible solute, sustains cell division under salt stress. *Plant Physiology* 131:1628-1637.
- Garcia-Pichel, F., U. Nubel & G. Muyzer, 1998. The phylogeny of unicellular, extremely halotolerant cyanobacteria. *Archives of Microbiology* 169:469-482.
- Hagemann, M., 2011. Molecular biology of cyanobacterial salt acclimation. *Fems Microbiology Reviews* 35:87-123.
- Hasler, P. & A. Poullickova, 2003. Diurnal changes in vertical distribution and morphology of a natural population of *Planktothrix agardhii* (Gom.) Anagnostidis et Komarek (Cyanobacteria). *Hydrobiologia* 506:195-201.
- Huertas, I. E., M. Rouco, V. López-Rodas & E. Costas, 2011. Warming will affect phytoplankton differently: evidence through a mechanistic approach. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*.
- Janse, I., W. E. A. Kardinaal, M. Kamst-van Agterveld, M. Meima, P. M. Visser & G. Zwart, 2005. Contrasting microcystin production and cyanobacterial population dynamics in two *Planktothrix*-dominated freshwater lakes. *Environmental Microbiology* 7:1514-1524.
- Kaebnick, M. & B. A. Neilan, 2001. Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *Fems Microbiology Ecology* 35:1-9.
- Kahm, M., G. Hasenbrink, H. Lichtenberg-Frate, J. Ludwig & M. Kschischo, 2010. grofit: Fitting biological growth curves with R. *Journal of Statistical Software* 33:1-21.
- Kanesaki, Y., I. Suzuki, S. I. Allakhverdiev, K. Mikami & N. Murata, 2002. Salt stress and hyperosmotic stress regulate the expression of different sets of genes in *Synechocystis sp* PCC 6803. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 290:339-348.
- Kardinaal, W. E. A., L. Tonk, I. Janse, S. Hol, P. Slot, J. Huisman & P. M. Visser, 2007. Competition for light between toxic and nontoxic strains of the harmful cyanobacterium *Microcystis*. *Applied and Environmental Microbiology* 73:2939-2946.

- Kirkwood, A. E., J. A. Buchheim, M. A. Buchheim & W. J. Henley, 2008. Cyanobacterial diversity and halotolerance in a variable hypersaline environment. *Microbial Ecology* 55:453-465.
- Komárek, J. & K. Anagnostidis, 2005. Cyanoprokaryota 2. Teil/ 2nd Part: Oscillatoriales. Süßwasserflora von Mitteleuropa 19/2. Elsevier/Spektrum Akademischer Verlag, Munich.
- Kurmayer, R., 2011. The toxic cyanobacterium *Nostoc* sp. strain 152 produces highest amounts of microcystin and nostophycin under stress conditions. *Journal of Phycology* 47:200-207.
- Kurmayer, R., G. Christiansen, J. Fastner & T. Borner, 2004. Abundance of active and inactive microcystin genotypes in populations of the toxic cyanobacterium *Planktothrix* spp. *Environmental Microbiology* 6:831-841.
- Kurmayer, R., G. Christiansen, M. Gumpenberger & J. Fastner, 2005. Genetic identification of microcystin ecotypes in toxic cyanobacteria of the genus *Planktothrix*. *Microbiology-Sgm* 151:1525-1533.
- Ladas, N. P. & G. C. Papageorgiou, 2000. Cell turgor: A critical factor for the proliferation of cyanobacteria at unfavorable salinity. *Photosynthesis Research* 65:155-164.
- Laub, J., P. Henriksen, S. M. Brittain, J. Wang, W. W. Carmichael, K. L. Rinehart & O. Moestrup, 2002. ADMAdda(5) -microcystins in *Planktothrix agardhii* strain PH-123 (cyanobacteria) - Importance for monitoring of microcystins in the environment. *Environmental Toxicology* 17:351-357.
- Leao, P. N., M. Vasconcelos & V. M. Vasconcelos, 2009. Allelopathy in freshwater cyanobacteria. *Critical Reviews in Microbiology* 35:271-282.
- Long, B. M., G. J. Jones & P. T. Orr, 2001. Cellular Microcystin Content in N-Limited *Microcystis aeruginosa* Can Be Predicted from Growth Rate. *Applied and Environmental Microbiology* 67:278-283.
- Luukkainen, R., K. Sivonen, M. Namikoshi, M. Färdig, K. L. Rinehart & S. I. Niemelä, 1993. Isolation and identification of eight microcystins from thirteen *Oscillatoria agardhii* strains and structure of a new microcystin. *Applied and Environmental Microbiology* 59:2204-2209.
- Lyck, S., 2004. Simultaneous changes in cell quotas of microcystin, chlorophyll a, protein and carbohydrate during different growth phases of a batch culture experiment with *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Plankton Research* 26:727-736.
- Mankiewicz-Boczek, J., I. Gagala, M. Kokocinski, T. Jurczak & K. Stefaniak, 2011. Perennial Toxicogenic *Planktothrix agardhii* Bloom in Selected Lakes of Western Poland. *Environmental Toxicology* 26:10-20.
- Mazur-Marzec, H., L. Spooł, J. Kobos, M. Plinski & J. Meriluoto, 2008. Cyanobacterial hepatotoxins, microcystins and nodularins, in fresh and brackish waters of the Pomeranian Province, northern Poland. *Oceanological and Hydrobiological Studies* 37:3-21.
- Mazur-Marzec, H., L. Zeglinska & M. Plinski, 2005. The effect of salinity on the growth, toxin production, and morphology of *Nodularia spumigena* isolated from the Gulf of Gdansk, southern Baltic Sea. *Journal of Applied Phycology* 17:171-179.
- Nagai, T., A. Imai, K. Matsushige & T. Fukushima, 2007. Growth characteristics and growth modeling of *Microcystis aeruginosa* and *Planktothrix agardhii* under iron limitation. *Limnology* 8:261-270.
- Oberhaus, L., M. Gelinas, B. Pinel-Alloul, A. Ghadouani & J. F. Humbert, 2007. Grazing of two toxic *Planktothrix* species by *Daphnia pulex*: potential for bloom control and transfer of microcystins. *Journal of Plankton Research* 29:827-838.
- Oliver, R. & G. Ganf, 2002. Freshwater blooms. In Whitton, B. & M. Potts (eds) *The ecology of cyanobacteria*. Springer Netherlands, 149-194.

- Oren, A., 2007. Diversity of organic osmotic compounds and osmotic adaptation in cyanobacteria and algae. In Seckbach, J. (ed) *Algae and cyanobacteria in extreme environments. Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology*, vol 11. Springer Netherlands, 639-655.
- Orr, P. T. & G. J. Jones, 1998. Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen-limited *Microcystis aeruginosa* cultures. *Limnology and Oceanography* 43:1604-1614.
- Paerl, H. & T. Otten, 2013. Harmful Cyanobacterial Blooms: Causes, Consequences, and Controls. *Microbial Ecology* 65:995-1010.
- Paerl, H. W. & V. J. Paul, 2012. Climate change: Links to global expansion of harmful cyanobacteria. *Water Research* 46:1349-1363.
- Pearson, L., T. Mihali, M. Moffitt, R. Kellmann & B. Neilan, 2010. On the Chemistry, Toxicology and Genetics of the Cyanobacterial Toxins, Microcystin, Nodularin, Saxitoxin and Cylindrospermopsin. *Marine Drugs* 8:1650-1680.
- Poulickova, A., P. Hasler & M. Kitner, 2004. Annual cycle of *Planktothrix agardhii* (Gom.) ANAGN. & KOM. Nature population. *International Review of Hydrobiology* 89:278-288.
- Pouria, S., A. de Andrade, J. Barbosa, R. L. Cavalcanti, V. T. S. Barreto, C. J. Ward, W. Preiser, G. K. Poon, G. H. Neild & G. A. Codd, 1998. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. *Lancet* 352:21-26.
- Prinsloo, J. F. & A. J. H. Pieterse, 1994. Preliminary-observations on the effect of increased concentrations of total dissolved salts on growth and photosynthetic rates in different algal species. *Water Sa* 20:219-222.
- Reed, R. H., S. R. C. Warr, D. L. Richardson, D. J. Moore & W. D. P. Stewart, 1985. Multiphasic osmotic adjustment in a euryhaline cyanobacterium. *Fems Microbiology Letters* 28:225-229.
- Ressom, R., F. San Soong, J. Fitzgerald & L. Turczynowicz, 1994. Health effects of toxic cyanobacteria. In: Servic, A. G. P. (ed). Canberra, 27-69.
- Rippka, R., 1988. Isolation and purification of Cyanobacteria. *Methods in Enzymology* 167:3-27.
- Rojo, C. & M. Alvarez Cobelas, 1994. Population dynamics of *Limnothrix redekei*, *Oscillatoria lanceaeformis*, *Planktothrix agardhii* and *Pseudanabaena limnetica* (cyanobacteria) in a shallow hypertrophic lake (Spain). *Hydrobiologia* 275-276:165-171.
- Romo, S. & M. R. Miracle, 1993. Long-term periodicity of *Planktothrix agardhii*, *Pseudanabaena galeata* and *Geitlerinema sp.* in a shallow hypertrophic lagoon, the Albufera of Valencia (Spain). *Archiv Fur Hydrobiologie* 126:469-486.
- Romo, S. & M. R. Miracle, 1994. Population dynamics and ecology of subdominant phytoplankton species in a shallow hypertrophic lake (Albufera of Valencia, Spain). *Hydrobiologia* 273:37-56.
- Sakamoto, T., T. Yoshida, H. Arima, Y. Hatanaka, Y. Takani & Y. Tamaru, 2009. Accumulation of trehalose in response to desiccation and salt stress in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *Phycological Research* 57:66-73.
- Seckbach, J. & A. Oren, 2007. Oxygenic photosynthetic microorganisms in extreme environments. In Seckbach, J. (ed) *Algae and cyanobacteria in extreme environments. Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology*, vol 11. Springer Netherlands, 3-25.
- Sevilla, E., B. Martin-Luna, L. Vela, M. T. Bes, M. F. Fillat & M. L. Peleato, 2008. Iron availability affects *mcyD* expression and microcystin-LR synthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *Environmental Microbiology* 10:2476-2483.

- Shapiguzov, A., A. A. Lyukevich, S. I. Allakhverdiev, T. V. Sergeyenko, I. Suzuki, N. Murata & D. A. Los, 2005. Osmotic shrinkage of cells of *Synechocystis* sp PCC 6803 by water efflux via aquaporins regulates osmotic stress-inducible gene expression. *Microbiology-Sgm* 151:447-455.
- Sivonen, K., 1990. Effects of light, temperature, nitrate, orthophosphate, and bacteria on growth of and hepatotoxin production by *Oscillatoria agardhii* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 56:2658-2666.
- Sivonen, K. & G. Jones, 1999. Cyanobacterial toxins. In: Chorus, I. & J. Bartram (eds) *Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. WHO edn. E & FN Spon, London and New York, 55-124.
- Song, L., T. Sano, R. Li, M. M. Watanabe, Y. Liu & K. Kaya, 1998. Microcystin production of *Microcystis viridis* (cyanobacteria) under different culture conditions. *Phycological Research* 46:19-23.
- Stal, L. J., 1991. The metabolic versatility of the mat-building cyanobacteria *Microcoleus chthonoplastes* and *Oscillatoria limosa* and its ecological significance *Archiv Fur Hydrobiologie*:453-467.
- Stal, L. J., 2007. Cyanobacteria: Diversity and versatility, clues to life in extreme environments. In Seckbach, J. (ed) *Algae and cyanobacteria in extreme environments. Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology*, vol 11. Springer Netherlands, 659-680.
- Suda, S., M. M. Watanabe, S. Otsuka, A. Mahakahant, W. Yongmanitchai, N. Nopartnaraporn, Y. D. Liu & J. G. Day, 2002. Taxonomic revision of water-bloom-forming species of oscillatorioid cyanobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52:1577-1595.
- Sun, J. & D. Y. Liu, 2003. Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. *Journal of Plankton Research* 25:1331-1346.
- Tonk, L., K. Bosch, P. M. Visser & J. Huisman, 2007. Salt tolerance of the harmful cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Aquatic Microbial Ecology* 46:117-123.
- Tonk, L., D. B. van de Waal, P. Slot, J. Huisman, H. C. P. Matthijs & P. M. Visser, 2008. Amino acid availability determines the ratio of microcystin variants in the cyanobacterium *Planktothrix agardhii*. *Fems Microbiology Ecology* 65:383-390.
- Tonk, L., P. M. Visser, G. Christiansen, E. Dittmann, E. Snelder, C. Wiedner, L. R. Mur & J. Huisman, 2005. The microcystin composition of the cyanobacterium *Planktothrix agardhii* changes toward a more toxic variant with increasing light intensity. *Applied and Environmental Microbiology* 71:5177-5181.
- Vezie, C., J. Rapala, J. Vaitomaa, J. Seitsonen & K. Sivonen, 2002. Effect of nitrogen and phosphorus on growth of toxic and nontoxic *Microcystis* strains and on intracellular microcystin concentrations. *Microbial Ecology* 43:443-454.
- Villena, M. J. & S. Romo, 2003. Phytoplankton changes in a shallow Mediterranean lake (Albufera of Valencia, Spain) after sewage diversion. *Hydrobiologia* 506:281-287.
- Wiedner, C., P. M. Visser, J. Fastner, J. S. Metcalf, G. A. Codd & L. R. Mur, 2003. Effects of Light on the Microcystin Content of *Microcystis* Strain PCC 7806. *Applied and Environmental Microbiology* 69:1475-1481.
- Yepremian, C., M. F. Gugger, E. Briand, A. Catherine, C. Berger, C. Quiblier & C. Bernard, 2007. Microcystin ecotypes in a perennial *Planktothrix agardhii* bloom. *Water Research* 41:4446-4456.
- Zorina, A., K. Mironov, N. Stepanchenko, M. Sinetova, N. Koroban, V. Zinchenko, E. Kupriyanova, S. Allakhverdiev & D. Los, 2011. Regulation systems for stress responses in cyanobacteria. *Russian Journal of Plant Physiology* 58:749-767.

**Figure captions**

**Figure 1** Differences of the 'Brack' growth between salinities.

(A) 'Brack' growth curves under various salinities fitted with the 'grofit' package from the  $abs_{750}$  measurements in function of time. Error bars on growth curves indicate standard deviation (N = 5). (B) Differences between salinities of the growth descriptive parameters determined from growth curves fitted by the 'grofit' model.

**Figure 2** LC-ESI-MS determination of the individual MC-variants detected in the 'Brack' strain.

(A) Extracted ion chromatograms including the intensity (counts – Y-axis) and the retention time (in min –X-axis) of each MC- variants. (B) Identification of MC-variant corresponding to ions present on the mass spectra (m/z). The range of retention time and the proportion for each MC-variant were also included in the table.

**Figure 3** Means of total MC concentrations ( $\mu\text{g.l}^{-1}$ ) in the 'Brack' populations in function of time.

Error bars indicate standard deviation (N=12). The different letters above means (a, b, c) indicate significant differences in MC concentrations over time ( $p < 0.05$ , Kruskal Wallis).

**Figure 4** Means of the 'Brack' MC quota ( $\mu\text{g}/\mu\text{m}^3$ ) in salinities ranging from 0 to  $7.5 \text{ g.l}^{-1}$  in function of time.

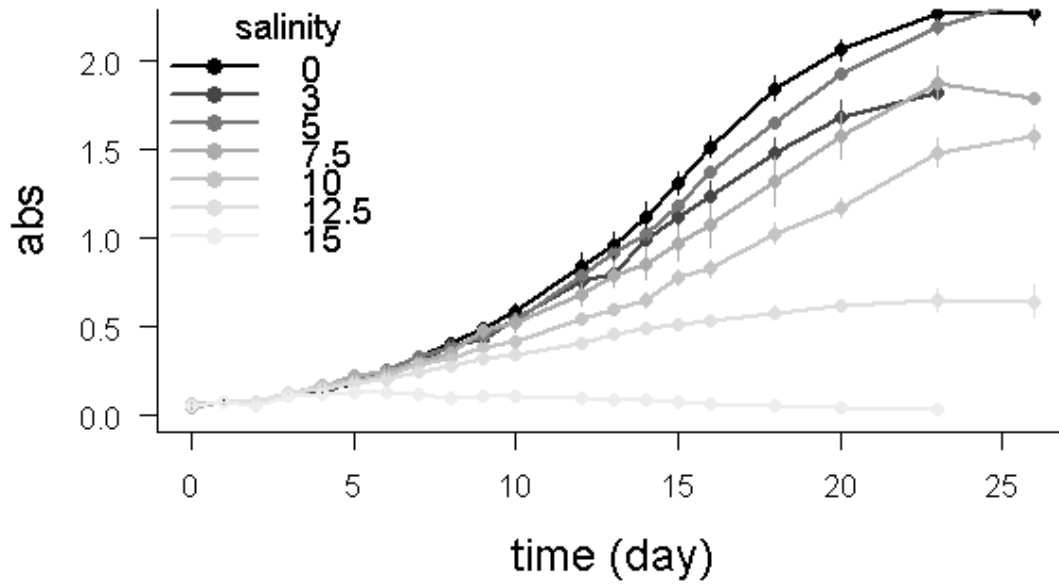
The different letters above means (a, b, c) indicate significant differences in MC quota over time ( $p < 0.05$ , Kruskal Wallis).

**Figure 5** Correlation between the 'Brack' MC quota ( $\mu\text{g}/\mu\text{m}^3$ ) and the biomass ( $\text{chl}_a$  in  $\text{mg.l}^{-1}$ ) of the various experimental populations in salinities ranging from 0 to  $7.5 \text{ g.l}^{-1}$  (n=36).

The logarithmic pattern was added with the "stat\_smooth" function (ggplot2 package).

**Figure 6** Growth rates and MC production rates during the lag, the acceleration and the exponential growth phase of 'Brack' populations according to salinity.

Figure 1  
(A)

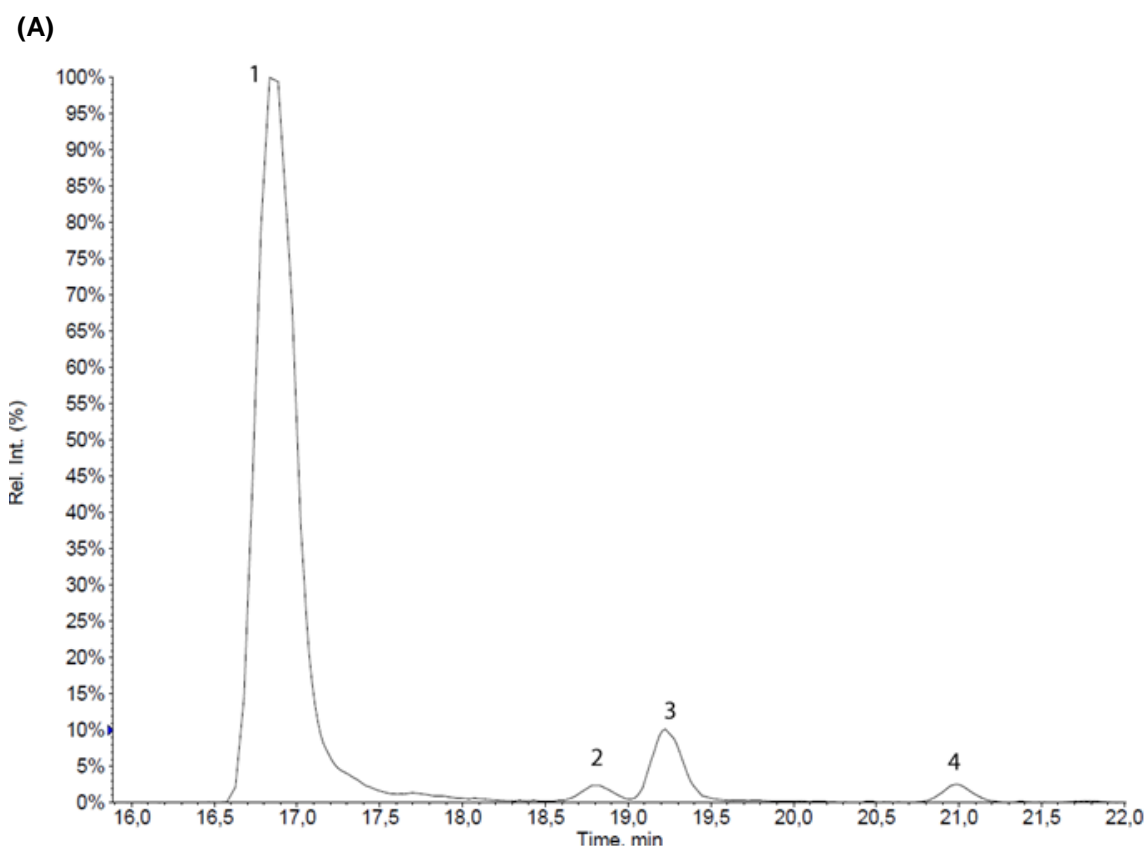


(B)

Salinity (g.l <sup>-1</sup> )	Growth rate (d <sup>-1</sup> )			Maximal density			Whole growth		
0	0,25	±0,05	<b>a</b>	2,4	±0,1	<b>a</b>	25	±7	<b>a</b>
3	0,19	±0,02	<b>a</b>	2,3	±0,4	<b>b</b>	21	±3	<b>ab</b>
5	0,20	±0,01	<b>a</b>	2,6	±0,2	<b>a</b>	25	±3	<b>a</b>
7.5	0,15	±0,02	<b>ab</b>	2,3	±0,5	<b>b</b>	18	±1	<b>b</b>
10	0,12	±0,02	<b>ab</b>	2,2	±0,6	<b>bc</b>	18	±2	<b>b</b>
12.5	0,05	±0,01	<b>b</b>	0,9	±0,6	<b>c</b>	10	±2	<b>c</b>

Values with different letters (a, b, c) are significantly different between salinities ( $p < 0.05$ , one-way ANOVA, Tukey's post-hoc test)

Figure 2



(B)

Peak	m/z	MH <sup>+</sup>	rTmin – rTmax in minutes	MC variants	Proportion (%) of MC variants*
1	512,8	1024,6	16,7 – 17,1	[Asp <sup>3</sup> ]MC-RR	83
2	523,3	1045,6	18,6 – 18,9	[Asp <sup>3</sup> ]MC-HtyR	2
3	491,3	981,6	18,9-19,4	[Asp <sup>3</sup> ]MC-LR	10
3	502,2	1003,4	19 – 19,4	Undetermined MC	1
4	516,2	1031,4	20,8 – 21,2	DeMC-YR ou [Asp <sup>3</sup> , Dha <sup>7</sup> ]MC-HtyR	4

\* Obtained under optimal conditions.

Microcystins were quantified using [Asp<sup>3</sup>] MC-RR (Alexis Corporation) standards.

Figure 3

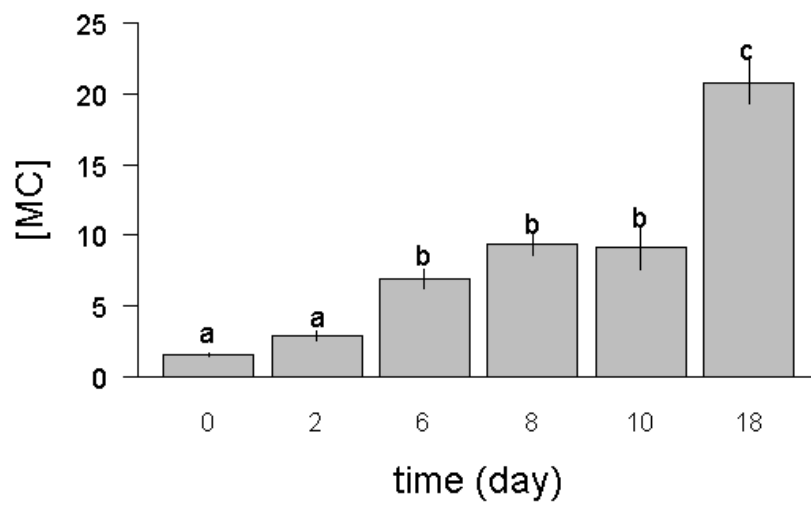


Figure 4

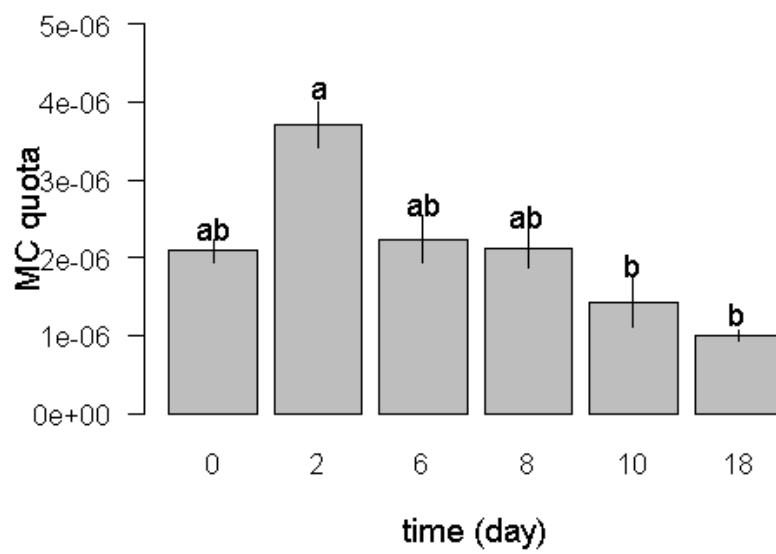




Figure 5

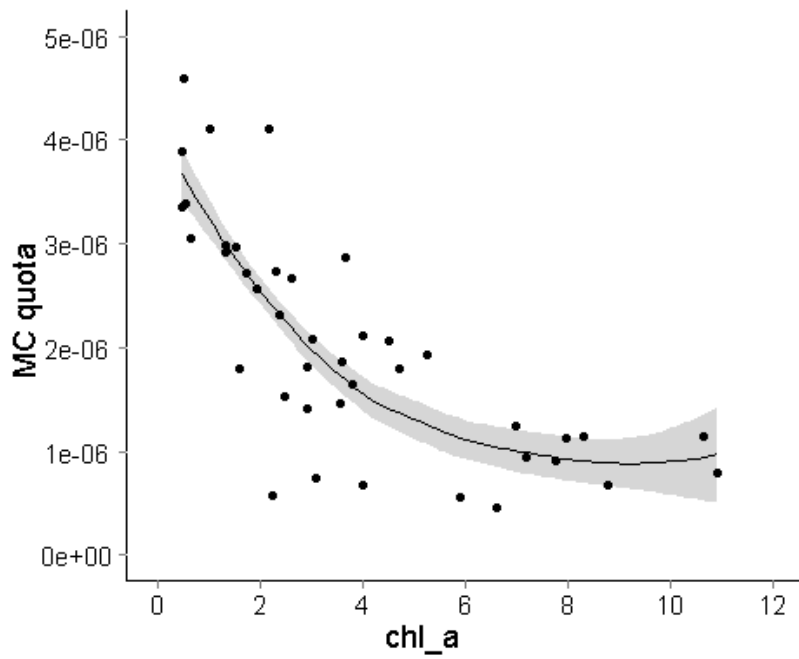
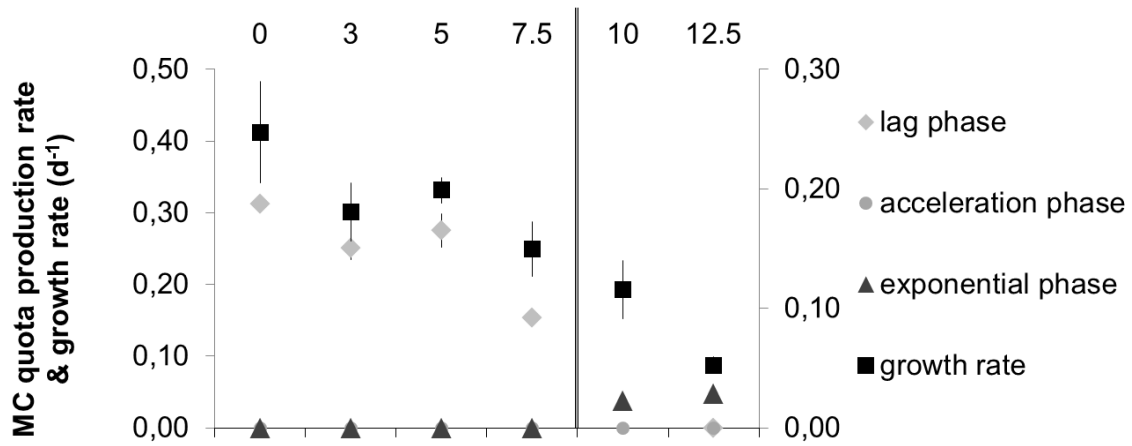


Figure 6









## CHAPITRE III

Quels sont les effets d'un stress halin sur le devenir  
de la cyanobactérie dominante *Planktothrix*  
*agardhii* dans un étang méditerranéen eutrophe



## A. INTRODUCTION

Le changement climatique global et l'eutrophisation accélérée des milieux exposent les écosystèmes du monde entier à un stress environnemental croissant [Huertas, *et al.* 2011]. L'augmentation des températures, de la fréquence des raz de marée, du niveau de la mer et la modification des précipitations, risquent notamment d'affecter les milieux côtiers [IPCC 2007]. Les répercussions sont susceptibles d'être particulièrement importantes sur les milieux aquatiques côtiers, la température et la salinité constituant un stress pour les communautés aquatiques [Floder, *et al.* 2010].

Les milieux lagunaires, de par leur position stratégique, sont généralement le lieu d'une forte anthropisation, et sont donc particulièrement affectés par l'eutrophisation. Par conséquent, ces milieux sont régulièrement le siège d'importantes proliférations phytoplanctoniques [Håkanson & Bryhn 2008; Paerl, *et al.* 2003]. Les milieux lagunaires sont soumis à des variations de salinité dépendantes des échanges hydriques avec la mer et leur bassin versant [Redden & Rukminasari 2008]. Le compartiment biotique de ces milieux est constitué d'une communauté peu diversifiée d'espèces d'eaux saumâtres [Barnes 1980; Floder, *et al.* 2010].

La salinité est un des principaux facteurs discriminants du peuplement phytoplanctonique des milieux saumâtres [Day, *et al.* 2012; Redden & Rukminasari 2008; Ryan, *et al.* 2008]. Les différences de tolérance à la salinité des espèces phytoplanctoniques participent à la structuration de la communauté [Kirst 1990]. Les limites de tolérance et les optima halins sont spécifiques à chaque espèce. Cependant, ces limites et optima dépendent également de l'adaptation des populations à leur environnement [Kirst 1990]. Les populations phytoplanctoniques ont développé des stratégies adaptatives morphologiques et physiologiques pour survivre dans différents environnements, notamment dans des milieux subissant des variations de salinité [Kirst 1990; Margalef 1978; Reynolds 1998]. Les cyanobactéries, en particulier, ont développé des stratégies afin de s'adapter à la salinité de leur environnement [Hagemann 2011].

*Planktothrix agardhii*, une des principales cyanobactéries à l'origine d'importantes efflorescences, et dominant le peuplement phytoplanctonique de nombreux milieux aquatiques eutrophisés [Bonilla, *et al.* 2012; Fastner, *et al.* 1999a; Mur, *et al.* 1999], apparaît aussi

performante en milieu saumâtre qu'en milieu dulçaquicole (Chap. I). Plusieurs études recensant la présence de l'espèce en milieu saumâtre (**Table 1**) laissent apparaître la capacité de *Planktothrix agardhii* à s'acclimater et/ou s'adapter à la salinité de son environnement.

Il a été établi expérimentalement une gamme d'halotolérance de *Planktothrix agardhii* plus large lorsque l'espèce vit dans une eau saumâtre : Elle s'étend jusqu'à 12.5/15 g.l<sup>-1</sup> dans un milieu de salinité moyenne annuelle de 3 g.l<sup>-1</sup> (Chap II), tandis que la limite d'halotolérance de souches isolées d'eaux douces a été fixée à 7.8 g.l<sup>-1</sup> [Suda, *et al.* 2002]. *In situ*, l'étude de Chomérat *et al.* [2007] démontrent le succès de l'espèce en milieu lagunaire, et ce, dans une salinité variant de façon saisonnière entre 4 et 11 g.l<sup>-1</sup>.

L'étang de Bolmon, une lagune mésohaline hypereutrophe du sud de la France, est le lieu d'efflorescences de *Planktothrix agardhii* depuis plusieurs années [Chomerat, *et al.* 2007]. En effet, l'étang constitue un environnement aux conditions particulièrement propices au développement de l'espèce *Planktothrix agardhii* (autoécologie de *Planktothrix agardhii* décrite dans l'étude menée au chapitre 1).

Une modification de gestion des rejets d'eaux douces de l'usine hydro-électrique EDF de Saint-Chamas située sur le pourtour de l'étang de Berre (étang adjacent à l'étang de Bolmon), a provoqué une augmentation abrupte de la salinité dans l'étang de Bolmon. La salinité de l'étang a atteint un niveau polyhalin durant plusieurs saisons, avant de retourner à un niveau oligo-mésohalin. D'une manière générale, une variabilité modérée de salinité ne change pas les dominances hiérarchiques des espèces [Redden & Rukminasari 2008; Reynolds 1995]. Cependant, la grande variation d'un paramètre environnemental altère la succession et désorganise les communautés [Reynolds 1995]; elle va provoquer la diminution de l'abondance des espèces sensibles, phénomène compensé par l'augmentation de l'abondance d'espèces moins sensibles devenant plus compétitives [Jochimsen, *et al.* 2013].

Reynolds *et al.* [2002] ont défini plusieurs groupes fonctionnels phytoplanctoniques susceptibles de dominer ou co-dominer dans un environnement donné. Ces groupes polyphylétiques étant fondés sur des traits adaptatifs physiologiques, morphologiques et écologiques, ils reflètent le mieux la réponse d'une communauté phytoplanctonique aux conditions environnementales [Kruk, *et al.* 2002; Nabout 2006; Reynolds, *et al.* 2002]. 38



assemblages phytoplanctoniques (appelés codons) sont définis à ce jour, selon les sensibilités et les tolérances des espèces constitutives [Padisak, *et al.* 2009].

Récemment, Padisák *et al.* [2006] ont élaboré un indice d'assemblage phytoplanctonique combinant le poids de la biomasse des groupes fonctionnels en présence et un facteur associé à chaque assemblage défini selon le type d'écosystème [Padisák, *et al.* 2006]. Cet indice constitue un outil intéressant pour estimer l'évolution du statut écologique des écosystèmes aquatiques indépendamment de la localisation géographique.

Les études pronostiquent généralement l'abondance de groupes fonctionnels dominants en fonction d'un gradient de facteur abiotique [Huisman, *et al.* 2004; Stomp, *et al.* 2007; Tilman 1977]. Cependant, peu d'études caractérisent le peuplement phytoplanctonique observé après la variation subite d'un paramètre environnemental.

L'augmentation de la salinité de l'étang de Bolmon fournit l'opportunité de caractériser l'effet d'un changement de classe haline sur les populations de *Planktothrix agardhii* et les assemblages d'espèces phytoplanctoniques en utilisant une approche structurale et fonctionnelle.

En premier lieu, on s'assurera que le contexte abiotique de l'étang de Bolmon ou la salinité a augmenté de façon significative constitue un milieu d'étude à ciel ouvert dans lequel on pourra valider les hypothèses suivantes :

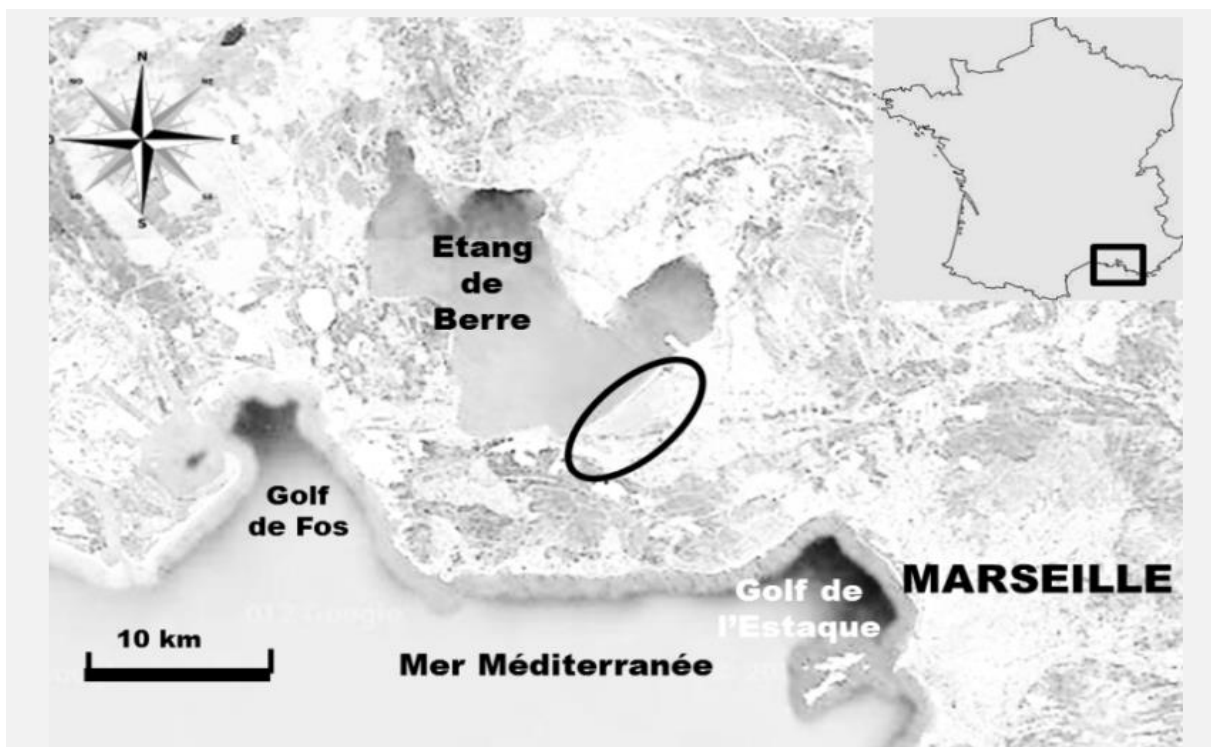
- i) Le stress halin va induire des modifications structurales à l'échelle du phytoplancton et des populations de *Planktothrix agardhii*;
- ii) Le stress halin va induire des modifications fonctionnelles à l'échelle de la communauté phytoplanctonique
- iii) Les populations de *Planktothrix agardhii* acclimatées à un environnement saumâtre peuvent décaler leur optimum et élargir leur valence écologique vis-à-vis du paramètre salinité. Cette hypothèse va permettre d'étayer et de corroborer les résultats expérimentaux.

Afin de répondre aux hypothèses posées, l'étude de la dynamique saisonnière du phytoplancton et des populations de *Planktothrix agardhii* de l'étang de Bolmon a été réalisée selon une approche structurale et fonctionnelle avant, pendant et après la hausse de salinité.

## B. MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1. Etang de Bolmon : site de validation

L'étang de Bolmon est une lagune située sur les communes de Marignane et Châteauneuf-les-Martigues, à environ 20 km à l'ouest de Marseille (43° 25' N, 5° 10' E) (**Figure 1**).

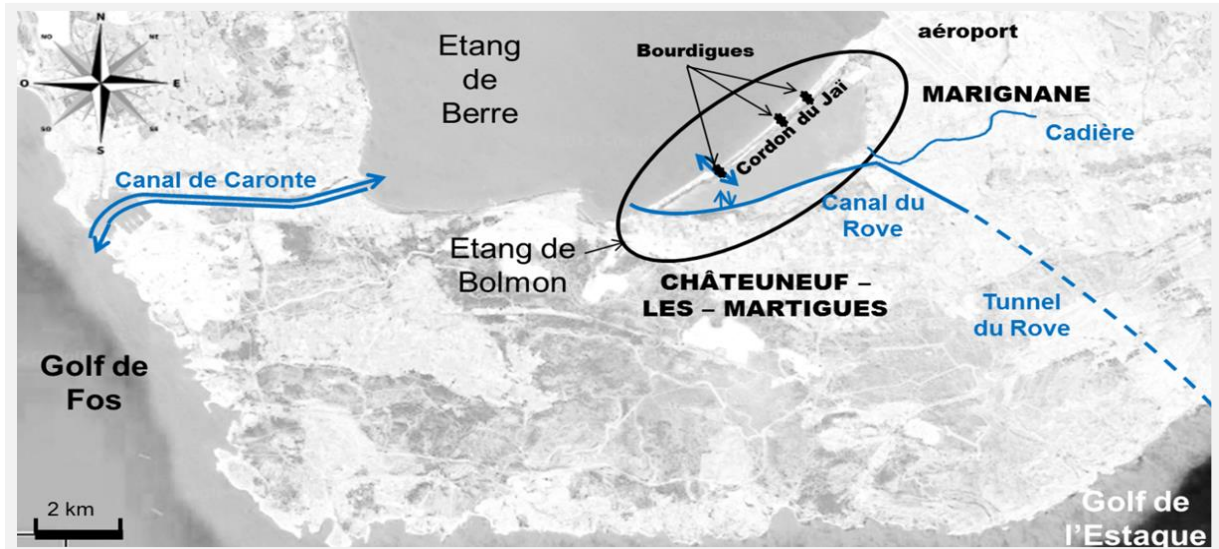


**Figure 1** Localisation de l'étang de Bolmon.

L'étang (encadré en noir) est un sous bassin de l'Etang de Berre, il est situé à 20 km au nord-ouest de Marseille (France)

L'étang de Bolmon est une zone d'intérêt écologique ; il est classé en ZNIEFF et en site Natura 2000. L'étang est soumis à de fortes pressions anthropiques et est le réceptacle d'eaux de ruissellement susceptibles d'emmener les eaux de lessivage de la décharge de Marignane ainsi que les polluants des sites industriels situés sur le pourtour de l'étang. De plus, son affluent, la Cadière, est riche en éléments nutritifs. Depuis plusieurs années l'étang présente un état écologique très dégradé, et depuis 2000 il est fermé aux activités de pêche et de baignade. La restauration de l'étang de Bolmon est un des objectifs programmés par le Conservatoire du littoral et son gestionnaire (SIBOJAI).

L'étang est un sous-bassin de l'Etang de Berre dont il a été séparé par l'émersion d'un haut fond il y a 21 siècles. L'accumulation de matériel sédimentaire sous l'action du vent dominant, suivie d'un abaissement du niveau de l'eau de l'étang de Berre, auraient induit l'apparition de ce cordon littoral, le Jaï, qui sépare actuellement l'étang de Bolmon de l'étang de Berre (**Figure 2**).



**Figure 2** Localisation de l'hydrosystème Rove - Etang de Berre - Etang de Bolmon et de leurs connexions hydriques.

Les sens des échanges hydriques sont indiqués par des flèches. Des points noirs figurent les bourdigues ; la double flèche indique la seule bourdigue ouverte lors de la période d'étude (bourdigue de Châteauneuf). Le cheminement de la Cadière est indiqué par un tracé bleu. Le tunnel du Rove, prolongement du canal du Rove, est dessiné en pointillés.

L'étang de Bolmon est un étang saumâtre de 578 ha. La longueur du grand axe de l'étang est de 5.5 km, la largeur maximale, au niveau de l'embouchure de la Cadière est de 1.7 km ; sa profondeur maximale est de 2.2 mètres. L'étang de Bolmon communique indirectement avec l'étang de Berre, via deux fenêtres dans la digue du canal du Rove qui longe la rive sud de l'étang de Bolmon sur 3 km (**Figure 2**). Le canal du Rove, long de 7 km, est souterrain dans sa presque totalité (tunnel du Rove). Le tunnel a été construit en 1926 afin de relier l'étang de Berre à la rade de Marseille en passant sous la chaîne de l'Estaque. En 1963, un éboulement de la voûte du tunnel a obstrué le canal et empêche depuis lors tout échange avec l'eau de mer. L'étang de Bolmon communique également avec l'Etang de Berre via 3 bourdigues (chenaux) creusées à travers le cordon du Jaï : Du nord au sud, la Petite Bourdigue, la Grande Bourdigue et la Bourdigue de Châteauneuf. Seule la bourdigue de Châteauneuf permet les échanges avec l'étang de Bolmon, les deux autres étant comblées par l'accumulation de matériel provenant de

l'érosion naturelle du Jaï. La bourdigue de Châteauneuf étant canalisée, elle ne subit pas d'ensablement trop important. Les échanges entre les deux étangs ont lieu dans les 2 sens selon les vents, la marée, les précipitations. Des échanges entre l'étang de Bolmon et l'étang de Berre ont également lieu à travers le Jaï, permis par la nature perméable de ce lido sableux. Toutes ces connexions sont des lieux d'échange d'eaux saumâtres, l'étang de Berre étant connecté avec la mer via le canal de Caronte. Les seuls apports en eau douce de l'étang de Bolmon proviennent, outre les eaux du ruissellement du bassin versant, de la Cadière, une rivière de 12 km de long dont la moyenne annuelle du débit est de  $0.80 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ .

L'étang de Bolmon étant une lagune mesohaline secondaire, étant indirectement relié à la mer Méditerranée. Il ne subit donc pas de changement abrupt de salinité provoqué par une entrée d'eau de mer et les marées affectent peu la salinité de l'étang. Les fluctuations de salinité de l'étang de Bolmon sont majoritairement expliquées par les conditions climatiques typiques du climat Méditerranéen. Cependant, des variations de salinité sortant du domaine de fluctuations saisonnières (de  $11 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  en été à  $4 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  en automne) peuvent également avoir lieu dans l'étang de Bolmon en raison de sa connexion avec l'étang de Berre qui subit de grandes variations de salinité provoquées par des rejets d'eaux douces provenant d'une usine hydro-électrique EDF installé au bord de l'étang de Berre depuis 1966 (**Figure 3**).

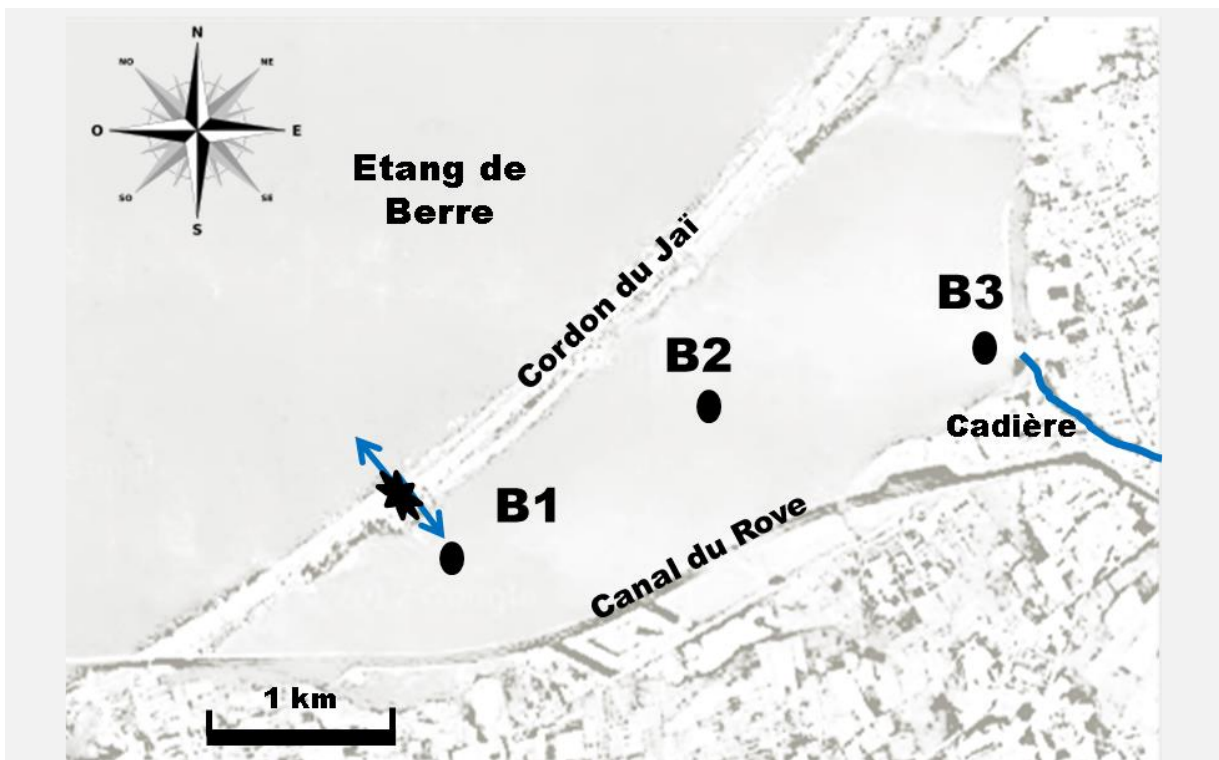


Des plans de gestion visant à réduire et lisser les rejets des limons et d'eaux douces de l'usine sont régulièrement mis en œuvre (1966 à 1993 : rejet de 3,3 milliards de  $\text{m}^3/\text{an}$  d'eau douce et 520 000 tonnes/an de sédiments ; 1993-1995 : Plan Barnier, réduction du rejet à 2.7 puis 2.1

milliards de m<sup>3</sup>/an d'eau douce ; etc. (Pour plus d'informations, cf. ([www.etangdeberre.org/](http://www.etangdeberre.org/))). Sous l'effet du vent dominant (le mistral), les variations de salinités de l'Etang de Berre sont susceptibles de se repercuter dans l'étang de Bolmon, expliquant la variation particulièrement brutale de salinité durant l'année 2007, à l'origine de l'étude réalisée dans ce manuscrit.

## 2. Stratégie d'échantillonnage

Trois stations de l'étang de Bolmon ont été échantillonnées mensuellement en sub-surface de février 2009 à octobre 2010. Les stations échantillonnées ont été choisies selon les connexions de l'étang avec son environnement (**Figure 4**).



**Figure 4** Localisation des stations échantillonnées de l'étang de Bolmon.

La bourdigue 'ouverte' est indiquée par des flèches. L'arrivée de la Cadière est tracée en bleu. Les stations indiquées en gris n'ont été que partiellement traitées dans ce chapitre.

La station B1 est située face à la bourdigue de Châteauneuf-les-Martigues, la seule des trois bourdigues à être restée ouverte durant la période d'étude. La station B2, située au centre de l'étang, constitue la station de référence car elle est représentative de la composition dominante de l'étang (cf. [Chomerat 2005]). La station B3 est localisée à l'embouchure de la Cadière.

### 3. Base de données environnementales et phytoplanctoniques

L'étude utilise les données des années 2006, 2007, 2009 et 2010. Les données environnementales et phytoplanctoniques des années 2006 et 2007 ont été récoltées par Fayolle S.

Les paramètres environnementaux mesurés sur le terrain (température de l'eau, conductivité, salinité, concentration et saturation en oxygène, transparence de l'eau, turbidité) et en laboratoire (pH, matières en suspension, concentrations en sulfate, orthophosphate, et composés azotés) ont été déterminés suivant la méthode indiquée dans le chapitre 1 (p. 52).

La détermination des espèces et le dénombrement cellulaire des espèces ont été réalisés de la même façon que lors de l'étude traitée au chapitre 1 (p. 54).

Les différentes espèces phytoplanctoniques ont été regroupées au sein des groupes fonctionnels, selon l'étude de Reynolds *et al.* [2002], révisée par Padisák *et al.* [2009] ; et au sein des groupes morphologiques selon l'étude de Kruk *et al.* [2010] (cf. résultats, [Table 1](#)).

L'indice d'assemblage phytoplanctonique Q défini par Padisák *et al.* [2006] a été estimé durant les quatre années de l'étude développé afin d'évaluer le statut écologique d'un lac à partir des proportions relatives des groupes fonctionnels et d'un facteur F établi pour chaque groupe fonctionnel selon le type de lac étudié. Bien que l'application de l'indice Q sur l'étang de Bolmon soit soumise à réserves (le milieu étant lagunaire), l'indice Q de l'étang de Bolmon a pu être estimé à partir du modèle d'un des lacs étudiés par Padisák *et al.* [2006] qui présente des caractéristiques similaires à celles de l'étang de Bolmon (peu profond (<1m), fluctuations du niveau de l'eau, eau saumâtre avec des variations de salinité).

### 4. Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques, ainsi que la majorité des graphiques, ont été réalisées dans l'environnement R (version 2.15.1) avec l'interface Rstudio (v0.96).

Les différences entre les échantillons ont été testées par des ANOVA ou des tests non paramétriques de Kruskal-Wallis (package « *pgirmess* ») lorsque la normalité et/ou l'homoscédasticité n'étaient pas vérifiées. Les tests post-hoc de Tukey et les comparaisons

multiples par paires (méthode de Dunn) ont été utilisés pour visualiser les différences significatives.

L'indice d'Equitabilité a été calculé, à partir de l'indice de Shannon, avec le package «Vegan».

L'Analyse en Composantes principales (ACP) et l'analyse factorielle des correspondances (AFC) ont été réalisées à l'aide du package « ade4 ».

Le facteur de corrélation de Pearson a été utilisé pour tester la relation linéaire entre deux variables. Les régressions non linéaires ont été déterminées à l'aide du package « ggplot2 ».

## C. RESULTATS

## 1. Modification des paramètres environnementaux

## 1.1. Variation de la salinité moyenne de l'étang de Bolmon

La salinité moyenne dans l'étang de Bolmon varie entre  $1.8 (\pm 1.2)$  et  $18 (\pm 0.5)$  g.l<sup>-1</sup> au cours des 4 ans de l'étude (**Figure 5**). La salinité varie entre 4.2 et 9.1 g.l<sup>-1</sup> de l'hiver 2005 à l'hiver 2006 (milieu  $\beta$  mesohalin), et augmente subitement durant le printemps 2007 (milieu  $\alpha$  mesohalin) pour atteindre une salinité moyenne maximale de 18 g.l<sup>-1</sup> en été 2007. Ce niveau de salinité se maintient durant l'automne et l'hiver 2007 (milieu polyhalin). En hiver 2008, la salinité moyenne atteint le minimum mesuré durant les 4 ans de l'étude, 1.8 g.l<sup>-1</sup>. Le milieu reste alors oligohalin (la salinité varie entre 2.3 et 4.8 g.l<sup>-1</sup>) du printemps 2009 au printemps 2010. La salinité augmente à nouveau en été 2010 (6.2 g.l<sup>-1</sup>) puis en automne 2010 (9.6 g.l<sup>-1</sup>) à un niveau similaire à celui observé juste avant le pic de salinité de 2007.

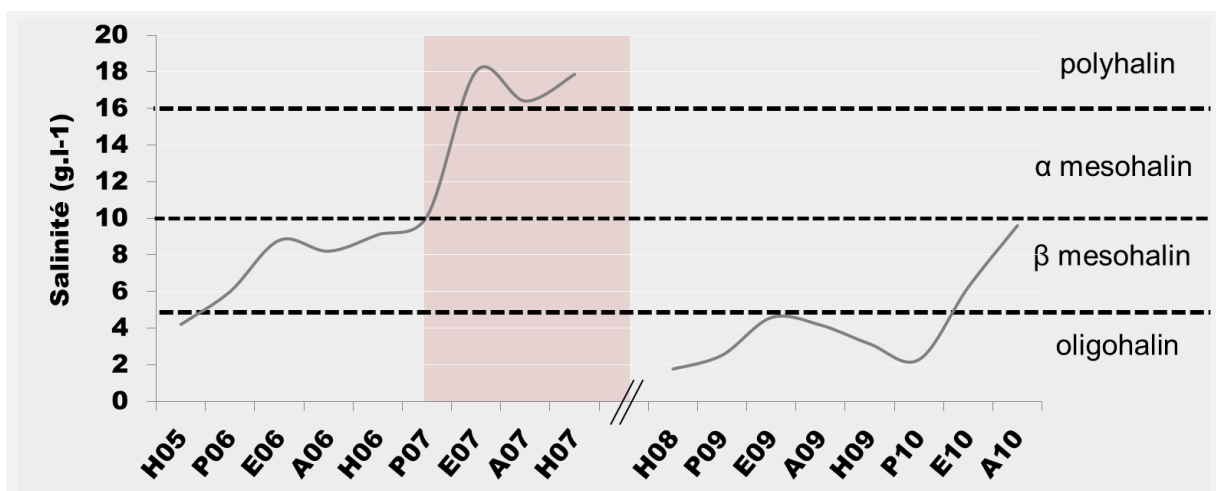


Figure 5 Variations de la salinité moyenne saisonnière de l'Etang de Bolmon de l'hiver 2005 (H05) à l'hiver 2007 (H07) et de l'hiver 2008 (H08) à l'automne 2010 (A10).

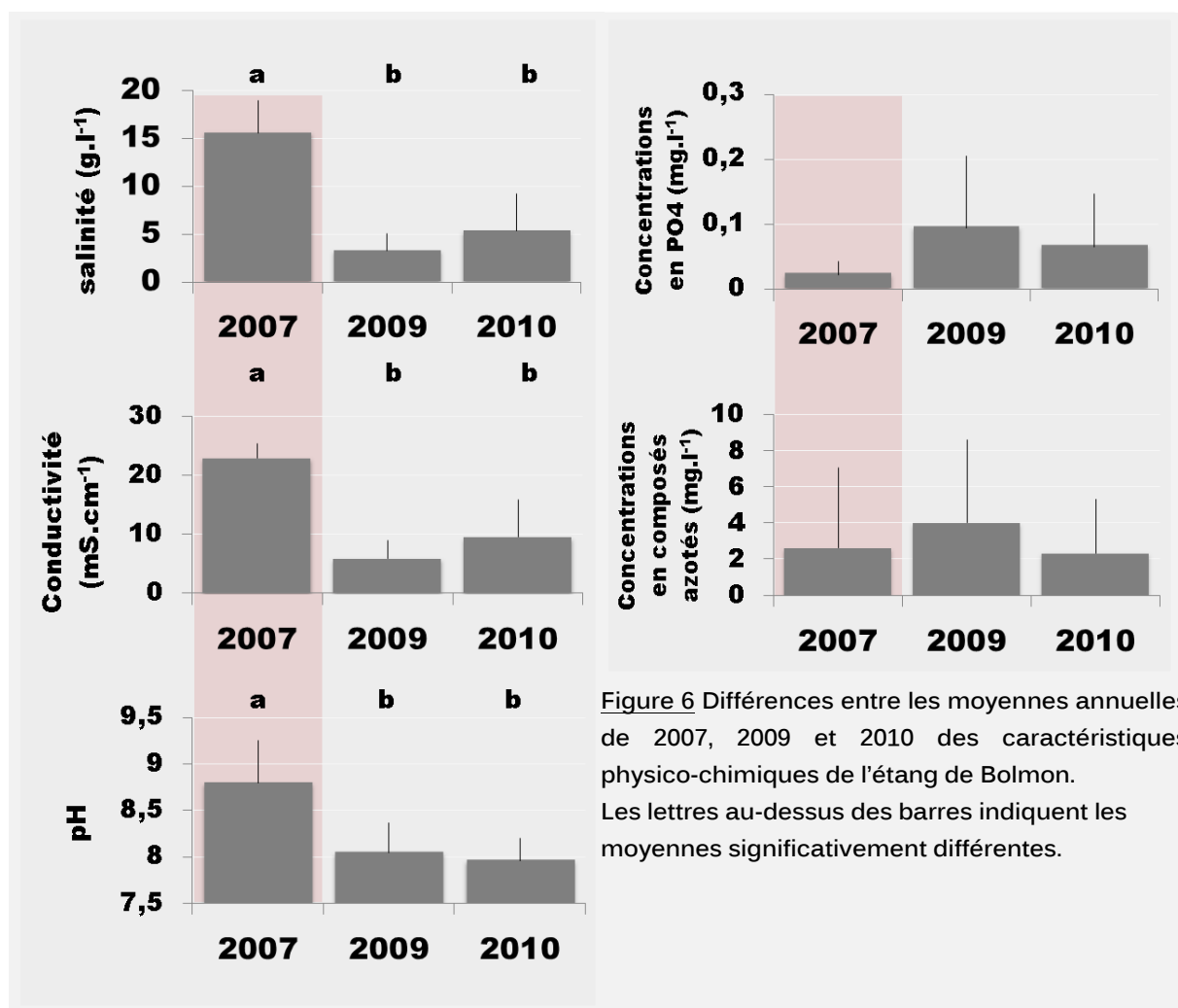
Les différentes catégories halines de l'étang de Bolmon sont indiquées [Por 1972]

## 1.2. Variation des paramètres environnementaux

La salinité, la conductivité et le pH sont significativement plus élevés durant l'année 2007 que durant les années 2009 et 2010 ( $p > 0.05$ ,  $n=36$ , test de Kruskal-Wallis) (**Figure 6**). Les concentrations en composés azotés et en phosphate sont en moyennes équivalentes en 2007,



2009 et 2010 ( $p > 0.05$ ,  $n=36$ , test de Kruskal-Wallis). L'étang de Bolmon est eutrophe en 2007, hypereutrophe en 2009 et eutrophe en 2010 selon les concentrations en phosphate ; il est hypereutrophe du point de vue des composés azotés en 2007, 2009 et 2010 [Wetzel 1983].



Une analyse en composante principale (ACP) a été réalisée à partir des paramètres environnementaux mesurés aux points B1, B2 et B3 durant 2007, 2009 et 2010 (Figure 7). Le premier axe de l'ACP explique 48.5 % de l'inertie de l'analyse. La salinité, la conductivité et le pH sont fortement corrélées avec le premier axe de l'ACP, ces paramètres expliquent majoritairement la différence entre les campagnes d'échantillonnage réalisées en 2007, caractérisées par une salinité élevée, et les campagnes réalisées durant 2009 et 2010 marquées par une plus faible salinité. Le deuxième axe de l'ACP, qui explique 26.8 % de l'analyse, représente un gradient de température ; il différencie les stations échantillonnées en hiver des campagnes réalisées en été.

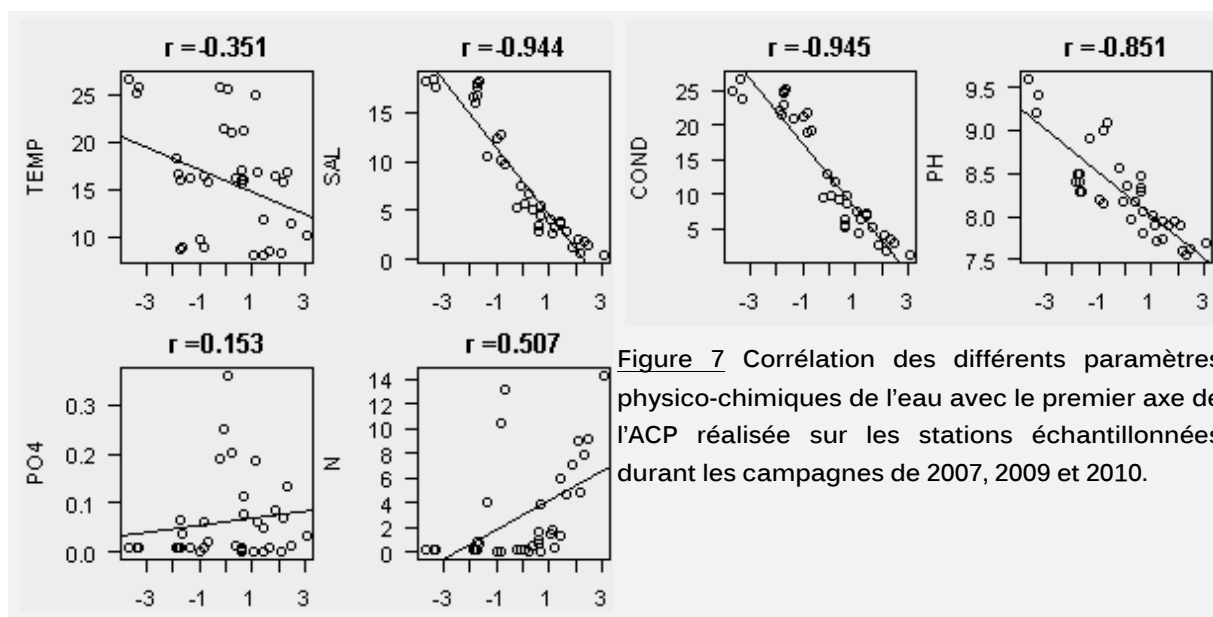


Figure 7 Corrélation des différents paramètres physico-chimiques de l'eau avec le premier axe de l'ACP réalisée sur les stations échantillonnées durant les campagnes de 2007, 2009 et 2010.

## 2. Modifications de la dynamique saisonnière phytoplanctonique

### 2.1. D'un point de vue structural

La richesse spécifique phytoplanctonique varie de 10 espèces par litre d'eau en automne et hiver 2007, à 36 espèces en hiver 2009. Elle est en moyenne de 20 espèces ( $\pm 5$ ) en 2006, avec un maximum en été et en automne, alors que la salinité varie entre 4 et 9  $\text{g.l}^{-1}$  (**Figure 8A**). La richesse spécifique diminue ensuite de façon significative alors que les salinités sont maximales et atteint un minimum en automne et en hiver 2007 (10 espèces). Le nombre de taxons augmente progressivement en 2009 puis se stabilise jusqu'à l'été 2010 à un niveau supérieur à celui observé avant l'augmentation de la salinité ( $33 \pm 9$  espèces).

L'indice d'équitabilité (IE) est significativement le plus faible avant l'augmentation de la salinité (de l'hiver 2005 à l'hiver 2006) tandis que la richesse spécifique est élevée. L'IE augmente ensuite subitement au printemps 2007 alors que la richesse spécifique diminue (**Figure 8B**). En 2009 et 2010, alors que la salinité retourne à un niveau similaire à celui observé avant la hausse de salinité de 2007, l'IE reste similaire à celui observé durant la hausse de salinité tandis que la richesse spécifique augmente.

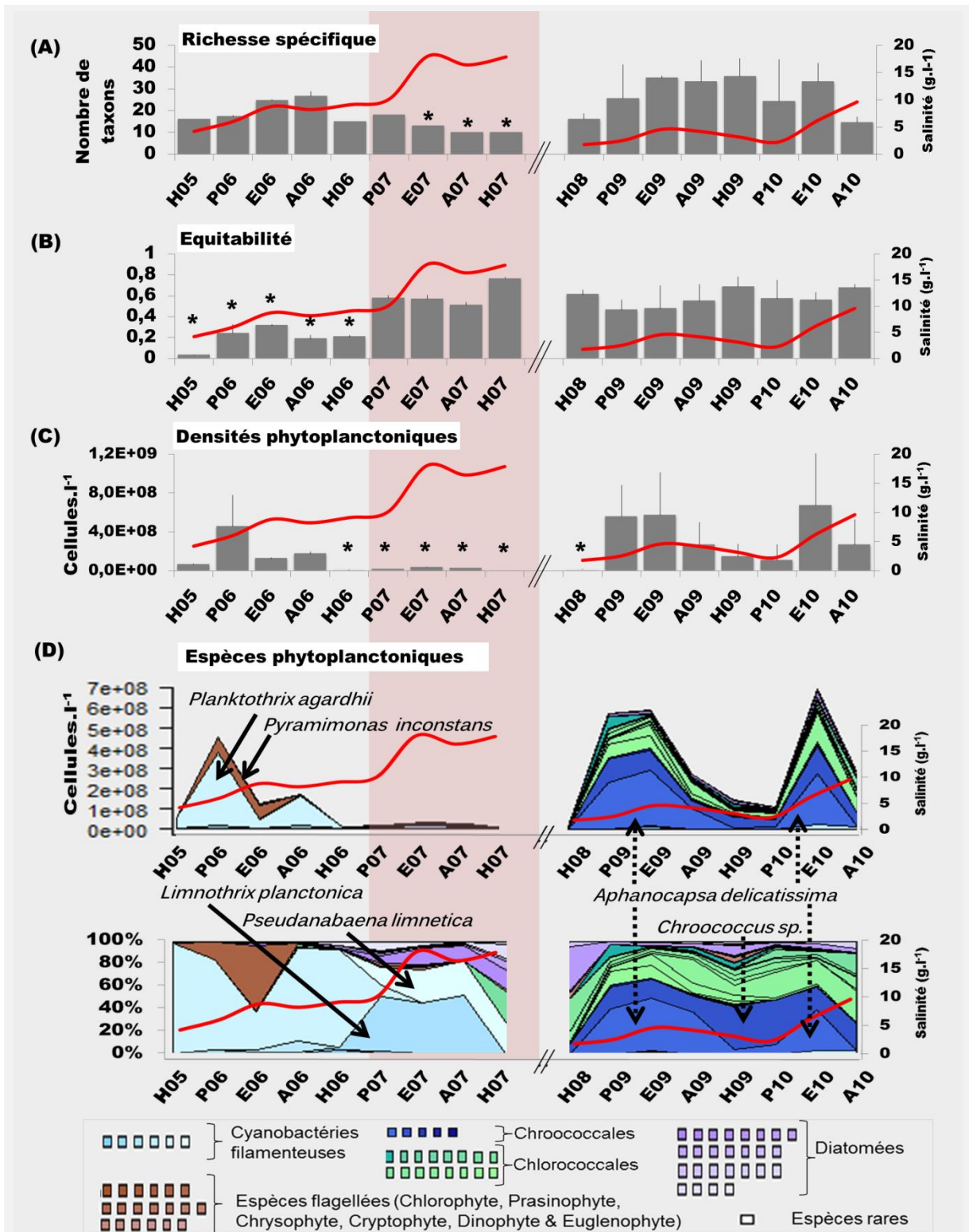


Figure 8 Modification de la dynamique saisonnière du phytoplancton d'un point de vue structural parallèlement aux variations de salinité observées de l'hiver 2005 à l'automne 2010.

A) Richesse spécifique ; (B) Indices d'équitabilité ; (C) Densités phytoplanctoniques ; (D) Abondance et proportions d'abondance des différentes espèces phytoplanctoniques.

Les '\*' indiquent les moyennes significativement différentes ( $p < 0.05$ ,  $n = 36$ , ANOVA).

La densité phytoplanctonique totale varie entre  $2.9 \times 10^6$  cell.l<sup>-1</sup> en hiver 2007 et  $7.7 \times 10^8$  cell.l<sup>-1</sup> en été 2010 (**Figure 8C**). La densité est en moyenne de  $1.2 \pm 0.6 \times 10^8$  cell.l<sup>-1</sup> de l'hiver 2005 à l'automne 2006 avec un maximum au printemps. Elle diminue jusqu'à être 7 fois plus faible en hiver 2006 et se maintient à ce niveau jusqu'en hiver 2007 ( $1.7 \pm 1.2 \times 10^7$  cell.l<sup>-1</sup>). La densité reste à un niveau similaire en hiver 2008 puis augmente durant 2009 et 2010 à un niveau plus élevé que la période précédant l'augmentation de la salinité ( $3.7 \pm 2.3 \times 10^8$  cell.l<sup>-1</sup>). Les densités phytoplanctoniques sont maximales durant les étés 2009 et 2010.

74 espèces phytoplanctoniques communes et accessoires sont recensées de l'hiver 2005 à l'hiver 2010 (**Table 1**). Les diatomées, les chlorophytes et les cyanobactéries constituent 95% du peuplement phytoplanctonique de l'étang de Bolmon durant les quatre années de l'étude (**Figure 8D**). Les espèces de l'ordre des Oscillatoriales sont dominantes ( $87 \pm 9\%$ ) de l'hiver 2005 à l'automne 2007. L'espèce *Planktothrix agardhii* domine le peuplement jusqu'en hiver 2006 ( $88 \pm 8\%$ ) mis à part en été 2006 (*Pyramimonas sp.* représente alors 58 % du peuplement phytoplanctonique). La densité de *Planktothrix agardhii* diminue au printemps 2007, puis l'espèce n'est plus détectée à partir de l'été 2007 jusqu'en hiver 2009, où seulement quelques filaments sont observés. *Limnothrix planctonica* domine le peuplement phytoplanctonique au printemps, été et automne 2007 ( $49 \pm 2.6\%$ ), en conservant une densité similaire à celle de 2006 ( $5 \times 10^6$  cell.l<sup>-1</sup> en 2006 et  $8 \times 10^6$  cell.l<sup>-1</sup> en 2007). L'espèce devient minoritaire en hiver 2007 ; elle représente ensuite une proportion insignifiante du peuplement phytoplanctonique (< 1%) jusqu'en été 2010. L'espèce *Limnothrix planctonica* est accompagnée de *Pseudanabaena limnetica* du printemps 2007 à l'hiver 2007 qui représente alors de 15 à 31 % du peuplement phytoplanctonique. Ces deux espèces dominent le peuplement alors que la salinité est maximale, démontrant leur halotolérance. L'hiver 2007 est marqué par une densité phytoplanctonique minimale due à la disparition de *Planktothrix agardhii* qui proliférait en hiver avant le stress halin. Les Oscillatoriales ne forment plus qu'une très faible proportion du peuplement durant les deux années suivant le stress halin.

Les diatomées dominent le peuplement phytoplanctonique en hiver 2007 et 2008 (41 et 43%). Elles sont principalement accompagnées de *Monoraphidium convolutum* et de *Pseudanabaena limnetica* en hiver 2007, et de *Chroococcus sp.* et *Monoraphidium tortile* en hiver 2008. En 2009 et 2010 les chlorococcales co-dominent le peuplement phytoplanctonique

avec des espèces de chroococcales ( $40 \pm 11\%$  de chlorophytes et  $47 \pm 14\%$  de cyanobactéries). Ces espèces sont majoritairement regroupées au sein des genres d'*Aphanocapsa*, *Chroococcus*, *Monoraphidium*, *Kirchneriella* et *Dictyosphaerium*. L'espèce *Aphanocapsa delicatissima* est à l'origine des deux pics de densité saisonniers observés durant les étés 2009 et 2010. Une faible proportion de diatomées (de 2.8 à 13.0%,) se maintient durant 2009 et 2010. Les cyanobactéries filamenteuses *Planktothrix agardhii*, *Limnothrix planctonica*, *Planktolyngbya limnetica*, *Pseudanabaena limnetica* et *Anabaenopsis circularis* forment seulement 0.3% du phytoplancton durant 2009 et 2010.

## 2.2. D'un point de vue fonctionnel

90 % des espèces phytoplanctonique sont des espèces filamenteuses durant la période s'étendant de l'hiver 2005 à l'hiver 2007 (**Figure 9A**). Le peuplement phytoplanctonique est dominé par des espèces unicellulaires isolées durant l'hiver 2008 ; celles-ci cohabitent avec des espèces coloniales. Ces dernières deviennent dominantes au printemps 2009 et le restent jusqu'à l'automne 2010. De faibles proportions d'espèces filamenteuses réapparaissent en été et automne 2010 (3.7 et 3.5 %).

L'identification de groupes écologiques cohérents, présentant des caractéristiques écologiques similaires, permet une meilleure compréhension de l'évolution de l'assemblage phytoplanctonique sous un environnement changeant. Ainsi, le regroupement des espèces en codons a été réalisé afin de mieux expliquer la relation entre le phytoplancton et l'environnement. Les espèces appartenant au codon S1 sont majoritaires de l'hiver 2005 à l'automne 2007 ( $80 \pm 19\%$ ) (**Figure 9B**) (**Table 1**). Les espèces du codon X2 accompagnent les espèces du codon S1 au printemps et en été 2006 ; le codon D apparaît en proportions croissantes lors de l'augmentation de salinité du printemps 2007 à l'hiver 2007. Ce dernier co-domine le milieu en hiver 2007 (37%) avec les codons S1 (29%) et X1 (28%). En hiver 2008, les espèces du codon X1 sont retrouvées comme co-dominantes avec les espèces du codon B (48 et 38 %), et sont accompagnées d'espèces du codon Lo (15 %). Durant la période comprise entre le printemps 2009 et l'automne 2010, les espèces appartiennent majoritairement aux

codons F ( $25 \pm 5 \%$ ), Lo ( $25 \pm 10 \%$ ) et K ( $24 \pm 19 \%$ ). Elles sont accompagnées des codons X1 ( $15 \pm 9 \%$ ) et B ( $3.8 \pm 2.4 \%$ ) durant toutes les saisons.

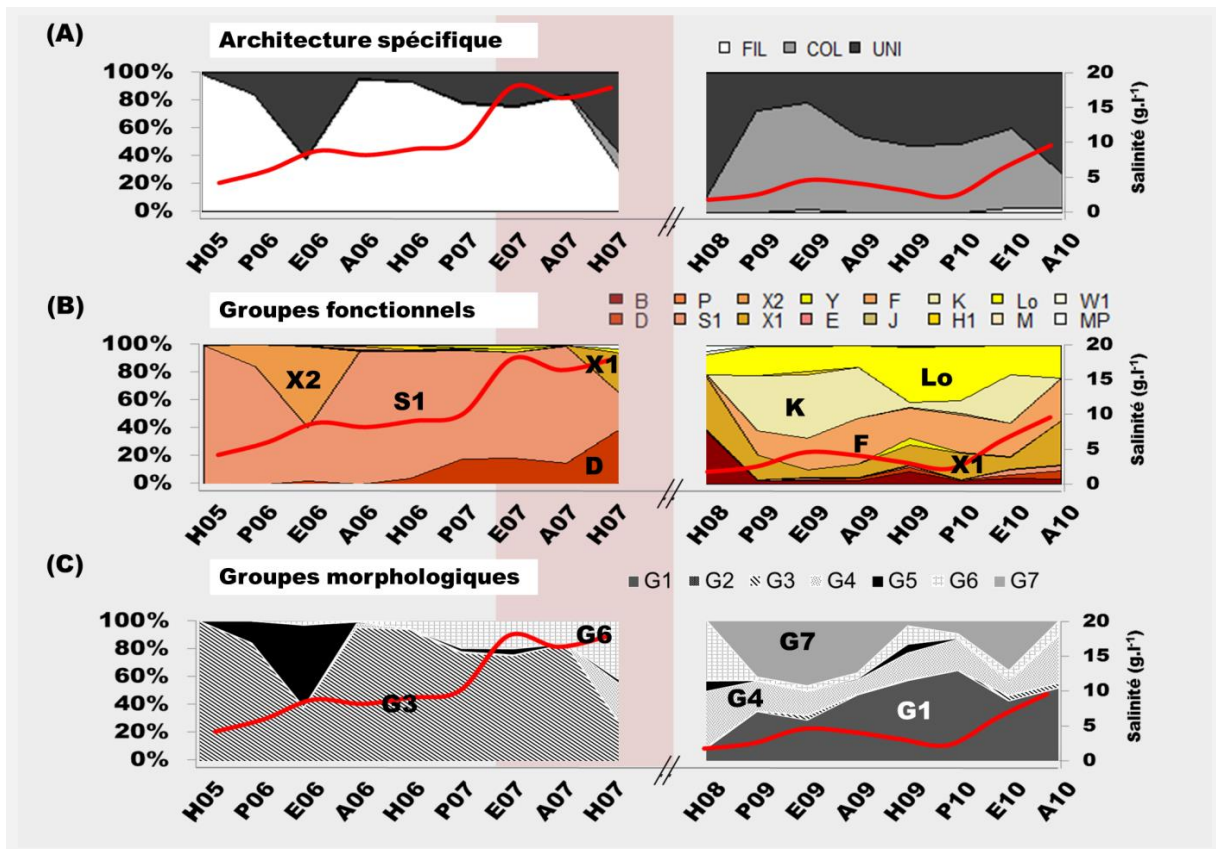


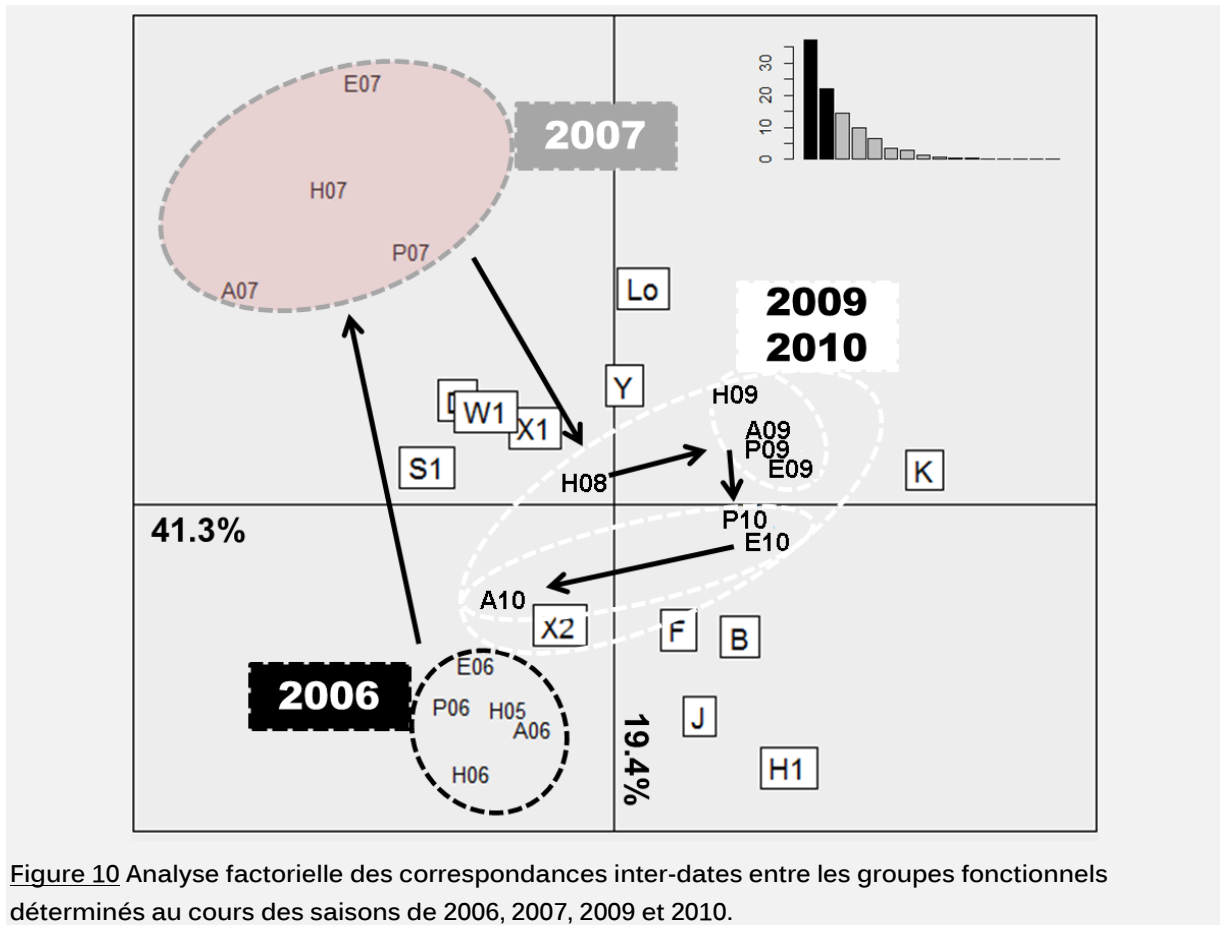
Figure 9 Modification de la dynamique saisonnière du phytoplancton d'un point de vue fonctionnel parallèlement aux variations de salinité observées de l'hiver 2005 à l'automne 2010.

(A) Proportion des espèces unicellulaires (UNI), coloniales (COL) et filamenteuses (FIL) ;

(B) Proportion des groupes fonctionnels (codons) définis par Reynolds *et al.* [2002] et Padisak *et al.* [2009] ; (C) Proportion des groupes morphologiques définis par Kruk *et al.* [2010]. Cf. [Table 1](#) pour le listing des groupes fonctionnels et morphologiques

Les espèces appartenant au groupe morphologique G3 sont dominantes de l'hiver 2005 jusqu'à l'automne 2007 ( $81 \pm 19 \%$ ) (Figure 9C) (Table 1). Les groupes G4 et G6 co-dominent en hiver 2007 (28 et 41%, respectivement) et en hiver 2008 (40 et 43%). Le groupe G1 domine le peuplement phytoplanctonique durant les années 2009 et 2010 ( $47 \pm 12\%$ ) mis à part en été, saison durant laquelle G7 est dominant (été 2009, 46% de G7) ou co-dominant avec G1 (été 2010, 43% de G1 et 35% de G7). Le groupe G4 représente le troisième groupe majoritaire du phytoplancton durant 2009 et 2010 ; il représente en moyenne  $19 \pm 8\%$  du peuplement.

Une analyse factorielle des correspondances (AFC) a été réalisée sur les groupes fonctionnels (**Figure 10**).

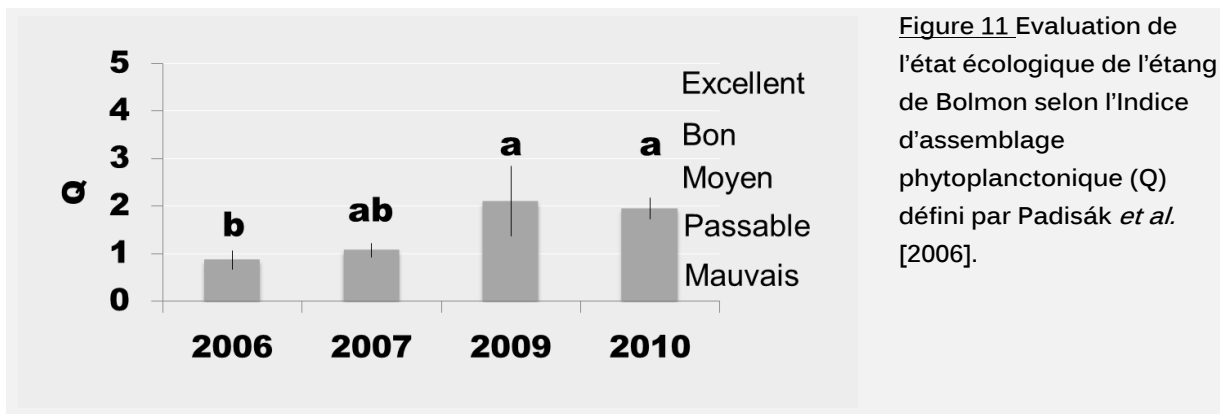


**Figure 10** Analyse factorielle des correspondances inter-dates entre les groupes fonctionnels déterminés au cours des saisons de 2006, 2007, 2009 et 2010.

L'ordination des groupes fonctionnels en fonction des deux premiers axes de l'AFC met en évidence l'évolution de la composition phytoplanctonique de l'étang de Bolmon durant les saisons de 2006, 2007, 2009 et 2010. Les deux premiers axes de l'AFC expliquent 60.7% de l'analyse. Le premier axe de l'AFC qui explique 41.3% de l'analyse oppose les années 2006 et 2007, dans sa partie négative, à l'année 2009, au printemps et en été 2010 dans sa partie positive. Les années 2006 et 2007 sont principalement caractérisées par la présence du codon S1. Ces années sont secondairement caractérisées par les codons D, X2, X1 et W1. Les années 2009 et 2010 sont, quant à elles, caractérisées par la présence des codons Lo, K, F, B, J et H1. Les codons X1, D, Lo, W1 et Y marquent la transition entre 2007 et l'hiver 2008. Cette saison présente une composition intermédiaire entre celle de l'année 2007 et celles des années 2009 et 2010 qui sont caractérisées par le codon K. Le printemps et l'été 2010 sont proches des saisons de l'année 2009 mais séparés de l'automne 2010. Le deuxième axe qui résume 19.4% de l'AFC

oppose l'année 2007 du côté positif à l'année 2006 et l'automne 2010 du côté négatif. L'automne 2010, dernière campagne de prélèvements effectuée lors de l'étude, se rapproche de l'année 2006 ; ce rapprochement fait intervenir le codon X2.

L'indice d'assemblage phytoplanctonique (Q) défini par Padisák *et al.* [2006] permet d'évaluer l'état écologique de l'étang à partir des groupes fonctionnels. L'indice Q a été calculé durant les 4 années de l'étude (**Figure 11**). L'indice est de 0.9 ( $\pm 0.2$ ) avant la hausse de salinité ; il correspond à un mauvais état écologique de l'étang ; il est de 1.1 ( $\pm 0.1$ ) durant 2007 tandis que la salinité est élevée, l'état écologique étant alors de mauvais à passable. L'indice est significativement plus élevé après la perturbation haline (2.1 ( $\pm 0.6$ ) en 2009 et 1.9 ( $\pm 0.2$ ) en 2010), caractérisant ainsi l'état écologique de l'étang de passable à moyen.





**Table 1** Listing des espèces phytoplanctoniques communes et accessoires déterminées durant la période d'étude dans l'étang de Bolmon.

Pour chaque espèce, un groupe fonctionnel (CODON) et un groupe morphologique (GM) ont été attribués selon les travaux de Reynolds *et al.* [2002], Padisak *et al.* [2009] et Kruk *et al.* [2010].

ESPECES	CODON	GM	ESPECES	CODON	GM
<i>Anabaenopsis circinalis</i>	H1	G3	<i>Chroomonas sp.</i>	X2	G5
<i>Aphanocapsa delicatissima</i>	K	G7	<i>Cryptomonas ovata</i>	Y	G5
<i>Chroococcus sp.</i>	Lo	G1	<i>Gymnodinium sp.</i>	Y	G5
<i>Chroococcus minutus</i>	Lo	G7	<i>Heterocapsa rotundata</i>	Y	G5
<i>Eucapsis sp.</i>	Lo	G1	<i>Peridinium umbonatum</i>	Lo	G5
<i>Geitlerinema sp.</i>	S1	G4	<i>Peridinium willei</i>	Lo	G5
<i>Limnothrix planctonica</i>	S1	G3	<i>Prorocentrum micans</i>	Lo	G5
<i>Microcystis sp.</i>	M	G7	<i>Prorocentrum minimum</i>	Lo	G5
<i>Planktolyngbya limnetica</i>	S1	G4	<i>Euglena agilis</i>	W1	G5
<i>Planktothrix agardhii</i>	S1	G3	<i>Euglena viridis</i>	W1	G5
<i>Pseudanabaena limnetica</i>	S1	G4	<i>Achnanthes exigua</i>	MP	G6
<i>Pseudocapsa sp.</i>	Lo	G7	<i>Achnanthes marginulata</i>	MP	G6
<i>Apiochloris sp.</i>	X2	G5	<i>Achnanthidium minutissimum</i>	MP	G6
<i>Chlamydomonas reinhardii</i>	X2	G5	<i>Chaetoceros muelleri</i>	D	G6
<i>Chlorella vulgaris</i>	X1	G1	<i>Cocconeis pediculus</i>	MP	G6
<i>Chlorogonium fusiforme</i>	X2	G5	<i>Cocconeis placentula</i>	MP	G6
<i>Dictyosphaerium botrytella</i>	F	G4	<i>Cyclotella atomus</i>	B	G6
<i>Dictyosphaerium pulchellum</i>	F	G4	<i>Cyclotella sp.</i>	B	G6
<i>Kirchneriella contorta</i>	F	G1	<i>Cylindrotheca closterium</i>	D	G6
<i>Kirchneriella diana</i>	F	G1	<i>Diatoma vulgaris</i>	MP	G6
<i>Kirchneriella obesa</i>	F	G4	<i>Fragilaria fasciculata</i>	P	G6
<i>Monoraphidium contortum</i>	X1	G4	<i>Fragilaria ulna</i>	P	G6
<i>Monoraphidium convolutum</i>	X1	G4	<i>Gomphonema parvulum</i>	MP	G6
<i>Monoraphidium dybrowski</i>	X1	G4	<i>Gyrosigma acuminatum</i>	MP	G6
<i>Monoraphidium griffithii</i>	X1	G4	<i>Melosira varians</i>	P	G6
<i>Monoraphidium tortile</i>	X1	G4	<i>Navicula cryptocephala</i>	MP	G6
<i>Nephroselmis olivaceae</i>	X2	G5	<i>Navicula menisculus</i>	MP	G6
<i>Pyramimonas inconstans</i>	X2	G5	<i>Navicula rhyncocephala</i>	MP	G6
<i>Scenedesmus acuminatus</i>	J	G4	<i>Navicula salinarum</i>	MP	G6
<i>Scenedesmus eornis</i>	J	G4	<i>Navicula tripunctata</i>	MP	G6
<i>Scenedesmus intermedius</i>	J	G4	<i>Nitzschia inconspicua</i>	D	G6
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	J	G4	<i>Nitzschia palea</i>	D	G6
<i>Tetraedron minimum</i>	J	G4	<i>Nitzschia pusilla</i>	D	G6
<i>Tetraselmis cordiformis</i>	X2	G5	<i>Skeletonema costatum</i>	D	G6
<i>Kephyrion spirale</i>	X2	G4	<i>Stephanodiscus sp.</i>	D	G6
<i>Mallomonas caudata</i>	E	G2	<i>Thalassiosira sp.</i>	D	G6
<i>Mallomonas sp.</i>	E	G2			
<i>Ochromonas vyssotzkii</i>	X2	G2			

### 3. Elargissement de la valence écologique de *Planktothrix agardhii* vis à vis du facteur salinité

*Planktothrix agardhii* est recensée dans 24 échantillons sur les 99 prélèvements effectués durant l'année 2006, le printemps 2007 et les années 2009 et 2010 (**Figure 12A**). La salinité de ces échantillons est située entre 0.2 et 10.5 g.l<sup>-1</sup>. La salinité augmentant rapidement durant le printemps 2007, on ne dispose pas de relevé de densité dans des salinités comprises entre 10.5 et 16 g.l<sup>-1</sup>, excepté deux échantillons de salinité 12.4 et 12.7 g.l<sup>-1</sup> qui rapportent l'absence de l'espèce à ces salinités. Toutefois, ces points ont été échantillonnés après la période de salinité élevée durant laquelle *Planktothrix agardhii* disparaît de la colonne d'eau, ils ne peuvent pas être pris en compte. *Planktothrix agardhii* n'est pas recensée dans la colonne d'eau lorsque la salinité est supérieure à 16 g.l<sup>-1</sup> (durant la deuxième moitié de l'année 2007). L'espèce est recensée sporadiquement en 2009 et 2010, avec des densités en moyenne  $5 \cdot 10^4$  plus faibles qu'en 2006 et printemps 2007. Elle est retrouvée au niveau de la station B2 en février, mars et en août 2010 (salinités de 4.1, 3.0 et 8.2 g.l<sup>-1</sup>, respectivement) et au niveau de la station B3 en avril et mai 2009, et en avril 2010 (salinités de 1.5, 2.2 et 0.3 g.l<sup>-1</sup>, respectivement). La courbe de régression des densités de *Planktothrix agardhii* en fonction de la salinité durant 2006 et 2007 présente une diminution de la densité de l'espèce alors que la salinité diminue de 6 à 10.5 g.l<sup>-1</sup> (**Figure 12A**). La courbe de régression des densités de *Planktothrix agardhii* en fonction de la salinité durant 2009 et 2010 présente des densités croissantes alors que la salinité augmente de 0 à 4 g.l<sup>-1</sup>. Les relevés de 2006-2007 et 2009-2010 ont été homogénéisés afin de pouvoir les rassembler et maximiser ainsi le nombre de points du nuage ainsi obtenu (**Figure 12B**). La densité de *Planktothrix agardhii* est corrélée à la salinité de l'étang de Bolmon ( $R=0.78$ ,  $n=24$ ,  $p<0.05$ ). La densité maximale de *Planktothrix agardhii* dans l'étang de Bolmon est observée alors que la salinité est de 6.5 g.l<sup>-1</sup>. Une régression linéaire positive de pente 0.54 est déduite de la courbe lorsque la salinité est comprise entre 0.2 et 6.0 g.l<sup>-1</sup> ( $r=-0.96$ ,  $p<0.05$ ,  $n=11$ ). Une régression linéaire négative de pente -0.95 est déduite de la courbe lorsque la salinité est comprise entre 7.5 et 10.5 g.l<sup>-1</sup> ( $r=-0.93$ ,  $p<0.05$ ,  $n=13$ ). Ces résultats doivent toutefois être pris en compte avec précaution à cause de la faible quantité de données à l'origine des courbes et des droites de régression.

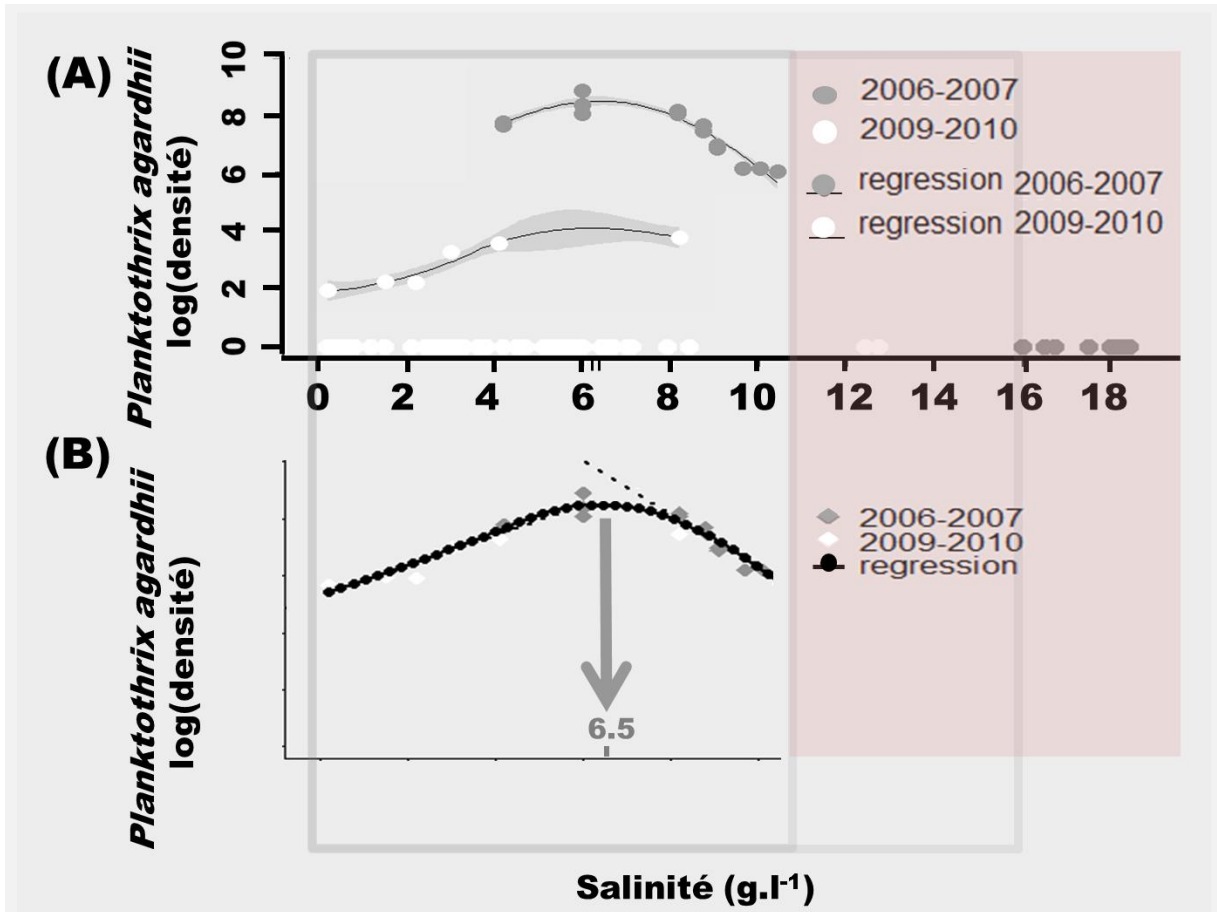


Figure 12 Relation entre la densité de *Planktothrix agardhii* et la salinité de l'étang de Bolmon en 2006, 2007, 2009 et 2010.

Les densités de *Planktothrix agardhii* portées sur une échelle logarithmique, déterminées avant et pendant la hausse de salinité (2006-2007) sont figurées par des points gris ; celles mesurées en 2009-2010 sont figurées par des points blancs. Les courbes sont des fonctions polynômes du deuxième degré qui ajustent au mieux les nuages de points des densités de *Planktothrix agardhii* mesurées en 2006-2007 et 2009-2010, représentés séparément (A) et rassemblés (B) après avoir multiplié les densités plus faibles de 2009-2010 par le facteur de différence avec les années 2006-2007 (x5000).

#### D. DISCUSSION

Le suivi pluriannuel de l'étang de Bolmon révèle que ses modalités de gestion ont conduit à une augmentation de la salinité de façon significative. L'étang constitue un milieu à ciel ouvert dans lequel il a été possible de mettre en exergue le passage du stade mésohalin à polyhalin puis un retour au stade mésohalin sans variation du contexte nutritif. Ce schéma environnemental a permis d'observer des dynamiques saisonnières fluctuantes de la communauté phytoplanctonique et des populations de *Planktothrix agardhii*.

Le changement majeur qui s'observe à travers la diminution de l'abondance est la disparition de *Planktothrix agardhii* de la colonne d'eau, espèce majoritaire du peuplement, et le remplacement par *Limnothrix planctonica* et *Pseudanabaena limnetica* durant l'épisode de stress halin. La hausse de salinité survenue dans l'étang de Bolmon excède donc les capacités permises par la plasticité phénotypique de *Planktothrix agardhii*, contrairement aux deux autres Oscillatoriales qui tolèrent une salinité plus élevée. Ce phénomène a déjà été rapporté par Bonilla *et al.* [2012] qui observent que l'espèce passe abruptement d'un état où elle domine le phytoplancton à un état où elle devient un composant rare quand un seuil environnemental a été atteint. L'observation de Chomérat *et al.* [2007] qui constate une plus grande halotolérance pour *Pseudanabaena limnetica* que pour *Planktothrix agardhii* est confortée par ce résultat. Il est à noter la possibilité que *Limnothrix planctonica* et *Pseudanabaena limnetica* vivant dans un milieu subissant des fluctuations de salinité se soient acclimatées et/ou adaptées à la salinité, ce qui leur permet de persister durant la hausse de salinité [Kirst 1990]. En effet, selon Padisák *et al.* [2003], l'adaptation évolutive aux conditions de stress est le principal facteur de sélection, les interactions compétitives étant d'importance secondaire. Si ces espèces sont adaptées à la salinité, alors leur limite d'halotolérance et leur optimum de salinité peuvent donc être plus élevés que ceux des mêmes espèces vivant en eau douce [Kirst 1990]. L'halotolérance observée dans cette étude ne dicte en rien une tendance générale spécifique mais la capacité d'acclimatation et/ou d'adaptation de ces espèces au sel et donc la capacité de ces espèces à produire des écotypes ou génotypes halotolérants voire halophiles.

La disparition de *Planktothrix agardhii* de la colonne d'eau, ayant entraîné la diminution de la turbidité de celle-ci, a transformé le milieu en une niche défavorable aux Oscillatoriales qui

finissent par disparaître de la colonne d'eau à la fin de leur période de prolifération, en hiver 2007. De plus, la salinité élevée a pu participer à rendre l'eau plus claire en augmentant la vitesse de sédimentation des matières en suspension et en diminuant le nombre de particules dans l'eau [Håkanson & Bryhn 2008].

L'élimination de la colonne d'eau de *Planktothrix agardhii* permet alors à quelques espèces rares de remplir la nouvelle niche ainsi formée [Gray 1989; Padisak, *et al.* 2009]. Les espèces *Chroococcus spp.*, *Aphanocapsa delicatissima*, *Kirchneriella obesa*, *Monoraphidium spp.* et *Cyclotella spp.* qui apparaissaient en faible abondance avant le stress halin forment un soutien pour les espèces dominantes ; elles répondent rapidement aux perturbations et permettent la recolonisation de l'écosystème [Weithoff 2003]. En effet, la richesse, couplée à un faible temps de génération, permet au phytoplancton de répondre rapidement à une variabilité environnementale à travers la sélection du phénotype le mieux adapté au nouvel environnement [Naselli-Flores & Barone 2000]. Ceci explique le fait que durant les années 2009 et 2010 le peuplement phytoplanctonique soit dominé par des espèces unicellulaires de chroococcales et de chlorococcales. L'espèce la plus abondante est *Aphanocapsa delicatissima* qui prolifère en été en raison de la stabilité de la colonne d'eau permise par la forte irradiance et la faible force des vents de la saison.

Le peuplement phytoplanctonique et les conditions trophiques de l'étang de Bolmon précédant le stress halin étaient caractéristiques d'un « turbid stable state » [Scheffer, *et al.* 1997] dans lequel les espèces de codon S1 assurent leur succès par leur capacité à utiliser une faible luminosité. La turbidité que ces espèces favorisent elles-mêmes par leur prolifération assure le maintien de leur dominance [Scheffer, *et al.* 1997]. Le stress halin induit l'exclusion des espèces du codon S1 (en hiver 2007) alors qu'il favorise les individus plus résistants, les espèces de codons D et X1. La persistance de ces espèces peut être expliquée par la disponibilité des nutriments qui étaient préalablement utilisés par *Planktothrix agardhii*, ou encore par la modification de la communauté de brouteurs induite par la hausse de salinité. L'halotolérance des espèces du codon X1 observée dans notre étude apporte une information supplémentaire sur le comportement des groupes fonctionnels vis-à-vis du facteur salinité, permettant d'élargir l'utilisation de l'approche des groupes fonctionnels aux milieux saumâtres comme il l'a été suggéré par Kruk *et al.* [2012].

Les espèces rares opportunistes des codons Lo, K, F et X1 favorisées en l'absence des espèces du codon S1 avec le retour au stade mésohalin de l'étang [Reynolds, *et al.* 2002] sont caractérisées par une sensibilité à la faible disponibilité en nutriments ou comme habitant les milieux brassés d'eau claire [Padisak, *et al.* 2009]. Ceci explique que ces groupes fonctionnels expriment l'amélioration de l'état écologique de l'étang observé par l'estimation de l'indice Q [Padisák, *et al.* 2006]. Ceux-ci présentent une tendance à passer d'un milieu turbide et riche en nutriments (codons S1 et D) à un milieu mésotrophe avec une eau claire (Lo, F et B) mais cependant toujours riche en nutriments (codons K et X1) [Padisak, *et al.* 2009; Reynolds, *et al.* 2002]. Les codons Lo, K, F et X1 ont également été vus comme caractéristiques des lacs peu profonds d'eau claire [Izaguirre, *et al.* 2012]. D'une manière générale, la disparition des Oscillatoriales du milieu ayant fortement participé à l'établissement de la nouvelle communauté phytoplanctonique via la diminution de la turbidité de l'eau, il est cohérent que celle-ci reflète un meilleur état écologique de l'étang.

L'étude de la morphologie des espèces permet de mettre en évidence deux groupes morphologiques dominants comprenant des espèces de petites tailles cellulaires : le groupe 1 constitué d'unicellulaires de petite taille et le groupe 7 constitué d'espèces de petite taille formant de grandes colonies. La réponse de la communauté phytoplanctonique au stress halin observée est typique de la réponse d'une communauté à un stress environnemental qui comprend la régression de l'espèce dominante au profit d'espèces opportunistes et la réduction de la taille moyenne des espèces dominantes [Gray 1989]. De même, Dokulil *et al.* [2012] observent des changements de la taille du phytoplancton d'un lac lors de son passage d'un état stable à un autre. Villena *et al.* [2003b] observent également un « shift » du peuplement phytoplanctonique d'un lac dominé par *Planktothrix agardhii* vers des espèces de chroococcales en réponse à un changement de gestion du milieu (détournement du rejet des eaux usées). Le groupe 1 est constitué d'espèces phytoplanctonique de stratégie r ayant la plus petite taille et le plus grand taux de croissance [Kruk, *et al.* 2010]. Leur taux de croissance rapide et leur faible vitesse de sédimentation ont permis la formation rapide d'une forte densité d'espèces phytoplanctoniques dans la nouvelle niche disponible après la disparition des Oscillatoriales [Reynolds, *et al.* 1984]. De la même façon, la disparition des Oscillatoriales favorise le développement des espèces du groupe morphologique 7 par la disponibilité en

nutriments du milieu. En effet le groupe 7 contient des espèces formant des larges colonies avec un grand volume et une grande surface, leur taille ayant tendance à rendre ces espèces sensibles à la faible disponibilité en ressource [Kruk & Segura 2012]. Leur taux de croissance est relativement faible. Cependant, la formation de colonies est considérée comme un avantage adaptatif ; les variations de la taille des colonies permettent d'adapter les capacités physiologiques et écologiques des cellules aux conditions environnementales [Jakobsen & Tang 2002]. De plus, ces espèces peuvent se protéger de certaines agressions extérieures grâce à leur mucilage. Enfin, leur capacité à maintenir leur colonie dans le sédiment a peut-être contribué à assurer leur survie lors du stress halin [Reynolds, *et al.* 1981]. D'une manière générale, le nanoplancton et les cyanobactéries de petite taille comme observés après le stress halin, ont tendance à vivre dans des eaux brassées et claires [Reynolds, *et al.* 2002]. Naselli-Flores *et al.* [2003] ont observé, de même que dans cette étude, un changement de la structure morpho-fonctionnelle de l'assemblage phytoplanctonique en réponse aux changements de la luminosité de la colonne d'eau.

L'augmentation de la salinité de l'étang de Bolmon est une expérimentation en grandeur nature qui a permis de définir le seuil d'halotolérance de *Planktothrix agardhii* et de valider que son déclin s'amorce à partir d'une valeur de salinité supérieure à 12.5 g.l<sup>-1</sup>. Bien qu'il soit difficile de définir une valeur exacte au vue de l'impossibilité de réguler la valeur de la salinité dans une situation environnementale naturelle, il est possible d'estimer que la limite d'halotolérance de *Planktothrix agardhii* de l'étang de Bolmon est située entre 10.5 et 16 g.l<sup>-1</sup>. La limite de tolérance à la salinité de l'espèce a été définie à 7.8 g.l<sup>-1</sup> par Suda *et al.* [2002]. Cette valeur seuil a été testée expérimentalement sur plusieurs souches de *Planktothrix agardhii* isolées de milieux d'eaux douces. La limite d'halotolérance de l'espèce vivant dans un milieu saumâtre de salinité moyenne de 3 g.l<sup>-1</sup>, est située quant à elle, entre 12.5 et 15 g.l<sup>-1</sup> (Chap. II, partie A). La limite observée *in situ* corrobore donc les résultats expérimentaux, si ce n'est en désignant une valeur bien définie, tout au moins en confirmant que l'espèce s'acclimate ou s'adapte à son environnement en élevant son seuil d'halotolérance (Cf. [Hagemann 2011] pour plus d'informations sur les stratégies d'acclimatation des cyanobactéries au sel).

La corrélation entre l'abondance de *Planktothrix agardhii* et la salinité de l'environnement présente une densité maximale dans une salinité de 6.5 g.l<sup>-1</sup>. La population de *Planktothrix*

*agardhii* de l'étang de Bolmon est halophile, avec un taux de croissance optimal proche de la salinité moyenne de son milieu. De plus, la densité augmente alors que la salinité augmente de 0.2 à 6.5 g.l<sup>-1</sup> et diminue rapidement de 6.5 g.l<sup>-1</sup> jusqu'à (au moins) 10.5 g.l<sup>-1</sup>. Le fait que l'optimum de croissance ne soit pas dans une eau douce laisse suggérer que la population de *Planktothrix agardhii* se soit adaptée à la salinité par une modification génétique plutôt qu'acclimatée physiologiquement. En effet, si une espèce phytoplanctonique est capable de survivre dans un environnement non favorable par une acclimatation phénotypique, alors son optimum de croissance reste fixe [Huertas, *et al.* 2011]. De telles observations sont courantes ; Flöder *et al.* [2010] ont par exemple observé un optimum halin élevé à 3 g.l<sup>-1</sup> plutôt que 0 g.l<sup>-1</sup> de l'espèce *Anabaenopsis flos-aquae* vivant dans un milieu saumâtre.

Quelques filaments de *Planktothrix agardhii* sont recensés dans la colonne d'eau de l'étang de Bolmon après le stress halin. Ces filaments apparaissent alors que la salinité varie de 0.3 à 8.2 g.l<sup>-1</sup>. Bien que la densité de *Planktothrix agardhii* soit beaucoup plus faible après qu'avant la perturbation haline, les quelques relevés semblent montrer un comportement similaire selon la salinité, à savoir un optimum de croissance autour d'une salinité de 6.5 g.l<sup>-1</sup>. Ce résultat tend à démontrer que les filaments observés sont issus de la même population ancestrale et qu'ils ne proviennent pas d'un ensemencement extérieur.

Il est nécessaire de prendre ces résultats avec précaution car, bien que la corrélation entre l'abondance de *Planktothrix agardhii* et la salinité soit significative, elle n'est pas très robuste en raison de la faible quantité de données utilisées.

La salinité de l'étang de Bolmon, ayant augmenté rapidement jusqu'à un niveau supérieur au maximum 'habituel' (11g.l<sup>-1</sup>), a atteint le seuil d'inertie de la communauté phytoplanctonique qui n'est plus capable de compenser [Gray 1989; Jochimsen, *et al.* 2013; Underwood 1989]. Une importante modification de salinité entraînant le changement de classe haline du milieu est fortement susceptible de modifier la composition spécifique phytoplanctonique [Kirst 1990; Pilkaitytė, *et al.* 2004]. Ainsi le stress halin a induit le changement de la structure, des groupes fonctionnels et morphologiques du peuplement phytoplanctonique démontrant que la communauté est sortie de son domaine de stabilité et a changé son domaine de fluctuation [Blandin & Lamotte 1984].



La possibilité que cette nouvelle communauté phytoplanctonique soit transitoire avant le retour à un peuplement dominé par *Planktothrix agardhii* ne peut cependant pas être écartée.

En effet, les groupes morphologiques 1 et 4 constitutifs du nouveau peuplement sont caractéristiques des milieux en phase de transition ayant subi une rupture d'équilibre [Kruk, *et al.* 2010; Reynolds, *et al.* 2002].

De même, la composition des groupes fonctionnels à la fin de l'étude (en automne 2010) montre une tendance à se rapprocher de celle observée avant le stress halin (en 2006).

Floder *et al.* [2010] observent également des modifications transitoires de l'assemblage phytoplanctonique après l'application d'un stress halin, plutôt que l'établissement d'une nouvelle communauté phytoplanctonique pérenne.

De plus, de nombreux milieux aquatiques peu profonds sont typiquement soumis à un passage entre deux états le plus souvent caractérisés par le passage d'un peuplement phytoplanctonique dominé par des espèces nanoplanctoniques vers la domination de cyanobactéries filamenteuses [Izaguirre, *et al.* 2012; Scheffer, *et al.* 1997]. Les groupes fonctionnels dominants de l'étang de Bolmon avant et après le stress halin ont été vus comme caractéristiques des lacs peu profonds présentant cette alternance de 'steady states' (codons X1, X2, S1, F, K) [Izaguirre, *et al.* 2012], étayant l'hypothèse d'un retour de l'étang de Bolmon vers une domination de la communauté phytoplanctonique par des Oscillatoriales.

Enfin, il suffirait du retour de *Planktothrix agardhii* dans la colonne d'eau de l'étang de Bolmon pour assurer les conditions propices au développement des Oscillatoriales. Or, quelques filaments de l'espèce sont observés dans la colonne d'eau après le retour à une salinité située dans la gamme d'halotolérance de l'écotype vivant dans l'étang de Bolmon et proche de son optimum halin. Il est possible que les filaments ayant sédimentés durant le stress halin sous forme d'akinètes puissent peu à peu regagner le milieu et reformer la niche écologique des Oscillatoriales.

A l'heure actuelle, des prélèvements réalisés entre janvier 2011 et Octobre 2012 ne montrent pas le retour et la colonisation par *Planktothrix agardhii* (S. Fayolle, données personnelles), démontrant que, si l'hypothèse d'un retour de l'espèce est plausible, celui-ci se fera après une grande période de temps.

### Conclusions & perspectives

Le stress halin survenu dans l'étang de Bolmon s'est principalement manifesté par la disparition de la colonne d'eau de l'espèce dominante *Planktothrix agardhii* dont le seuil d'halotolérance a été franchi. La modification de la communauté phytoplanctonique se déroule ensuite en conséquence de la disparition de *Planktothrix agardhii*:

- La diminution de l'auto-ombrage préalablement induit par *Planktothrix agardhii* provoque la disparition des espèces de codon S1 préalablement dominantes
- La disponibilité en nutriments et la diminution de l'ombrage favorisent le développement de petites espèces des codons K, Lo, X1 et F.

Ce résultat corrobore les conclusions de Floder *et al.* [2010] montrant que la croissance compensatoire des espèces rares et abondantes opportunistes se produit lorsque le niveau halin est tel qu'il inhibe la croissance de l'espèce dominante du milieu.

Le stress halin induit la sortie du domaine de stabilité du peuplement phytoplanctonique qui passe d'un état caractéristique des lacs hypereutrophes dominés par des espèces d'Oscillatoriales qualifié de 'turbid stable state', à une communauté dominé par des espèces picoplanctoniques et coloniales typiques des milieux lagunaires et/ou des milieux dans un état transitoire [Kanoshina, *et al.* 2003; Moss 1994].

Le besoin d'appliquer l'approche des groupes fonctionnels aux communautés phytoplanctoniques des eaux côtières a été énoncé par Kruk *et al.* [2010]. Notre étude illustre la possibilité d'utilisation des groupes fonctionnels et morphologiques dans le déterminisme de communautés phytoplanctoniques en milieu saumâtre.





## DISCUSSION GENERALE

### 1. Originalité et intérêt de l'étude

Cette étude tire une grande partie de son originalité du facteur environnemental étudié, la salinité, dans le déterminisme des efflorescences toxiques d'une cyanobactérie pourtant référencée comme dulçaquicole, *Planktothrix agardhii* [Anagnostidis & Komárek 1988]. L'intérêt de l'étude a été initiée par l'observation de proliférations de *Planktothrix agardhii* en milieu saumâtre, observation qui a mené à la nécessité évidente, au vu des nuisances occasionnées par les proliférations de l'espèce [Fastner, *et al.* 1999b], de caractériser le comportement de l'espèce dans cette nouvelle niche. Notre recherche met alors en évidence le succès de *Planktothrix agardhii* et sa production de microcystines hors de son *preferendum* halin, conséquences de la capacité stratégique des cyanobactéries à s'adapter et à s'acclimater à tous types de conditions environnementales, et de coloniser ainsi avec succès de nombreux milieux aquatiques [Seckbach & Oren 2007].

Le contexte local de l'étude, à savoir la perspective d'une réhabilitation des étangs de Berre et de Bolmon par une entrée massive d'eau salée, entraîne l'intégration des résultats de l'étude dans une réflexion sur la faisabilité d'un mode de gestion hydraulique pour restaurer les milieux aquatiques côtiers.

Enfin, l'importance de l'analyse du comportement des cyanobactéries vis-à-vis de la salinité devient évidente dans un contexte de changement global, qui, de façon prévisible, assurera le succès des cyanobactéries [Carey, *et al.* 2012; Paerl & Paul 2012]. Notre étude permet d'apporter des éléments de réflexion sur le comportement des cyanobactéries face à la salinisation des milieux et au stress halin susceptible de particulièrement impacter les milieux côtiers dans un contexte de changement climatique.

Un des principaux points forts de cette recherche est qu'elle repose à la fois sur la réalisation d'études *in situ*, et d'expérimentations en milieu contrôlé. La discussion qui suit repose sur le couplage de ces deux types de travaux afin d'apporter les conclusions et les perspectives de la recherche.

## **2. Les populations de *Planktothrix agardhii* des étangs saumâtres de l'Olivier et de Bolmon sont acclimatées et/ou adaptées à la salinité**

Les deux populations de *Planktothrix agardhii* présentent une valence écologique élargie vis-à-vis de la salinité par rapport à celle des populations vivant en milieux dulçaquicoles. La recherche, menée expérimentalement, démontre que les souches saumâtres de *Planktothrix agardhii* de l'étang de l'Olivier parviennent à minimiser l'impact de la salinité sur la croissance de leur population; elles présentent des taux de croissance et des densités maximales moins affectés par une augmentation de salinité que les souches dulçaquicoles. L'étude, menée sur l'étang de Bolmon, rapporte la présence de *Planktothrix agardhii* (avant le stress halin) dans des salinités s'élevant au-delà du seuil d'halotolérance défini pour des populations dulçaquicoles. Par conséquent, les deux populations sont acclimatées/adaptées à la salinité. La présence de *Planktothrix agardhii* a été recensée dans d'autres milieux saumâtres, confirmant sa capacité de colonisation des milieux hors de son preferendum halin [Carstensen & Heiskanen 2007; Chomerat, *et al.* 2007; Romo & Miracle 1994b]. Cette observation mène à s'interroger sur les limites d'halotolérance d'autres cyanobactéries considérées comme dulçaquicoles, et dont les capacités d'acclimatation sont susceptibles d'élargir leur niche écologique. D'une manière générale, cette observation reflète la nécessité de tenir compte, lors d'études du déterminisme des conditions environnementales sur les processus régissant les communautés cyanobactériennes, du fait que la valence écologique des espèces vis-à-vis de la salinité ou d'autres paramètres environnementaux n'est pas fixée et est donc susceptible d'être modifiée avec leur présence à long terme dans des conditions particulières.

La distinction entre l'acclimatation et l'adaptation d'un organisme à un facteur n'est pas toujours claire dans la littérature et les deux termes sont parfois employés indifféremment pour désigner l'un ou l'autre des phénomènes. Cependant, bien que le terme 'acclimatation' puisse être usité dans un sens large, celle-ci se produit à un niveau physiologique sans modification génétique, tandis que l'adaptation consiste en l'apparition de mutations qui confèrent la résistance à l'organisme, suivies de la sélection des génotypes performants [Huertas, *et al.* 2011].

**Notre recherche tendrait à imputer l'halotolérance de la population de *Planktothrix agardhii* de l'étang de l'Olivier à une acclimatation, son optimum de croissance étant maintenu dans**

une eau douce. La population de *Planktothrix agardhii* de l'étang de Bolmon se serait, quant à elle, plutôt adaptée à la salinité de son environnement, la population présentant une capacité à former des biomasses maximales dans la salinité moyenne de l'étang, à savoir 6.5 g.l<sup>-1</sup>.

La différence entre ces deux populations provient vraisemblablement du fait que l'étang de Bolmon présente une salinité moyenne plus élevée (correspondant à l'optimum de croissance de la population), ainsi que de plus grands écarts de salinité que l'étang de l'Olivier (milieu lagunaire). En effet, quand les conditions environnementales dépassent les limites physiologiques de l'organisme, celui-ci assure sa survie par le maintien de sa performance dans le nouvel environnement dépendamment de l'évolution adaptative, qui est, elle-même, gouvernée par l'occurrence des mutations conférant la résistance et la sélection qui s'ensuit [Sniegowski & Lenski 1995]. De plus, un milieu fluctuant permet d'augmenter la probabilité d'adaptation et de sélection des génotypes adaptés à la salinité du milieu [Padisák, *et al.* 2003]. La population de *Planktothrix agardhii* de l'étang de Bolmon serait alors issue d'un ou plusieurs génotypes porteurs d'une mutation ponctuelle, ou d'ADN provenant d'une autre espèce de cyanobactérie ou de procaryote, rendant la population halophile et donc sélectionnée par l'environnement. Un transfert latéral de gènes serait toutefois plus probable d'avoir apporté cet avantage, la probabilité d'occurrence et de sélection de cet événement étant plus grande [Oren 2007]. La totalité des gènes impliqués dans l'acclimatation des cyanobactéries à la salinité n'étant pas identifiée, il apparaît difficile de pouvoir déterminer quelle information génétique serait à l'origine de cette adaptation [Hagemann 2011]. Il pourrait s'agir de gènes codant pour des protéines impliquées dans la synthèse de composés osmotiques, dans des processus bioénergétiques ou encore des protéines constitutives de pompes membranaires ioniques. Toutefois, cette adaptation génétique n'impliquerait pas un plus grand élargissement de la valence écologique que celle de la population de l'étang de l'Olivier. La salinité de l'étang de Bolmon aurait donc sélectionné le génotype permettant d'optimiser le taux de croissance de *Planktothrix agardhii* dans la salinité moyenne de son environnement, sans pour autant permettre une augmentation du seuil d'halotolérance, ce niveau de salinité étant rarement atteint dans le milieu.

Plusieurs pistes peuvent être envisagées pour expliquer comment s'acclimate la population de *Planktothrix agardhii* de l'étang de l'Olivier à la salinité. La réponse à la salinité des cyanobactéries consiste en une réponse biphasique : l'organisme va juguler le choc osmotique de la cellule par la réalisation de flux actifs (entrant d'eau et sortant d'ions), puis assurer son équilibre osmotique par l'accumulation de 'compatible solutes' [Hagemann 2011; Kirst 1990]. Les cellules acclimatées à la salinité peuvent accumuler plus de composés osmotiques que des cellules non acclimatées, activer la production de composés osmotiques plus performants à maintenir l'équilibre ionique que le sucrose (cf. [Hagemann 2011]), activer l'expression de protéines impliquées dans 'l'efflux' ionique et 'l'influx' d'eau dans le cytoplasme.

Finalement, il est nécessaire de souligner que seule une analyse génétique de souches des deux populations serait susceptible de confirmer l'acclimatation de l'une et l'adaptation de l'autre. De plus, l'acclimatation à la salinité de la population de l'étang de l'Olivier a été établie d'après l'analyse de 3 souches, l'étude d'autres souches montrerait peut-être un comportement différent. De même, la valence écologique de *Planktothrix agardhii* de l'étang de Bolmon n'a pas été testée expérimentalement mais seulement estimée d'après l'observation du comportement de l'espèce vis-à-vis de la salinité *in situ*. Il serait judicieux d'alimenter à l'avenir nos résultats par des études expérimentales supplémentaires de souches isolées de l'étang de Bolmon, mais également d'autres milieux saumâtres afin de confirmer la capacité d'acclimatation/adaptation de l'espèce (ou voire même d'autres espèces de cyanobactéries considérées comme dulçaquicoles).

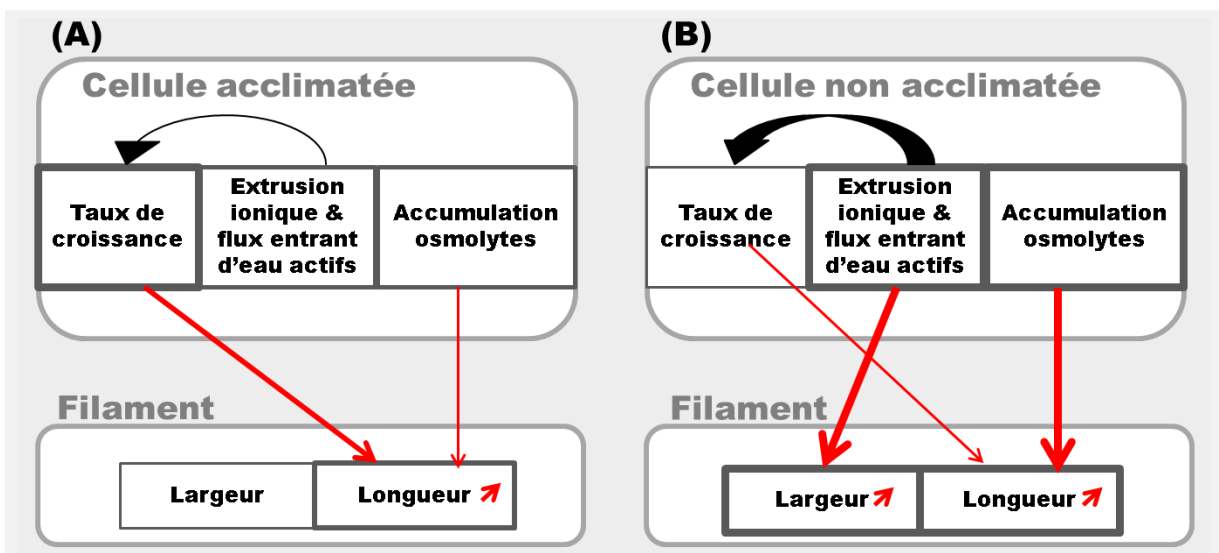
L'adaptation est un processus qui assure la survie de l'espèce, alors que l'acclimatation se produit lorsque les changements de l'habitat sont « faibles » [Huertas, *et al.* 2011]. On peut donc s'interroger sur l'existence d'un seuil halin au-delà duquel la suprématie de *Planktothrix agardhii* ne peut plus être assurée grâce à l'acclimatation de la population, mais seulement par la génération de génotypes performant qui seront sélectionnés par l'environnement. Si l'existence d'un tel seuil est vérifiée, les résultats de notre étude tendraient à l'estimer entre 3 et 6.5 g.l<sup>-1</sup>.

D'une manière générale, les résultats de notre recherche allant plutôt dans le sens énoncé plus haut, il sera attribué dans la fin de cette discussion une acclimatation à la salinité à la population de *Planktothrix agardhii* de l'étang de l'Olivier et une adaptation à celle de l'étang de Bolmon.



### 3. La morphométrie des filaments de *Planktothrix agardhii* comme un potentiel témoin de sa plasticité face à la salinité

Notre recherche met en relief la conséquence de l'acclimatation à la salinité de *Planktothrix agardhii* dans la variation de la morphométrie de ses filaments en soulignant l'effet minimisé qu'exerce la salinité sur celle-ci : Dans des salinités non-optimales mais non-limitantes pour la croissance, les populations acclimatées allongent moins leurs filaments que les populations dulçaquicoles, et ne vont pas subir de variation de la largeur des cellules. Ce phénomène tendrait à démontrer un mode d'acclimatation par la réalisation efficace d'un équilibre entre le flux sortant de sels et le flux entrant d'eau annihilant le choc osmotique des cellules et induisant une nécessité moindre d'accumulation de 'compatible solute' (Figure 1).



**Figure 1** Schéma envisageant les processus métaboliques impliqués dans les variations morphométriques des filaments d'une population de *Planktothrix agardhii* acclimatée à la salinité de l'environnement (A) et d'une population dulçaquicole (B), en milieu saumâtre.

L'épaisseur des flèches et de l'encadrement des processus cellulaires indique l'importance potentiellement imputée aux événements.

Dans les cas où la salinité attendrait des niveaux supérieurs, il est envisagé que : l'épaisseur des flèches de (B), initialement épaisses, augmente avec la salinité, et inversement pour la flèche fine ; le scénario de (A) se transforme peu à peu en (B).

Cette hypothèse irait dans le sens d'une 'osmoacclimatation' des populations saumâtres [Reed, *et al.* 1985]. Sa vérification nécessiterait la mesure des flux entre la cellule et son environnement et la quantification des osmolytes accumulées dans les deux types de cellules.

La dynamique morphométrique met également en évidence l'acclimatation des souches de *Planktothrix agardhii* à la salinité de leur environnement, en reflétant un aussi bon état physiologique des cellules en milieu saumâtre que celui observé en milieu dulçaquicole. En effet, les longueurs moyennes des filaments de *Planktothrix agardhii* de l'étang de l'Olivier, sont identiques à celles rapportées par Poulickova *et al.* [2004] en milieu dulçaquicole, et témoignent donc d'un état physiologique des cellules similaires. Un taux de croissance élevé favorise l'élongation des filaments alors que des filaments courts reflètent le mauvais état physiologique des cellules d'une population, la fragmentation des filaments étant réalisée comme un mécanisme de survie pourvoyeur d'énergie aux cellules présentant un faible taux de croissance [Poulickova, *et al.* 2004]. Ce phénomène explique l'observation concomitante de la longueur maximale des filaments lors des proliférations de *Planktothrix agardhii*, et minimale lorsque la densité de la population est la plus faible. De même, en milieu contrôlé, dans une eau douce, la longueur des filaments de toutes les populations est maximale lors de la phase exponentielle de croissance, phase figurant la période d'efflorescence *in situ*. Toutefois, une inconsistance dans cette propriété apparaît au cours de l'étude en milieu contrôlé : lors de la phase exponentielle de croissance, la longueur des filaments de *Planktothrix agardhii* dulçaquicole en milieu d'eau douce est plus longue que celle des filaments de la population saumâtre dans une eau douce ou de salinité de 3 g.l<sup>-1</sup>, alors que ces trois populations présentent des taux de croissance similaires. Cette différence observée expérimentalement n'étant pas vérifiée *in situ*, elle semble être un effet indirect de l'expérimentation. De manière générale, les conditions expérimentales étant fixées (exceptée la/les variable(s) testée(s)), elles ne reflètent pas intégralement l'environnement naturel. De même, les filaments de *Planktothrix agardhii* de l'étang de l'Olivier sont plus courts que ceux des milieux de culture de salinité de 3 g.l<sup>-1</sup>. Ces observations démontrent la nécessité, autant qu'il est possible, de confronter le bilan d'expérimentations avec les observations *in situ*.

#### 4. Implications de l'acclimatation à la salinité de *Planktothrix agardhii*

L'acclimatation de *Planktothrix agardhii* à la salinité de son environnement va permettre à la population d'optimiser sa croissance dans un environnement saumâtre ; croissance dont les deux paramètres prépondérants sont : La densité/biomasse maximale que la population peut former, et le taux de croissance.

**L'optimisation de la formation de fortes biomasses va principalement assurer la suprématie de *Planktothrix agardhii* en milieu saumâtre ; et, le couplage de cette optimisation à celle du taux de croissance de la population semble également garantir la capacité toxinique de *Planktothrix agardhii* en milieu saumâtre avec la même dynamique que celle observée en milieu dulçaquicole.**

##### 4.1. L'acclimatation/adaptation à la salinité de *Planktothrix agardhii* assure sa suprématie en milieu saumâtre

**Les étangs de Bolmon et de l'Olivier sont typiquement des milieux en 'turbid stable state',** à savoir des milieux eutrophes (pour les phosphates), généralement peu profonds et turbides ; cette dernière caractéristique est la conséquence de la dominance de leur compartiment phytoplanctonique par une espèce de l'ordre des Oscillatoriales, qui garantit sa persistance hystérétique dans le milieu en favorisant elle-même sa propre compétitivité vis-à-vis des faibles luminosités par sa capacité à créer la plus forte turbidité/biomasse par unité de phosphore que toute autre espèce phytoplanctonique [Scheffer, *et al.* 1997]. L'auteur a élaboré ce patron-type de milieu avec pour espèce modèle, *Planktothrix agardhii*, considérée comme l'espèce la plus importante à l'origine d'efflorescences des lacs situés en zone tempérée.

La recherche, menée sur l'étang de l'Olivier, démontre que *Planktothrix agardhii* présente le même comportement dans celui-ci ; l'espèce affiche en effet la même exploitation de ses caractéristiques assurant son succès aussi bien en milieu saumâtre qu'en milieu dulçaquicole, à savoir sa capacité à capter les faibles luminosités [Havens 2008] et à favoriser ce caractère compétitif par auto-ombrage [Scheffer, *et al.* 1997] ; mais également sa capacité à migrer le long de la colonne d'eau, et à tolérer les faibles températures [Sivonen & Jones 1999]. De même, les biomasses formées lors des efflorescences de *Planktothrix agardhii*, la grande proportion du phytoplancton occupée par *Planktothrix agardhii*, la discrimination des facteurs

environnementaux sur le biovolume de *Planktothrix agardhii*, et le cortège d'espèces phytoplanctoniques accompagnant *Planktothrix agardhii* sont similaires dans l'étang de l'Olivier et en milieu dulçaquicole [Bonilla, *et al.* 2012].

**L'intensité lumineuse agit également avec la température sur la dynamique temporelle de *Planktothrix agardhii***: le couplage d'une température douce [Oberhaus, *et al.* 2007a] et d'une intensité lumineuse relativement faible (la croissance de *Planktothrix agardhii* est limitée lorsque l'intensité est supérieure à  $180 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  [Van Liere & Mur 1980], correspondant à la période estivale en milieu méditerranéen) mène à la prolifération de *Planktothrix agardhii* plus précocement en milieu méditerranéen (au printemps) qu'en milieu tempéré (en été). La réunion de ces deux conditions durant le printemps induit le taux de croissance optimal de *Planktothrix agardhii* dans l'étang de l'Olivier, à l'origine de la longueur maximale des filaments et du biovolume maximal de *Planktothrix agardhii* observés durant cette saison.

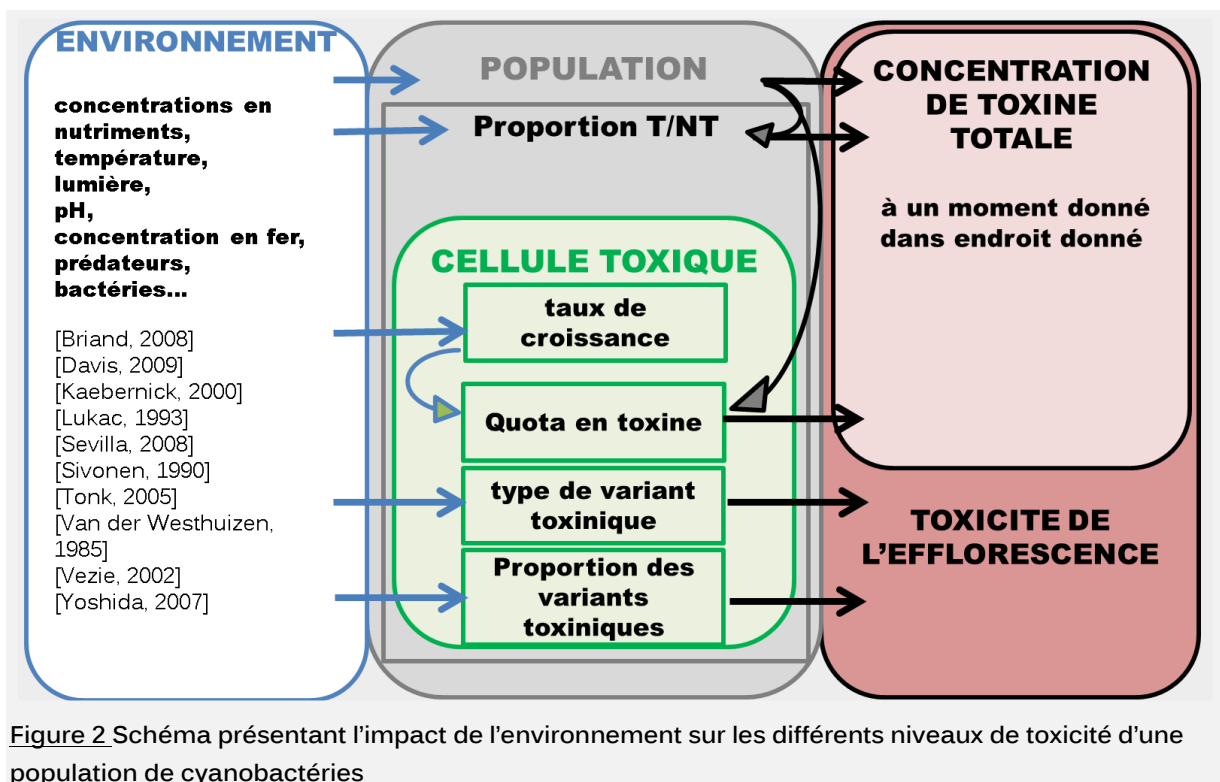
**La salinité de l'étang de l'Olivier n'intervient quant à elle que secondairement comme facteur discriminant du phytoplancton** ; lorsque toutes les conditions ne sont pas réunies pour la dominance de *Planktothrix agardhii*, la salinité va sélectionner l'espèce qui va concurrencer *Planktothrix agardhii*. Cependant le fait que ces événements ne soient pas pérennes confirme la persistance de la suprématie de *Planktothrix agardhii* en milieu saumâtre eutrophe.

Ainsi, la seule présence de *Planktothrix agardhii* dans un milieu eutrophe saumâtre ou dulçaquicole assure son maintien et son propre avantage sur les autres espèces phytoplanctoniques ; la luminosité / turbidité étant le facteur environnemental majeur régissant les populations de *Planktothrix agardhii* en milieu eutrophe.

**La supra-dominance de *Planktothrix agardhii* en milieu dulçaquicole et saumâtre dépend donc principalement de sa capacité à former d'importantes biomasses.** L'acclimatation à la salinité de la population de *Planktothrix agardhii* de l'étang de l'Olivier permet à l'espèce de performer des biovolumes maximaux en eau saumâtre identiques à ceux formés en eau douce. La population de *Planktothrix agardhii* de l'étang de l'Olivier favorise donc aussi bien son avantage vis-à-vis des faibles luminosités par auto-ombrage qu'en milieu dulçaquicole.

#### 4.2. L'acclimatation à la salinité de *Planktothrix agardhii* garantit sa production de MC en milieu saumâtre

Les facteurs contrôlant la production des MC et le rôle écologique de ces métabolites restent sujets à questionnement et d'un intérêt primordial en raison du danger qu'ils représentent pour la faune et l'homme [Rantala, *et al.* 2004; Sivonen & Jones 1999]. Le déterminisme des conditions environnementales dans la toxicité des efflorescences de cyanobactéries a intensément été étudié afin de tenter d'apporter des éléments de réponse à ces questions (**Annexe. C**). Cependant, il est reconnu que la prédiction de la concentration en toxine lors des efflorescences de cyanobactéries est difficile en raison de la complexité des facteurs en jeu. En effet, la variabilité de la toxicité d'une efflorescence de cyanobactérie s'exprime à différents niveaux (cf. encart rappelant la définition de quelques paramètres employés dans l'évaluation du niveau de toxicité d'une population) (**Figure 2**).



**Toxicité** : Concentration de toxine ayant un effet léthal sur 50% d'une population (= DL<sub>50</sub>).

**Concentration de toxine** : Concentration de toxine totale dosée, à un moment donné, dans un volume donné. Elle peut être intracellulaire (le milieu extracellulaire est enlevé de l'analyse), extracellulaire (les cellules ne sont pas prises en compte) ou totale (intra+extracellulaire).

**Quota en toxine** : concentration de toxine par cellule ou par unité de biomasse/biovolume de l'organisme producteur

**Taux de production de toxine** : quota en toxine produite par unité de temps

De nombreuses études témoignent de l'effet de l'environnement sur la biomasse totale de la population, sur la proportion de clones toxiques / non-toxiques cohabitant dans la population et sur le quota cellulaire en toxines. Ces paramètres expliquent la concentration de toxines *in situ* et, avec le type de variant et la proportion des variants toxiques synthétisés (qui est également influencée par l'environnement), la toxicité de l'efflorescence. Toutefois, l'effet du facteur salinité sur la concentration des MC produites lors des efflorescences de cyanobactéries est peu étudié, l'occurrence des espèces productrices de MC étant souvent considérée comme limitée aux milieux dulçaquicoles [Sivonen & Jones 1999]. Ce manuscrit démontrant pourtant la capacité d'acclimatation de *Planktothrix agardhii* à un environnement saumâtre, la nécessité d'estimer le risque procuré par ses efflorescences en milieu saumâtre est évidente.

**Notre recherche apporte des informations sur plusieurs niveaux de variabilité de la toxicité des efflorescences de *Planktothrix agardhii* potentiellement influencés par la salinité de son environnement.**

- **Tout d'abord, la salinité du milieu n'entraîne pas de modification, par rapport au milieu dulçaquicole, de la densité totale de la population potentiellement productrice de MC.** En effet la recherche démontre que la population de *Planktothrix agardhii* acclimatée à son environnement forme des biomasses très importantes en milieu saumâtre ;

- **Cette population est constituée d'un mélange de clones toxiques et non toxiques.** En effet, il a été constaté une distribution aléatoire des gènes *mcy* (gènes de biosynthèse des MC) au sein des populations de *Planktothrix agardhii*; les organismes producteurs de MC cohabitent donc avec des organismes non producteurs de MC (gènes *mcy* absents ou inactifs) [Kurmayer, *et al.* 2004]. La présence de clones toxiques dans l'étang de l'Olivier est indirectement vérifiée par la détection de MC et par l'isolement d'une souche productrice de MC, la souche 'Brack2' (correspond à la souche 'Brack' étudiée dans la partie B du chapitre II) qui présente la même valence écologique vis-à-vis de la salinité que les souches non productrices de MC (Brack0 et Brack1). Le milieu saumâtre n'est donc pas incompatible avec la présence de souches de *Planktothrix agardhii* portant les gènes *mcy* fonctionnels, tout comme la présence des gènes *mcy* n'empêche pas l'acclimatation de la souche à la salinité. Toutefois,

la proportion des clones toxiques/non toxiques (ratio T/NT) variant selon l'environnement [Briand, *et al.* 2012], il serait intéressant d'investiguer à l'avenir cette proportion en milieu saumâtre et de faire une étude expérimentale de la variation de cette proportion sous différentes salinités dans le but de tester la sélection préférentielle par la salinité d'un des deux types de souches. L'étude de l'halotolérance de *Planktothrix agardhii* en milieu contrôlé nous amène néanmoins à remarquer que la souche toxique présente une même valence écologique vis-à-vis de la salinité que les deux souches non toxiques ('Brack0' et 'Brack1'), mais présente de manière générale une meilleure croissance que les souches non toxiques, et ceci, à toutes les salinités testées. Ce résultat induirait un grand ratio T/NT dans l'environnement, et donc un plus grand risque de toxicité de l'efflorescence *in situ*. Cependant, le comportement des deux types de clones peut s'avérer différent lorsqu'ils sont en compétition [Briand, *et al.* 2008b]. De plus, notre observation repose sur l'analyse de « seulement » 3 souches, elle peut simplement être le résultat d'une variabilité physiologique entre les 3 individus, indépendante de leur caractère toxique.

Finalement, il a été montré que seul un très faible pourcentage des variations des concentrations en MC peut être expliqué par les changements du ratio T/NT, ce qui suggère que la majorité de ces variations est due à la production de MC par les cellules toxiques [Sabart, *et al.* 2010]. En effet, la différence entre la variation de biomasse de l'espèce et la dynamique toxinique est la plupart du temps expliquée par des fluctuations du contenu cellulaire en MC [Mikalsen, *et al.* 2003; Sivonen & Jones 1999].

- **Notre recherche met en évidence une dynamique temporelle de la production de MC par les cellules de *Planktothrix agardhii* en milieu saumâtre similaire à celle observée en milieu dulçaquicole.** En effet, dans des salinités non limitantes pour la croissance de *Planktothrix agardhii*, le quota en MC est maximal durant la phase de latence précédant la phase exponentielle de croissance. Cette dynamique de production est révélée par la corrélation négative existant entre le quota en MC et le biovolume total de la population. Ce résultat observé expérimentalement expliquerait le fait que le pic de concentration en MC et le pic de densité de *Planktothrix agardhii* ne soient pas observés concomitamment dans l'étang de l'Olivier, ce dernier se produisant après le pic de MC. Le quota en MC produit par *Planktothrix*

*agardhii* en milieu dulçaquicole est également souvent rapporté comme maximal durant le début des efflorescences [Janse, *et al.* 2005; Kurmayer, *et al.* 2005]. Plusieurs idées ont été proposées pour expliquer ce phénomène, dont deux hypothèses corroboreraient le résultat de notre étude expérimentale : La production de MC serait stimulée dans des faibles biomasses, ou, au contraire, la MC agirait comme un promoteur de la croissance de la population toxique expliquant pourquoi sa production diminue au fur et à mesure que la population se développe. Cette dernière hypothèse laisserait suggérer que les cellules toxiques présenteraient un avantage dans des conditions sous-optimales de croissance, et que, alors, la MC pourrait être impliquée dans le maintien de la croissance de l'organisme producteur dans des conditions défavorables [Janse, *et al.* 2005]. De toutes les façons, cette dynamique de production en MC semble évoquer l'existence d'un lien, dans un sens ou dans un autre, entre la densité de la population et la concentration de MC produite par les cellules de *Planktothrix agardhii*.

Il est important de noter qu'un autre phénomène semble se dérouler *in situ* menant également à cette dynamique toxique : certaines études montrent en effet que, lors de l'efflorescence, le ratio T/NT est très élevé au début de l'efflorescence, puis diminue durant son développement jusqu'à atteindre un minimum lorsque la densité cellulaire est maximale [Bozarth, *et al.* 2010; Briand, *et al.* 2009; Kardinaal, *et al.* 2007].

Dans tous les cas, il a été noté que les souches toxiques et non toxiques affichaient un comportement différent lorsqu'elles sont étudiées en culture monoclonale et lorsqu'elles sont en présence l'une de l'autre [Briand, *et al.* 2008b]. Ainsi, l'investigation de la dynamique du ratio T/NT ayant lieu durant le déroulement de l'efflorescence de *Planktothrix agardhii* en milieu saumâtre semble être la perspective la plus importante à mener à l'avenir, afin de conclure sur les processus régissant *in situ* la production de MC au cours de cette efflorescence.

- En dernier lieu notre recherche apporte trois éléments de réponse supplémentaires importants à la question de la toxicité des efflorescences de *Planktothrix agardhii* en milieu saumâtre :

(i) Dans des salinités optimales et sous-optimales, le taux de production des MC de *Planktothrix agardhii* durant les prémices de l'efflorescence semble proportionnel à son **taux de croissance**. Cette observation laisse entrevoir que les populations de *Planktothrix*



*agardhii* acclimatées à la salinité, conservant un taux de croissance performant dans un milieu saumâtre, sont susceptibles de produire la même quantité de MC que l'espèce en synthèse en milieu dulçaquicole. Cette information corrobore les conclusions de plusieurs études qui étayent l'hypothèse d'un impact indirect de l'environnement sur le taux de production des MC, via le taux de croissance de la population, et donc de l'intégration de la synthèse toxinique dans le métabolisme primaire [Downing, *et al.* 2005; Kurmayer 2011; Long, *et al.* 2001; Orr & Jones 1998]. Toutefois, bien que la population de *Planktothrix agardhii* acclimatée à la salinité présente une croissance quasi-optimale dans la salinité de son milieu, l'optimum se maintient dans une eau douce. Cette observation fournirait l'explication au fait que les concentrations en MC mesurées dans l'étang de l'Olivier soient situées dans la partie basse de la gamme des concentrations mesurées en milieu dulçaquicole [Sivonen & Jones 1999]. Il serait intéressant de tester la production de MC de souches de *Planktothrix agardhii* de l'étang de Bolmon afin de vérifier sa corrélation avec le taux de croissance optimal, probablement situé dans une salinité de 6.5 g.l<sup>-1</sup>.

**(ii) Une production de MC est maintenue dans des salinités non-optimales pour la croissance de *Planktothrix agardhii*.** En effet, dans des salinités permettant une croissance limitée de *Planktothrix agardhii*, les cellules produisent toujours des MC, bien que le taux de production soit plus faible que lorsque la salinité est optimale ou sous-optimale pour la croissance de la population. Ce dernier point irait dans le sens d'une synthèse constitutive des MC par *Planktothrix agardhii* [Lyck 2004]. Cette hypothèse est à prendre avec précaution, notre étude apportant l'analyse de la production de MC d'une seule souche et en milieu contrôlé ; et, de manière générale, les travaux de nombreux auteurs présentent des résultats discordants sur la régulation de la synthèse de la MC [Kardinaal, *et al.* 2007; Kosol, *et al.* 2009; Orr & Jones 1998; Wood, *et al.* 2011].

**(iii) La dynamique de production des MC par *Planktothrix agardhii* est différente selon la salinité du milieu :** Nous avons observé que, dans des salinités optimales et sous-optimales, le taux de production des MC est assuré durant les prémices de l'efflorescence, proportionnellement au taux de croissance de la population. Dans des salinités limitantes pour la croissance, le taux de production des MC semble quant à lui assuré plus tardivement durant le cycle de croissance de la population.

Par conséquent, tout comme l'analyse de la morphométrie des filaments de *Planktothrix agardhii*, l'étude de la dynamique et de l'importance du taux de production des MC fournit un indice physiologique de l'impact de la salinité du milieu sur la population de *Planktothrix agardhii*.

Toutefois, il est peu probable que dans la nature, *Planktothrix agardhii* « seulement » acclimatée (Dans le cas d'une adaptation à la salinité de *Planktothrix agardhii*, les salinités 10 et 12.5 ne constitueraient probablement pas des conditions défavorables pour la croissance), puisse dominer le phytoplancton et assurer des proliférations toxiques dans une salinité non-optimale, celle-ci ne menant pas à d'aussi fortes biomasses de l'espèce que dans des salinités optimales ou sous-optimales.

- **A ce dernier élément, il convient d'ajouter que la souche de *Planktothrix agardhii* issue de l'étang de l'Olivier synthétise les mêmes types et proportions de variants de MC que ceux communément rapportés en milieu dulçaquicole [Fastner, *et al.* 1999b],** laissant entrevoir une toxicité des efflorescences de *Planktothrix agardhii* non modifiée par la salinité du milieu. Cependant, cette conclusion doit être nuancée par le fait que l'analyse des variants de MC a été réalisée sur une seule souche de *Planktothrix agardhii*. Il apparaît donc nécessaire de reproduire cette analyse sur d'autres souches de milieux saumâtres ainsi que sur la dynamique des variants de MC produits *in situ* par la population saumâtre, afin de pouvoir conclure sur la toxicité des efflorescences de *Planktothrix agardhii* en milieu saumâtre.

Finalement, à ce risque de toxicité dû à la production de MC par *Planktothrix agardhii* en milieu saumâtre, s'ajoute celui d'autres cyanotoxines, l'espèce étant potentiellement capable de produire d'autres toxines dangereuses pour la faune et l'homme, telles que des aplysiatoxines (dermatotoxines), des homoanatoxines-a et anatoxines-a (neurotoxines) ou encore des saxitoxines [Pomati, *et al.* 2000; Sivonen & Jones 1999].

**En conclusion, cette recherche démontre que *Planktothrix agardhii* s'acclimate et s'adapte à la salinité de son environnement, garantissant sa suprématie au sein de la communauté phytoplanctonique et semblant optimiser sa production de MC en milieu saumâtre de manière quasi-identique à celles observées en milieu dulçaquicole (Figure 3).**

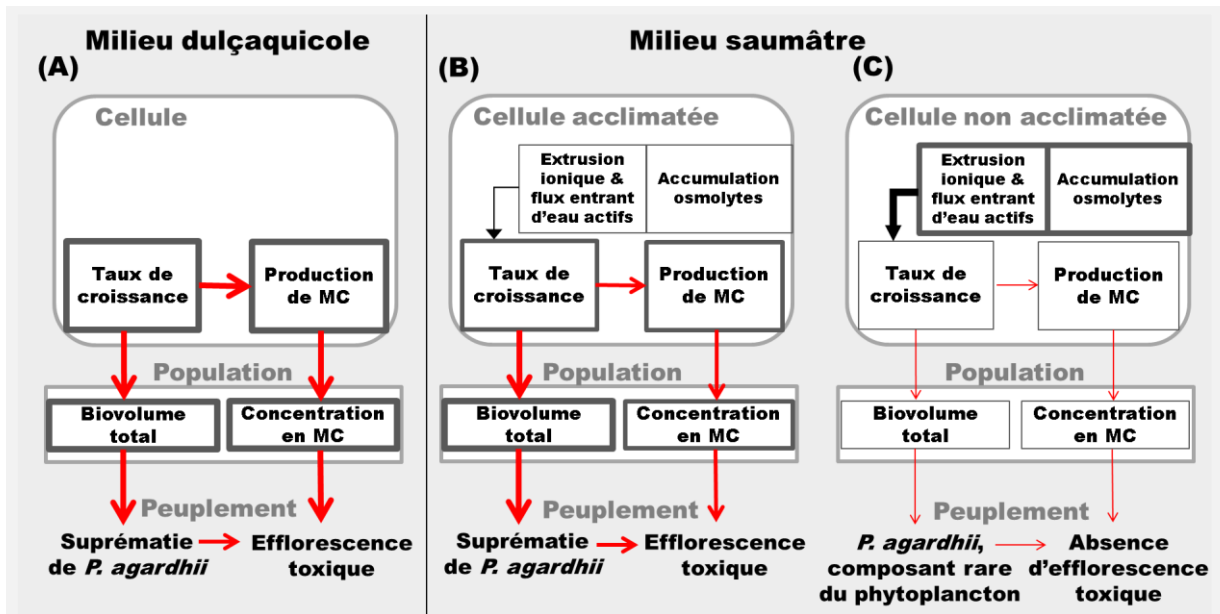


Figure 3 Hypothèse de la conséquence de l'acclimatation à la salinité de *Planktothrix agardhii* sur sa performance à produire des efflorescences toxiques.

Cellule de *Planktothrix agardhii* dans un milieu d'eau douce (A), cellules de *Planktothrix agardhii* acclimatée (B) et non acclimatée à la salinité (C) en milieu saumâtre

L'épaisseur des flèches et de l'encadrement des processus cellulaires indique l'importance potentiellement imputée aux événements.

La recherche présentée ici apporte les premiers éléments de réponse à la production de MC par *Planktothrix agardhii* en milieu saumâtre, ainsi que l'influence potentielle que peut exercer la salinité sur cette production. Cependant, comme il a été dit au fur et à mesure de ce dernier paragraphe, certaines investigations sont nécessaires afin de valider les hypothèses formulées. De plus, l'ensemble des travaux réalisés dans le but d'appréhender le déterminisme de l'environnement sur la production toxinique des cyanobactéries laisse apercevoir l'impossibilité actuelle de réaliser un modèle général, les différents niveaux explicatifs de la variabilité toxinique des efflorescences de cyanobactéries affichant des différences de réponses selon les conditions d'expérimentation, l'espèce, la/les souche(s) étudiée(s) et le site d'étude [Manganelli, *et al.* 2012]. Par surcroît, la liste des hypothèses formulées sur la fonction des MC, qui fournirait un indice de taille sur la caractérisation de sa régulation, semble s'allonger au fur et à mesure de son investigation, obscurcissant encore la compréhension de sa production dans la nature [Zilliges, *et al.* 2011].

### 5. L'effondrement de la suprématie de *Planktothrix agardhii* entraîne la rupture d'équilibre de la communauté phytoplanctonique de l'étang de Bolmon

Notre recherche démontre que l'effondrement de la suprématie de *Planktothrix agardhii* est la conséquence de la hausse de salinité survenue dans l'étang de Bolmon. Cette observation a permis de mettre en évidence *in situ* le seuil d'halotolérance de la population de *Planktothrix agardhii* de l'étang de Bolmon, situé entre 10.5 et 16 g.l<sup>-1</sup>. Ce seuil est similaire à celui déterminé expérimentalement sur la population de l'étang de l'Olivier. Comme il a été dit plus haut, la salinité des étangs de Bolmon et d'Olivier ne franchissant jamais 12 g.l<sup>-1</sup>, la tolérance de *Planktothrix agardhii* à une salinité plus élevée ne fournissait pas un avantage à la population. On peut imaginer qu'un milieu dont les limites et la moyenne de salinité augmentent au cours du temps, puisse fournir la possibilité à l'espèce de former des génotypes sélectionnés par la salinité de l'environnement. Ainsi, le seuil d'halotolérance déterminé dans cette recherche témoigne de la capacité d'adaptation et d'acclimatation des cyanobactéries, sans avoir pour but de redéfinir la valence écologique de *Planktothrix agardhii* vis-à-vis de la salinité.

**La détermination de l'effet du stress halin sur le phytoplancton de l'étang de Bolmon démontre que la suprématie de *Planktothrix agardhii* induit à elle seule la définition de la niche écologique des espèces phytoplanctoniques**, phénomène laissant suggérer la caractérisation de l'étang de Bolmon préalablement au stress halin comme un milieu en 'steady-state' [Naselli-Flores & Barone 2003]. En effet, si la supra-dominance du phytoplancton par *Planktothrix agardhii* n'est plus assurée, l'habitat est totalement modifié, entraînant la rupture de l'équilibre du phytoplancton qui se manifeste par la modification structurale et fonctionnelle de la communauté. Cette modification constitue le symptôme de la sortie de la communauté phytoplanctonique de son domaine de stabilité, entraînant l'installation d'un peuplement probablement transitoire. La hausse de salinité survenue dans l'étang de Bolmon constitue donc un stress pour l'écosystème entier, uniquement parce qu'il dépasse le seuil de compensation de l'espèce dominante, corroborant les observations de Flöder *et al.* [2010]. En effet, notre recherche démontre que le déclin puis la disparition de *Planktothrix agardhii* de la colonne d'eau entraîne la modification de la niche écologique alors propice au développement d'espèces opportunistes préalablement rares. Cette niche est conséquemment définie par la

disparition de l'ombrage qui était assuré par les Oscillatoriales et la disponibilité en nutriment. On ne peut toutefois pas écarter la possibilité d'une modification de la communauté des prédateurs par conséquence directe de la hausse de salinité ou indirecte par la modification de la communauté phytoplanctonique.

**Un des acquis de l'étude est la caractérisation structurale et fonctionnelle du peuplement phytoplanctonique succédant à un stress exercé sur une communauté caractéristique des milieux en 'turbid stable state'.** Cette communauté dominée par la cyanobactérie filamenteuse *Planktothrix agardhii* (codon S1) laisse place au développement d'une communauté phytoplanctonique constituée d'espèces de chlorophytes et de cyanobactéries picoplanctoniques et coloniales (codons K, Lo, X1 et F). La caractéristique la plus frappante de cette nouvelle communauté est sa constitution quasi-exclusive de cellules de petite taille. Ce trait fonctionnel est généralement caractéristique des milieux en phase de transition après une perturbation, ou encore, de milieux lagunaires. Il est également prévu que, sous le réchauffement climatique, le peuplement phytoplanctonique soit dominé par des organismes de petite taille. Cependant, Huertas *et al.* [2011] suggèrent que l'origine de cette dominance proviendrait, non pas d'un impact direct de la température, mais de la modification du broutage préférentiel. Ainsi, nous ne pouvons pas écarter la possibilité que la dominance de petites cellules phytoplanctoniques dans l'étang de Bolmon soit la conséquence indirecte du stress halin par la modification du broutage exercé dans le milieu.

**La grande question de l'étude de l'étang de Bolmon, encore sans réponse, reste celle de la possibilité du retour de *Planktothrix agardhii*.** La modification de la communauté phytoplanctonique indiquant son changement de domaine de stabilité, tend à réfuter le retour vers le domaine de stabilité préalable dominé par *Planktothrix agardhii*. De même, aujourd'hui, c'est-à-dire près de 5 ans après le stress halin, *Planktothrix agardhii* ne présente toujours pas de signe de retour dans le milieu. Inversement, quelques éléments peuvent étayer l'hypothèse du retour de *Planktothrix agardhii*, comme l'observation d'un état alternatif ayant lieu dans certains lacs démontrant la possibilité d'un retour rapide de la dominance du phytoplancton par *Planktothrix agardhii* [Scheffer, *et al.* 1993], la détermination de quelques filaments après le stress halin semblant présenter la même adaptation à la salinité du milieu, ou l'observation d'un

rétablissement très long d'un écosystème après une modification de gestion [Jeppesen, *et al.* 2007; Liere & Janse 1992].

### **6. Réflexions sur l'issue de la recherche dans son contexte local de réhabilitation des milieux**

Un des contextes de réalisation de l'étude est celui d'une volonté de réhabilitation de l'étang de Berre, via un aménagement hydrique amenant de l'eau de mer dans l'étang de Bolmon et l'étang de Berre. Peut-on envisager ce type de stress halin comme outil de remédiation écologique à l'échelle d'un étang eutrophe ?

L'eutrophisation accélérée des écosystèmes due à l'anthropisation est la cause de nombreux symptômes du 'mauvais' état écologique de nombreux milieux aquatiques. Cette eutrophisation augmentant au fur et à mesure de l'anthropisation, amène la nécessité de développer des outils de remédiation. Les eaux eutrophes sont notamment affectées par des fortes proliférations de cyanobactéries et par conséquent, sont souvent rapportées comme contenant de fortes concentrations en cyanotoxines [Dolman, *et al.* 2012]. Les nuisances provoquées par ces HAB ('Harmful Algal Blooms') entraînent un coût économique important, ce qui tend à augmenter la demande d'établissement de stratégies de gestion visant à prévenir, supprimer ou tout au plus contenir ces phénomènes [Hudnell 2010]. Les milieux lagunaires en particulier sont souvent le sujet de projets de restauration, car ces milieux très fragiles et de courte durée de vie à l'échelle des temps géologiques constituent généralement une richesse de biodiversité et une richesse économique [Håkanson & Bryhn 2008]. La salinité jouant un rôle important dans les communautés phytoplanctoniques des milieux lagunaires [Melo, *et al.* 2007; Rojo & Miracle 1989], des projets de gestion étudient l'emploi de la modification de salinité comme moyen de remédiation de ces écosystèmes [Håkanson & Bryhn 2008; Verspagen, *et al.* 2006].

De manière générale, la prévision de l'effet d'une modification de gestion d'un écosystème sur son compartiment phytoplanctonique apparaît indispensable, celui-ci étant à la base du réseau trophique des milieux aquatiques. Cet effet va notamment être dépendant du type d'aménagement qui va influencer la perturbation de l'écosystème (long, court,

changement permanent ou transitoire, entrée d'eau salée, diminution des rejets d'eau douce). Le mode de gestion envisagé dans le contexte de notre étude risque vraisemblablement de constituer un stress de par la modification subite et abrupte de la salinité qu'elle va provoquer, et la chasse hydraulique qu'elle exercera sur les communautés. Nos travaux portent sur l'effet d'un stress halin à durée limitée provenant d'une diminution de l'apport en eaux douces du milieu. Les espèces qui se développent, suite à cette modification de gestion, sont des espèces endogènes qui étaient rares ou accessoires dans le peuplement préalable au stress halin. Dans le cas d'une gestion comme celle-ci, il serait alors possible d'estimer le peuplement susceptible de se développer par la recherche des caractéristiques potentiellement opportunistes des espèces en présence.

De toutes les façons, le mode de gestion envisagé pour l'étang de Berre entraînerait une augmentation de la salinité, non pas par la diminution des rejets d'eau douce mais par une entrée d'eau salée provenant de la mer Méditerranée. Il paraît alors difficile de prévoir quelles espèces vont se maintenir et devenir dominantes, puisqu'il y aura un apport d'espèces exogènes qui s'ajouteront aux espèces présentes. Parmi celles-ci, seules seront sélectionnées les espèces résistantes au stress, aux courants et à la nouvelle salinité du milieu qui sera variable selon les courants et située entre la salinité actuelle et celle de la mer Méditerranée. De plus, ce mode de gestion peut entraîner l'apport d'espèces euryhalines dangereuses provenant de la mer Méditerranée [Vila & Masó 2005] telle que la dinoflagellée toxique *Ostreopsis ovata*.

Bien que la modification de salinité puisse être présentée comme une solution afin d'éliminer ou d'atténuer certaines nuisances, une modification de la communauté phytoplanctonique est susceptible de se répercuter sur les différents niveaux trophiques supérieurs et donc de modifier le fonctionnement global de l'écosystème. En effet, si notre étude démontre qu'une augmentation de salinité atteignant le seuil de tolérance de *Planktothrix agardhii* entraîne sa disparition de la colonne d'eau, elle indique également que l'élimination de la cyanobactérie dominante d'un écosystème risque d'entraîner la modification du peuplement phytoplanctonique total, ce qui est susceptible d'entraîner à son tour le bouleversement du fonctionnement de tout le réseau trophique. Ainsi, le changement de la communauté phytoplanctonique vers une dominance d'espèces de petite taille comme dans notre étude, et comme il est fréquemment trouvé dans un écosystème stressé [Gray 1989], peut être

accompagné par l'augmentation de la proportion de petites espèces de zooplancton [Gamble, *et al.* 1977]. Il convient aussi de noter qu'à ce risque s'ajoute celui de l'occurrence d'un pic de toxicité car, lorsque les cellules de cyanobactéries meurent, elles relâchent leurs toxines dans le milieu (la grande proportion des concentrations en cyanotoxines étant intracellulaire).

En règle générale, le retour du bon état trophique d'un milieu implique le rétablissement de l'équilibre entre les différents maillons de la chaîne alimentaire. Il paraît difficile de trouver le mode de gestion hydraulique à concevoir pour remplir cette condition, en raison de la difficulté à prévoir le comportement de chaque compartiment biotique, et de la complexité des interactions du réseau trophique. Hakanson *et al.* [2008] ont par exemple étudié la potentialité de gestion hydraulique d'une lagune eutrophe avec pour objectif de diminuer la turbidité du milieu et d'obtenir une clarté de l'eau de 2 mètres de Secchi. Les auteurs concluent qu'une augmentation de salinité permanente et sans fluctuation, combinée avec une diminution des apports nutritifs seraient susceptibles d'approcher cet objectif. Cependant ils discutent de la difficulté de son accomplissement, celle-ci nécessitant la réalisation d'un équilibre entre la sédimentation des particules en suspension de la colonne d'eau induite par l'augmentation de salinité, le développement du phytoplancton favorisé par la luminosité de la colonne d'eau induite par cette sédimentation, et le développement des espèces des compartiments trophiques supérieurs nécessaire pour le bon fonctionnement de la chaîne alimentaire et donc de l'écosystème, ces espèces étant susceptibles d'être affectées par la hausse de salinité. Finalement, il convient d'ajouter que la meilleure stratégie de gestion des HAB, ou, plus généralement de remédiation d'un milieu eutrophe, doit nécessairement inclure la réduction des apports nutritifs afin de juguler le problème à sa source [Paerl & Otten 2013].



## 7. Réflexions sur l'issue de la recherche dans un contexte de changement global

Aujourd'hui, le changement climatique est considéré comme un catalyseur de l'expansion des efflorescences de cyanobactéries, particulièrement dans des eaux eutrophes [Paerl & Huisman 2008].

Face à la modification d'un facteur environnemental, les espèces peuvent soit migrer vers des habitats plus hospitaliers, soit tolérer les nouvelles conditions par leur plasticité phénotypique et physiologique, ou encore s'adapter aux nouvelles conditions par des changements génétiques via le processus évolutif [Huertas, *et al.* 2011]. Le succès des cyanobactéries, dans le futur, est prévu notamment en raison de leurs nombreuses caractéristiques morphologiques et physiologiques qui leur permettraient l'exploitation avec succès de la plupart des *scenarii* du changement climatique global [Carey, *et al.* 2012]. Ces organismes, par leur aptitude à présenter des phénotypes plastiques et donc réversibles, sont en effet avantagés dans des environnements variables, leur plasticité permettant l'ajustement de leur réponse face à l'environnement, augmentant ainsi leur potentiel invasif [Stal 2007]. La formation d'écotypes présentant des tolérances environnementales différentes, comme nous venons de le voir pour l'espèce *Planktothrix agardhii*, va promouvoir la versatilité de l'espèce, renforçant son aptitude à coloniser puis à assurer son succès dans différentes conditions [Bonilla, *et al.* 2012].

Lorsque les changements excèdent les limites physiologiques, la survie des espèces dépend uniquement de l'évolution adaptative qui est, elle-même, gouvernée par l'occurrence des mutations conférant la résistance et la sélection qui s'ensuit. Les cyanobactéries possèdent un avantage supplémentaire de taille face aux autres groupes phytoplanctoniques : Leur haploïdie garantit leur évolution adaptative plus rapide, par l'expression plus rapide de leurs mutations et donc la sélection également plus rapide de celles-ci [Sniegowski & Lenski 1995]. De plus, il a été mis en évidence une plasticité du génome de certaines cyanobactéries comme par exemple celui d'une souche de *Microcystis aeruginosa* qui présente des longues séquences d'ADN répétées, une grande proportion de gènes codant potentiellement pour des transposases et des enzymes de restriction, indiquant une grande potentialité de recombinaison génétique [Frangeul, *et al.* 2008]. Ainsi les cyanobactéries développent

également des stratégies génétiques d'adaptation les amenant à sans cesse développer leur pouvoir invasif dans tous types de milieu.

Notre recherche apporte un témoignage de ce double avantage compétitif des cyanobactéries : Elle démontre la capacité de *Planktothrix agardhii* à s'acclimater à la salinité grâce à sa plasticité physiologique permettant son succès et sa production toxinique dans une eau saumâtre et à s'adapter lorsque la pression de sélection est plus forte.

Ainsi, notre étude rend compte du risque de la persistance des cyanobactéries dans un contexte de salinisation progressive des milieux, mais également de leur capacité d'expansion vers de nouvelles niches écologiques dans un contexte de changement global. Par exemple, les cyanobactéries dulçaquicoles vont pouvoir coloniser les estuaires et les milieux côtiers, via les fortes précipitations et inondations qui jouent un rôle important dans le transport des cyanobactéries [Funari, *et al.* 2012]. En effet, il été observé la présence d'une souche de *Microcystis aeruginosa* en milieu saumâtre (espèce pourtant typiquement dulçaquicole), dont le génome est identique à celui de la population vivant dans les lacs dulçaquicoles voisins, indiquant le transport puis l'acclimatation à la salinité de la souche (la salinité n'étant pas assez élevée pour avoir exercé une pression nécessitant l'adaptation de la souche) [Lin, *et al.* 2011]. De manière générale, *Microcystis aeruginosa* semble étendre sa distribution aux milieux saumâtres, l'espèce ayant été rapportée comme proliférant dans un lac saumâtre en Chine, dans la baie de San Francisco, ou encore dans l'estuaire de Breton Sound en Louisiane [Lehman, *et al.* 2005; Lin, *et al.* 2011]. Tout comme *Planktothrix agardhii* dans notre étude, *Microcystis* est capable de développer une tolérance à la salinité et présente un quota cellulaire en toxine non impacté par des salinités s'élevant jusqu'à 10 g.l<sup>-1</sup> [Tonk, *et al.* 2007].

Ainsi, de manière générale, notre recherche va dans le sens de la supra-dominance des cyanobactéries et de leur potentialité d'expansion dans les milieux aquatiques dans les milieux saumâtres.

En conclusion, les apports de notre recherche, qui repose sur la réalisation couplée de suivis *in situ* et d'expérimentations en milieu contrôlé, sont :

- (i) La démonstration de la versatilité écologique de *Planktothrix agardhii* par sa capacité à s'acclimater et à s'adapter à la salinité de son environnement, témoignant de la plasticité métabolique et génétique des cyanobactéries ;
- (ii) La caractérisation de la variation de la morphométrie des filaments de *Planktothrix agardhii* en tant que témoin de cette versatilité ;
- (iii) La caractérisation de la dynamique spatio-temporelle et toxinique de *Planktothrix agardhii* en milieu saumâtre méditerranéen ;
- (iv) La démonstration de l'implication de l'acclimatation de *Planktothrix agardhii* dans :
  - sa capacité à former des biomasses importantes assurant sa suprématie en milieu saumâtre ;
  - son optimisation du taux de croissance semblant maintenir sa production toxinique en milieu saumâtre ;
- (v) La démonstration du stress halin survenu dans l'étang de Bolmon à franchissant le seuil d'halotolérance de *Planktothrix agardhii* à l'origine de son déclin, celui-ci entraînant alors la sortie de l'écosystème de son état d'équilibre ;
- (vi) La caractérisation du peuplement phytoplanctonique transitoire succédant à un stress halin en milieu lagunaire ;
- (vii) Des éléments d'informations sur le comportement des cyanobactéries face à la salinisation des milieux dans un contexte de changement global ;
- (viii) Le témoignage de l'aptitude des cyanobactéries à être de bons compétiteurs, laissant présager leur persistance, la continuité de leurs nuisances, et leur expansion dans le futur.







## Références bibliographiques





## Références bibliographiques

---

**Akcaalan 2006**

Microcystin analysis in single filaments of *Planktothrix spp.* in laboratory cultures and environmental blooms. *Water Research* 40(8).

**Allakhverdiev & Murata 2008**

Salt stress inhibits photosystems II and I in cyanobacteria. *Photosynthesis Research* 98(1).

**Anagnostidis 1988**

Modern approach to the classification system of cyanophytes. 3 - Oscillatoriales *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes* No. 50-53.

**Anagnostidis & Komárek 1988**

Modern approach to the classification system of cyanophytes. 3 - Oscillatoriales *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes* No. 50-53.

**Bahnwart, et al. 1998**

Downstream changes in phytoplankton composition and biomass in a lowland river-lake system (Warnow River, Germany). *Hydrobiologia* 391(1).

**Barnes, ed.**

1980 Coastal lagoons. Volume 1. Cambridge: Cambridge University Press.

**Barron, et al. 2002**

Effects of varying salinity on phytoplankton growth in a low-salinity coastal pond under two nutrient conditions. *Biological Bulletin* 203(2).

**Bellinger & Sigeo 2010**

A Key to the More Frequently Occurring Freshwater Algae: John Wiley & Sons, Ltd.

**Bergmann, et al. 2008**

Salinity tolerance of the chlorophyll b-synthesizing cyanobacterium *Prochlorothrix hollandica* strain SAG 10.89. *Microbial Ecology* 55(4).

**Bhaya, et al. 2002**

Molecular Responses to Environmental Stress. *In* The Ecology of Cyanobacteria. B. Whitton and M. Potts, eds. Pp. 397-442: Springer Netherlands.

**Blandin & Lamotte 1984**

Ecologie des systèmes et aménagement: fondement théoriques et principes méthodologiques. *In* Fondements rationnels de l'aménagement d'un territoire. M. Lamotte, ed. Pp. 139-162. Paris: Masson.

**Bonilia, et al. 2005**

Influence of hydrology on phytoplankton species composition and life strategies in a subtropical coastal lagoon periodically connected with the Atlantic Ocean. *Estuaries* 28(6).

**Bonilla, et al. 2012**

What drives the distribution of the bloom-forming cyanobacteria *Planktothrix agardhii* and *Cylindrospermopsis raciborskii*? *Fems Microbiology Ecology* 79(3).

## Références bibliographiques

---

### **Bourelly 1981**

Les algues d'eau douces. Initiation à la systématique. Tome 2 : les algues jaunes et brunes. Chrysophycées, Phéophycées, Xanthophycées et Diatomées Volume 2. Paris: Boubée.

### **Bourelly 1985**

Les algues d'eau douces. Initiation à la systématique. Tome 3 : les algues bleues et rouges, les Eugléniens, Péridiniens et Cryptomonadines. Volume 3. Paris: Boubée.

### **Bourelly 1990**

Les algues d'eau douces. Initiation à la systématique. . Tome 1 : les algues vertes. . Volume 1. Paris: Boubée.

### **Bozarth, *et al.* 2010**

Population Turnover in a Microcystis Bloom Results in Predominantly Nontoxic Variants Late in the Season. *Applied and Environmental Microbiology* 76(15).

### **Briand, *et al.* 2012**

Evidence of the Cost of the Production of Microcystins by *Microcystis aeruginosa* under Differing Light and Nitrate Environmental Conditions. *Plos One* 7(1).

### **Briand, *et al.* 2009**

Spatiotemporal changes in the genetic diversity of a bloom-forming *Microcystis aeruginosa* (cyanobacteria) population. *Isme Journal* 3(4).

### **Briand, *et al.* 2008a**

Temporal variations in the dynamics of potentially microcystin-producing strains in a bloom-forming *Planktothrix agardhii* (cyanobacterium) population. *Applied and Environmental Microbiology* 74(12).

### **Briand, *et al.* 2005**

Variations in the Microcystin Production of *Planktothrix rubescens* (Cyanobacteria) Assessed from a Four-Year Survey of Lac du Bourget (France) and from Laboratory Experiments. *Microbial Ecology* 50(3).

### **Briand, *et al.* 2002**

A perennial bloom of *Planktothrix agardhii* (Cyanobacteria) in a shallow eutrophic French lake: limnological and microcystin production studies. Volume 153. Stuttgart, ALLEMAGNE: Schweizerbart.

### **Briand, *et al.* 2008b**

Competition between microcystin- and non-microcystin-producing *Planktothrix agardhii* (cyanobacteria) strains under different environmental conditions. *Environmental Microbiology* 10(12).

### **Budzynska, *et al.* 2009**

The dynamics of a *Planktothrix agardhii* population in a shallow dimictic lake. *Oceanological and Hydrobiological Studies* 38.

## Références bibliographiques

---

**Carey, *et al.* 2012**

Eco-physiological adaptations that favour freshwater cyanobacteria in a changing climate. *Water Research* 46(5).

**Carmichael 1992**

Cyanobacteria secondary metabolites—the cyanotoxins. *Journal of Applied Microbiology* 72(6).

**Carmichael 2001**

Health effects of toxin-producing cyanobacteria: "The CyanoHABs". *Human and Ecological Risk Assessment* 7(5).

**Carstensen & Heiskanen 2007**

Phytoplankton responses to nutrient status: application of a screening method to the northern Baltic Sea. *Marine Ecology-Progress Series*.

**Catherine, *et al.* 2008**

Collapse of a *Planktothrix agardhii* perennial bloom and microcystin dynamics in response to reduced phosphate concentrations in a temperate lake. *Fems Microbiology Ecology* 65(1).

**Chomerat 2005**

Patrons de réponse du phytoplancton à la variabilité des facteurs abiotiques dans un étang méditerranéen hypereutrophe: succès écologique de *Planktothrix agardhii* (Gom.) Anagn. & Kom. (cyanoprocaryste) dans un écosystème saumâtre, Thèse.

**Chomerat, *et al.* 2007**

Seasonal succession of cyanoprokaryotes in a hypereutrophic oligo-mesohaline lagoon from the South of France. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 72(4).

**Chorus & Bartram, eds.**

1999 Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. London and New York: E & FN Spon.

**Chorus & Schlag 1993**

Importance of intermediate disturbances for the species composition and diversity of phytoplankton in two very different Berlin lakes. *Hydrobiologia* 249(1-3).

**Christiansen, *et al.* 2003**

Microcystin biosynthesis in *Planktothrix*: Genes, evolution, and manipulation. *Journal of Bacteriology* 185(2).

**Christiansen, *et al.* 2008**

Nontoxic strains of cyanobacteria are the result of major gene deletion events induced by a transposable element. *Molecular Biology and Evolution* 25(8).

**Codd, *et al.* 2005**

Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicology and Applied Pharmacology* 203(3).

## Références bibliographiques

---

**Cox 1996**

Identification of Freshwater Diatoms from Live Material. London· Weinheim . New York· Tokyo· Melbourne· Madras: Chapman & Hall.

**Dadheech 2010**

Desiccation tolerance in cyanobacteria. *African Journal of Microbiology Research* 4(15).

**Dajoz 1985**

Précis d'écologie. Paris: Dunod.

**DasSarma & DasSarma 2001**

Halophiles: John Wiley & Sons, Ltd.

**Davis, et al. 2009**

The effects of temperature and nutrients on the growth and dynamics of toxic and non-toxic strains of *Microcystis* during cyanobacteria blooms. *Harmful Algae* 8(5).

**Davis & Walsby 2002**

Comparison of measured growth rates with those calculated from rates of photosynthesis in *Planktothrix* spp. isolated from Blelham Tarn, English Lake District. *New Phytologist* 156(2).

**Day, et al. 2012**

Estuarine Ecology: Wiley.

**de Figueiredo, et al. 2006**

The effect of environmental parameters and cyanobacterial blooms on phytoplankton dynamics of a Portuguese temperate lake. *Hydrobiologia* 568.

**Dokulil & Teubner 2000**

Cyanobacterial dominance in lakes. *Hydrobiologia* 438(1).

**Dokulil & Teubner 2012**

Deep living *Planktothrix rubescens*; modulated by environmental constraints and climate forcing. *Hydrobiologia*.

**Dolman, et al. 2012**

Cyanobacteria and Cyanotoxins: The Influence of Nitrogen versus Phosphorus. *Plos One* 7(6).

**Downing, et al. 2005**

Medium N : P ratios and specific growth rate comodule microcystin and protein content in *Microcystis aeruginosa* PCC7806 and *Microcystis aeruginosa* UV027. *Microbial Ecology* 49(3).

**Druart & Rimet 2008**

Protocoles d'analyse du phytoplancton de l'INRA : Prélèvement, dénombrement et biovolumes.

**Edwards, et al. 2013**

Functional traits explain phytoplankton community structure and seasonal dynamics in a marine ecosystem. *Ecology Letters* 16(1).

## Références bibliographiques

---

**Fastner, et al.** 1999a

Characterization and diversity of microcystins in natural blooms and strains of the genera *Microcystis* and *Planktothrix* from German freshwaters. *Archiv Fur Hydrobiologie* 145(2).

**Fastner, et al.** 1998

Optimised extraction of microcystins from field samples - A comparison of different solvents and procedures. *Water Research* 32(10).

**Fastner, et al.** 1999b

Microcystins (hepatotoxic heptapeptides) in German fresh water bodies. *Environmental Toxicology* 14(1).

**Fathalli, et al.** 2011

Molecular and phylogenetic characterization of potentially toxic cyanobacteria in Tunisian freshwaters. *Systematic and Applied Microbiology* 34(4).

**Ferjani, et al.** 2003

Glucosylglycerol, a compatible solute, sustains cell division under salt stress. *Plant Physiology* 131(4).

**Floder, et al.** 2010

Dominance and compensatory growth in phytoplankton communities under salinity stress. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 395(1-2).

**Frangeul, et al.** 2008

Highly plastic genome of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806, a ubiquitous toxic freshwater cyanobacterium. *Bmc Genomics* 9(1).

**Funari, et al.** 2012

Impact of climate change on waterborne diseases. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità* 48.

**Gamble, et al.** 1977

Loch Ewe Bag Experiment, 1974. *Bulletin of Marine Science* 27(1).

**Garcia-Pichel, et al.** 1998

The phylogeny of unicellular, extremely halotolerant cyanobacteria. *Archives of Microbiology* 169(6).

**Graneli & Turner** 2006

Ecology of harmful algae: Springer Berlin Heidelberg.

**Gray** 1989

Effects of environmental stress on species rich assemblages. *Biological Journal of the Linnean Society* 37(1-2).

**Hagemann** 2011

Molecular biology of cyanobacterial salt acclimation. *Fems Microbiology Reviews* 35(1).

## Références bibliographiques

---

**Håkanson & Bryhn 2008**

Goals and remedial strategies for water quality and wildlife management in a coastal lagoon—A case-study of Ringkøbing Fjord, Denmark. *Journal of Environmental Management* 86(3).

**Halstvedt, et al. 2007**

Seasonal dynamics and depth distribution of *Planktothrix* spp. in Lake Steinsfjorden (Norway) related to environmental factors. *Journal of Plankton Research* 29(5).

**Hasler & Poulickova 2003**

Diurnal changes in vertical distribution and morphology of a natural population of *Planktothrix agardhii* (Gom.) Anagnostidis et Komarek (Cyanobacteria). *Hydrobiologia* 506(1-3).

**Havens 2008**

Cyanobacteria blooms: effects on aquatic ecosystems. In Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs. H.K. Hudnell, ed. Pp. 733-747. Advances in Experimental Medicine and Biology: Springer New York.

**Havens, et al. 1998**

Light availability as a possible regulator of cyanobacteria species composition in a shallow subtropical lake. *Freshwater Biology* 39(3).

**Heisler, et al. 2008**

Eutrophication and harmful algal blooms: A scientific consensus. *Harmful Algae* 8(1).

**Hillebrand, et al. 1999**

Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of Phycology* 35(2).

**Hu, et al. 2012**

Comparing biological classifications of freshwater phytoplankton: a case study from South China. *Hydrobiologia*.

**Hudnell 2010**

The state of US freshwater harmful algal blooms assessments, policy and legislation. *Toxicon* 55(5).

**Huertas, et al. 2011**

Warming will affect phytoplankton differently: evidence through a mechanistic approach. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*.

**Huisman, et al. 2004**

Changes in turbulent mixing shift competition for light between phytoplankton species. *Ecology* 85(11).

**Ibelings & Chorus 2007**

Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater "seafood" and its consequences for public health: A review. *Environmental Pollution* 150(1).

**IPCC 2007**

IPCC fourth assessment report: climate change 2007.

## Références bibliographiques

---

Izaguirre, *et al.* 2012

Comparison of morpho-functional phytoplankton classifications in human-impacted shallow lakes with different stable states. *Hydrobiologia* 698(1).

Jaanus, *et al.* 2011

Changes in phytoplankton communities along a north-south gradient in the Baltic Sea between 1990 and 2008. *Boreal Environment Research* 16.

Jahnichen, *et al.* 2007

Impact of inorganic carbon availability on microcystin production by *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Applied and Environmental Microbiology* 73.

Jakobsen & Tang 2002

Effects of protozoan grazing on colony formation in *Phaeocystis globosa* (Prymnesiophyceae) and the potential costs and benefits. *Aquatic Microbial Ecology* 27(3).

Janse, *et al.* 2005

Contrasting microcystin production and cyanobacterial population dynamics in two *Planktothrix*-dominated freshwater lakes. *Environmental Microbiology* 7(10).

Janse, *et al.* 2004

Toxic and Nontoxic *Microcystis* Colonies in Natural Populations Can Be Differentiated on the Basis of rRNA Gene Internal Transcribed Spacer Diversity. *Applied and Environmental Microbiology* 70(7).

Jeppesen, *et al.* 2007

Restoration of shallow lakes by nutrient control and biomanipulation—the successful strategy varies with lake size and climate. *Hydrobiologia* 581(1).

Jochimsen, *et al.* 2013

Compensatory dynamics and the stability of phytoplankton biomass during four decades of eutrophication and oligotrophication. *Ecology Letters* 16(1).

Johnk, *et al.* 2008

Summer heatwaves promote blooms of harmful cyanobacteria. *Global Change Biology* 14(3).

Jones & Chorus 2001

"Toxic cyanobacteria - Towards a global perspective," Fifth International Conference on Toxic Cyanobacteria, Noosa, Queensland, Australia, July 15-20, 2001. *Environmental Toxicology* 16(6).

Kaebernick & Neilan 2001

Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *Fems Microbiology Ecology* 35(1).

Kaebernick, *et al.* 2000

Light and the Transcriptional Response of the Microcystin Biosynthesis Gene Cluster. *Applied and Environmental Microbiology* 66(8).

## Références bibliographiques

---

**Kahm, *et al.* 2010**

grofit: Fitting biological growth curves with R. *Journal of Statistical Software* 33(7).

**Kanesaki, *et al.* 2002**

Salt stress and hyperosmotic stress regulate the expression of different sets of genes in *Synechocystis sp* PCC 6803. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 290(1).

**Kangro, *et al.* 2005**

Long-term Changes and Seasonal Development of Phytoplankton in a Strongly Stratified, Hypertrophic Lake. *Hydrobiologia* 547(1).

**Kanoshina, *et al.* 2003**

The influence of weather conditions (temperature and wind) on cyanobacterial bloom development in the Gulf of Finland (Baltic Sea). *Harmful Algae* 2(1).

**Karadzic, *et al.* 2010**

Phytoplankton and eutrophication development in the water supply reservoirs Garasi and Bukulja (Serbia). *Desalination* 255(1-3).

**Kardinaal, *et al.* 2007**

Competition for light between toxic and nontoxic strains of the harmful cyanobacterium *Microcystis*. *Applied and Environmental Microbiology* 73(9).

**Keil, *et al.* 2002**

Toxicity and microcystin content of extracts from a *Planktothrix* bloom and two laboratory strains. *Water Research* 36(8).

**Kirkwood, *et al.* 2008**

Cyanobacterial diversity and halotolerance in a variable hypersaline environment. *Microbial Ecology* 55(3).

**Kirst 1990**

Salinity Tolerance of Eukaryotic Marine Algae. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 41(1).

**Komárek & Anagnostidis, eds.**

1999 Süßwasserflora von Mitteleuropa 19/1. Cyanoprokaryota 1. Teil: Chroococcales. . Volume 19. Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.

**Komárek & Anagnostidis, eds.**

2005 Süßwasserflora von Mitteleuropa 19/2. Cyanoprokaryota 2. Teil: Chroococcales. . Volume 19. Munich: Elsevier/Spektrum Akademischer Verlag.

**Kosol, *et al.* 2009**

Variation in peptide net production and growth among strains of the toxic cyanobacterium *Planktothrix spp.* *European Journal of Phycology* 44(1).

**Kotai 1972**

Instructions for preparation of modified nutrient solution Z8 for algae. *Norwegian Institute for Water research* B-11/69.



## Références bibliographiques

---

**Krammer & Lange-Bertalot**, eds.

1986 Süßwasserflora von Mitteleuropa. T1: Bacillariophyceae : Naviculaceae. Band 2/1. Volume 1. Stuttgart: Gustav Fisher Verlag

**Krammer & Lange-Bertalot**, eds.

1988 Süßwasserflora von Mitteleuropa. T2: Bacillariophyceae : Epithemiaceae. Surirellaceae. Band 2/2 Volume 2. Stuttgart: Gustav Fisher Verlag

**Krammer & Lange-Bertalot**, eds.

1991a Süßwasserflora von Mitteleuropa. T3: Bacillariophyceae: Centrales. Fragilariaceae. Eunotiacea. Band 2/3 Volume 3. Stuttgart: Gustav Fisher Verlag

**Krammer & Lange-Bertalot**, eds.

1991b Süßwasserflora von Mitteleuropa. T4 : Bacillariophyceae : Achnantaceae. Band 2/4 Volume 4. Stuttgart: Gustav Fisher Verlag

**Kruk, *et al.*** 2010

A morphological classification capturing functional variation in phytoplankton. *Freshwater Biology* 55(3).

**Kruk, *et al.*** 2002

Classification schemes for phytoplankton: a local validation of a functional approach to the analysis of species temporal replacement. *Journal of Plankton Research* 24(9).

**Kruk & Segura** 2012

The habitat template of phytoplankton morphology-based functional groups. *Hydrobiologia* 698(1).

**Kruskopf & Flynn** 2006

Chlorophyll content and fluorescence responses cannot be used to gauge reliably phytoplankton biomass, nutrient status or growth rate. *New Phytologist* 169(3).

**Kurmayer** 2011

The toxic cyanobacterium *Nostoc sp.* strain 152 produces highest amounts of microcystin and nostophycin under stress conditions. *Journal of Phycology* 47(1).

**Kurmayer, *et al.*** 2003

The abundance of microcystin-producing genotypes correlates positively with colony size in *Microcystis sp.* and determines its microcystin net production in Lake Wannsee. *Applied and Environmental Microbiology* 69(2).

**Kurmayer, *et al.*** 2004

Abundance of active and inactive microcystin genotypes in populations of the toxic cyanobacterium *Planktothrix spp.* *Environmental Microbiology* 6(8).

**Kurmayer, *et al.*** 2005

Genetic identification of microcystin ecotypes in toxic cyanobacteria of the genus *Planktothrix*. *Microbiology-Sgm* 151.

## Références bibliographiques

---

**Kurmayer & Gumpenberger 2006**

Diversity of microcystin genotypes among populations of the filamentous cyanobacteria *Planktothrix rubescens* and *Planktothrix agardhii*. *Molecular Ecology* 15(12).

**Kurmayer, et al. 2011**

Spatial divergence in the proportions of genes encoding toxic peptide synthesis among populations of the cyanobacterium *Planktothrix* in European lakes. *Fems Microbiology Letters* 317(2).

**Ladas & Papageorgiou 2000**

Cell turgor: A critical factor for the proliferation of cyanobacteria at unfavorable salinity. *Photosynthesis Research* 65(2).

**Laub, et al. 2002**

ADMAAdda(5) -microcystins in *Planktothrix agardhii* strain PH-123 (cyanobacteria) - Importance for monitoring of microcystins in the environment. *Environmental Toxicology* 17(4).

**Leao, et al. 2009**

Allelopathy in freshwater cyanobacteria. *Critical Reviews in Microbiology* 35(4).

**Lehman, et al. 2005**

Distribution and toxicity of a new colonial *Microcystis aeruginosa* bloom in the San Francisco Bay Estuary, California. *Hydrobiologia* 541(1).

**Liere & Janse 1992**

Restoration and resilience to recovery of the Lake Loosdrecht ecosystem in relation to its phosphorus flow. *Hydrobiologia* 233(1-3).

**Lin, et al. 2011**

Molecular evaluation on the distribution, diversity, and toxicity of *Microcystis* (Cyanobacteria) species from Lake Ulungur—a mesotrophic brackish desert lake in Xinjiang, China. *Environmental Monitoring and Assessment* 175(1-4).

**Lin, et al. 2010**

Genetic diversity and molecular phylogeny of *Planktothrix* (Oscillatoriales, cyanobacteria) strains from China. *Harmful Algae* 9(1).

**Lindholm, et al. 1999**

Toxic algae and fish mortality in a brackish-water lake in angstrom land, SW Finland. *Hydrobiologia* 397.

**Litchman, et al. 2010**

Linking traits to species diversity and community structure in phytoplankton. *Hydrobiologia* 653(1).

**Long, et al. 2001**

Cellular Microcystin Content in N-Limited *Microcystis aeruginosa* Can Be Predicted from Growth Rate. *Applied and Environmental Microbiology* 67(1).

## Références bibliographiques

---

**Lorenzen 1967**

Determination of chlorophyll and phaeopigments: spectrophotometric equations. *Limnol. Oceanogr.* 12(2).

**Lukač & Aegerter 1993**

Influence of trace metals on growth and toxin production of *Microcystis aeruginosa*. *Toxicon* 31(3).

**Lund, et al. 1958**

The inverted microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimations by counting. *Hydrobiologia* 11(2).

**Luukkainen, et al. 1993**

Isolation and identification of eight microcystins from thirteen *Oscillatoria agardhii* strains and structure of a new microcystin. *Applied and Environmental Microbiology* 59(7).

**Lyck 2004**

Simultaneous changes in cell quotas of microcystin, chlorophyll a, protein and carbohydrate during different growth phases of a batch culture experiment with *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Plankton Research* 26(7).

**Manganelli, et al. 2012**

Emerging health issues of cyanobacterial blooms. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità* 48.

**Mankiewicz-Boczek, et al. 2011**

Perennial Toxigenic *Planktothrix agardhii* Bloom in Selected Lakes of Western Poland. *Environmental Toxicology* 26(1).

**Mankiewicz-Boczek, et al. 2006**

Detection and monitoring toxigenicity of cyanobacteria by application of molecular methods. *Environmental Toxicology* 21(4).

**Margalef 1978**

Life-forms of phytoplankton as survival alternatives in an unstable environment. *Oceanologica acta* 134.

**Markensten, et al. 2010**

Simulated lake phytoplankton composition shifts toward cyanobacteria dominance in a future warmer climate. *Ecological Applications* 20(3).

**Mazur-Marzec, et al. 2008**

Cyanobacterial hepatotoxins, microcystins and nodularins, in fresh and brackish waters of the Pomeranian Province, northern Poland. *Oceanological and Hydrobiological Studies* 37(4).

## Références bibliographiques

---

**Mazur-Marzec, *et al.* 2005**

The effect of salinity on the growth, toxin production, and morphology of *Nodularia spumigena* isolated from the Gulf of Gdansk, southern Baltic Sea. *Journal of Applied Phycology* 17(2).

**Mbedi, *et al.* 2005**

Variability of the microcystin synthetase gene cluster in the genus *Planktothrix* (Oscillatoriales, Cyanobacteria). *Fems Microbiology Letters* 245(2).

**Melo, *et al.* 2007**

Temporal and spatial fluctuations of phytoplankton in a tropical coastal lagoon, southeast Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 67.

**Mikalsen, *et al.* 2003**

Natural Variation in the Microcystin Synthetase Operon *mcyABC* and Impact on Microcystin Production in *Microcystis* Strains. *Journal of Bacteriology* 185(9).

**Mischke & Nixdorf 2003**

Equilibrium phase conditions in shallow German lakes: How Cyanoprokaryota species establish a steady state phase in late summer. *Hydrobiologia* 502(1-3).

**Moore, *et al.* 2008**

Impacts of climate variability and future climate change on harmful algal blooms and human health. *Environmental Health* 7(0).

**Moss 1994**

Brackish and freshwater shallow lakes — different systems or variations on the same theme? *Hydrobiologia* 275-276(1).

**Moustaka-Gouni, *et al.* 2007**

Phytoplankton species succession in a shallow Mediterranean lake (L. Kastoria, Greece): steady-state dominance of *Limnothrix redekei*, *Microcystis aeruginosa* and *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Hydrobiologia* 575(1).

**Mur, *et al.* 1999**

Cyanobacteria in the environment. In *Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. I. Chorus and J. Bartram, eds. Pp. 25-54. London and New York: E & FN Spon.

**Muyllaert, *et al.* 2000**

Spatial and temporal dynamics of phytoplankton communities in a freshwater tidal estuary (Schelde, Belgium). *Estuarine Coastal and Shelf Science* 50(5).

**Nabout 2006**

Spatial and temporal dynamics of phytoplankton functional group in a blocked valley (Brazil). *Acta Limnologica Brasiliensia* 18.

## Références bibliographiques

---

**Nagai, *et al.* 2007**

Growth characteristics and growth modeling of *Microcystis aeruginosa* and *Planktothrix agardhii* under iron limitation. *Limnology* 8(3).

**Naselli-Flores & Barone 2000**

Phytoplankton dynamics and structure: a comparative analysis in natural and man-made water bodies of different trophic state. *Hydrobiologia* 438(1-3).

**Naselli-Flores & Barone 2003**

Steady-state assemblages in a Mediterranean hypertrophic reservoir. The role of *Microcystis* ecomorphological variability in maintaining an apparent equilibrium. *Hydrobiologia* 502(1-3).

**Nixdorf, *et al.* 2003**

Phytoplankton assemblages and steady state in deep and shallow eutrophic lakes – an approach to differentiate the habitat properties of Oscillatoriales. *Hydrobiologia* 502(1).

**Nõges, *et al.* 2010**

Analysis of changes over 44 years in the phytoplankton of Lake Võrtsjärv (Estonia): the effect of nutrients, climate and the investigator on phytoplankton-based water quality indices. *Hydrobiologia* 646(1).

**O'Neil, *et al.* 2012**

The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. *Harmful Algae* 14(0).

**Oberhaus, *et al.* 2008**

Allelopathic growth inhibition by the toxic, bloom-forming cyanobacterium *Planktothrix rubescens*. *Fems Microbiology Ecology* 66(2).

**Oberhaus, *et al.* 2007a**

Comparative effects of the quality and quantity of light and temperature on the growth of *Planktothrix agardhii* and *P-rubescens*. *Journal of Phycology* 43(6).

**Oberhaus, *et al.* 2007b**

Grazing of two toxic *Planktothrix* species by *Daphnia pulicaria*: potential for bloom control and transfer of microcystins. *Journal of Plankton Research* 29.

**Oh, *et al.* 2000**

Microcystin Production by *Microcystis aeruginosa* in a Phosphorus-Limited Chemostat. *Applied and Environmental Microbiology* 66(1).

**Oliver & Ganf 2002**

Freshwater blooms. In *The ecology of cyanobacteria*. B. Whitton and M. Potts, eds. Pp. 149-194: Springer Netherlands.

**Oren 2007**

Diversity of organic osmotic compounds and osmotic adaptation in cyanobacteria and algae. In *Algae and cyanobacteria in extreme environments*. J. Seckbach, ed. Pp. 639-655. Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology: Springer Netherlands.

## Références bibliographiques

---

**Orr & Jones 1998**

Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen-limited *Microcystis aeruginosa* cultures. *Limnology and Oceanography* 43(7).

**Padisák, et al. 2003**

Dominant species, functional assemblages and frequency of equilibrium phases in late summer phytoplankton assemblages in Hungarian small shallow lakes. *Hydrobiologia* 502(1-3).

**Padisák, et al. 2006**

Use of Phytoplankton Assemblages for Monitoring Ecological Status of Lakes within the Water Framework Directive: The Assemblage Index. *Hydrobiologia* 553(1).

**Padisak, et al. 2009**

Use and misuse in the application of the phytoplankton functional classification: a critical review with updates. *Hydrobiologia* 621.

**Paerl, et al. 2011**

Controlling harmful cyanobacterial blooms in a world experiencing anthropogenic and climatic-induced change. *Science of the Total Environment* 409(10).

**Paerl & Huisman 2008**

Climate - Blooms like it hot. *Science* 320(5872).

**Paerl & Huisman 2009**

Climate change: a catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. *Environmental Microbiology Reports* 1(1).

**Paerl & Otten 2013**

Harmful Cyanobacterial Blooms: Causes, Consequences, and Controls. *Microbial Ecology* 65(4).

**Paerl & Paul 2012**

Climate change: Links to global expansion of harmful cyanobacteria. *Water Research* 46(5).

**Paerl, et al. 2003**

Phytoplankton photopigments as indicators of estuarine and coastal eutrophication. *Bioscience* 53(10).

**Paul 2008**

Global warming and cyanobacterial harmful algal blooms. *In* Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs. H.K. Hudnell, ed. Pp. 239-257. *Advances in Experimental Medicine and Biology*: Springer New York.

**Pearson, et al. 2010**

On the Chemistry, Toxicology and Genetics of the Cyanobacterial Toxins, Microcystin, Nodularin, Saxitoxin and Cylindrospermopsin. *Marine Drugs* 8(5).

## Références bibliographiques

---

**Pilkaitytė, et al.** 2004

Response of phytoplankton communities to salinity changes—a mesocosm approach. *Hydrobiologia* 513(1).

**Pomati, et al.** 2000

The freshwater cyanobacterium *Planktothrix* sp. FP1: Molecular identification and detection of paralytic shellfish poisoning toxins. *Journal of Phycology* 36(3).

**Por** 1972

Hydrobiological notes on the high-salinity waters of the Sinai Peninsula. *Marine Biology* 14(2).

**Poulickova, et al.** 2004

Annual cycle of *Planktothrix agardhii* (Gom.) ANAGN. & KOM. Nature population. *International Review of Hydrobiology* 89(3).

**Pouria, et al.** 1998

Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. *Lancet* 352(9121).

**Prinsloo & Pieterse** 1994

Preliminary-observations on the effect of increased concentrations of total dissolved salts on growth and photosynthetic rates in different algal species. *Water Sa* 20(3).

**Rantala, et al.** 2004

Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(2).

**Rapala, et al.** 1997

Variation of microcystins, cyanobacterial hepatotoxins, in *Anabaena* spp. as a function of growth stimuli. *Applied and Environmental Microbiology* 63(6).

**Rasmussen, et al.** 2008

Reassessing the first appearance of eukaryotes and cyanobacteria. *Nature* 455(7216).

**Reavie, et al.** 2010

Algal assemblages for large river monitoring: Comparison among biovolume, absolute and relative abundance metrics. *Ecological Indicators* 10(2).

**Redden & Rukminasari** 2008

Effects of increases in salinity on phytoplankton in the Broadwater of the Myall Lakes, NSW, Australia. *Hydrobiologia* 608.

**Reed, et al.** 1985

Multiphasic osmotic adjustment in a euryhaline cyanobacterium. *Fems Microbiology Letters* 28(3).

**Repka, et al.** 2004

Effects of Phosphate and Light on Growth of and Bioactive Peptide Production by the Cyanobacterium *Anabaena* Strain 90 and Its Anabaenopeptilide Mutant. *Applied and Environmental Microbiology* 70(8).

## Références bibliographiques

---

**Ressom, *et al.* 1994**

Health effects of toxic cyanobacteria.

**Reynolds 1975**

Interrelations of photosynthetic behavior and buoyancy regulation in a natural population of a blue green algae. *Freshwater Biology* 5(4).

**Reynolds 1995**

The intermediate disturbance hypothesis and its applicability to planktonic communities: comments on the views of Padisak and Wilson. *New Zealand Journal of Ecology* 19(2).

**Reynolds 1998**

What factors influence the species composition of phytoplankton in lakes of different trophic status? *Hydrobiologia* 370.

**Reynolds & Elliott 2002**

Phytoplankton diversity: discontinuous assembly responses to environmental forcing. *International Association of Theoretical and Applied Limnology, Vol 28, Pt 1, Proceedings* 28.

**Reynolds, *et al.* 2002**

Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton. *Journal of Plankton Research* 24(5).

**Reynolds, *et al.* 1981**

On the Annual Cycle of the Blue-Green Alga *Microcystis Aeruginosa* Kutz. Emend. Elenkin. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences* 293(1068).

**Reynolds, *et al.* 1984**

Growth-rate and loss-rate responses of phytoplankton to intermittent artificial mixing and their potential application to the control of planktonic algal biomass *Journal of Applied Ecology* 21(1).

**Rippka 1988**

Isolation and purification of Cyanobacteria. *Methods in Enzymology* 167.

**Rohrlack & Utkilen 2007**

Effects of nutrient and light availability on production of bioactive anabaenopeptins and microviridin by the cyanobacterium *Planktothrix agardhii*. *Hydrobiologia* 583.

**Rojo & Álvarez-Cobelas 2003**

Are there steady-state phytoplankton assemblages in the field? *Hydrobiologia* 502(1).

**Rojo & Alvarez Cobelas 1994**

Population dynamics of *Limnothrix redekei*, *Oscillatoria lanceaeformis*, *Planktothrix agardhii* and *Pseudanabaena limnetica* (cyanobacteria) in a shallow hypertrophic lake (Spain). *Hydrobiologia* 275-276(1).



## Références bibliographiques

---

**Rojo & Miracle 1989**

Phytoplankton Fluctuations during an Annual Cycle in the Coastal Lagoon of Cullera (Spain). *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie* 74(2).

**Rojo, et al. 2000**

Phytoplankton structure and dynamics in a semiarid wetland, the National Park "Las Tablas de Daimiel" (Spain). *Archiv Fur Hydrobiologie* 148(3).

**Romo & Miracle 1993**

Long-term periodicity of *Planktothrix agardhii*, *Pseudanabaena galeata* and *Geitlerinema sp.* in a shallow hypertrophic lagoon, the Albufera of Valencia (Spain). *Archiv Fur Hydrobiologie* 126(4).

**Romo & Miracle 1994a**

Long-Term Phytoplankton Changes in a Shallow Hypertrophic Lake, Albufera of Valencia (Spain). *Hydrobiologia* 276.

**Romo & Miracle 1994b**

Population dynamics and ecology of subdominant phytoplankton species in a shallow hypertrophic lake (Albufera of Valencia, Spain). *Hydrobiologia* 273(1).

**Rücker, et al. 1997**

Factors controlling the dominance of *Planktothrix agardhii* and *Limnothrix redekei* in eutrophic shallow lakes. *Hydrobiologia* 342-343(0).

**Ryan, et al. 2008**

Temporal and spatial variability in the phytoplankton community of Myall Lakes, Australia, and influences of salinity. *Hydrobiologia* 608.

**Sabart, et al. 2010**

Spatiotemporal Variations in Microcystin Concentrations and in the Proportions of Microcystin-Producing Cells in Several *Microcystis aeruginosa* Populations. *Applied and Environmental Microbiology* 76(14).

**Sakamoto, et al. 2009**

Accumulation of trehalose in response to desiccation and salt stress in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *Phycological Research* 57(1).

**Scheffer, et al. 1993**

Alternative equilibria in shallow lakes. *Trends in ecology & evolution (Personal edition)* 8(8).

**Scheffer, et al. 1997**

On the dominance of filamentous cyanobacteria in shallow, turbid lakes. *Ecology* 78(1).

**Seckbach 2007**

Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments. 11.

## Références bibliographiques

---

### Seckbach & Oren 2007

Oxygenic photosynthetic microorganisms in extreme environments. *In* Algae and cyanobacteria in extreme environments. J. Seckbach, ed. Pp. 3-25. Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology: Springer Netherlands.

### Sevilla, *et al.* 2008

Iron availability affects mcyD expression and microcystin-LR synthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *Environmental Microbiology* 10(10).

### Shapiguzov, *et al.* 2005

Osmotic shrinkage of cells of *Synechocystis sp* PCC 6803 by water efflux via aquaporins regulates osmotic stress-inducible gene expression. *Microbiology-Sgm* 151.

### Sieroslawska, *et al.* 2010

Toxicity of cyanobacterial bloom in the eutrophic Dam reservoir (Southeast Poland). *Environmental Toxicology and Chemistry* 29(3).

### Sivonen 1990

Effects of light, temperature, nitrate, orthophosphate, and bacteria on growth of and hepatotoxin production by *Oscillatoria agardhii* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 56(9).

### Sivonen & Jones 1999

Cyanobacterial toxins. *In* Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. I. Chorus and J. Bartram, eds. Pp. 55-124. London and New York: E & FN Spon.

### Smayda & Reynolds 2001

Community Assembly in Marine Phytoplankton: Application of Recent Models to Harmful Dinoflagellate Blooms. *Journal of Plankton Research* 23(5).

### Smith 2003

Eutrophication of freshwater and coastal marine ecosystems - A global problem. *Environmental Science and Pollution Research* 10(2).

### Sniegowski & Lenski 1995

Mutation and Adaptation: The Directed Mutation Controversy in Evolutionary Perspective. *Annual Review of Ecology and Systematics* 26(1).

### Solis, *et al.* 2009

Bloom-forming cyanobacteria and other algae in selected anthropogenic reservoirs of the Leczna-Wlodawa Lakeland. *Oceanological and Hydrobiological Studies* 38.

### Song, *et al.* 1998

Microcystin production of *Microcystis viridis* (cyanobacteria) under different culture conditions. *Phycological Research* 46.

### Stal 1991

The metabolic versatility of the mat-building cyanobacteria *Microcoleus chthonoplastes* and *Oscillatoria limosa* and its ecological significance *Archiv Fur Hydrobiologie*.

## Références bibliographiques

---

**Stal 2007**

Cyanobacteria: Diversity and versatility, clues to life in extreme environments. *In* Algae and cyanobacteria in extreme environments. J. Seckbach, ed. Pp. 659-680. Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology: Springer Netherlands.

**Stomp, et al. 2007**

Colourful coexistence of red and green picocyanobacteria in lakes and seas. *Ecology Letters* 10(4).

**Suda, et al. 2002**

Taxonomic revision of water-bloom-forming species of oscillatoriid cyanobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52.

**Sun & Liu 2003**

Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. *Journal of Plankton Research* 25(11).

**Thomazeau 2010**

Systématique de cyanobactéries du continent africain par une approche polyphasique & scénarios évolutifs.

**Tilman 1977**

Resource Competition between Plankton Algae: An Experimental and Theoretical Approach. *Ecology* 58(2).

**Tonk, et al. 2007**

Salt tolerance of the harmful cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Aquatic Microbial Ecology* 46(2).

**Tonk, et al. 2008**

Amino acid availability determines the ratio of microcystin variants in the cyanobacterium *Planktothrix agardhii*. *Fems Microbiology Ecology* 65(3).

**Tonk, et al. 2005**

The microcystin composition of the cyanobacterium *Planktothrix agardhii* changes toward a more toxic variant with increasing light intensity. *Applied and Environmental Microbiology* 71(9).

**Toporowska, et al. 2010**

Winter versus summer blooming of phytoplankton in a shallow lake: Effect of hypertrophic conditions. *Polish Journal of Ecology* 58(1).

**Underwood 1989**

The analysis of stress in natural populations. *Biological Journal of the Linnean Society* 37(1-2).

**Utermöhl 1958**

Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Mitt. int. Ver. theor. angew. Limnol.* 9.

## Références bibliographiques

---

**Utkilen & Gjølme 1995**

Iron-stimulated toxin production in *Microcystis aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology* 61(2).

**Van Liere & Mur 1980**

Occurrence of *Oscillatoria agardhii* and some related species, a survey. *In* Developments in Hydrobiology. J.a.M. Barica, L., ed. Pp. 67-77. The Hague: Dr W. Junk b.v. Publishers.

**Van Liere & Walsby 1982**

Interactions of cyanobacteria with light. *In* The Biology of the Cyanobacteria. N.G.W. Carr, B. A., ed. Pp. 9-45. Oxford: Blackwell Science Publications.

**Verspagen, et al. 2006**

Water management strategies against toxic *Microcystis* blooms in the Dutch delta. *Ecological Applications* 16(1).

**Vezie, et al. 2002**

Effect of nitrogen and phosphorus on growth of toxic and nontoxic *Microcystis* strains and on intracellular microcystin concentrations. *Microbial Ecology* 43(4).

**Vicente & Miracle 1992**

The coastal lagoon Albufera de Valencia: An ecosystem under stress. *Limnetica*.

**Vila & Masó 2005**

Phytoplankton functional groups and harmful algae species in anthropogenically impacted waters of the NW Mediterranean Sea. *Scientia Marina*.

**Villena & Romo 2003a**

Phytoplankton changes in a shallow Mediterranean lake (Albufera of Valencia, Spain) after sewage diversion. *Hydrobiologia* 506(1-3).

**Villena & Romo 2003b**

Temporal changes of cyanobacteria in the largest coastal Spanish Lake. *Algological Studies* 109.

**Wehr & Sheath 2003**

Freshwater Algae of North America. Ecology and Classification. USA: Elsevier.

**Weithoff 2003**

The concepts of 'plant functional types' and 'functional diversity' in lake phytoplankton – a new understanding of phytoplankton ecology? *Freshwater Biology* 48(9).

**Wetzel 1983**

Hypertrophic ecosystems - BARICA,J, MUR,LR. *Limnology and Oceanography* 28(5).

**Whitton & Potts 2002**

Introduction to the cyanobacteria. *In* The Ecology of Cyanobacteria. B. Whitton and M. Potts, eds. Pp. 1-11: Springer Netherlands.

## Références bibliographiques

---

**Wiedner, *et al.* 2003**

Effects of Light on the Microcystin Content of Microcystis Strain PCC 7806. *Applied and Environmental Microbiology* 69(3).

**Winder & Sommer 2012**

Phytoplankton response to a changing climate. *Hydrobiologia* 698(1).

**Wojciechowska 2004**

Vertical distribution of dominant cyanobacteria species in three lakes - evidence of tolerance to different turbulence and oxygen conditions. *Polish Journal of Ecology* 52(3).

**Wood, *et al.* 2011**

Switching toxin production on and off: intermittent microcystin synthesis in a Microcystis bloom. *Environmental Microbiology Reports* 3(1).

**Wotowski 1998**

Taxonomic and Environmental studies on Euglenophytes of the Krakow-czestochowa upland (southern poland). Krakow: Polish Academy of Sciences, W Szafer Institute of Botany.

**Yepremian, *et al.* 2007**

Microcystin ecotypes in a perennial *Planktothrix agardhii* bloom. *Water Research* 41(19).

**Zilliges, *et al.* 2011**

The Cyanobacterial Hepatotoxin Microcystin Binds to Proteins and Increases the Fitness of *Microcystis* under Oxidative Stress Conditions. *Plos One* 6(3).

**Zorina, *et al.* 2011**

Regulation systems for stress responses in cyanobacteria. *Russian Journal of Plant Physiology* 58(5).

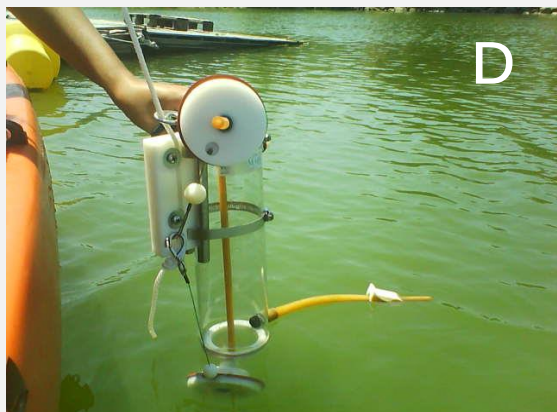
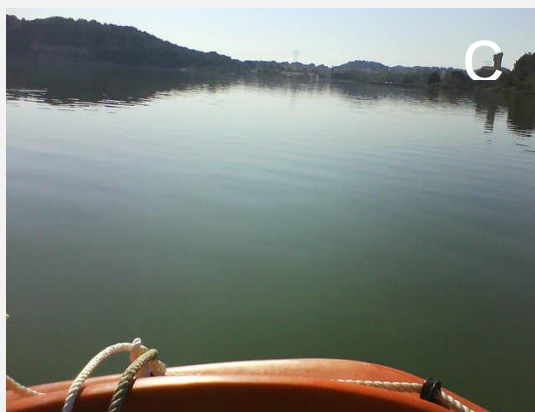


## Annexes





Annexe. A. Photos des différentes stations d'échantillonnage de l'étang de l'Olivier.



## Annexes

**Annexe. B.** Relevé des espèces phytoplanctoniques déterminées dans l'étang de l'Olivier de février 2009 à octobre 2010, de fréquence d'occurrence > 5%.

Le code et la formule mathématique utilisée pour calculer le biovolume de chaque espèce sont indiqués. Les formules sont issues de différents ouvrages énumérés au chapitre 1 (p. 4.3).

ESPECE	CODE	BIOVOLUME
<b>BACILLARIOPHYTA</b>		
<i>Achnanthes exigua</i>	AEXI	$= (1/4) * \pi * (L) * (l) * e$
<i>Achnanthes marginulata</i>	AMAR	$= (1/4) * \pi * (L) * (l) * e$
<i>Chaetoceros tenuissimus</i>	CTEN	$= (1/4) * \pi * (l^2) * (L)$
<i>Cocconeis placentula</i> var. <i>placentula</i>	CPLA	$= (1/4) * \pi * (L) * (l) * e$
<i>Cyclotella atomus</i>	CATO	$= (1/4) * \pi * (l^2) * (L)$
<i>Cyclotella meneghiniana</i>	CMEN	$= (1/4) * \pi * (l^2) * (L)$
<i>Cymbella</i> sp.	CYMsp	$= (2/3) * \pi * (L) * \text{angle} / 360 * (l/2)^2$
<i>Diatoma</i> sp.	DIATsp	$= (1/4) * \pi * (L) * (l) * e$
<i>Navicula menisculus</i> var. <i>menisculus</i>	NMEN	$= (1/4) * \pi * (L) * (l) * e$
<i>Navicula minuscula</i>	NMIN	$= (1/4) * \pi * (L) * (l) * e$
<i>Nitzschia closterium</i>	NCLO	$= (1/2) * (L) * (l) * e$
<i>Nitzschia graciliformis</i>	NGRF	$= (1/2) * (L) * (l) * e$
<i>Nitzschia gracilis</i>	NGRA	$= (1/2) * (L) * (l) * e$
<i>Nitzschia palea</i>	NPAL	$= (1/2) * (L) * (l) * e$
<i>Nitzschia paleacea</i>	NPAC	$= (1/2) * (L) * (l) * e$
<i>Nitzschia</i> sp.	NITsp	$= (1/2) * (L) * (l) * e$
<i>Rhoicosphenia abbreviata</i>	RHOsp	$= L * e * [(\pi * (l - (L/2))) / 4 + (((L/2) - (l - (L/2))) / 3)]$
<i>Synedra acus</i>	SACU	$= (L) * (l) * e$
<b>CHLOROPHYTA</b>		
<i>Amphikikros minutissimus</i>	AMIN	$= (1/6) * \pi * (l^3)$
<i>Apiochloris obliqua</i>	AOBL	$= (1/6) * \pi * (l^2) * L$
<i>Chlamydomonas</i> sp.	CHLsp	$= (1/6) * \pi * (l^2) * L$
<i>Chlorella vulgaris</i>	CVUL	$= (1/6) * \pi * (l^3)$
<i>Chroococciopsis</i> sp.	CHROsp	$= (1/6) * \pi * (l^3)$
<i>Closteriopsis</i> sp.	CLOsp	$= (1/6) * \pi * (l^2) * (L)$
<i>Closteriopsis longissima</i>	CLON	$= (1/6) * \pi * (l^2) * (L)$
<i>Coelastrum microporum</i>	CMIC	$= (1/6) * \pi * (L^3)$
<i>Cosmarium laeve</i>	CLAE	$= (1/6) * \pi * (l^2) * L$
<i>Cosmarium</i> sp.	COSsp	$= (1/6) * \pi * (l^2) * L$
<i>Dictyosphaerium pulchellum</i>	DPUL	$= (1/6) * \pi * (L^3)$
<i>Golenkinia radiata</i>	GRAD	$= (1/6) * \pi * (L^3)$
<i>Kirchneriella diana</i>	KDIA	$= (1/6) * \pi * (e^2) * (L)$
<i>Kirchneriella obesa</i>	KOBE	$= (1/6) * \pi * (e^2) * (L)$
<i>Lagerheimia quadriseta</i>	LQUA	$= (1/6) * \pi * (L^3)$
<i>Lagerheimia subsala</i>	LSUB	$= (1/6) * \pi * (e^2) * (L)$

## Annexes

<i>Monoraphidium arcuatum</i>	MARC	$= (1/6) * PI() * (I^2) * (L)$
<i>Monoraphidium contortum</i>	MCON	$= (1/6) * PI() * (I^2) * (L)$
<i>Monoraphidium dybrowski</i>	MDYB	$= (1/6) * PI() * (I^2) * (L)$
<i>Monoraphidium griffithii</i>	MGRI	$= (1/6) * PI() * (I^2) * (L)$
<i>Oocystis lacustris</i>	OLAC	$= (1/6) * PI() * (I^2) * (L)$
<i>Oocystis solitaria</i>	OSOL	$= (1/6) * PI() * (I^2) * (L)$
<i>Planktonema lauterbornii</i>	PLAU	$= (1/6) * PI() * (I^2) * L$
<i>Pyramimonas cordata</i>	PCOR	$= (1/12) * PI() * (I^2) * (L)$
<i>Tetraedron hemisphaericum</i>	THEM	$= (L) * (I) * e$
<i>Tetraedron minimum</i>	TMIN	$= (L) * (I) * e$
<i>Tetraspora sp.</i>	TETsp	$= (1/6) * PI() * (I^3)$
<b>CHRYSOPHYTA</b>		
<i>Chrysamoeba sp.</i>	CHRsp	$= (1/6) * PI() * (I^3)$
<i>Chrysodydimus sp.</i>	CHRDsp	$= (1/6) * PI() * (I^2) * L$
<i>Kephyrion littorale</i>	KLIT	$= (1/6) * PI() * (I^2) * L$
<i>Mallomonas sp.</i>	MALsp	$= (1/6) * PI() * (I^2) * (L)$
<i>Ochromonas vyssotzkii</i>	OVYS	$= (1/6) * PI() * (I^2) * L$
<b>CYANOPROKARYOTA</b>		
<i>Aphanocapsa delicatissima</i>	ADEL	$= (1/6) * PI() * (I^3)$
<i>Eucapsis sp.</i>	EUCsp	$= (1/6) * PI() * (L^3)$
<i>Limnothrix planctonica</i>	LPLA	$= (1/4) * PI() * (I^2) * (L)$
<i>Planktolyngbya limnetica</i>	PLIM	$= (1/4) * PI() * (I^2) * (L)$
<i>Planktothrix agardhii</i>	PAGA	$= (1/4) * PI() * (I^2) * (L)$
<i>Synechococcus sp.</i>	SYNO	$= (1/6) * PI() * (I^2) * L$
<i>Synechocystis sp.</i>	SYNY	$= (1/6) * PI() * (L^3)$
<b>DINOPHYTA</b>		
<i>Heterocapsa rotundata</i>	HROT	$= (1/6) * PI() * (I^2) * L$
<i>Katodinium asymmetricum</i>	KASY	$= (1/6) * PI() * (I^2) * L$
<i>Peridinium willei</i>	PWILL	$= (1/6) * PI() * (I^2) * L$
<i>Prorocentrum minimum</i>	PMIN	$= (1/6) * PI() * (L^3)$
<b>EUGLENOPHYTA</b>		
<i>Euglena agilis</i>	EAGI	$= (1/6) * PI() * (I^2) * L$
<i>Trachelomonas hispida var2</i>	THIS2	$= (1/6) * PI() * (I^2) * L$
<i>Trachelomonas lacustris</i>	TLAC	$= (1/6) * PI() * (I^2) * L$
<i>Trachelomonas similis f. similis</i>	TSIM	$= (1/6) * PI() * (L^3)$
<i>Trachelomonas volvocina</i>	TVOL	$= (1/6) * PI() * (I^2) * L$
<b>XANTHOPHYTA</b>		
<i>Bumilleriopsis sp.</i>	BUMsp	$= (1/6) * PI() * (I^2) * (L)$

### Annexe. C. Tableau non exhaustif des études réalisées dans le but de tester l'effet de l'environnement sur les différents niveaux de toxicité des cyanobactéries.

**Cultures/In situ** : études réalisées à partir d'expérimentations en milieu contrôlé ou *in situ* ;

**Facteurs** : facteur environnemental étudié (lim. : limitant ; opt. : optimal ; azote, phosphore, fer,... : concentrations en azote, phosphore, fer... ; T : clones toxiques) ;

**Effet +** : effet du facteur ; **Effet -** : pas d'effet ;

**Niveau** : niveau de toxicité mesuré (T/NT : proportions de clones toxiques sur clones non toxiques ;

**VAR** : proportion des variants de MC ;

**Q** : quota/production de MC par cellule ou par unité de biomasse ;

**CMC** : concentration en MC,

**TX** : taux de production en MC

Auteurs	Organisme	Culture <i>In situ</i>	Facteurs	Effet	Niveau
[Briand, <i>et al.</i> 2005]	<i>P. rubescens</i>	<i>In situ</i> & culture	profondeur densité cellulaire orthophosphates	- + +	VAR Q TX
[Briand, <i>et al.</i> 2008b]	<i>P. agardhii</i>	culture  compétition	lumière + température + azote  lumière + température + azote	- + + +	T/NT Q TX T/NT Q
[Briand, <i>et al.</i> 2008a]	<i>P. agardhii</i>	<i>In situ</i>	densité cellulaire	+ +	T/NT Q
[Briand, <i>et al.</i> 2009]	<i>M. aeruginosa</i>	<i>In situ</i>	densité cellulaire	+	T/NT
[Briand, <i>et al.</i> 2012]	<i>M. aeruginosa</i>	culture  compétition	azote lumière azote + lumière	- - + +	T/NT T/NT T/NT Q
[Davis, <i>et al.</i> 2009]	<i>Microcystis sp.</i>	<i>In situ</i> & cultures	température azote phosphore + température	+ + +	T/NT T/NT T/NT
[Downing, <i>et al.</i> 2005]	<i>M. aeruginosa</i>	culture	azote/phosphore	+	Q
[Janse, <i>et al.</i> 2004]	<i>Microcystis sp.</i>	<i>In situ</i>	géographie saisonnalité	- +	T/NT T/NT
[Janse, <i>et al.</i> 2005]	<i>P. agardhii</i> <i>P. rubescens</i>	<i>In situ</i>	densité cellulaire	+ & -	T/NT
[Kaebernick, <i>et al.</i> 2000]	<i>M. aeruginosa</i>	cultures	intensité lumineuse  lumière rouge lumière bleue	- + + -	T/NT Q Q Q
[Kardinaal, <i>et al.</i> 2007]	<i>Microcystis sp.</i>	compétition	lumière	+ +	T/NT CMC
[Kurmayer 2011]	<i>Nostoc sp.</i>	cultures	température + phosphore + lumière azote limitant	+  -	Q  Q
[Kurmayer, <i>et al.</i>	<i>Planktothrix sp.</i>	<i>In situ</i>	densité cellulaire	-	T/NT

## Annexes

2011]					
[Kurmayer, <i>et al.</i> 2003]	<i>M. aeruginosa</i>	<i>In situ</i> & culture	taille des colonies	+	T/NT Q Q
[Long, <i>et al.</i> 2001]	<i>M. aeruginosa</i>	cultures	azote	+	Q
[Lukač & Aegerter 1993]	<i>M. aeruginosa</i>	cultures	Fer limitant	+	Q
[Lyck 2004]	<i>M. aeruginosa</i>	cultures	lumière	+	Q TX
[Oh, <i>et al.</i> 2000]	<i>M. aeruginosa</i>	cultures	phosphore	+	Q
[Orr & Jones 1998]			azote	+	Q
[Sabart, <i>et al.</i> 2010]	<i>M. aeruginosa</i>	<i>In situ</i>	nombreuses conditions densité clones T  densité cellulaire	- - - +	T/NT VAR CMC Q
[Sevilla, <i>et al.</i> 2008]	<i>M. aeruginosa</i>	cultures	fer lim.	+	T/NT Q
[Song, <i>et al.</i> 1998]	<i>M. viridis</i>	cultures	pH + température (lumière + température) opt. (lumière + température) lim. azote phosphore phase de croissance	+ + - - - +	Q Q Q Q Q Q
[Tonk, <i>et al.</i> 2005]	<i>P. agardhii</i>	cultures	Irradiance	+	Q VAR
[Utkilen & Gjølme 1995]	<i>M. aeruginosa</i>	cultures	fer lim.	+	T/NT
[Wiedner, <i>et al.</i> 2003]	<i>M. aeruginosa</i>	cultures	irradiance	+	Q TX
[Yepremian, <i>et al.</i> 2007]	<i>P. agardhii</i>	cultures	température	- +	T/NT Q



# Résumé

La recherche a été initiée par l'observation d'efflorescences de *Planktothrix agardhii*, une cyanobactérie dulçaquicole potentiellement toxique, dans deux étangs saumâtres, les étangs de l'Olivier et de Bolmon, avec dans ce dernier le déclin de l'espèce concomitamment à une augmentation de salinité.

L'objectif de l'étude consistait à évaluer l'influence de la salinité du milieu sur la performance, l'hégémonie et la production de toxine de *Planktothrix agardhii* au sein de la communauté phytoplanctonique.

La réalisation de suivis pluriannuels *in situ* couplés à des expérimentations en milieu contrôlé a permis de démontrer (i) la capacité d'acclimatation et d'adaptation à la salinité de *Planktothrix agardhii*, laquelle garantit sa suprématie et sa production toxinique en milieu saumâtre ; et (ii) la modification structurale et fonctionnelle de la communauté phytoplanctonique suite à une augmentation de salinité supérieure au seuil d'halotolérance de *Planktothrix agardhii*.

La recherche témoigne ainsi de la versatilité des cyanobactéries qui renforce leur aptitude à être de bons compétiteurs, laissant présager leur persistance, la continuité de leurs nuisances, et leur expansion dans le futur.

**Mots clé :** cyanobactérie, *Planktothrix agardhii*, salinité, toxicité, acclimatation, versatilité, étangs saumâtres, « batch-cultures »

# Abstract

The research was launched by the observation of *Planktothrix agardhii* blooms, a potentially toxic freshwater cyanobacterium, in two brackish ponds, the Olivier and Bolmon ponds, with in the latter, the species collapse concomitantly with an increase in salinity.

The study aimed to assess the salinity influence on the performance, the dominance and the toxin production of *Planktothrix agardhii* within the phytoplankton community.

The achievement of long-term *in situ* monitoring combined with batch cultures experiments has demonstrated (i) the ability of *Planktothrix agardhii* to acclimate and adapt to salinity, which ensured its supremacy and its toxin production in brackish areas, and (ii) the structural and functional changes of the phytoplankton community with the exceeding of the *Planktothrix agardhii* salt-tolerance threshold.

The research reflects the cyanobacteria versatility that enhances their suitability for being good performers, suggesting their persistence along with their nuisances, and their expansion in the future.

**Key-words:** cyanobacteria, *Planktothrix agardhii*, salinity, toxicity, acclimation, versatility, brackish ponds, batch cultures