



Centre d'Etude et de Valorisation
des Algues
Presqu'île de Pen Lan
BP 3 / 22610 PLEUBIAN
02 96 22 93 50
02 96 22 84 38
e-mail : algue@ceva.fr

Programme d'intervention du CEVA
en faveur de l'action régionale et interdépartementale
pour la maîtrise des phénomènes de marées vertes

CIMAV 2015

RAPPORT SUR LE PROJET 3

COMPLEMENT D'ETUDE SUR LES PROCESSUS BIOLOGIQUES,
HYDROLOGIQUES ET SEDIMENTOLOGIQUES IMPLIQUES DANS LES
BLOOMS MACROALGAUX



ANNEE 2015 - Rapport final



Cimav P3 – Rapport final – Mars 2016

SOMMAIRE

1	INTRODUCTION	1
2	OBJECTIFS ET PROGRAMME DE TRAVAIL	3
2.1	ACQUISITION DES PARAMETRES DE CROISSANCE IN SITU POUR PYLAIELLA LITTORALIS	3
2.2	AMELIORATION DES CONDITIONS DE CULTURE DE PYLAIELLA EN MILIEU CONTROLE	3
3	CROISSANCE IN SITU DE PYLAIELLA LITTORALIS	5
3.1	PROTOCOLE DE L'ETUDE	5
3.2	RESULTATS	7
4	CULTURE DE PYLAIELLA LITTORALIS EN MILIEU CONTROLE	10
4.1	ENRICHISSEMENT DU MILIEU DE CULTURE : EAU DE MER ARTIFICIELLE VS EAU DE MER	10
4.1.1	<i>Protocole</i>	10
4.1.2	<i>Résultats</i>	12
4.1.2.1	Juillet 2015 : expérience d'essais et de mise au point.....	12
4.1.2.2	Octobre 2015	16
4.2	CULTURE EN MILIEUX EPURES	22
4.2.1	<i>Protocole</i>	22
4.2.1.1	Epuration de l'eau de mer.....	22
4.2.1.2	Culture de Pylaiella littoralis en milieux épurés	23
4.2.2	<i>Résultats</i>	24
5	CONCLUSIONS	30
6	REFERENCES	31

1 Introduction

Les actions proposées dans ce programme depuis 2007 permettent de consolider les acquis scientifiques sur l'origine, les conditions de développement et les moyens de limitation des marées vertes.

De manière concrète, **ces connaissances alimentent et améliorent le modèle numérique Mars-Ulve** qui permet d'une part d'identifier les sources d'azote contribuant le plus au développement des proliférations algales, et d'autre part de fixer des objectifs de réduction des apports azotés pour réduire significativement le phénomène. Ce modèle a fait l'objet d'une publication scientifique (Perrot et al. 2014) et représente **un outil d'aide à la décision pour les gestionnaires**.

Par ailleurs, les données acquises dans le cadre de ce programme permettent d'avoir une **connaissance actualisée et robuste du phénomène des proliférations d'algues vertes** et d'en expliquer les évolutions. Ces données ont largement alimenté **le rapport de la mission interministérielle** produit en 2012 (Chevassus-au-Louis et al. 2012) destiné à analyser l'ensemble des paramètres pouvant contribuer aux proliférations macroalgales et à statuer sur l'implication de l'azote d'origine agricole dans ce phénomène.

Depuis 2012, les actions menées dans le cadre de ce programme se sont concentrées sur *Pylaiella littoralis*, algue brune filamenteuse remplaçant les ulves en baie de La Fresnaye (Figure 1) depuis 2006 et se développant en baie de Saint-Brieuc notamment entre 2011 et 2013. Bien que les proliférations soient d'ampleur inférieure, des tapis épais de *Pylaiella* ont été répertoriés en sortie de l'estuaire de l'Aber Benoît en 2014 (Figure 1), sur les plages de Cap Coz (baie de la Forêt) en 2013 sur la baie de Morlaix/Carantec en 2010 et sur la baie de Quiberon en 2010 et 2011.



Figure 1 : Photographies aériennes illustrant la prolifération de *Pylaiella* en baie de la Fresnaye (à gauche) et dans l'estuaire de l'Aber Benoît (à droite) durant l'été 2014. Les flèches rouges pointent les proliférations de *Pylaiella*.

Les premiers résultats écophysiologicals obtenus dans le cadre du CIMAV P3 de 2012, 2013 et 2014 indiquent que la prolifération de cette algue serait favorisée dans des eaux froides (lui permettant de se développer dès la fin de l'hiver) et qu'elle peut poursuivre son développement dans des eaux dont les teneurs en éléments nutritifs ne sont pas suffisantes pour permettre le développement des ulves. La présence de ces algues en remplacement de prolifération d'ulves pourrait donc être indicatrice d'une amélioration de la qualité des eaux.

Malgré le caractère opportuniste de cette algue (Scanlan et al. 2007), celle-ci n'est actuellement pas considérée dans l'évaluation de la qualité des masses d'eau dans le cadre de la Directive Cadre sur l'Eau ce qui a pour conséquence d'avoir fait basculer en 2013 (années prises en compte 2008-2013 soit 4 années sur 6 avec 0 ha d'ulves en baie de la Fresnaye) la masse d'eau Rance-Fresnaye (FRGC03) en bon état écologique malgré la présence de cette prolifération.

En outre, les **capacités de croissance** de cette algue *in situ* ainsi que **les teneurs internes en azote et en phosphore** lui étant nécessaires pour proliférer ne sont pas connues. Cette algue semble également sujette à une **dégradation rapide** qui pourrait lui permettre, par la matière organique relarguée, **d'auto-alimenter le niveau nutritionnel de la masse d'eau, donc sa prolifération**. La connaissance de ces différents paramètres est donc importante pour pouvoir qualifier la prolifération de cette algue par rapport à celle de l'ulve et confirmer son caractère indicateur d'un degré d'eutrophisation moindre par rapport aux conditions dans lesquelles se développent les blooms d'algues vertes.

De façon à pouvoir répondre aux questions relatives à ces « nouvelles » proliférations et à pouvoir les replacer de façon certaine dans un contexte d'amélioration de la qualité écologique des masses d'eau, notamment en termes de diminution de la pression d'eutrophisation, il est capital de poursuivre l'étude de cette algue peu connue dans le contexte breton.

Ainsi, il a été proposé :

- d'étudier la croissance de l'algue dans son milieu,
- de mettre au point les conditions optimales de culture de *Pylaiella* en milieu contrôlé, conditions nécessaires à la réussite des expérimentations écophysiologicals à mener en laboratoire (difficultés rencontrées dans les expérimentations des années précédentes).

2 Objectifs et programme de travail

L'objectif pour cette année 2015 était de poursuivre l'amélioration des connaissances sur le développement de *Pylaiella littoralis*, algue brune filamenteuse récurrente sur le site de la Fresnaye depuis 2006 et qui semble désormais persister sur le site de Saint-Brieuc. Celle-ci est également présente de façon occasionnelle sur d'autres sites bretons.

2.1 Acquisition des paramètres de croissance *in situ* pour *Pylaiella littoralis*

Il a été proposé un suivi *in situ* de la croissance de *Pylaiella* en baie de la Fresnaye, baie sur laquelle les probabilités de trouver du *Pylaiella* sont les meilleures. Dans cette optique, des biomasses de *Pylaiella* ont été placées dans des sacs à mailles étroites en trois points fixes de la baie. L'évolution de cette biomasse en conditions naturelles a été suivie par la réalisation de pesées à intervalle régulier, à savoir toutes les deux semaines de juin à septembre. Ce travail avait pour but d'identifier les variations saisonnières de la croissance de *Pylaiella* et d'en analyser la dynamique dans la baie. Des algues vertes étaient également présentes en début de saison : elles ont été de la même manière mises en sacs aux mêmes lieux pour effectuer une comparaison des croissances et/ou de la dégradation de ces deux types d'algues.

2.2 Amélioration des conditions de culture de *Pylaiella* en milieu contrôlé

En 2013 et 2014, il s'est avéré difficile de maintenir et de faire croître *Pylaiella* en eau de mer artificielle en laboratoire. L'utilisation de l'eau de mer artificielle ou d'une eau de mer appauvrie est pourtant nécessaire pour la mise en place des expérimentations visant à établir les quotas critique et de subsistance des algues. De façon à lever ce point de blocage, il a été proposé de réaliser des essais de culture. Le but était de trouver un milieu dans lequel *Pylaiella* croît et dont on peut abaisser artificiellement la concentration en nutriments. L'eau de mer naturelle est en effet trop riche en nutriments (azote et phosphore) si bien que l'algue met trop de temps à épuiser le milieu et ses réserves internes, ce qui est pourtant recherché et qui permettrait de déterminer les quotas écophysologiques de l'algue. Ainsi :

- plusieurs compositions d'eau de mer artificielle ont été testées, à partir des informations compilées dans la littérature scientifique et auprès de partenaires du CEVA compétents en phycologie (Station biologique de Roscoff, IUEM...)
- d'autres sources d'eau de mer naturelles appauvrie ont été également recherchées (eau de mer du large, eau de mer appauvrie par phyto-épuration,...)

Le suivi de la croissance a été effectué par la pesée des échantillons de *Pylaiella* aux cours des expériences. L'analyse des fractions particulières et dissoutes en azote et en phosphore a également été réalisée sur l'eau des bassins de culture durant l'expérimentation. Cette démarche a

pour but de fournir de premières informations concernant la dynamique de dégradation du *Pylaiella*.

3 Croissance *in situ* de *Pylaiella littoralis*

3.1 Protocole de l'étude

Le dispositif expérimental a été mis en place en Baie de la Fresnaye en juin 2015 sur trois points fixes (Figure 2). Ce dispositif était composé, en chaque point, de 6 sacs à mailles étroites maintenus par un corps-mort, soit un total de 18 sacs (Figure 3). La moitié des sacs contenaient une biomasse moyenne de départ de 212 g (poids frais égoutté) \pm 7 g (erreur type) pour *Pylaiella littoralis* et de 324 g (poids frais égoutté) \pm 24 g (erreur type) pour les algues vertes. Les algues vertes majoritairement présentes dans la baie à la mise en place du suivi et placées dans les sacs appartenaient à l'espèce *Ulvaria obscura*. Les algues ont été collectées le 1^{er} juillet en baie de la Fresnaye et stockées en bassin d'eau de mer courante avec bullage d'air et lumière naturelle, puis ont été triées au laboratoire le 2 juillet pour être remises sur site le 3 juillet 2015.

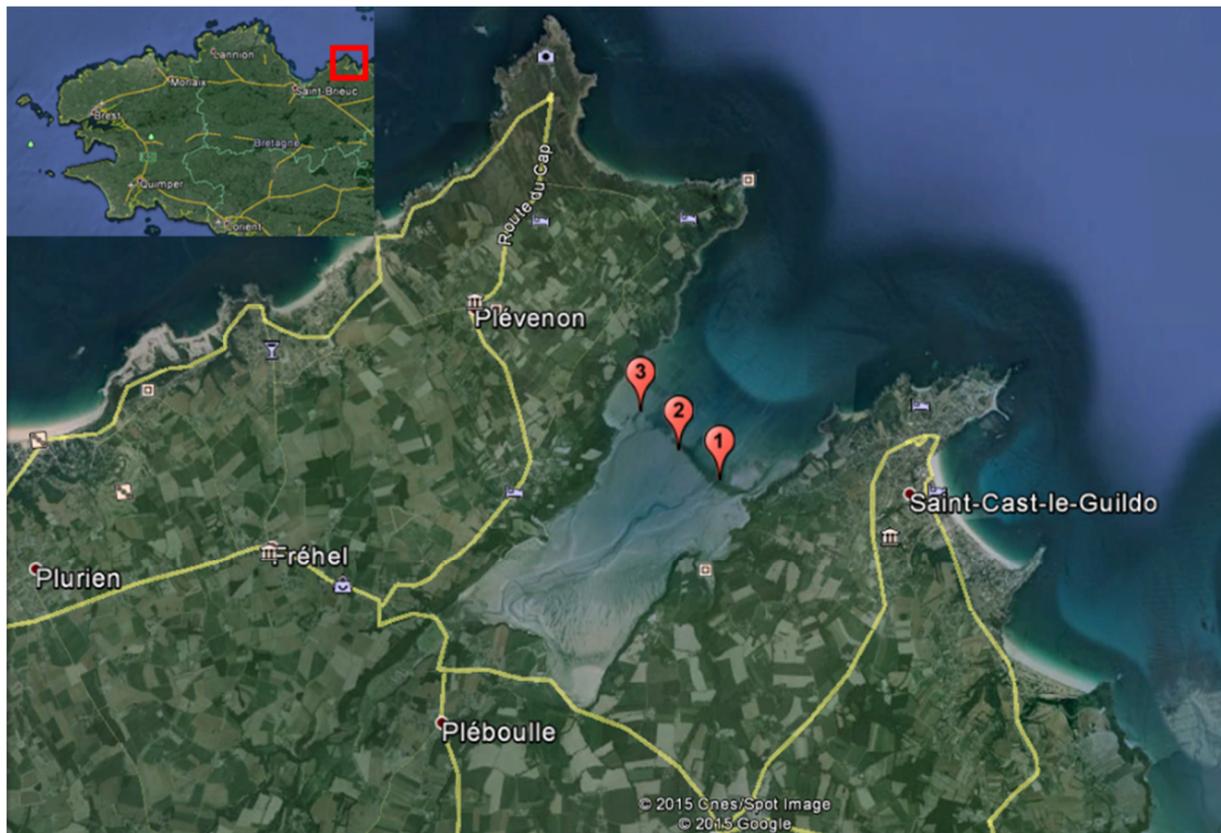


Figure 2. Emplacement du dispositif expérimental en Baie de la Fresnaye (22).

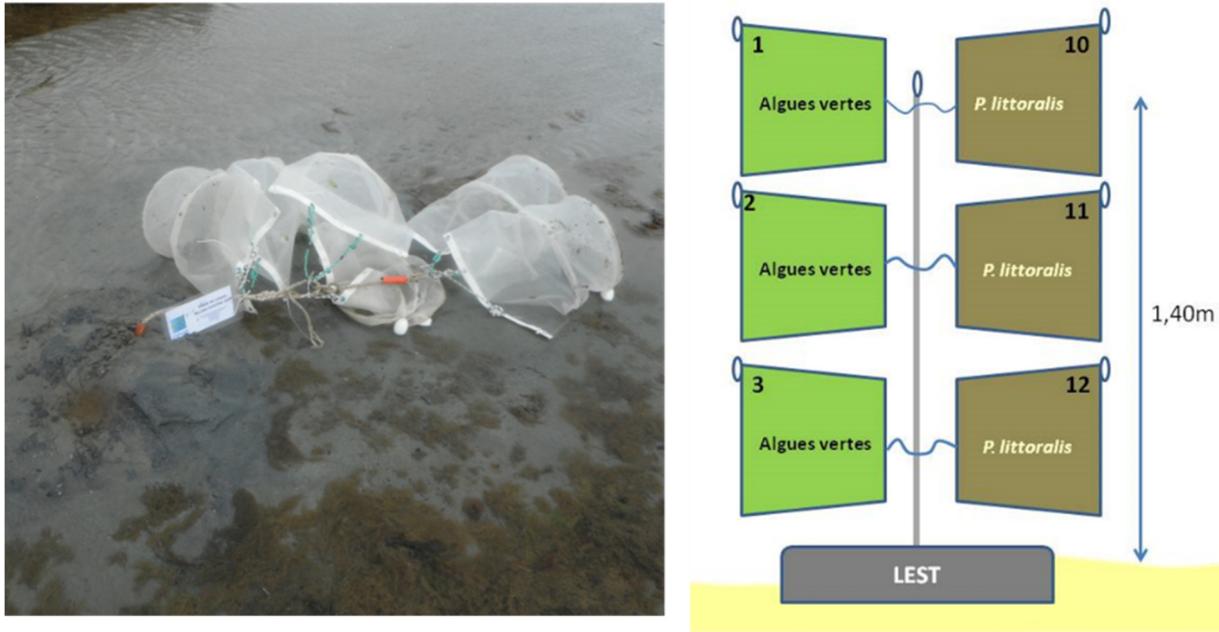


Figure 3. Dispositif expérimental composé de 6 sacs à mailles fines : 3 sacs contenant *Pylaiella littoralis* et 3 sacs contenant *Ulvaria obscura*.

Chacun des sacs a été détaché, pesé *in situ* puis rattaché tous les 15 jours. Pour réaliser la pesée, les sacs ont été immergés puis égouttés dans un premier temps par 5 chutes successives d'une hauteur constante, le sac étant attaché à une cordelette de 50 cm (Figure 4). Dans un deuxième temps, le sac a été suspendu et laissé à égoutter 1 minute supplémentaire avant pesée. Les mesures de biomasse ont été faites à l'aide d'un peson après un égouttage.

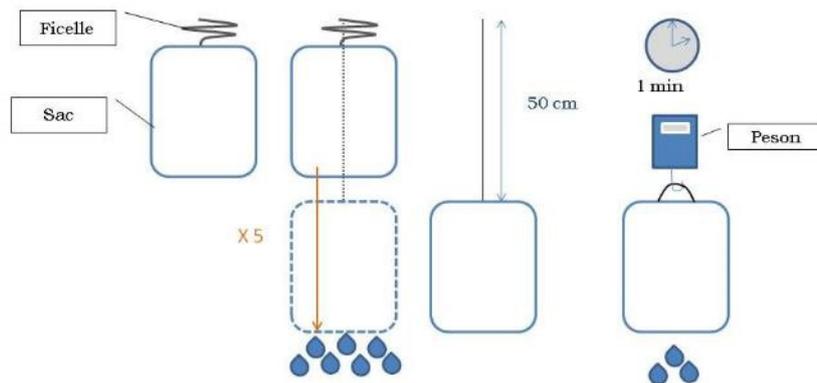


Figure 4. Schéma du protocole de pesée : 1) sac égoutté par 5 chutes successives de la hauteur de la ficelle auquel il a été attaché, 2) égouttage supplémentaire d'une minute, 3) pesée du sac.

3.2 Résultats

Le suivi n'a pas pu être assuré dès avril comme cela avait été initialement proposé suite aux difficultés rencontrées pour obtenir les autorisations nécessaires à la mise en place des sacs *in situ* (DDTM saisie dès le mois de février pour l'installation de corps morts dans la baie pour l'ancrage des sacs. L'absence d'autorisation en mai nous a conduit à installer les dispositifs dans les concessions conchylicoles en bas d'estran). Le dispositif a été mis en place début juin (02/06/2015). Un fort coup de vent a ensuite endommagé le dispositif expérimental mis en place et le suivi a dû être arrêté le 15 juin afin de remettre en état les sacs. Le dispositif n'a pu être remis en place que début juillet et le suivi a perduré jusqu'à fin septembre.

Les résultats présentés Figure 5 sont issus de la moyenne des résultats obtenus aux trois stations. L'erreur type montre une bonne comparabilité entre les stations et justifie donc le fait d'interpréter la moyenne des résultats.

Entre le 3 juillet et le 17 août 2015, la biomasse de *Pylaiella littoralis* dans les sacs a été multipliée par plus de 2,5. Cette biomasse a ensuite régressé jusqu'au 28 septembre jusqu'à une biomasse proche de celle de départ (Figure 5).

En parallèle, les observations faites à l'échelle de la baie, que ce soit lors de vérités-terrain ou lors des campagnes aériennes, ont témoigné de l'augmentation de la biomasse de *Pylaiella* d'avril à début juin. A partir de mi-juin et jusqu'à fin juillet, *Pylaiella* a fortement régressé au profit de deux autres espèces : *Ulvaria obscura* et *Polysiphonia* sp.. A partir de mi-août, *Pylaiella* redevient l'algue majoritairement présente dans la baie et ce jusqu'en octobre (Figure 6).

Une dynamique différente de croissance a donc été constatée entre les échelles d'observation stationnelles et sectorielles. Plusieurs causes peuvent être à l'origine de cette différence :

- La position des sacs. En effet, ceux-ci étaient fixes et proches du fond à marée haute, le *Pylaiella* a pu donc bénéficier d'une luminosité plus faible, favorable à sa croissance (CEVA 2014), et d'une compétition moindre avec les autres espèces par son isolement dans les sacs.
- La densité algale dans les sacs. La diminution de *Pylaiella* observée dans les sacs à partir de fin août alors que le *Pylaiella* dominait à nouveau en baie de la Fresnaye, pourrait être due à une trop forte densité atteinte dans les sacs, induisant un auto-ombrage puis la dégradation d'une partie de la biomasse.
- La présence de 2 sous-espèces de *Pylaiella littoralis*. L'hypothèse avancée par Geoffroy et al. (2015) de la coexistence de deux sous espèces de *Pylaiella littoralis*, l'une se développant plus favorablement au printemps et l'autre à l'automne pourrait également expliquer la diminution du *Pylaiella* dans les sacs ; l'espèce se développant au printemps aurait alors été enfermée dans les sacs au début du suivi et se serait développée pour ensuite régresser à l'automne, pendant que l'espèce d'automne se développait dans la baie.

La biomasse en algues vertes, essentiellement composées d'*Ulvaria obscura*, a graduellement diminuée au cours du suivi jusqu'à leur disparition de certains sacs dès le 15 septembre et une disparition de tous les sacs le 28 septembre (Figure 5). En parallèle, les observations de terrain ont montré une disparition progressive d'*Ulvaria* dans la baie. La diminution de la biomasse

d'*Ulvaria* pourrait donc être attribuée à des conditions environnementales devenues moins favorables au cours de la saison, notamment en termes de flux de nutriments.

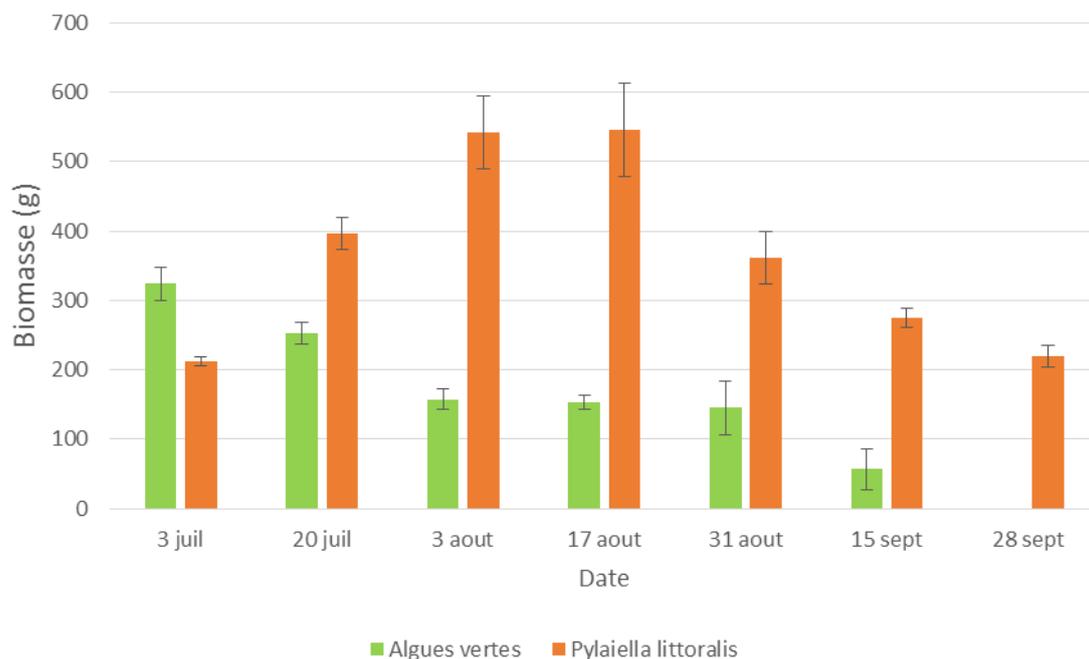


Figure 5. Suivi *in situ* de la biomasse (g de masse égouttée) de *Pylaiella littoralis* et des algues vertes placés dans des sacs à mailles fines en Baie de la Fresnaye du 3 juillet au 28 septembre 2015.

Les résultats de ce suivi ont montré :

- *Une dynamique de population différente entre l'échelle stationnelle et l'échelle sectorielle pour l'espèce Pylaiella littoralis*
- *Le recoupement des croissances observées en sac et sur la baie montre que Pylaiella littoralis peut perdurer tout au long de l'année mais les conditions environnementales (notamment la lumière) et la compétition avec d'autres espèces opportunistes semblent être des facteurs prépondérants pour son développement*
- *La dynamique de développement d'Ulvaria obscura a été similaire entre l'échelle stationnelle et sectorielle. Le niveau bathymétrique des sacs et les conditions environnementales associées (lumière, temps d'émersion) ne semblent donc pas être la cause principale du déclin de ces algues. L'ambiance nutritionnelle de la baie semble être la cause principale de la disparition de ces algues dans la baie.*

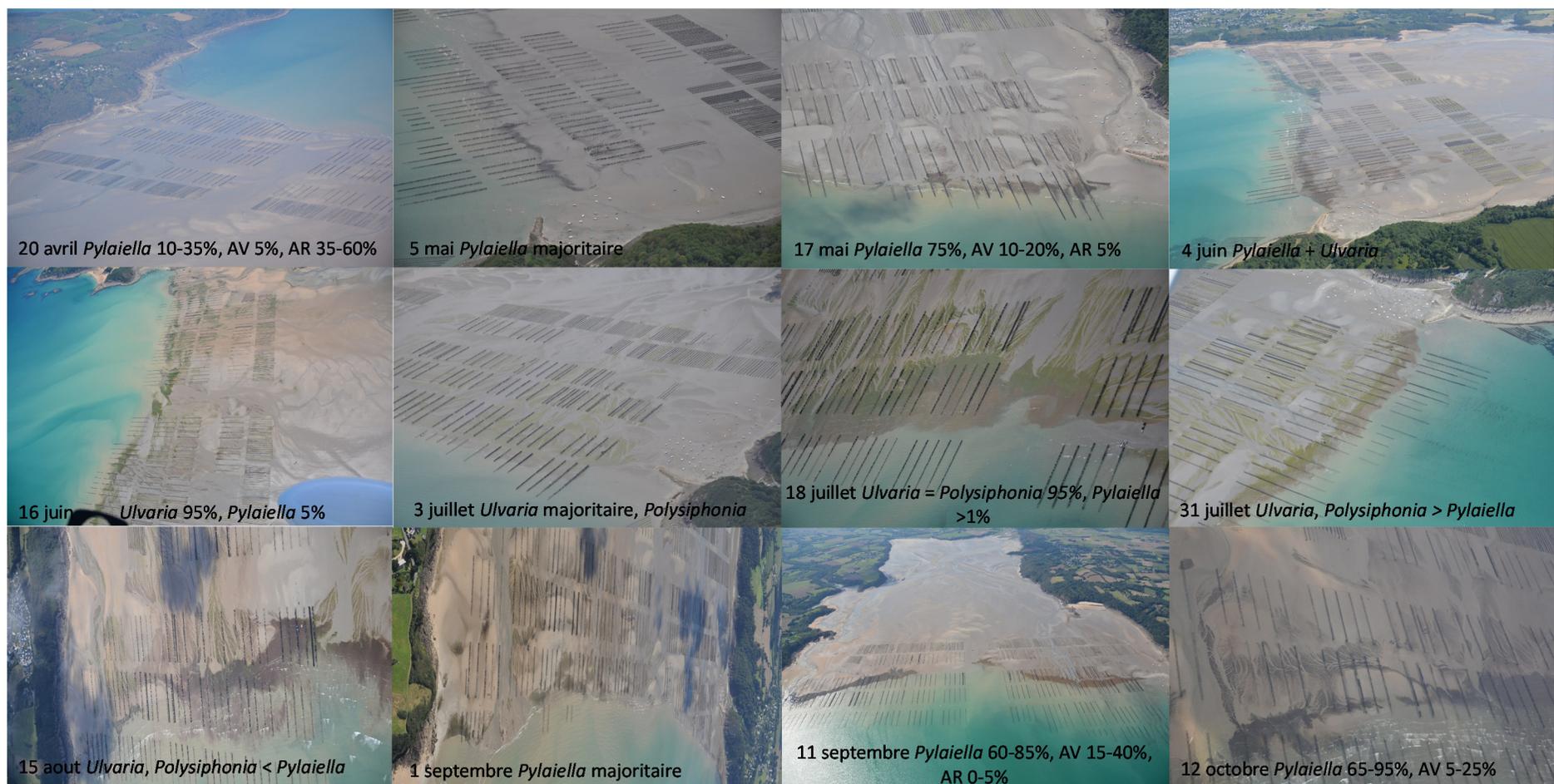


Figure 6. Evolution de *Pylaiella littoralis*, *Ulvaria obscura* et *Polysiphonia* sp. d'avril à octobre 2015 en Baie de la Fresnaye. AV : algues vertes, AR : algues rouges

4 Culture de *Pylaiella littoralis* en milieu contrôlé

4.1 Enrichissement du milieu de culture : eau de mer artificielle vs eau de mer

Plusieurs compositions différentes d'eau de mer enrichie afin de faire croître le *Pylaiella* ont été testées. Le but sous-jacent était de trouver le milieu qui permettrait, en supprimant l'« enrichissement » du milieu, de faire épuiser les réserves de nutriments présents dans l'algue et de déterminer les quotas internes critique et de subsistance de celle-ci.

Une première expérience a été effectuée en juillet en laboratoire afin de tester les protocoles d'enrichissement, le système expérimental et leurs effets sur la croissance algale. Basé sur ces résultats d'essais, une seconde expérience a été menée en octobre, suivant un protocole mis au point en juillet afin de consolider les premières observations.

4.1.1 Protocole

Trois milieux de culture ont été testés lors de cette expérience :

- une eau de mer naturelle non enrichie filtrée à 0.22 μm appelée NATURELLE ci-après,
- une eau de mer naturelle enrichie filtrée à 0.22 μm appelée ENRICHIE ci-après,
- une eau de mer artificielle enrichie appelée ARTIFICIELLE ci-après.

Le protocole d'enrichissement a été choisi après consultation de la bibliographie et après discussion avec le Dr Akira Peters (protocole présenté en Annexe). Ce protocole consiste à générer une solution d'enrichissement Provasoli et une eau de mer artificielle qui ont été utilisées dans la présente étude. Ces milieux sont couramment utilisés dans la culture de l'algue brune *Ectocarpus* proche de *Pylaiella*, ces algues appartenant toutes deux à l'ordre des Ectocarpales.

L'expérience a été répétée à deux dates en juillet et en octobre 2015. Le *Pylaiella* utilisé a été collecté le 3 juillet et le 28 septembre en baie de la Fresnaye. Les algues ont été triées puis stockées en bassin d'eau de mer courante avec bullage d'eau et lumière naturelle. Les expériences ont commencé le 6 juillet et le 8 octobre respectivement. Les algues ont été cultivées dans les trois milieux pendant 22 et 16 jours respectivement.

Le dispositif de culture était composé de 9 bacs de 20 L, soit 3 bacs répliqués par milieu testé (Figure 7). La Figure 8 présente le dispositif expérimental de culture en milieu contrôlé utilisé. Les bacs ont été disposés dans trois baignoires permettant de maintenir une température optimale de croissance de 15°C (Lotze et al. 1999) à l'aide de groupes refroidisseurs et de pompes. La disposition des bacs dans les baignoires a été aléatoire à raison de 3 bacs de chaque condition par baignoire de façon à éviter tous biais liés à une éventuelle différence de température ou de lumière. La lumière a été assurée par 6 néons produisant une intensité lumineuse suffisante pour

atteindre une productivité maximale de $100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (CEVA 2014) et une photopériode de 14 L : 10 O (14 h de lumière et 10 h d'obscurité). Un bullage d'air dans chaque bac a été mis en place afin d'assurer un mouvement de l'eau ainsi qu'une bonne oxygénation. La biomasse de *Pylaiella* mis en culture était de 30 g par bac en juillet et en octobre.

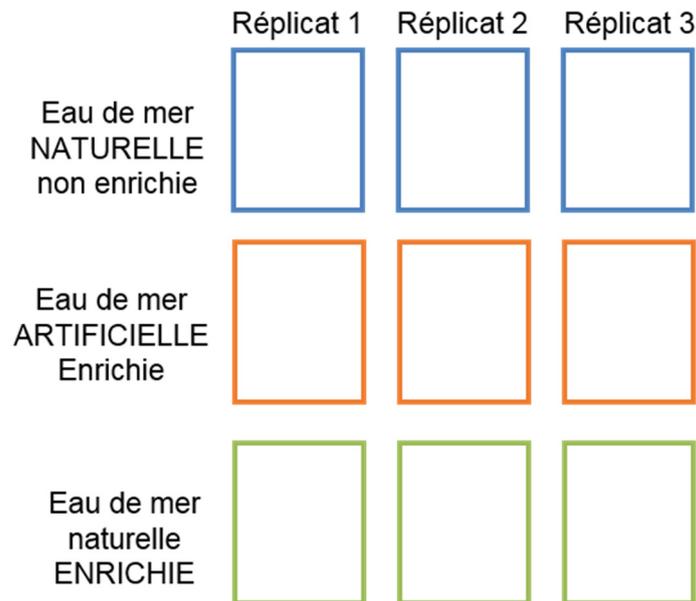


Figure 7. Protocole de culture du *Pylaeilla* en milieu d'eau de mer NATURELLE non enrichie, eau de mer ARTIFICIELLE enrichie et eau de mer naturelle ENRICHIE (n=3).



Figure 8. Dispositif expérimental de culture de *Pylaiella littoralis* en milieu contrôlé

Le suivi de la croissance de *Pylaiella* a été assuré par des pesées régulières tous les 4 jours au cours des deux expériences. Le protocole de pesée était identique à celui présenté au paragraphe 3.1.

Les milieux de culture respectifs ont été renouvelés dans les bacs à chaque date de pesée. Des photos macroscopiques et microscopiques de chaque répliat ont été prises à chaque pesée afin de suivre visuellement l'évolution de *Pylaiella*. Lors de la seconde expérience, des échantillons d'eau ont été prélevés et filtrés (0.22 µm) en début et fin d'expérience (à 16 jours). Ces échantillons ont été analysés afin de déterminer leur concentration en nitrate, ammonium et orthophosphate dissous (analyses effectuées par le laboratoire Eurofins). Par ailleurs, lors de la seconde expérience, les variations de température et de lumière ont été enregistrées toutes les 5 min au cours du suivi (sonde HOB0® modèle UA-002-08) de façon à s'assurer que les algues étaient maintenues à température constante et que la photopériode était respectée. A l'issue de chacune des expériences, le *Pylaiella* a été collecté, rincé à l'eau ultra pure, congelé, lyophilisé, pesé (poids sec), puis analysé afin de déterminer le contenu interne en azote et en phosphore (analyses effectuées par le laboratoire InVivo Labs).

4.1.2 Résultats

4.1.2.1 Juillet 2015 : expérience d'essais et de mise au point

Lors de la première expérience de juillet, un défaut dans le dispositif expérimental a engendré l'absence de photopériode, les algues étant soumises à un éclairage continu. Ainsi jusqu'à 9^{ème} jour, une lumière constante semble avoir impacté la croissance de *Pylaiella* et les effets des différents milieux de culture n'ont été réellement visibles qu'après le 9^{ème} jour, lorsque la photopériode a été rétablie (Figure 9). Les commentaires suivants sont donc établis en prenant comme T0, les résultats d'expérience au 9^{ème} jour.

En eau de mer ENRICHIE, la biomasse de *Pylaiella* a graduellement augmenté entre le 14^{ème} et le 22^{ème} jour (Figure 9) atteignant près de 160 g en fin d'expérience. En eau de mer ARTIFICIELLE, la biomasse de *Pylaiella* a diminué au cours de l'expérience (Figure 9) jusqu'à une biomasse finale de 100 g. En eau de mer NATURELLE, la biomasse de *Pylaiella* est restée constante (Figure 9). Au 22^{ème} jour de l'expérience, les algues ont démontré une capacité à persister en eau de mer NATURELLE et ENRICHIE mais ne démontre pas une capacité à se développer en eau de mer ARTIFICIELLE.

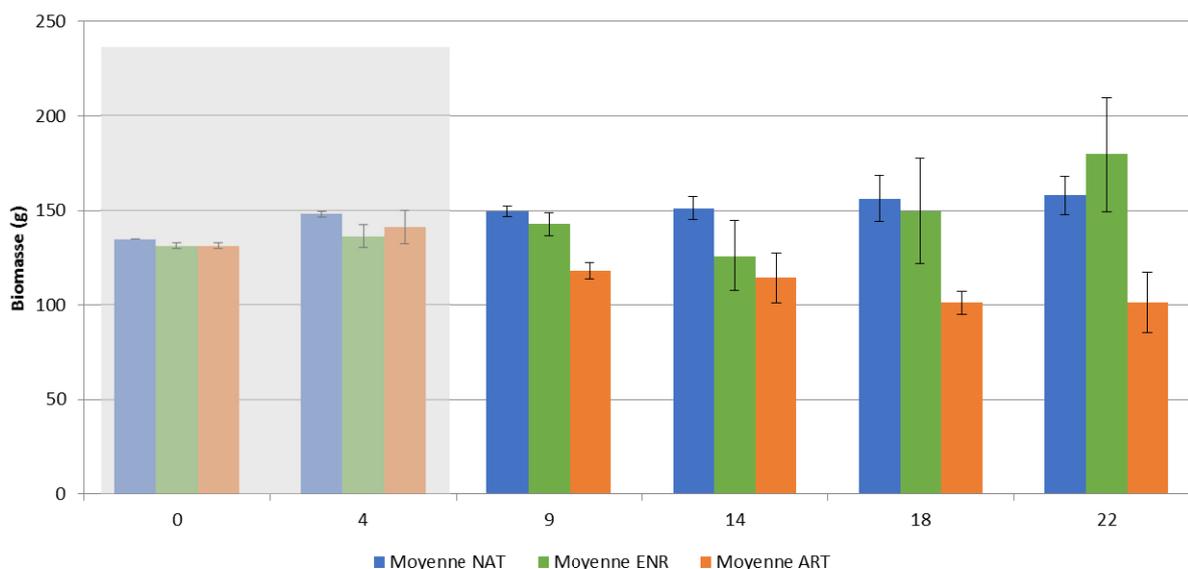


Figure 9. Evolution de la biomasse (g de masse égouttée) de *Pylaiella littoralis* cultivé en milieu d'eau de mer naturelle non enrichie : NATURELLE (NAT), d'eau de mer naturelle enrichie : ENRICHIE (ENR) et d'eau de mer artificielle enrichie : ARTIFICIELLE (ART) pendant 22 jours en juillet 2015. Données : moyenne \pm erreur type (n=3). Expérience conduite en juillet. Les biomasses mesurées au jour 0 et au jour 4 sont présentées mais non prises en considération dans l'interprétation des résultats, la photopériode ayant été défectueuse en début d'expérience.

L'analyse des biomasses sèches en fin d'expérience aboutit aux mêmes conclusions à savoir que le milieu composé d'eau de mer ARTIFICIELLE semble défavorable à la croissance de *Pylaiella littoralis*.

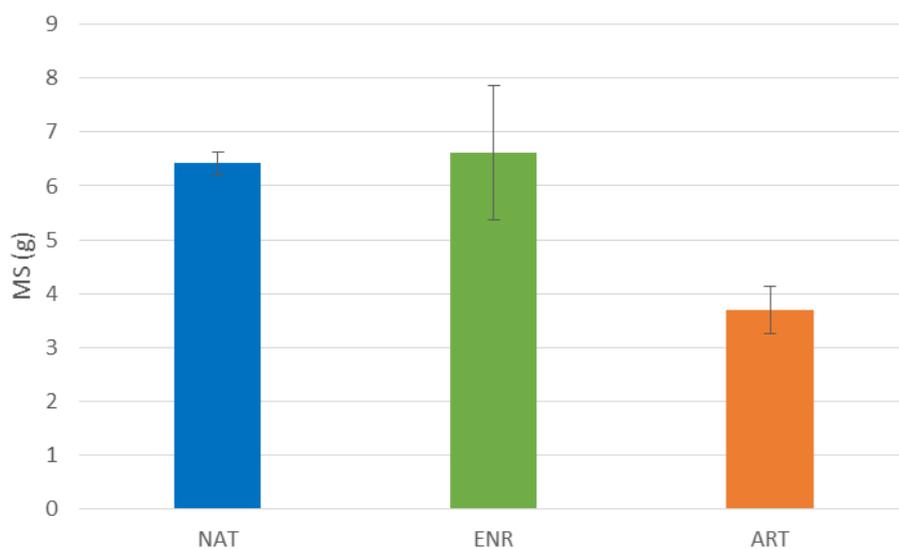


Figure 10. Biomasse de *Pylaiella littoralis* (MS : masse sèche) au 22^{ème} jour de culture en milieu d'eau de mer naturelle non enrichie : NATURELLE (NAT), d'eau de mer naturelle enrichie : ENRICHIE (ENR) et d'eau de mer artificielle enrichie : ARTIFICIELLE (ART) pendant 22 jours en juillet 2015. Données : moyenne \pm erreur type (n=3). Expérience conduite en juillet.

Pylaiella a également montré des différences visuelles entre les trois milieux de culture avec des thalles de couleur nettement plus foncée pour l'eau de mer ENRICHIE et ARTIFICIELLE et un état plus fragmenté en eau de mer ARTIFICIELLE (Figure 11).

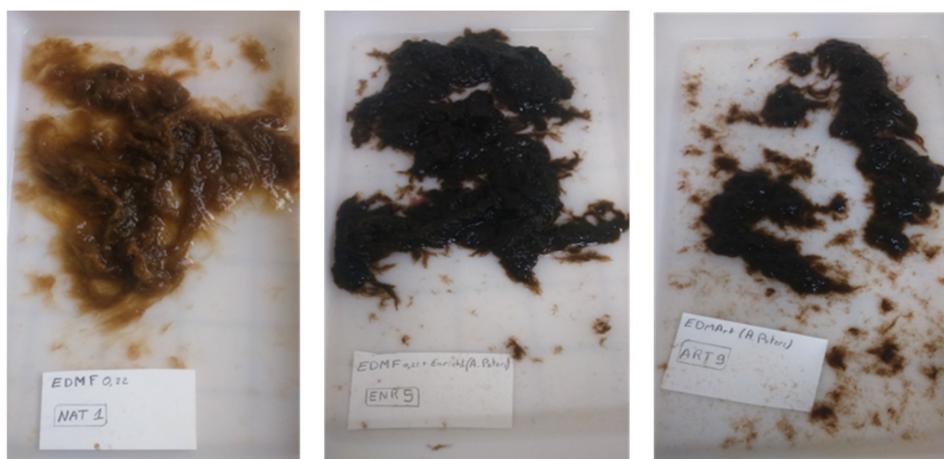


Figure 11. *Pylaiella littoralis* au 22^{ème} jour de culture en milieu d'eau de mer naturelle non enrichie : NATURELLE (à gauche), d'eau de mer naturelle enrichie : ENRICHIE (au milieu) et d'eau de mer artificielle enrichie : ARTIFICIELLE (à droite) pendant 22 jours en juillet 2015.

La Figure 12 présente le contenu interne en azote et en phosphore dans les thalles de *Pylaiella* en fin d'expérience pour chaque condition de culture. A noter que le suivi de terrain permet de savoir que les algues *in situ* prélevées le 1^{er} juillet 2015 contenaient de l'azote à hauteur de 1,53 % de MS et 0,26 % de MS en phosphore. Ces valeurs sont considérées comme proches des contenus internes en N et P du lot d'algues ayant servi à initier l'expérimentation.

Dans le milieu d'eau de mer NATURELLE, les quotas sont plus faibles en fin d'expérience ce qui est cohérent avec le fait que la biomasse algale est restée constante dans un milieu pourtant pauvre en nutriment. De façon à subsister, les algues ont donc utilisées une part de leur réserve nutritionnelle interne.

Dans le milieu d'eau de mer ENRICHIE, les quotas ont été multipliés par 3 et par 2 le temps de l'expérience, pour l'azote et le phosphore respectivement. Le suivi de biomasse montre que ce milieu est le plus favorable à la croissance de *Pylaiella*. La croissance couplée à l'enrichissement interne en nutriment montre que les nutriments sont suffisants dans le milieu pour assurer à la fois le développement des algues et l'absorption des nutriments.

Dans le milieu d'eau de mer ARTIFICIELLE, lui aussi complétement en nutriments de la même façon que le milieu d'eau de mer ENRICHIE, les quotas ont été multipliés par 2.5 pour l'azote et par 2 pour le phosphore. Par ailleurs, le suivi de biomasse a montré que ce milieu n'était pas favorable à la croissance de *Pylaiella*. En dépit, de l'enrichissement, l'absorption n'est donc pas aussi efficace et les algues ne se développent pas comme attendu dans ce milieu.

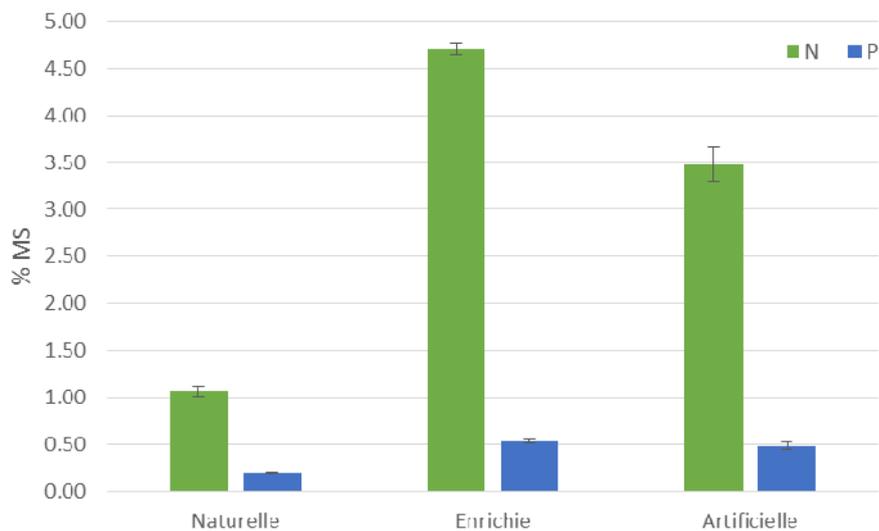


Figure 12. Quotas internes azotés (N) et phosphorés (P) de *Pylaiella littoralis* (% MS : % de masse sèche) au 22^{ème} jour de culture en milieu d'eau de mer naturelle non enrichie : NATURELLE, d'eau de mer naturelle enrichie : ENRICHIE et d'eau de mer artificielle enrichie : ARTIFICIELLE pendant 22 jours en juillet 2015. Données : moyenne \pm erreur type (n=3). Expérience conduite en juillet.

4.1.2.2 Octobre 2015

Lors de la même expérience refaite en octobre, l'initiation de l'expérimentation avec une biomasse plus faible a permis de mieux mettre en évidence la capacité de croissance de *Pylaiella* lors des premiers jours de l'expérimentation.

Les résultats obtenus lors de l'expérience de juillet ont été confirmés par celle d'octobre avec une augmentation de la biomasse de *Pylaiella* en eau de mer ENRICHIE tout au long de l'expérience. Une augmentation jusqu'au 8^{ème} jour puis une diminution la biomasse jusqu'en fin d'expérience a été observée en eau de mer ARTIFICIELLE et NATURELLE (Figure 13).

Au 16^{ème} jour, une différence significative a été observée avec une biomasse (masse égouttée) de *Pylaiella* deux fois plus importante en milieu d'eau de mer ENRICHIE qu'en eau de mer NATURELLE et ARTIFICIELLE. Cette plus forte croissance de *Pylaiella* en eau de mer ENRICHIE a également été confirmée par les mesures de biomasses en Masse Sèche effectuées en fin d'expérience (Figure 14)

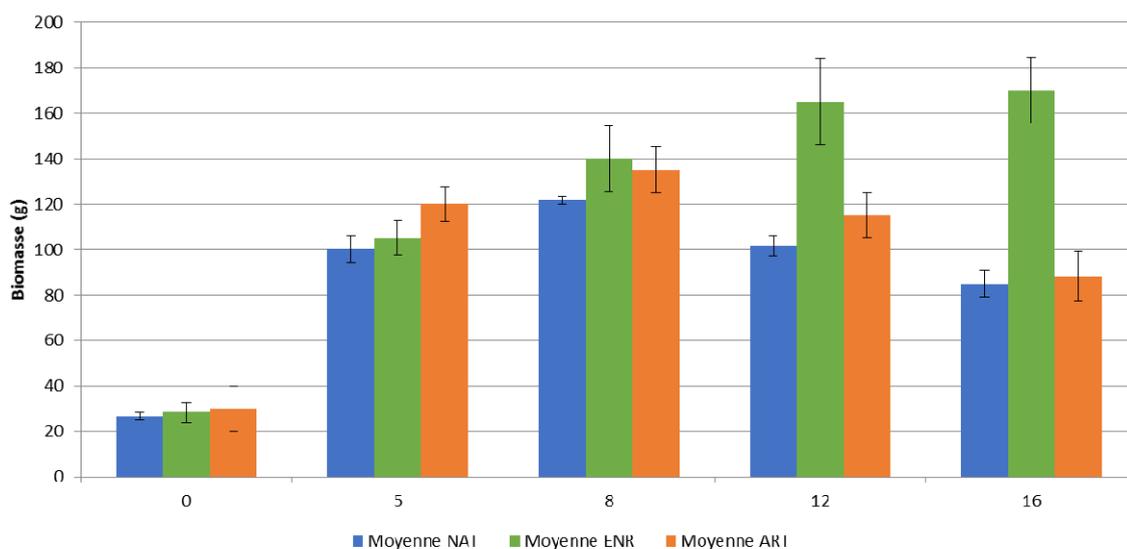


Figure 13. Evolution de la biomasse (g de masse égouttée) de *Pylaiella littoralis* cultivé en eau de mer naturelle non enrichie : NATURELLE (NAT), eau de mer naturelle enrichie : ENRICHIE (ENR) et eau de mer artificielle enrichie : ARTIFICIELLE (ART) pendant 16 jours en octobre 2015. Données : moyenne \pm erreur type (n=3). Expérience conduite en octobre.

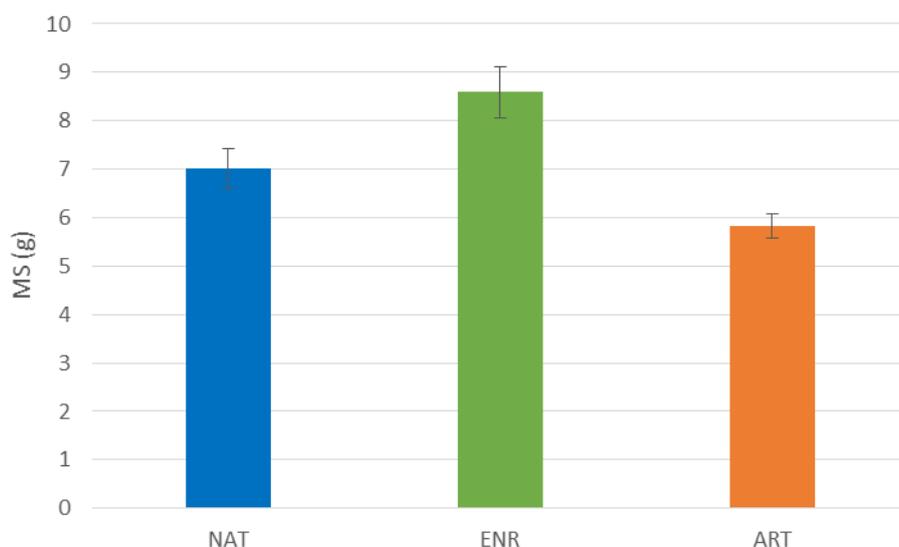


Figure 14. Biomasse de *Pylaiella littoralis* (MS : masse sèche) au 16^{ème} jour de culture en eau de mer naturelle non enrichie : NATURELLE (NAT), d'eau de mer naturelle enrichie : ENRICHIE (ENR) et d'eau de mer artificielle enrichie : ARTIFICIELLE (ART) pendant 16 jours en octobre 2015. Données : moyenne \pm erreur type (n=3). Expérience conduite en octobre.

Les analyses d'eau des trois milieux de cultures (Figure 15) ont montré que l'enrichissement des eaux de mer ENRICHIE et ARTIFICIELLE a bien été effectif. L'état initial (J0) pour les nitrates dissous était $<0.1 \mu\text{mol/l}$ pour l'eau de mer NATURELLE, et de $340 \mu\text{mol/l}$ pour l'eau de mer ENRICHIE et l'eau de mer ARTIFICIELLE (Figure 15).

Pour les orthophosphates, un état initial (J0) $<0.1 \mu\text{mol/l}$ pour l'eau de mer NATURELLE, et de $8.4 \mu\text{mol/l}$ pour l'eau de mer ENRICHIE et $8.1 \mu\text{mol/l}$ pour l'eau de mer ARTIFICIELLE.

Les nitrates dissous ont été absorbés par *Pylaiella* entre J12 et J16 en eau de mer ENRICHIE et ARTIFICIELLE avec une absorption plus importante en eau de mer ENRICHIE en comparaison des résultats obtenus en eau de mer ARTIFICIELLE.

Les orthophosphates ont été également absorbés par le *Pylaiella* de J12 à J16 en eau de mer ENRICHIE et ARTIFICIELLE avec absorption équivalente entre ces deux conditions de culture. De l'ammonium était présent en forte concentration à l'état initial (J0) uniquement dans l'eau de mer ARTIFICIELLE ($290 \mu\text{mol/l}$), résultant probablement de la formulation de ce milieu synthétique. Cet ammonium a été absorbé par *Pylaiella*, élément plus facilement assimilable par les algues que le nitrate. C'est probablement la raison pour laquelle l'absorption du nitrate a été moindre dans ce milieu.

Les concentrations en nutriments sont restées faibles dans l'eau de mer NATURELLE.

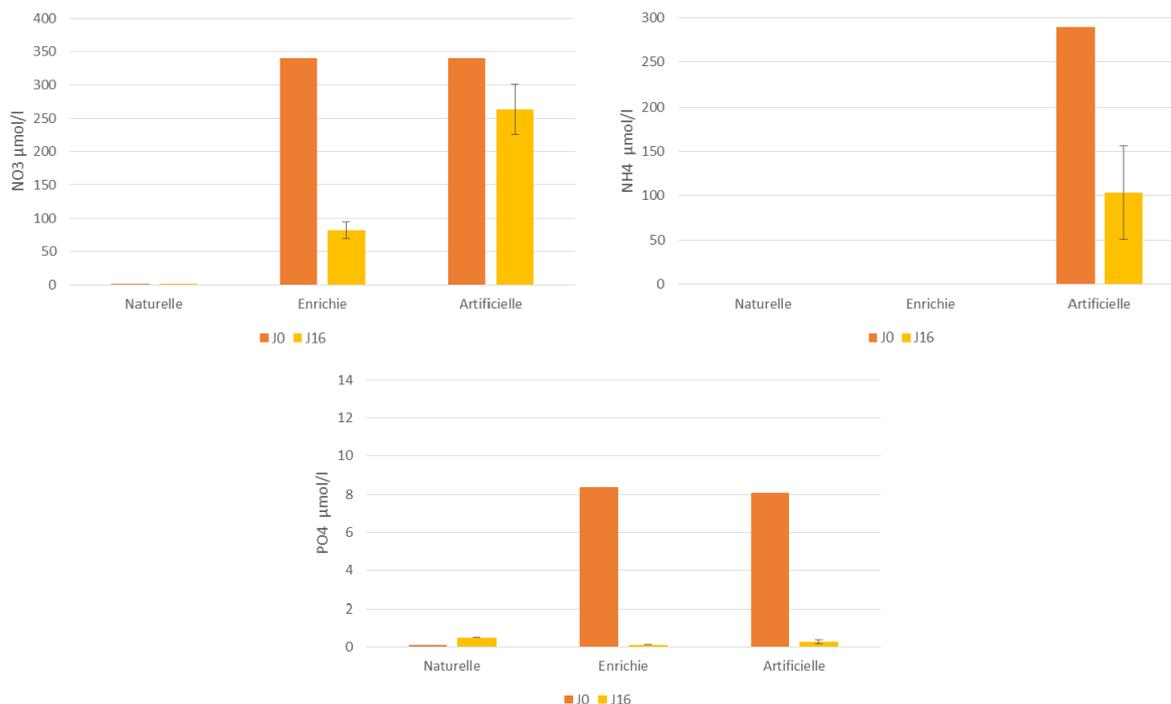


Figure 15. Nutriments dissous (Nitrate : NO₃, Ammonium : NH₄, Orthophosphate : PO₄) mesurés dans les milieux de culture ; eau de mer naturelle non enrichie : NATURELLE (NAT) ; eau de mer naturelle enrichie : ENRICHIE (ENR) ; eau de mer artificielle enrichie : ARTIFICIELLE (ART) en octobre 2015. Les milieux étant renouvelés tous les 4 jours, les données indiquent l'évolution des concentrations sur ce laps de temps : J0 représentant les concentrations initiales dans les milieux renouvelés ; J16 : évolution sur 4 jours entre le 12^{ème} et le 16^{ème} jour (J16) de l'expérience. Données : moyenne ± erreur type (J0 : n=1, J16 : n=3). Expérience conduite en octobre.

La Figure 16 présente le contenu interne en azote et en phosphore dans les thalles de *Pylaiella* en fin d'expérience pour chaque condition de culture. A noter que le suivi de terrain permet de savoir que les algues *in situ* prélevées le 14 septembre 2015 contenaient de l'azote à hauteur de 2,23 % de MS et 0,32 % de MS en phosphore. Ces valeurs sont considérées comme proches des contenus internes en N et P du lot d'algues ayant servi à initier l'expérimentation.

Les résultats montrent que les contenus internes de *Pylaiella* en azote et en phosphore ont été doublés dans les milieux d'eau de mer ENRICHIE et ARTIFICIELLE en comparaison de la valeur obtenue à partir des algues prélevées sur le terrain fin septembre. En revanche, comme dans l'expérience de juillet, une diminution des quotas internes en azote et en phosphore a été observée dans le milieu d'eau de mer NATURELLE.

Le comportement écophysologique des algues présente des différences entre l'expérience de juillet et d'octobre. En milieu d'eau de mer naturelle, la biomasse de *Pylaiella* ne se maintient pas en octobre (à l'inverse de l'expérimentation de juillet) en dépit de quotas internes plus importants. Par ailleurs, concernant le milieu d'eau de mer ARTIFICIELLE, l'absorption des nutriments est comparable à celle observée en milieu d'eau de mer ENRICHIE alors que la biomasse diminue (comme observé en juillet). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces différences :

- Le stress lumineux subit par *Pylaiella* au début de l'expérience du mois de juillet a endommagé les algues et modifié certains paramètres écophysioologiques
- Les populations algales expérimentées appartiennent à deux sous-espèces différentes (comme suggéré par le suivi de terrain) et ont donc des comportements écophysioologiques différents.

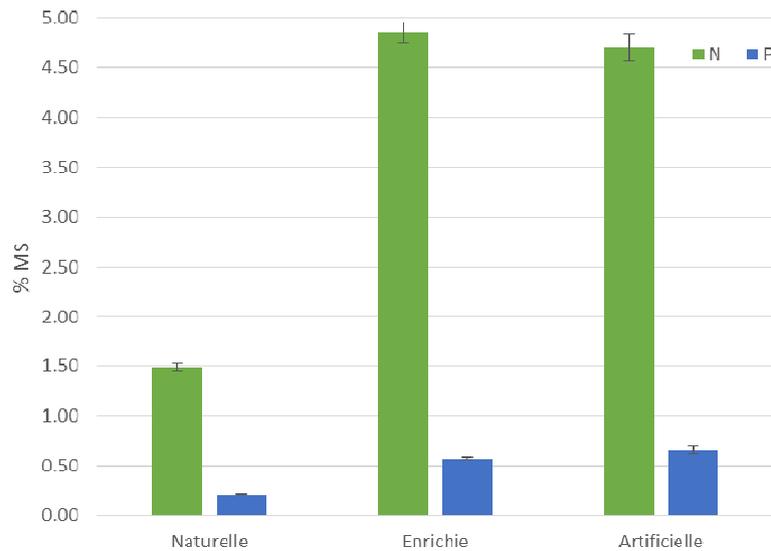


Figure 16. Quotas internes azotés (N) et phosphorés (P) de *Pylaiella littoralis* (% MS : % de masse sèche) en fin d'expérience (16^{ème} jour) en eau de mer naturelle non enrichie : NATURELLE, d'eau de mer naturelle enrichie : ENRICHIE et d'eau de mer artificielle enrichie : ARTIFICIELLE pendant 16 jours en octobre 2015. Données : moyenne \pm erreur type (n=3). Expérience conduite en octobre.

La coloration de *Pylaiella* en fin d'expérimentation témoigne également de la constitution des quotas avec des thalles plus foncés pour les milieux d'eau de mer ENRICHIE et ARTIFICIELLE (Figure 17). L'apparition progressive au cours de l'expérience de petits thalles fins dans ces deux milieux suggère également une reproduction soit par sporulation soit par fragmentation.

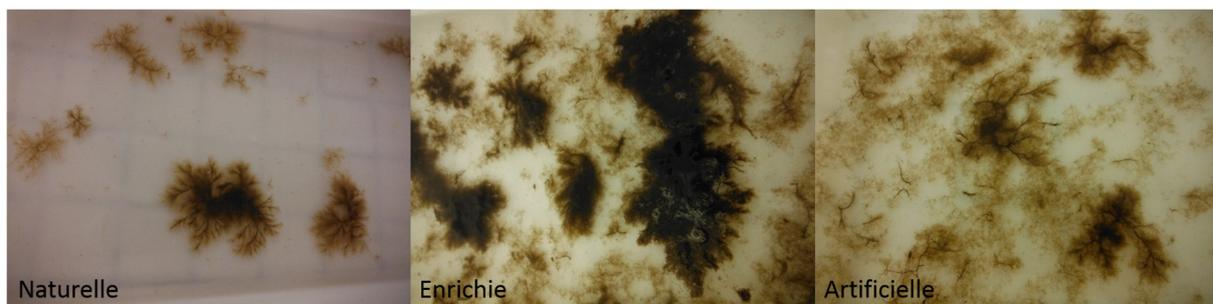


Figure 17. *Pylaiella littoralis* en fin d'expérience (16^{ème} jour) dans les différentes conditions de culture. Naturelle (à gauche) : eau de mer naturelle ; Enrichie (au milieu) : eau de mer naturelle enrichie ; Artificielle (à droite) : eau de mer artificielle enrichie. Expérience conduite en octobre.

L'eau de mer ENRICHIE paraît être le milieu le plus propice à une croissance de *Pylaiella* en laboratoire. Les observations microscopiques faites au cours des expériences ont confirmé ce résultat. Une croissance et une reproduction active de *Pylaiella* a été observée en eau de mer ENRICHIE en juillet et en octobre permettant d'expliquer une telle augmentation de la biomasse (Figure 18). Ces phénomènes (apparition de cellules reproductrices et/ou de sporulation) ont été également observés en eau de mer ARTIFICIELLE mais dans une moindre mesure et ils n'ont pas été observés en eau de mer NATURELLE.



Figure 18. *Pylaiella littoralis* en eau de mer ENRICHIE observé au microscope à 16 jours de croissance. A) Présence du développement de nouvelles ramifications. B) Présence de cellules reproductrices. C) observation de sporulation des cellules reproductrices.

Une forte sporulation pourrait expliquer l'apparition de nouveaux thalles observés en Figure 17 et semble se confirmer par l'examen des eaux des différents bacs, présentant une coloration plus foncée en eau de mer ENRICHIE et plus légèrement colorée pour l'ARTIFICIELLE (Figure 19). En outre, il a été observé au microscope dans ces eaux colorées un nombre important de fragments ou de petits thalles de *Pylaiella*.



Figure 19. Coloration des eaux des trois milieux de culture d'eau de mer après 4 jours de culture, entre J12 et J16. Naturelle (à gauche) : eau de mer naturelle ; Enrichie (au milieu) : eau de mer naturelle enrichie ; Artificielle (à droite) : eau de mer artificielle enrichie. Expérience conduite en octobre.

*L'objectif de cette expérimentation était de trouver un milieu dans lequel la culture de *Pylaiella littoralis* était concluante permettant d'envisager des expérimentations écophysiologiques plus poussées. Les résultats ont montré que :*

- Le milieu de culture basé sur de l'eau de mer artificielle ne convient pas à la mise en culture de *Pylaiella*. L'eau de mer naturelle devra être utilisée pour les expérimentations futures.*
- Le comportement écophysiologique semble varier selon la période de l'année. La mise en place de nouvelles expérimentations devra prendre en compte cette variation saisonnière.*
- L'enrichissement en sels nutritifs semble induire une reproduction. Selon les expérimentations menées, une phase reproductive peut induire un biais dans les résultats obtenus. Une modulation de l'enrichissement ou une durée d'expérimentation plus courte pourra être envisagée pour éviter ce phénomène si nécessaire.*

4.2 Culture en milieux épurés

Différentes sources d'eau de mer épurée ont été testées comme milieu de culture pour le *Pylaiella*. Le but final était comme lors des expériences précédentes de trouver un milieu permettant à l'algue d'épuiser le milieu et ses stocks internes en nutriments afin de pouvoir déterminer ultérieurement les quotas internes de celle-ci.

L'intérêt de l'épuration biologique par rapport aux milieux enrichis ou artificiels consiste en une plus grande facilité de production de ces milieux, par l'économie des réactifs chimiques coûteux et parfois dangereux à manipuler (composés classés CMR).

4.2.1 Protocole

4.2.1.1 Epuration de l'eau de mer

De l'eau de mer naturelle a été épurée en utilisant des algues *Ulva* sp. collectées le 16 juillet 2015 à Bréhec (22). A cette époque de la saison, les Ulves ont généralement des quotas internes en azote et phosphore très faibles et sont donc carencées. L'épuration de l'eau de mer par les Ulves a donc été basée sur le principe d'une absorption par ces algues des nutriments présents dans l'eau de mer, cette dernière présentant également normalement de faibles teneurs en nutriments à cette époque de l'année (été).

Deux bacs de 800 L situés en extérieur ont été remplis d'eau de mer et 3 kg d'Ulves ont été placés par bac (Figure 20). L'eau de mer d'un des bacs a été épurée en présence d'Ulves pendant 4 jours (du 16 au 20 juillet) et l'autre pendant 8 jours (du 16 au 24 juillet). Le mouvement des algues ainsi que la bonne oxygénation de l'eau de mer ont été assurés par bullage d'air dans les bacs. A la fin de l'épuration, l'eau de mer a été filtrée (0.22 µm) et stockée en chambre froide jusqu'au lancement de l'expérience de culture de *Pylaiella littoralis* en milieux épurés.



Figure 20. Dispositif d'épuration de l'eau de mer par les Ulves (3kg/bac). Un bac de 800 L épuré pendant 4 jours (EPU4) et un bac de 800 L épuré pendant 8 jours (EPU8).

4.2.1.2 Culture de *Pylaiella littoralis* en milieux épurés

Trois milieux de culture ont été testés lors de cette expérience :

- une eau de mer naturelle non épurée servant de témoin, appelée NATURELLE ci-après,
- une eau de mer épurée pendant 4 jours, appelée EPU4 ci-après
- une eau de mer épurée pendant 8 jours, appelées EPU8 ci-après.

Les trois milieux ont été filtrés à $0.22 \mu\text{m}$ et distribués dans 3 bacs répliqués selon un dispositif expérimental et des conditions identiques à ceux décrits paragraphe 4.1.1. Le protocole est représenté de façon schématique Figure 21.

La culture de *Pylaiella* dans ces trois milieux a eu lieu pendant 16 jours du 29 juillet au 14 août 2015. La biomasse de *Pylaiella* placée en culture était de $80 \text{ g} \pm 13 \text{ g}$ (erreur type) en poids humide en utilisant la méthode de pesée décrite au paragraphe 3.1. Le suivi de la croissance de *Pylaiella* a été assuré par des pesées régulières tous les 4 jours. Les milieux de culture respectifs n'ont pas été renouvelés dans les bacs au cours de l'expérience afin de permettre au *Pylaiella* d'épuiser les nutriments du milieu et de puiser dans ses réserves internes en azote et en phosphore. Des photos macroscopiques et microscopiques des algues de chaque répliquat ont été prises à chaque pesée afin de suivre visuellement l'évolution de *Pylaiella*. Des échantillons d'eau ont été prélevés et filtrés ($0.22 \mu\text{m}$) en début et fin d'expérience (après 16 jours d'expérience). Ces échantillons ont été analysés afin de déterminer leur teneur en nitrate, ammonium et orthophosphate dissous (analyses effectuées par Eurofins). En fin d'expérience, le *Pylaiella* a été collecté, rincé à l'eau ultra pure, congelé, lyophilisé, pesé (poids sec), puis analysé afin de déterminer la concentration interne en nutriments (analyses effectuées par In Vivo).

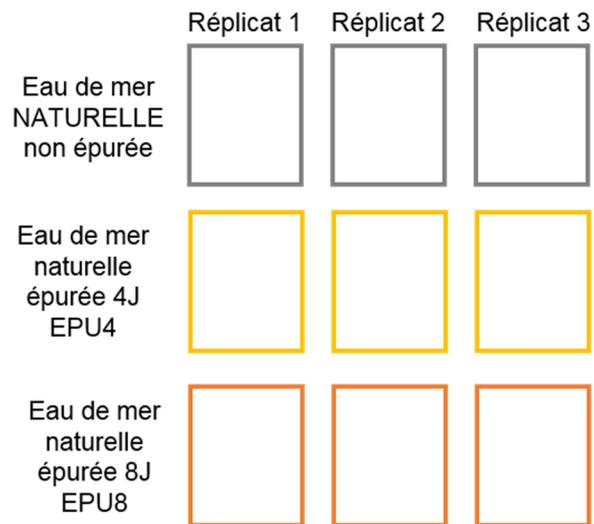


Figure 21. Protocole de culture du *Pylaiella* en eaux de mer épurées grâce à la présence d'Ulves pendant 4 jours (EPU4) et pendant 8 jours (EPU8), l'eau de mer NATURELLE non épurée servant de témoin (n=3)

4.2.2 Résultats

Aucune variation significative de biomasse n'a été observée quel que soit le milieu considéré (Figure 22). La biomasse sèche mesurée en fin d'expérimentation confirme qu'aucune différence significative n'existe entre les milieux testés (Figure 23).

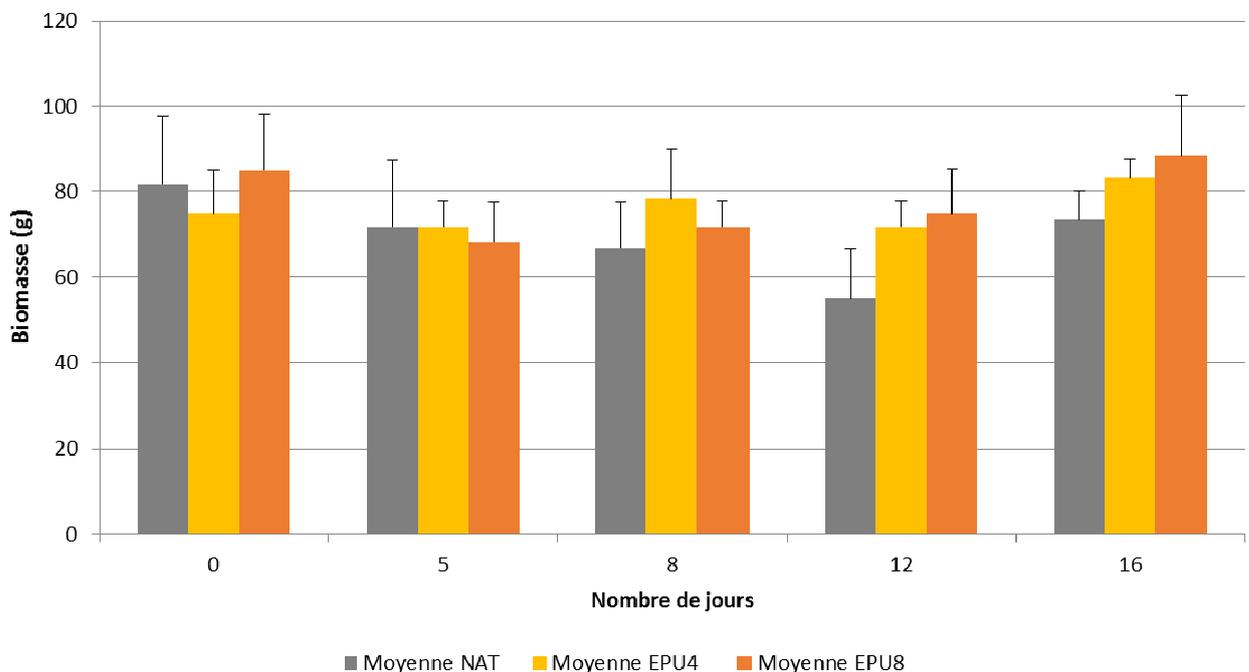


Figure 22. Evolution de la biomasse (g de masse égouttée) de *Pylaiella littoralis* cultivé en milieu d'eau de mer naturelle (NAT) et d'eau de mer épurée pendant 4 jours (EPU4) et épurée pendant 8 jours (EPU8) durant 16 jours en août 2015. Données : moyenne \pm erreur type (n=3).

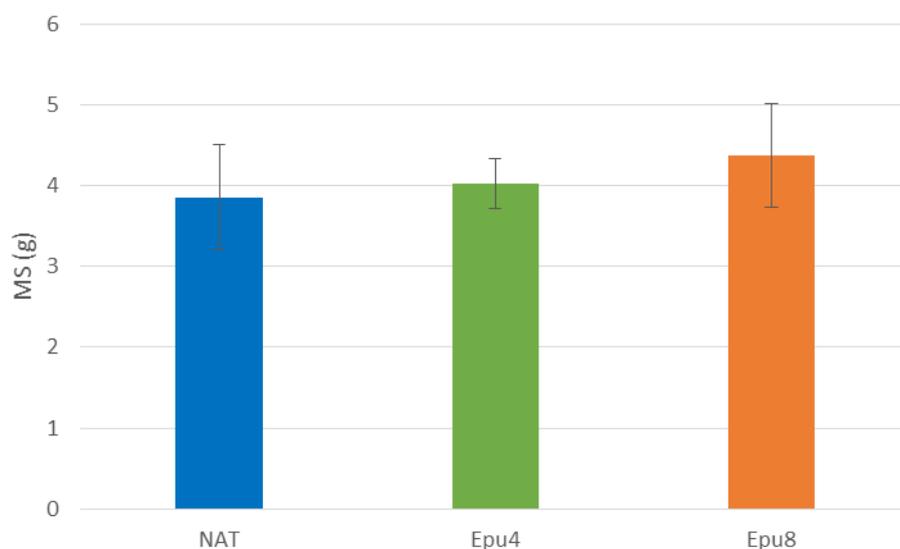


Figure 23. Biomasse (Masse Sèche : MS) de *Pylaiella littoralis* cultivé en eau de mer naturelle (NAT) et eau de mer épurée pendant 4 jours (EPU4) et épurée pendant 8 jours (EPU8) au 16^{ème} jour. Données : moyenne \pm erreur type (n=3). Expérience conduite en aout 2015.

L'analyse des concentrations en nutriments dissous (Figure 24) dans les trois milieux de culture a été effectuée au début et au 16^{ème} jour de l'expérience. Pour rappel, les milieux n'ont pas été renouvelés lors de cette expérience afin d'obtenir un épuisement des nutriments dans le milieu et d'initier la diminution des contenus internes en azote et en phosphore des thalles de *Pylaiella*.

Pour les nitrates dissous à l'état initial (J0), une diminution due à l'épuration a été mesurée entre l'eau de mer NATURELLE et l'épuration à 8 jours (EPU8) (jusqu'à 2 fois moins), alors qu'une très faible différence entre l'épuration à 4 jours (EPU4) et l'eau de mer NATURELLE a été observée. Les nitrates dissous n'étaient plus qu'à l'état de traces au 16^{ème} jour dans les trois milieux.

Les concentrations en orthophosphates étaient initialement plus importantes dans les milieux épurés (jusqu'à 3 fois pour EPU4 et jusqu'à 7 fois pour EPU8) que dans l'eau de mer (traces $<0.1 \mu\text{mol/l}$) à l'état initial (J0). Après 16 jours, cette concentration a été réduite, à un niveau équivalent ou inférieur à celui de l'eau de mer naturelle.

Les concentrations en ammonium sont restées faibles au cours de l'expérience.

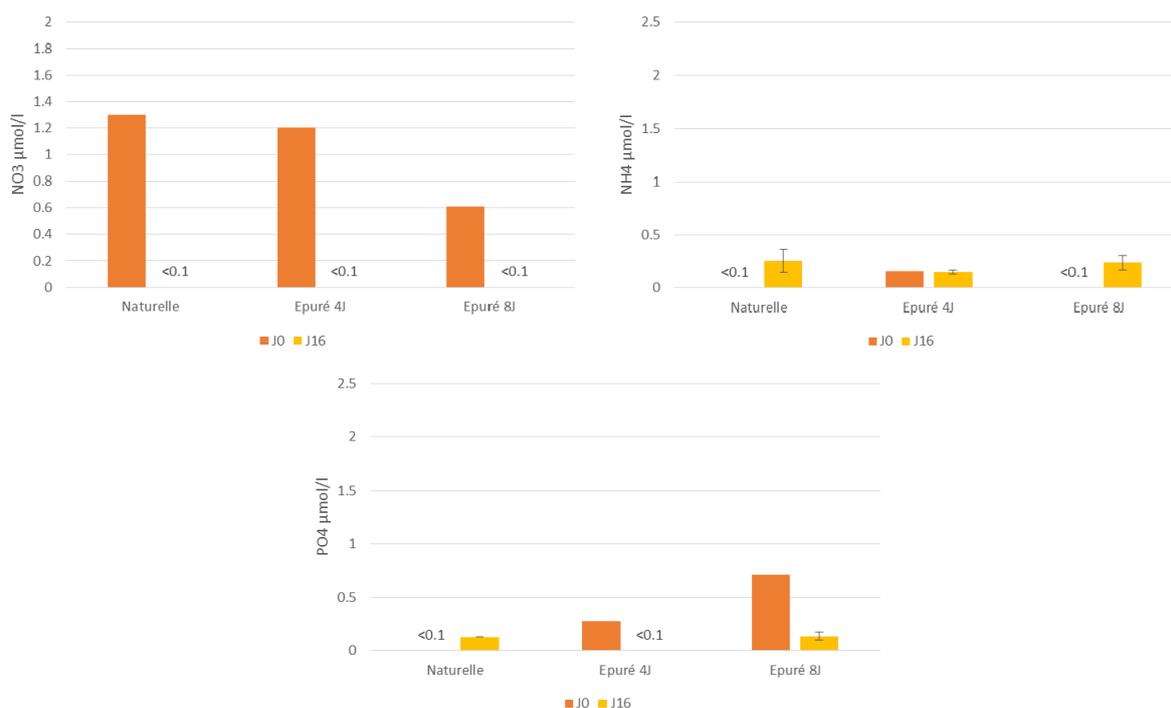


Figure 24. Nutriments dissous (Nitrate : NO₃, Ammonium : NH₄, Orthophosphate : PO₄) mesurés dans les milieux de culture : eau de mer naturelle (Naturelle), eau de mer épurée pendant 4 jours (Epuré 4J) et épurée pendant 8 jours (Epuré 8J) en août 2015. Les milieux n'ont pas été renouvelés durant les 16 jours de l'expérience. Les données indiquent l'évolution des concentrations sur ce laps de temps. J0 : concentrations initiales dans les milieux. J16 : concentrations en fin d'expérience (16^{ème} jour). Données : moyenne ± erreur type (J0 : n=1, J16 : n=3). Expérience conduite en août.

En dépit d'une faible quantité de nutriments dans le milieu à l'issue de l'expérimentation, les contenus internes en azote et en phosphore des thalles de *Pylaiella* sont comparables quel que soit le milieu dans lequel elles ont été placées. Il est probable que les concentrations initiales en azote (environ 1.2 μM pour l'eau de mer naturelle et l'eau de mer EPU4 et 0.6 μM pour l'eau de mer EPU 8) aient été suffisantes pour que les algues n'aient pas à puiser dans leur réserve interne. Par ailleurs, l'absence de croissance a également favorisée le maintien des quotas en azote et en phosphore dans les algues.

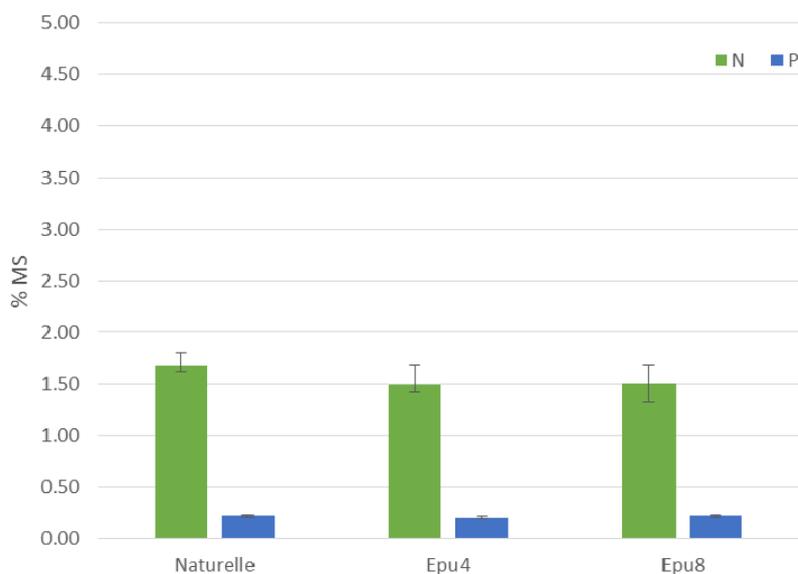


Figure 25. Quotas internes azotés (N) et phosphorés (P) de *Pylaiella littoralis* (% MS : % de masse sèche) au 16^{ème} jour de culture en eau de mer naturelle (Naturelle) et d'eau de mer épurée pendant 4 jours (EPU4) et épurée pendant 8 jours (EPU8) durant 16 jours en aout 2015. Données : moyenne \pm erreur type (n=3). Expérience conduite en aout.

L'absence de croissance de *Pylaiella* vient en contradiction avec les résultats obtenus plus haut dans lesquels une croissance était observée au moins durant les premiers jours des expérimentations. L'observation microscopiques des thalles d'algues au cours de l'expérience a montré que *Pylaiella* présentait des cellules reproductives tout au long de l'expérience et ce quel que soit le milieu dans lequel elle était placée. Des évènements de sporulation ont également été observés (Figure 26). Il est probable que la croissance soit fortement restreinte durant la période de reproduction de façon à allouer l'énergie à la seule activité de reproduction.

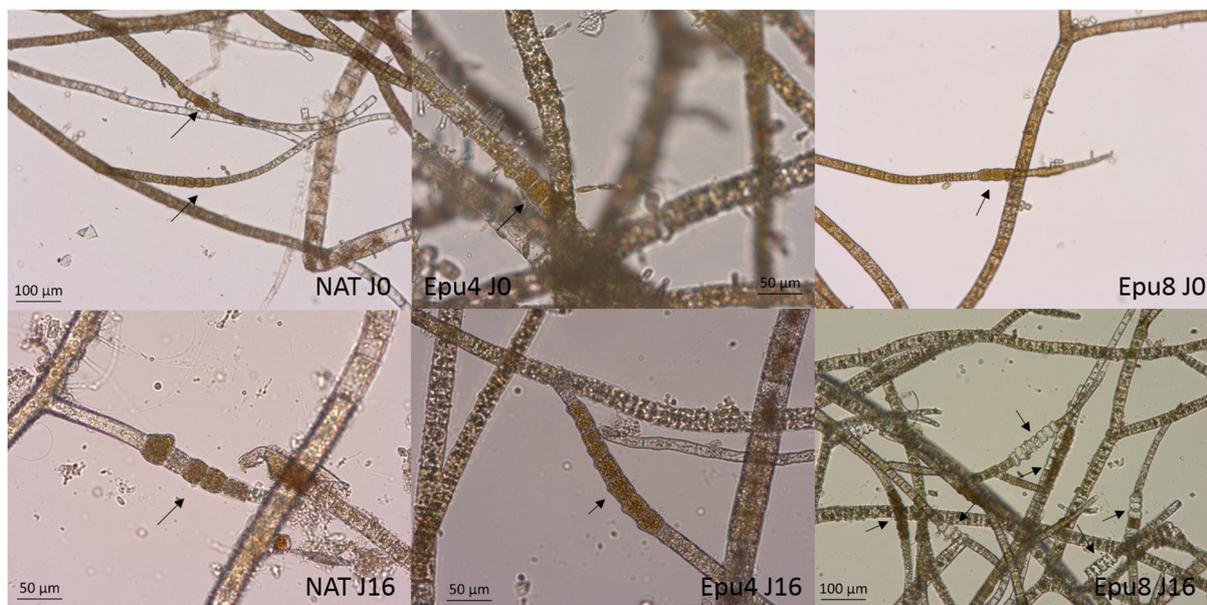


Figure 26. *Pylaiella littoralis* en eau de mer NATURELLE (NAT), épurée pendant 4 jours (Epu4) et 8 jours (Epu8) observé au microscope au début (J0) et à 16 jours de croissance (J16). Les flèches indiquent une présence de cellules reproductrices et observations de sporulation des cellules reproductrices (en bas à droite).

*Cette expérience avait pour objectif de trouver un moyen de travailler en eau de mer naturelle appauvrie afin d'envisager un protocole d'acquisition des quotas critique et de subsistance en azote et en phosphore pour *Pylaiella*. Les résultats montrent que :*

- La phyto-épuration a des capacités restreintes car même si les concentrations en nitrates ont été diminuées de moitié en 8 jours, il est très probable que le matériel biologique et les cycles biogéochimiques associés rendent ce processus peu reproductible.*
- La phase de reproduction de *Pylaiella* est un paramètre important à prendre en compte dans la mise en place d'expérimentations écophysiologicals*

5 Conclusions

Les différentes expérimentations menées ont permis de mieux cibler les variables influençant le développement *in situ* ainsi que les paramètres à prendre en compte pour parvenir à déterminer en milieu contrôlé les différentes constantes écophysiologicals d'intérêt :

- Le suivi *in situ* a permis de constater que l'évolution de *Pylaiella* en sac et sur l'ensemble de la baie n'était pas comparable. *Pylaiella* a atteint son maximum de biomasse en sac au moment même où cette algue avait quasiment disparue à l'échelle de la baie. Les sacs étant situés en bas d'estran, il est probable que les conditions environnementales y aient été plus favorables (exposition à la lumière, temps d'émergence...). A l'inverse, lorsque *Pylaiella* s'est à nouveau développé sur l'ensemble de la baie en fin de saison, sa biomasse n'a fait que diminuer dans les sacs. Ce deuxième constat semble en accord avec l'étude Geoffroy et al. 2015 indiquant la possibilité d'une succession temporelle entre deux sous-espèces de *Pylaiella* : l'une se développant au printemps et correspondant à celle suivie dans les sacs et l'autre se développant à l'automne, correspondant au développement de septembre en Baie de la Fresnaye mais non observé dans les sacs.

En parallèle, la biomasse d'*Ulvaria* a été suivie et a démontré la même tendance que celle observée dans la baie à savoir sa disparition progressive. Cela semble indiquer que le niveau bathymétrique et les paramètres physiques associés ne sont pas les premiers facteurs influençant l'évolution de cette population. L'ambiance nutritionnelle générale est probablement le facteur principal contrôlant la dynamique de cette population.

- La culture de *Pylaiella* a été rendue possible en travaillant en eau de mer naturelle enrichie. L'eau de mer artificielle est un milieu qui ne convient pas à la culture de *Pylaiella*. Toutefois, l'enrichissement semble promouvoir la reproduction de *Pylaiella* ce qui dans le cadre d'expérimentations écophysiologicals induirait des biais de mesure. Il est donc important d'effectuer des expérimentations courtes. Une modulation de l'enrichissement pourrait également être une piste d'amélioration pour tenter d'éviter ce phénomène.
- L'impossibilité de travailler en eau de mer artificielle oblige à trouver d'autres solutions pour obtenir de l'eau de mer appauvrie en nutriments. Ainsi, la phyto-épuration a été testée. Même si les concentrations obtenues en azote inorganique dissous ont été divisées par 2 par rapport à la concentration initiale de l'eau de mer, la reproductibilité d'une telle action semble délicate et des phénomènes biologiques de dégradation/reminéralisation peuvent interférer sur ce procédé.

Dans le cadre de prochaines expérimentations en laboratoire, une attention particulière devra donc être apportée au milieu utilisé en privilégiant de l'eau de mer prélevée au large en période estivale si l'objectif est de travailler en milieu appauvri. Pour une vision plus proche des processus se déroulant *in situ*, il sera nécessaire de travailler sur du *Pylaiella* prélevé au printemps et en automne, les résultats obtenus ici semblant indiquer des comportements écophysiologicals différents selon la saison.

6 Références

- Chevassus-au-Louis B, Andral B, Femenias A, Bouvier M (2012) Bilan des connaissances scientifiques sur les causes de prolifération de macroalgues vertes: Application à la situation de la Bretagne et propositions.
- Lotze HK, Schramm W, Schories D, Worm B (1999) Control of macroalgal blooms at early developmental stages: *Pilayella littoralis* versus *Enteromorpha* spp. *Oecologia* 119:46–54.
- Perrot T, Rossi N, Ménesguen A, Dumas F (2014) Modelling green macroalgal blooms on the coasts of Brittany, France to enhance water quality management. *Journal of Marine Systems* 132:38–53.
- Geoffroy A, Mauger S, Jode A de, Le Gall L, Destombe C, Clerck O de (2015) Molecular evidence for the coexistence of two sibling species in *Pylaiella littoralis* (Ectocarpales, Phaeophyceae) along the Brittany coast. *J. Phycol.*:n/a-n/a.
- CEVA (2014) Programme d'intervention du CEVA en faveur de l'action régionale et interdépartementale pour la maîtrise des phénomènes de marées vertes CIMAV 2014 Rapport sur le projet 3 complément d'étude sur les processus biologiques, hydrologiques et sédimentologies impliqués dans les blooms macroalgaux: Rapport sur le projet 3.
- Scanlan CM, Foden J, Wells E, Best MA (2007) The monitoring of opportunistic macroalgal blooms for the water framework directive. *Marine pollution bulletin* 55:162–171.

ANNEXES

&11 1-1° -11# 1# 11° 1# 1#° 1#° 1#° 1#°

Eau de mer artificielle

- Dissoudre les réactifs dans 250 L d'eau déminéralisée
- Ajouter la solution d'enrichissement (*cf.* plus bas)
- Ajuster le pH à 7,8

Réactif	Masse (en g) pour 250L
NaCl	6,5725. 10 ³
KCl	1,8500. 10 ²
CaCl ₂	2,4750. 10 ²
MgCl ₂ ·6H ₂ O	1,5225. 10 ³
MgSO ₄ ·7H ₂ O	9,8500. 10 ²

Solution d'enrichissement dite « de Provasoli » (d'après Starr et Zeikus, 1993)

Solution pour enrichir de l'eau de mer naturelle stérilisée par autoclave ou par filtration stérile.

Quantités nécessaires pour former 5 L de solution d'enrichissement, utilisée ensuite pour générer 250 L de milieu complet (eau de mer artificielle ou eau de mer naturelle enrichie).

- Dissoudre les éléments de chaque solution indépendamment dans une petite quantité d'eau déminéralisée
- Mélanger les réactifs pour former chaque solution indépendante
- Mélanger les 4 solutions
- Ajouter de l'eau déminéralisée jusqu'à 5 L
- Ajuster le pH à 7,8

Réactif	Masse (en g) pour 5 L de solution d'enrichissement
Solution 1 : Fer	
(NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂	5,85. 10 ⁻¹
Titriplex III (EDTA disodium salt dihydrate)	5,00. 10 ⁻¹
Solution 2 : Métaux	
H ₃ BO ₃	9,50. 10 ⁻¹
FeCl ₃ °6H ₂ O	4,08. 10 ⁻¹
MnSO ₄ °H ₂ O	1,37. 10 ⁻¹
ZnSO ₄ °7H ₂ O	1,83. 10 ⁻²
CoSO ₄ °7H ₂ O	4,00. 10 ⁻³
Titriplex III (EDTA disodium salt dihydrate)	8,33.10 ⁻¹
Solution 3 : Vitamines	
B 12	3,33. 10 ⁻⁴
Thiamine	1,67. 10 ⁻²
D(+) Biotin	1,67. 10 ⁻⁴
TRIS	1,67. 10 ¹
Solution 4 : N et P	
NaNO ₃	1,17. 10 ¹
C ₃ H ₇ NaO ₆ P°5H ₂ O	1,67