

ANCOVA 17

Aquaculture Nouvelle de COncombre de mer, de Ver tube et
d'Algue rouge en Charente-Maritime

Vers la création d'une filière de culture
de l'algue rouge *Porphyra purpurea*



Cédric Hennache, Amandine
Adrien, Pierrick Barbier, Sarah
Bouchemousse Chloé Jegou,
Guillaume Lebrun

Décembre 2024

Cédric Hennache ANCOVA 17	Centre pour l'Aquaculture, la Pêche et l'Environnement de Nouvelle-Aquitaine Porteur de projet : CAPENA
ANCOVA 17 (Aquaculture Nouvelle de CONcombres de mer, de Ver tube et d'Algue rouge en Charente-Maritime) - Vers la création d'une filière de culture de l'algue rouge <i>Porphyra purpurea</i>	
Rapport 49 pages	Décembre 2024
Hennache C., Adrien A., Barbier P., Bouchemousse S., Jegou C., Lebrun G. (2024) ANCOVA 17 (Aquaculture Nouvelle de CONcombres de mer, de Ver tube et d'Algue rouge en Charente-Maritime) - Vers la création d'une filière de culture de l'algue rouge <i>Porphyra purpurea</i> , CAPENA, Rapport 49 p	
<p>RESUMÉ :</p> <p>Le projet ANCOVA 17 explore la faisabilité de nouvelles filières aquacoles, en valorisant des espèces indigènes sous-exploitées au fort potentiel pour le développement de l'aquaculture multitrophique intégrée sur les côtes françaises et la diversification des production aquacoles.</p> <p>Les espèces étudiées incluent l'algue rouge <i>Porphyra purpurea</i>, le ver tube <i>Diopatra biscayensis</i> et les concombres de mer <i>Holothuria forskali</i> et <i>H. tubulosa</i>.</p> <p>Concernant <i>P. purpurea</i>, le projet vise à approfondir les connaissances biologiques et techniques liées à sa culture tout en explorant des applications à forte valeur ajoutée. Une première phase a permis la mise en place d'une écloserie pilote, avec le développement de protocoles spécifiques allant de l'obtention des souches au transfert des plantules en mer. Cette étape a validé un itinéraire technique adapté aux conditions locales, montrant des performances prometteuses en termes de croissance et de gestion des cultures.</p> <p>En parallèle, une caractérisation génétique des populations de <i>Porphyra</i> en Charente-Maritime a enrichi les connaissances sur sa diversité intra- et interspécifique. Par ailleurs, une comparaison des performances de croissance entre des individus issus d'écloserie et d'autres captés dans le milieu naturel a mis en évidence les avantages des cultures contrôlées.</p> <p>Le développement d'un plugin QGIS, basé sur des données issues de survols en drone, offre un outil fonctionnel pour la reconnaissance des zones favorable à la culture de cette algue au sein des concessions ostréicoles.</p> <p>Enfin, l'optimisation du procédé de bioraffinerie, permettant l'obtention de fractions riches en molécules d'intérêt, ouvre la voie à des applications innovantes dans différents secteurs industriels.</p>	
Mots clés : <i>Porphyra purpurea</i> , algue rouge, algoculture	

Table des matières

1	Contexte	6
1.1	Généralités	6
1.2	L'algue rouge <i>Porphyra purpurea</i>	6
2	Mise en place d'une éclosérie pilote	8
2.1	Présentation.....	8
2.2	<i>Porphyra</i> : biologie et cycle de vie	8
2.3	Itinéraire technique de la culture de <i>Porphyra purpurea</i>	9
2.3.1	Obtention des souches	10
2.4	Cycle de culture	12
2.4.1	Croissance du <i>Conchocelis</i>	12
2.4.2	Maturation du <i>Conchocelis</i>	12
2.4.3	Déclenchement de la sporulation	13
2.4.4	Ensemencement des supports	13
2.4.5	Préculture des plantules d'éclosérie en bassin.....	14
2.4.6	Transfert en mer.....	14
2.5	Calendrier opératoire.....	15
2.6	Développement d'une éclosérie pilote sur le site de FMDS	15
2.6.1	Matériel nécessaire.....	16
2.6.2	Temps nécessaire pour mettre en place l'activité d'éclosérie.....	16
2.6.3	Précisions des différentes étapes de culture et résultats.....	17
2.6.4	Bilan.....	20
2.7	Conclusions	21
3	Caractérisation de la diversité génétique inter- et intra-spécifique des populations de <i>Porphyra spp.</i> en Charente-Maritime	23
3.1	Contexte et objectifs	23
3.2	Méthodologie.....	23
3.2.1	Identification des espèces de <i>Porphyra spp.</i>	23
3.2.2	Mise au point de marqueurs génétiques pour étudier la diversité et structure génétique de <i>Porphyra purpurea</i>	24
3.3	Résultats	26
3.3.1	Diversité et distribution des espèces de <i>Porphyra spp.</i> en Charente-Maritime ...	26
3.3.2	Résultats d'amplification des marqueurs génétiques testés	28
3.4	Bilan et perspectives	29

4	Comparaison des performances de croissance de <i>Porphyra</i> issue d'écloserie et de <i>Porphyra</i> captée dans le milieu naturel	30
4.1	Généralités.....	30
4.2	Objectif.....	30
4.3	Méthodologie.....	31
4.3.1	Supports.....	31
4.3.2	Données de biomasse	31
4.4	Analyse.....	33
4.5	Résultats	34
4.6	Discussion.....	35
4.7	Bilan.....	36
5	Identification des zones favorables au développement de <i>Porphyra</i>	37
5.1	Contexte	37
5.2	Méthodologie.....	37
5.2.1	Principe	37
5.2.2	Acquisition des données	37
5.2.3	Traitement des données.....	38
5.2.4	Détection des algues <i>Porphyra</i> et analyse de la surface couverte.....	39
5.3	Bilan.....	40
6	Recherche de molécules d'intérêt et développement de méthodologies d'extraction .	42
6.1	Contexte	42
6.2	Problématique	43
6.3	Méthodologie.....	43
6.3.1	Etude de l'influence de la position sur l'estran sur la composition biochimique de <i>Porphyra</i>	43
6.3.2	Optimisation du procédé de bioraffinerie.....	44
6.4	Résultats	45
6.4.1	Influence de la position sur l'estran sur la composition biochimique.....	45
6.4.2	Optimisation du processus de bioraffinerie.....	45
6.5	Conclusions	46
7	Conclusion générale.....	48
8	Références bibliographiques	49

Liste des figures

Figure 1 : Développement de <i>Porphyra purpurea</i> sur des poches ostréicoles du bassin de Marennes-Oléron.....	6
Figure 2 : Cycle de développement de <i>Porphyra sp.</i> , cas d'une espèce dioïque (© CEVA)	9
Figure 3 : Thalle de <i>P. purpurea</i> en période de reproduction (© FMDS)	10
Figure 4 : Désinfection d'un morceau d'algue femelle	11
Figure 5 : <i>Conchocelis</i> avant mise en souchothèque	11
Figure 6 : Filaments de <i>Conchocelis</i> observés au microscope après 2 mois de croissance (© FMDS)	12
Figure 7 : Apparition des conchosporanges lors de la maturation des <i>Conchocelis</i> (© FMDS)	12
Figure 8 : Supports de captage (poche ostréicole) disposés au fond du bac (© FMDS).....	13
Figure 9 : Plantules sur poche observées à la loupe binoculaire	14
Figure 10 : Supportsensemencés en éclosérie disposés sur tables ostréicoles dans le milieu naturel	15
Figure 11 : Calendrier opératoire de la culture du <i>Porphyra</i>	15
Figure 12 : Concentration moyenne de <i>conchocelis</i> durant l'expérimentation	18
Figure 13 : Localisation des sites d'échantillonnage de <i>Porphyra spp.</i> en milieu naturel (en jaune) et en zones ostréicoles (en rouge). Les zones blanches correspondent au cadastre ostréicole.	24
Figure 14 : a) Arbre phylogénétique comprenant les 86 séquences des échantillons récoltés sur les sites naturels et sur les concessions ostréicoles, trois des 4 échantillons de références (échantillons fléchés) et les séquences des taxons de l'ordre des Bangiales provenant de la base de référence Genbank. b) et c) Zooms de l'arbre phylogénétique au niveau des clusters correspondant respectivement à <i>Porphyra dioica</i> et <i>Porphyra purpurea</i>	27
Figure 15 : Distribution des haplotypes correspondant aux regroupements génétiques de <i>Porphyra umbilicalis</i> (orange), <i>Porphyra dioica</i> (jaune) et <i>Porphyra purpurea</i> (bleu).	28
Figure 16 : Profils des chromatogrammes, obtenus à l'aide du séquenceur « SeqStudio », du marqueur PPY02 identifiés par le logiciel Micro Primers, sur le panel de 6 échantillons.	29
Figure 17 : Développement de <i>P. purpurea</i> sur des tables ostréicoles.....	30
Figure 18 : Développement de <i>P. purpurea</i> et <i>U. intestinalis</i> sur une poche ostréicole	30
Figure 19 : Support utilisé pour le captage de <i>P. purpurea</i>	31
Figure 20 : Relève de la biomasse d'algue sur les supports	32
Figure 21 : Protocole utilisé pour suivre le développement de la biomasse de <i>P. purpurea</i> ...	33

Figure 22 : Poids moyen de <i>Porphyra</i> relevé sur les supports à chaque suivi en fonction du site de captage naturel	34
Figure 23 : Poids moyen de <i>Porphyra</i> relevé sur les supports à chaque suivi en fonction du site de croissance	34
Figure 24 : Poids moyen de <i>Porphyra</i> récolté par support au pic de biomasse sur l'ensemble des sites de croissance en fonction de leur origine de captage	35
Figure 25 : Drone DJI Mavic 3M.....	37
Figure 26 : Les 3 Orthomosaïques produites avec le logiciel Pix4Dfields (MCARI, Image multispectrale et image en couleur réelle).....	39
Figure 27 : Exemple d'usage de l'extension.....	40
Figure 28 : Composés identifiés chez <i>Porphyra</i> sp. dans la littérature (Cao et al, 2016).....	42
Figure 29 : Proposition d'étapes d'extraction pour obtenir des extraits riches en molécules d'intérêt précédemment identifiées.....	43
Figure 30 : Schéma des paramètres testés pour l'obtention de la fraction lors de l'étape 1..	44
Figure 31 : Influence de la position de la culture de <i>Porphyra</i> sur l'estran (marée 85 ou 50) sur la composition biochimique de l'algue.....	45
Figure 32 : Influence de la température et de l'alcalase sur les rendements en protéines lors de l'étape 1 (A) et les rendements en <i>Porphyranes</i> et cellulose des étapes 2 et 3 (B) et spectres FTIR-ATR des fractions riches en <i>Porphyrane</i> et cellulose obtenues aux étapes 2 et 3 (C). ..	47

Liste des tableaux

Tableau 1 : Matériel et coûts associés pour la mise en place d'une éclosérie pilote sur le site de FMDS.....	16
Tableau 2 : Récapitulatif du temps agent passé pour la mise en œuvre de l'éclosérie pilote	17
Tableau 3 : Récapitulatif des différentes étapes de culture	17
Tableau 4 : Évolution du poids des <i>Conchocelis</i> durant la culture	18
Tableau 5 : Gain de biomasse des <i>Conchocelis</i> durant les différentes étapes de culture.....	19
Tableau 6 : nombre de spores dénombré à chaque ensemencement	19
Tableau 7 : Date de mise à l'eau des supports dans le milieu naturel.....	20
Tableau 8 : Problèmes rencontrés lors des différentes étapes de l'éclosérie pilote et préconisations.....	20
Tableau 9 : Détails des SSRs identifiés à l'aide des logiciels Micro-Primers et QDD.	25
Tableau 10 : calendrier d'acquisition des données de biomasse de <i>Porphyra</i>	32

1 Contexte

1.1 Généralités

Par la nature de son littoral, le bon état écologique, chimique et sanitaire des eaux ainsi que son ensoleillement, la côte de Nouvelle-Aquitaine, et en particulier celle de Charente-Maritime présente un fort potentiel pour le développement de l'aquaculture. Ce territoire est déjà largement exploité pour la production d'huîtres et de moules, ce qui en fait le premier bassin ostréicole de France.

Dans un contexte zoosanitaire peu favorable, lié à une conchyliculture monospécifique, le développement de nouvelles aquacultures peut offrir une voie de diversification pour certains conchyliculteurs, qui font face depuis quelques années à des épisodes anormaux de mortalités d'huîtres et de moules. La culture ou l'élevage de nouvelles espèces pourrait également créer des emplois dans le cadre d'une pleine activité d'exploitation, s'inscrivant directement dans les thématiques de la « croissance bleue », la gestion intégrée des zones côtières et des filières marines émergentes, la co-culture ou encore l'Aquaculture Multi-Trophique Intégrée (AMTI).

Le projet ANCOVA 17 propose de poursuivre les premiers travaux réalisés sur la faisabilité de culture ou d'élevage de 4 espèces, naturellement présentes sur les côtes de Charente-Maritime :

- L'algue rouge *Porphyra purpurea* (ou nori) ;
- Le ver tube *Diopatra biscayensis* ;
- Les holothuries *Holothuria forskali* et *H. tubulosa* (ou concombre de mer).

1.2 L'algue rouge *Porphyra purpurea*.

Dans les pertuis charentais, les macroalgues se développent naturellement et en quantité sur les poches ostréicoles, dans les concessions exploitées par les professionnels. En abondance, ces algues peuvent ralentir la croissance des huîtres en diminuant le flux d'eau qui passe à travers les poches, et donc la nourriture disponible. Pour pallier ce phénomène, les ostréiculteurs enlèvent les algues des poches puis les retournent. Les algues ainsi retirées sont laissées dans le milieu et ne sont pas valorisées. L'une des espèces que l'on retrouve au sein des concessions est l'algue rouge *Porphyra purpurea* (cf. § 3) (Figure 1).



Figure 1 : Développement de *Porphyra purpurea* sur des poches ostréicoles du bassin de Marennes-Oléron

Cette algue est proche de l'espèce cultivée en Asie (*Pyropia yezoensis*) qui sert principalement à la fabrication des feuilles de nori que l'on retrouve dans les plats asiatiques dont le plus connu est le maki-sushi.

Les études réalisées par CAPENA depuis 2017 (Grassien, 2018 ; Hennache, 2019 ; Hennache et Carpentier 2021) ont montré l'intérêt de valoriser cette espèce d'algue aussi connue sous le nom de nori. Cette algue à forte valeur ajoutée, pourrait être ramassée par les professionnels afin de la valoriser. Les conclusions obtenues durant l'étude réalisée en 2021 (Hennache et Carpentier 2021) ont montré qu'en l'état, l'exploitation du *Porphyra* n'est pas économiquement rentable pour les professionnels. Plusieurs pistes sont à l'étude pour rendre l'exploitation de cette espèce intéressante. D'une part, des voies de valorisation plus rémunératrices que l'industrie agro-alimentaire, comme la pharmacie, la médecine ou la cosmétique, qui exploitent les molécules d'intérêt naturellement présentes dans l'algue, et d'autre part la mise en place d'une algoculture dédiée sur les parcs ostréicoles.

L'axe *Porphyra* du projet ANCOVA 17 a permis de réaliser plusieurs actions ouvrant la voie vers la mise en place d'une filière de production de l'algue *Porphyra*. Les actions abordées dans ce projet sont :

- La mise en place d'une éclosérie pilote
- La caractérisation génétique de la population
- La comparaison des performances de croissance d'algue d'éclosérie et d'algue naturelle
- L'identification des zones favorables au développement de *Porphyra*
- La recherche de molécules d'intérêt et développement de méthodologies d'extraction

2 Mise en place d'une éclosérie pilote

2.1 Présentation

L'éclosérie pilote de *Porphyra purpurea* en Charente-Maritime est installée sur le site du Douhet (Ile d'Oléron, 17) appartenant aux Fermes Marines du Soleil (FMDS), avec l'appui technique du Centre d'Etude et de Valorisation des Algues (CEVA). Étant donné sa maîtrise des productions d'alevins de poissons marins, la qualification de son personnel, et la proximité des secteurs propices à de l'algoculture de nori, FMDS est un partenaire naturel pour la bonne réussite de ce projet.

L'objectif de ce travail est de maîtriser la production de plantules d'éclosérie sur des supports ensemencés afin d'être en mesure d'en proposer aux professionnels dès l'émergence d'une filière d'algoculture de nori. Les différentes étapes nécessaires à la production de supports, ainsi que les résultats obtenus durant cette expérimentation sont détaillées ci-dessous.

2.2 *Porphyra* : biologie et cycle de vie

Le cycle de reproduction des espèces de *Porphyra* est caractérisé par l'alternance de deux générations morphologiquement différentes : un stade gamétophytique foliacé macroscopique, c'est sous ce stade que l'algue est actuellement récoltée et valorisée, et un stade sporophytique filamenteux microscopique, anciennement identifié comme un genre différent : *Conchocelis*. Cette appellation est encore conservée pour nommer le sporophyte. C'est une algue annuelle dont la phénologie varie selon les espèces. La Figure 2 suivante, inspirée de l'ouvrage de Perez et al. (1992), schématise le cycle de reproduction de cette algue.

La lame (thalle) est un gamétophyte soit mâle, soit femelle, ou hermaphrodite. Elles sont dites monoïques (les deux sexes sur le même thalle), ou dioïques (sexes séparés) selon les espèces. Différents critères permettent de les différencier et de reconnaître le stade de développement. Un liseré blanchâtre à jaunâtre (pour les parties mâles), souligné par une zone rougeâtre (pour les femelles), apparaît lors de la période de reproduction. Durant cette période, les gamètes mâles sont libérés et viennent féconder les gamètes femelles sur le thalle femelle qui libèrera à son tour les zygotes issus de la fécondation. Une fois fixé sur un substrat (souvent un coquillage ou autre support calcaire), le zygote germe en un réseau filamenteux (phase *Conchocelis*) dans la matrice calcaire de la coquille. Celui-ci se développe jusqu'à produire des conchosporanges qui libèreront à leur tour des conchospores. Ces derniers germeront pour produire les nouveaux gamétophytes (Perez et al. 1992).

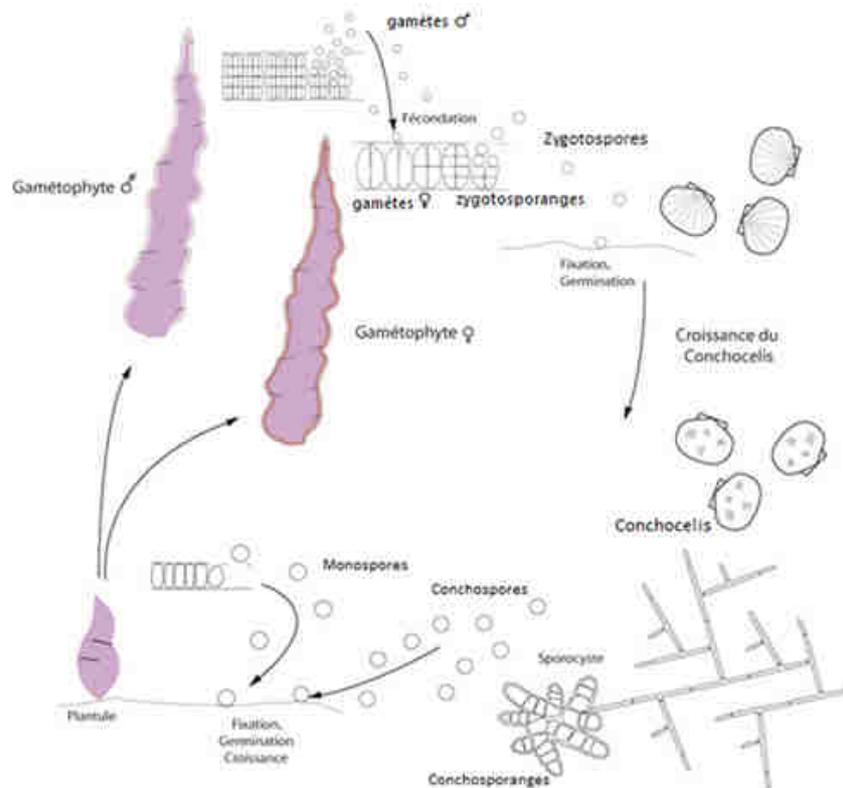


Figure 2 : Cycle de développement de *Porphyra* sp., cas d'une espèce dioïque (© CEVA)

2.3 Itinéraire technique de la culture de *Porphyra purpurea*

L'itinéraire technique de la culture de cette algue peut se décomposer en 2 grandes étapes, elles-mêmes subdivisées en différentes phases.

- Obtention des souches
 - Récolte des géniteurs
 - Désinfection des géniteurs
 - Déclenchement de la sporulation (zygotospores)
 - Mise en collection des *Conchocelis* (facultatif)
- Cycle de culture à partir des souches
 - Culture des *Conchocelis* en free-living
 - Déclenchement de la sporulation des conchosporanges
 - Ensemencement des supports de culture
 - Prégrossissement des plantules d'écloserie en bassins (facultatif)
 - Transfert des jeunes plantules en mer
 - Grossissement en mer
 - Récolte

2.3.1 Obtention des souches

2.3.1.1 Récolte des géniteurs

La première étape consiste à prélever dans le milieu naturel des géniteurs femelles issus du secteur où la culture d'algue est envisagée. Ceci permet d'avoir une souche adaptée à l'environnement de culture. Ce prélèvement est réalisé durant la période de reproduction au moment où les algues sont fertiles. D'après les différentes observations réalisées dans le milieu lors des précédentes études de CAPENA, on peut considérer qu'en Charente-Maritime, le pic de reproduction de cette espèce a lieu la dernière quinzaine de juin. Un décalage plus tôt pendant le mois de juin est possible si les températures de l'eau sont supérieures aux normales de saisons.

Les individus à prélever doivent être propres, peu dégradés, et dépourvus d'épiphytes. *Porphyra purpurea* est une espèce hermaphrodite, la partie femelle compose la moitié du thalle. En période de reproduction la zone fertile apparaît rosée tandis que la partie mâle qui compose l'autre partie du thalle est plutôt jaune pâle à blanchâtre (Figure 3). Une fois prélevé, les individus sont transportés au frais en milieu humide.

Dans le cadre de cette étude, des géniteurs de *P. purpurea* ont été prélevés le 9 juin 2023 dans le bassin de Marennes-Oléron sur une concession ostréicole de banc de Trompe-sot, en face de la commune de Saint-Trojan les bains.

2.3.1.2 Désinfection des géniteurs

Cette étape consiste à prélever des morceaux de thalle fécondés sur la partie femelle de l'algue, en vue de la production de spores (zygotospores) qui vont germer et se développer pour former le *Conchocelis*. Cette étape est minutieuse et est réalisée en milieu stérile. L'ensemble des outils utilisés est rigoureusement stérilisé à l'alcool à 70°. Aucun intrant extérieur : bactérie, microalgue, spore d'autres espèces d'algue... ne doit se retrouver sur le fragment ainsi désinfecté.

La désinfection est réalisée en nettoyant chaque fragment avec un pinceau dans différents bains successifs d'eau de mer stérile (Figure 4).



Figure 3 : Thalle de *P. purpurea* en période de reproduction (© FMDS)



Figure 4 : Désinfection d'un morceau d'algue femelle

2.3.1.3 Déclenchement de la sporulation

Une fois l'étape précédente terminée, le fragment est mis en assec de quelques heures à une nuit à température de 15°C dans l'obscurité. Les morceaux de thalles désinfectés sont plongés dans une solution d'eau de mer stérile complétée avec une solution nutritive Provasoli F/2 (solution azotée, phosphatées, métallique et vitaminique) utilisée dans la culture de macroalgues marines (Andersen, 2005), et mis en agitation dans un ballon durant 3 à 6 h. Les spores vont ainsi se retrouver dans la solution.

2.3.1.4 Mise en collection des *Conchocelis*

La solution précédente est filtrée. Le filtrat obtenu est réparti dans plusieurs boîtes de Pétri contenant une solution d'eau de mer stérile complétée par une solution Provasoli F/2. Après 20 à 30 jours exposés à une lumière continue, les spores ont germé et formé des filaments de *Conchocelis* (Figure 5). Les filaments sont isolés individuellement, transférés dans un Erlenmeyer contenant un milieu de culture et conservé sans bullage en souchothèque, dans des conditions de lumière et de température contrôlées (16°C).



Figure 5 : *Conchocelis* avant mise en souchothèque

2.4 Cycle de culture

Cette étape permet d'obtenir les spores nécessaires à la colonisation des capteurs qui seront mis en croissance sur l'estran dans le milieu naturel.

Il est préférable de démarrer le cycle de culture à partir d'une souche existante déjà développée.

Dans le cadre de ce travail, la souche utilisée pour la mise en culture est une souche de *Porphyra purpurea* provenant de l'île de Ré, prélevée en juin 2018 et depuis en collection au CEVA.

2.4.1 Croissance du *Conchocelis*

Cette étape consiste à amplifier la souche à disposition afin d'avoir suffisamment de filaments pour induire la formation de structures reproductrices (conchosporanges).

La solution de *Conchocelis* est filtrée sur un maillage de 100 µm passé préalablement à l'étuve ou désinfecté à l'alcool. La boule de filaments ainsi obtenue est introduite dans un ballon autoclavé contenant une solution d'eau de mer stérile et de Provasoli F/2. Elle est ensuite dilacérée mécaniquement à l'aide d'un mixer. Le ballon est placé en chambre thermostatée à 16 °C en lumière continue avec un bullage alimenté en air filtré.

Les filaments de *Conchocelis* vont ainsi se développer lentement (Figure 6), durant 3 à 4 mois, en limitant la reproduction. Durant cette période, ils sont repiqués régulièrement (tous les 15 j) suivant le même protocole que précédemment et mis en croissance dans des volumes de plus en plus importants, passant d'un ballon de 1 L au départ jusqu'à 3 ballons de 6 L une fois la croissance optimale atteinte.

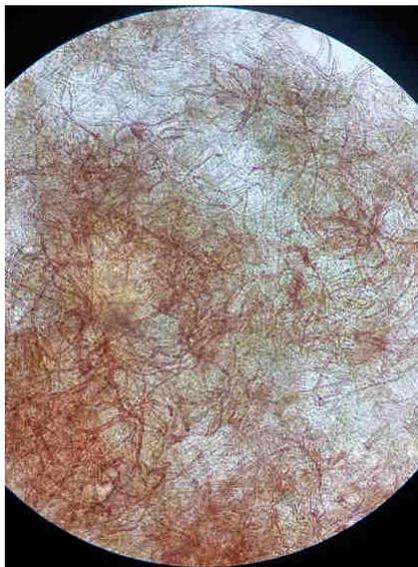


Figure 6 : Filaments de *Conchocelis* observés au microscope après 2 mois de croissance (© FMDS)

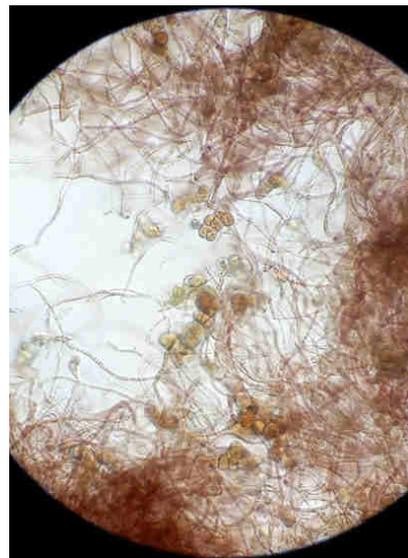


Figure 7 : Apparition des conchosporanges lors de la maturation des *Conchocelis* (© FMDS)

2.4.2 Maturation du *Conchocelis*

Cette étape va durer 2 mois minimum. Une fois que la biomasse de *Conchocelis* est considérée comme suffisante, un changement de conditions est réalisé pour provoquer la maturation. Ces conditions vont simuler une période automnale à pré-hivernale en diminuant progressivement la température jusqu'à 12°C pendant 1 mois, et jusqu'à 10°C le mois suivant. En parallèle, l'intensité lumineuse est augmentée et l'on passe à un cycle de jours courts (8h jour/16h nuit). L'alimentation en air filtrée est conservée.

L'apparition de l'appareil reproducteur (ou conchosporange) (Figure 7) est contrôlé par prélèvement régulier (lors des repiquages par exemple).

2.4.3 Déclenchement de la sporulation

Une fois que les conchosporanges sont bien développés, la libération des spores (conchospores) peut être déclenchée afin d'ensemencer les supports.

Cette sporulation est provoquée par un changement des conditions. L'intensité lumineuse est doublée et la température abaissée à 9°C. A ce stade, il peut y avoir des effets de souches et des variations en fonction de sa provenance. Le cycle lumineux reste en jour court (8h jour/16h nuit), comme durant la maturation. L'apport de nutriment se fait directement dans le ballon par ajout d'une solution nutritive (F/2) stérile. Le bullage est maintenu durant cette étape.

Les premiers conchospores, de 10 à 20 µm, apparaissent au bout d'un mois. Leur présence est contrôlée dans le ballon par prélèvement à la pipette. Lorsque que leur quantité est suffisante (environ 1000 spores/ml) les supports peuvent êtreensemencés.

2.4.4 Ensemencement des supports

Les supports utilisés dans cette étude sont des demi-poches à huîtres usagées, ayant subi un contact prolongé avec l'eau de mer. Ces poches ont une maille de 9 mm.

Les poches sont disposées à plat, au fond de bacs adaptés (des piscines hors-sols de 12 m² dans notre cas), préalablement désinfectés, remplis de 30 cm d'eau de mer stérile enrichie en milieu nutritif F/2, maintenus à une température de 10°C (Figure 8). Chaque piscine peut accueillir 14 supports.

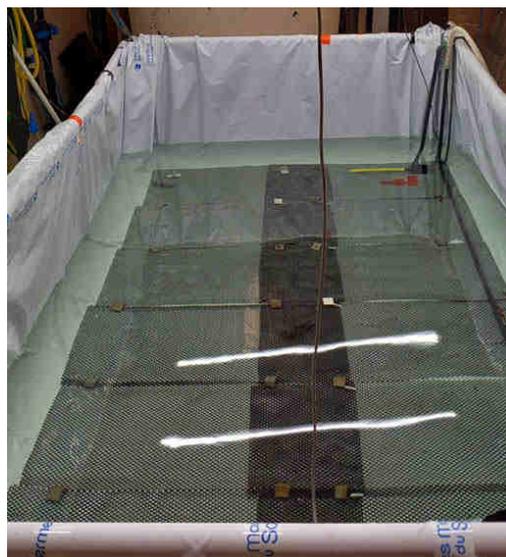


Figure 8 : Supports de captage (poche ostréicole) disposés au fond du bac (© FMDS)

Pour ensemencer, les filaments contenus dans les ballons sont tamisés en suivant la même méthodologie du changement de milieu lors de l'étape de croissance des *Conchocelis* (§2.1). Le filtrat obtenu constitue une solution de conchospores pour ensemencer les supports. Les filaments sont remis en culture.

La solution est versée délicatement en pluie fine avec un arrosoir, à quelques centimètres de la surface de l'eau au-dessus des poches, afin de limiter les éclaboussures. Il est important d'éviter les turbulences. Les spores sont non flagellées et doivent pouvoir se déposer sur les supports. Le bullage est donc coupé avant l'ensemencement et durant les 2 jours suivants afin de favoriser la fixation des spores. La lumière est maintenue au-dessus des poches à une période de 12h jour et 12h nuit.

Tant que la culture en ballon libère des conchospores, d'autres ensemencements peuvent être pratiqués. Les mêmes supports peuvent être ensemencés plusieurs fois afin d'augmenter la densité par supports. D'autres supports, peuvent également être ensemencés afin d'augmenter la quantité totale de supports ensemencés.

2.4.5 Préculture des plantules d'écloserie en bassin

Cette étape consiste à faire croître les plantules issues de la germination des spores fixés sur les supports. Il s'agit notamment de contrôler la présence et la croissance des plantules, ainsi que les paramètres des cultures (température et lumière). L'eau des bassins est renouvelée chaque semaine avec ajout de solution nutritive (F/2).

En bassin, des contaminations apparaissent systématiquement. Dans notre cas, des patches d'algues brunes de l'ordre des Ectocarpales ont été observées ainsi que des biofilms de diatomées. Ces contaminations n'ont pas eu d'incidence sur le développement des plantules qui sont bien visibles (Figure 9). Si ces contaminations sont amenées à devenir trop importantes, les bassins doivent être vidangés. Les supports sont sortis de l'eau pendant 2 heures maximum, le temps de faire un nettoyage au jet d'eau douce.



Figure 9 : Plantules sur poche observées à la loupe binoculaire

2.4.6 Transfert en mer

Après 1 à 2 mois en écloserie, les plantules sont visibles à l'œil nu. Le transport sur le site d'immersion se fait préférentiellement en atmosphère humide. Durant le transport, les supports sont espacés à l'aide de cales afin d'éviter tout arrachage de plantules par abrasion ou frottement. Une fois sur site, les supports sont placés sur des tables ostréicoles à un niveau bathymétrique adapté où les algues finiront leur croissance en milieu naturel (Figure 10), avant la récolte au mois de juin.



Figure 10 : Supportsensemencés en éclosérie disposés sur tables ostréicoles dans le milieu naturel

2.5 Calendrier opératoire

Le calendrier opératoire de la culture de *Porphyra* incluant une étape d'éclosérie dans le cadre du projet ANCOVA est détaillé dans la Figure 11. La mise en œuvre de l'éclosérie pilote s'est échelonnée entre juin 2023 et mars 2024.

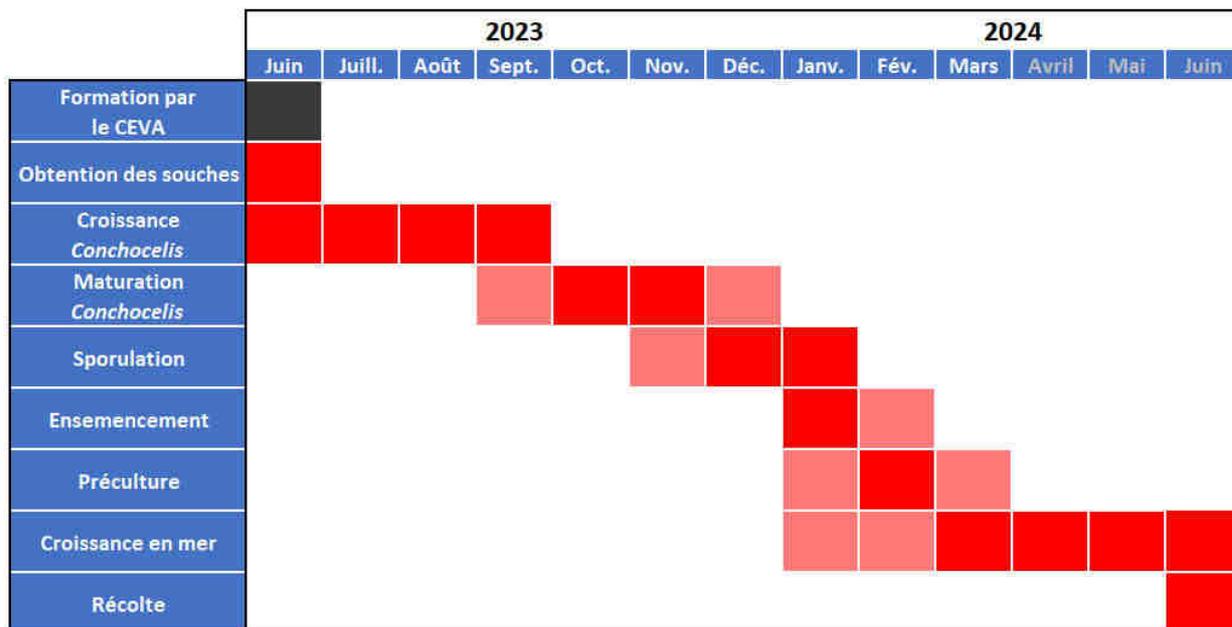


Figure 11 : Calendrier opératoire de la culture du *Porphyra*

2.6 Développement d'une éclosérie pilote sur le site de FMDS

Le site du Douhet des Fermes Marines du Soleil sur l'île d'Oléron a pour activité principale la production d'alevins de Dorade royale (*Sparus aurata*) destiné à l'aquaculture de cette espèce sur le marché européen principalement, et au-delà (Golfe Persique, Afrique du Nord...). Ce site se diversifie également avec la production de post-larves de crevettes (*Penaeus japonicus*), ainsi qu'une production d'*Ulva sp.* dans les bassins d'épuration de l'eau provenant de ses installations.

En plus de sa proximité des sites de grossissement des algues sur les concessions conchylicoles, FMDS dispose des infrastructures nécessaires et des compétences requises pour développer une éclosérie pilote de *Porphyra purpurea*.

Le paragraphe suivant détaille les différentes étapes de mise en œuvre de cette éclosérie pilote ainsi que les résultats obtenus durant cette expérimentation.

2.6.1 Matériel nécessaire

La mise en œuvre de l'éclosérie pilote a nécessité divers matériels afin de disposer de l'équipement adapté pour réaliser cette expérimentation. Le Tableau 1 suivant liste ce matériel

Tableau 1 : Matériel et coûts associés pour la mise en place d'une éclosérie pilote sur le site de FMDS

Matériel nécessaire	
<u>Verrerie</u>	€
3x6L	417,93 €
8x2L	263,20 €
10x500ml	143,82 €
<u>Armoire</u>	
Armoire thermostatée	2 074,79 €
LEDs	491,62 €
Bullage	85,02 €
Filtres soucoupes x25	284,05 €
<u>Module piscine x2</u>	
Piscine (BAC)	491,62 €
Groupe Froid	2 083,32 €
LEDs	1 756,80 €
Installation LEDs	620,11 €
Pompe aquarium	200,00 €
Soufflante	1 055,33 €
<u>Autres</u>	
Milieu de culture (conso approx. sur le projet)	387 €
Enveloppe petit matos (boites de pétri, pipettes, bec buns)	100 €
	10 354,61 €

Sur le site FMDS d'Oléron, du matériel provenant d'anciens projets ou non utilisé par la production était déjà disponible. De plus, l'autoclave de l'activité plancton a pu être mutualisé ce qui a permis de réaliser une économie importante. Les supports ont été fournis par CAPENA.

2.6.2 Temps nécessaire pour mettre en place l'activité d'éclosérie

Différentes personnes ont pris part au projet : un technicien diversification pour la mise en place et le suivi de la production de *Porphyra*, un technicien plancton pour la préparation et la stérilisation des volumes ainsi qu'un technicien de la maintenance pour la mise en place du matériel nécessaire. Le travail s'est étalé sur une période de plusieurs mois, depuis la formation en juin, jusqu'à la livraison des dernières poches en mars. Le Tableau 2 reprend les temps dédiés aux principales étapes du projet

Tableau 2 : Récapitulatif du temps agent passé pour la mise en œuvre de l'écloserie pilote

Etapes	Temps passé (heures)	ETP
Formation	25	2
Mise en place écloserie	20	2
Entretien de souches	53	2
Amplification	24,5	2
Maturation	22	2
Sporulation	32,5	2
Préculture en bassin	77	2
	254	heures tot

- **La formation** inclue le nombre d'heures dispensées par le CEVA.
- La **mise en place de l'écloserie** correspond au nombre d'heures réalisées par l'équipe pour l'agencement des deux piscines ainsi que de leurs circuits d'eau et d'air. La conception d'un cadre supportant les LEDs pour les bassins, son installation et le raccordement électrique nécessaire.
- Les **étapes de production** : entretien de souches, amplification, maturation et sporulation.
- La **préculture en bassin** comprend la préparation des piscines (remplissage, ajout de milieu de culture, des poches), l'ensemencement en spores puis le suivi quotidien de la culture.

2.6.3 Précisions des différentes étapes de culture et résultats

2.6.3.1 Les différentes étapes de cultures

Le planning préconisé par le CEVA lors de la formation et des différents échanges de suivi de culture a été appliqué. Les différents volumes ont été repiqués à intervalle régulier (Tableau 3).

Tableau 3 : Récapitulatif des différentes étapes de culture

Etapes	Durée	Intervalles des repiquages	Volumes de début	Volumes de fin
Amplification	3,5 mois (Juin-Oct)	Toutes les deux semaines	0,5L + 1L	2x6L+3x2L
Maturation	2 mois (Oct-Dec)	Toutes les deux semaines	2x6L+3x2L	2x6L+3x2L
Sporulation	3 mois (Dec-Mars)	<u>Dans un 1er temps</u> : rajout de milieu de culture + eau distillée <u>Puis lors de l'ensemencement des bassins</u> : repiquage toutes les semaines, récupération du filtrat puis remise des conchosporanges dans un nouveau volume	2x6L+3x2L	2x6L+3x2L
Préculture en bassin	2 mois (Janv-Mars)	Chaque semaine, renouvellement de l'eau des bassins	2 piscines (28 poches)	2 piscines (28 poches)

2.6.3.2 Masse de *Conchocelis* obtenue

Durant les différentes étapes du processus le *Conchocelis* s'est développé jusqu'à la production des spores et l'ensemencement des supports.

Phase d'amplification : Le nombre et le volume de la verrerie ont été augmentés, passant ainsi de 500 ml à 6 L, et la croissance des *Conchocelis* (0,05 gr/jour) a débuté. Une biomasse de 5,44 gr a été atteinte à la fin de cette étape.

Phase de maturation : À partir de cette étape, le volume est resté stable. Une croissance plus importante (0,42 gr/jour) a été observée, atteignant 31,31 gr de biomasse. Les conchosporanges sont apparus durant cette phase.

Phase de sporulation : La libération des spores a eu lieu, accompagnée d'une croissance importante (0,75 gr/jour), atteignant 67,93 gr de biomasse en fin d'étape.

Phase d'ensemencement : À partir de janvier, les ensemencements des piscines ont débuté. La biomasse a continué de croître jusqu'à 107,82 gr au 5ème ensemencement. Les biomasses obtenues sont à nuancer car des contaminations par d'autres algues épiphytes ont été observées. C'est à cette étape que la croissance a été la plus importante : 1,02 gr/jour.

Le graphique de la Figure 12 suivante met en évidence cette prise de croissance sur l'ensemble de l'expérimentation.

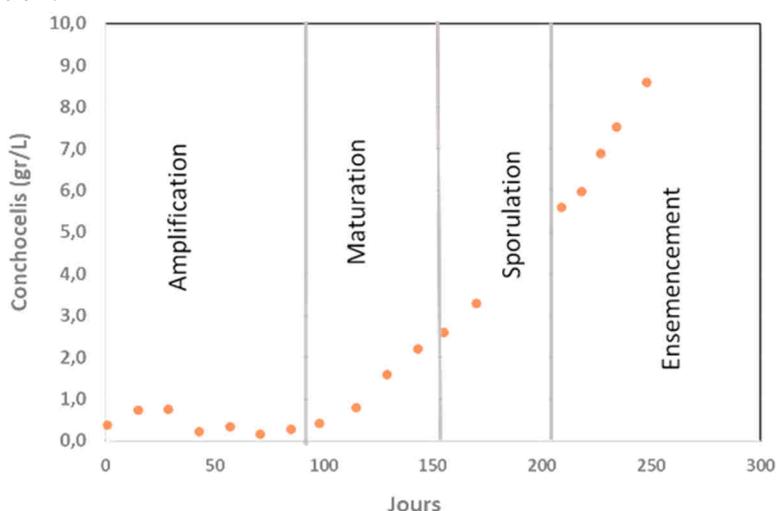


Figure 12 : Concentration moyenne de *conchocelis* durant l'expérimentation

À chaque repiquage, la quantité de *Conchocelis* dans les volumes repiqués est pesée précisément ce qui permet de suivre les quantités de *Conchocelis* présentes (Tableau 4), ainsi que les gains de biomasse (Tableau 5)

Tableau 4 : Évolution du poids des *Conchocelis* durant la culture

<i>Conchocelis</i>	Moy gr/L	Biomasse totale en fin d'étape (gr)
Amplification	0,36	5,44
Maturation	1,8	31,31
Sporulation	3,3	67,93
Ensemencement n°1	5,6	
Ensemencement n°2	6	76,73
Ensemencement n°3	6,89	90,13
Ensemencement n°4	7,51	96,94
Ensemencement n°5	8,59	107,82

Tableau 5 : Gain de biomasse des *Conchocelis* durant les différentes étapes de culture

Gain de biomasse	gr/L	gr/jour
Amplification	0,04	0,05
Maturation	2,19	0,42
Sporulation	3	0,75
Ensemencement	2,99	1,02

2.6.3.3 Ensemencement

6ensemencements ont été réalisés durant ce projet entre le 8 janvier et le 23 février. Chaque ensemencement est associé à un volume de filtrat qui est ensuite divisé entre les 2 bassins. Le Tableau 6 détaille le nombre de spores déversées dans chaque bassin à chaque ensemencement.

Tableau 6 : nombre de spores dénombré à chaque ensemencement

Ensemencement	Date	Nombre de spores par bassin
1	8 janvier	47 072
2	17 janvier	1 745 350
3	26 janvier	3 041 983
4	2 février	3 592 625
5	16 février	1 218 771
6	23 février	NA
Total		9 645 801

Une période de prégrossissement des plantules (facultative) peut être effectuée avant la mise en croissance dans le milieu naturel. Cette étape permet de s'assurer que la croissance a bien débuté.

2.6.3.4 Mise en croissance dans le milieu naturel

La mise en croissance dans le milieu naturel des supports ensemencés s'est effectuée en 3 fois

Le 10 janvier : mise à l'eau de 20 supports.

Cette mise à l'eau précoce avait pour objectif d'observer la croissance des algues d'éclosion, sans période de prégrossissement, après avoir reçu un seul ensemencement.

Une mise à l'eau 2 mois plus tard était prévue afin d'observer et de comparer les supports avec et sans prégrossissement. Les supports avec prégrossissement ont de plus reçu plusieurs ensemencements successifs (§ 2.6.3.4).

Après 1 mois de prégrossissement des algues vertes contaminantes ont commencé à se développer sur les supports. Une partie des poches a donc été mise en croissance dans le milieu naturel plus tôt que prévu, après avoir subi un léger rinçage au jet, afin d'éviter que le phénomène s'amplifie. 18 supports ont été mis en croissance le 29 février.

Les 10 derniers supports ont été déposés sur l'estran le 13 mars, après 2 mois comme prévu initialement. Ils ont de plus reçu un rinçage supplémentaire plus soutenu que précédemment. En parallèle, de premiers tests d'ensemencement sur d'autres types de supports comme des cordes (synthétiques et en fibre de coco) ou des longueurs de 10 m dans le même matériau que les poches ostréicoles (rouleau de maille 20) ont également eu lieu sur cette période.

Le Tableau 7 synthétise ces informations

Tableau 7 : Date de mise à l'eau des supports dans le milieu naturel

Date	Supports	Observations
10/01/2024	20 poches + 2 rouleaux	48h d'ensemencement
29/02/2024	18 poches	Rinçage léger
12/03/2024	10 poches + 2 cordes	Rinçage soutenu

Le suivi des supports ensemencé dans l'écloserie pilote n'était pas prévu dans le projet ANCOVA 17. L'objectif de cet axe était de maîtriser le cycle de reproduction, et de parvenir à obtenir des supports ensemencés en écloserie. Les résultats de croissance des supports produits dans l'écloserie pilote sont partiels et ne seront pas détaillés dans ce document. La section 4 de ce document détaille la comparaison de croissance entre des supports ensemencés en laboratoire par le CEVA et des supports captés naturellement.

2.6.4 Bilan

FMDS a déjà collaboré avec CAPENA sur les précédents projets sur la culture du *Porphyra* mais seulement au niveau de la récolte et du process de stabilisation de l'algue. Grâce au projet ANCOVA et le travail dédié à l'écloserie pilote, les connaissances théoriques ont été enrichies grâce à la formation dispensée par le CEVA.

Cela a permis d'aborder puis de maîtriser les différentes étapes de production, de la reproduction des géniteurs à la livraison de supports avec plantules. FMDS a ainsi appris à manipuler avec minutie les algues au cours des nombreux repiquages et ensemencement, tout en étant vigilant aux changements des conditions environnementales en adéquation avec les étapes de production en milieu contrôlé.

Un gros travail d'observation a été réalisé dès le départ, à la libération des gamètes par les géniteurs, puis lors de l'évolution de la quantité de *Conchocelis*, jusqu'au passage des *Conchocelis* en conchosporanges et la libération des spores, avec au final l'observation des plantules sur les poches. Ces observations ont été primordiales pour vérifier le bon déroulement de la production et les éventuelles contaminations. Une base de données photos des différents stades a été réalisée à cette occasion.

Un travail sur le dimensionnement et la mise en place du matériel a également été fait afin d'optimiser les conditions de culture des algues.

Le Tableau 8 suivant liste les problématiques rencontrées.

Tableau 8 : Problèmes rencontrés lors des différentes étapes de l'écloserie pilote et préconisations

Etapes	Problèmes rencontrés	Préconisations
Entretien des souches	Fluctuations des températures dans le soucier, matériel pas adapté. Observation du <i>Porphyra</i> à différentes étapes (<i>Conchocelis</i> , conchosporanges)	Adapter le matériel : achat d'une armoire thermostatée réglables
Amplification, maturation, sporulation	Beaucoup de volumes ??? Difficultés dans la quantification des spores	Adapter le nombre de volume en fonction des besoins Multiplier les observations, équipement d'une caméra + logiciel (comptages)

Préculture plantules	Contaminations par des épiphytes, du phytoplancton	<p>Plus de maîtrise du milieu</p> <p>Améliorer la procédure de nettoyage/rinçage des poches. Exondation des poches ?</p> <p>Attention aux zones mortes dans les piscines</p> <p>Travail sur la qualité d'eau en amont Nettoyage du réseau d'eau</p> <p>Acquisition d'un jet d'eau de mer (rinçage à pression constante des poches)</p>
Toutes	<p>Difficultés à identifier les contaminants lors des observations</p> <p>Risque sanitaire avec le mélange des activités ?</p>	<p>Gagner en expérience, multiplier les observations</p> <p>Attention particulière apportée au sanitaire ? Sas sanitaire</p>

Afin d'améliorer les process de production de supportsensemencés à destination d'une filière d'algoculture de *Porphyra*, et de passer d'une phase pilote à une phase opérationnelle, des tests complémentaires devront être menés dans la poursuite d'un tel projet.

- Test de nouveaux supports afin de maximiser la surface à ensemercer et le rendement par piscine (ex : cordes). D'autres type de supports, à définir, pourraient aussi être intéressants pour les professionnels.
- Test d'optimisation du temps de grossissement des plantules afin de les mettre plus rapidement en croissance dans le milieu naturel. Cela permettrait de limiter les risques de contaminations, diminuer le coût de production et augmenter le nombre de supports produits. On peut raisonnablement penser que ce temps peut passer de 2 mois à 1 mois de préculture.
- L'optimisation de la place dans les piscines pour un rendement maximal, tout en assurant la qualité de l'ensemencement avec une inclinaison à 45° des supports dans les bacs de culture.
- Des recherches plus poussées pourraient également permettre de tester d'autres conditions de température et de lumière afin de définir l'optimum pour cette espèce.
- Un travail sur la maîtrise en éclosérie d'autres souches de *Porphyra purpurea*, notamment celle présente naturellement sur l'île d'Oléron, ou bien d'une autre espèce le *Porphyra umbilicalis* pourrait offrir d'autres débouchés.

2.7 Conclusions

Dans le cadre de l'axe 1 du projet ANCOVA 17 sur le développement d'une l'algoculture de nori, le volet sur la mise en œuvre d'une éclosérie pilote a atteint les objectifs fixés. La maîtrise du cycle de reproduction de l'algue rouge *Porphyra purpurea* et l'obtention de supportsensemencés ont été validés, en partenariat avec les Fermes Marines du Soleil.

L'investissement humain et matériel a été identifié à l'échelle pilote. Des interrogations ont été soulevées face à différents problèmes rencontrés, dont le principal est la présence d'algues contaminantes épiphytes sur les supports ensemencés. Afin de passer à une échelle opérationnelle avec la fourniture de plantules à des professionnels qui souhaiteraient débiter cette algoculture, certaines étapes doivent être optimisées ainsi qu'un ajustement du dimensionnement du matériel et des infrastructures. Ces différents points feront l'objet d'un futur projet.

3 Caractérisation de la diversité génétique inter- et intra-spécifique des populations de *Porphyra* spp. en Charente-Maritime

3.1 Contexte et objectifs

En Charente-Maritime, les populations des espèces de *Porphyra* spp. sont présentes sur les estrans rocheux et sablo-vaseux en milieu naturel, mais également sur des substrats artificiels, ex. zones ostréicoles et mytilicoles, chenaux, enrochement, habitat portuaire, ouvrage offshore. Identifier les espèces, se développant en milieu naturel et sur substrat artificiel tel que les poches ostréicoles, est une étape essentielle pour cibler la ou les espèces d'intérêt en vue de mettre en place un processus de sélection variétale. De même, l'analyse de la distribution de la diversité génétique des populations de l'espèce dominante se développant sur les poches ostréicoles permettrait d'apporter des premiers éléments sur la diversité des souches présentes et du potentiel de sélection de variétés adaptées aux conditions de culture et aux conditions environnementales du bassin Marennes-Oléron. Afin de disposer d'une vision la plus complète possible de la diversité inter- et intra- spécifique des populations de *Porphyra* présentes en Charente-Maritime, le CEVA a réalisé une étude génétique afin de répondre à deux objectifs :

Objectif 1 : Identifier les espèces de *Porphyra* spp. présentes dans les populations en milieu naturel et sur concessions ostréicoles.

Objectif 2 : Analyser la diversité et la structure génétique des populations de l'espèce dominante de *Porphyra* spp. se développant sur les poches ostréicoles.

3.2 Méthodologie

3.2.1 Identification des espèces de *Porphyra* spp.

Afin d'identifier les espèces de *Porphyra* spp. présentes en milieu naturel et sur concessions ostréicoles, un échantillonnage a été réalisé dans 12 sites répartis à l'échelle de la Charente-Maritime. Six sites de substrat rocheux (i.e. population naturelle) et 6 sites de concessions ostréicoles ont été sélectionnés et échantillonnés entre mai et juin 2023 (Figure 13). Sur chacun des 12 sites, 12 échantillons ont été prélevés, chacun à un minimum de 10 m de distance des autres, et conservés dans du silica gel en vue des analyses génétiques. Au total, 144 individus ont été échantillonnés pour l'identification spécifique.

Sur les 144 échantillons disponibles pour le barcoding génétique, 96 échantillons, soit 8 par site, ont été séquencés en utilisant la méthode de séquençage Sanger. Du fait de sa taille importante, près de 950 paires de base (pb), et de son niveau de polymorphisme suffisant pour identifier les 4 espèces, le marqueur *rbcl* avec les amorces Forward: AACTGCTTCTATTATTGGTA et Reverse: ACGTTGGCTGTTGGAGTCT a été retenu pour l'analyse.

Afin de disposer d'échantillons de référence, des spécimens provenant de la souchothèque du CEVA ont été mis à disposition pour l'étude : 4 échantillons correspondant aux 4 espèces présentes en Charente-Maritime : *Porphyra linearis*, *Porphyra purpurea*, *Porphyra umbilicalis* et *Porphyra dioica*.



Figure 13 : Localisation des sites d'échantillonnage de *Porphyra* spp. en milieu naturel (en jaune) et en zones ostréicoles (en rouge). Les zones blanches correspondent au cadastre ostréicole.

Après séquençage, 89 séquences de 900 pb ont été obtenues pour réaliser les analyses phylogénétiques. L'analyse phylogénétique a été réalisée à l'aide du programme IQ-TREE avec 1000 itérations bootstrap et a été illustrée sous la forme d'un arbre phylogénétique FigTree. En plus des échantillons de référence séquencés, des séquences de référence, disponibles sur Genbank et correspondant aux espèces de l'ordre des Bangiales, ont été intégrées aux analyses phylogénétiques.

3.2.2 Mise au point de marqueurs génétiques pour étudier la diversité et structure génétique de *Porphyra purpurea*

Pour cette étude, une approche de génétique des populations utilisant des marqueurs microsatellites (ou Simple Sequence Repeat, SSR)¹ a été mise en place sur 60 individus prélevés sur poches ostréicoles dans 6 sites du bassin Marennes-Oléron (Figure 13).

Cependant, au début de l'étude, aucun marqueur microsatellite n'était disponible dans la littérature pour pouvoir effectuer les analyses sur l'espèce dominante identifiée sur les poches ostréicoles, *i.e.* *Porphyra purpurea* (cf. Résultats). Huit marqueurs microsatellites développés sur les espèces *P. linearis*, *P. umbilicalis* et *P. dioica* (Varela- Álvarez et al, 2017, 2018, 2022) ont été testés sur un panel de 7 échantillons provenant de notre étude pour évaluer leur potentiel d'amplification croisée sur l'espèce *Porphyra purpurea*. Aucun des 8 marqueurs SSRs testés n'a cependant amplifié sur les échantillons de l'espèce *P. purpurea*. **Ce constat a amené à réorienter le projet sur le développement de marqueurs SSRs spécifiques à l'espèce *P. purpurea*.**

Afin d'identifier des régions génomiques montrant des microsatellites, un séquençage haut-débit de type DNAseq du génome de plusieurs échantillons de *P. purpurea* a été réalisé. Dix échantillons, sélectionnés pour couvrir les 6 populations de *P. purpurea* échantillonnées sur les poches ostréicoles et pour couvrir la diversité génétique observée sur le marqueur *rbcl*,

¹ Les microsatellites (ou Simple Sequence Repeat, SSR) sont des séquences d'ADN relativement courtes, composées de motifs nucléotidiques (de 2 à 9 bases) répétés de manière continue dans le génome non codant. Ces séquences, très variables d'une génération à l'autre, sont généralement utilisées pour réaliser des analyses de génétique des populations à petite échelle géographique et pour réaliser des analyses de parentés.

ont été utilisés. Un total de 36 millions de séquences génomiques, avec une longueur de lecture de 2 x 300 pb, a été obtenu à l'aide d'un séquenceur MiSeq.

Deux logiciels bioinformatiques (Micro-Primers et QDD) ont été utilisés pour identifier des marqueurs microsatellites et obtenir les séquences d'amorces Forward et Reverse. Une liste de 16 marqueurs a été obtenue (Tableau 9).

Tableau 9 : Détails des SSRs identifiés à l'aide des logiciels Micro-Primers et QDD.

Identifiant du marqueur	Taille du fragment	Forward	Reverse	Motif
SSR_Loci1_Pair1	141	ACGTGTTAACCAG CCAACG	CCCGTATTTAACACAT GAAACG	(ACCA)6
SSR_Loci2_Pair1	209	GGCCAAATTGGTA ATGAAGC	TTCTTCATATTTATTGA AGTTTCATGC	(AT)7
SSR_Loci3_Pair1	183	TCAGAAGTGACGC AAGAACG	TTCAATTGGCCCTATC CAAC	(TGAT)1 2
SSR_Loci4_Pair1	188	GCCGATAATGAAG AGCAACC	ACCCGATCCTCAATGT TCC	(CT)8
SSR_Loci5_Pair1	166	GTCAGATTTGCTC TAAATGCTTTG	AACCAAACCTTGGCCAC AATC	(ACG)6
SSR_Loci6_Pair1	124	CACATGAAACGGA AACATGC	CGTGTTTAACCAGCCA ACG	(TTGG)6
SSR_Loci7_Pair1	123	TTGATTGATTGGT TGTTGG	AAATTGAGCCTATCCA ACGTG	(ATTG)5
SSR_Loci8_Pair1	127	ATTGGTTGGTTGG TTGGTTG	GACCTTGTGGAGCAAT GACC	(ATTG)7
SSR_Loci9_Pair1	114	ATTGGTTGGTTGG TTGGTTG	CCTTGACAAAGGTCAC AAGGTC	(TTGG)7
SSR_Loci10_Pair1	111	GACGTGTCGCTTT CATGTTC	TGGGTTTCGGAGGGAT TAC	(ATT)13
SSR_Loci11_Pair1	187	TTACGCGGTGTCA GTTTCAG	TGAAAGACCTTCAATT GTTCTTTG	(AAT)10
SSR_Loci12_Pair1	118	TATCACGTTGGCG TCGTC	GTGGTCCTAACCTTG TGTCG	(CGT)6
SSR01	179	CGGCAGCGTCAGA TGTGTAT	GTCCGGTCCATCCAAT CCC	CCG
SSR02	155	GTGGGCTCGGAGA TGTGTAT	CTCGTCAACAACCACG TCGA	CCG
SSR03	234	GTGGGCTCGGAGA TGTGTAT	TTCGATTCGCTCTCAC GACC	CCG
SSR04	181	GTGGGCTCGGAGA TGTGTAT	TGCGCATTGACCGGCT AC	CCG

Les marqueurs SSR identifiés à l'aide des outils bioinformatiques ont été testés sur un panel de 6 échantillons provenant de régions géographiques différentes, afin de maximiser les chances de détection de polymorphisme génétique. Les échantillons de *P. purpurea* provenant du CEVA comprenaient 2 échantillons de Bretagne, 2 échantillons de Normandie et 2 échantillons de Charente-Maritime provenant de cette étude.

3.3 Résultats

3.3.1 Diversité et distribution des espèces de *Porphyra spp.* en Charente-Maritime

Sur les 86 individus échantillonnés sur les sites de Charente-Maritime, trois groupes génétiques correspondant à 3 taxons de *Porphyra spp.* présents en Charente-Maritime ont été identifiés (Figure 14a) :

- Quatre échantillons sont assignés au sein du cluster regroupant l'échantillon de référence et les séquences de référence de *P. umbilicalis*
- 46 échantillons sont assignés au sein du cluster regroupant l'échantillon de référence et les séquences de référence de *P. purpurea*
- 36 échantillons sont assignés au sein du cluster regroupant les séquences de référence de *P. dioica*

Au sein des regroupements de *P. purpurea* et *P. dioica*, plusieurs groupes de séquences ont été identifiés, suggérant possiblement des origines, *i.e.* populations sources, différentes entre et au sein des populations échantillonnées (Figure 14b et c).

Dans les populations échantillonnées, les échantillons assignés à *Porphyra dioica* proviennent à 97% des populations naturelles et les échantillons assignés à *Porphyra purpurea* proviennent en totalité des populations échantillonnées sur les sites ostréicoles (Figure 15). Seul un spécimen de *Porphyra dioica* a été identifié sur le site ostréicole de l'île Madame. L'espèce *Porphyra umbilicalis* a été identifiée uniquement dans la population naturelle échantillonnée sur le plateau de Cordouan.

A l'échelle de la Charente-Maritime, les analyses réalisées démontrent la présence quasi-exclusive de *P. purpurea* sur les sites ostréicoles.

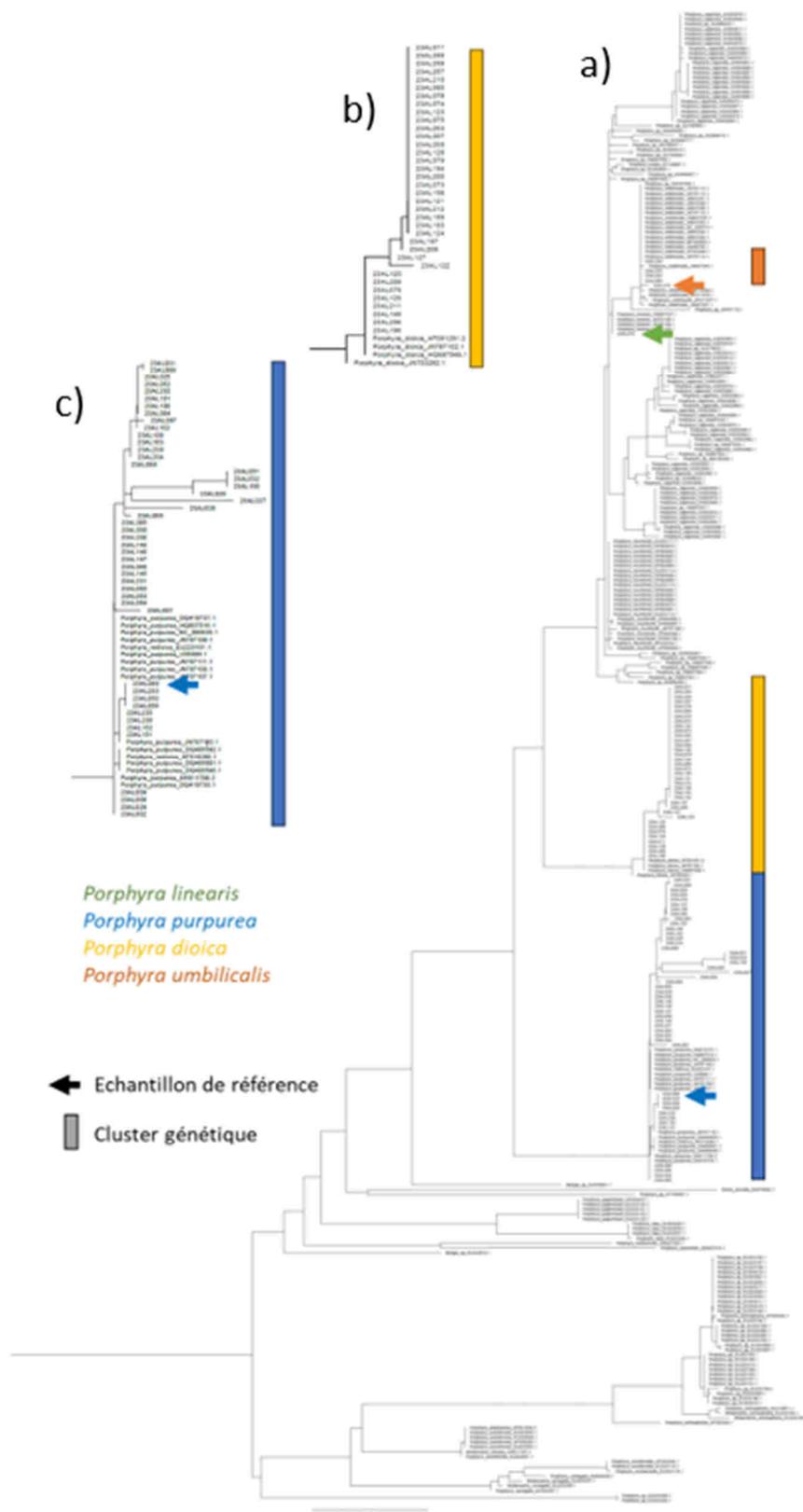


Figure 14 : a) Arbre phylogénétique comprenant les 86 séquences des échantillons récoltés sur les sites naturels et sur les concessions ostréicoles, trois des 4 échantillons de références (échantillons fléchés) et les séquences des taxons de l'ordre des Bangiales provenant de la base de référence Genbank. b) et c) Zooms de l'arbre phylogénétique au niveau des clusters correspondant respectivement à *Porphyra dioica* et *Porphyra purpurea*.



Figure 15 : Distribution des haplotypes correspondant aux regroupements génétiques de *Porphyra umbilicalis* (orange), *Porphyra dioica* (jaune) et *Porphyra purpurea* (bleu).

3.3.2 Résultats d'amplification des marqueurs génétiques testés

Sur les 16 SSR identifiés à l'aide des logiciels Micro-Primers et QDD et testés sur le panel de 6 échantillons provenant de différentes régions géographiques, seulement 3 ont montré des profils compatibles avec des allèles, *i.e.* les locus 2, 5 et 10 :

- Le locus 2 (Figure 16) montre la présence de polymorphisme d'allèles sur le panel des 6 échantillons. Trois allèles ont été détectés, les allèles 220, 228 et 230. Les allèles 220 et 230 sont présents dans les échantillons provenant de Bretagne (P06, P19, tandis que l'allèle 228 est partagé entre les échantillons de Charente-Maritime (23AL029, 23AL049) et de Normandie (P12, P20) (Figure 16). Aucun individu hétérozygote (présence de polymorphisme au sein d'un même individu) n'a cependant été identifié.
- Le locus 5 est monomorphe sur le panel d'échantillons testés.
- Le locus 10 semble présenter du polymorphisme d'allèles, avec cependant certains allèles très éloignés en termes de taille de fragment. Ce constat pourra être expliqué par l'amplification d'autres fragments que la séquence ciblée.

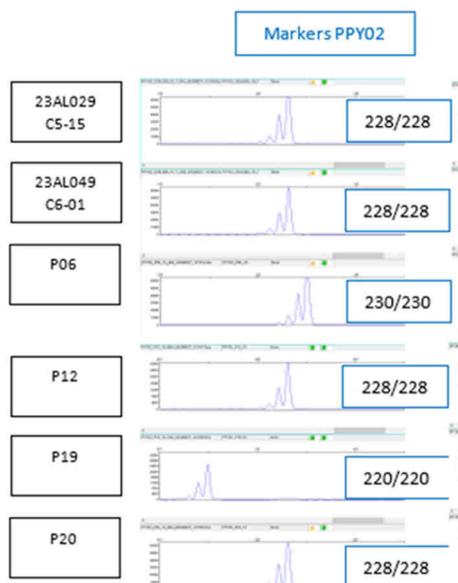


Figure 16 : Profils des chromatogrammes, obtenus à l'aide du séquenceur « SeqStudio », du marqueur PPY02 identifiés par le logiciel Micro Primers, sur le panel de 6 échantillons.

3.4 Bilan et perspectives

Pour le premier objectif, l'approche par séquençage du marqueur *rbcL* réalisée sur 96 individus prélevés dans 12 sites naturels et artificiels de la Charente-Maritime a permis de répondre aux questions initiales :

- Trois espèces de *Porphyra* ont été détectées dans les populations échantillonnées en Charente-Maritime, i.e. *Porphyra umbilicalis*, *Porphyra dioica* et *Porphyra purpurea*.
- Les espèces *P. umbilicalis* et *P. dioica* sont quasi exclusivement présentes dans les populations échantillonnées en milieu naturel, tandis **que *P. purpurea* est uniquement présentes sur les sites ostréicoles.**

Ces résultats confirment les observations précédentes réalisées au CEVA dans le cadre du projet Chaco (Ceva, 2012) qui avait mis en évidence que seule l'espèce *P. purpurea* était présente sur les poches ostréicoles du site de Cancale. Ce constat est ainsi également observé sur les sites ostréicoles de Charente-Maritime.

Pour la seconde étude, l'absence de marqueurs génétiques spécifiques à l'espèce *Porphyra purpurea* dans la littérature n'a pas permis de répondre au second objectif portant sur l'analyse de la diversité et de la structure génétique des populations de *P. purpurea* sur les sites ostréicoles.

Dans le cadre de ce projet, les efforts déployés pour identifier des marqueurs de type microsatellites n'ont pas permis de développer un panel de marqueurs suffisants pour réaliser l'étude de génétique des populations. En effet, seuls 3 marqueurs microsatellites, dont 1 seulement montrait du polymorphisme d'allèles sur 6 échantillons testés, semblent montrer des profils compatibles avec des allèles. Les études de génétique des populations portant sur les algues et utilisant ce type de marqueur utilisent généralement un panel de 10 et 30 locus microsatellites pour décrire les niveaux de diversité génétique (Mauger et al, 2023).

Des recherches plus approfondies sur l'identification de marqueurs SSR ou d'autres marqueurs (ex. SNPs) doivent être mis en œuvre pour atteindre l'objectif initial. Identifier les populations génétiquement différentes en termes de niveau de diversité génétique mais également en termes de structuration permettrait en effet de sélectionner les populations les plus pertinentes pour mener des programmes de sélection de variétés de *P. purpurea* adaptées aux conditions de culture et aux conditions environnementales du bassin Marennes-Oléron.

4 Comparaison des performances de croissance de *Porphyra* issue d'écloserie et de *Porphyra* captée dans le milieu naturel

4.1 Généralités

L'algue rouge *Porphyra purpurea* se développe naturellement sur les structures des parcs ostréicoles de Charente-Maritime, principalement sur les poches à huître. On la retrouve également sur diverses autres structures telles que les tables ostréicoles, les balises en bois délimitant les parcs ou encore les systèmes de « laveurs » en caoutchouc utilisés pour empêcher l'accumulation de vase entre les tables (Figure 17).



Figure 17 : Développement de *P. purpurea* sur des tables ostréicoles

La colonisation de cette algue est dépendante des conditions environnementales et donc très hétérogène selon les sites. D'autres algues, principalement l'algue verte filamenteuse *Ulva intestinalis*, peuvent aussi se développer en même temps que le *Porphyra* (Figure 18). Cela peut impacter la qualité du rendement et de la récolte finale.



Figure 18 : Développement de *P. purpurea* et *U. intestinalis* sur une poche ostréicole

4.2 Objectif

La but de ces travaux est de comparer le développement et la croissance de *P. purpurea* issu d'écloserie avec du *P. purpurea* qui a capté naturellement dans les concessions ostréicoles. Finalement, il s'agit d'identifier les avantages et les inconvénients de chaque origine de

captage ; naturel ou éclosion. Autrement dit, de mettre en évidence l'intérêt de fournir préférentiellement la filière de culture d'algue à partir d'éclosion ou de captage naturel.

4.3 Méthodologie

4.3.1 Supports

Les supports utilisés pour capter du *Porphyra* dans le milieu naturel sont des poches ostréicoles coupées sur la longueur, représentant une surface de 0.5 m² avec une maille de 9 mm (Figure 19).

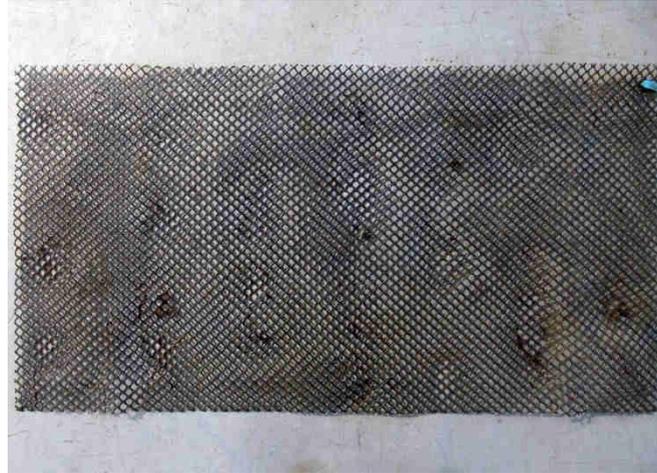


Figure 19 : Support utilisé pour le captage de *P. purpurea*

Afin de réaliser cette comparaison, 30 supports ont été ensemencés en laboratoire par le CEVA (Centre d'Etude et de Valorisation des Algues), centre technique national dédié aux algues. Elles sont ensuite disposées sur 3 parcs ostréicoles du bassin de Marennes-Oléron le 13 février, Mortane, Chevalier et Viandet, après 2 mois de pré grossissement en éclosion.

En parallèle, le 10 janvier 2024, 30 supports sont disposés sur 2 sites de captages : Mortane et Chevalier, soit 15 supports par site. Le 13 mars, 5 supports de chacun de ces 2 sites sont déplacés et mis en croissance sur le site de Viandet.

Finalement, sur chacun des 3 sites, le développement des algues est suivi sur 10 supports d'éclosion et 10 supports de captage naturel, soit 60 supports en tout (Figure 21).

4.3.2 Données de biomasse

4.3.2.1 Moyen

Avant d'être utilisée dans cette expérimentation, chaque support est identifié à l'aide d'un numéro et pesé individuellement.

À l'exception du dernier relevé où les supports sont ramenés et pesés à terre, l'acquisition des données se fait directement sur chacun des sites. Au moment de la prise de biomasse, les supports sont égouttés uniformément puis pesés individuellement sur une balance précise à $\pm 5g$ à l'aide d'un système adapté (Figure 20). C'est donc le poids frais qui est pesé.

Chacun des supports est également photographié afin d'avoir un suivi de leur colonisation à chaque relevé.

Si de l'algue verte s'est développée sur les supports, elle est retirée avant la pesée, afin de relever uniquement la biomasse de l'algue rouge. L'algue verte est pesée séparément. Lorsque l'algue verte devient prédominante sur le support, l'algue rouge est retirée du support et pesée séparément. Le support n'est plus suivi par la suite. On considère qu'il n'y a plus de développement significatif d'algue rouge.



Figure 20 : Relève de la biomasse d'algue sur les supports

4.3.2.2 Périodicité

La biomasse de chaque support est relevée à une fréquence définie. La première acquisition de données a eu lieu début avril lorsque les algues commencent à se développer dans le milieu naturel. Les dernières données sont acquises courant juin, au moment où les algues commencent à se dégrader. Le Tableau 10 suivant précise les dates de relève de la biomasse sur les supports.

Tableau 10 : calendrier d'acquisition des données de biomasse de *Porphyra*

N° de suivi	Date
1	8 et 10 avril 2024
2	6 mai 2024
3	23 et 24 mai 2024
4	3, 4, 5 juin 2024
5	20 juin 2024

La Figure 21 synthétise chacune des étapes de la méthodologie utilisée dans cette expérimentation

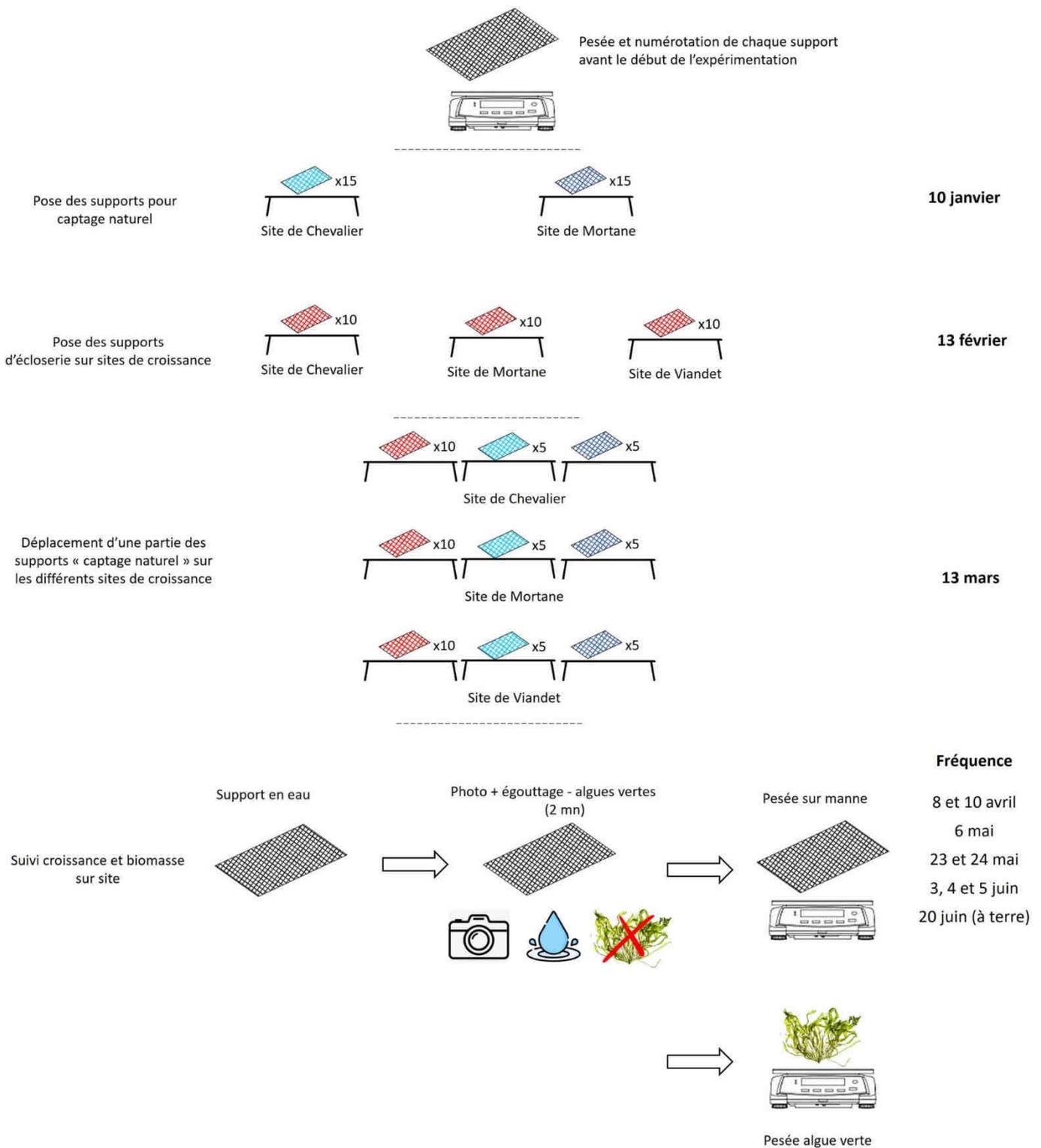


Figure 21 : Protocole utilisé pour suivre le développement de la biomasse de *P. purpurea*

4.4 Analyse

Les données acquises en fonction de l'origine, du site de captage et de croissance sont présentées sous la forme de moyenne associée à un intervalle de confiance à 95 %. Les tests de comparaison de moyennes utilisés sont des ANOVA simples et multiples suivies de tests post-hoc de Tukey HSD. Les conditions d'application de ces tests paramétriques sont vérifiées par le test de Shapiro-Wilk (normalité) sur les résidus de l'ANOVA et le test de Levene (homoscédasticité). En cas de non-normalité ou d'hétéroscédasticité des données, le test non-

paramétrique de comparaison de moyenne de Kruskal-Wallis est réalisé. Le seuil de significativité utilisé pour ces différents tests est $\alpha < 0,05$. L'ensemble des données est traité avec les logiciels R (Version 4.3.0) et RStudio© (Version 2023.12.1+402).

4.5 Résultats

Les analyses statistiques ont mis en évidence que le site de captage naturel influence la biomasse produite sur les différents sites de croissance. Autrement dit la qualité de captage n'est pas identique entre les 2 sites de captages (Chevalier et Mortane) (Figure 22).

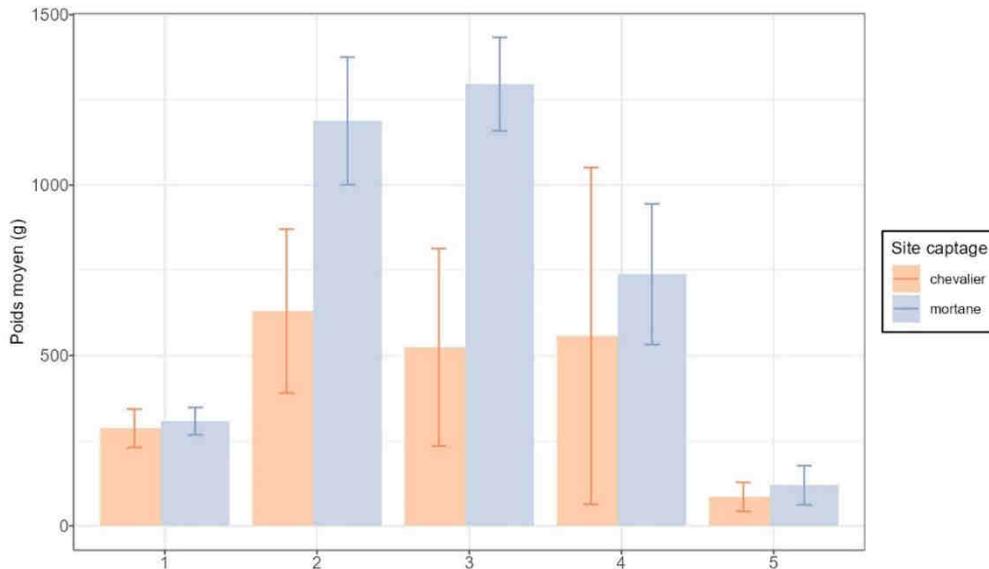


Figure 22 : Poids moyen de *Porphyra* relevé sur les supports à chaque suivi en fonction du site de captage naturel

En revanche, il n'y a pas de différence significative entre les sites de croissance pour la production d'algues d'une même origine (écloserie ou même site de captage) (Figure 23).

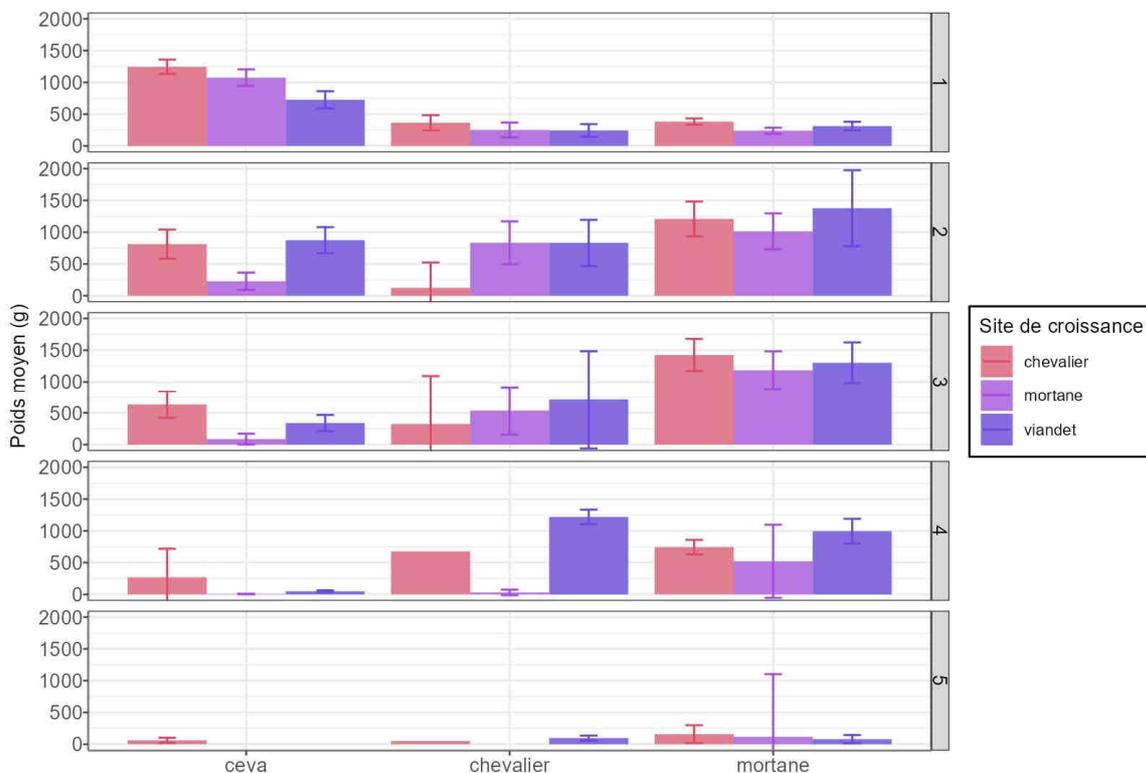
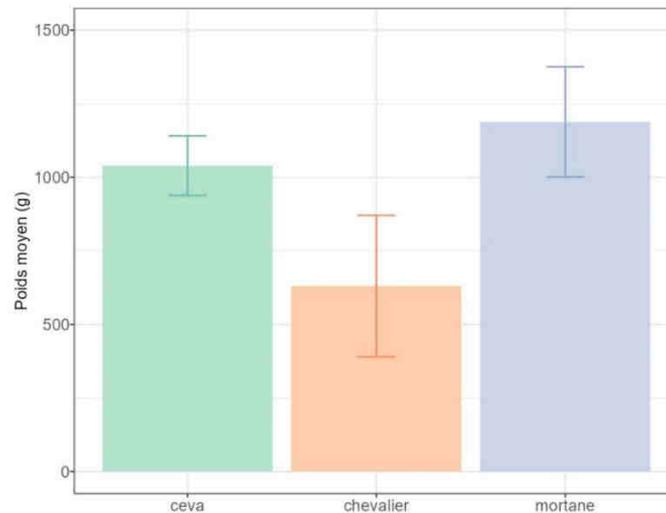


Figure 23 : Poids moyen de *Porphyra* relevé sur les supports à chaque suivi en fonction du site de croissance

L'analyse des données s'est donc concentrée sur la comparaison de la production d'algue en fonction de leur origine au moment du pic de biomasse constatée lors des différents suivis réalisés.

La qualité de la récolte des algues issues d'écloserie et des algues captées naturellement sur le site de la Mortane est significativement identique en termes de quantité moyenne produite. La production des algues captées naturellement sur le site de Chevalier est significativement inférieure. (Figure 24). Cependant, cette expérimentation a mis en évidence que le pic de production est observé un mois plus tôt avec les algues d'écloserie. De plus, l'intervalle de confiance pour les algues d'écloserie étant moins important que celui des algues captées naturellement, cela traduit une production plus homogène pour le *Porphyra*ensemencé en écloserie.



Provenance	Ceva	Chevalier	Mortane
Poids moyen (g±IC)	1040 ±102	630 ±240	1188 ±187

Figure 24 : Poids moyen de *Porphyra* récolté par support au pic de biomasse sur l'ensemble des sites de croissance en fonction de leur origine de captage

4.6 Discussion

D'après les résultats de cette expérimentation, l'utilisation de supports ensemencés en écloserie semble offrir une plus grande stabilité de production, avec un rendement équivalent à celui du captage naturel observé sur certains sites. Il a été observé que la biomasse atteint son pic un mois plus tôt sur les supports d'écloserie que sur ceux ensemencés naturellement. Recourir à une écloserie permet donc aussi d'échelonner la production en étalant l'ensemencement des supports sur une période plus longue que le captage naturel, qui est limité à quelques semaines en hiver.

D'après nos observations, le captage naturel présente une variabilité plus grande en fonction des sites et est plus hétérogène d'un support à l'autre, ce qui peut nécessiter davantage de main-d'œuvre lors du ramassage ou du tri, notamment si d'autres algues indésirables se développent. Cependant, l'utilisation de supports d'écloserie a un coût, et si la filière de culture de *Porphyra* se développe, les professionnels devront trouver un équilibre entre l'achat de ces supports et la rentabilité de la production. À terme, l'utilisation de supports ensemencés en écloserie pourra favoriser l'emploi de souches sélectionnées, plus productives, offrant ainsi un intérêt accru par rapport aux algues captées naturellement, malgré le surcoût. C'est l'objectif visé par la caractérisation génétique de cette population (cf. § 3).

À l'avenir, on peut envisager des professionnels cultivant les algues à partir de captage naturel et/ou d'algues d'écloserie sélectionnées, à l'image de la pratique en ostréiculture avec les naissains d'huîtres.

4.7 Bilan

Ce volet de l'axe *Porphyra* du programme ANCOVA 17 a souligné l'intérêt d'utiliser des algues issues d'écloserie dans le cadre d'une filière de culture de nori. D'une part, cela permet d'élargir la période de production, et d'autre part, d'assurer une production plus homogène. L'utilisation de souches productives, sélectionnées et adaptées à l'environnement local, viendra ensuite renforcer l'intérêt de recourir à des plantules d'écloserie. Cela n'enlève rien à l'importance du captage naturel, qui peut s'avérer tout aussi intéressant en termes de rendements, bien que les performances de croissance puissent être plus aléatoires selon le site où l'algue a été captée.

5 Identification des zones favorables au développement de *Porphyra*

5.1 Contexte

En Charente-Maritime, les parcs ostréicoles sont classés en fonction de leur utilisation dans le cycle de production des huîtres. Certains sont favorables au captage du naissain, tandis que d'autres bénéficient à la croissance. De la même manière, certains secteurs ostréicoles sont plus ou moins propices au développement du *Porphyra* en fonction des conditions environnementales (hydrodynamisme, disponibilité en sels nutritifs, turbidité...). L'objectif de ce travail est de mettre en œuvre une méthodologie afin d'identifier les zones les plus favorables à la croissance de cette algue, avec pour objectif final l'optimisation des futures productions une fois la filière mise en place.

5.2 Méthodologie

5.2.1 Principe

La méthodologie utilisée consiste à acquérir et analyser automatiquement des données photographiques aériennes sur différents secteurs du domaine public maritime de Charente-Maritime concédés aux ostréiculteurs, à l'aide d'un drone équipé d'une caméra multispectrale. Les secteurs survolés ont été pré-identifiés grâce à une enquête auprès des professionnels réalisée par CAPENA entre janvier et avril 2023 (Carpentier, 2023).

Les survols ont eu lieu durant la période où les algues *Porphyra* sont les plus développées entre les mois de mai et juin. Les fenêtres de vols sont conditionnées par la marée basse, le coefficient de marée, la luminosité, l'ensoleillement et le vent. Il y a donc de nombreuses conditions nécessaires pour acquérir des données optimales.

5.2.2 Acquisition des données

5.2.2.1 Matériel

L'acquisition des données s'est déroulée en plusieurs étapes essentielles pour garantir la précision et la fiabilité des informations collectées. Pour cette étude, le drone DJI Mavic 3M Multispectral (Figure 25) a été utilisé. C'est un outil spécialement conçu pour les applications agricoles et environnementales. Ce drone est équipé de plusieurs capteurs qui permettent une analyse détaillée des cultures.

Caractéristiques du Drone

Capteurs Multispectraux :

- Vert (G) : 560 nm \pm 16 nm
- Rouge (R) : 650 nm \pm 16 nm
- Bord rouge (RE) : 730 nm \pm 16 nm
- Proche infrarouge (NIR) : 860 nm \pm 26 nm

Caméra RGB :

- Capteur CMOS de 20 MP
- Distance focale : 24 mm
- Ouverture : f/2.8 - f/11
- ISO : 100-6400 (photo et vidéo)

Autonomie de vol : Jusqu'à 46 minutes

Précision du positionnement : Horizontal \pm 1.5 m,

Vertical \pm 0.5 m

Suivi de terrain : Permet de maintenir une hauteur constante au-dessus de la zone de survol, assurant ainsi une collecte de données uniforme.

RTK (Real-Time Kinematic) : Fournit une précision centimétrique pour les relevés topographiques (non utilisé dans notre cas)



Figure 25 : Drone DJI Mavic 3M

Système de détection d'obstacles omnidirectionnel : Améliore la sécurité du vol en détectant et évitant les obstacles dans toutes les directions.

5.2.2.2 Processus d'acquisition

Préparation du Vol : Les zones à survoler sont sélectionnées en fonction de l'enquête préalable réalisée auprès des conchyliculteurs. Ensuite, les missions de vol sont planifiées en utilisant le logiciel DJI Pilot pour définir les trajectoires et les altitudes optimales.

Survol des Zones : Les vols sont réalisés à une altitude de 100 m afin d'assurer une résolution spatiale adéquate. Un mode de vol autonome est utilisé pour garantir la couverture systématique des zones et la répétabilité des missions.

Capture des Images : Une prise d'images multispectrales et RGB à intervalles réguliers est effectuée. Les données sont stockées sur les supports de stockage du drone. Le drone capture ainsi une série d'images en survolant la zone d'intérêt selon un plan de vol préétabli. Ces images sont prises avec un recouvrement entre 70% et 90% pour s'assurer qu'il y a suffisamment de données communes entre les images adjacentes.

5.2.3 Traitement des données

Après avoir effectué la phase d'acquisition d'images avec le drone, les images capturées sont importées dans le logiciel de cartographie agricole Pix4Dfields, où elles sont organisées et préparées pour le traitement par zone (chaque champ pouvant comporter plusieurs zones).

Traitement Pix4DFields : ce traitement opère une fusion de données de cinq acquisitions simultanées. En effet, le drone équipé de 5 caméras dispose à chaque acquisition de cinq images correspondantes chacune à l'une des bandes listées dans le descriptif du drone. Les bandes rouge et verte (respectivement 650 nm et 560 nm) permettent la construction de l'orthomosaïque couleur et les bandes verte, rouge et NIR (860 nm) la construction de l'orthomosaïque MCARI (Modified Chlorophyll Absorption Ratio Index). Au final 3 orthomosaïques sont disponibles après le traitement par le logiciel (Figure 26).

- MCARI : Le MCARI est un indice utilisé pour évaluer la quantité de chlorophylle dans la végétation. Il est obtenu à partir des données multispectrales capturées par le drone, Pix4Dfields calcule le MCARI en utilisant une formule spécifique.
- Image multispectrale avec reconstruction du bleu : Pix4Dfields utilise les données multispectrales pour reconstruire une image où le canal bleu est synthétisé à partir des bandes rouge et verte pour un traitement couleur ultérieur.
- Image naturelle en couleurs Réelles : Il s'agit de l'image qui représente les couleurs telles qu'elles apparaissent à l'œil humain. Elle est obtenue à partir des données RGB capturées par le drone, et fournissant une représentation fidèle de la surface terrestre comme on la percevrait visuellement.

Depuis ces bandes vertes, rouges et NIR, il est possible de calculer des critères identifiés et exploités dans l'agriculture. Dans notre cas il s'agit d'analyser l'intensité de l'activité chlorophyllienne : le critère MCARI pour lequel chaque valeur de pixel dans l'image produite devient en fait un niveau de cette activité chlorophyllienne sur la zone correspondant au pixel. Pix4Dfields va donc produire une orthomosaïque sur d'une fusion spatiale et spectrale des données. Spatiale dans le sens où des images de plusieurs acquisitions seront employées et spectrale dans le sens où plusieurs bandes de couleur seront utilisées.

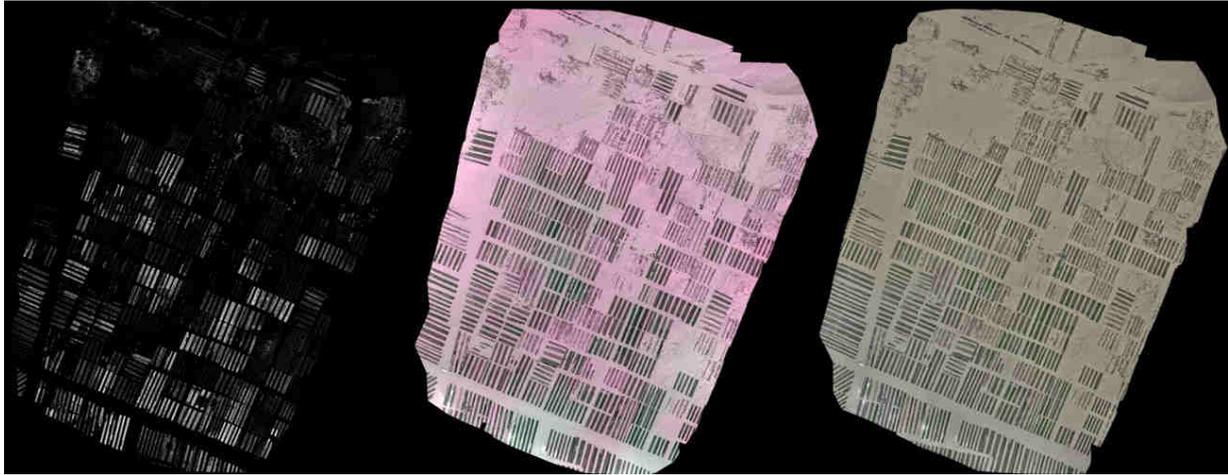


Figure 26 : Les 3 Orthomosaïques produites avec le logiciel Pix4Dfields (MCARI, Image multispectrale et image en couleur réelle)

Choix des orthomosaïques produites : afin d'effectuer par la suite le traitement sur le logiciel de cartographie QGis, nous avons fait le choix d'exploiter les orthomosaïques issues des images des bandes verte et rouge. Elles permettent d'obtenir une orthomosaïque MCARI et couleur (le bleu étant déduit). L'image RGB produite par le drone n'est pas prise en compte car sa résolution et l'emprise de l'orthomosaïque produite ne correspond pas à l'image MCARI utilisée pour obtenir l'identification du *Porphyra*. Des travaux ont été amorcés lors d'un stage de master 1 avec le laboratoire MIA de la Rochelle pour permettre la mise en correspondance de ces orthomosaïques (entre autres algorithmes de segmentation, d'identification du *Porphyra*) mais n'ont pas donné de résultats suffisamment aboutis pour l'instant. Un défi a émergé en particulier lors de cette mise en correspondance : au-delà de la problématique d'emprise et de résolution, il s'avère que la fusion spatiale des images RGB diffère de celle des images multispectrales. Nous avons constaté en recalant les orthomosaïques manuellement par rapport à un point d'intérêt au sud-ouest que nous avons toujours un décalage au nord-est de l'image.

Les images MCARI et RGB reconstruites depuis les bandes multispectrales avec Pix4DField seront donc notre base de travail dans QGis pour effectuer la détection du *Porphyra*. Nous conservons la possibilité dans le futur d'intégrer les orthomosaïques depuis les images RGB du fait de leur résolution supérieur notamment pour des traitements s'appuyant sur la texture.

5.2.4 Détection des algues *Porphyra* et analyse de la surface couverte

L'objectif de cette étape est de détecter la présence des algues rouge *Porphyra* sur la base des deux orthomosaïques produites par Pix4DFields et, par la suite de mesurer automatiquement la surface couverte par ces algues.

Pour cela un plugin exploitant l'API Python de QGis a été développé par ADS Process afin de permettre un traitement directement dans QGis de ces orthomosaïques. Le scénario est le suivant :

- Un projet QGis est construit sur la base d'un fond de carte incluant l'île d'Oléron et ses alentours.
- Un groupe est construit par acquisition drone (une acquisition correspondant pour rappel à l'ensemble des images multispectrale permettant la construction des orthomosaïques).
- Dans ce groupe sont importé les deux orthomosaïques (deux GeoTiff) produites par Pix4DFields : les conventions de nommage du logiciel font que les fichiers correspondant aux orthomosaïques MCARI et RGB seront respectivement MCARI.data.tiff et Orthomosaïque.rgb.tiff.

- Une fois le plugin activé, le groupe, puis les deux orthomosaïque sont choisis.
- Une interaction avec les glissières du plugin permet de valider les meilleurs paramètres pour identifier les algues rouges. En effet trois visualisations interactives permettent de vérifier en direct l'adéquation de chaque paramètre.
- Une fois les validations effectuées, le plugin disparaît laissant le champ à QGis où un nouveau layer de polygones est apparu et recouvrant l'ensemble des pixels identifiant une zone contenant de l'algue rouge (Figure 27).

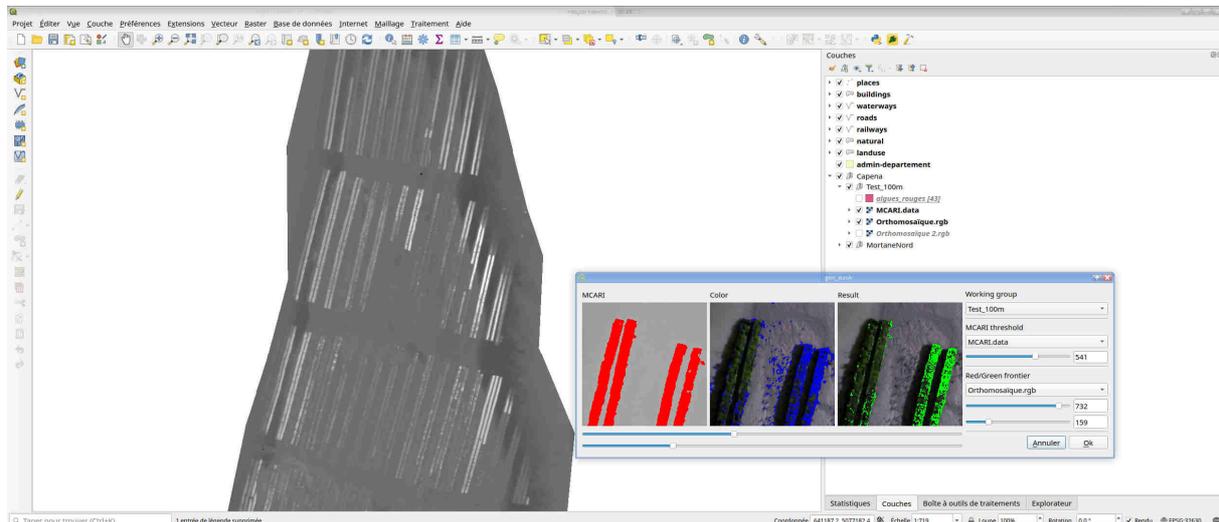


Figure 27 : Exemple d'usage de l'extension

Durant la production de ces polygones, le plugin produit également les statistiques de surface de chaque polygone permettant à l'utilisateur une estimation de l'emprise globale mais également des statistiques sur la surface moyenne et la répartition statistique de ces surfaces.

5.3 Bilan

Ce projet a été réalisé avec le soutien de l'entreprise ADS Process, située à Martillac, qui avait pour mission de développer un moyen de traitement automatique des acquisitions photographiques des concessions ostréicoles produites par le logiciel Pix4Dfields, à partir des photos prises en drone, afin de discriminer les secteurs de développement de l'algue rouge *Porphyra*. La première année a permis de perfectionner le protocole d'acquisition des données, d'explorer les méthodes de traitement d'images afin d'améliorer l'analyse jusqu'alors identifiée, et de créer un algorithme d'analyse automatique des images où des alternatives R et Python ont été explorés pour des traitements SIG. La deuxième année a été consacrée à la transposition de cet algorithme en un plugin pour une intégration dans QGIS avec un focus particulier sur l'ergonomie du programme pour que celui-ci réponde aux attentes de CAPENA. L'appui technique d'un stagiaire de Master 1 (Master MIX) en collaboration avec le Laboratoire Mathématique, Image et Applications (MIA) de l'Université de La Rochelle a notamment permis de démarrer le travail sur le plugin python et d'explorer certaines hypothèses pour de potentielles améliorations.

Le résultat final est donc une extension (plugin) compatible avec le logiciel QGIS, permettant d'identifier les surfaces occupées par l'algue rouge *Porphyra* au sein des concessions ostréicoles, ainsi qu'une première identification des secteurs comme les plus favorables au développement de cette algue sur les structures conchyliques.

Deux années de données (2023 et 2024) sont disponibles sur 4 des 5 principaux secteurs du bassin de Marennes-Oléron reconnus comme favorables (Mortane, Viandet, Ronces et Bourgeois) au développement du *Porphyra*. L'objectif est de poursuivre cette acquisition et

cette analyse quelques années afin d'avoir au minimum 5 années de séries historiques sur ces sites, et de collecter de la donnée sur les autres sites identifiés. Une série historique de cette dimension permet de lisser les influences de l'environnement et *in fine* de déterminer les secteurs où la culture de *Porphyra* devrait être la plus optimale une fois cette algoculture en place.

6 Recherche de molécules d'intérêt et développement de méthodologies d'extraction

6.1 Contexte

Les macroalgues, du genre *Porphyra*, souvent consommées sèches, contiennent une large gamme de composés d'intérêt nutritionnel et fonctionnel tels que des polysaccharides ; en particulier le *Porphyran*, un polysaccharide sulfaté qui, après traitement alcalin, présente les capacités gélifiantes de l'agarose (Rinaudo et al, 2007), des protéines, des vitamines (telles que des vitamines de familles B et C), des composés phénoliques, caroténoïdes, acides aminés analogues de la mycosporine (MacArtain et al, 2008 ; Cao et al, 2016) (MAA en anglais), minéraux (Bito et al, 2017)... pouvant présenter une variété d'activités biologiques (Figure 28). Les protéines, en particulier, constituent une part relativement importante du poids sec des algues rouges et donc des *Porphyra* (25 à 30% du poids sec de l'algue en moyenne, Cao et al 2016), en comparaison avec les autres groupes de macroalgues et d'autres légumes terrestres.

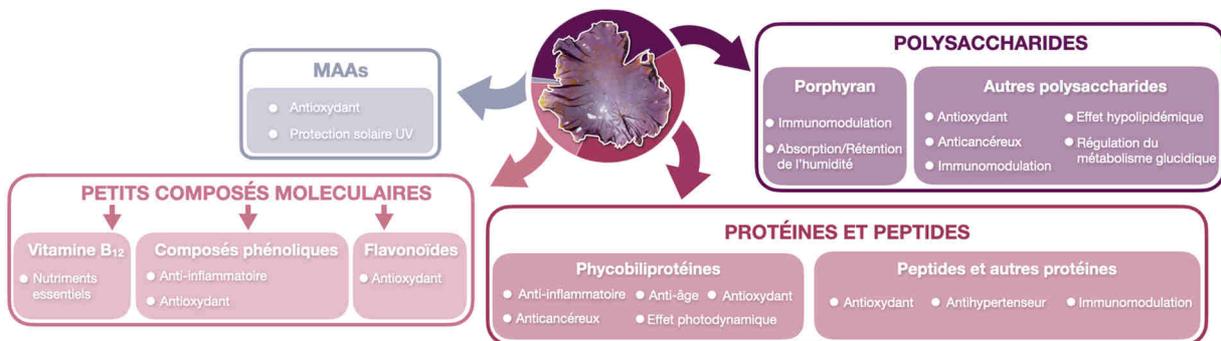


Figure 28 : Composés identifiés chez *Porphyra* sp. dans la littérature (Cao et al, 2016)

Lors de précédents travaux, plusieurs problématiques ont été abordées et ont permis d'identifier des premiers éléments permettant de diriger les travaux réalisés dans le projet ANCOVA :

- Les premiers travaux visant à évaluer le potentiel de *Porphyra purpurea* cultivées sur l'île d'Oléron ont permis de confirmer leur richesse en protéines mais aussi dans d'autres molécules actives potentiellement très intéressantes dans différents secteurs tels que la santé, l'alimentation ou la cosmétique comme les phycobilliprotéines (PBPs) et les acides aminés analogues à la mycosporine (MAAs) ainsi qu'en polysaccharides comme un hydrocolloïde (*Porphyranes*) et la cellulose. Ces molécules ont ainsi été identifiées comme « cibles » pour les futurs travaux d'extraction. Les résultats ont en revanche montré une présence modeste de composés tels que les polyphénols ou flavonoïdes par rapport à d'autres biomasses algales ou terrestres.
- L'impact sur les rendements d'extraction des molécules cibles d'un certain nombre de paramètres tels que la granulométrie de la biomasse, son dessalage ou non ou sa préparation après récolte (séchée à l'air libre, humide ou congelée) ont été évalués pour optimiser le procédé.
- Trois grandes étapes ont été proposées pour obtenir trois fractions riches dans les molécules ciblées, en tenant compte de leurs propriétés physico-chimiques (Figure 29) :
 - Un extrait riche en molécules actives hydrosolubles, obtenu à des températures peu élevées, contenant particulièrement des protéines, PBPs et MAAs. Cet extrait a fait l'objet d'un focus particulier pour ces molécules particulièrement intéressantes, en cosmétique notamment.

- Un extrait riche en *Porphyranes*, obtenu à des températures élevées, un polysaccharide sulfaté pouvant trouver des applications diverses, notamment dans la santé ou l'alimentaire, et pouvant aussi être une source d'oligo-*Porphyranes* actifs.
- Un extrait riche en cellulose pouvant trouver des applications en packaging, mais également dans d'autres secteurs sous forme de nanocellulose par exemple.

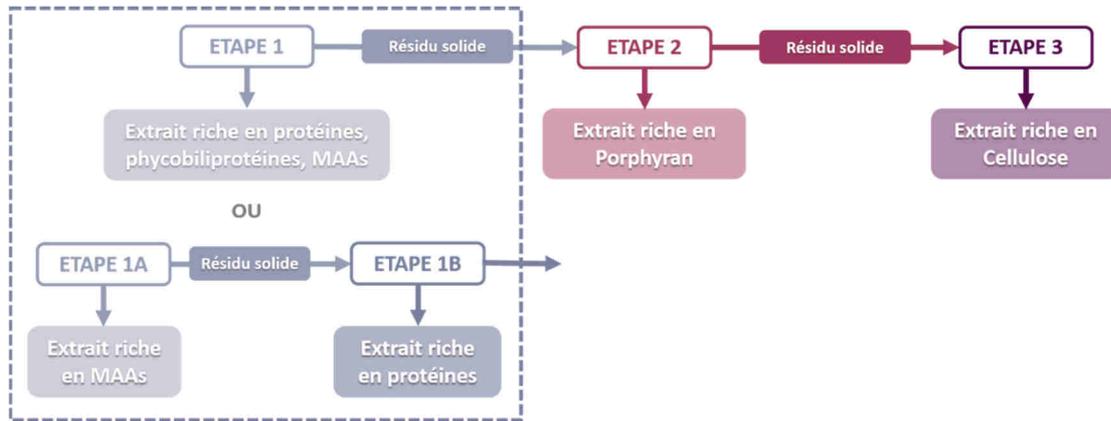


Figure 29 : Proposition d'étapes d'extraction pour obtenir des extraits riches en molécules d'intérêt précédemment identifiées

6.2 Problématique

La transition vers une bioéconomie circulaire nécessite des procédés de bioraffinerie optimisés pour exploiter pleinement le potentiel des macroalgues, tout en minimisant l'impact environnemental des méthodes d'extraction. La bioraffinerie permet d'extraire une diversité de biomolécules à partir d'une même biomasse, avec pour défi d'isoler chaque composant sans compromettre les autres. Par exemple, l'extraction des polysaccharides à partir de *Porphyra* se fait à haute température, mais des conditions trop sévères peuvent endommager d'autres composés, tels que les protéines.

Les précédents travaux ayant permis d'identifier certaines données importantes pour la valorisation de la *P. purpurea* sous formes d'extraits actifs, il s'agit dans le projet ANCOVA de développer un procédé de bioraffinerie « vert » et cohérent permettant l'obtention des extraits en optimisant leurs rendements et qualité.

Nous savons également que la composition biochimique des macroalgues peut être largement influencée par des paramètres environnementaux extérieurs tels que l'ensoleillement, la salinité, la température de l'eau... Cela nous a ainsi conduit à nous poser la question suivante : pour une même espèce, cultivée sur un même estran dans des conditions similaires, la position sur l'estran (en bas ou en haut) peut-elle significativement influencer sa composition biochimique et donc ses applications potentielles ?

Pour répondre à ces deux axes de questionnement, des travaux de recherche ont été réalisés au laboratoire IPREM de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour sous forme de stage de master II.

6.3 Méthodologie

6.3.1 Etude de l'influence de la position sur l'estran sur la composition biochimique de *Porphyra*

L'influence de la position de culture de *Porphyra* sur l'estran a été étudiée sur des prélèvements réalisés le même jour en mai 2024, et séchés dans des conditions similaires (extérieur, zone couverte) avant d'être analysés en parallèle au laboratoire. Un prélèvement a été réalisé par

CAPENA sur une zone correspondant à coefficient de marée autour de 85 et un autre autour d'un coefficient de 50.

Une fois arrivées au laboratoire, les algues ont été broyées à l'aide d'un broyeur planétaire à billes RETSCH PM100. Le broyage a été réalisé pendant 20 minutes à une vitesse de 400 rpm. La composition biochimique des deux prélèvements en sucres totaux, polyphénols, MAAs, PBPs, chlorophylles et protéines extractibles a ensuite été analysée. Les méthodes d'extraction des molécules et leur quantification (par dosages spectrophotométriques) ont été optimisées lors de précédents travaux.

6.3.2 Optimisation du procédé de bioraffinerie

6.3.2.1 Optimisation de l'étape 1 : cible protéines, PBPs et MAAs

Lors de ces travaux, un effort particulier a été fourni pour optimiser l'extraction des molécules hydrosolubles thermosensibles, avec un focus sur les protéines, PBPs et MAAs. Les macroalgues comme *Porphyra* étant dotées de parois cellulaires résistantes, il est intéressant de traiter les algues pour dégrader la paroi cellulaire, augmenter leur perméabilité en molécules d'intérêt et ainsi améliorer les rendements. Des techniques physiques, chimiques et biologiques peuvent être envisagées.

Dans ces travaux, nous avons fait le choix de combiner un traitement physique (mécanique, par broyage) et biologique (par action d'enzymes) et d'évaluer leur pertinence pour l'extraction des molécules cibles de l'étape 1. Les différentes conditions expérimentales testées sont récapitulées dans la Figure 30.

Différents paramètres ont ainsi été optimisés :

- Ratio algue/solvant (1/20, 1/40, 1/60)
- Utilisation ou non d'une enzyme (protéase ou carbohydrase) et % d'enzyme à utiliser
- Température d'extraction (4°C, 20°C, 50°C)

Pour chaque test d'extraction, les algues sèches non dessalées ont tout d'abord été mélangées à l'eau distillée en suivant le ratio attendu puis broyées en utilisant un disperseur IKA Ultra-Turrax T25 easy clean control durant 3 min à 13 000 rpm. L'extraction a ensuite été poursuivie sous agitation pendant 6h, dans les conditions désirées (de température et avec/sans enzyme) (Figure 30). Des prélèvements ont été réalisés toutes les heures afin de suivre l'extraction des molécules cibles (protéines, PBPs et MAAs). Au bout des 6 h d'extraction, les extraits ont été récupérés par centrifugation et les culots conservés à -20°C pour l'étape 2.

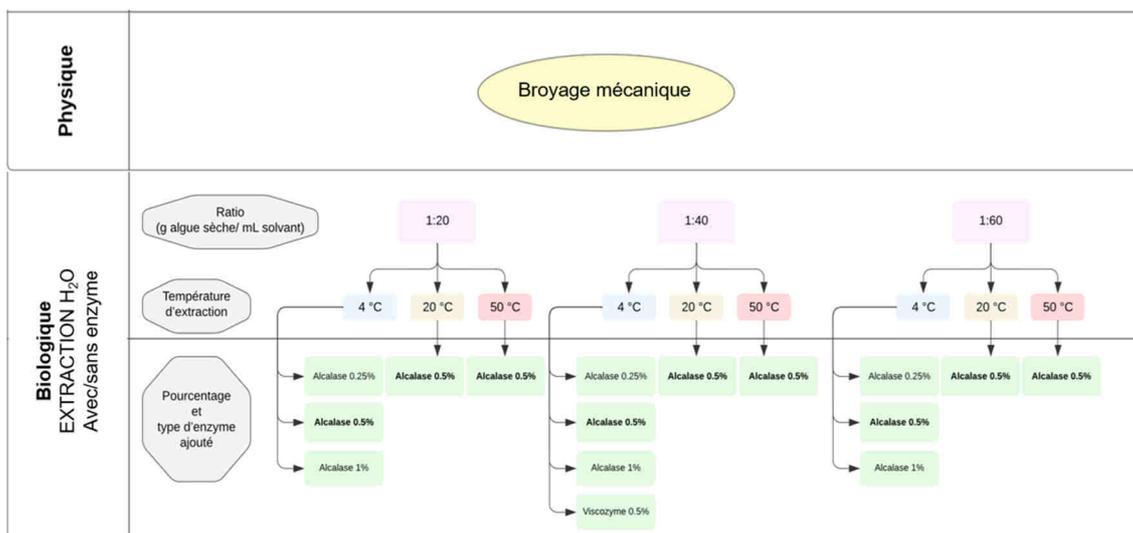


Figure 30 : Schéma des paramètres testés pour l'obtention de la fraction lors de l'étape 1

6.3.2.2 Etape 2 et 3 : obtention de fractions riches en Porphyranes et cellulose

La fraction riche en *Porphyranes* a été obtenue à partir du résidu sortant de l'étape 1. L'extrait a été obtenu après chauffage dans de l'eau distillée avec un ratio 1/30 à 90 °C pendant 2 heures, suivi d'une centrifugation pour récupérer le surnageant riche en *Porphyranes*. Celui-ci a ensuite été précipité à l'éthanol 80% avant lyophilisation. Le résidu a été conservé pour l'étape 3.

La fraction riche en cellulose a été obtenue à partir du résidu de l'étape 2. Pour cela, le résidu a été traité avec une solution de NaOH à 4% à 80 °C avec un ratio 1/40 pendant 2 h. Le traitement de blanchiment des échantillons a ensuite été effectué en utilisant une solution de H₂O₂ à 30%, ratio 1/10, à 80 °C pendant 1,5 h.

6.3.2.3 Caractérisation des extraits obtenus

Pour l'étape 1, les molécules ont été dosées par des méthodes spectrophotométriques similaires à la partie 6.2.1.

Les *Porphyranes* (étape 2) et la cellulose (étape 3), ont été caractérisés par spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier.

6.4 Résultats

6.4.1 Influence de la position sur l'estran sur la composition biochimique

Les résultats ont montré que la position de la culture de *Porphyra* sur l'estran (en haut ou en bas) avait un impact sur certaines molécules de l'algue. En effet, pour les algues cultivées sur la zone correspondant à une marée avec un coefficient plus faible (50) une augmentation notable des PBPs a été observée. À l'inverse, les sucres totaux, protéines extractibles, MAAs et les polyphénols semblent moins influencés par le changement de coefficient de marée (Figure 4).

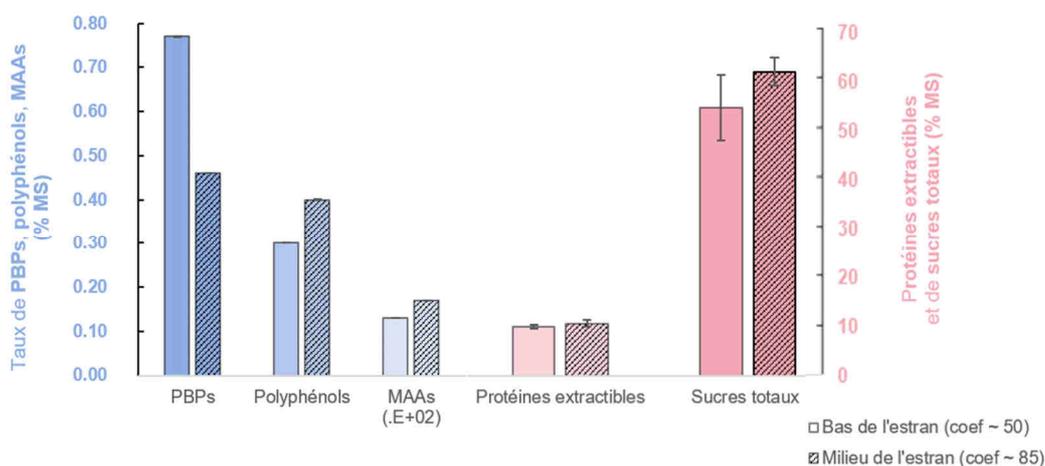


Figure 31 : Influence de la position de la culture de *Porphyra* sur l'estran (marée 85 ou 50) sur la composition biochimique de l'algue

6.4.2 Optimisation du processus de bioraffinerie

L'objectif principal de la deuxième partie du projet était de développer un procédé de « bioraffinerie » permettant d'obtenir plusieurs extraits valorisables dans différents secteurs, et en particulier dans la cosmétique. Pour cela, différentes étapes ont été identifiées pour optimiser la qualité et le rendement de chaque extrait, en prenant en compte les propriétés physico-chimiques des molécules cibles telles que leur hydrosolubilité, thermosensibilité etc... Chaque étape ayant un impact sur la suivante, il est donc également nécessaire, lors de

l'optimisation d'une étape, de vérifier son influence sur la suivante. L'étape 1 du procédé de bioraffinerie a fait l'objet d'un focus particulier par l'obtention d'une fraction riche en protéines, PBPs et MAAs, des molécules potentiellement intéressantes pour la cosmétique, l'une des cibles de CAPENA pour la valorisation du *Porphyra*.

Ces travaux nous ont permis d'optimiser le ratio d'extraction algue/solvant (1/40), l'ajout ou non d'une enzyme (alcalase, carbohydrase sans effet) et sa concentration (0.5%), la température d'extraction et sa durée. Tous les résultats obtenus ne peuvent être présentés ici, mais une proposition de procédé découlant des résultats peut être proposé et adapté au type d'extrait ciblé. Si l'on cherche, par exemple une étape 2 qui maximise l'extraction de protéines/peptides en limitant l'extraction des polysaccharides qui seraient plutôt extraits lors des étapes 2 et 3, voici la proposition que l'on pourrait faire :

Les résultats ont montré que l'alcalase permettait d'augmenter le rendement d'extraction des protéines/peptides de 100%, et ceci quelle que soit la température (4°C, 20°C et 50°C, une température plus élevée risquant de dégrader certaines des molécules cibles telle que les PBPs ainsi que de favoriser l'extraction des *Porphyranes*), passant d'environ 7% pour l'extraction sans enzyme à environ 14% avec l'alcalase à une concentration de 0,5% (Figure 32A). Cependant, la température d'extraction lors de l'étape 1 a largement influencé les rendements d'extraction des polysaccharides lors de étapes 2 et 3, en particulier du *Porphyrane* (Figure 32B). En effet, aux températures de 20 et 50°C, le rendement chute à environ 9%, contre environ 15% avec une étape 1 à 4°C, ce qui implique qu'une partie des *Porphyranes* a été extraite lors de l'étape 1 aux températures les plus élevées. L'étape 1 est donc moins sélective vis-à-vis des protéines, PBPs et MAAs à 20°C et 50°C qu'à 4°C.

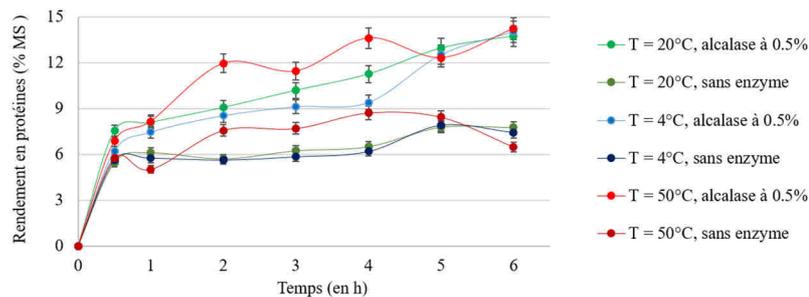
Les résultats obtenus lors de ces travaux nous ont donc permis de montrer qu'il était possible d'extraire différentes fractions d'intérêt à partir de *Porphyra purpurea* cultivée sur l'île d'Oléron, pouvant trouver des applications dans les domaines des cosmétiques, mais également dans d'autres secteurs comme l'alimentaire ou les nutraceutiques. Différents extraits préparés à partir des résultats obtenus lors de ces travaux sont d'ailleurs actuellement en cours de production afin de pouvoir être testés dans un projet nutrition.

De plus, il pourrait être intéressant, pour certaines molécules à haute valeur ajoutée comme les MAAs, de produire des extraits avec des puretés plus élevées. C'est pourquoi des premiers tests ont également été entrepris lors du projet ANCOVA pour essayer de purifier les molécules extraites, notamment les MAAs de l'étape 1. Les premiers résultats obtenus sont encourageants même si une étude plus approfondie sera nécessaire pour confirmer et améliorer le procédé.

6.5 Conclusions

Ces travaux mettent en évidence le potentiel de valorisation de *Porphyra purpurea* grâce à un procédé de bioraffinerie optimisé, permettant l'obtention de fractions riches en molécules d'intérêt pour divers secteurs comme la cosmétique ou la nutraceutique. L'influence des paramètres de culture et des étapes d'extraction sur les rendements et la qualité des extraits a été démontrée, ouvrant la voie à des applications innovantes. La poursuite des efforts pour améliorer la sélectivité et la pureté des molécules cibles, notamment les MAAs, constitue une perspective prometteuse pour développer l'exploitation durable de cette ressource.

(A)



(B)

Température d'extraction de la fraction 1	Avec/Sans Alcalase à 0,5%	Rendement en porphyrane (%)	Rendement en cellulose (%)
4°C	Avec	16.88 ± 0.01	3.75 ± 0.25
	Sans	14.25 ± 0.01	3.70 ± 0.05
20°C	Avec	8.14 ± 0.01	1.67 ± 0.24
	Sans	8.91 ± 0.01	0.84 ± 0.01
50°C	Avec	11.77 ± 0.02	1.10 ± 0.32
	Sans	9.10 ± 0.01	1.20 ± 0.41

(C)

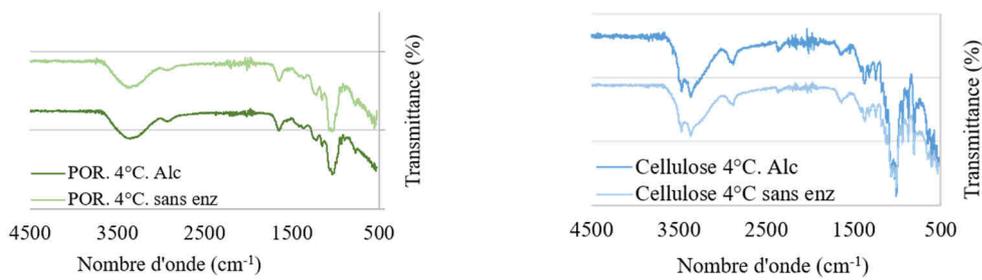


Figure 32 : Influence de la température et de l'alcalase sur les rendements en protéines lors de l'étape 1 (A) et les rendements en *Porphyranes* et cellulose des étapes 2 et 3 (B) et spectres FTIR-ATR des fractions riches en *Porphyrane* et cellulose obtenues aux étapes 2 et 3 (C).

7 Conclusion générale

Le volet algue du projet ANCOVA 17 a confirmé le potentiel de valorisation de *P. purpurea* pour le développement de nouvelles filières aquacoles. L'ensemencement en éclosérie a été maîtrisé, et la croissance des algues avec ce procédé s'est révélée prometteuse, offrant notamment une plus grande homogénéité des récoltes.

L'analyse génétique des populations de *Porphyra* en Charente-Maritime a mis en évidence que l'espèce *P. purpurea*, était particulièrement bien adaptée aux sites ostréicoles. Bien que des recherches supplémentaires soient nécessaires pour développer des marqueurs génétiques propres à cette espèce, ces travaux ouvrent la voie à la sélection de souches adaptées aux conditions locales et à la culture.

L'outil développé à partir des survols en drone offrira, à terme, la possibilité de cartographier précisément les parcs ostréicoles propices à la culture de *P. purpurea*, contribuant ainsi à une gestion plus fine des sites aquacoles.

L'optimisation des procédés de bioraffinerie a permis d'extraire des fractions riches en molécules d'intérêt, ouvrant des perspectives pour des applications dans des secteurs comme la cosmétique ou la nutraceutique. Les efforts pour améliorer la sélectivité et la pureté des molécules cibles, notamment les MAAs, renforceront l'intérêt pour le développement de cette algoculture.

Les résultats obtenus sont encourageants, mais soulignent également la nécessité de poursuivre les recherches afin de perfectionner les protocoles de culture et d'extraction, tout en consolidant les bases pour l'implantation de filières aquacoles durables et économiquement viables.

8 Références bibliographiques

- Andersen RA. (2005) Algal culturing techniques. Elsevier Academic Press, Burlington, MA
- Bito, T., Teng, F., Watanabe, F. (2017) Bioactive Compounds of Edible Purple Laver *Porphyra* sp. (nori). J. Agric. Food Chem. 65, 10685–10692
- Cao, J., Wang, J., Wang, S., Xu, X. (2016) *Porphyra* Species: A Mini-Review of Its Pharmacological and Nutritional Properties. J. Med. Food 19, 111–119
- Carpentier C. (2023) Identification des sites d'observation de *Porphyra* spp. sur les concessions ostréicoles charentaises. Rapport d'enquête CAPENA, 18 p
- CEVA (2012) Compte rendu des expérimentations en baie de Cancale - Projet CHACO Culture d'algues d'intérêt économique sur les concessions conchylicoles bretonnes. Projet du programme BREIZH'ALG - Axe 1 -Culture
- Grassien J. (2018) Opportunité de valorisation des macroalgues du bassin conchylicole de Marennes-Oléron (Rapport de stage de Master 2 FOGEM) (p. 74). Centre Régional d'Expérimentation et d'Application Aquacole (CREAA) : Université de Lille.
- Hennache C. (2019) Suivi de croissance de l'algue *Porphyra* sp. après captage naturel sur parc ostréicole. Rapport CREAA, 21p.
- Hennache C., Carpentier C. (2021) La culture de *Porphyra* spp. dans les parcs ostréicoles de Charente-Maritime. Rapport CAPENA, 26p.
- MacArtain, P., Gill, C. I. R., Brooks, M., Campbell, R., Rowland, I. R. (2008) Nutritional Value of Edible Seaweeds. *Nutr. Rev.* 65, 535–543
- Mauger S., Baud A., Le Corguillé G., Tanguy G., Legeay E., Creis E. (2023) Genetic resources of macroalgae: Development of an efficient method using microsatellite markers in non-model organisms. *Algal Research*, vol. 75, p. 103251
- Perez R., Kaas R., Campello F., Arbault S., Barbaroux O. (1992) La culture des algues marines dans le monde. IFREMER
- Rinaudo, M. (2007) Seaweed Polysaccharides. in *Comprehensive Glycoscience* 691–735
- Smith, J., Summers, G., Wong, R. (2010) Nutrient and heavy metal content of edible seaweeds in New Zealand. *N. Z. J. Crop Hortic. Sci.* 38, 19–28
- Varela-Álvarez E., Balau A.C., Paulino C., Berceibar E., Pearson G.A., Serrão E.A. (2018) Isolation and characterization of microsatellite markers for the red alga *Porphyra umbilicalis*. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*, vol. 16, n° 4, p. 390–393.
- Varela-Álvarez E., Meirmans P.G., Guiry M.D., Serrão E.A. (2022) Biogeographic Population Structure of Chimeric Blades of *Porphyra* in the Northeast Atlantic Reveals Southern Rich Gene Pools, Introgression and Cryptic Plasticity. *Frontiers in plant science*, vol. 13, p. 818368.
- Varela-Álvarez E., Paulino C., Serrão E.A. (2017) Development and characterization of twelve microsatellite markers for *Porphyra linearis* Greville. *Genetica*, vol. 145, n° 1, p. 127–130.



Cédric Hennache
Chargé de mission Pêches et environnement
c.hennache@cape-na.fr

CAPENA – Expertise et Application
Prise de Terdoux – 17480 le Château d’Oléron
T : 05 46 47 51 93
<https://www.cape-na.fr/>



Liberté • Égalité • Fraternité
RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

