



**HAL**  
open science

# Étude des mécanismes de contamination des mollusques bivalves par des neurotoxines à action rapide (FAT) & développement de procédés de détoxification.

Medhioub Walid

► **To cite this version:**

Medhioub Walid. Étude des mécanismes de contamination des mollusques bivalves par des neurotoxines à action rapide (FAT) & développement de procédés de détoxification.. Physiologie [q-bio.TO]. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2011. Français. NNT: . tel-00598247

**HAL Id: tel-00598247**

**<https://theses.hal.science/tel-00598247>**

Submitted on 5 Jun 2011

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



**THESE DE DOCTORAT en co-tutelle**

**Entre**

L'université de Tunis El-Manar  
&  
L'université de Bretagne Occidentale

Présentée par

Monsieur MEDHIOUB Walid

En vue de l'obtention du grade de

**Docteur en Sciences Biologiques**

**Etude des mécanismes de contamination des mollusques  
bivalves par des neurotoxines à action rapide (FAT)  
& développement de procédés de détoxification**

Soutenue publiquement le 09 mai 2011 devant le jury composé de :

- Pr. A. EI ABED (INSTM) : Président
- Pr. M.M. KRAÏEM (INSTM) : Encadreur
- Dr. P. SOUDANT (Université de Bretagne Occidentale) : Encadreur
- Pr. M. EI CAFSI (Faculté des Sciences de Tunis) : Rapporteur
- Pr. J.M. FREMY (ANSES/DSL) : Rapporteur
- Pr. F. GUERARD (Université de Bretagne Occidentale) : examinateur
- Dr. P. LASSUS (IFREMER, Nantes) : Invité



## **REMERCIEMENTS**

Ce travail a été réalisé en co-tutelle internationale entre l'Université de Tunis El-Manar et l'Université de Bretagne Occidentale au sein du Laboratoire Aquaculture de l'Institut National des Sciences et Technologies de la Mer de Monastir, du laboratoire Phycotoxines de l'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer de Nantes et avec la collaboration du Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin de Brest.

Je remercie très cordialement les responsables de la coopération INSTM-IFREMER particulièrement monsieur Denis Lacroix et de l'Institut Français de Coopération (Ambassade de France en Tunisie) ainsi que ceux du Collège Doctoral International de l'Université Européenne de Bretagne pour avoir contribué au financement de ma thèse et à sa réalisation dans les meilleures conditions.

J'exprime ma reconnaissance à monsieur Ridha Mrabet Directeur Général de l'INSTM pour le grand intérêt qu'il a accordé au thème étudié et pour tous les moyens qu'il a mis à ma disposition pour l'avancement de mes travaux de recherches.

J'adresse mes sincères remerciements au professeur Amor El-Abed pour avoir accepté de présider ce jury et ce malgré ses nombreuses occupations. Sa présence me fait un grand honneur.

Ma profonde gratitude est destinée au professeur Mohamed El Gafsi et au professeur Jean-Marc Frémy pour avoir accepté d'évaluer ce travail. Leurs suggestions, leurs remarques pertinentes et leurs commentaires judicieux m'ont été très utiles.

Je tiens également à remercier Mme Fabienne Guérard d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude et ma sincère reconnaissance à mes deux directeurs de thèse, Mejjedine Kraeim professeur et chef de Laboratoire d'Aquaculture et Philippe Soudant professeur à l'Université Occidentale de Brest, pour leur encadrement et leur soutien qui m'ont permis de mener à bien ce projet. La rigueur scientifique qu'ils m'ont

transmise lors de la correction de mes articles me servira tout au long de ma vie professionnelle.

Cette thèse n'aurait jamais vu le jour sans le soutien de mes responsables scientifiques Patrick Lassus et Zouher Amzil. Je tiens à les remercier d'avoir mis à ma disposition tous les moyens techniques, scientifiques et matériels indispensables à la réalisation de mon travail et de m'avoir offert l'opportunité de profiter de leur savoir faire et de leur expérience dans le domaine des phycotoxines. Je les remercie également pour leurs conseils précieux, pour leur encouragement sur le plan personnel et professionnel et pour avoir accordé le temps nécessaire à relire mes articles, mes présentations orales et plus récemment mon manuscrit.

Ce travail doit aussi son aboutissement à la collaboration de nombreux chercheurs et techniciens, c'est pourquoi je voudrais exprimer toute ma reconnaissance aux équipes de recherches du :

- Laboratoire phycotoxines, un remerciement particulier à tous les membres de l'équipe pour l'ambiance chaleureuse de travail qu'ils maintiennent au quotidien. Merci à Véronique, Philippe, Michèle, Marielle, Mano, Flo, Véro, Elodie, Claire, Florence, Thierry, Marie, Guillaume de m'avoir aidé à réaliser ce travail.
- Laboratoire d'aquaculture à Monastir, en particulier Sondes, Ali, Jamel, Wissem et Mabrouk dont l'aide a été pour moi précieuse dans l'accomplissement de cette thèse.
- Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR), IUEM, Brest. Spécialement Hélène Hégaret, Christophe Lambert et Hansy pour leur aide et leurs conseils.
- Laboratoire du milieu marin (INSTM), particulièrement Asma Hamza chercheur au centre de Sfax pour tous les renseignements utiles concernant les micro-algues toxiques dans le Golfe de Gabès.

Mes tantes, mes oncles et ya Neziha, que chacun se sente ici chaleureusement remercié pour son amour et pour son soutien moral.

Un grand merci à tous mes cousins (es), à tous mes amis de Moatmeur et de Nantes, qui m'ont soutenu jour après jour en m'apportant leur joie de vivre.

Enfin, je ne saurais terminer cette liste sans adresser un remerciement particulier à ceux qui m'ont soutenu dans l'ombre et qui ont cru en moi, mes parents, ma sœur, sans qui ce travail n'aurait jamais pu voir le jour. Je leur dédie ce travail en témoignage de ma profonde affection pour toute la patience et les sacrifices qu'ils ont consentis pour moi et dont je serai à jamais redevable. D'avoir porté ce travail à terme représente pour moi, aujourd'hui, la plus belle des récompenses.

Que tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin dans l'élaboration de ce travail trouvent ici l'expression de ma sincère gratitude.

**A**

*l'âme de mes chers grands parents*

*Hamadi, Ameer et Mennana*

*A mes parents Amel et Nejib et à ma sœur Mouna*

## SOMMAIRE

<b>REMERCIEMENTS</b>	<b>2</b>
<b>SOMMAIRE</b>	<b>6</b>
<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS</b>	<b>8</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b>	<b>12</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE</b>	<b>14</b>
<b>Partie I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>23</b>
<b>1. Les phycotoxines</b>	<b>23</b>
1.1. Efflorescences de phytoplancton toxique	23
1.2. Classification des phycotoxines	24
1.3. Réglementation des phycotoxines et méthodes d'analyse des toxines lipophiles	29
1.4. Les imines cycliques	33
<b>2. Relation entre micro-algues toxiques et mollusques bivalves</b>	<b>44</b>
2.1. Comportement alimentaire des mollusques bivalves face aux micro-algues toxiques	44
2.2. Digestion des particules alimentaires	46
2.3. Impact des micro-algues toxiques sur le système digestif des mollusques bivalves	47
2.4. Détoxification des mollusques bivalves	49
<b>3. Cultures des micro-algues toxiques.</b>	<b>59</b>
3.1. Croissance cellulaire de <i>K. selliformis</i> et production des gymnodimines	61
3.2. Croissance cellulaire d' <i>A. ostensfeldii</i> et production de spirolides	62
<b>Partie II. RESULTATS &amp; DISCUSSIONS</b>	<b>64</b>
<b>CHAPITRE I. Croissance et toxicité de <i>Karenia selliformis</i></b>	<b>65</b>
Résumé	66
Abstract	68
1. Introduction	69
2. Materials and Methods	71
3. Results	73
4. Discussion	77
<b>CHAPITRE II. Etude de la détoxification de palourdes contaminées par les gymnodimines</b>	<b>83</b>
<b>1. Introduction</b>	<b>84</b>
<b>2. Approche expérimentale</b>	<b>85</b>
Résumé	86
Abstract	87
2.1. Introduction	88
2.2. Materials and methods	89
2.3. Results	93
2.4. Discussion	100
<b>3. Approche naturelle</b>	<b>104</b>
3.1. Introduction	104
3.2. Matériels et méthodes	105
3.3. Résultats	111
3.4. Discussion	115
<b>4. Conclusion</b>	<b>118</b>

<b>CHAPITRE III. Croissance et toxicité d'<i>Alexandrium ostenfeldii</i></b> -----	<b>120</b>
Résumé -----	121
Abstract -----	123
1. Introduction -----	124
2. Materials and Methods -----	125
3. Results -----	128
4. Discussion -----	138
<b>CHAPITRE IV. Etude expérimentale de la détoxification des huîtres. ---</b>	<b>145</b>
Résumé -----	146
Abstract -----	148
1. Introduction -----	149
2. Materials and Methods -----	150
3. Results -----	153
4. Discussion -----	161
<b>CONCLUSIONS GENERALES &amp; PERSPECTIVES</b> -----	<b>165</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> -----	<b>171</b>
<b>ANNEXE</b> -----	<b>191</b>
<b>RESUME</b> -----	<b>211</b>



## TABLE DES ILLUSTRATIONS

## FIGURE

## INTRODUCTION GENERALE

Figure 1. Carte du Golfe de Gabès (sud est de la Tunisie, source Google Earth 2010).....	16
Figure 2. Carte du Bassin d'Arcachon (sud ouest de la France, source Google Earth 2010).....	18
Figure 3. Evolution mondiale du nombre d'épisodes toxiques liés aux phycotoxines. Les secteurs encadrés indiquent les zones où les toxines ont été détectées à des niveaux suffisants pour observer un impact sur la santé humaine ou sur l'environnement. Adapté de Van Dolah (2000).....	25
Figure 4. Structures chimiques des différentes phycotoxines appartenant au groupe des Imines cycliques.....	34
Figure 5. Structure des gymnodimines .....	36
Figure 6. <i>Karenia selliformis</i> , vue microscopique, cg : cingulum, sc : sulcus, aps : assise périphérique des chloroplastes, dn : dinocaryon dans la partie postérieure droite, ca : carène apicale. Echelle : 10µm .....	37
Figure 7. Cycle biologique général des dinoflagellés illustrant l'alternance entre la multiplication végétative, la reproduction sexuée et l'enkystement (Chenut, 1993).....	38
Figure 8. Structures des spirovides.....	40
Figure 9. <i>Alexandrium ostenfeldii</i> (photo Elisabeth NEZAN / IFREMER) (A) cellule végétative lugolée 50 x 50 µm (B) cellule végétative disséquée.....	42
Figure 10. Distribution globale mondiale des spirovides sur la base des populations d' <i>Alexandrium ostenfeldii</i> et des signalements de coquillages contaminés (Botana, 2008). .....	43
Figure 11. Schéma de synthèse illustrant le devenir des particules en suspension dans l'eau filtrée par le bivalve (Lassus <i>et al.</i> , 2002).....	45
Figure 12. Section de la glande digestive montrant l'absorption et la digestion intracellulaire du matériel provenant de l'estomac (flèches continues) et mouvements des débris vers l'extérieur (flèches discontinues). D'après Owen (1955). .....	47
Figure 13. (A) Tubule de la glande digestive (Dgt) des naissains d'huîtres <i>Crassostrea gigas</i> exposés à un mélange naturel de phytoplancton, les cellules de l'épithélium sont denses et les lumières des tubules sont bien définies indiquant une forme normale, une activité alimentaire et un métabolisme important. (B) tubules de la glande digestive exposés à un mélange naturel de phytoplancton, l'épithélium est aminci, indiquant un arrêt de l'alimentation. (C et D) Exemples d'une dilatation sévère des tubules de la glande digestive suite à une exposition expérimentale des huîtres à <i>Prorocentrum rathymum</i> . La flèche indique une exfoliation des cellules épithéliales au niveau de la lumière des tubules de la glande digestive. Echelle = 10 µm (d'après Pearce <i>et al.</i> , 2005). .....	48
Figure 14. Taux de détoxification journalier des toxines paralysantes par espèces de bivalves regroupées selon leurs cinétiques de décontamination. Résultats moyens (écarts type en gris clair) calculés d'après le modèle exponentiel de détoxification $y=y_0e^{-kt}$ (Adapté de Bricelj et Shumway, 1998) .....	52
Figure 15. Evolution de la concentration en GYM-A des palourdes provenant de la lagune de Boughrara entre 2000 et 2007 (Marrouchi <i>et al.</i> , 2010).....	56

## Partie II. RESULTATS &amp; DISCUSSIONS

CHAPITRE I. Croissance et toxicité de *Karenia selliformis*

Figure 16. GYM structure of A and its analogues B and C.....	70
Figure 17: Growth of <i>K. selliformis</i> in volume of 1,5 L at two temperatures and two salinities: 15 and 20°C, 36 and 44 psu.....	73
Figure 18. Culture extract of <i>K. selliformis</i> : analytical results in LC-MS/MS showing the presence of GYM A in all samples, and GYM B at trace levels (< 0.3 %). .....	77

**CHAPITRE II. Etude de la détoxification de palourdes contaminées par les gymnodimines**

Figure 19. Filtration rates ( $\text{mg}\cdot\text{h}^{-1} \text{ g dmw}^{-1}$ ) of clams exposed to (A) *Karenia selliformis* (contamination period) and (B) *Isochrysis galbana* or sea water during experiment 1 (detoxification period). Triangles ( $\Delta$ ): starved clams, squares ( $\blacksquare$ ): clams fed from the third day of detoxification, and circles ( $\bullet$ ): clams fed throughout detoxification.....94

Figure 20. Percentage of clams with opened siphon (siphon activity) exposed to (A) *Karenia selliformis* (contamination period) and (B) *Isochrysis galbana* or sea water during experiment 1 (detoxification period). Triangles ( $\Delta$ ): starved clams, squares ( $\blacksquare$ ): clams fed from the third day of detoxification, and circles ( $\bullet$ ): clams fed throughout detoxification. ....95

Figure 21. Biodeposits (total particulate matter production:  $\text{mg}\cdot\text{h}^{-1}\text{ind}^{-1}$ ) of clams exposed to *Isochrysis galbana* or sea water during detoxification period of experiment 1. Triangles ( $\Delta$ ): starved clams, squares ( $\blacksquare$ ): clams fed from the third day of detoxification, and circles ( $\bullet$ ): clams fed throughout detoxification.....95

Figure 22 Relative toxicity (%) between DG and other tissues during detoxification period according to clams receiving food during the experiment 1 .....96

Figure 23. Clam detoxification kinetics according to the different detoxification diets used in experiment 1. Triangles ( $\Delta$ ): starved clams, squares ( $\blacksquare$ ): clams fed from the third day of detoxification, and circles ( $\bullet$ ): clams fed throughout detoxification. Mean values  $\pm$  S.E. (3 chemical analysis for any point and diet used).....99

Figure 24. Clam detoxification kinetics according to the different diets used in experiment 2. Triangles ( $\Delta$ ): starved clams, squares ( $\blacksquare$ ): fed clams. Mean values  $\pm$  S.E. (3 chemical analysis for any point and diet used). ....99

Figure 25. Zone de récolte des palourdes et points d'échantillonnage de l'eau de mer .....107

Figure 26. Cinétique de détoxification de palourdes contaminées naturellement par *Karenia selliformis* pour différentes conditions expérimentales.....112

Figure 27. Distribution de la GYM (%) entre les différents organes de la palourde alimentée pendant la détoxification.....113

Figure 28. Variation de l'indice de condition des palourdes alimentées (AA, AAT, AATB) et des palourdes non alimenté (SA) pendant leurs détoxifications. ....114

Figure 29. Diverticule digestifs des palourdes contaminées in-situ par *Karenia selliformis* .....115

**CHAPITRE III. Croissance et toxicité d'*Alexandrium ostenfeldii***

Figure 30. *A. ostenfeldii* growth of in 450 ml flask culture and for six experimental conditions using three medium (L1, L1+ soil extract, f/2) and two temperatures (16 and 22°C). All values are means of triplicate cultures (n=3).....129

Figure 31. Cell concentrations and mean cell diameters of *Alexandrium ostenfeldii* during its growth in 100L-photobioreactor. ....130

Figure 32. Mean cell diameter of *Alexandrium ostenfeldii* during growth in 450 ml flask culture under different condition. ....130

Figure 33. Cell diameter spectrum in 450 ml flask culture after 16 days culture.....131

Figure 34. Cell diameter spectrum in photobioreactor culture after 34 days culture.....132

Figure 35. Relationship between cell concentration and intracellular spriolide content in photobioreactor and small volume batch cultures. ....133

Figure 36. Relationship between cell concentration and intracellular spriolide content in small volume batch cultures under three different culture media (L1, L1+ Soil Extract, f/2) (a) and at two temperatures (16 °C and 22°C) (b). ....134

Figure 37. Variation of total spriolide concentration in the cellular fraction per unit volume of culture ( $\mu\text{g}/\text{L}$ ) according to the cell concentration .....136

Figure 38. Variation of individual spriolide concentrations in the cellular fraction per unit volume of culture ( $\mu\text{g}/\text{L}$ ) during growth in small volume bath culture. ....137

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

---

Figure 39. Variation of individual spirolides concentrations in the cellular fraction per unit volume of culture ( $\mu\text{g/L}$ ) during growth in photobioreactor.....137

### CHAPITRE IV. Etude expérimentale de la détoxification des huîtres contaminées par les spirolides

Figure 40. Toxin profiles (expressed as %) of (a) *Alexandrium ostenfeldii* at days 1 & 3 of the experiment and (b) of digestive gland (DG) and remaining meat (RM) of oysters after 4 days exposure. ....154

Figure 41. SPXs detoxification of digestive gland (a) and remaining meat (b) from contaminated oysters. (Mean and S.D. of 3 analysis). ....154

Figure 42. Percentage of active digestive gland tubules during the experiment. From left to right: reference before exposure to *A. ostenfeldii*; after contamination with *A. ostenfeldii* and finally after 7 days of detoxification (gray bar referring to oyster fed and white bar referring to oyster without feeding). \* significant differences between treatment for levels ( $P < 0.05$ ). ....157

Figure 43. Intact cells of *Alexandrium ostenfeldii* found in faeces from *Crassostrea gigas* during exposure (scale bar = 20  $\mu\text{m}$ ). ....157

Figure 44. Inflammatory response in the intestine of *A. ostenfeldii*-exposed oysters. Aggregation of hemocytes in the connective tissue surrounding the intestine and hemocytes in diapodesis through the intestine epithelium. Hematoxylin-eosin stained paraffin sections (5  $\mu\text{m}$ ). (Ao) *A. ostenfeldii* in intestine (I) of *C. gigas*. (H) surrounding hemocytes and (Hd) hemocytes in diapodesis. ....160

Figure 45. Structure of digestive gland tubule, characteristic dilation shape of active tubule (A) inactive tubule (B). ....161

## TABLEAUX

### INTRODUCTION GENERALE

Tableau 1. Récapitulatif des familles de toxines, de leurs modes d'action, des organismes producteurs, des voies d'intoxication et des zones géographiques concernées. ....28

Tableau 2. Récapitulatif des données utilisées pour l'établissement des doses de référence en toxicité aiguë et des valeurs guide calculées et actuelles (FAO/WHO/IOC, 2005): .....32

Tableau 3. Diagnostic structural des différents macrocycles appartenant au groupe des imines cycliques (Botana, 2008). ....33

Tableau 4. Effets physiologiques d'*Alexandrium tamarense* administré à sept espèces de bivalves filtreurs (Bricelj *et al.*, 1990 ; Shumway et Cucci, 1987). ....46

Tableau 5. Dates et valeurs des concentrations les plus élevées en spirolides ( $\mu\text{g/kg}$  de chair), observées dans les mollusques du Bassin d'Arcachon pour la période 2005-2008 (Rapports d'analyses des toxines lipophiles sur trois points de suivi du réseau REPHY). ....57

### Partie II. RESULTATS & DISCUSSIONS

#### CHAPITRE I. Croissance et toxicité de *Karenia selliformis*

Tableau 6. Culture conditions, growth and toxin content of *K. selliformis* culture .....75

Tableau 7. Doses minimales mortelles (DMM) pour la souris exprimées en nombre de cellules de *K. selliformis* (extrait injecté aux souris), ainsi qu'en  $\mu\text{g GYM Kg}^{-1}$  de souris. ....76

Tableau 8. m/z transition conditions for GYM-A and GYM-B. m/z (mass to charge ratio). ....92

---

## **CHAPITRE II. Etude de la détoxification de palourdes contaminées par les gymnodimines**

Tableau 9. Summary of experimental conditions, exponential equation, comparison of bioassays and chemical analysis after detoxification period .....	98
Tableau 10. Jours d'échantillonnage pour le bioessai sur souris .....	109
Tableau 11. Conditions de transition pour la GYM-A et la GYM-B. m/z (rapport masse sur charge). .....	110
Tableau 12. Récapitulatif des conditions expérimentales, équations exponentielles, analyses chimiques, bioessais.....	112

## **CHAPITRE III. Croissance et toxicité d'*Alexandrium ostenfeldii***

Tableau 13. Structural components of spirolides found among <i>A. ostenfeldii</i> (strain CCMP1773) and transition conditions. m/z (mass to charge ratio). .....	128
Tableau 14. Maximum cell concentration and growth rate for <i>A. ostenfeldii</i> (CCMP1773) determined through the exponential phase of growth in batch and photobioreactor culture under different environmental conditions. ....	129
Tableau 15. Spirolide profile for <i>A. ostenfeldii</i> (CCMP1773) determined through growth in batch and photobioreactor culture under different environmental conditions. ....	135

## **CHAPITRE IV. Etude expérimentale de la détoxification des huîtres contaminées par les spirolides**

Tableau 16. m/z transition conditions for spirolides toxins. m/z (mass to charge ratio). .....	152
Tableau 17. Structures of known SPX toxin analogues and their concentration in <i>A. ostenfeldii</i> culture (strain CCMP1773). .....	155
Tableau 18. Spirolides concentrations in digestive gland and remaining meat during the detoxification period .....	156
Tableau 19. Intensity of pathological effects of <i>A. ostenfeldii</i> before and after 4 days exposure and 7 days detoxification in oyster digestive gland. Results are expressed as mean of stage intensity $\pm$ Confidence interval (n = 10), with stage 0 = absence or very light, 1= moderate and stage 2 = heavy. Significant differences between the two treatments with or without feeding are indicated by* when $p < 0.05$ . .....	158

## LISTE DES ABREVIATIONS

ACh: Acétylcholine

AD : Acide domoïque

AO : Acide okadaïque

ASP : Amnesic Shellfish Poisoning

AZAs : Azaspiracides

CFP: Ciguatera fish poisoning

CL-SM/SM: Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem.

CO<sub>2</sub> : Dioxyde de carbone

CR : Clearance Rate

CT : Chair totale

DGPA : Direction générale de la pêche et de l'aquaculture

DL50 : Dose létale provoquant 50% de mortalité.

DMM: Dose minimale mortelle

DMW: Dry meat weight

DSP : Diarrheic Shellfish Poisoning

DSW: Dry shell weight

DTXs : Dinophysistoxines

ESSDAF : Elevage Suivi Sanitaire et Détoxification des Animaux Filtreurs

FAO : Food and Agriculture Organization

FAT : Fast -Acting Toxins (toxines à action rapide)

FR : Filtration Rate

GD : Glande digestive

GYMs : Gymnodimines

HAB : Harmful Algal Bloom

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

IAFM : Intoxications Amnésiantes par les Fruits de Mer

IC : Indice de Condition

IDFM : Intoxications Diarrhéiques par les Fruits de Mer

IFREMER : Institut Française de recherche pour l'exploitation de la Mer

IG : *Isochrysis galbana*

INFM : Intoxications Neurologiques par les Fruits de Mer

INSTM : Institut Nationale des Sciences et Technologie de la Mer

---

Ip : Intrapéritonéale

IPFM : Intoxications Paralysantes par les Fruits de Mer

KS : *Karenia selliformis*

LC: Liquid chromatography

LC-MS/MS: Liquid chromatography coupled with mass spectrometry

Mg : Magnésium

MLD: Minimal lethal dose

MRM : Multiple Reaction Monitoring

NSP : Neurotoxic Shellfish Poisoning

PIM: Particulate Inorganic Matter

Pinnatoxines: PnTXs

POM: Particulate Organic Matter

PSP: Paralytic Shellfish Poisoning

Ptériatoxines: PtTXs

PTXs : Pectenotoxines

RC : Raceway

REPHY: Réseau de Surveillance du Phytoplancton et des Phycotoxines

RM: Remaining meat

Se: Sélénium

SPXs : Spirolides

STX : Saxitoxine

TPM: Total Particulate Matter

UE : Union européenne

YTXs : Yessotoxines

### INTRODUCTION GENERALE

La prolifération massive de phytoplancton en milieu marin, saumâtre ou dulçaquicole est un phénomène naturel dont la première description remonte à l'Antiquité (Hallegraeff, 1993). En effet, dans certaines conditions environnementales (température, salinité, richesse en nutriments, stabilité de la colonne d'eau, luminosité, etc.) et selon un processus biologique naturel, des micro-organismes photosynthétiques ont, pour certains, la capacité de se développer en très grand nombre, jusqu'à plusieurs millions de cellules par litre d'eau (Hallegraeff, 1993).

Les micro-algues sont préférentiellement consommées par des organismes filtreurs et notamment des mollusques bivalves. Certaines d'entre elles sont capables de synthétiser des métabolites secondaires toxiques qui sont alors libérés et accumulés chez ces consommateurs primaires. Ces derniers vont eux-mêmes servir de proies à un consommateur secondaire et ainsi de suite, permettant aux métabolites de s'accumuler dans les différents maillons de la chaîne alimentaire (Jiang *et al.* 2006 ; 2007).

Du fait de cette bioaccumulation, des mollusques bivalves ou des poissons phytophages peuvent se révéler toxiques en cas de consommation par l'homme.

Les mollusques bivalves, consommateurs primaires, sont des vecteurs importants dans la transmission des toxines aux autres maillons de la chaîne alimentaire, dont l'homme (Choi *et al.*, 2006 ; Kvittek *et al.* 2008). Par mesure de précaution, des seuils sanitaires spécifiques à chaque toxine ont été mis en place par les organismes nationaux et internationaux en charge d'assurer la sécurité alimentaire (directive européenne 91/492/EEC). Lorsque ces seuils sont atteints ou dépassés dans la chair des mollusques, les zones conchylicoles concernées sont fermées avec interdiction de vente des mollusques. Ceci peut entraîner, à terme, des pertes économiques et une méfiance du consommateur vis-à-vis des producteurs et de la grande distribution (Bricelj & Shumway 1998, Lassus *et al.*, 2005).

En marge des épisodes de toxicité attribués aux phycotoxines connues, on observe, depuis quelques années, une expansion mondiale de la contamination des mollusques bivalves par des toxines émergentes non réglementées. En général, la toxicité de ces composés est révélée chez l'animal mais pas chez l'homme, même si l'agent chimique responsable a pu être mis en évidence par des analyses chimiques de la chair des mollusques contaminés.

Face à une alerte sanitaire liée à la manifestation de ce type de contamination des mollusques bivalves, il est important d'étudier et de préciser la relation entre la présence de

ces phycotoxines et la réponse des bioessais utilisés pour les contrôles officiels d'une part et d'étudier leurs impacts sur la physiologie des mollusques bivalves concernés d'autre part.

C'est dans ce contexte que s'inscrit le travail de thèse présenté dans ce manuscrit et qui répond à deux problématiques, concernant deux régions géographiquement opposées du bassin méditerranéen:

### **La contamination endémique des palourdes *Ruditapes decussatus* par les gymnodimines dans le golfe de Gabès (sud de la Tunisie).**

Le golfe de Gabès (Figure 1) est situé sur la façade sud-est de la Tunisie, il renferme les îles de Kerkennah, Kneiss et Djerba et les lagunes de Boughrara et d'El Biben. Il occupe le tiers des côtes du pays et représente le centre du trafic maritime avec la plus importante infrastructure portuaire de Tunisie (Dammak-Zouari *et al.*, 2009). L'écosystème du Golfe de Gabès est caractérisé par l'abondance en zone côtière des herbiers à posidonies qui abritent de nombreuses espèces de poissons (Ben Mustapha *et al.*, 1999). En terme de ressources pêchées, le Golfe de Gabès représente plus de 60% des ressources ichtyologiques tunisiennes. En outre, il y a une production locale de palourdes qui est considérée comme la plus élevée à l'échelle de la Tunisie. Cependant, le Golfe de Gabès est aussi caractérisé par une surexploitation des ressources démersales, qui est à l'origine de la dégradation des écosystèmes benthiques. Enfin, il est soumis à une pression constante de la pollution industrielle (Turki *et al.*, 2006). Depuis les années 70, l'implantation d'industries de transformation de phosphate a contribué à la fragilisation de l'écosystème du Golfe (Baouendi *et al.*, 2005). De même, une importante régression de la biodiversité des peuplements phytobenthiques y a été constatée (Shili et Ben Maiz, 2006).

Dans ce golfe la production de palourde *Ruditapes decussatus* a été estimée en 1995 à 1500 tonnes dont 1200 tonnes ont été exportées (Hamza, 2003). Cette production fait vivre environ 6000 personnes (Dammak-Zouari *et al.*, 2009) et constitue également une source de devises pour le pays qui représente 7 millions d'euros par an (Hamza, 2003). Cependant, durant ces dernières années, la quantité de palourde destinée à l'exportation a été limitée à 400-600 tonnes / an (DGPA, 2005-2009) suite à :

i) la présence dans l'eau du Golfe du dinoflagellé toxique *Karenia selliformis* dont les proliférations sont devenues de plus en plus fréquentes et généralisées à plusieurs sites. Elles affectent en particulier la lagune de Boughrara et les côtes abritées (Hamza et El Abed, 1994 ; Turki et Hamza 2001 ; Hamza *et al.*, 1999 ; Hamza, 2003 ; Hansen *et al.*, 2004).



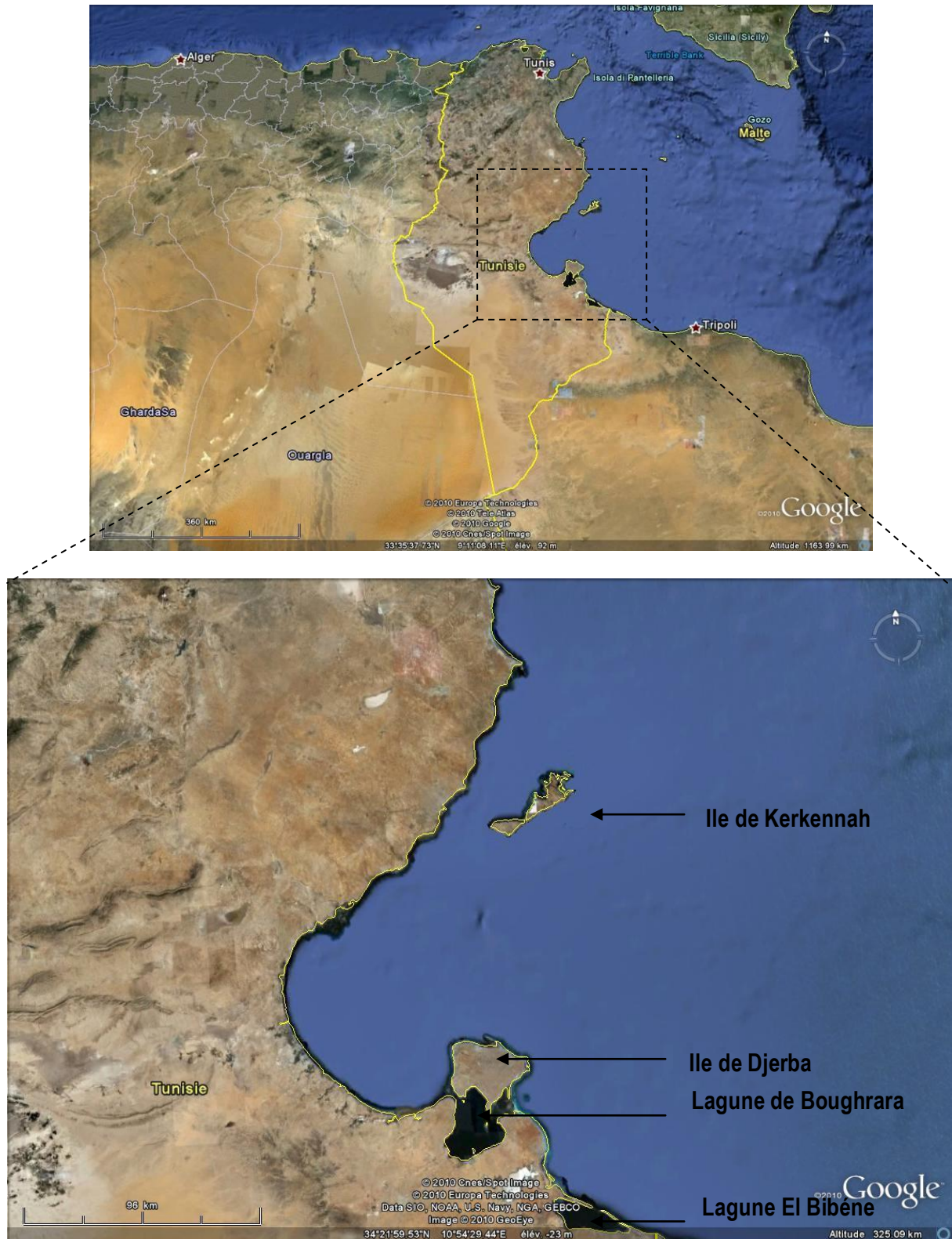


Figure 1. Carte du Golfe de Gabès (sud est de la Tunisie, source Google Earth 2010).

ii) la contamination des palourdes par ce dinoflagellé producteur de gymnodimine (Stirling *et al.*, 2002).

Au niveau international, aucun cas d'intoxication n'a été rapporté. Il n'existe pour l'instant aucun syndrome lié à la consommation par l'homme de coquillages contaminés par les gymnodimines.

La présence de la gymnodimine dans les coquillages de Nouvelle-Zélande n'est pas réglementée et ne donne donc pas lieu dans ce pays au retrait et à la destruction des coquillages contaminés. En revanche en Europe, le principe de précaution est appliqué à tout composé toxique entraînant un test diarrhéique (DSP) positif après injection intra péritonéale sur souris.

En Tunisie, les palourdes contaminées par la gymnodimine entrent dans cette catégorie, c'est-à-dire que ce composé injecté i.p chez la souris entraîne une mortalité de type DSP mais en un temps plus court, d'où le terme de 'Fast Acting Toxin' (FAT). Lorsque l'origine de la mortalité des souris n'est pas identifiée les autorités sanitaires procèdent néanmoins à une interdiction de la commercialisation et de l'exportation.

### **La contamination des huîtres *Crassostrea gigas* par les spirolides dans le bassin d'Arcachon (France)**

La production de l'industrie aquacole française s'élevait à 243 907 tonnes en 2004, ce qui la plaçait au deuxième rang européen (FAO, 2009). Cette production est dominée par les mollusques avec notamment 105 250 tonnes d'huîtres creuses (*Crassostrea gigas*) et 74 100 tonnes de moules (*Mytilus edulis*).

Le Bassin d'Arcachon (Figure 2) est situé dans le sud ouest de la France, sur la côte Aquitaine. Sa production moyenne annuelle en huître tourne autour de 10 000 à 13 000 tonnes, soit 7% de la production nationale de coquillages (Deltreil, 2006). Rappelons que la production ostréicole française est la première en Europe, en terme de tonnage. De plus, le bassin d'Arcachon est le plus grand centre européen de captage naturel de l'huître creuse (Deltreil, 2006).

Chaque année plus de 3 milliards de jeunes huîtres creuses (60 à 70 % des jeunes huîtres de bassin) sont expédiées dans les parcs ostréicoles de Bretagne, de Normandie, des Charentes, de Méditerranée, d'Espagne et d'Irlande.



**Figure 2.** Carte du Bassin d'Arcachon (sud ouest de la France, source Google Earth 2010).

En mai 2005, le bassin d'Arcachon a connu un épisode dramatique sur le plan de la production ostréicole. La commercialisation des huîtres avait été suspendue pendant plus de 5 semaines, suite à la présence de micro-algues toxiques et à la détection de phycotoxines au niveau des glandes digestives des coquillages (sur la base de bio-essais 'souris' positifs pour les toxines lipophiles).

Bien que le début de cet épisode ait pu être rattaché à la présence dans l'eau de micro-algues du genre *Dinophysis* et à l'accumulation d'acide okadaïque dans les hépatopancreas des huîtres, il n'en a pas été de même pour la fin de la période de contamination. Cette période fut en effet qualifiée d'épisode de "toxicité atypique" ou "toxicité d'origine inconnue", c'est-à-dire, selon la définition officielle : "un épisode de contamination des coquillages, révélé à travers une réponse toxique chez la souris en injection intra-péritonéale (*i.p.*), dont l'origine ne peut pas être expliquée par la présence de toxines connues habituellement recherchées" (Maurer *et al.*, 2010).

Bien que les spirolides soient déréglementées (pas de seuil de toxicité pouvant entraîner un effet sur l'homme) la présence simultanée de spirolides et d'autres toxines lipophiles réellement diarrhéiques (Acide okadaïque, Dinophysistoxines) mais à des concentrations inférieures au seuil sanitaire pouvait laisser craindre des effets de synergie. Sur la base de tests 'souris' positifs ces interactions, si elles existaient, devaient être prises en compte.

Cependant un travail réalisé récemment sur la base d'un mélange de toxines (Acide okadaïque, spirolides et pecténotoxines) injecté par voie *i.p.* aux souris n'a pas permis de conclure sur un effet de synergie entre ces toxines (Dubois et Amzil, 2009). Les résultats positifs du test souris ont conduit à plusieurs reprises les autorités sanitaires à interdire par arrêté préfectoral la commercialisation des coquillages du bassin d'Arcachon.

Des épisodes de toxicité atypique ont été à nouveau décrits en 2007 et 2008, perturbant considérablement la commercialisation des huîtres et des moules du bassin d'Arcachon et entraînant de vives protestations de la part des conchyliculteurs.

Dans la mesure où une relation directe entre la présence de spirolides dans les huîtres et les moules du bassin d'Arcachon et l'obtention des résultats positifs sur test souris n'est pas validée, il est important d'étudier l'interaction de ces toxines avec les mollusques bivalves.

**Les huîtres et les palourdes sont les deux principales espèces produites en tonnages respectivement en France et en Tunisie et seront, de ce fait, retenues comme modèles dans ce travail de thèse.**

Les pertes économiques engendrées par la fermeture des zones sont inquiétantes pour les professionnels de la conchyliculture. Il est donc important de pouvoir trouver des solutions adéquates et judicieuses afin de limiter les périodes d'arrêt de vente. Plusieurs pistes sont envisageables pour résoudre ce problème.

Avant la collecte : La surveillance et la détection des espèces toxiques au niveau du milieu naturel (dépistage).

Après la collecte : Pour cela, il serait possible, sous couvert d'un agrément des autorités sanitaires, de i) déplacer les mollusques bivalves dans des bassins à terres dès l'apparition des premières cellules phytoplanctoniques toxiques ii) détoxifier artificiellement des coquillages contaminés dans des systèmes contrôlés « à terre ».

C'est cette seconde piste qui a été choisie comme objectif appliqué pour cette étude. L'influence des stress thermiques et osmotiques, des chocs électriques, de la chute du pH et de l'ajout de chlore a déjà été testée par plusieurs auteurs (Bricelj et Shumway, 1998 ; Fernandez *et al.*, 2003). Aucune de ces méthodes n'a permis jusqu'ici d'accélérer la vitesse de détoxification de mollusques bivalves contenant des phycotoxines. L'influence des paramètres environnementaux et intrinsèques a été mise en évidence par Blanco *et al.* (1997) et par Morono *et al.* (2001). Ces auteurs ont souligné que la prise en compte de la température, de la salinité et de la présence de matière en suspension sur des moules contenant des toxines paralysantes permettait d'améliorer les cinétiques de contamination et de détoxification (Lassus, 1999 ; Lassus *et al.*, 2002 ; 2005 ; Guéguén *et al.*, 2008a ; 2008b).

Cependant, pour d'autres auteurs, l'impact de la nourriture et de la température reste encore controversé (Madenwald, 1985 ; Marcaillou-Le Baut *et al.*, 1993 ; Blanco *et al.*, 1997 ; Bricelj et Shumway, 1998 ; Blanco *et al.*, 1999 ; Svensson, 2003 ; Duinker *et al.*, 2007).

**Considérant les types de toxines étudiés et quelques résultats préliminaires, notre travail portera sur l'influence de l'alimentation dans la détoxification des mollusques.**

L'influence de cette variable n'est pas le seul paramètre à prendre en compte pour pouvoir optimiser la cinétique de détoxification. **Il est important de bien comprendre l'impact physiologique des micro-algues contenant les toxines émergentes au niveau des mollusques.** Différents auteurs ont en effet démontré que le phytoplancton toxique affecte la physiologie des mollusques bivalves qui le consomment (Shumway *et al.*, 1985; Shumway et Cucci, 1987; Wikfors et Smolowitz, 1993; 1995; Luckenbach *et al.*, 1993; Bricelj *et al.*, 2005, Galimany *et al.*, 2008a ; 2008b ; 2008c, Hégaret *et al.*, 2007 ; 2008a ; Haberkorn *et al.*, 2010) pouvant ainsi influencer les processus de détoxification. Cette démarche permettra donc de

comprendre les procédés d'accumulation et de fixation de ces toxines dans les tissus des bivalves contaminés et d'utiliser ces données pour optimiser le processus de détoxification.

**Les objectifs** de cette thèse sont donc :

- i) de **maîtriser les conditions de culture et de production toxinique** chez *Karenia selliformis* et *Alexandrium ostenfeldii*. Cette étape est indispensable pour réaliser ensuite des contaminations expérimentales afin d'être indépendant du caractère aléatoire des proliférations toxiques en zones côtières. Elle nécessite également, après caractérisation des facteurs d'optimisation de la biomasse et de la toxicité des micro-algues en faibles volumes de culture, de développer et de standardiser des modes de culture en masse du type bioréacteur
- ii) **d'étudier l'impact de l'alimentation sur la détoxification** artificielle des palourdes contaminées par des gymnodimines et des huîtres contaminées par des spirolides
- iii) **d'étudier l'impact physiologique de ces neurotoxines** au niveau des organes accumulateurs des coquillages en faisant un suivi histologique de l'appareil digestif des coquillages contaminés puis décontaminés.

Le mémoire de thèse s'organise en trois parties.

**Une première partie résumera les données bibliographiques** disponibles en ce qui concerne les neurotoxines phytoplanctoniques, leurs diversités chimiques et les micro-organismes qui les produisent ainsi que l'état actuel des connaissances sur l'interaction phycotoxines / mollusques

Comme la contamination expérimentale des mollusques bivalves s'effectue par l'intermédiaire d'une exposition à des micro-algues toxiques, ce chapitre fera aussi l'état des lieux des connaissances sur les conditions de culture de ces micro-algues. Les facteurs optimisant leur croissance et leur production toxinique seront donc décrits.

**La deuxième partie** présentera les résultats obtenus, rédigés sous la forme de plusieurs publications. Le premier chapitre de cette partie est consacré à l'étude de la croissance et de la toxicité de *K. selliformis*, le second chapitre présente les résultats de la détoxification des palourdes contaminées par les gymnodimines en suivant deux approches: la contamination expérimentale et naturelle. Les deux derniers chapitres de cette partie sont consacrés en

premier lieu à l'étude de la croissance et de la toxicité d'*A. ostentfeldii*, suivi d'un second chapitre présentant les résultats obtenus sur les cinétiques de détoxification des spirovides ainsi que les réponses physiologiques des huîtres contaminées.

**La troisième et dernière partie** présente une synthèse générale des connaissances apportées par ce travail sur les aspects abordés, ainsi que les conclusions et perspectives qui en découlent.

## **Partie I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE**

### **1. Les phycotoxines**

Les phycotoxines sont des métabolites secondaires synthétisés par quelques espèces appartenant à plusieurs classes de phytoplancton : principalement les Dinophyceae (dinoflagellés) et les Bacillariophyceae (diatomées), mais aussi les Raphidophyceae, les Prymnesiophyceae et les Cyanophyceae.

Certaines phycotoxines sont libérées dans le milieu (exotoxines) et exercent des effets délétères directs sur la flore ou la faune : certaines d'entre elles endommagent la membrane cellulaire, d'autres ont des effets inhibiteurs spécifiques sur des populations phytoplanctoniques susceptibles de rentrer en compétition. D'autres phycotoxines restent dans les cellules planctoniques (endotoxines), s'accumulent dans les chaînes alimentaires et parviennent jusqu'à l'homme *via* les produits marins consommés : ce sont elles qui constituent un risque potentiel pour la santé humaine et un fléau pour l'économie conchylicole.

#### **1.1. Efflorescences de phytoplancton toxique**

Le phytoplancton est constitué d'un ensemble hétérogène de micro-algues unicellulaires majoritairement photosynthétiques, vivant en suspension dans l'eau et soumises aux mouvements des masses d'eau. Les cellules peuvent être solitaires ou groupées en colonies.

Les organismes phytoplanctoniques sont majoritairement autotrophes, mais certaines espèces, principalement des dinoflagellés, peuvent être hétérotrophes, de façon temporaire ou permanente.

Parmi les 5000 espèces microalgales planctoniques marines recensées à travers le monde, 5 à 7 % ont été identifiées comme responsables d'efflorescences algales massives (Sournia, 1995). Les espèces productrices de toxines sont moins nombreuses, 60 à 78 espèces ayant été recensées (soit environ 2 % de la «microflore pélagique mondiale»). Parmi ces espèces, 90% sont des flagellés, et plus particulièrement des dinoflagellés (Smayda, 1997).

Les intoxications humaines associées à la consommation de coquillages sont connues depuis plusieurs siècles et en divers endroits du globe, la première mention la mieux documentée étant l'intoxication par des toxines paralysantes (PSP) d'une partie de l'équipage de l'expédition menée par le Capitaine Vancouver sur la côte ouest de l'actuel Canada, en 1793 (Kao, 1993).



Depuis les années soixante-dix, les événements toxiques associés à la prolifération des micro-algues toxiques ont progressé en terme d'occurrence et de répartition spatiale (Figure 3).

L'ensemble de ces phénomènes est aujourd'hui rassemblé sous l'appellation internationale : « Harmful Algal Bloom » ou « HAB ».

Au cours de ces efflorescences, les concentrations cellulaires observées peuvent dépasser plusieurs millions de cellules par litre d'eau.

Le déterminisme de ces efflorescences fait l'objet d'un grand nombre de travaux et il semblerait qu'un certain nombre de paramètres conditionne leur apparition, en particulier les teneurs en azote et phosphore, la température, l'éclairement et le pH (Mur *et al.*, 1999).

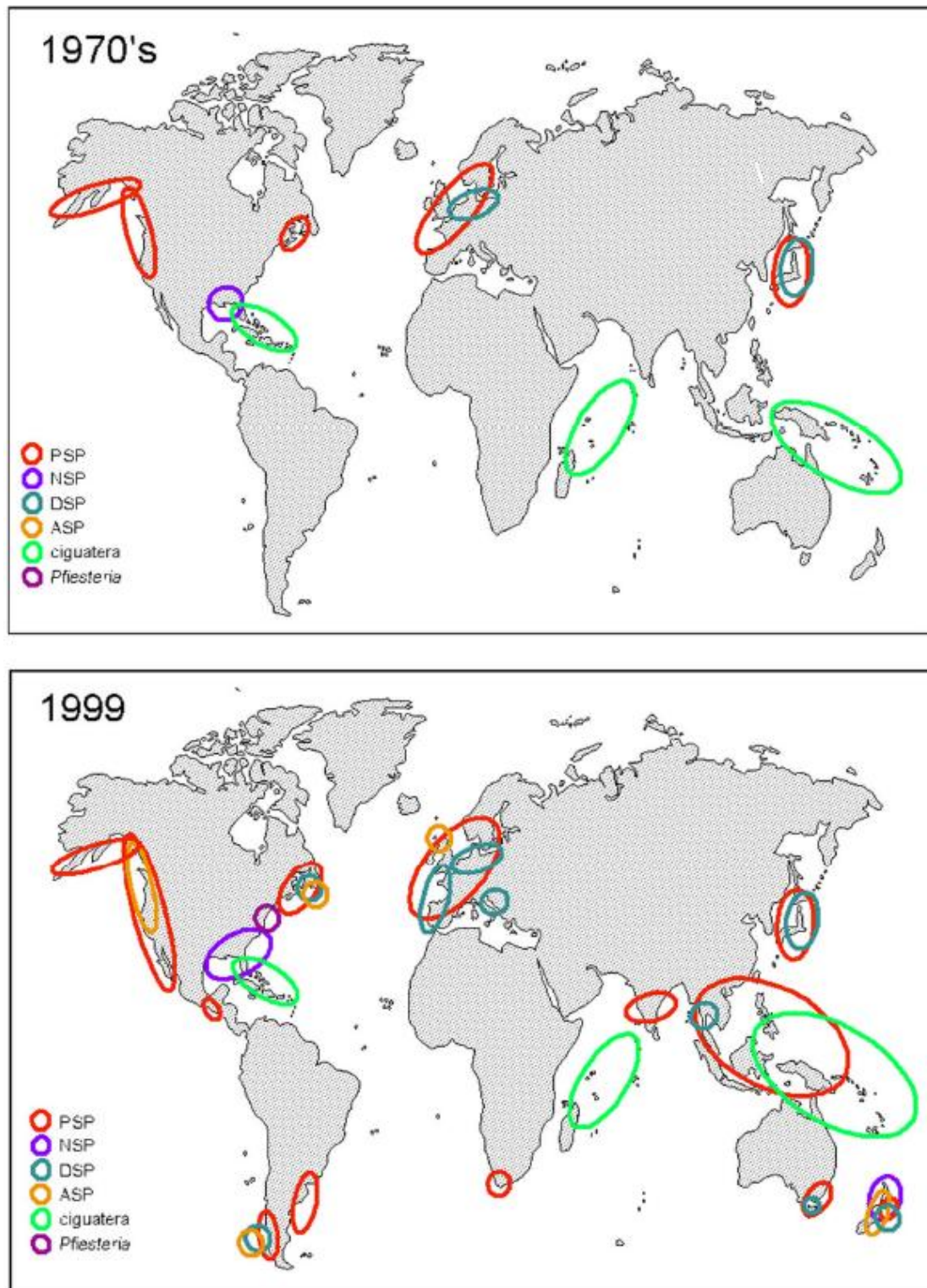
Par ailleurs, ces phénomènes naturels semblent être accentués par d'autres facteurs tels que : i) l'eutrophisation du milieu en lien avec les activités humaines (Anderson *et al.*, 2002 ; Maso et Garcés, 2006) ; ii) l'introduction accidentelle de kystes temporaires ou de résistance via les eaux de ballasts ; iii) le transfert de mollusques d'une zone à une autre (Hallegraeff, 1993).

Les efflorescences de micro-algues sont le plus souvent mono- ou oligospécifiques et elles induisent une diminution de la biodiversité du phytoplancton local (Crossetti *et al.*, 2008). De plus, une compétition directe ou indirecte pour la lumière et les nutriments peut entraîner une modification profonde de la répartition verticale avec des accumulations de matériel biologique sur les zones de discontinuité physique (pycnoclines, nitratoclines, thermoclines). Ce phénomène peut entraîner, outre des effets 'd'ombrage', des anoxies touchant les couches plus profondes (Paerl et Huisman, 2008). Ainsi, des anoxies, résultant de la décomposition des micro-algues par des bactéries hétérotrophes sont parfois associées aux efflorescences, provoquant une forte mortalité des populations de poissons (Hudnell, 2008).

## **1.2. Classification des phycotoxines**

Habituellement, on classe les phycotoxines sur la base i) des effets et des symptômes observés chez l'homme. Dans ce cas on mentionnera le type d'intoxication alimentaire causé par les fruits de mer, ii) des propriétés chimiques et des particularités structurales des toxines ainsi que de leurs cibles cellulaires. Dans ce cas on mentionnera la famille de composés chimiques à laquelle appartient la toxine marine considérée.

Nous reprenons ci-dessous les éléments essentiels de cette typologie uniquement pour les phycotoxines s'accumulant dans les mollusques bivalves.



**Figure 3.** Evolution mondiale du nombre d'épisodes toxiques liés aux phycotoxines. Les secteurs encadrés indiquent les zones où les toxines ont été détectées à des niveaux suffisants pour observer un impact sur la santé humaine ou sur l'environnement. Adapté de Van Dolah (2000).

### 1.2.1 Classification selon les symptômes observés chez l'homme

- **Intoxications Paralysantes par les Fruits de Mer (IPFM)**

Il s'agit du cas d'intoxications le plus grave lié à la consommation de produits marins en raison du potentiel léthal des toxines paralysantes (PSP= Paralytic Shellfish Poisoning) et de leur distribution globale dans le monde. Environ 2000 cas d'intoxication sont déclarés par an avec un taux de mortalité moyen de 15% (Van Dolah, 2000; Bricelj et Shumway, 1998).

Les toxines responsables de l'IPFM forment une famille d'une vingtaine de molécules chimiquement proches, dont la toxine de base est la saxitoxine (STX). Ces toxines sont produites principalement par les dinoflagellés du genre *Alexandrium*, et par les espèces *Gymnodinium catenatum* et *Pyrodinium bahamense* var. *compressum*.

Après ingestion de coquillages contaminés par des toxines de type PSP, les symptômes observés sont : une paresthésie (trouble de la sensibilité) brutale des lèvres, du visage, des bras puis des jambes, puis une paralysie musculaire pouvant atteindre les muscles respiratoires, et, dans les cas les plus graves, un collapsus cardio-vasculaire entraînant la mort du patient.

- **Intoxications Amnésiantes par les Fruits de Mer (IAFM)**

Les toxines amnésiantes (ASP= Amnesic Shellfish Poisoning) ont été identifiées en 1987, suite à une intoxication alimentaire massive (145 intoxications recensées, dont quatre mortelles) liée à la consommation de moules récoltées dans l'estuaire de l'île-du-Prince Édouard à Cardigan Bay au Canada. (Bates *et al.*, 1989).

La toxine responsable de ces IAFM est l'acide domoïque synthétisé par des diatomées appartenant au genre *Pseudo-nitzschia*. Il est à noter que d'autres espèces de diatomées produisent, en culture, l'acide domoïque, comme *Amphora coffaeiformis*, et *Nitzschia navis-varingica*.

Après ingestion de coquillages contaminés par des toxines de type ASP, les symptômes observés sur l'homme sont de type gastro-entériques (diarrhées et vomissements entre 2 et 24 h après ingestion), mais également neurologiques avec céphalée, confusion, désorientation, notamment des pertes de mémoire (Smith *et al.*, 1993) ; ces toxines peuvent, dans les cas les plus graves, entraîner la mort (Teitelbaum *et al.* 1990).

- **Intoxications Neurologiques par les Fruits de Mer (INFM)**

Les intoxications liées à l'ingestion de neurotoxines présentes dans des coquillages (NSP= Neurotoxic Shellfish Poisoning) ont été observées dans les régions côtières de la

Floride, des Caraïbes et de la Nouvelle Zélande. Aucune intoxication de ce type n'a été détectée jusqu'ici en Europe ou sur les côtes méditerranéennes.

Les toxines responsables de ces cas d'intoxications sont les brevétocines produites par le dinoflagellé *Karenia brevis* (= *Gymnodinium breve*).

Les INFM peuvent être provoquées par l'ingestion d'organismes contaminés. Dans ce cas, les toxines affectent le tractus gastro-intestinal ainsi que le système nerveux périphérique et central. Non seulement les consommateurs humains sont concernés mais aussi les prédateurs de fin de chaîne alimentaire comme les mammifères marins (Anderson et White, 1992).

Les INFM peuvent aussi résulter de l'inhalation d'aérosols contenant des cellules dégradées de micro-algues toxiques. La symptomatologie est alors davantage du type bronchite asthmatique et rhinorrhées.

- **Intoxications Diarrhéiques par les Fruits de Mer (IDFM)**

La présence des toxines diarrhétiques (DSP= Diarrhetic Shellfish Poisoning) est observée dans de nombreuses régions du monde : une grande partie de l'Europe de l'ouest, le Canada (baie du Saint Laurent), le Chili, l'Afrique du sud, l'Inde, le Japon, la Nouvelle Zélande (UNESCO, 2004).

La principale toxine responsable de ces cas d'intoxication est l'acide okadaïque produit par les dinoflagellés appartenant aux genres *Dinophysis* et *Prorocentrum*.

Des symptômes gastro-intestinaux tels que des douleurs abdominales, des diarrhées, des nausées et vomissements (de 30 minutes à 2 heures après ingestion), sont associés à ces intoxications.

### 1.2.2 Classification selon les familles de toxines

Le nombre de nouvelles phycotoxines identifiées ne cesse d'augmenter et les données relatives à leurs toxicités et leurs implications dans des cas d'intoxication humaines restent à déterminer.

Récemment, une division basée sur les propriétés physico-chimiques a été suggérée par un groupe de travail international (FAO/WHO/IOC, 2005).

Nous avons repris dans cette classification (tableau 1) les principaux groupes de toxines, leurs mécanismes d'action, les organismes qui les produisent, les voies d'intoxication et les zones géographiques concernées.

Seul le groupe des imines cycliques (Gymnodimines et Spirolides) sera développé dans le paragraphe suivant en raison de son importance dans le présent travail.

**Tableau 1.** Récapitulatif des familles de toxines, de leurs modes d'action, des organismes producteurs, des voies d'intoxication et des zones géographiques concernées.

Groupe	Mécanismes d'action des toxines	Organismes producteurs	Voie d'intoxication	Zones géographiques
<b>Imines cycliques</b> -Gymnodimines -Spirolides	-Liaison avec les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine -Liaison avec les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine	- <i>Karenia selliformis</i>  - <i>Alexandrium ostenfeldii</i>	Mollusques bivalves (palourdes, huîtres, moules...)	- Amérique du Nord , Afrique du Sud Nouvelle-Zélande, Tunisie, Koweït. - Europe, Canada, Etats Unis, , Nouvelle-Zélande, Océan pacifique
<b>Acide domoïque</b>	Activation des récepteurs glutamates	<i>Pseudo-nitzschia spp</i>	Bivalves (moules, pectinidés, huîtres...) et poissons (anchois)	Europe, Canada, Mer du Nord, Nord USA,
<b>Acide okadaïque et dinophysistoxines</b>	Inhibition des protéines phosphatases	<i>Dinophysis spp.</i> <i>Prorocentrum spp.</i>		Europe, Japon, Australie, Amérique du nord
<b>Azaspiracides</b>	nd	<i>Azadinium spinosum</i>		Irlande, France
<b>Pecténotoxines</b>	nd	<i>Dinophysis spp.</i>		Europe, Australie, Japon
<b>Yessotoxines</b>	nd	<i>Protoceratium reticulatum</i> <i>Lingulodinium polyedrum</i>	Bivalves (moules, huîtres, clams, et autres espèces spécifiques des régions concernées.	France, Italie, Japon, Nouvelle-Zélande
<b>Brevetoxines</b>	Activation des canaux sodique voltage dépendants (Na <sup>+</sup> )	<i>Karenia brevis</i>		Floride, Japon, Mexique, Nouvelle-Zélande
<b>Saxitoxines</b>	Blocage des canaux sodiques voltage dépendants (Na <sup>+</sup> )	<i>Alexandrium spp</i> <i>Gymnodinium catenatum</i> <i>Pyrodinium bahamense var. compressum</i>		Europe, USA, Amérique du Sud

nd: non déterminé

### **1.3. Réglementation des phycotoxines et méthodes d'analyse des toxines lipophiles**

Depuis 1991, l'union européenne (UE) impose une surveillance des mollusques et des crustacés en ce qui concerne la présence de phycotoxines. C'est la Directive du Conseil 91/492/CEE fixant les règles sanitaires régissant la production et la mise sur le marché de ces organismes marins, qui énonce les principes de la réglementation européenne relative aux phycotoxines.

Nous avons récapitulé (tableau 2) les données utilisées pour établir les valeurs toxicologiques de référence pour les effets aigus, ainsi que les valeurs seuils préconisées dans les guides (FAO/WHO/IOC, 2005). Par manque de données épidémiologiques concernant les contaminations humaines durant les épisodes toxiques et vu la faible toxicité des gymnodimines et des spirolides par voie orale, ces toxines restent non réglementées, à l'heure actuelle, à l'échelle internationale.

Dans le contexte de sécurité sanitaire visant à protéger le consommateur, il est important de pouvoir prendre en compte la toxicité globale correspondant à la somme des effets toxiques de tous les composés présents dans un échantillon pour la comparer aux valeurs seuils en vigueur. Depuis de nombreuses années, la sécurité sanitaire du consommateur est donc assurée par une démarche réglementaire basée sur des bioessais sur souris dont l'un des avantages est d'estimer la toxicité *in vivo* d'un échantillon. Des méthodes telles que la LC-MS/MS (Holmes *et al.*, 1999 ; Gonzalez *et al.*, 2000 ; Suzuki et Yasumoto, 2000), des tests immunologiques (Huang *et al.*, 1996 ; Vale et Sampayo, 1999), de cytotoxicité (Crocchi *et al.*, 2001) et des tests basés sur l'activité cellulaire tels que l'inhibition de la protéine phosphatase PP2A (Mountfort *et al.*, 2001) ont également été développés pour la détection des toxines DSP.

#### **1.3.1 Les toxines lipophiles**

Les toxines lipophiles se caractérisent par leur importante affinité avec les solvants organiques tels que le méthanol. Ces toxines comprennent :

Les Toxines lipophiles réglementées : il s'agit de la famille de l'acide okadaïque et des dinophysistoxines (DTXs) et de la famille des azaspiracides (AZAs) qui sont responsables d'un syndrome diarrhéique chez l'homme. On doit leur rajouter les familles des yessotoxines (YTXs) et des pecténotoxines (PTXs) qui sont des toxines pour lesquelles le risque chez l'homme est mal connu mais a été évalué à partir de données toxicologiques expérimentales chez l'animal.

Les Toxines lipophiles non réglementées : il s'agit des neurotoxines à action létale très rapide chez les souris après injection intra-péritonéale. Les effets toxiques chez l'homme ne sont pas connus et, à ce jour, aucun cas clinique n'a été déclaré. Les gymnodimines et les spiroïdes qui font l'objet de ce présent travail sont les deux principales toxines bioaccumulables par les mollusques bivalves.

### **1.3.2 Le bioessai sur souris**

Le bioessai sur souris basé sur le protocole de Yasumoto *et al.* (1978) est largement utilisé pour détecter les toxines lipophiles dont les toxines DSP.

Le bioessai présente l'avantage de pouvoir détecter en routine la présence d'une toxicité nouvelle ou émergente ou de nouveaux analogues d'une toxine déjà connue. Il permet d'obtenir une réponse semi-quantitative et donne des indications sur la nature des toxines impliquées par l'observation des symptômes de la souris.

En revanche, le bioessai sur souris est plus long qu'une méthode analytique telle que la LC-MS/MS et il peut donner des «faux positifs» en raison i) de la présence de substances qui sont toxiques chez la souris par voie intra-péritonéale mais qui ne sont pas toxiques par voie orale chez l'homme : c'est le cas des acides gras libres (Takagi *et al.*, 1984 ; Kogawa *et al.*, 1989), ii) de la forte toxicité sur souris des toxines appartenant à la famille des imines cycliques (e.g gymnodimine et spiroïde). Cette toxicité intervient dans un temps très court et peut interférer avec les toxines lipophiles réglementées puisque ces dernières sont extraites à partir du même solvant organique, ce qui complique ainsi l'interprétation des résultats.

De plus la souche, le sexe, l'âge et le poids de la souris peuvent également influencer sensiblement sur les résultats du test (Stabell *et al.*, 1992; Vieites *et al.*, 1996).

Enfin, ces dernières années, des difficultés d'interprétation des résultats du bioessai sur souris ont été constatées. Elles sont liées au nombre croissant de familles de toxines lipophiles répondant à ce test. C'est pourquoi la décision 2002/225/CE établit la possibilité d'utiliser des méthodes complémentaires pour la détection des familles de toxines lipophiles. L'une des approches retenues est basée sur l'utilisation de la LC-MS/MS.

### **1.3.3 Analyses chimiques par CL-SM/SM**

La LC-MS/SM est basée sur un couplage entre la chromatographie liquide et la spectrométrie de masse en tandem.

La chromatographie en phase liquide (liquid chromatography, LC) est une technique d'analyse quantitative, qualitative et séparative principalement utilisée dans le domaine de la

chimie analytique. Ce type de chromatographie repose sur la séparation de composés entraînés par un liquide (phase mobile) à travers un solide (phase stationnaire) qui est placé dans une colonne chromatographique.

La spectrométrie de masse (mass spectrometry, MS) est une technique physique d'analyse permettant de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse, et de caractériser leur structure chimique. Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge ( $m/z$ ).

L'utilisation de la LC-MS/MS pour la détection et la quantification des toxines lipophiles a progressé rapidement et un nombre croissant de scientifiques considèrent que cette technique est un moyen efficace comme méthode alternative au test souris puisqu'elle garantit plus de sélectivité, de sensibilité, de fiabilité et de rapidité (Amandi *et al.*, 2002; Ciminiello *et al.*, 2002; Holland *et al.*, 2002; Hess *et al.*, 2003; Vale, 2004; MacNabb *et al.*, 2005; Stobo *et al.*, 2005; Hashimoto *et al.*, 2006).

En France, la surveillance des toxines lipophiles au niveau des broyats des coquillages est appliquée par LC-MS/MS en utilisant une méthode multitoxines (Amzil *et al.*, 2007) englobant :

#### Les Toxines lipophiles réglementées

- L'acide okadaïque (AO)
- Les dinophysistoxines (DTXs) : DTX1, DTX2, DTX3
- Les pectenotoxines (PTXs) : PTX1, PTX2
- Les azaspiracides (AZAs) : AZA1, AZA2, AZA3
- Les yessotoxines (YTXs) : YTX, Homo YTX, 45-OH YTX, Homo 45-OH YTX

#### Les Toxines lipophiles non réglementées.

- Les gymnodimines (GYMs)
- Les spirolides (SPXs)



**Tableau 2.** Récapitulatif des données utilisées pour l'établissement des doses de référence en toxicité aiguë et des valeurs guide calculées et

Groupe de toxine	DMENO (1) <sup>a</sup> DSENO (2) (µg/kg pc)	Facteur de sécurité données humaines (H), données sur l'animal (A)	Dose provisoire de toxicité aiguë sur l'homme	Concentrations maximales autorisées (basée sur la consommation de 100g (1), 250g (2) et 380g (3))	Seuils de salubrité (Actuellement en vigueur dans certains pays)
<b>Azaspiracides</b>	0,4 (1)	10 (H)	0,04 µg/kg 2,4 µg/adulte	0,024 mg/kg de chair de mollusque (1) 0,0096 mg/kg CM (2) 0,0063 mg/kg CM (3)	0,16 mg/kg
<b>Brevetoxines</b>			n.d		0,8 mg/kg pour la PBTx-2
<b>Imines cycliques</b>			n.d		
<b>Acides domoïques</b>	1,000 (1)	10 (H)	100 µg /kg 6 mg/adulte	60 mg/kg CM (1) 24 mg/kg CM (2) 16 mg/kg CM (3)	20 mg/kg
<b>Acides okadaïques</b>	1,000 (1)	3 (H)	0.33µg/kg 20 µg/adulte	0,2 mg/kg CM (1) 0,08 mg/kg CM (2) 0,05 mg/kg CM (3)	0,16 mg/kg
<b>Pectenotoxines</b>			n.d		0,16 mg OA equivalent/kg
<b>Saxitoxines</b>	2 (1)	3 (H)	0,7 µg/kg 42 µg/adulte	0,42 mg/kg CM (1) 0,17 mg/kg CM (2) 0,11 mg/kg CM (3)	0,8 mg/kg
<b>Yessotoxines</b>	5,000 (2)	100 (A)	50 µg/kg 3 mg/adulte	30 mg/kg CM (1) 12 mg/kg CM (2) 8 mg/kg CM (3)	1 mg/kg

actuelles (FAO/WHO/IOC, 2005):

<sup>a</sup>DMENO= dose minimale avec effet nocif observé ; DSENO= dose sans effet nocif observé<sup>b</sup> sur la base d'un poids corporel (pc) adulte de 60 kg

#### 1.4. Les imines cycliques

Les imines cycliques sont des toxines marines émergentes lipophiles caractérisées par la présence d'un composé polyéther macrocyclique. Elles recouvrent un ensemble de composés neurotoxiques regroupant plusieurs familles distinctes (Figure 4): les gymnodimines, les spiroïdes, les pinnatoxines, les pteriatoxines et les prorocentrolides (Molgo *et al.*, 2007).

Les imines cycliques ont été associées aux biotoxines marines pour la première fois par Tindall *et al.* (1984) pour décrire des composés inconnus causant la mort rapide des souris (en moins de quinze minutes) suite à une injection intra-péritonéale d'extraits méthanoliques de *Prorocentrum concavum*.

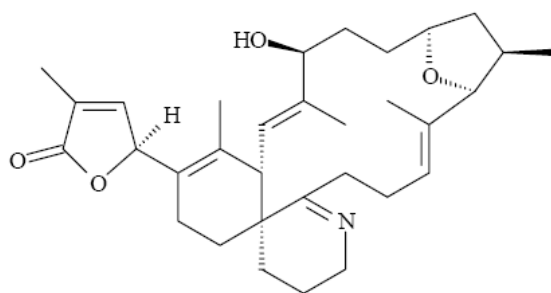
Toutes ces imines macrocycliques possèdent des caractéristiques chimiques communes (tableau 3).

**Tableau 3.** Diagnostic structural des différents macrocycles appartenant au groupe des imines cycliques (Botana, 2008).

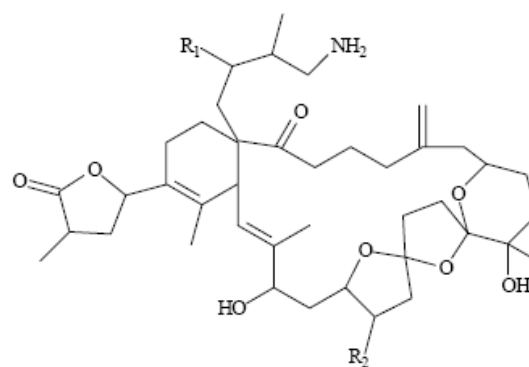
	Gymnodimines	Spiroïdes	Pinnatoxines Pteriatoxines	Prorocentrolides
Lactone	oui	oui	non	oui
Imines cycliques	6	7	7	6
Fonctions ether	1	3	5	1
Fonction hydroxyle	1/2	2	2	4
Nombre d'insaturation	2	2	1	4

Outre leurs structures chimiques, ces toxines présentent deux autres points communs qui sont i) leur potentiel toxique important et rapide chez la souris lorsqu'elles sont injectées par voie intra-péritonéale, et ii) leur faible toxicité par voie orale.

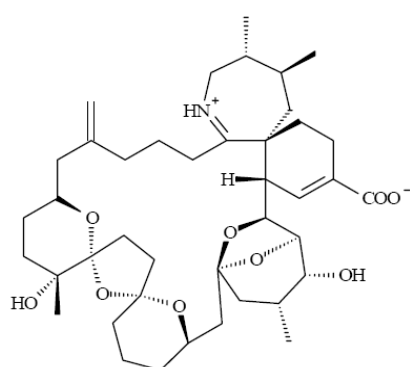
De plus toutes les études toxicologiques menées sur ces toxines ont montré que les symptômes observés chez la souris injectée *i.p* sont similaires et de type neurologique (Hu *et al.*, 1996; Cembella *et al.*, 2000a,b; Takada *et al.*, 2001a,b). Ces symptômes sont : une pilo-érection, une diminution des mouvements et du comportement exploratoire, une hyper extension du dos, une baisse de la coordination, une queue courbée en arc et des convulsions. La respiration abdominale est caractéristique, indiquant une détresse respiratoire.



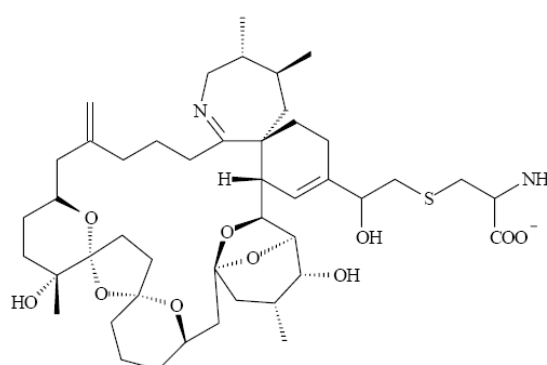
**Gymnodimine**



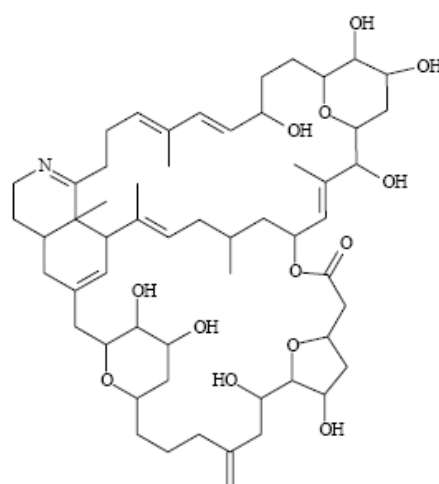
**Spirolide**



**Pinnatoxine**



**Ptériatoxine**



**Prorocentrolide**

**Figure 4.** Structures chimiques des différentes phycotoxines appartenant au groupe des Imines cycliques.

La mort des souris traitées survient rapidement (entre 3 et 20 minutes après l'injection), ce qui a permis de qualifier les spirolides de toxines à action rapide (Fast Acting Toxins = FAT).

Une autre caractéristique des 'FATs' est leur groupement fonctionnel pharmacophore, rarement rencontré chez les autres phycotoxines : l'imine cyclique. A titre d'exemple, Stewart *et al.* (1997) ont montré que la réduction de la fonction imine de la gymnodimine en fonction amine (formation de la gymnodamine) entraîne une baisse importante de la toxicité de ce nouveau composé. Cette information est confirmée par le fait que les spirolides E et F qui possèdent une amine secondaire à la place de l'imine, en raison de l'ouverture du cycle, sont biologiquement inactives (Hu *et al.*, 1996).

Les premières études menées sur le groupe des imines cycliques dans le but d'élucider leur mode d'action montrent une action au niveau de certains canaux ioniques. Ainsi, la gymnodimine présente un potentiel d'activation des canaux  $\text{Na}^+$ , bien qu'il soit plus faible que celui des brevétoxines (Seki *et al.*, 1996) ; quant à la pinnatoxine A et aux spirolides 13-desMeC, ce sont des activateurs du canal  $\text{Ca}^{2+}$ .

## 1.4.1 Gymnodimine

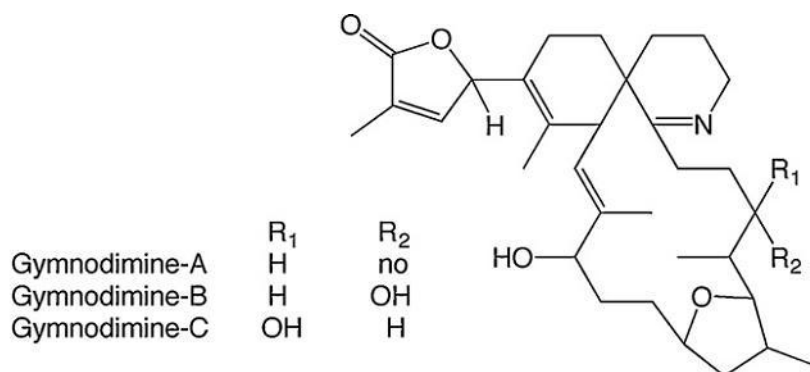
### 1.4.1.1 Propriétés physico-chimiques

La gymnodimine est un dérivé pentacyclique complexe (Figure 5) comportant un motif buténolide et une imine cyclique caractéristique des toxines à action rapide. La GYM-A, de formule brute  $\text{C}_{32}\text{H}_{45}\text{NO}_4$ , a été isolée à partir d'extraits d'huîtres et de cellules de *Karenia selliformis* (Seki *et al.*, 1995).

Les analogues de la GYM (GYM-B et GYM-C), isolés à partir d'une culture de cette même micro-algue, ont une formule brute  $\text{C}_{32}\text{H}_{45}\text{NO}_5$  (Miles *et al.*, 1999a; Miles *et al.*, 2000a; Miles *et al.*, 2000b). Ils se distinguent de la GYM-A par la présence d'un groupement hydroxyle porté par le carbone C-18. Ce groupement est responsable de la distinction entre la GYM-B et la GYM-C. Ces analogues se différencient par la position de cet hydroxyle dans l'espace (Miles *et al.*, 2000b; Miles *et al.*, 2003).

Comme la stabilité d'une toxine influe sur son potentiel toxique, plusieurs travaux ont été menés afin de déterminer les conditions de stabilité de la GYM avec une attention toute particulière pour les deux groupements fonctionnels: l'imine cyclique et le groupement buténolide. Miles *et al.* (1999b) notent que la GYM est stable dans des conditions acides ou en solution dans le méthanol. D'autre part, le groupement imine n'est pas hydrolysé à pH

acide pendant au moins deux semaines. Inversement, dans des conditions faiblement acides ou alcalines la GYM devient instable (Miles *et al.*, 2000b).



**Figure 5.** Structure des gymnodimines

A titre d'exemple, Mountford *et al.* (2006) ont montré que l'extraction de la gymnodimine (intracellulaire et extracellulaire) est réalisable par acidification de l'échantillon (pH à 5,5 ajusté par ajout de l'acide acétique à 1%) en utilisant l'acétone à 5% et l'acétonitrile à 10 % pour extraire les gymnodimines.

Différentes valeurs ont été rapportées dans la littérature en ce qui concerne les doses létales sur souris de la GYM par voie *ip* : Seki *et al.* (1996) et Stewart *et al.* (1997) estiment la dose létale minimum à 450 µg/kg et 700 µg/kg respectivement, alors que Miles *et al.* (1999b) rapportent que la dose létale médiane (DL<sub>50</sub> ; dose entraînant la mort de 50% des animaux testés) est de 96 µg/kg. Les études menées afin d'évaluer le potentiel toxique de la GYM par voie orale (pour des doses allant de 755 à 7500 µg/kg) chez la souris n'ont pas permis d'observer d'effets toxiques (Biré *et al.*, 2002 ; Munday *et al.*, 2004). Aucune donnée n'est pour l'instant disponible concernant le potentiel toxique des GYM-B et GYM-C à cause de la mise en évidence récente de ces analogues, et des quantités faibles extraites à partir des cellules ne permettant pas d'effectuer une évaluation toxicologique.

Kharrat *et al.* (2008) ont récemment mis en évidence que la GYM-A se liait avec une forte affinité aux récepteurs nicotiques de l'ACh, ce qui explique sa neurotoxicité par voie *i.p.*

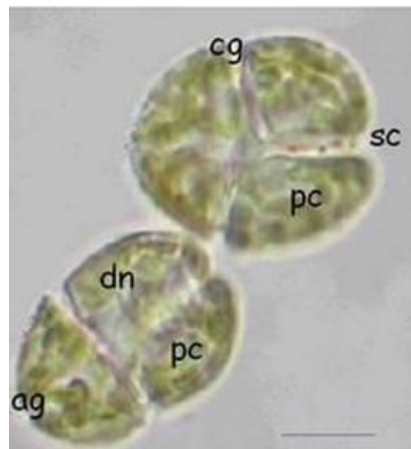
#### 1.4.1.2 Organisme producteur et répartition géographique

*Karenia selliformis* est le seul producteur connu de gymnodimines (Seki *et al.*, 1995; Miles *et al.*, 2000a).

Le dinoflagellé *K. selliformis* a d'abord été identifié en tant que *Gymnodinium selliforme*. C'est une espèce appartenant à la classe des Dinophycées, à l'ordre des Gymnodiniales, à la famille des Gymnodiniacées et au genre *Karenia*.

Ce genre comprend plus de 200 espèces. Récemment *Gymnodinium selliforme*, *Gymnodinium breve*, *Gymnodinium brevisulcatum* et *Gymnodinium mikimotoi* ont été renommées selon un nouveau nom de genre : *Karenia*. De ce fait *Gymnodinium selliforme* a été rebaptisée *Karenia selliformis* (Hansen *et al.*, 2004)

Les cellules de *Karenia selliformis* (Figure 6) mesurent en moyenne 25µm de longueur, 20µm de largeur et 10µm d'épaisseur.

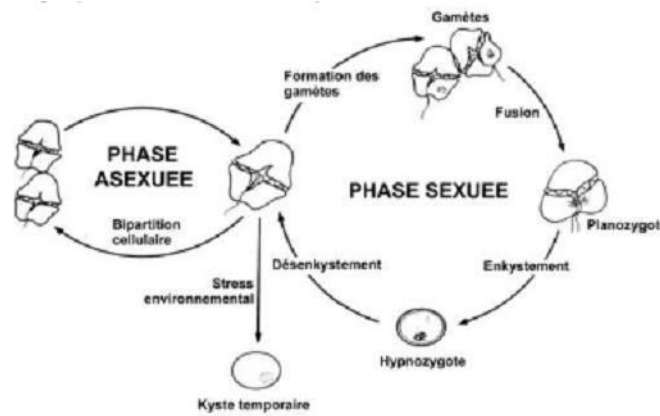


**Figure 6.** *Karenia selliformis*, vue microscopique, cg : cingulum, sc : sulcus, aps : assise périphérique des chloroplastes, dn : dinocaryon dans la partie postérieure droite, ca : carène apicale. Echelle : 10µm

Le cycle de développement de *K. selliformis* se divise en deux phases (Figure 7):

Une phase sexuée pendant laquelle il y a formation des gamètes à partir des cellules végétatives. La fusion des gamètes donne un zygote à paroi renforcée et très résistante, appelé hypnozygote ou kyste. Il peut rester enfoui dans les sédiments pendant une période plus ou moins longue avant de germer et de libérer à nouveau des cellules flagellées planctoniques. La formation de kystes de résistance (resting cyst) résultant de la fusion des gamètes est liée au déclin des proliférations estivales.

Une phase asexuée caractérisée par une simple division binaire des cellules végétatives haploïdes. Par ailleurs, le passage d'une phase à l'autre ou même à une forme de résistance (kyste temporaire) est souvent sous la dépendance des facteurs du milieu. En effet en cas de conditions défavorables, un dinoflagellé peut s'enkyster (par simple déhiscence de la thèque) et supporter quelques temps les modifications du milieu ambiant avant de redonner une cellule végétative.



**Figure 7.** Cycle biologique général des dinoflagellés illustrant l'alternance entre la multiplication végétative, la reproduction sexuée et l'enkystement (Chenut, 1993).

Le dinoflagellé toxique *K. selliformis* a été décrit en Nouvelle-Zélande suite à plusieurs événements du type 'El Nino' (1992, 1993, 1997, 1998) qui ont engendré des blooms de dinoflagellés dominés par des espèces de *Gymnodinium*. Ainsi en 1994, *Gymnodinium selliforme* était rendu responsable de la contamination des huîtres (*Ostrea chilensis Philippi*) du détroit de Foveaux au sud de la Nouvelle-Zélande, ce qui a permis la découverte d'une nouvelle toxine: la gymnodimine (Seki *et al.*, 1995).

En 1999, *K. selliformis* a été observée au niveau des côtes du Koweït comme étant responsable d'eaux colorées et probablement de la mort de poissons à une concentration de  $6 \times 10^6$  cellules/litre (Heil *et al.*, 2001).

En Tunisie, les premiers blooms sont identifiés en 1988 (*Karenia selliformis* syn : *Gymnodinium cf. nagasakiense*) (Turki et Hamza, 2001). En 1991, Guerlorget signale la présence, sur les côtes du sud tunisien, d'une micro-algue toxique d'abord identifiée comme *Gyrodinium aureolum*, puis, en 1994, comme *Gymnodinium sp.* (Arzul *et al.*, 1995). L'année 1994 fut une année particulière en raison de mortalités massives (1 à 2 tonnes) d'organismes marins (anguilles, seiches, labridés, muges, sparidés...etc.) enregistrées aussi bien dans la lagune de Boughrara (sud de la Tunisie) que dans les stations aquacoles avoisinantes (Hamza et El Abed, 1994). Cette mortalité coïncidait avec l'apparition d'eaux colorées, l'espèce phytoplanctonique responsable étant un *Gymnodinium sp.*, très semblable à *Karenia nagasakiense*, et que l'on retrouvait à toutes les stations du Golfe de Gabès. Les plus fortes concentrations cellulaires enregistrées étaient de l'ordre de  $40 \text{ à } 60 \times 10^6$  cellules/l (Hamza *et al.*, 1999 ; Hamza, 2003 ; Hansen *et al.*, 2004). Ce n'est qu'en 2004 que cette micro-algue a été re-décrite en tant que *Karenia selliformis* par Haywood *et al.* (2004).

Les proliférations de *K. selliformis* ont été associées à la présence dans les mollusques d'une toxine atypique, la gymnodimine, qui a été décrite par de nombreux auteurs (Seki *et*

*al.*, 1995, Miles *et al.*, 2000a,b ; 2003 ; Munday *et al.*, 2004, Mountfort *et al.*, 2006). Par ailleurs, la relation entre *Karenia* et la GYM a été confirmée par les travaux de Stirling *et al.* (2002) qui portaient sur la contamination de bivalves tunisiens. De même, Biré *et al.* (2002) ont noté l'accumulation de cette toxine dans les glandes digestives de palourdes tunisiennes.

Depuis les événements de 1994 la répartition de *Karenia selliformis*, dans le golfe de Gabès (Dammak-Zouari *et al.*, 2009), s'est étendue à tout le pourtour du golfe avec toutefois une omniprésence remarquable dans la lagune de Boughrara (Hamza *et al.*, 1999 ; Hamza *et al.*, 2001 ; Hamza 2003). Outre cette omniprésence et la fréquence régulière de ses proliférations, cette micro-algue produit des kystes de résistance, également toxiques, et qui sont aussi fréquents que la forme végétative (Hamza, 2003). Ces kystes se rencontrent généralement lors des premières semaines suivant l'apparition des pics à *Karenia* et la germination n'a lieu que 3 à 5 mois plus tard. Selon les données du réseau de surveillance tunisien REPHY<sup>1</sup>, les dinoflagellés sont responsables de 89 % des efflorescences observées, et l'espèce *Karenia selliformis* détient à elle seule 64% des occurrences.

En outre, les travaux de Turki *et al.* (2006), Drira *et al.* (2008) et Dammak-Zouari *et al.* (2009) ont précisé les caractères d'abondance propres à l'ordre des Gymnodiniales dont *Karenia selliformis* fait partie. Ils ont mis en évidence la fréquence et la régularité des efflorescences ainsi que les crises dystrophiques qui affectent la lagune de Boughrara depuis 1991-1994 et confirment ainsi la fragilité de cet écosystème.

## 1.4.2 Spirolides

### 1.4.2.1 Propriétés physico-chimiques

La famille des spirolides (SPX) comprend plusieurs analogues (Figure 8) dont la structure de base est composée de six ou sept cycles parmi lesquels un buténolide (ou  $\gamma$ -lactone), un cyclohexène et trois noyaux éther.

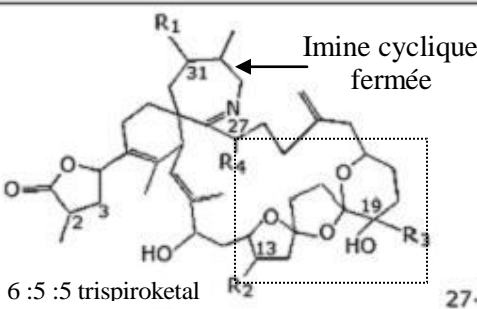
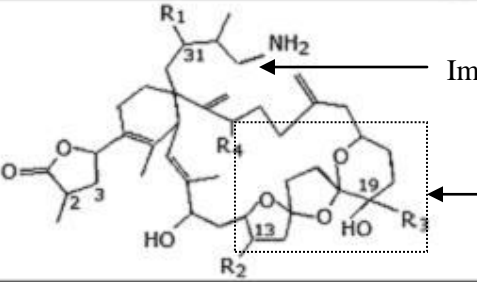
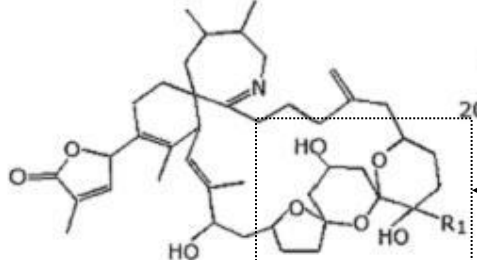
Les SPXs sont solubles dans les solvants organiques tels que le méthanol, l'éthanol et l'acétone. Par conséquent, elles sont facilement extraites à partir de la glande digestive et de la chair des mollusques (Otero *et al.*, 2010a ; 2010b). Certains auteurs effectuent deux extractions avec une solution aqueuse à 80% de méthanol à partir des glandes digestives des moules (Aasen *et al.*, 2005 ; 2006). De plus ce mélange a également été utilisé pour extraire les spirolides à partir des cellules d'*A. ostenfeldii* (Aasen *et al.*, 2006).

---

<sup>1</sup> Réseau de Surveillance du Phytoplancton et des Phycotoxines



Parmi les SPXs, on distingue trois groupes de toxines en fonction de la présence ou non de la fonction imine cyclique. Le premier groupe comporte les spirolides A, B, C et D de formules brutes respectives  $C_{42}H_{61}NO_7$ ,  $C_{42}H_{63}NO_7$ ,  $C_{43}H_{63}NO_7$ ,  $C_{43}H_{65}NO_7$  et  $C_{42}H_{61}NO_7$  et d'autres dérivés (13-desMeC, 13,19-didesMeC, 13-desMeD, 27-OH-13,19-didesMeC) qui possèdent une imine cyclique active comprenant six carbones (Hu *et al.*, 1995; Hu *et al.*, 2001) et une fonction cyclique 6 :5 :5-trispiroketal (Otero *et al.*, 2010b) (Figure 8). Le deuxième groupe comporte les spirolides E et F ( $C_{42}H_{63}NO_8$  et  $C_{42}H_{65}NO_8$  respectivement) qui sont des métabolites obtenus à partir des mollusques bivalves caractérisés par une imine cyclique ouverte (Figure 8) et hydrolysée en cétoamine, ce qui induit une diminution de l'activité biologique de ces molécules (Hu *et al.*, 1996).

	Spirolide	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	Δ	MW
 <p>Imine cyclique fermée</p> <p>6 :5 :5 trispiroketal</p>	A	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	Δ <sup>2,3</sup>	691.5
	B	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H		693.5
	C	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	Δ <sup>2,3</sup>	705.5
	D	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H		707.7
	13-desMeC	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	H	Δ <sup>2,3</sup>	691.5
	13,19-didesMeC	CH <sub>3</sub>	H	H	H	Δ <sup>2,3</sup>	677.5
	13-desMeD	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	H		693.5
	27-OH-13,19-didesMeC	CH <sub>3</sub>	H	H	CH <sub>3</sub>	Δ <sup>2,3</sup>	691.5
 <p>Imine cyclique ouverte</p> <p>6 :5 :5 trispiroketal</p>	E	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	Δ <sup>2,3</sup>	709.5
	F	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H		711.5
	G	H					
 <p>5 :5 :6 trispiroketal</p>	20-MeG	CH <sub>3</sub>					705.5

**Figure 8.** Structures des spirolides.

Le dernier groupe est composé de la spirolide G et de son dérivé 20-MeG caractérisé par une imine cyclique active et une fonction cyclique 5 :5 :6-trispiroketal (Figure 8) jamais observée chez d'autres groupes de toxines marines (Otero *et al.*, 2010b).

Les spirolides se caractérisent également par la présence d'une double liaison entre les carbones C<sub>2</sub> et C<sub>3</sub> (Δ<sup>2,3</sup>) au niveau du cycle buténolide, et par les groupements chimiques (H

ou CH<sub>3</sub>) substitués au niveau des carbones C<sub>13</sub> et C<sub>31</sub>. La 13-desMeC, de formule brute C<sub>42</sub>H<sub>61</sub>NO<sub>7</sub> se distingue des autres spirolides par l'absence d'un groupement méthyle en C<sub>13</sub>, remplacé par un hydrogène (Hu *et al.*, 2001).

L'administration par voie intra-péritonéale à des souris de doses létales de spirolides ou d'extrait d'*A. ostensfeldii* ou d'extraits de bivalves contaminés provoque des symptômes d'ordre neurologique qui apparaissent quelques minutes après l'injection (Richard *et al.*, 2001). Chez la souris, les valeurs de la DL<sub>50</sub> pour la spirolide C (forme 13-desMeC) sont de 6,5 µg kg<sup>-1</sup>, 157 µg kg<sup>-1</sup> ou 500 µg kg<sup>-1</sup> après que la toxine ait été respectivement injectée par voie *i.p.*, administrée par gavage ou ajoutée dans l'alimentation (Munday *et al.*, 2004). Gill *et al.* (2003) ont montré que chez le rat et la souris l'injection de doses létales n'entraîne aucune atteinte macroscopique et histologique de la rétine, du foie, du cœur, des reins, des poumons, de la rate et du tractus gastro-intestinal. En revanche, la SPX 13-desMeC affecte spécifiquement certaines régions du système nerveux central, notamment le tronc cérébral et l'hippocampe avec une intensité liée à la quantité de toxine administrée (Gill *et al.*, 2003).

L'injection d'atropine ou d'autres antagonistes des récepteurs cholinergiques diminue le temps de survie des animaux injectés avec le SPX 13-desMeC alors que l'injection d'agonistes (méthacholine) de ces mêmes récepteurs augmente ce temps de survie (Richard *et al.*, 2001). Enfin, des analyses transcriptionnelles réalisées à partir des cerveaux d'animaux traités ont montré que l'expression des gènes codant pour certaines sous-unités des récepteurs nicotiques (RnACh $\alpha$ 2 et RnACh $\beta$ 4) et muscariniques (RmACh1, RmACh4 et RmACh5) est augmentée chez les animaux traités (Gill *et al.*, 2003). Bien que le mode d'action des SPXs ne soit pas encore élucidé, un certain nombre d'éléments tendent à montrer que ces toxines agiraient au niveau des récepteurs cholinergiques nicotiques et/ou muscariniques (Molgo *et al.*, 2007; 2008).

#### 1.4.2.2 Organisme producteur et répartition géographique

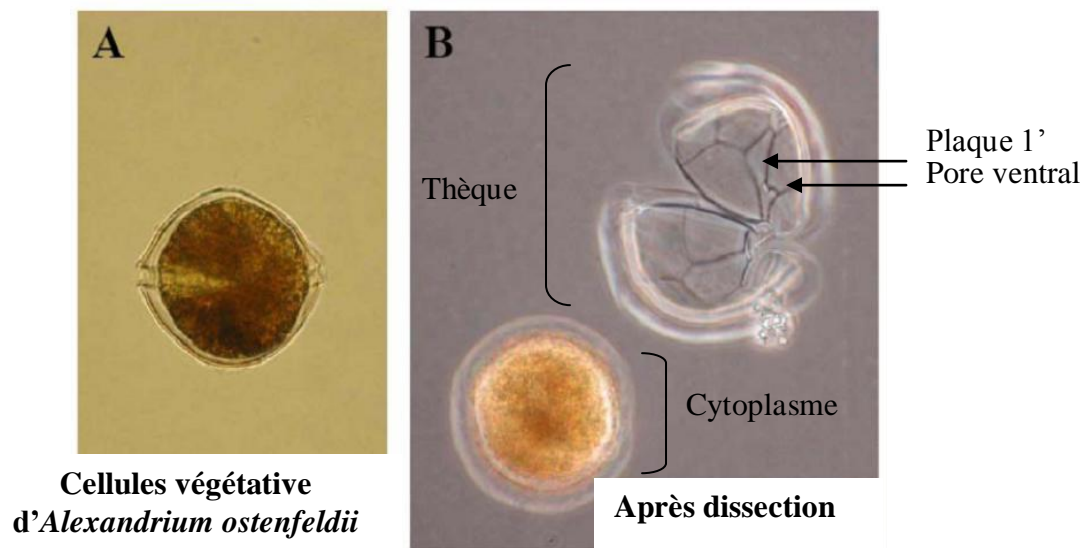
*Alexandrium ostensfeldii* est un dinoflagellé, appartenant à l'ordre des Péridiniales, à la famille des Goniodomataceae et au genre *Alexandrium*.

*A. ostensfeldii* (Figure 9) est une espèce planctonique estuarienne dont la taille des cellules est comprise entre 40-56 µm de longueur et 40-50 µm de largeur (Balech, 1995; Balech et Tangen, 1985; Konovalova, 1991; Larsen et Moestrup, 1989; Steidinger et Tangen, 1996). Comme les autres espèces appartenant au genre *Alexandrium*, les cellules d'*A. ostensfeldii* sont entourées d'une thèque pecto-cellulosique constituée de plaque soudées entre

elles. La plaque apicale 1' possède un pore ventral d'une forme particulière permettant de discriminer *A. ostenfeldii* d'autres espèces d'*Alexandrium*.

Ce dinoflagellé est caractérisé par sa capacité à se comporter comme une espèce mixotrophe (Jacobson et Anderson, 1996; Gribble *et al.*, 2005) et à produire des composés allélopathiques (Hansen *et al.*, 1992; Tillmann *et al.*, 2007).

La reproduction d'*A. ostenfeldii* s'effectue également de deux manières : i) reproduction asexuée par fission binaire et ii) cycle sexuel avec fusion des gamètes donnant naissance à un planozygote (Jensen et Moestrup, 1997).



**Figure 9.** *Alexandrium ostenfeldii* (photo Elisabeth NEZAN / IFREMER) (A) cellule végétative lugolée 50 x 50 µm (B) cellule végétative disséquée.

*A. ostenfeldii* a d'abord été décrit comme spécifique des eaux froides (Okolodkov et Dodge, 1996). Il est également présent dans les eaux tempérées mondiales (Figure 10). *A. ostenfeldii* a été décrit pour la première fois en Islande (Paulsen, 1904) et par la suite il a été signalé dans les eaux du nord de l'Europe (Balech et Tangen, 1985 ; Moestrup et Hansen, 1988 ; John *et al.*, 2003b), au Danemark (Moestrup et Hansen, 1988), en Arctique (Okolodkov et Dodge, 1996) et en mer de Sibérie orientale (Konovalova, 1991), mais aussi dans le sud de l'Europe, sur les côtes de l'Espagne (Fraga et Sanchez, 1985).

On le rencontre également en Amérique du nord, plus précisément au Canada dans le Golfe du Saint-Laurent (Balech, 1995 ; Levasseur *et al.*, 1997 ; Cembella *et al.*, 2000b ; Gribble *et al.*, 2005), et au sud de la Nouvelle-Écosse (Cembella *et al.*, 2000a), Enfin, *A. ostenfeldii* a été identifié en Nouvelle-Zélande (MacKenzie *et al.*, 1996a,b).



**Figure 10.** Distribution globale mondiale des spirolides sur la base des populations d'*Alexandrium ostenfeldii* et des signalements de coquillages contaminés (Botana, 2008).

Ce dinoflagellé se trouve généralement en faible concentration cellulaire dans le milieu naturel. A ce jour, aucune prolifération exceptionnelle d'*A. ostenfeldii*, n'a été reportée en Europe, excepté peut-être en Belgique (s'il est confirmé que le bloom de *Pyrodinium phoneus* décrit par Woloszynska et Conrad 1939 n'est pas assimilable à *Alexandrium excavatum* mais plutôt à *A. ostenfeldii*).

En France, parmi les phycotoxines lipophiles détectées au niveau du bassin d'Arcachon, il y a eu des spirolides. Ces nouvelles toxines ont été mises en évidence pour la première fois en France en 2005 dans les huîtres du bassin d'Arcachon (Amzil *et al.*, 2007). L'espèce phytoplanctonique *Alexandrium ostenfeldii* est considérée comme responsable de la production des spirolides. Elle a été observée dans 3 stations de prélèvement à des concentrations faibles, soit de l'ordre de 10-60 cellules/l (données Ifremer/Quadrige/Rephy ; Maurer *et al.*, 2010).

Il faut préciser que cette espèce n'est pas facilement identifiable en microscopie optique. Avant 2005, ce taxon avait été signalé en quelques occasions (Maurer *et al.*, 2010) et depuis 2007, il n'est pas répertorié dans le Bassin d'Arcachon.

## 2. Relation entre micro-algues toxiques et mollusques bivalves

La contamination des mollusques bivalves par les micro-algues toxiques s'effectue à travers le processus alimentaire qui englobe l'ingestion de l'algue toxique, sa digestion et son assimilation (Silvert et Cembella, 1995). Cependant, le comportement alimentaire des mollusques bivalves pourrait être modifié comme un moyen de protection vis à vis des micro-algues toxiques qui peuvent affecter leur physiologie (Shumway *et al.*, 1985; Shumway et Cucci, 1987; Wikfors et Smolowitz, 1993; 1995; Luckenbach *et al.*, 1993; Bricelj *et al.*, 2005) et par conséquent influencer leurs cinétiques de détoxification.

### 2.1. Comportement alimentaire des mollusques bivalves face aux micro-algues toxiques

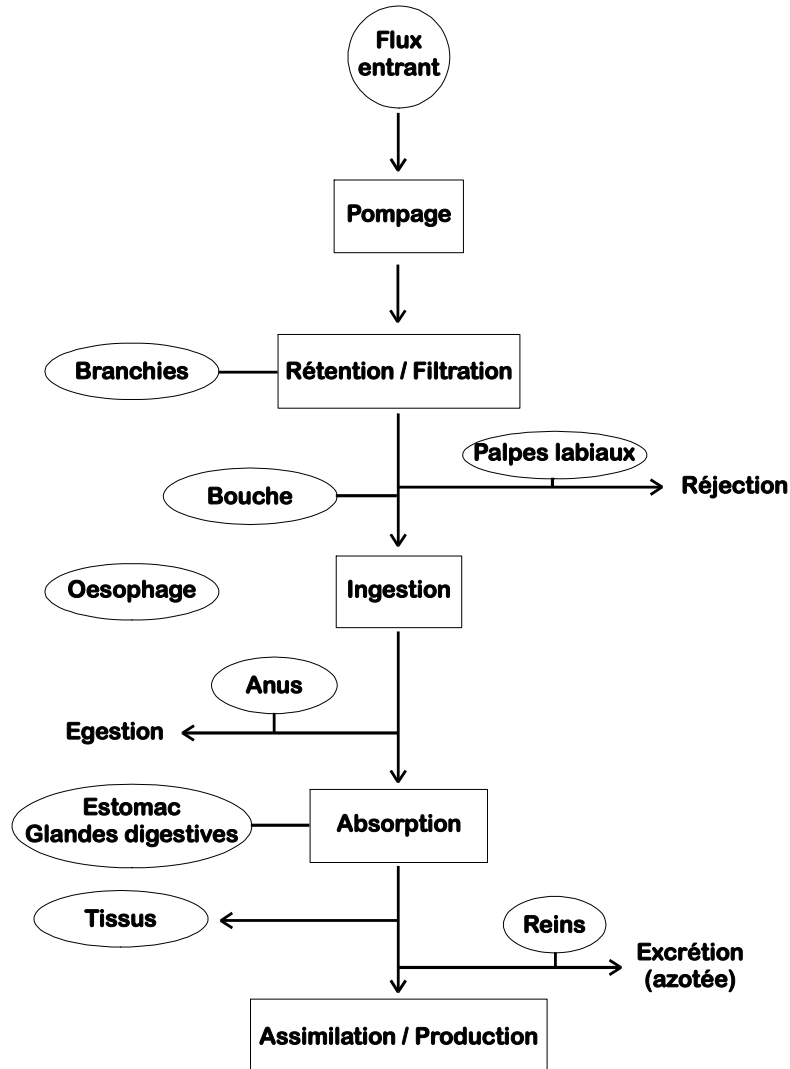
Les mollusques bivalves sont des suspensivores capable de s'alimenter à partir de cellules phytoplanktoniques ou de ciliés (Le Gall *et al.*, 1997 ; Dupuy, 1999) ou encore de produits de dégradation de macroalgues (Levinton *et al.*, 2002).

Le processus alimentaire est essentiellement le même chez toutes les espèces ; il se décompose en différentes phases (Figure 11), comme l'interception des particules, leur transport, leur sélection, leur ingestion, leur absorption et enfin leur excrétion (Beninger *et al.*, 1995 ; Silverman *et al.*, 1999).

L'alimentation de *C. gigas* est sous l'influence de facteurs environnementaux comme la température, la concentration et la taille des particules en suspension (Barille *et al.*, 1997), mais aussi de facteurs biochimiques (composition en lipide, en acide gras et en protéine) en lien avec la nourriture (Levinton *et al.*, 2002) et enfin avec des facteurs intrinsèques comme le statut physiologique de l'animal. L'impact des micro-algues toxiques sur les fonctions de filtration et d'ingestion des bivalves a été largement étudié (Pearce *et al.*, 2005, Bardouil *et al.*, 1993 ; Wildish *et al.*, 1998 ; Li et Wang, 2001 ; Bougrier *et al.* 2003 ; Lassus *et al.*, 2004 ; Navarro *et al.*, 2008 ; Fernandez-Reiriz *et al.*, 2008).

Plusieurs études ont mis en évidence une inhibition de l'activité de filtration chez *C. gigas* (Bardouil *et al.*, 1993 ; Wildish *et al.*, 1998 ; Lassus *et al.*, 2004) et *Mytilus chilensis* (Navarro *et al.*, 2008) exposées à des micro-algues toxiques appartenant au genre *Alexandrium*. Matsuyama *et al.* (1997) ont aussi mis en évidence une inhibition du taux de filtration de la moule *Mytilus galloprovincialis* avec absence de production de fèces et de pseudofèces lorsqu'elle est en présence d'une faible densité (50 cellules ml<sup>-1</sup>) d'*Heterocapsa circularisquama*. Dans ce dernier cas, cette inhibition est due à des substances protéiques localisées sur la surface des cellules.

De plus, l'inhibition de l'alimentation en présence des dinoflagellés toxiques est évoquée chez d'autres espèces de bivalves comme *Mya arenaria* et *Crassostrea virginica* (Shumway et Cucci, 1987), ou *Mytilus edulis* (Widdows *et al.*, 1979), mais aussi chez des copépodes (Huntley *et al.*, 1986).



**Figure 11.** Schéma de synthèse illustrant le devenir des particules en suspension dans l'eau filtrée par le bivalve (Lassus *et al.*, 2002)

De plus, certains coquillages filtreurs peuvent bloquer leur activité alimentaire (fermeture des valves ou des siphons) et produire du mucus lorsqu'ils sont mis en présence de producteurs de toxines (tableau 4). C'est le cas d'un fouisseur, *Mercenaria mercenaria*, qui est capable de rétracter son siphon, fermer ses valves et s'enfouir dans le sédiment lors des proliférations algales toxiques. La diminution de la filtration et la fermeture prolongée des valves sont souvent accompagnées de variation importante de la consommation d'oxygène dissous et de l'activité cardiaque mais, dans ce cas, il ne s'agit pas d'effets directs des micro-

algues mais de conséquences des premiers troubles physiologiques constatés (Gainey et Shumway, 1988).

**Tableau 4.** Effets physiologiques d'*Alexandrium tamarense* administré à sept espèces de bivalves filtreurs (Bricelj *et al.*, 1990 ; Shumway et Cucci, 1987).

Paramètre physiologique	<i>Mya arenaria</i>	<i>Mytilus edulis</i>	<i>Geukensia demissa</i>	<i>Ostrea edulis</i>	<i>Placopecten magellanicus</i>	<i>Modiolus modiolus</i>	<i>Spisula solidissima</i>
Taux de filtration	↘	↘	↘	↗	-	aucun	aucun
Fermeture des valves	oui	Oui	oui	partielle	Oui	aucun	aucun
Rétraction du siphon	oui	-	oui	-	-	oui	oui
Production de mucus	-	↗	↗	-	↗	oui	oui

## 2.2. Digestion des particules alimentaires

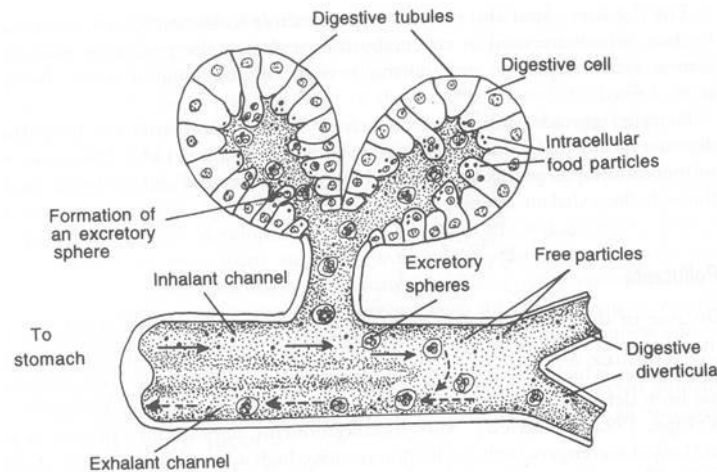
Les particules alimentaires entrent par la bouche puis se déplacent dans l'oesophage sous l'action d'un épithélium cilié. Ensuite les particules sont conduites à l'estomac, où a lieu la sélection post-ingestive (Brillant et MacDonald, 2000) et où elles sont absorbées partiellement ou totalement (Shumway *et al.*, 1985). Le temps de résidence des micro-algues dans l'estomac est différent suivant les espèces algales (Rouillon et Navarro, 2001).

La dégradation des particules est possible grâce à la présence du stylet cristallin, composé de mucoprotéines, qui se projette à travers l'estomac et vient froter contre le bouclier gastrique. Les particules sont brassées par les rotations du stylet, et subissent un début de lyse grâce à l'action des enzymes (amylase) libérées par le stylet.

Différents conduits ciliaires dirigent les particules à travers un flux continu dans deux sens : soit vers les tubules digestifs où elles subiront l'absorption et la digestion intracellulaire (Purchon, 1977; 1987) soit vers l'intestin et l'estomac pour les déchets non digérés (Figure 12). La fraction non absorbée des particules ingérées est rejetée au niveau de l'anus sous la forme de fèces, dont la production augmente en fonction de la masse de chair sèche de l'organisme et de la charge particulaire totale jusqu'à une valeur seuil qui correspond à la fois au remplissage du système digestif et à un temps de transit maximum (Bayne et Newell, 1983).

Les tubules digestifs sont constitués de deux types de cellules, les cellules digestives et les cellules basophiles (Weinstein, 1995). Les cellules digestives récupèrent les particules par pinocytose (absorption du liquide extracellulaire dans les cellules) et leur digestion se déroule

dans les vacuoles. Les cellules basophiles appelées cellules sécrétrices participent à la synthèse protéique mais leur rôle exacte reste encore non connu.



**Figure 12.** Section de la glande digestive montrant l'absorption et la digestion intracellulaire du matériel provenant de l'estomac (flèches continues) et mouvements des débris vers l'extérieur (flèches discontinues). D'après Owen (1955).

Le produit final de la digestion est évacué du système digestif (Mathers, 1972) pour passer dans les tissus, et les débris sont retenus au niveau des corps membranaires afin d'être libérés au niveau de la lumière des tubules (Figure 12). Dans ce cas, les cellules digestives sont remplacées par de nouvelles cellules. Les débris sont encapsulés dans des sphères excrétoires afin d'être transportés vers l'estomac et vers l'intestin. Ces débris contiennent des enzymes digestives qui peuvent être utilisées par l'estomac pour la digestion extracellulaire (Mathers, 1972).

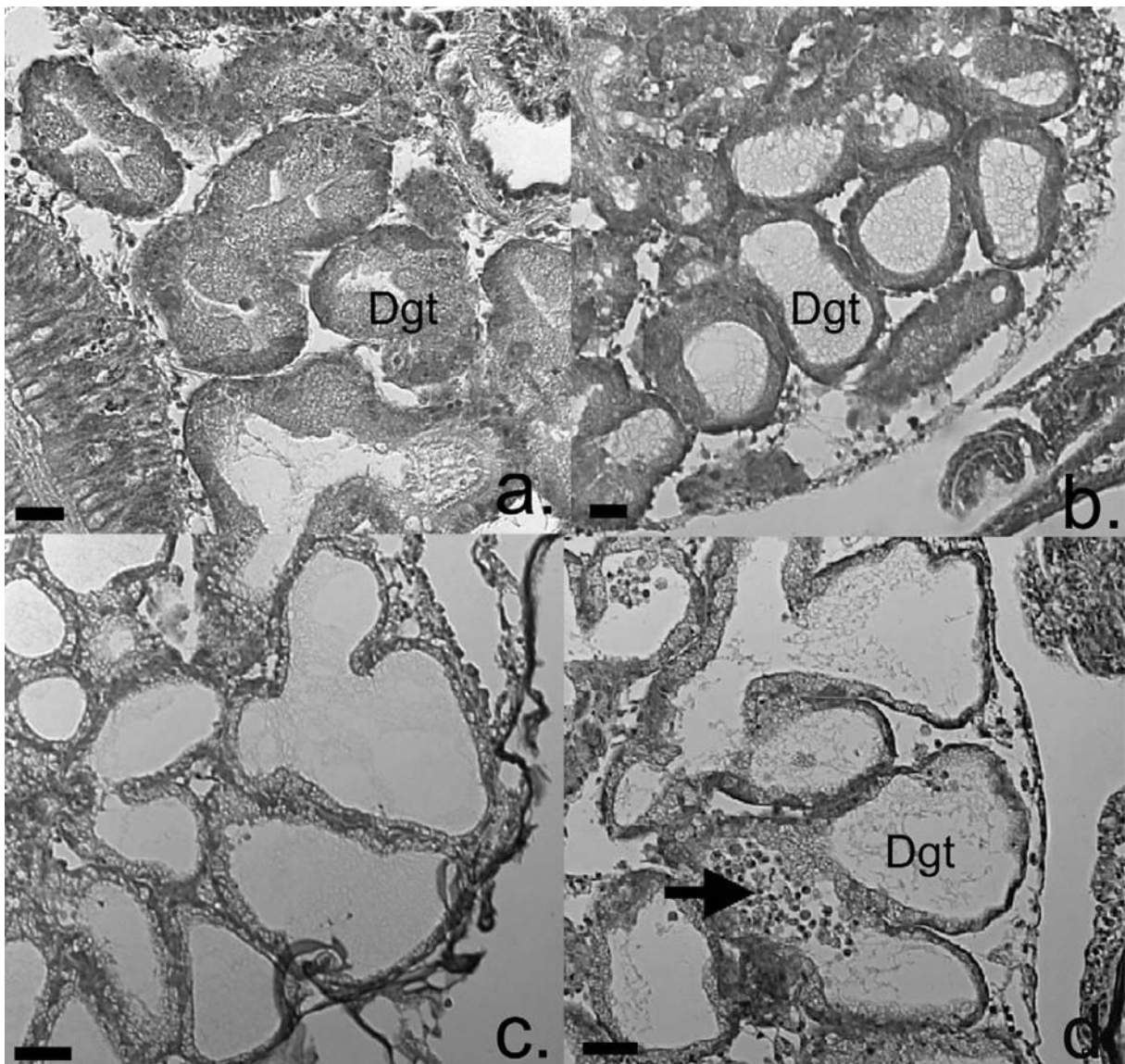
L'estomac, la glande digestive et parfois l'intestin produisent différentes enzymes digestives. Des enzymes à digestion rapide e.g. esterase et phosphatases acide *et* alcaline ont été retrouvées au niveau de l'estomac, de la glande digestive et de l'intestin des huîtres *Ostrea edulis* et *Crassostrea angulata* (Mathers, 1973 ; Langdon et Newell, 1996). L'activité protéolytique au niveau des bivalves est faible, cependant des endopeptidases telles que la chymotrypsine et la cathepsine ont été trouvées au niveau de la glande digestive et l'activité trypsine a été signalée au niveau de l'estomac et de l'intestin de certains bivalves (Reid, 1968).

### 2.3 Impact des micro-algues toxiques sur le système digestif des mollusques bivalves

L'exposition des bivalves à des micro-algues toxiques peut affecter le système digestif. Fernandez-Reiriz *et al.* (2008) ont démontré que l'exposition de *Mytilus chilensis* à *Alexandrium catenella* pouvait aboutir à une inhibition temporaire des processus digestifs,



notamment une diminution des activités enzymatiques. Pearce *et al.* (2005) ont observé que des larves de *C. gigas* exposées à *Prorocentrum rhathymum* présentaient un amincissement de l'épithélium des tubules digestifs ainsi qu'une exfoliation des cellules de l'épithélium dans la lumière de ces mêmes tubules (Figure 13). De même, lors de l'exposition des moules à *Alexandrium fundyense*, Galimany *et al.* (2008a) ont constaté une dégradation importante des conduits et des tubules digestifs après neuf jours d'exposition.



**Figure 13.** (A) Tubule de la glande digestive (Dgt) des naissains d'huîtres *Crassostrea gigas* exposés à un mélange naturel de phytoplancton, les cellules de l'épithélium sont denses et les lumières des tubules sont bien définies indiquant une forme normale, une activité alimentaire et un métabolisme important. (B) tubules de la glande digestive exposés à un mélange naturel de phytoplancton, l'épithélium est aminci, indiquant un arrêt de l'alimentation. (C et D) Exemples d'une dilatation sévère des tubules de la glande digestive suite à une exposition expérimentale des huîtres à *Prorocentrum rhathymum*. La flèche indique une exfoliation des cellules épithéliales au niveau de la lumière des tubules de la glande digestive. Echelle = 10  $\mu$ m (d'après Pearce *et al.*, 2005).

Les micro-algues toxiques peuvent également provoquer une réaction immunitaire, comme le suggèrent les réactions inflammatoires observées chez différentes espèces de bivalves. Plusieurs observations histopathologiques ont montré que les hémocytes sont impliqués dans les réponses des bivalves lors d'une exposition à des algues toxiques (Wikfors et Smolowitz, 1993 ; 1995 ; Galimany *et al.*, 2008a ; 2008b ; 2008c ; Haberkorn *et al.*, 2010).

A titre d'exemple, des infiltrations et des diapédèses hémocytaires (passage des hémocytes entre les cellules de l'épithélium depuis le tissu conjonctif vers la lumière de l'estomac ou de l'intestin), ont également été observées dans différents tissus de la glande digestive de *M. edulis* exposée aux dinoflagellés toxiques *Alexandrium fundyense* (Galimany *et al.*, 2008a), *Prorocentrum minimum* (Galimany *et al.*, 2008b) et *Karlodinium veneficum* (Galimany *et al.*, 2008c) ainsi que des huîtres exposées à *Alexandrium minutum* (Haberkorn *et al.*, 2010). Hégaret *et al.* (2009) ont également observé des réactions inflammatoires dans le système digestif de la palourde, *Ruditapes philippinarum*, exposée à *P. minimum*.

## 2.4 Détoxification des mollusques bivalves

### 2.4.1 Procédés de détoxification

En Europe, les procédures de détoxification des mollusques bivalves à l'échelle industrielle sont rares :

**Cas des toxines ASP:** Il n'existe actuellement aucune méthode industrielle. Le seul protocole disponible est la détoxification naturelle lorsqu'elle est possible. Il existe des études qui portent sur l'utilisation de micro-organismes afin de métaboliser l'acide domoïque (AD) dans des bivalves présentant des taux de détoxification rapide, tels que les moules et les palourdes (Stewart *et al.*, 1998). De plus, il existe une réglementation spécifique pour les coquilles Saint-Jacques (*Pecten maximus* et *Pecten jacobaeus*) (Commission européenne, 2002), qui peuvent être récoltées, même si elles sont toxiques, à condition que la toxicité totale ne soit pas supérieure à 250 mg / kg, que le muscle ou la gonade analysés séparément ne présentent pas une toxicité supérieure à 4,6 mg/kg et que leur hépatopancréas soit enlevé ce qui entraîne une forte diminution de la toxicité. Elles peuvent aussi être commercialisées dans des conditions fixées par la Commission européenne (Parlement européen, 2004a et b).

**Cas des toxines PSP:** Il existe des techniques industrielles de détoxification de bivalves cuits grâce à l'hydrosolubilité de la saxitoxine (STX) et ses dérivés. Une série de cuisson et de lavage suivie de stérilisation peut réduire la toxicité d'*Acanthocardia tuberculatum*. Cette méthode de détoxification est agréée par la Commission européenne exclusivement pour ces bivalves (Commission européenne, 1996). Au niveau expérimental, l'utilisation de solutions

alcalines suivie par la cuisson et le lavage ont également démontré la réduction du niveau de la concentration en toxines (Vieites *et al.*, 1999; Lagos *et al.*, 2001). En ce qui concerne la détoxification de coquillages vivants, l'utilisation de l'ozone a fait l'objet de travaux controversés concernant les effets obtenus en fin d'expérience (Blogoslawski *et al.*, 1979; Van Egmond, 2004). Récemment, l'utilisation de bactéries pour une détoxification rapide des moules - *Mytilus edulis* a été explorée *in-vitro* avec des résultats prometteurs (Donovan *et al.*, 2008). Des durées de détoxification compatibles avec les attentes des producteurs sont obtenues en nourrissant en circuit fermé les huîtres creuses avec des algues fourrages non-toxiques (Lassus *et al.*, 2005).

**Cas des toxines DSP:** Seule la détoxification naturelle est autorisée. Cependant il a été signalé qu'il est possible de réduire les niveaux des toxines à l'aide du CO<sub>2</sub> bien que le produit final ne soit pas commercialement acceptable (Gonzalez *et al.*, 2002). En général, l'alimentation est utilisée comme le principal outil pour éliminer les toxines lipophiles. Les résultats ont montré qu'une diminution du temps de détoxification est observée au niveau de la moule *Mytilus edulis*, mais il est encore trop tôt pour la mise en œuvre industrielle (Kroken *et al.*, 2006). Une troisième voie a également été explorée et vise à intervenir sur le métabolisme des moules en ajoutant la N-acétylcystéine, un précurseur du glutathion, qui a pour but d'augmenter la vitesse de détoxification (Pena-Llopis *et al.*, 2006).

#### 2.4.2 Cinétiques de détoxification des mollusques bivalves

La cinétique de détoxification des phycotoxines dans le mollusque bivalve est dépendante de différents processus dont (1) l'âge et la taille de l'espèce de bivalve concernée: une croissance pondérale rapide en cours de détoxification aura tendance à diluer le contenu toxinique et à accélérer artificiellement (indirectement) la détoxification (Bricelj et Cembella, 1995); (2) le niveau initial de contamination, due principalement aux caractéristiques du bloom phytoplanctonique (concentration algale, toxicité cellulaire et ratio entre algues toxiques et non toxiques); (3) les variations individuelles au sein d'une même espèce et les variations inter-espèces; (4) l'ingestion de l'algue, sa digestion et son assimilation; (5) le transfert des toxines au sein des différents organes; (6) les biotransformations vers d'autres métabolites toxiques et (7) les mécanismes de détoxification à travers divers processus comme l'égestion, l'excrétion, la dégradation des particules algales qui peuvent influencer la vitesse de détoxification (Silver et Cembella, 1995).

Les bivalves exposés aux mêmes conditions de contaminations algales montrent des capacités variables à se détoxifier. En prenant comme base le taux d'élimination journalier

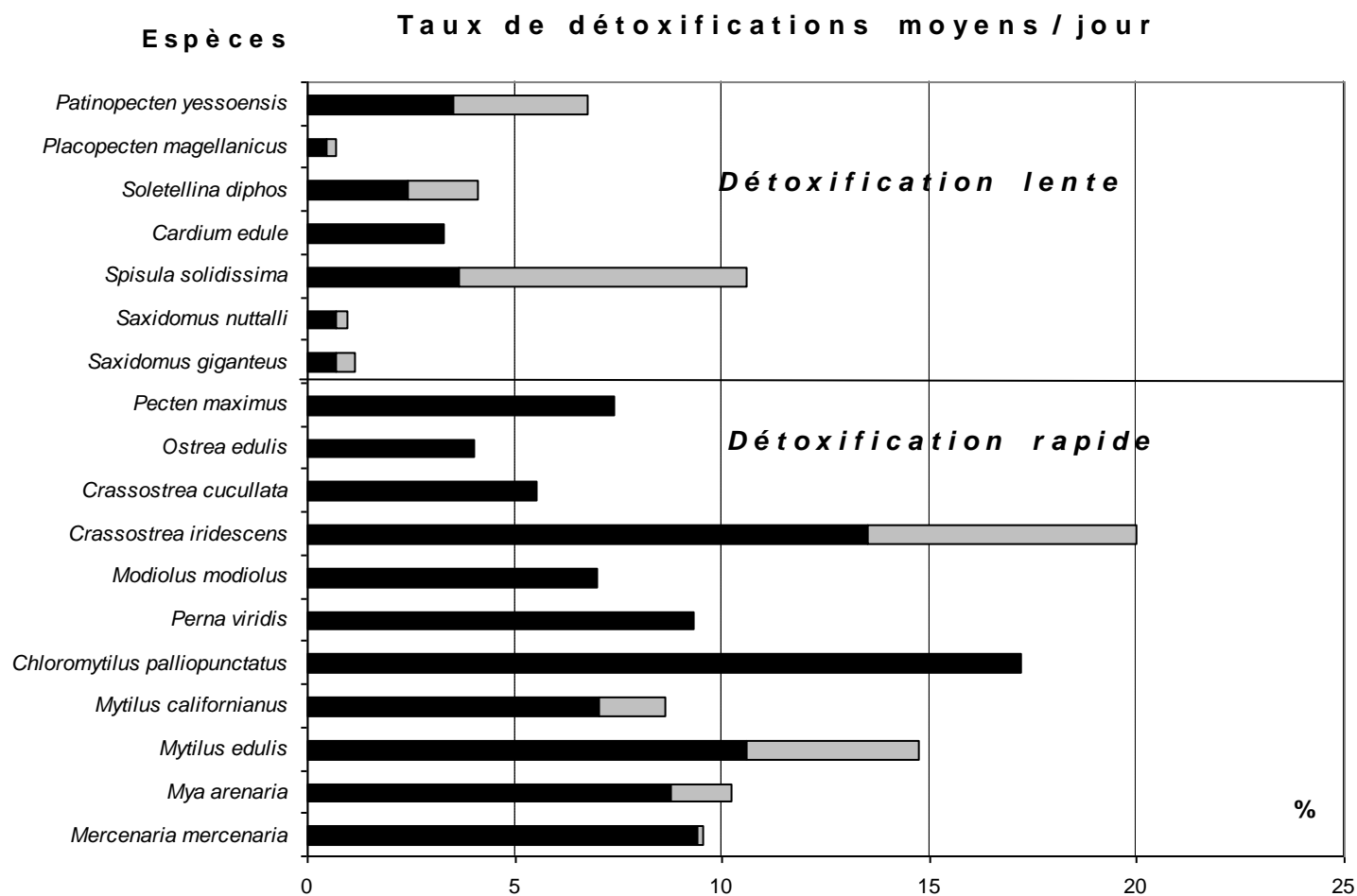
des toxines paralysantes (relation exponentielle établie par Bricelj et Shumway en 1998 à partir de données obtenues *in situ* ou par des expérimentations), deux catégories de bivalves peuvent être distinguées (Figure. 14) : les espèces à détoxification rapide (quelques jours à quelques semaines) et celles à détoxification lente (quelques mois à quelques années).

En outre, différentes variables interagissent sur la cinétique de détoxification et l'effet des facteurs influençant le processus de détoxification est souvent controversé.

Concernant l'effet de la température, Shumway et Cembella, (1993) observent un ralentissement général de la détoxification des mollusques à basse température tandis qu'aucun effet n'est observé entre 12 et 16 °C chez *Saxidomus giganteus* (Madenwald, 1985) ou chez *Mytilus galloprovincialis* (Blanco *et al.* 1997). En effet la température et la salinité de l'eau utilisées dans les stations d'épuration ont une influence significative sur les processus physiologiques des mollusques (par exemple, le taux de filtration, la ponte), et par conséquent sur l'efficacité de l'élimination des micro-organismes (Fleet, 1978; Shumway, 1996). Plusieurs études ont montré que la température optimale et la salinité des eaux lors des procédés d'épuration sont dépendantes i) des conditions du milieu ambiant au niveau du site de récolte ii) de la situation géographique de la station d'épuration et iii) de la saison et de l'état physiologique des mollusques. Par exemple, une augmentation non contrôlée de température peut stimuler la ponte des huîtres de Sydney *Saccostrea commercialis* et des huîtres du Pacifique *Crassostrea gigas* (Arakawa, 1990) et peut favoriser une accumulation des micro-organismes dans les coquillages ou dans l'eau de mer.

En ce qui concerne l'utilisation de l'ozone pour détoxifier les mollusques, les résultats sont contradictoires. Ainsi, Blogoslawski *et al.*, (1979) ont signalé que l'eau ozonée permet de détoxifier les bivalves contaminés par des cellules «mobiles» (végétatives) productrices de toxines paralysantes alors que Shumway, (1996) estime que l'ozone est inefficace pour détoxifier des bivalves qui ont ingéré des kystes d'espèces toxiques ou qui ont bioaccumulé depuis longtemps des toxines paralysantes déjà métabolisées et liées aux tissus.

La disponibilité de la nourriture non toxique a été proposée par plusieurs auteurs comme le principal facteur pouvant influencer la détoxification (Haamer *et al.*, 1990; Sampayo *et al.*, 1990; Marcaillou-Le Baut *et al.*, 1993; Poletti *et al.*, 1996; Blanco *et al.*, 1999). A titre d'exemple, une étude comparative de la détoxification des moules contaminées par des toxines lipophiles a montré que ces dernières se détoxifient plus rapidement lorsqu'elles se trouvent dans le milieu naturel, en présence de quantités abondantes de phytoplancton non toxique, que lorsque les moules sont détoxifiées au laboratoire avec alimentation.



**Figure 14.** Taux de détoxification journalier des toxines paralysantes par espèces de bivalves regroupées selon leurs cinétiques de décontamination. Résultats moyens (écarts type en gris clair) calculés d'après le modèle exponentiel de détoxification  $y=y_0e^{-kt}$  (Adapté de Bricelj et Shumway, 1998).

En Suède, les moules présentent des niveaux élevés en acide okadaïque pendant l'automne et l'hiver, suivis d'une diminution rapide au début du printemps. La réduction en concentration de cette toxine coïncide avec la floraison printanière des diatomées. Cela indiquerait également qu'un apport d'algues non toxiques est un moyen biologique efficace pour éliminer ces toxines (Svensson 2003).

La présence de nourriture, en quantité suffisante, jouerait donc un rôle dans la détoxification des moules contenant des phycotoxines diarrhéiques en accélérant le métabolisme global et les vitesses d'élimination des toxines (Marcaillou-Le Baut *et al.*, 1993). De plus, l'utilisation de la nourriture non toxique permet une augmentation du taux d'ingestion des moules contaminées par des toxines lipophiles ce qui, à son tour, conduit à une activité digestive plus élevée et à de plus grandes productions fécales. Ainsi les biodépôts sont considérés comme la principale voie d'élimination des toxines DSP (Bauder *et al.*, 1996; Blanco *et al.*, 1999).

Cependant Svensson, (2003) a montré expérimentalement que les cinétiques de détoxification pendant 32 jours de moules contaminées naturellement par l'acide okadaïque ne sont pas différentes selon que les moules sont nourries ou non nourries ce qui contredit les observations faites sur le terrain par ce même auteur. Dans son expérimentation, la perte de toxine des moules non alimentées serait corrélée à une perte de masse considérable de la glande digestive entre 16 et 32 jours. De la même façon, Haamer *et al.* (1990) ont rapporté que la détoxification des moules dans des bassins avec ou sans ajout de particules de levures était réduite après une semaine dans les deux traitements. Néanmoins, les auteurs ont observé une plus grande variabilité dans les moules n'ayant pas reçu de levures.

En ce qui concerne les effets de l'alimentation sur la détoxification d'autres types de toxines, Novaczek *et al.* (1992) et Wohlgeschaffen *et al.* (1992) n'ont trouvé aucune différence entre des moules, *M. edulis*, alimentées et non alimentées au niveau des taux d'élimination de l'acide domoïque. De même, Chen et Chou, (2001) ont observé que l'efficacité d'élimination des toxines PSP chez la palourde pourpre, *Hiatula rostrata*, était similaire pour les palourdes nourries ou non nourries avec des algues non toxiques.

Ces études suggèrent que la détoxification peut se produire même sans apport de nourriture dans le système. De plus, des analyses multivariées des effets environnementaux sur la détoxification des phycotoxines paralysantes (PSP) dans la moule *Mytilus galloprovincialis* ont révélé que les variables appliquées, y compris la concentration en phytoplancton, semblent être sans importance dans le processus de détoxification (Blanco *et al.*, 1997).

Au final les mécanismes mis en jeu dans le processus de détoxification sont peu connus. Ils peuvent inclure l'égestion et l'excrétion des particules algales, la dégradation et la biotransformation des toxines. Dans le cas de la palourde *Ruditapes philippinarum* contaminée par des toxines paralysantes, l'excrétion est le principal mécanisme de détoxification (Oshima et Naria, 2001). Cependant, la palourde *Tapes japonica* présente la capacité de biotransformer les toxines paralysantes dans un temps très court (0,5 h) et d'éliminer 99% de la quantité totale de toxine après sept jours de détoxification (Samsur *et al.*, 2006).

La composition biochimique et l'état physiologique du mollusque peuvent influencer la répartition et le devenir des substances toxiques (Widdows et Donkin, 1992). En ce qui concerne les composés lipophiles, il existe en général une corrélation entre la concentration en lipides dans l'organisme ou dans le tissu spécifique et le degré de bioaccumulation du composé toxique. Cela semble indiquer que les substances toxiques sont associées à des réserves de lipides dans les tissus (Farrington, 1989; Livingstone et Pipe, 1992; Phillips, 1993). A titre d'exemple, la glande digestive des moules est l'organe le plus riche en lipides (De Zwaan et Mathieu, 1992), et il représente le site principal pour l'accumulation des polluants organiques ou de l'acide okadaïque (AO) (Yasumoto *et al.*, 1978; Livingstone et Pipe, 1992). Environ 99% de la charge en toxines DSP se retrouvent dans la glande digestive de *M. galloprovincialis* (Blanco *et al.*, 2007). Pour les PSP, et chez plusieurs bivalves, la glande digestive représente 80-90% de la teneur en toxine paralysante (Bricelj et Shumway, 1998). De façon similaire, la glande digestive peut représenter de 94 à 99% de la charge totale en acide domoïque (AD) chez la coquille Saint-Jacques *Pecten maximus* (Blanco *et al.*, 2002), 93% chez la moule *M. edulis* (Grimmelt *et al.*, 1990) et 70% chez l'huître américaine *C. virginica* (Roelke *et al.*, 1993).

Plusieurs études ont montré que les glandes digestives se détoxifiaient plus vite que les autres tissus (Bricelj *et al.*, 1991; Bricelj et Cembella, 1995). En fait, la détoxification de la glande digestive est liée à la fois à la production de fèces et aux échanges avec les autres tissus. Ainsi la détoxification de l'animal est la résultante de deux cinétiques : une première rapide qui correspond à l'élimination 'mécanique' des toxines libres dans le tractus digestif, suivie d'une seconde beaucoup plus lente qui résulte de l'élimination des toxines liées aux différents tissus (Silvert et Cembella, 1995). Des tendances similaires ont également été observées par Marcaillou-Le Baut *et al.* (1993), Fernandez *et al.* (1998), Blanco *et al.* (1999) et Bauder *et al.* (1996) chez la moule *M. edulis* ainsi que chez un pétoncle canadien *Argopecten irradians*. Les taux de détoxification par organe s'établissent généralement dans

l'ordre suivant: masse viscérales >branchies > manteau / siphon / pied > muscle adducteur (Bricelj et Cembella, 1995).

L'étude de la distribution anatomique des toxines a donc été proposée comme un précieux indicateur de début et de fin de floraison des micro-algues toxiques (Bricelj et Shumway, 1998), mais elle est également utile pour le développement de modèles prédictifs des cinétiques des toxines (Blanco *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2005). Plusieurs mécanismes pourraient être impliqués dans la distribution des toxines DSP dans les mollusques (Blanco *et al.*, 2007). En effet, les toxines absorbées à partir du phytoplancton toxique, seront en général accumulées dans la glande digestive des mollusques bivalves en fonction de leur affinité pour les constituants de cet organe et de l'existence de mécanismes de transport pour leur acheminement vers les autres tissus. Dans le cas où les toxines atteignent les organes non viscéraux, elles sont susceptibles d'être soumises à différents environnements chimiques et biochimiques, ce qui peut favoriser certaines biotransformations. Ainsi les azaspiracides, des toxines lipophiles, peuvent être accumulés sous différentes formes dans différents tissus de la moule *M. edulis* (James *et al.*, 2002) et de la coquille Saint Jacques *P. maximus* (Braná Magdalena *et al.*, 2003).

De plus, différents organes ou tissus peuvent avoir différentes affinités pour les phycotoxines. Une fois liées aux tissus, les toxines vont être libérées, soit très lentement ou très rapidement. Ces cas ont été observés chez plusieurs espèces pour plusieurs toxines hydrophiles, comme les toxines PSP et ASP. Les toxines PSP, par exemple, peuvent rester pendant des années au niveau des siphons du 'clam' *Saxidomus giganteus* (Kvitek et Beitler, 1988; Beitler et Liston, 1990). La même observation est valable pour les toxines ASP (acide domoïque) qui sont accumulées dans les tissus non-viscéraux de palourdes du Pacifique et du couteau, *Siliqua patula* (Drum *et al.*, 1993).

Les accumulations sur de « longues durées » pourraient s'expliquer par la séquestration des toxines dans des lysosomes comme cela a été récemment démontré pour des toxines lipophiles, les yessotoxines (Malagoli *et al.*, 2006). De plus, au niveau de la glande digestive et plus précisément dans les diverticules digestifs, les particules alimentaires vont subir une digestion intracellulaire par endocytose ou pinocytose dans laquelle le système lysosomal joue un rôle important (Owen, 1972). En effet, les lysosomes sont impliqués dans la digestion intracellulaire des particules alimentaires et la séquestration de xénobiotiques comme des métaux lourds et certaines phycotoxines. A titre d'exemple, l'absorption de l'acide okadaïque dans les lysosomes pourrait représenter un mécanisme dont le rôle est de protéger le reste des cellules tissulaires des effets cytotoxiques de cette toxine (Svensson, 2003).

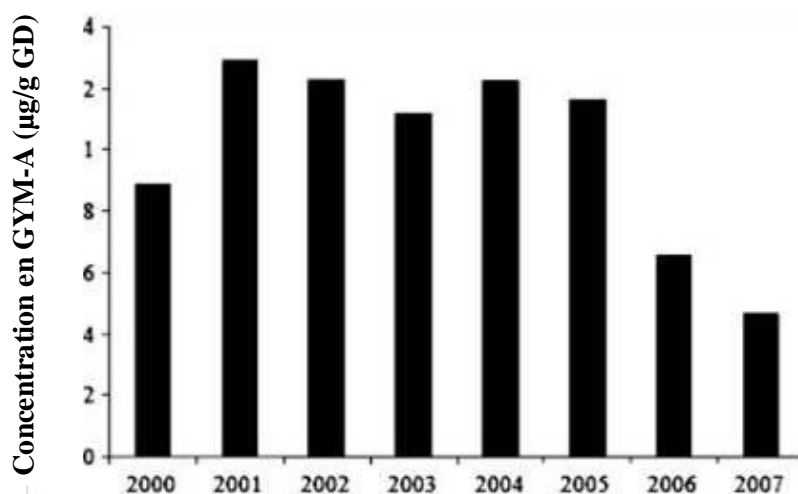


Dans le cas de la moule *M. galloprovincialis* contaminée par les toxines DSP, la contribution des tissus autres que la glande digestive à la charge totale en toxines est négligeable. Cette contribution pourrait devenir significative lorsque le taux d'ingestion des toxines est élevé. L'explication la plus probable est que ces toxines sont fortement liées à certains composants cellulaires qui ne permettent pas leur transport à d'autres tissus (Blanco *et al.*, 2007).

#### 2.4.2.1 Cas des imines cycliques.

##### Les gymnodimines

La présence des gymnodimines (GYM A et B), n'a pas été signalée dans les mollusques bivalves produits en Europe. Cependant, elles ont été détectées dans la palourde tunisienne *Ruditapes decussatus* (Biré *et al.*, 2002) et dans de nombreuses espèces de coquillages de Nouvelle-Zélande : huîtres plates (*Ostrea chilensis*), huîtres du pacifique (*Crassostrea gigas*), moules communes (*Mytilus galloprovincialis*), ormeaux (*Haliotis iris*), coquilles Saint-Jacques (*Pecten novaezelandiae*), mactres solides (*Paphies subtriangulata* et *Paphies australis*) (MacKenzie *et al.*, 1996 ; Stirling, 2001). La persistance de GYM-A dans les palourdes contaminées de la lagune de Boughrara a été démontrée par Marrouchi *et al.* 2010 (Figure 15). De plus MacKenzie *et al.* (1996) rapportent que les gymnodimines ne sont pas exclusivement localisées dans la glande digestive et que leur accumulation élevée dans les huîtres (*Tiostrea chilensis*) de la Nouvelle-Zélande a été signalée pendant plusieurs mois. En revanche, les moules vertes (*Perna canaliculus*) accumulent moins les gymnodimines et se détoxifient rapidement (2 à 3 semaines) (MacKenzie *et al.*, 1996 ; Stirling, 2001).



**Figure 15.** Suivi de la concentration en GYM-A des palourdes provenant de la lagune de Boughrara entre 2000 et 2007 (Marrouchi *et al.*, 2010).

### Les spirolides

En ce qui concerne les spirolides, elles ont été détectées pour la première fois en 1991 dans les moules et les palourdes de la Nouvelle-Écosse (Canada) (Sleno *et al.*, 2004, Richard *et al.*, 2001). Depuis, leur présence dans les coquillages ne cesse d'augmenter dans le monde. En Europe, ces toxines ont été trouvées en Espagne chez *Mytilus galloprovincialis* et *Venerupis pullastra* (Villar Gonzalez *et al.*, 2006), en Norvège chez *M. edulis* (Aasen *et al.*, 2005) et en France (Amzil *et al.*, 2007) chez *M. edulis* et *C. gigas*.

Les concentrations les plus élevées en spirolides dans les huîtres du Bassin d'Arcachon pour la période 2005-2008 ont été résumées à partir des données de la surveillance des toxines lipophiles (Tableau 5).

Dates	Grand-Banc	Arguin	Le Tes
25/04/2005	-	47	-
03/04/2006	-	20	-
15/03/2007	4	-	5
18/02/2008	-	-	2

**Tableau 5.** Dates et valeurs des concentrations les plus élevées en spirolides ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  de chair), observées dans les mollusques du Bassin d'Arcachon pour la période 2005-2008 (Rapports d'analyses des toxines lipophiles sur trois points de suivi du réseau REPHY).

### Les pinnatoxines et les ptériatoxines

Les pinnatoxines comme les ptériatoxines ont été extraites de coquillages originaires d'Okinawa (Japon), appartenant respectivement aux espèces *Pinna muricata* (Uemura *et al.*, 1995) et *Pteria penguin* (Takada *et al.*, 2001a), d'où leurs noms. L'organisme producteur des pinnatoxines (PnTX) n'a pas été identifié mais il a été décrit comme étant un dinoflagellé (Rhodes *et al.*, 2010 ; Selwood *et al.*, 2010), apparemment une nouvelle espèce appartenant à l'ordre des Peridiniales (Rhodes *et al.*, 2010, com. pers).

En 1995, un premier composé, la pinnatoxine A (PnTX-A) a été identifié dans la chair de coquillages du genre *Pinna* suite à des cas d'intoxication au Japon et en Chine (Uemura *et al.*, 1995). L'année suivante, c'est la PnTX-D qui a été isolée (Chou *et al.*, 1996) tandis que les PnTX-B et C, qui n'étaient présentes qu'à l'état de traces, n'ont pu être isolées qu'en 2001 (Takada *et al.*, 2001a). Récemment, de nouveaux analogues des pinnatoxines, les PnTX-E, F et G, ont été isolés à partir d'huîtres en Nouvelle-Zélande et en Australie (Selwood *et al.*, 2010). Les analogues PnTX-F et G sont produits par différents dinoflagellés et sont considérées comme les précurseurs de tous les PnTXs connus ainsi que des ptériatoxines (PtTXs) par transformation métabolique et par hydrolyse dans les coquillages (Selwood *et al.*,

2010) tandis que la pinnatoxine G a été mise en évidence en 2007 dans des moules, en Norvège (Rundberget *et al.*, 2010, com. pers)

En effet, les analyses stéréochimiques effectuées sur les pteriatoxines ont révélé que ces toxines ont la même structure macrocyclique polyéther que la pinnatoxine A (Takada *et al.*, 2001a).

### **Les prorocentrolide**

Torigoe *et al.* (1988) rapportent que la prorocentrolide a été isolée à partir des cellules de *Prorocentrum lima*, prélevées sur les côtes de l'île Sesoko, à Okinawa (Japon). La production de prorocentrolide n'est pas spécifique à *P. lima*. En effet Lu *et al.*, (2001) ont également isolé cette toxine à partir des cellules d'une espèce inconnue de *Prorocentrum* originaire de Taiwan. Quant à la prorocentrolide B, elle a été isolée de cellules de *P. maculosum* (anciennement *P. concavum*) par Hu *et al.* (1996). Cependant, aucun élément bibliographique ne fait état de cas d'intoxications suite à la consommation de coquillages contenant des prorocentrolides.

Compte tenu de la mise en évidence récente des imines cycliques, il y a peu de données bibliographiques sur le mécanisme de contamination ou sur la distribution de ces toxines, dans les tissus des bivalves contaminés, plus particulièrement dans le cas des gymnodimines et des spirolides. Ainsi pour réaliser des études de contamination et/ou de détoxification en laboratoire ou en bassins à terre il est indispensable de maîtriser auparavant les conditions de culture et de production toxinique des micro-algues toxiques productrices de gymnodimines et de spirolides.

### 3. Cultures des micro-algues toxiques.

Différents composés bioactifs ont été découverts chez les dinoflagellés et chez d'autres protistes marins dans l'objectif de répondre à des questions relatives à l'écophysiologie, la recherche biomédicale, la toxicologie et la chimie (Borowitzka, 1993; Lebeau et Robert, 2003a ; 2003b; Belarbi *et al.*, 2003; Walker *et al.*, 2005; Dittmann et Wiegand, 2006). Il apparaît à chaque fois que la production de quantités utiles de composés bioactifs à partir de cultures de dinoflagellés exige des systèmes permettant la production en masse de ces micro-organismes.

Bien que la production en masse de micro-algues avec des photobioréacteurs ait rapidement rencontré un certain succès (Molina Grima *et al.*, 1999 ; 2000a ; 2000b ; 2001), la production de dinoflagellés toxiques pose de nouveaux problèmes. En effet, ces organismes ont des taux de croissance spécifique sensiblement inférieurs à ceux des micro-algues 'fourrage' largement utilisées en aquaculture. En raison des faibles densités cellulaires atteintes, les concentrations de toxines dans les cultures ont tendance à être de l'ordre de quelques microgrammes par litre. En conséquence, des volumes importants de culture (plusieurs centaines de litres) sont nécessaires pour produire des quantités infimes de toxines.

Par ailleurs, différentes étapes précédant la culture en masse sont nécessaires afin d'améliorer les rendements de croissance et de production toxinique, en particulier i) le développement de milieux de culture adaptés (Harrison *et al.*, 1988 ; Okaishi *et al.*, 1987) et, ii) la détermination de l'intensité lumineuse, de la température (Boyer *et al.*, 1987, Ogata *et al.*, 1987; 1989 ; Anderson *et al.*, 1990), et de la salinité (White, 1978), les plus appropriés pour une croissance cellulaire et une production de toxines optimales. De plus, la croissance et la toxicité des dinoflagellés sont influencées par la présence d'autres micro-algues ou bactéries et *vice versa* (Blanco et campos, 1988 ; Kodama *et al.*, 1990) ce qui suggère des interactions complexes en cultures mixtes et non axéniques.

D'autres facteurs moins importants sont aussi à prendre en compte comme l'agitation du milieu. L'aération ou le brassage des cultures ainsi que la géométrie du contenant de culture sont indispensables, ils permettent i) d'homogénéiser la distribution des micro-algues et des nutriments et de favoriser ou pas une surface de contact avec la lumière ii) d'éviter la sédimentation des cellules et la stratification thermique, iii) d'augmenter les échanges gazeux en culture ouverte. Cependant certaines espèces ne tolèrent pas une aération ou un brassage vigoureux en particulier les dinoflagellés fragiles appartenant aux genres *Gymnodinium*, *Karenia*, *Gonyaulax* et *Karlodinium*. White, (1976) et Pollinger et Zemel, (1981) ont été les premiers à démontrer expérimentalement que l'agitation, comme l'aération, inhibent la

croissance des dinoflagellés et peuvent conduire à la mortalité si cette agitation est maintenue ou renforcée. Ces auteurs ont aussi trouvé que la turbulence perturbe l'horloge cellulaire, le cycle mitotique, et modifie les concentrations d'acides nucléiques. De plus, lors des cultures en photobioréacteur, la turbulence du système est connue pour affecter les taux de croissance spécifique et la morphologie des dinoflagellés (Berdalet et Estrada, 1993; Sullivan et Swift, 2003; Sullivan *et al.*, 2003).

L'impact des paramètres environnementaux incluant la salinité (Parakash *et al.*, 1967 ; White, 1978), la lumière (Ogata *et al.*, 1989), la température (Ogata *et al.*, 1989) et les concentrations en macronutriments (Boyer *et al.*, 1987), sur la croissance et la production toxinique des espèces de micro-algues appartenant au genre *Alexandrium* a été largement étudié. Malheureusement l'interprétation des résultats reste parfois difficile à cause : i) des différences méthodologiques adoptées au niveau des expériences, ii) de l'influence des phases de croissance et du pré-conditionnement des souches dans le milieu de culture, iii) des réponses spécifiques de chaque souche d'*Alexandrium* face aux variations des conditions environnementales.

Au niveau des cultures contrôlées du dinoflagellé *Alexandrium tamarense*, il a été démontré qu'il existe une corrélation positive entre la concentration en saxitoxine (quantité de toxine par cellule) la croissance cellulaire et la salinité, ce qui suggère que le contenu en toxine pourrait être affecté par la modification des facteurs extrinsèques. Cependant, cette relation ne semble pas être une réponse directe au stress environnemental (Parkhill et Cembella, 1999). Elle s'explique par l'effet positif de la salinité sur le taux de croissance, ce qui contribue à augmenter la quantité de toxine par cellule de cette espèce. Hall, (1982) n'observe aucune relation entre le contenu en toxine PST d'un isolat *Alexandrium spp* et la variation de l'intensité lumineuse. De façon contradictoire, d'autres résultats ont indiqué qu'une augmentation de l'intensité lumineuse et de la température provoquait une diminution de la production en toxine d'*A. tamarense* suite à une augmentation du taux de division (Ogata *et al.*, 1987).

La relation existant entre le taux de division et la toxicité des cellules d'*Alexandrium spp* en culture en batch semble être complexe et la littérature ne manque pas d'exemples de résultats contradictoires (Parakash, 1967, Proctor *et al.*, 1975 ; White, 1978 ; Kodama *et al.*, 1990). Ainsi Proctor *et al.* (1975) suggèrent que le contenu toxinique est inversement corrélé au taux de division d'*Alexandrium catenella* (= *Gonyaulax catenella*). Cependant, Kodama *et al.* (1990) ont montré l'absence de relation entre la croissance et le contenu cellulaire en toxine en étudiant différents isolats d'*A. tamarense* (= *Protogonyaulax tamarensis*).

La production de toxines à partir des micro-algues est profondément influencée par les facteurs nutritionnels au niveau de la culture utilisée (Cembella *et al.*, 1998). Différents travaux ont démontré que les nutriments, et plus particulièrement les niveaux et les sources de nitrates utilisés, affectent la croissance et la production des toxines des dinoflagellés (Anderson *et al.*, 1990 ; Flynn *et al.*, 1994). Des observations identiques ont été réalisées après addition de phosphate au cours de la culture (John et Flynn, 2000 ; Flynn *et al.*, 1994).

D'autres études se sont intéressées à la croissance cellulaire et à la production de toxines de certains dinoflagellés dans des conditions limitantes en nitrates ou en phosphates (Siu *et al.*, 1997 ; Wang et Hsieh, 2002). Ainsi la production de toxines PSP par quelques dinoflagellés est stimulée dans des conditions limitantes en phosphates (Boyer *et al.*, 1987 ; Anderson *et al.*, 1990 ; Guisande *et al.*, 2002 ; Frangopulos *et al.*, 2004) tel est le cas d'*A. tamarensis* (Boyer *et al.*, 1987) alors que la production de ces mêmes toxines par *A. minutum* est stimulée dans des conditions limitantes en nitrates et phosphates (Flynn *et al.*, 1994).

### 3.1 Croissance cellulaire de *K. selliformis* et production des gymnodimines

Différents auteurs (Seki *et al.*, 1995 ; Miles *et al.*, 2000a,b ; Mackenzie *et al.*, 2002) se sont intéressés à la production de la gymnodimine à partir de *Karenia selliformis* notamment pour ses propriétés pharmacologiques. Par ailleurs, des études rapportent que différents facteurs stimulent la production de GYM et la croissance de *K. selliformis*. Il s'agit par exemple de l'addition d'acétate, de glycolate, d'alanine et de glutamate (Mountfort *et al.*, 2006), de la combinaison de magnésium (Mg) et de sélénium (Se) (Rhodes *et al.*, 2006) et de l'addition de nutriments organiques (Mountfort *et al.*, 2006).

A titre d'exemple, ces derniers auteurs ont montré que la culture de *K. selliformis* dans des volumes de 15 l enrichis en milieu GP + Se (Loeblich et Smith, 1968) et soumise à une photo-période 12-h/12-h, permet d'obtenir des rendements de croissance et de production en gymnodimine faibles ( $\mu = 0,05 \text{ jours}^{-1}$ ; gymnodimine =  $250 \text{ mg l}^{-1}$ ). Cependant l'utilisation de glycolate et d'alanine optimise la production de cette toxine en stimulant la croissance cellulaire et en favorisant sa prolongation (rendement cellulaire maximale =  $1,76 \cdot 10^5 \text{ cellules ml}^{-1}$ ; production de gymnodimine =  $1260 \text{ mg l}^{-1}$ ; taux de croissance ( $\mu$ ) =  $0,2 \text{ jours}^{-1}$ )

La GYM est détectée dans les fractions particulières (cellules) et dissoutes (milieu de culture) lors des cultures en batch de *K. selliformis* (Mackenzie *et al.*, 2002). Ces auteurs signalent que jusqu'à 50% de la GYM reste sous forme dissoute dans le milieu de culture durant le début de la phase de croissance, mais que rapidement cette proportion baisse pendant les phases exponentielle et stationnaire où plus de 70% de la toxine sont associés aux

cellules. En effet la GYM est caractérisée par son instabilité aux pH neutres et élevés (Miles *et al.*, 1999). Lorsque le pH du milieu de culture atteint la gamme 8.1-8.7, il est probable qu'une dégradation significative de la toxine ait lieu. Cette dégradation de la GYM sous forme dissoute a été confirmée et estimée à 5 % par jour (Mackenzie *et al.*, 2002). Ces derniers auteurs indiquent que la cause de la présence de la GYM dans le milieu environnant est inconnue et ils supposent qu'elle est le résultat soit d'un processus actif d'excrétion à partir des cellules de *K. selliformis*, soit d'une perte passive de toxines à partir de ces cellules, soit encore d'une libération de la GYM dans le milieu due à une lyse cellulaire. En outre, les mêmes auteurs signalent que la GYM pourrait apparaître comme un constituant plutôt stable dans la cellule mais que sa présence, en quantité significative, sous forme dissoute dans le milieu permet d'envisager la possibilité d'une fonction ectocrine qui conférerait un certain avantage écologique à *K. selliformis*.

### 3.2 Croissance cellulaire d'*A. ostenfeldii* et production de spirolides

Compte tenu de la présence d'*A. ostenfeldii* dans des assemblages phytoplanctoniques plurispécifiques, il a été difficile de caractériser la toxicité potentielle de cette espèce (Balech 1995; Hansen *et al.*, 1992). Cependant *A. ostenfeldii* est capable de produire aussi des phycotoxines paralysantes et le profil toxinique des cellules peut varier largement selon les souches et les localités (Hansen *et al.*, 1992; MacKenzie *et al.*, 1996b). La souche Danoise d'*A. ostenfeldii* est capable de produire de faibles quantités de dérivés de la saxitoxine (Hansen *et al.*, 1992), tandis que les souches de Nouvelle-Zélande produisent des concentrations de PSP pouvant atteindre 217 pg STX eq cell<sup>-1</sup> autrement dit des valeurs qu'aucune autre souche d'*Alexandrium* ne peut atteindre (MacKenzie *et al.*, 1996a, b, c).

Récemment, une étude au Canada a révélé la présence de spirolides principalement produits par des souches d'*A. ostenfeldii* provenant de l'Ouest de l'Atlantique (Cembella *et al.*, 2000a ; 2000b). Jusqu'à présent *A. ostenfeldii* est la seule espèce microplanctonique reconnue capable de produire des spirolides.

Différents travaux ont porté sur l'étude de la croissance d'*A. ostenfeldii*. Jensen et Moestrup, 1997 ont montré que le taux de division d'*A. ostenfeldii* (souche LF37 et LF 38) est maximal (0.3 div j<sup>-1</sup>) à une température de 20 °C et à une salinité entre 15-20 psu et qu'une variation de la taille des cellules a été observée à différentes gammes de température et de salinité. De plus, ces auteurs ont montré qu'en culture, la reproduction sexuelle, la fusion des gamètes et la forme planozygote d'*A. ostenfeldii* sont observées dans des conditions limitantes en nutriments.

D'autres travaux ont montré que la croissance d'*A. ostenfeldii* (souche AOSH1) est limitée lors de l'application d'une intensité lumineuse supérieure à  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , pour une salinité inférieure à 15 psu et une concentration initiale en nitrate inférieure à  $20 \mu\text{M}$  (Maclean *et al.*, 2003).

L'étude de la variation de production des spirolides par *A. ostenfeldii* a fait l'objet de différents travaux afin d'identifier les facteurs influençant cette production. Lors de la croissance cellulaire d'*A. ostenfeldii* souche (AOSH1), John *et al.*, 2000 ont montré que la production des spirolide est caractérisée par une dominance de la spirolide 13-desMeC (90%). De plus ces auteurs ont montré que cette production (par unité de volume) est dépendante de la croissance cellulaire et plus particulièrement du cycle nyctéméral: on observe une augmentation de la quantité de spirolide totaux par cellule en phase sombre et une diminution en phase éclairée

L'analyse de la production et de la composition des spirolides au cours de la croissance d'*A. ostenfeldii* (souche AOSH1), montre une augmentation de concentration totale (quantité de toxine par unité de volume) en spirolides de la fraction cellulaire coïncidant avec l'augmentation de la croissance (Maclean *et al.*, 2003). Par contre, la production et la composition en spirolides par cellule restent inchangées en réponse à des variations environnementales (lumière, salinité et éléments nutritifs).

Otero *et al.* (2010a) se sont intéressés à l'effet des milieux nutritifs sur le contenu toxinique d'*A. ostenfeldii* (souche CCMP1773). La quantité maximale en spirolides totaux par cellule est obtenue lors de l'utilisation du milieu f/2 et du milieu Walne à une salinité de 28 psu pour un éclairage continu. De plus, ces auteurs ont montré que le profil toxinique de cette souche est relativement dépendant des conditions environnementales rencontrées (salinité du milieu de culture et photopériode). Ainsi, la proportion maximale en spirolide 13.19-didesMeC est obtenue en utilisant le milieu L1, une salinité de 33 psu et une photopériode de 14h:10h (jour : nuit). Par contre, la proportion maximale en spirolides 13-desMeC est obtenue avec une culture en milieu L1 à une salinité de 28 psu et avec une photopériode similaire.



## **Partie II. RESULTATS & DISCUSSIONS**

Dans cette partie II, présentée en quatre chapitres, nous avons étudié la faisabilité de la détoxification des palourdes et des huîtres contaminées par des toxines émergentes (neurotoxines à action rapide) afin de mettre en place un procédé de décontamination.

Le chapitre I et III présentent les facteurs pouvant influencer la croissance et la toxicité des deux dinoflagellés concernés d'une part et les modes de culture pouvant être utilisé afin d'atteindre une biomasse nécessaire pour développer des expérimentations de contamination.

Le chapitre II et IV présentent les résultats i) des cinétiques de détoxification des palourdes contaminées par les gymnodimines et des huîtres contaminées par les spirolides en utilisant l'alimentation comme un procédé de détoxification ainsi que les durées nécessaires permettant d'obtenir des animaux conformes à la consommation humaine, ii) de l'impact physiologique de ces neurotoxines au niveau des organes accumulateurs des coquillages.

## CHAPITRE I. Croissance et toxicité de *Karenia selliformis*

### 1.1. Article 1- Influence of environmental parameters on *Karenia selliformis* toxin content in culture.

Article soumis le 11 août accepté le 03 décembre 2009 dans le journal  
'Cahiers de Biologie Marine'. (IF=0.873)

Cah. Biol. Mar. (2009) 50 : 333-342



### Influence of environmental parameters on *Karenia selliformis* toxin content in culture

Amel MEDHIOUB<sup>1</sup>, Walid MEDHIOUB<sup>3,2</sup>, Zouher AMZIL<sup>2</sup>, Manoella SIBAT<sup>2</sup>, Michèle BARDOUIL<sup>2</sup>, Idriss BEN NEILA<sup>3</sup>, Salah MEZGIANI<sup>3</sup>, Asma HAMZA<sup>1</sup> and Patrick LASSUS<sup>2</sup>

<sup>(1)</sup> *INSTM, Institut National des Sciences et Technologies de la Mer. Laboratoire d'Aquaculture, 28, rue 2 Mars 1934, 2025 Salambo, Tunisie. E-mail: amel.medhioub@instm.rnrt.tn*

<sup>(2)</sup> *IFREMER, Département Environnement, Microbiologie et Phycotoxines, BP 21105, 44311 Nantes, France.*

<sup>(3)</sup> *IRVT, Institut de la Recherche Vétérinaire de Tunisie, centre régional de Sfax. Route de l'aéroport, km 1, 3003 Sfax, Tunisie*

**Abstract:** *Karenia selliformis* strain GM94GAB was isolated in 1994 from the north of Sfax, Gabès gulf, Tunisia. This species, which produces gymnodimine (GYM) a cyclic imine, has since been responsible for chronic contamination of Tunisian clams. A study was made by culturing the microalgae on enriched Guillard f/2 medium. The influence of growing conditions on toxin content was studied, examining the effects of (i) different culture volumes (0.25 to 40 litre flasks), (ii) two temperature ranges (17-15°C et 20-21°C) and (iii) two salinities (36 and 44). Chemical analyses were made by mass spectrometry coupled with liquid chromatography (LC-MS/MS). Results showed that (i) the highest growth rate ( $0.34 \pm 0.14 \text{ div d}^{-1}$ ) was obtained at 20°C and a salinity of 36, (ii) GYM content expressed as  $\text{pg eq GYM cell}^{-1}$  increased with culture time. The neurotoxicity of *K. selliformis* extracts was confirmed by mouse bioassay. This study allowed us to calculate the minimal lethal dose (MLD) of gymnodimine (GYM) that kills a mouse, as a function of the number of *K. selliformis* cells extracted.

**Résumé :** *Influence des paramètres environnementaux sur la teneur en toxine d'une souche cultivée de Karenia selliformis.* La souche *Karenia selliformis* GM94GAB a été isolée en 1994 au nord de Sfax dans le golfe de Gabès (Tunisie). Depuis, cette espèce, productrice de la gymnodimine (GYM, imine cyclique) est responsable de la contamination chronique des palourdes en Tunisie. L'étude de l'influence des conditions de croissance sur le contenu toxinique de *K. selliformis*, en culture avec le milieu f/2 de Guillard, a porté sur (i) les volumes de culture (0.25 à 40 L), (ii) deux gammes de température (15-17°C et 20-21°C), (iii) deux salinités (36 et 44). L'analyse chimique a été réalisée en Chromatographie Liquide couplée à un Spectromètre de Masse (CL-SM/SM). Les résultats montrent que (i) le taux de croissance le plus élevé ( $0.34 \pm 0.14 \text{ div j}^{-1}$ ) est obtenu à la température de 20°C pour une salinité de 36, (ii) le contenu en GYM exprimé en  $\text{pg eq GYM cell}^{-1}$  augmente en fonction de l'âge de la culture. De plus, la neurotoxicité sur souris des extraits de *K. selliformis* a été confirmée. La dose minimale mortelle (DMM) de GYM pour la souris a été déterminée en fonction du nombre de cellules de *K. selliformis* extraites.

**Keywords :** *Karenia selliformis* • Growth • Toxicity • Gymnodimine • Mouse bioassay

Reçu le 11 août 2009 ; accepté après révision le 3 décembre 2009.  
Received 11 August 2009; accepted in revised form 3 December 2009.

## Résumé

Les premiers épisodes de l'apparition de blooms du dinoflagellé *Karenia selliformis* en haute mer ont été identifiés en 1988 dans le golfe de Gabès (Turki et Hamza, 2001). Ces phénomènes sont depuis, devenus fréquents et généralisés à plusieurs localités, affectant sérieusement les lagunes, les côtes abritées et les ressources aquatiques qui vivent.

Les blooms récurrents produits par *K. selliformis* dans le golfe de Gabès ont par ailleurs fortement altéré les écosystèmes côtiers de cette région et freiné le développement de leur exploitation. L'année 1994 fut remarquable en raison des importantes mortalités d'organismes marins qui furent constatées dans ce golfe. Depuis, l'occurrence d'épisodes d'efflorescences toxiques dans les eaux de transition (lagunaires et côtières) tunisiennes fait l'objet d'une surveillance continue à travers un réseau de surveillance des micro-algues toxiques.

L'objectif final de ce travail vise donc, entre autres, une meilleure compréhension des facteurs favorisant la croissance et la toxicité en laboratoire du dinoflagellé toxique *Karenia selliformis*, afin de développer des moyens permettant sa culture en masse pour pouvoir simuler expérimentalement les épisodes toxiques.

De plus, une meilleure compréhension des facteurs environnementaux permettra d'affiner les diagnostics portés, en particulier dans le cadre du réseau de surveillance, et d'améliorer la gestion de l'exploitation des stocks de coquillage en milieu naturel.

L'objectif de cette étude consistait à i) étudier l'influence des conditions de croissance sur le contenu toxique de cette espèce lorsqu'elle est cultivée en petit volume (erlens et ballons de culture), dans des conditions différentes de température (15-17 °C et 20-21 °C) et de salinité (36 et 44 psu), ii) évaluer les performances de croissance en grand volume et iii) déterminer la dose minimale mortelle (DMM) de GYM-A pour la souris à partir des cellules de *K. selliformis*.

Les résultats montrent que : i) lors de la culture en erlen de 1,5 l, le taux de croissance le plus élevé exprimé en division par jour est de  $\mu=0.34 \pm 0.14 \text{ div j}^{-1}$  et ceci pour une température de 20°C et pour une salinité de 36 psu alors que la toxicité maximale (18 pg eq GYM cell<sup>-1</sup>) est obtenue pour une même température et une salinité de 44 psu, ii) le contenu en GYM exprimé en pg eq GYM cell<sup>-1</sup> augmente en fonction de l'âge de la culture, iii) les essais réalisés en bac de 40 l sans agitation ont permis d'atteindre une concentration maximale de  $3 \cdot 10^4 \text{ cell ml}^{-1}$ . Cependant, les essais de culture de cette espèce en photobioréacteur ont montré une perturbation de la croissance dans des conditions d'agitation continue. C'est pour cette raison que des essais de culture en photobioréacteur horizontal ont été débutés (annexe 8) afin de développer des systèmes de cultures adaptés à une agitation discontinuée tout en

assurant des productions cellulaires et toxiques optimales. Enfin, la neurotoxicité de ce dinoflagellé a été confirmée par le bioessai sur souris. Les symptômes de toxicité qui suivent une injection intra-péritonéale chez ce rongeur sont : étirement, agitation du corps, sursauts successifs immédiatement après injection, queue tendue, mouvements ralentis, paralysie des membres postérieurs, respiration difficile, exophtalmie. Ces symptômes ont été suivis soit d'une mortalité 1 à 6 minutes après injection i.p à des doses létales élevées, soit, dans le cas d'une survie (doses non létales), d'une réapparition, après 20 minutes, d'un état normal chez les souris.

**Mots clés:** *Karenia selliformis*, croissance, toxicité, gymnodimine, bioessai sur souris.

**Abstract**

*Karenia selliformis* strain GM94GAB was isolated in 1994 from the north of Sfax, Gabès gulf, Tunisia. This species, which produces gymnodimine (GYM) a cyclic imine, has since been responsible for chronic contamination of Tunisian clams. A study was made by culturing the microalgae on enriched Guillard f/2 medium. The influence of growing conditions on toxin content was studied, examining the effects of (i) different culture volumes (0.25 to 40 litre flasks), (ii) two temperature ranges (17-15°C et 20-21°C) and (iii) two salinities (36 and 44 psu). Chemical analyses were made by mass spectrometry coupled with liquid chromatography (LC-MS/MS). Results showed 1) the highest growth rate ( $0.34 \pm 0.14$  div d<sup>-1</sup>) was obtained at 20 °C and 36 psu 2) GYM content expressed as pg eq GYM cell<sup>-1</sup> increased with culture time. The neurotoxicity of *K. selliformis* extracts was confirmed by mouse bioassay. This study allowed us to calculate the minimal lethal dose (MLD) of gymnodimine (GYM) that kills a mouse, as a function of the number of *K. selliformis* cells extracted.

**Key words:** *Karenia selliformis*, growth, toxicity, gymnodimine, mouse Bioassay.

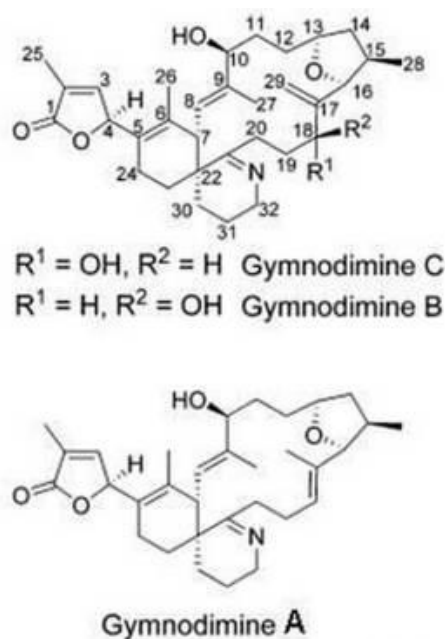
## 1. Introduction

The Gabès gulf in southern Tunisia is an important area for natural stocks of the grooved carpet shell, *Ruditapes decussatus* (Linné) for both local and national fisheries. Exploitation of these beds is a long tradition that supports around 8000 families and represents a source of income for the country. Unfortunately, over the last fourteen years, the production of this shellfish has been repeatedly affected by phycotoxin contaminations. The problem has been particularly recurrent at Boughrara lagoon (Hamza *et al.*, 1999; Hamza, 2003). In 1991, Guerloget signalled the presence of a toxic alga on the south Tunisian coasts. The species was first identified as *Gyrodinium aureolum* (Guerloget, 1991), then in 1994 as *Gymnodinium sp.* (Arzul *et al.*, 1995). Coloration of the waters of the Gabès gulf was seen for the first time in 1994, due to a cellular concentration of  $60 \times 10^6$  cells l<sup>-1</sup>, and mass fish mortality occurred (Hamza et El Abed., 1994; Hansen *et al.*, 2004). It was only in 2004, however, that this microalga was renamed *Karenia selliformis* (*K. selliformis*) by Haywood *et al.* (2004). The same species was also associated with high fish mortality on Kuwaiti coasts in 1999 (Heil *et al.*, 2001).

In the gulf of Gabès different toxic dinoflagellates were detected (Turki *et al.*, 2006; Feki *et al.*, 2008; Dammak-Zouari *et al.*, 2009). Moreover, several studies reported that *K. selliformis* is considered as the most problematic species in this gulf, causing 67 to 70 % of toxicity cases (Feki *et al.*, 2008; Dammak-Zouari *et al.*, 2009). During the past 10 years, the routine monitoring of this toxic dinoflagellate in the gulf of Gabès was correlated with abiotic conditions (Feki *et al.*, 2008). These last authors showed that blooms of *K. selliformis* were observed at three temperature levels (<18°C, between 18 and 22°C and > 22°C) and with preference for high salinities (42 g/l and 50 g/l in the Boughrara lagoon). Moreover, Dammak-Zouari *et al.* (2009) confirmed that blooms of *K. selliformis* are detected at high temperatures (>19°C) in all sampling stations except the Boughrara lagoon, which is characterized by high salinity (up to 52 g/l) and where blooms coincide with temperatures of 13 to 16 °C.

Figure 16 shows the structure of the basic toxin gymnodimine A (GYM), and its analogues (Seki *et al.*, 1995; Biré *et al.*, 2002 ; Miles *et al.*, 2000; 2003). This phycotoxin was discovered for the first time in 1994, in oysters (*Tiostrea chilensis*) from the Foveaux strait, New Zealand (Mackenzie *et al.*, 1995; 1996). In Tunisia, the relation between *Karenia* and GYM was confirmed by the work of Biré *et al.* (2002) on bivalve contamination. These contaminations have meant that the harvest and consumption of clams has been banned and

their production has fallen, which has had a serious economic impact for those working in this industry. A monitoring network, in place since 1995, guarantees products for export to the European Community and those for the home market. It relies on shellfish toxicity testing according to the official mouse test for lipophilic toxins (Yasumoto *et al.*, 1978), and on the detection of the presence of any toxic species.



**Figure 16.** GYM structure of A and its analogues B and C.

The strain GM94GAB of *K. selliformis*, isolated by E. Erard-Le Denn (Ifremer), was put into culture at the INSTM Centre de Monastir in June 2005.

To help reduce the economic impact of GYM contamination in clams, a project was started to study the feasibility of clam decontamination: '*Elevage Suivi Sanitaire et Détoxification des Animaux Filtreurs*' (ESSDAF) - Cultivation, sanitary supervision and detoxication of filtering animals.

Data were therefore needed on contamination kinetics. However, before any controlled contamination experiments could be done, a full technical understanding of *K. selliformis* culture was needed with the objective i) to produce *K. selliformis* cells of known toxicity and ii) to perform further contamination / decontamination trial on edible shellfish.

We examined the influence of the algal in culture environment, two temperature scales and two salinities, on the toxin content of cultured *K. selliformis*. The neurotoxicity of GYM was determined by the minimum lethal dose (MLD) of GYM by intraperitoneal (ip) administration to mice, using extracts of cultured *K. selliformis*. Measurement of toxin

content was made by chemical analysis using Liquid Chromatography coupled with Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS).

## **2. Materials and Methods**

### ***Culture and growth conditions***

The strain GM94GAB of *K. selliformis*, isolated by E. Erard-Le Denn (Ifremer) and in culture at the INSTM Centre de Monastir since June 2005, was used in the present study. A certified standard solution of GYM was supplied by the Conseil National de Recherche Canadien (CNRC), Halifax, Canada.

*K. selliformis* was cultivated in natural seawater at two salinities: 36 and 44 psu. All seawater was filtered at 1 µm and autoclaved. The cultures were set up in f/2 culture medium (Guillard et Ryther, 1962; Guillard, 1975), without aeration, in flasks and tanks of different sizes: 0.25, 1, 1.5, 2, 8, 15 and 40 l (table 6). Experiments released in small and larger cultures were performed three times (n=3).

The experiments were done at two temperature ranges 15-17 °C and 20-21°C, under a light intensity of 45 µmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> provided by "cool white" fluorescent tube with a photoperiod of 12 h light/12 h dark.

To isolate other clones of *K. selliformis*, water samples were taken from different stations situated in the Gulf of Gabès. The choice of the temperature and salinity is based on the measures of these two factors during the sampling from coastal water of this Gulf.

Every 2 to 7 days, temperature and pH were measured and *K. selliformis* cell counts were made under the microscope using a Sedgwick Rafter<sup>®</sup> counting cell. Maximum cell yield was calculated as the difference between initial cell concentrations (at D<sub>0</sub>) and final cell concentrations (Mountfort *et al.*, 2006).

### ***Sampling and extraction of cultured K. selliformis***

For the chemical analysis of gymnodimine (GYM), three samples (n=3) of 10 to 100 ml were taken, then extracted and pooled every 7 days from cultures of 250 ml, 1, 2 and 8 l. Concerning culture used in 1.5 l, samples were taken: at the end of the exponential phase (D<sub>30</sub> at 15 °C, D<sub>32</sub> at 17 °C and D<sub>11</sub> at 20 °C) and in the decline phase (D<sub>35</sub> at 15 °C, D<sub>40</sub> at 17 °C et D<sub>13</sub> at 20 °C).

For the mouse bioassay, three samples (n=3) of 100 to 300 ml were taken, then extracted and pooled from culture of 1.5 l during each of these two phases: at the end of exponential growth (D<sub>32</sub> at 17 °C and D<sub>11</sub> at 20 °C) and during the decline phase (D<sub>40</sub> at 17 °C and D<sub>13</sub> at 20 °C).



The two types of sample were immediately centrifuged at 4000 rpm for 25 min. GYM was extracted from the cellular residues with 1 ml methanol (4 x 250 µl), followed by 20 min treatment with an ultrasound probe to ensure cell disruption.

Conditions of extract conservation depended on the method of analysis: i) for chemical analyses, conservation was done in methanol at -80 °C; ii) for bioassays, the methanol was evaporated and the sample taken up in 1 ml Tween 60 at 1% (polyoxyethylene sorbitan monostearate) conservation at -20°C.

### ***Mouse Bioassay***

The bioassay used was the official mouse test for detection of lipophilic toxins (including 'diarrhetic shellfish poisoning' DSP toxins) (Yasumoto *et al.*, 1978). These tests were done in an officially approved laboratory at INRVT-Centre régional de Sfax. For each mouse test, three mice (Swiss females) of 19 to 21 g were used. Each received 1 ml of the test solution by ip administration. The treated mice were kept under observation to note any symptoms and the duration of their survival.

To determine the minimum lethal dose (MLD) of GYM that can kill a mouse, different dilutions of the extracts of cultured *K. selliformis* were made in Tween 60 at 1%. The MLD was calculated from the GYM concentration per cell of *Karenia* determined by chemical analysis and given in µg GYM per Kg mouse weight. A series of doses were tested on mice to determine the MLD of GYM: 75, 80, 84, 86, 95, 100, 107, 120, 141, 150, 157, 175, 187, 200, 228, 250 µg Kg<sup>-1</sup>.

### ***Chemical analysis by LC-SM/SM***

The chemical analysis of GYM levels in cultured *K. selliformis* were made by liquid chromatography coupled to a triple quadrupole mass spectrometer API 2000 (LC-SM/SM) according to a method modified from Quilliam *et al.*, (2001). Concentrations were expressed in picograms of GYM per cell of *K. selliformis*. (pg eq GYM cell<sup>-1</sup>)

### ***Statistical analysis***

Experimental data were analysed using Statistica 5.5 software. During all experiment, the effects of temperature, salinity and volume culture on the growth of the toxic dinoflagellate *K. selliformis* used in this study were assessed using one or two factorial ANOVAs. The variance homogeneity of the data was checked using box M test. The growth rate was arcsin(x) transformed. For P-values less than 0.05, differences between growth rates were considered statistically significant at a 95% confidence level.

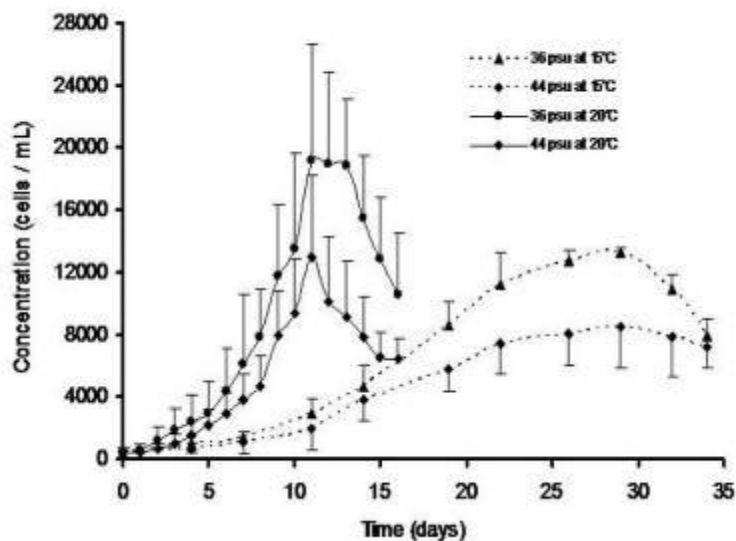
### 3. Results

#### *Cellular growth of K. selliformis cultures*

Data on culture conditions, growth (Fig. 17) and cellular GYM concentrations (eq. GYM-A by cell) are given in table 6. The growth (growth rate, cell yield and cellular concentration) of the toxic dinoflagellate was studied by examining the effects of volume, salinity and temperature. The growth rate of *K. selliformis* cultivated in 0.25, 1 and 2 l at 16°C and 36 psu (I: table 6) showed a significant difference ( $P>0.05$ ) than the one cultivated in 8 l. The maximum cell yield and concentration of *K. selliformis* were obtained at D<sub>21</sub> (24 930 cell ml<sup>-1</sup> and 27 000 cell ml<sup>-1</sup>, respectively) in a culture volume of 1 l at 36 psu salinity.

In the same way, the growth rates of *K. selliformis* cultivated in 1,5, 15 and 40 l in the range of temperature 20-21°C at a salinity of 36 psu (IV, table 6) were significantly different ( $P>0.05$ ). The highest growth rate was found in 1,5 l. However the lowest was seen in culture volume of 40 l.

The maximum cell yield and concentration of *K. selliformis* obtained at D<sub>11</sub> (18222 cell ml<sup>-1</sup> and 19166 cell ml<sup>-1</sup> respectively) in culture volume of 1,5 l at 36 psu.



**Figure 17:** Growth of *K. selliformis* in volume of 1,5 l at two temperatures and two salinities: 15 and 20°C, 36 and 44 psu.

In the two ranges of temperature 15-17°C and 20°C (II, table 6) we saw no significant difference ( $P<0.05$ ) in the growth rate of *K. Selliformis* cultivated in 1.5 l at two salinity (36 and 44 psu) (II, table 6). However, a significant difference ( $P>0.05$ ) was obtained in the growth rate between these temperature ranges. At 20 °C, maximum division rates of 0.30 and 0.34 div.d<sup>-1</sup> were seen at 36 and 44 psu, respectively, in a final culture volume of 1.5 l, with

maximum cell yield and concentration reached at D<sub>11</sub>. Also, when *K. selliformis* cultivated in larger culture of 40 l (III. table 6) at two salinity (36 and 44 psu), there was no significant difference in growth rate ( $P < 0.05$ ).

### ***Toxicity***

Cellular GYM concentrations, measured by LC-MS/MS chemical analysis, are shown in table 6. An example of analytical results for cultured *K. selliformis* is given in figure 18, showing the presence of GYM A in all samples, and GYM B at trace levels ( $< 0.3\%$ ). Our results showed that at all temperatures and salinities used cellular GYM concentrations increased with the age of the *K. selliformis* cultures. At D<sub>21</sub>, table 6 showed that the maximum GYM concentration at decline phase was higher in the cultures grown at 44 psu (18.2 pg at eq GYM cell<sup>-1</sup>) than those at 36 psu at the same phase (2 to 10 eq GYM cell<sup>-1</sup>).

**Tableau 6.** Culture conditions, growth and toxin content of *K. selliformis* culture

	Culture vessel	Volume (ml)	Temperature (°C)	Salinity (psu)	Maximum cell yield (cell mL <sup>-1</sup> )*	Maximum cell production rate (cell mL <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> )	μ (div d <sup>-1</sup> )	Standard deviation	GYM (pg cell <sup>-1</sup> ) D7 - D14 - D21
<b>I</b>	<b>Erlenmeyer</b>	250	16	36	17330	19300 D21	0.11 <sup>a</sup>	0.05	8.3- 9.3 - 22.4
		1000			24930	27000 D21	0.12 <sup>a</sup>	0.06	5.6 - 12.1 - 12.9
		2000			17000	19100 D21	0.11 <sup>a</sup>	0.04	5.3 - 10.5 - 8.1
		8000			2570	4600 D14	0.06 <sup>b</sup>	0.07	2,1 - 5.6
									<b>exp φ / decline φ</b>
<b>II</b>	<b>Erlenmeyer</b>	1500	15	36	12874	13317 D29	0.11 <sup>c</sup>	0.06	2.1
			17		17475	17934 D32	0.14 <sup>c</sup>	0.07	1.2 - 3.4
			20		18722	19166 D11	0.34 <sup>d</sup>	0.14	5.1 - 10.05
			15	44	7960	8502 D29	0.10 <sup>c</sup>	0.06	6.4 - 18.2
			17		10670	11164 D24	0.13 <sup>c</sup>	0.06	1.6 - 12.6
			20		10201	12320 D11	0.3 <sup>d</sup>	0.17	9.5 - 18.2
<b>III</b>	<b>Tank</b>	40000	21	36	8380	8900 D18	0.15 <sup>e</sup>	0.05	Not done
	<b>Erlenmeyer</b>	1500		44	3960	4380 D18	0.13 <sup>e</sup>	0.07	
<b>IV</b>	<b>Flask</b>	15000	19.8	36	18722	19166 D11	0.34 <sup>f</sup>	0.14	Not done
	<b>Tank</b>	40000	21		2973	5000 D20	0.09 <sup>g</sup>	0.05	
					8380	8900 D18	0.15 <sup>h</sup>	0.05	

Different letters indicate significantly different values (P=0.05) according to ANOVAs test.

Les différentes lettres indiquées représentent les différences significatives selon le test ANOVAs.

(I): Effect of culture volume on the growth rate of *K. selliformis* at 16°C and 36 psu.

(I): Effet du volume de culture sur le taux de croissance de *K. selliformis* cultivé à 16°C et à 36 psu.

(II): Effects of temperature and salinities on growth rate of *K. selliformis* in Erlenmeyer culture of 1.5 l

(II): Effet de la température et de la salinité sur le taux de croissance de *K. selliformis* cultivé dans un Erlen de 1.5 l.

(III): Effect of salinities on the growth rate of *K. selliformis* in tank culture.

(III): Effet de la salinité sur le taux de croissance de *K. selliformis* cultivé dans des bac de 40 l.

(IV): Effect of culture volume on the growth rate of *K. selliformis* at 20°C and 36 psu.

(IV): Effet du volume de culture sur le taux de croissance de *K. selliformis* cultivé à 20°C et 36 psu.

**Tableau 7.** Doses minimales mortelles (DMM) pour la souris exprimées en nombre de cellules de *K. selliformis* (extrait injecté aux souris), ainsi qu'en  $\mu\text{g GYM Kg}^{-1}$  de souris.

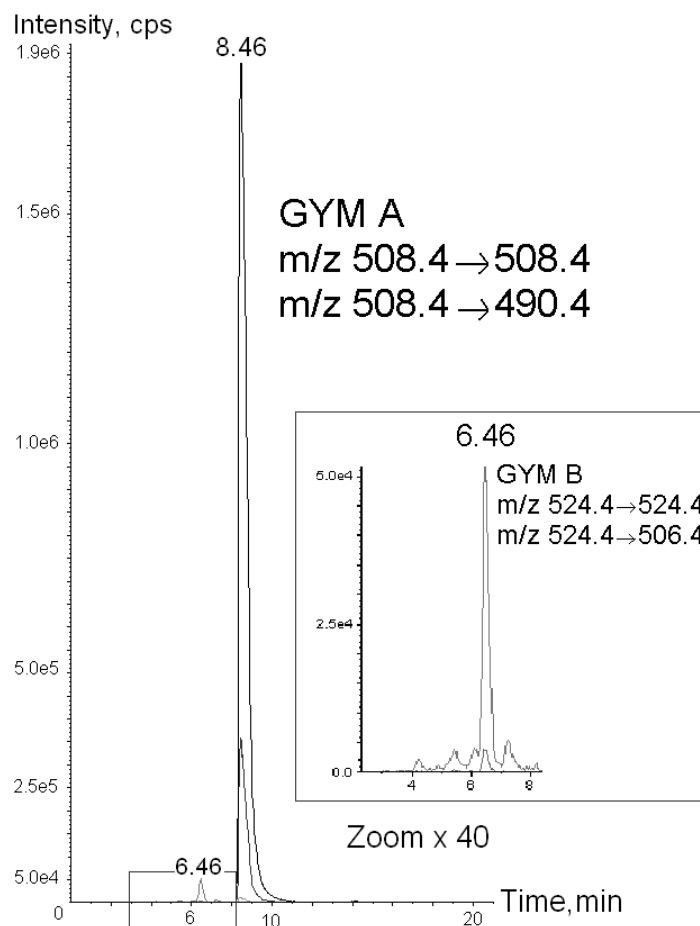
Salinity and Temperature	Exponential phase		Decline phase	
	Number of cells $\times 10^3$	GYM $\mu\text{g Kg}^{-1}$	Number of cells $\times 10^3$	GYM $\mu\text{g Kg}^{-1}$
36 psu 20 °C	700 $\pm$ 53	175	485 $\pm$ 15	157
44 psu 20 °C	404 $\pm$ 17,5	187	251 $\pm$ 23	228
36 psu 17 °C	1 440, 36 $\pm$ 98	86	770 $\pm$ 26,5	84
44 psu 17 °C	1 340 $\pm$ 95	107	224 $\pm$ 24	141

The MLD of the GYM for mouse was determined from *K. selliformis* culture extracts with variable cellular GYM concentration. Table 7 shows the doses of GYM that were lethal to mice, according to the growth phase, salinity and temperature of the algal cultures. Whatever the salinity (36 or 44 psu) or the temperature (17 or 20 °C), the number of cells needed was high during the exponential phase than in the decline phase.

Depending on the culture conditions, the MLD to a mouse varied from 84 to 228 eq GYM  $\text{Kg}^{-1}$  mouse weight (table 7). However, when considering the same culture, the MLD (eq GYM  $\text{Kg}^{-1}$ ) obtained in the exponential phase was similar to that obtained in the decline phase.

Moreover, our studies showed that the MLD of cultures grown at 20 °C was higher than those of culture grown at 17 °C (table 7).

The symptoms of toxicity observed in the mice were stretching, hyperactivity, jumping immediately after injection, stiff tail, slowed movements, paralysis of the hind legs, breathing difficulties and exophthalmoses. These symptoms were followed either by death 3 to 7 minutes later at the MLD or by a recovery to a normal state after about 20 minutes.



**Figure 18.** Culture extract of *K. selliformis*: analytical results in LC-MS/MS showing the presence of GYM A in all samples, and GYM B at trace levels (< 0.3 %).

## 4. Discussion

### *Growth*

In the Gabès gulf, *K. selliformis* occurs in waters of different salinities: 36-37, 39-40, 41-44 and 47-52 psu. There is also a salinity gradient running from the north to the south of the gulf. The lowest salinities are found to the north of Sfax, while the highest salinities are found further to the south. At Boughrara, salinity in the winter period is 41-44 and can reach 47-52 psu in summer. These data which were recorded during our samplings are confirmed by the work of Feki *et al.* (2008) and Dammak-Zouari *et al.* (2009). These authors, showed that blooms of *K. selliformis* are observed at various temperatures (<18°C, between 18 and 22°C, >22°C) and with preference of high salinity (> 42g/l). For this reason we choose to study algal growth and toxicity at these two salinities (36 and 44) and at these two temperatures ranges (15-17 °C and 20-21°C). Although the acclimation of *K. selliformis* to 36-52 psu causes no particular problems or fundamental changes in the behaviour of these cells, this microalga does seem highly sensitive to temperature variation.

Several studies have been made on the effect of salinity on growth and toxicity of dinoflagellates such as *Alexandrium ostenfeldii* (Maclean *et al.*, 2003), *Karenia brevis* (Magana and Villareal, 2006) and *Karenia spp* (Maier Brown *et al.*, 2006), but no specific study had been made on the effect of salinity on the growth and toxicity of *K. selliformis* before now. Our study shows that these microalgae can grow at a similar rate at 36 and 44 psu if the temperature is within the same range. The maximum growth rates at salinities 36 and 44 psu were found at 20 °C (0.34 and 0.30 div d<sup>-1</sup>, respectively); though the rates for these same salinities were considerably lower at 17 °C (0.14 and 0.13 div d<sup>-1</sup>, respectively) in the same culture volume. In a similar way, MacKenzie *et al.* (2002) reported a maximum growth rate of *K. selliformis* (0.18 div d<sup>-1</sup>) at 18°C.

Under the conditions used to culture *K. selliformis* in this study (table 6), maximum growth (growth rate, cellular concentration) was obtained in small volumes (0.25 to 2 l), while the lowest growth was observed in the largest volumes (8 to 40 l).

These results agree with the study by Mountfort *et al.* (2006), who showed that the highest growth rate and maximum cell yield of *K. selliformis* (0.27 and  $210.2 \times 10^3$  cell ml<sup>-1</sup>, respectively) were obtained in volumes of 5 ml (plate wells) rather in the larger volumes used (15 L) (0.04, and  $41.4 \times 10^3$  cell ml<sup>-1</sup>). Even though the maximum cell yield obtained in plate wells is higher than any obtained in the volumes tested in the present study, 5 ml is not a practical volume for future contamination tests, which will require a very high biomass of *K. selliformis*.

In this present study, culture of *K. selliformis* during all experimental conditions did not show any effects of photoinhibition because the light intensity (45  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) used in all experiments was lower than the one observed in areas (Bouhrara lagoon) where blooms of *K. selliformis* occurred. Moreover, to determine optimal light for growth of *K. selliformis*, further experiments will be needed with different light intensities.

It is generally known that the cultures of dinoflagellates are more fragile than other microalgae currently cultivated in batch or continuous flow culture (photobioreactors) with considerable evidence of negative effects from aeration condition and as such offer a challenge to microalgal biomass production.

In this study, the low growth of *K. selliformis* obtained in larger cultures without aeration was attributed to the culture volume (I, IV, table 6). Indeed, White (1976) and Pollinger et Zemel (1981) were the first to demonstrate experimentally that agitation, shaking, aeration and stirring inhibit dinoflagellate growth rate and can lead to mortality, if

sustained or intensified. These last authors found also, that turbulence disrupts the cellular clock, mitotic cycle, and alters nucleic acid concentrations.

### ***Toxin content***

Under the conditions used to culture *K. selliformis* in this study, the lowest cellular concentration of GYM was found in the largest volume we analysed (8 l). It should be noted that this concentration appears to decrease as the culture volume increases.

GYM production by *K. selliformis* has already been described elsewhere (Seki *et al.*, 1995; Miles *et al.*, 2000; Mackenzie *et al.*, 2002). The analysis of GYM in the particulate (cellular) and dissolved fractions of sampled batch culture of this microalga (Mackenzie *et al.*, 2002) show that the toxin is produced at a relatively stable rate over most of the algal growth cycle. Up to 50% of the GYM remains in the dissolved form in the culture medium at the start of the growth phase, but this proportion rapidly falls during the exponential and stationary phases. More than 70 % of the toxin is associated with cells during the exponential and stationary phases. Indeed, the GYM is characterized by its instability at neutral and high pH (Miles *et al.*, 1999b), it is likely that a significant decomposition of this toxin takes place during the experiment when the pH reaches the range 8.1-8.7. Such GYM decomposition was confirmed and estimated at a rate of approximately 5% per day (Mackenzie *et al.*, 2002). These authors indicated that the cause of the gym dissolution in the surrounding environment is unknown suggesting that it is the result of either an active process of *K. selliformis* cells excretion, a passive loss of these cells, or a release of the GYM in the middle due to cell lysis. In addition, these same authors reported that the GYM seems as a rather stable component in the cell, but its presence in significant amounts in the dissolved form in the medium suggest the possibility of an ectocrine function which confers an ecological advantage to *K. selliformis*.

In our own study, GYM was only quantified in the cellular fraction. However, the concentration of GYM seems to increase with the age of the cultures and was higher during the decline phase (senescence). We could expect a higher toxicity in coastal waters when a proliferation of this alga is prolonged. A higher toxicity could then to risk therefore arise when clams were exposed to long lasting blooms.

In the same way, brevetoxin (measured in cultured *K. brevis*) showed a higher level in the stationary phase, due to a higher accumulation of this toxin in senescent cells (Magaña and Villareal, 2006). The authors also suggested that as a natural bloom ages it becomes more toxic and thus becomes a greater public health risk.



Effects of environmental factors including salinity on cellular growth and toxin production have been studied for several species of dinoflagellate (Cembella, 1998; Grzebyk *et al.*, 2003). In our study, salinity may affect the toxin content of *K. selliformis*. Indeed, the maximal toxicity was obtained at the highest salinity (44 psu) examined (table 6).

Salinity is a factor that affects brevetoxin production in the raphidophyceae. In *Heterosigma akashiwo*, low salinities correspond to the highest levels of brevetoxins (Haque and Onoue, 2002a), and two *Chattonella* species show a higher toxicity at medium salinity (25 psu) and low toxicity at high salinities (Haque and Oneoue, 2002b). In *K. brevis*, however, the effect of salinity on toxin production is complex, as some studies have shown that maximum toxicity is achieved during the stationary phase for tested salinities (20, 30 and 40 psu) (Kim and Martin, 1974; Maier Brown *et al.*, 2006).

GYM is a cyclic imine whose structure was first elucidated by nuclear magnetic resonance (Seki *et al.*, 1995), then confirmed by X ray crystallography (Stewart *et al.*, 1997). It has a number of characteristics in common with other active compounds like the spirolides (Hu *et al.*, 1995), pinnatoxins (Uemura *et al.*, 1995) and prorocontrolides (Hu *et al.*, 2001). Although GYM toxicity to mice is low by oral administration ( $LD_{50} = 755 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ) it is higher and more rapid following ip administration ( $LD_{50} = 96 \mu\text{g Kg}^{-1}$ ) (Miles *et al.*, 1999b, Munday *et al.*, 2004). This method of injection is used in surveillance of lipophilic toxins (including diarrhetic toxins). According to these authors, the MLD by ip injection to mice varied from  $450 \mu\text{g Kg}^{-1}$  (Seki *et al.*, 1995) to  $700 \mu\text{g Kg}^{-1}$  (Stewart *et al.*, 1997). However, the MLD found for mice in the present study varied from 84 to  $228 \mu\text{g Kg}^{-1}$ . Though this range is large, the maximum values recorded are clearly lower than those cited in the literature.

As GYM is extracted directly from *K. selliformis* cells, our results reflect the purity of our material, which could partially explain this difference. In the same way, the combined effect of salinity and temperature on toxin production appears to be complex, which could contribute to explaining the observed variation in MLD. Also, this variation could be explained by the nature of the bio test. For this reason, further studies will be needed to investigate experimental plan with two factors (salinity and temperature) on the MLD of gymnodimine to mice.

Additionally, in contrast to the amount of toxin produced, the number of cells needed to reach the MLD seems to be higher in the exponential phase than in the decline phase.

The values we obtained are close to the cellular concentrations reported to have caused shellfish contamination (alert conditions) in the Gabès gulf or mortality of marine organisms in the Sfax region: 1000 and  $60 \times 10^6$  cells  $l^{-1}$ , respectively (Hamza and El Abed, 1994)

One characteristic of GYM, like other spiroimines including GYM B, is the rapid mortality they induce in ip injected mice bioassays (Miles *et al.*, 2000). For this reason they are known as “fast-acting toxins” (FAT) (Munday *et al.*, 2004). The same authors also reported that mortality occurred less than one minute after administration of lethal doses, but that there was no further mortality after 10-11 min. Seki *et al.* (1996) noted that death of mice occurred between 5 and 15 minutes after the administration of the lethal dose. In the present study, mortality occurred between 3 and 7 minutes for MLD, preceded by the same symptoms as those described by Seki *et al.* (1996) and Munday *et al.* (2004). There seems to be a great similarity between these intoxication symptoms and those recently described for 13-desmethyl-C-spirolide (Gill *et al.*, 2003).

During the mouse tests we performed, some injected doses were not lethal even though they caused characteristic FAT symptoms over the first 10 minutes. The symptoms gradually disappeared and the mice presented a normal state after 20 min. The same observations were made by Seki *et al.* (1996) and referred to as “sub-lethal” by Munday *et al.* (2004).

In conclusion, the results we gathered produced a dataset on *K. selliformis* growth and toxicity determined under the following experimental conditions: culture volumes 0.25 to 40 l, two temperatures ranges (15-17 or 20-21°C), two salinities (36, and 44 psu), a single light level ( $45 \mu\text{mol photons m}^2 \text{s}^{-1}$ ), and a photoperiod of 12h light/12h dark. Overall, growth rates were similar for the different salinities tested, but varied depending on the temperature (0.11-0.10, 0.14-0.13 and 0.34-0.30  $\text{div d}^{-1}$  at 15, 17 and 20°C, respectively, table 6). Toxicity of the cultures seems to be increase with age. The neurotoxicity of this dinoflagellate was confirmed by the bioassay test, and the MLD for mouse was determined as a function of the number of *K. selliformis* cells on which the extraction was made. In contrast to the quantity of toxin produced, the number of cells necessary to reach the MLD may be higher in the exponential phase than in the decline phase.

It would be interesting to continue this study with a comparison of different techniques of mass culture of *Karenia* (in tanks, a horizontal photobioreactor or in static culture with or without CO<sub>2</sub>). Moreover, further studies will be needed to investigate the relationship between growth and the production of gymnodimine at different levels of light intensity and salinity with the aim of optimising the production of this microalga in the laboratory. Biomass of *K. selliformis* could then constitute a good support to study the experimental contamination and

detoxification kinetics of the grooved carpet shell *R. decussatus* (Medhioub *et al.*, 2009) in order to develop, validate and propose to shellfish farmer a detoxification procedure within a short time. Such study would limit the economic impact at the closure of production areas affected by *K. selliformis*.

***Acknowledgements***

This study was carried out in the cadre of partnership INSTM-IFREMER between the Laboratory of Aquaculture / project detoxification of shellfish from the center of Monastir and the Environment Department, Microbiology and Phycotoxines of Nantes. The authors thank the INSTM Tunisia and the IFREMER France for participation to financial support of this study.

**CHAPITRE II. Etude de la détoxification de palourdes  
contaminées par les gymnodimines**

## 1. Introduction

En Tunisie, la quasi-totalité de la production des mollusques bivalves est constituée par la palourde *Ruditapes decussatus*. Cependant la vénériculture est aujourd'hui en crise. En 1995, la Tunisie exportait 1200 tonnes de palourdes vers les pays européens sur la base d'un stock exploité naturellement et estimé à 1500 tonnes. En 1997, suite à l'apparition et à l'identification de *Karenia selliformis* comme organisme responsable de la contamination, la production a été limitée à seulement 300 tonnes. Ceci représentait non seulement un manque à gagner pour l'exploitation globales, mais aussi un problème considérable pour 6000 personnes (Dammak-Zouari *et al.*, 2009) pratiquant la pêche à pied. C'est dans ce contexte que s'inscrit ce travail qui a pour but de détoxifier artificiellement des palourdes contaminées. Ce travail s'inscrit également dans une démarche de recherche de solutions pratiques pour la gestion des palourdes de pêche afin d'assurer un approvisionnement continu du marché.

Différents procédés (ozone, pH, température) ont été mis au point dans le but de réduire le contenu en toxines dans les bivalves comestibles (Schwinghamer *et al.*, 1994 ; Blogoslawski 1988 ; Lassus *et al.*, 2002, 2005 ; Guéguen *et al.*, 2008a ; 2008b ; Madenwald 1985, Marcaillou-Le Baut *et al.* 1993, Blanco *et al.* 1997, Bricelj et Shumway 1998, Blanco *et al.* 1999, Svensson 2003, Duinker *et al.* 2007). Dans notre travail, l'apport de la nourriture non toxique a été choisi comme un moyen simple pour accélérer la détoxification des palourdes contaminées par les gymnodimines. Ainsi, pour étudier l'impact de l'alimentation sur les cinétiques de détoxification des palourdes, deux approches ont été adoptées :

- **Approche expérimentale**, qui consiste à simuler les épisodes de contamination naturelle au laboratoire et à étudier les cinétiques de détoxification.
- **Approche naturelle**, qui consiste à étudier les cinétiques de détoxification des palourdes originaires de la lagune de Boughrara (Golfe de Gabès) et contaminées par les gymnodimines.

Ces travaux de recherche viennent compléter des résultats obtenus ces dernières années dans le cadre des projets menés par L'Institut National des Sciences et Techniques de la Mer (INSTM), en collaboration avec l'Institut Français de Recherche et d'Exploitation de la Mer (Ifremer). Il s'agit essentiellement des programmes ESSDAF (2003-2006) et ANTESSAB (2007/2010).

## 2. Approche expérimentale

### Article 2- Detoxification enhancement in the gymnodimine-contaminated grooved carpet shell, *Ruditapes decussatus* (Linné)

Article soumis le 07 août accepté le 07 octobre 2009 dans le journal 'Harmful Algae'

(IF= 2.572)

Harmful Algae 9 (2010) 200–207



### Detoxification enhancement in the gymnodimine-contaminated grooved carpet shell, *Ruditapes decussatus* (Linné)

Medhioub Walid<sup>a,b,\*</sup>, Guéguen Marielle<sup>a</sup>, Lassus Patrick<sup>a</sup>, Bardouil Michèle<sup>a</sup>, Truquet Philippe<sup>a</sup>, Sibat Manoella<sup>a</sup>, Medhioub Néjib<sup>b</sup>, Soudant Philippe<sup>c</sup>, Kraiem Mejdeddine<sup>b</sup>, Amzil Zouher<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire Phycotoxines, IFREMER, Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (Ifremer), BP 21105, 44311 Nantes Cedex 3, France

<sup>b</sup> Laboratoire d'Aquaculture, INSTM, Institut National des Sciences et Technologies de la Mer, Route de Kniss - 5000 Monastir, Tunisia

<sup>c</sup> Université de Bretagne Occidentale – IUEM, LEMAR CNRS UMR 6539, Place Nicolas Copernic, technopôle Brest Iroise - 29280 Plouzané, France

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 7 August 2009

Received in revised form 7 October 2009

Accepted 7 October 2009

##### Keywords:

Detoxification

Toxicity

Gymnodimine

*Karenia selliformis*

Grooved carpet shell

*Ruditapes decussatus*

#### ABSTRACT

In the Gulf of Gabès (Tunisia, Eastern Mediterranean sea), the grooved carpet shell *Ruditapes decussatus* has been seen to contain persistent levels of gymnodimine (GYM) for several years. The present experimental work represents the first attempt to assess detoxification kinetics of fast-acting toxins (FAT) in marine molluscs fed specific diets of non-toxic algae (*Isochrysis galbana*).

To find an optimal detoxification method, two experiments were performed in which clams were first fed the toxic dinoflagellate *Karenia selliformis* to artificially contaminate them with GYM, thus simulating the effect of natural toxic episodes. As a second step, the same clams were fed a non-toxic algae, *I. galbana*, to speed up the detoxification process.

Changes in toxin content over the whole experiment were assessed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis.

The first results revealed (i) faster detoxification rates in digestive gland (DG) when clams were fed on *I. galbana* compared with a starved control (no food) and (ii) a typical detoxification pattern, i.e. a rapid drop in toxin content within the first days followed by a secondary slower decrease. GYM levels could be reduced approximately to less than 5% within 7–8 days in clams fed *I. galbana*, according to the initial toxin levels of 1400 and 9400 µg GYM/kg of DG, respectively. At the end of the second experiment, DSP mouse bioassay was negative when GYM was less than 100 µg/kg DG.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

#### 1. Introduction

At least five human syndromes are recognized to be induced by the consumption of phycotoxin-contaminated seafood worldwide. These fall into several groups: paralytic shellfish poisoning (PSP), amnesic shellfish poisoning (ASP), diarrhetic shellfish poisoning (DSP), neurotoxic shellfish poisoning (NSP) and ciguatera fish poisoning (CFP). There is, therefore, a growing consensus among scientists that the presence of toxic phytoplankton in coastal waters is of great significance for human health. The problem also causes serious economic losses due to periodic closure of commercial shellfisheries.

Gymnodimine (GYM) was isolated as a toxic substance from oysters and is unique in containing butenolide, a 16-membered carbocycle and cyclic imine moieties. GYM was chemically

characterized by different investigators (Seki et al., 1995; Miles et al., 2000, 2003) (Fig. 1). The biogenetic origin of gymnodimine was identified as the dinoflagellate *Karenia selliformis*. Two analogs, gymnodimine-B and gymnodimine-C were also isolated from this dinoflagellate (Miles et al., 2000, 2003).

The presence of a spirocyclic imine indicated that this marine toxin belongs to the cyclic imines family, which already includes pinnatoxins (Uemura et al., 1995), pteriatoxins (Takada et al., 2001), prorocentrolides (Chou et al., 1996) and spiroclides (Hu et al., 1995).

GYM was later on shown to be widely distributed along New Zealand coastlines, but generally at a low concentration (Stirling, 2001), and was recently identified in digestive gland tissues of clams *Ruditapes decussatus* from Tunisia (Biré et al., 2002). GYM has also been observed in many other species of contaminated shellfish, including greenshell mussel, blue mussel, scallop, cockle, surfclam, oyster and abalone (MacKenzie et al., 1996, 2002; Stirling, 2001). Furthermore, the toxin is not readily depurated from shellfish, and may persist for years, for example in oysters (MacKenzie et al., 2002).

More recently, GYM-A has been unequivocally detected in shellfish from European and North American coasts (Kharat et al.,

\* Corresponding author at: Laboratoire Phycotoxines, IFREMER, Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (Ifremer), BP21105, 44311 Nantes Cedex 3, France. Tel.: +33 240374272.  
E-mail address: Walid.Medhioub@ifremer.fr (M. Walid).

## Résumé

La palourde *Ruditapes decussatus* du golfe de Gabès est contaminée d'une façon répétitive par une micro-algue toxique, *Karenia selliformis*, productrice de gymnodimine.

Dans le but d'optimiser la méthode de décontamination, deux expériences ont été réalisées. Dans un premier temps, les palourdes ont été contaminées artificiellement par *Karenia selliformis* et ensuite décontaminées en utilisant la micro-algue non toxique *Isochrysis galbana* pour accélérer le processus de détoxification.

Le suivi de la toxicité pendant la décontamination a été réalisé au moyen d'une chromatographie liquide couplée à un double spectromètre de masse (CL/SM/SM).

Les résultats ont montrés : i) l'importance de la présence de phytoplancton non toxique dans l'eau de mer pour accélérer la détoxification au niveau de la glande digestive, ii) un aspect biphasique de la cinétique de décontamination des palourdes, i.e une première phase correspond à une baisse importante de la concentration en GYM suivie par une deuxième phase marquée par un ralentissement de la cinétique de détoxification, iii) après 7 et 8 jours de détoxification de palourdes alimentées avec *I. galbana*, le niveau initial en GYM est réduit à 5 % par rapport au niveau initial correspondant à 1400  $\mu\text{g GYM Kg}^{-1}$  de glande digestive (GD) et 9400  $\mu\text{g GYM Kg}^{-1}$  de GD. A la fin de la deuxième expérience de détoxification, le bioessai sur souris (DSP) est négatif et correspond à une concentration inférieure à 100  $\mu\text{g GYM Kg}^{-1}$  de GD.

**Mots clés:** Détoxification, toxicité, gymnodimine, *Karenia selliformis*, *Ruditapes decussatus*.

**Abstract**

In the Gulf of Gabès (Tunisia, Eastern Mediterranean sea), the grooved carpet shell *Ruditapes decussatus* has been seen to contain persistent levels of Gymnodimine (GYM) for several years. The present experimental work represents the first attempt to assess detoxification kinetics of fast-acting toxins (FAT) in marine molluscs fed specific diets of nontoxic algae (*Isochrysis galbana*).

To find an optimal detoxification method, two experiments were performed in which clams were first fed the toxic dinoflagellate *Karenia selliformis* to artificially contaminate them with GYM, thus simulating the effect of natural toxic episodes. As a second step, the same clams were fed a nontoxic algae, *Isochrysis galbana*, to speed up the detoxification process.

Changes in toxin content over the whole experiment were assessed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) analysis.

The first results revealed i) faster detoxification rates in digestive gland (DG) when clams were fed on *Isochrysis galbana* compared with a starved control (no food) and ii) a typical detoxification pattern, i.e. a rapid drop in toxin content within the first days followed by a secondary slower decrease. GYM levels could be reduced approximately to less than 5 % within 7 to 8 days in clams fed on *I. galbana*, according to the initial toxin levels of 1400 and 9400 µg GYM/kg of DG, respectively. At the end of the second experiment, DSP mouse bioassay was negative when GYM was less than 100 µg /kg DG.

**Key words:** Detoxification, toxicity, gymnodimine, *Karenia selliformis*, grooved carpet shell, *Ruditapes decussatus*.



## 2.1. Introduction

At least five human syndromes are recognized to be induced by the consumption of phycotoxin-contaminated seafood worldwide. These fall into several groups: paralytic shellfish poisoning (PSP), amnesic shellfish poisoning (ASP), diarrhetic shellfish poisoning (DSP), neurotoxic shellfish poisoning (NSP) and ciguatera fish poisoning (CFP). There is, therefore, a growing consensus among scientists that the presence of toxic phytoplankton in coastal waters is of great significance for human health. The problem also causes serious economic losses due to periodic closure of commercial shellfisheries.

Gymnodimine (GYM) was isolated as a toxic substance from oysters and is unique in containing butenolide, a 16-membered carbocycle and cyclic imine moieties. GYM was chemically characterized by different investigators (Seki *et al.*, 1995; Miles *et al.*, 2000; Miles *et al.*, 2003). The biogenetic origin of gymnodimine was identified as the dinoflagellate *Karenia selliformis*. Two analogs, gymnodimine-B and gymnodimine-C were also isolated from this dinoflagellate (Miles *et al.*, 2000; Miles *et al.*, 2003).

The presence of a spirocyclic imine indicated that this marine toxin belongs to the cyclic imines family, which already includes pinnatoxins (Uemura *et al.*, 1995), pteriatoxins (Takada *et al.*, 2001), prorocentrolides (Chou *et al.*, 1996) and spiroclides (Hu *et al.*, 1995).

GYM was later on shown to be widely distributed along New Zealand coastlines, but generally at a low concentration (Stirling, 2001), and was recently identified in digestive-gland tissues of clams *Ruditapes decussatus* from Tunisia (Biré *et al.*, 2002). GYM has also been observed in many other species of contaminated shellfish, including greenshell mussel, blue mussel, scallop, cockle, surfclam, oyster and abalone (Mackenzie *et al.*, 1996; Stirling, 2001; Mackenzie *et al.*, 2002). Furthermore, the toxin is not readily depurated from shellfish, and may persist for years, for example in oysters (Mackenzie *et al.*, 2002).

More recently, GYM-A has been unequivocally detected in shellfish from European and North American coasts (Kharrat *et al.*, 2008), and is considered as an emergent 'fast-acting' phycotoxin (FAT). Due to the rapid onset of neurological symptoms in mice and rapid death following intra-peritoneal (*i.p.*) injection (Mackenzie *et al.*, 1996; Munday *et al.*, 2004). GYM-A has also proved to be toxic to fish (Seki *et al.*, 1995). However, when GYM administered to mice by oral route, toxicity appears to be quite low (Munday *et al.*, 2004). As a result GYM is not considered as a hazard for humans in most concerned countries.

Recent studies tend to demonstrate that GYM-A targets the muscle nicotinic acetylcholine receptor, which could explain its neurotoxicity (Kharrat *et al.*, 2008). When shellfish extracts containing GYM systematically give positive mouse bioassay results for

lipophilic compounds, these shellfish cannot be safely consumed. Management of the carpet shell clam fishery requires drastic improvements, particularly the development of routine specific assays to monitor GYM and congeners (McNabb *et al.*, 2005).

In the meantime, the development of detoxification processes could represent a useful option for reducing the final GYM concentration in shellfish meat to a level low enough to produce negative mouse assay results.

The purpose of this study was to determine the impact of non-toxic algal food on detoxification rates, testing the hypothesis that clams fed *I. galbana* detoxified faster than unfed (control) clams. Thus, the detoxification kinetics of *Ruditapes decussatus* experimentally contaminated with *K. selliformis* was studied in raceway-based recirculating or flow-through systems.

## 2.2. Materials and methods

### *Experimental contamination of clams fed on Karenia selliformis followed by detoxification with and without nontoxic food.*

#### Experiment 1

Strain GM95GAB of *K. selliformis*, formerly referred to as *Gymnodinium maguelonnense* or *Karenia sp.* (Guillou *et al.*, 2002, Shao *et al.*, 2004), was isolated in 1995 (Arzul *et al.*, 1995) from the Gulf of Gabès (North of Sfax) after an episode of mass fish mortality (Hamza and El-Abed, 1994, Hansen *et al.*, 2004). Unialgal isolates are stored and batch cultured (250 ml) in f/2-medium (Guillard and Ryther 1962, Guillard, 1975) under alternation of light and shade 12 h / 12 h at  $52 \pm 4 \mu\text{mole photons/m}^2/\text{s}$  and  $16 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ . *Isochrysis galbana* “Tahiti strain” cultures, used as non-toxic live feed for control purposes, were also maintained under the same conditions. For the experiments, *K. selliformis* and *I. galbana* were grown in larger flasks, i.e. 4 L and 10 L flat-bottomed vessels, respectively, with (*I. galbana*) or without (*K. selliformis*) air supply. Toxic and non-toxic algal cells were harvested for feeding experiments at the end of the exponential growth phase (12 to 14 days after inoculation, respectively). Algal-cell concentrations were quantified using a Nageotte hemocytometer.

In March 2007, *Ruditapes decussatus* clams with no history of phycotoxin contamination were collected from Noirmoutier island in France. Harvested clams were of commercial size, i.e.  $37 \pm 2 \text{ mm}$  mean shell length ( $n = 10$ ) and  $0.44 \pm 0.03 \text{ g}$  mean tissue dry weight ( $n = 10$ ). Samples (8 kg: 252 clams) were immediately transported to the IFREMER

laboratory (Nantes, France), and acclimatized for 5 to 6 days in a raceway filled with 150 L seawater, fed on *Isochrysis galbana*, and maintained at  $16 \pm 0.5$  °C (Table 9).

Sea water at a salinity of 35 psu was pumped through the raceways at a flow rate of 800 L/h and circulated in a closed system maintained at  $16 \pm 0.5$ °C. The experimental setting was similar to that previously described in Lassus *et al.* (1999). Seawater was totally renewed every two days to prevent an increase in ammonia concentration (dissolved ammonia levels were measured every two days using the method of Koroleff (1969)).

During the contamination period, clams were continuously fed on toxic microalgae *K. selliformis* at a concentration of 200 cells/ml for six days; in such a way that available phytoplankton was automatically kept at a steady concentration (autoregulation through Labview ® software / datalogger / fluorescence detection). Clams were sampled for chemical analysis at day 0 and day 6 of contamination. The entire edible tissues and digestive gland of 10 clams were pooled, and their toxicity analysed according to the method described in 2.2.

During a 7-day detoxification, three experimental groups were prepared: in the first, 70 clams were fed *I. galbana* at 12 000 cells/ml with the same autoregulation protocol as that described for *K. selliformis*; in the second group, 70 clams were successively supplied with sea water alone for the three first days of detoxification and then fed *I. galbana* at the same concentration as group 1; and, in the last group, 70 clams were starved (sea water only) and thus served as a control. During detoxification, clams ( $n = 10$ ) were sampled daily for GYM analysis, i.e. on days 0, 1, 2, 3, 4, 6 and 7. For each daily sample, tests were conducted on pooled digestive gland ( $n = 10$ ) and on pooled remaining flesh fractions ( $n=10$ ). Chemical analysis were performed three times for each sample ( $n=3$ ).

No mouse bioassays were performed in this experiment.

## **Experiment 2**

The same strain of *K. selliformis* was cultured in the INSTM hatchery of Monastir (Tunisia) using 40 L culture tanks of L1 medium (Guillard and Hargraves, 1993) and a 12 h / 12 h light-dark cycle with a light intensity of 40  $\mu\text{mole photons/m}^2/\text{s}$  and temperature regulated at  $18 \pm 0.5$ °C. *Isochrysis galbana* “Tahiti strain” cultures were grown in 100 L polyethylene sheathes in f/2 medium (Guillard and Ryther 1962, Guillard 1975) and maintained under the same conditions.

Both toxic and non-toxic algae were harvested in late-exponential or early-stationary phase after 14-16 days (*K. selliformis*) and 6-8 days (*I. galbana*) growth.

In April 2008, *R. decussatus* clams with no history of phycotoxin contamination were collected from the Gulf of Gabès in Tunisia. These clams were of commercial size, i.e.  $34 \pm$

2.3 mm mean shell length and  $0.29 \pm 0.07$  g mean tissue dry weight (n=10). The clams (20 kg) were transported under dry and cold conditions to the laboratory where they were acclimatized for 5 to 6 days in a raceway filled with 150 L seawater at a temperature of  $18 \pm 0.1$  °C and salinity of 38 psu (Table 9).

During the contamination period, clams were fed on the toxic microalgae *K. selliformis* (harvested in decline-phase after 30 days, 20 000 cell/ml) for seven days and sampled at days 0 and 7 of contamination for chemical analysis (n=10) and mouse bioassay (2 kg) (Table 9).

During the detoxification period, two experimental groups were prepared in an open-seawater system: three 150 L raceways, each containing 5 kg of clams with a temperature of  $17 \pm 0.3$  °C, salinity of 37 psu and constant seawater flow-rate with total renewal of circulated seawater three times a day.

In the first two raceways, clams were fed on *I. galbana*. The daily algal food ration was 2 % DW algae / DW clam meat; clams in the last raceway were starved (sea water only) and thus served as controls.

During the detoxification period, clams were sampled, on days 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8 and 10 for GYM quantitative analysis and on days 7, 8 and 10 for mouse bioassay (2 kg).

For each daily sample, chemical analysis were conducted on pooled digestive gland (n=10). Chemical analysis were performed three times for each sample (n=3).

### ***Extraction and LC-MS/MS analysis of gymnodimine***

#### **Extraction procedure**

Clam toxin contents were monitored during the detoxification period of both experiments. Clam soft parts were dissected and then divided into two fractions: digestive gland and remaining tissues (including siphon, foot, gill, adductor muscle and mantle). These two fractions were drained for 2 h on a Büchner funnel, weighed, and then frozen at  $-80$  °C. Lipophilic toxins were extracted from 2 g of homogenized digestive gland or remaining tissue with 15 ml (3×5 ml) of a methanol/water (90/10) solution. After centrifugation (3000 g, 15 minutes, 4 °C) supernatants were combined and homogenized. A 2 ml sample was ultra-filtered by centrifugation through a 0.2 µm membrane (Whatman allipore filter) at 6000 rpm for 5 minutes. Five µl of the filtrate were injected into the LC-MS/MS system.

#### ***LC-MS/MS analysis***

The LC-MS/MS analysis were performed according to Amzil *et al.*, (2007) using an Agilent 1100 LC model coupled to a triple-quadrupole mass spectrometer (API 2000). Toxins were eluted in a 3-µm hyperclone MOS C8 column (50\*2.0mm, Phenomenex) at 20 °C with a linear gradient set at 0.2 ml/min.

Analyses were carried out in multiple reaction monitoring (MRM) positive ion mode and the two most intense product ions per compound were selected. The transition conditions chosen for gymnodimine toxins are indicated in table 8.

**Tableau 8.** m/z transition conditions for GYM-A and GYM-B. m/z (mass to charge ratio).

Toxins	Transitions m/z
GYM A	508.4>490.2/392.3
GYM B	524.4>506.4

### *Mouse bioassay*

#### **Toxin extraction**

The mouse bioassay for the DSP toxins was performed according to the method of Yasumoto *et al.* (1978). 20 g digestive glands (DG) from each clam sample were extracted with 50 ml acetone, homogenized with ultra Turax, filtered and then placed in a rotary evaporator. This last step was repeated twice. Finally, after acetone / water evaporation, the dry residue was collected and stirred with glass beads and 4 ml 1 % Tween 60 before being stored at -80 °C until use.

#### **Mouse inoculation**

The residue was suspended in 1 ml 1 % Tween 60 solution and injected intra-peritoneally (i.p.) into three mice. Toxicity was determined by time until mouse death following the inoculation with clam extracts. Three control mice were also i.p. injected with 1 ml Tween standard solution. As soon as inoculation had been made, mice had to be carefully observed, paying special attention to the symptoms occurring within the first 15 min.

The bioassay was considered positive if at least two out of three mice died within 24 h.

#### **Filtration rates**

As soon as clam faeces (but not pseudo-faeces) were produced during the feeding period of experiment 1 they were detected and immediately removed with Pasteur pipettes twice a day. The amount of total particulate matter (TPM) and particulate inorganic matter (PIM) in seston (detritic and living particles) are expressed per unit of sampled sea water as:

$$TPM_{\text{seston}}(\text{mg.l}^{-1}) = PIM_{\text{seston}} + POM_{\text{seston}}$$

Biodeposits of the detoxification period (faeces and pseudo-faeces) amounts were determined by successively heating Whatman filters at 60 °C for 24 h and 450 °C for 1 h. The total particulate matter (TPM) of biodeposits was calculated using the following relationship:

$TPM_{\text{biodeposits}}(\text{mg}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{ind}^{-1}) = [(\text{POM}_{\text{biodeposits}} (\text{mg}) + \text{PIM}_{\text{biodeposits}} (\text{mg}))/\text{production time (h)})/\text{number of clams}]$

Filtration rate (FR) was calculated using the following relationship (Hawkins *et al.*, 1996; Urratia *et al.*, 1996):

$FR (\text{mg}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g dmw}^{-1}) = [(\text{mg inorganic matter issued from faeces and pseudofaeces h}^{-1}) \times [(\text{mg total particulate matter l}^{-1} \text{ seawater}) / (\text{mg inorganic matter l}^{-1} \text{ seawater})] / \text{g of dry meat weight (DMW) of clam.}$

### **Condition index**

Condition index (CI) was calculated using the relationship of dry meat weight (DMW) to dry shell weight (DSW) according to the following equation:

$$CI = \text{DMW} \times 100 / \text{DSW}$$

### **Siphon activity**

The opening of siphon (*R. decussatus*) was monitored every half hour during contamination (clams exposed to *K. selliformis*) and detoxification periods (clams exposed to *Isochrysis galbana* or sea water) in experiment 1. The siphon activity was expressed as the ratio of the number of clams that opened their siphons to the number of clams used in the experiment.

### **Statistical analysis**

Experimental data were analysed using *Statgraphics Centurion* software. During the three experiments, the impact of food in a raceway was assessed using multifactorial ANOVAs.

Data obtained from chemical analysis (toxicity level on the last days of detoxification compared with the safety threshold) were tested statistically using a T test.

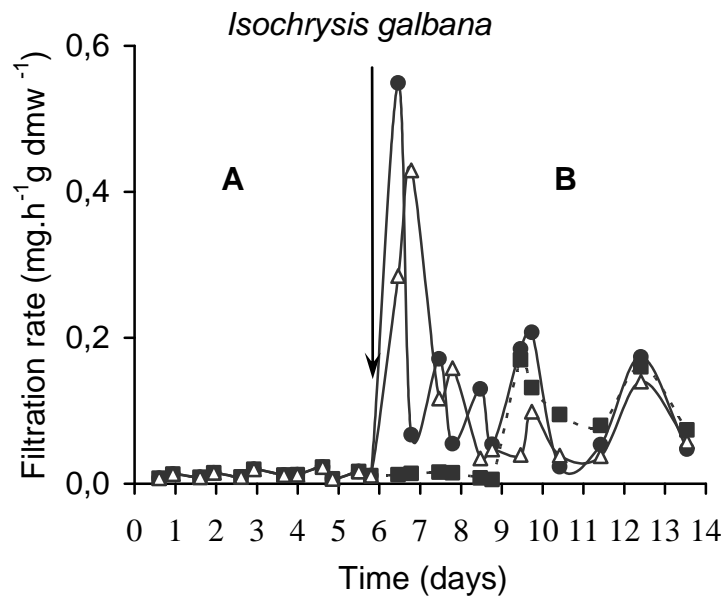
For P-values less than 0.05, differences between toxin contents were considered statistically significant at a 95 % confidence level.

## **2.3. Results**

### **Filtration rates during contamination and detoxification periods**

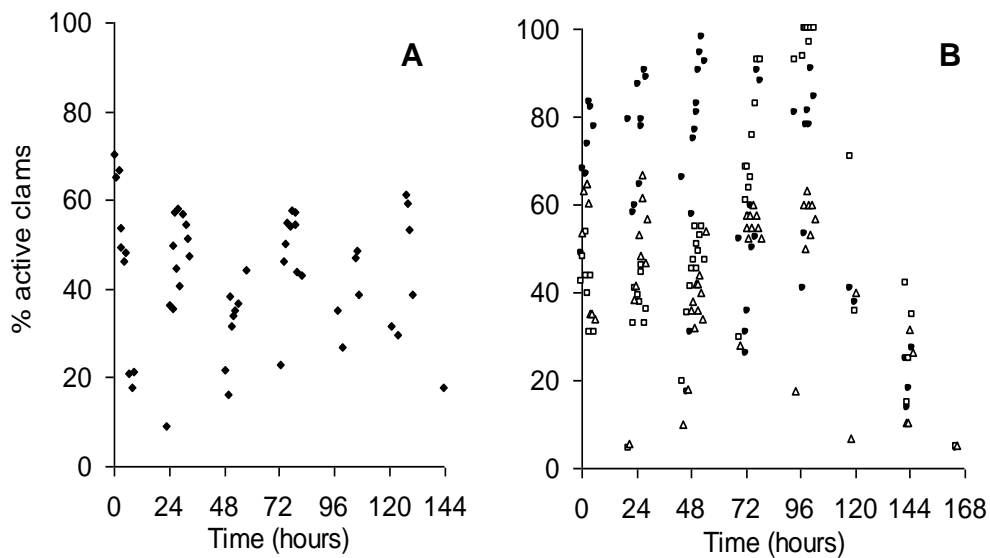
Filtration rates ( $\text{mg}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g dmw}^{-1}$ ) for each treatment during experiment 1 are shown in Fig. 19. The filtration rate (FR) differed significantly during contamination and detoxification periods and for each diet tested during the experiment. The FR of clams fed on *I. galbana* (groups 1 and 2) was higher during detoxification than during contamination. This difference can be correlated with the percentage clearance activity expressed as the percentage of clams with siphons open every half hour (Fig. 20). Diets containing the toxic dinoflagellate *Karenia*

*selliformis* led to apparent reduced clearance activity (20 to 60 % of clams were active), whereas when non-toxic diets were used, an increase was seen in the number of actively filtering clams (60 to 80 % were active with *I. Galbana*). The clams that were fed (group 1 and 2) showed a higher FR compared with the starved clams. Overall, the differences in FR during the detoxification period indirectly confirmed that clams were feeding and ingesting food according to expectations of the experimental design.



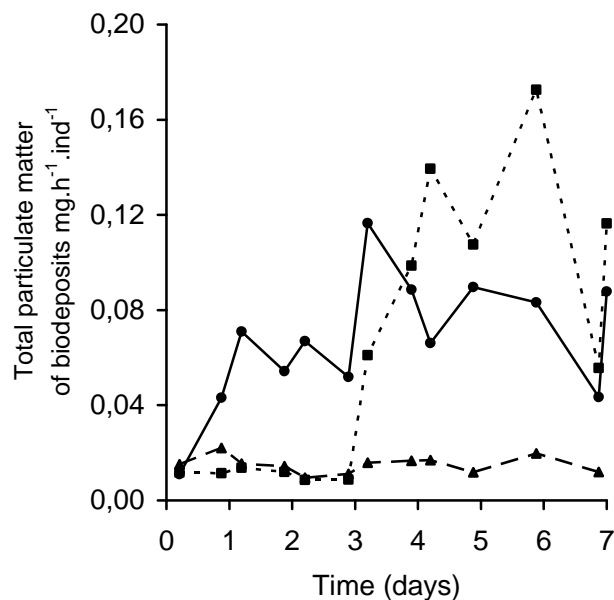
**Figure 19.** Filtration rates ( $\text{mg/h}^{-1} \text{ g dmw}^{-1}$ ) of clams exposed to (A) *Karenia selliformis* (contamination period) and (B) *Isochrysis galbana* or sea water during experiment 1 (detoxification period). Triangles ( $\Delta$ ): starved clams, squares ( $\blacksquare$ ): clams fed from the third day of detoxification, and circles ( $\bullet$ ): clams fed throughout detoxification.

Biodeposits (total particulate matter :  $\text{mg.h}^{-1}\text{ind}^{-1}$ ) for each group of clams during the detoxification period in experiment 1 is shown in Fig. 21. After 7 days detoxification, the amount of biodeposits (TPM) produced differed among treatments. During the first 3 days of detoxification, group 1, which was fed *I. galbana*, had a higher production than groups 2 and 3. On day 3, the group of clams that had received food showed an increase in TPM. In the treatment without food, only a minor increase in total fecal production was observed during the whole experiment, indicating that no further ingestion occurred (Fig. 21).



**Figure 20.** Percentage of clams with opened siphon (siphon activity) exposed to (A) *Karenia selliformis* (contamination period) and (B) *Isochrysis galbana* or sea water during experiment 1 (detoxification period). Triangles ( $\Delta$ ): starved clams, squares ( $\blacksquare$ ): clams fed from the third day of detoxification, and circles ( $\bullet$ ): clams fed throughout detoxification.

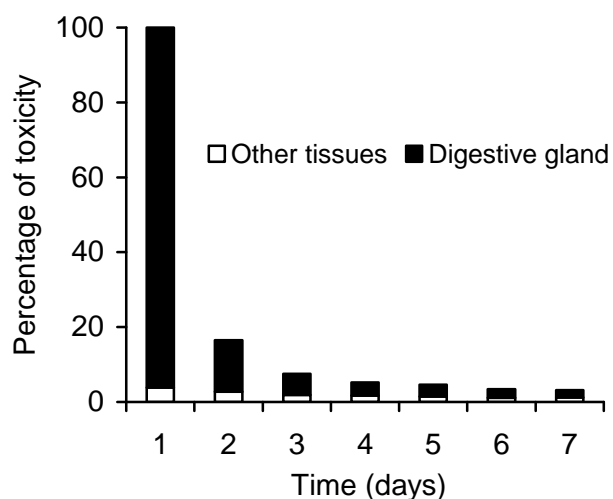
*Distribution of GYM-A in carpet shell tissues during detoxification*



**Figure 21.** Biodeposits (total particulate matter production: mg.h<sup>-1</sup>.ind<sup>-1</sup>) of clams exposed to *Isochrysis galbana* or sea water during detoxification period of experiment 1. Triangles ( $\Delta$ ): starved clams, squares ( $\blacksquare$ ): clams fed from the third day of detoxification, and circles ( $\bullet$ ): clams fed throughout detoxification.



In experiment 1, on the first day of detoxification, DG contained most of the GYM-A (97 %), whereas other tissues contained only 3 %. During the 7 days of detoxification, toxic content in DG decreased rapidly (Fig. 22) to weak level (1.93 %). Conversely, the toxin content of other tissues only decreased slightly during the detoxification period (1.24 %).



**Figure 22** Relative toxicity (%) between DG and other tissues during detoxification period according to clams receiving food during the experiment 1

### *Detoxification kinetics in clams fed on *K. selliformis* and on *I. galbana* successively*

#### **Experiment 1**

Detoxification kinetics were determined from chemical assessment (LC-MS/MS) of toxin contents in the digestive gland (DG; Fig. 23). Maximal gymnodimine (GYM) levels were obtained at the end of the contamination period:  $9491 \pm 2110 \mu\text{g eq GYM/kg DG}$ . This concentration was reduced at day 7 detoxification to  $153 \pm 8$ ,  $320 \pm 22$  and  $511 \pm 18 \mu\text{g eq GYM/kg DG}$ , respectively, for rations 1 (fed), 2 (unfed during the three first days) and 3 (starved control). At this time, the lowest concentration of GYM was observed in clams receiving food.

On day 1, the toxin concentration in clams receiving no food (group 2 and 3) was significantly ( $P=0.042$ ) higher compared with clams feeding on *I. galbana* (group 1). On day 3, clams receiving food showed a significant decrease in toxicity ( $1476 \pm 33$  to  $550 \pm 28 \mu\text{g eq GYM/kg DG}$  at day 4).

After 7 days detoxification, DG of clams that had been fed on nontoxic algae since the first day of detoxification had lost 98 % of their toxin content, whereas clams fed on nontoxic algae since the third day of detoxification had lost 97 % and clams receiving no food (Table 9) only 95 %. At the end of detoxification, no differences in clam condition index were

observed between the different feeding conditions, except some slightly lower values for unfed clams (day 7: IC=5.1±0.13).

In table 9, detoxification rates of *Ruditapes decussatus* are described by the general negative exponential equation  $y_t = y_0 e^{-kt}$ , which corresponds to a one compartment model (for the group fed on nontoxic algae and for the starved group) where  $t$  = detoxification period (day);  $y_0$  = initial toxin level ( $\mu\text{g eq Gym kg}^{-1}$  of DG) and  $k$  represents the detoxification coefficient ( $\text{day}^{-1}$ ). In this experiment, the ratio between the two detoxification coefficients was 1.37, with a coefficient of  $0.37 \text{ d}^{-1}$  using seawater and  $0.51 \text{ d}^{-1}$  with the *I. galbana* diet (Table 9).

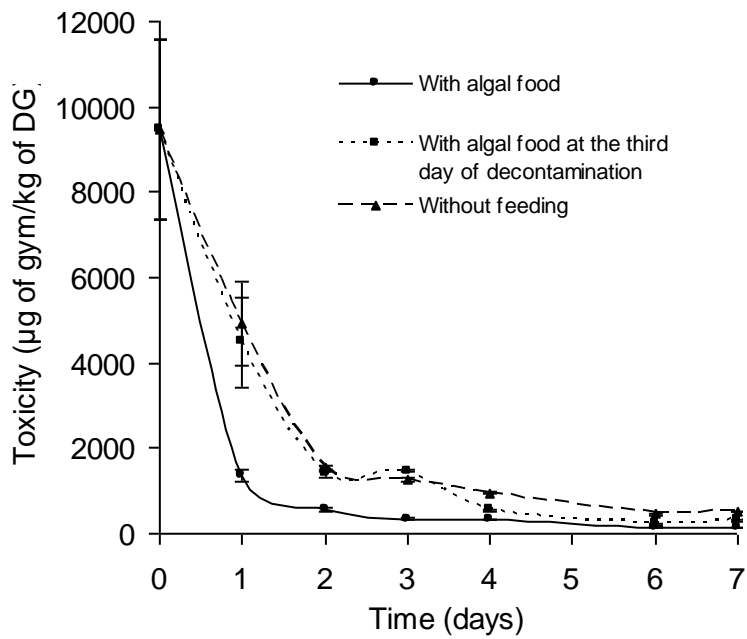
### **Experiment 2**

In experiment 2, the maximum GYM level in clam DG ( $1238 \pm 159 \mu\text{g eq GYM/kg DG}$ ) was observed after 7 days exposure to *K. selliformis* (Fig. 24). At the end of the detoxification period (10 days) toxin concentrations in starved clams ( $375 \pm 26 \mu\text{g eq GYM/kg DG}$ ) was significantly higher than in clams fed on *I. galbana* ( $54 \pm 2.1 \mu\text{g eq GYM/kg DG}$ ) representing 70 % and 96 % drops in toxin content, respectively (Table 9).

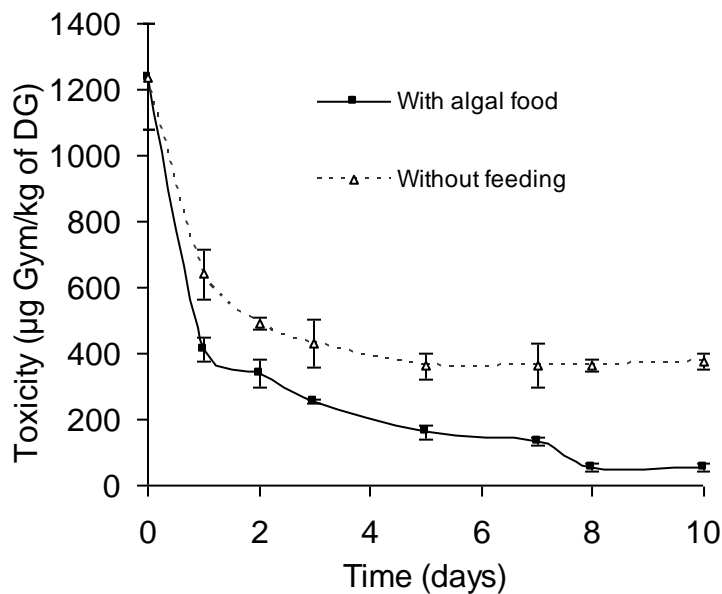
**Tableau 9.** Summary of experimental conditions, exponential equation, comparison of bioassays and chemical analysis after detoxification period

Clam group	Origin/Date/shell length	Acclimation period (days)	Contamination period (days)	Detoxification period (days) / Temperature	Initial toxin content/ Final toxin content (µg Gym/kg GD)	DSP Mouse Bioassay	Exponential equation		
<b>Experiment 1</b>									
Control	Island Noirmoutier (France) March 2007 37 ± 2 mm	5-6	6	7	16±0.5°C	9491	y = 4751 exp (-0.3722 t) R <sup>2</sup> = 0.8581		
With algal food*							320	Not done	y = 6412.8 exp (0.5113 t) R <sup>2</sup> = 0.9083
With algal food							153		y = 2970 exp (-0.5044 t) R <sup>2</sup> = 0.791
<b>Experiment 2</b>									
Control	Golf of Gabès (Tunisia) April 2008 34 ± 2.3 mm	5-6	7	8	17±0.3°C	1238	y = 733.25 exp (-0.0922 t) R <sup>2</sup> = 0.5963		
With algal food							55	-	y = 716.57 exp (-0.2803 t) R <sup>2</sup> = 0.912

Control : Without feeding ;With algal food: *Isochrysis galbana* ;\* *Isochrysis galbana* on the third day of detoxification; Mouse test = + : all mice died; - no death observed.



**Figure 23.** Clam detoxification kinetics according to the different detoxification diets used in experiment 1. Triangles ( $\Delta$ ): starved clams, squares ( $\blacksquare$ ): clams fed from the third day of detoxification, and circles ( $\bullet$ ): clams fed throughout detoxification. Mean values  $\pm$  S.E. (3 chemical analysis for any point and diet used).



**Figure 24.** Clam detoxification kinetics according to the different diets used in experiment 2. Triangles ( $\Delta$ ): starved clams, squares ( $\blacksquare$ ): fed clams. Mean values  $\pm$  S.E. (3 chemical analysis for any point and diet used).

The ratio between the two detoxification coefficients in this experiment was 3.04, with a coefficient of  $0.092 \text{ d}^{-1}$  in seawater and  $0.28 \text{ d}^{-1}$  with the *I. galbana* diet (Table 9).

It was only on day 8 and 10 that detoxified clams gave a negative result with mouse bioassay (no mouse death). At the end of the detoxification period, differences in condition index between each treatments were observed; values were lower for unfed clams (day 10: IC =  $7.5 \pm 1.2$  n = 10), in comparison to clams fed on *I. galbana* (day 10: IC =  $9.2 \pm 1.35$  n = 10).

## 2.4. Discussion

Different feeding processes have been tested to see how they could speed up the elimination of paralytic and diarrheic toxins from bivalve molluscs. Croci *et al.* (1994) showed that treatment with ozone had no significant effect on diarrheic toxin detoxification. Temperature and salinity seem to have no effect (Blanco *et al.*, 1999), and several authors reported that food supply has little positive effect either (Sampayo *et al.*, 1990; Blanco *et al.*, 1999), while starvation was found to increase the apparent detoxification rate (Svensson, 2003).

Field detoxification by moving mussels from toxic to nontoxic environments (relaying) was performed by Haamer *et al.* (1990), Marcaillou-Le Baut *et al.* (1993), Poletti *et al.* (1996) and Blanco *et al.* (1999). Moreover the availability of nontoxic food has been proposed by several authors to be the main factor affecting diarrheic detoxification in mussels (Haamer *et al.*, 1990; Sampayo *et al.*, 1990; Poletti *et al.*, 1996; Blanco *et al.*, 1999).

Studies on the effects of food on detoxification of contaminants in mussels have been investigated for other types of toxins. Novaczek *et al.*, (1992) and (Wohlgeschaffen *et al.*, (1992) found no difference in detoxification rate of the hydrophilic neurotoxin domoic acid among fed or starved mussels, *M. edulis*. Regarding the effect of environmental factors on paralytic shellfish toxin (PST) detoxification rates in *Mytilus galloprovincialis*, Blanco *et al.*, (1997) found that phytoplankton concentration seemed to have no particular effects. Chen and Chou, (2001) observed that detoxification efficiency of (PST) in the purple clam, *Hiatula rostrata* was similar for clams fed nontoxic algae or starved.

No attempt had been made to detoxify GYM contaminated shellfish before the present study. In this work, our method consisted of transferring clams to waters free of toxic organisms, with environmental conditions that could promote accelerated detoxification.

The experiments aimed to test the effects of food on detoxification under controlled conditions. It was found that clams fed non toxic algae had the highest amount of fecal production compared with starved animals. This confirmed that ingestion rates differed among treatments according to predictions, and in this way the experiment was successful.

Moreover, during the contamination period the clams showed a significant reduction in filtration rate when fed *K. selliformis* at a concentration of 200 cells ml<sup>-1</sup>. The FR increase when exposed to *I. galbana* at a concentration of 12000 cell ml<sup>-1</sup> at the beginning of detoxification period. This suggest that *K. selliformis* diet is inappropriate and probably harmful for grooved carpet.

GYM detoxification kinetics were faster in clams fed on *I. galbana* (experiments 1 and 2) than in starved clams. These results are in agreement with other studies such as detoxification experiments with blue mussels, which showed that feeding mussels accelerated the detoxification process. Moreover, observations made by Sampayo *et al.* (1990) during several DSP episodes on the Portuguese coast, suggested that the detoxification rate increases with phytoplankton concentration, i.e with the main food for bivalve molluscs. These findings contrast with the experiments carried out by Svensson, (2003), who showed that detoxification of lipophilic phycotoxin (okadaic acid) in mussels was unaffected by food availability.

During the two experiments, detoxification rates were rapid (7 to 8 days) whatever non-toxic algal diets were used. Thus, in order to set up a process that will optimize detoxification, the presence of *I. galbana* is a very significant element to help reach the estimated safety threshold. These observations seem consistent with Bricelj and Shumway's (1998) classification of *R. decussatus* as a "fast detoxifier" within the same time frame as *Crassostrea gigas* for paralytic toxins

In this study, the initial toxicity was much higher in experiment 1 ( $9491 \pm 2110 \mu\text{g eq GYM/kg DG}$ ) than in experiment 2 ( $1238 \pm 159 \mu\text{g eq GYM/kg DG}$ ). This difference can be attributed to the high number of clams and the low toxicity of *Karenia selliformis* used in experiment 2 (2.6 pg GYM/cell compared with 10.7 pg GYM/cell in experiment 1). Clam digestive gland accumulated most of the total GYM (97 %), and the remaining toxins were distributed in the other tissues. This disproportionate accumulation agrees with results obtained for other bivalve molluscs, like scallops (Cembella *et al.*, 1993; Choi *et al.*, 2003), mussels (Bricelj *et al.*, 1990) and *Hiatula rostrata* (Chen and Chou, 2001). Most studies have concluded that bivalve viscera and DG accumulated most of the total toxin burden, despite the limited contribution of these organs to the total body burden (Bricelj *et al.*, 1990; Cembella *et al.*, 1993).

The different detoxification rates for each kind of tissue may cause an increase in the percentage contribution of the digestive gland to the whole shellfish toxin burden as detoxification progresses, e.g. in the case of *Argopecten irradians* the percentage increased to

95 % after two days of detoxification. In our study, it was observed that DG detoxification rate in clams (fed and unfed) was faster during the first two days (more than 84 % loss) but then subsequently slowed down. This suggests that toxins are distributed between these two compartments. Similar patterns were also observed for blue mussels (Marcaillou-Le Baut *et al.*, 1993; Fernandez *et al.*, 1998; Blanco *et al.*, 1999) and also for scallops (Bauder *et al.*, 1996). This last author found that the rapid loss of toxins during the first 3 days of detoxification coincided with the evacuation of toxin-producing algae from the viscera. Biphasic (fast and slow) detoxification kinetics were also found for other types of algal toxins in different shellfish species, like PSP in king scallop *Pecten maximus* (Lassus *et al.*, 1989), or DSP in blue mussels (Marcaillou-Lebaut *et al.*, 1993).

The slow detoxification rates shown in other tissues (including gill, mantle, siphon and foot) were in agreement with previous studies such those as in surfclams, *S. solidissima*. According to Bricelj and Cembella, (1995) the rank order of various tissue pools in terms of their detoxification rates is as follows: viscera > gill > mantle > siphon > foot > adductor muscle. The two experiments we carried out reveal that the detoxification of clams fed with *I. galbana* could be achieved in 7 or 8 days (experiments 1 and 2, respectively). As described in the “material and methods” section, mouse bioassay was done only in experiment 2. This experiment revealed that toxicities in the fed clams were  $134 \pm 11.34$ ,  $55 \pm 5.6$  and  $54 \pm 2.1$   $\mu\text{g GYM/kg DG}$  after 7, 8 and 10 days of detoxification, respectively, and negative mouse test results were only found after 8 and 10 days. In contrast, clams that were not fed during the detoxification period, which had final toxicities of  $366 \pm 66.46$ ,  $363 \pm 20.43$  and  $375 \pm 25.89$   $\mu\text{g of GYM/kg DG}$  after 7, 8 and 10 days of detoxification, respectively, showed a positive result in the mouse test.

The correspondence of these chemical analyses with the results of the mouse biotest showed that toxicity over  $55 \mu\text{g GYM/kg DG}$  was responsible for the death of all three mice. Indeed, the presence of GYMs in mice appears through body stretching, hyperactivity, stiff tail, slowing of movements and paralysis of the rear limbs followed by rapid mortality. These symptoms are all neurological (Hu *et al.*, 1996; Cembella *et al.*, 2000; Takada *et al.*, 2001). Moreover, GYM is listed among toxins with a fast action FAT (fast-acting toxins) since it results in the death of mice within a span of a few minutes (Rein and Borrone, 1999). Another significant toxicological characteristic of fast acting toxins lies in the differential expression of toxicity according to the toxin levels present in the extracts of tested mice. Indeed, these toxins present an “all or nothing” effect, (Hu and al., 1996; MacKenzie *et al.*, 1996 ; Hu *et al.*, 2001), initially observed by Tindall *et al.*, (1984). This effect is characterized by a sharp

disappearance of the mouse lethality once the injected extracts are diluted beyond a certain threshold (MacKenzie *et al.*, 1996).

### ***Conclusions***

Controlled detoxification applied to GYM-contaminated shellfish could be a practical approach for the management of clam fisheries, particularly to ensure a continuous supply of safe clams for the market. The results obtained in this study have shown that detoxification occurs when a non-toxic alga is present in the detoxification system and that GYM levels can be reduced to approximately 5 % of initial toxin content within 7 to 8 days for laboratory-contaminated clams i.e. it is possible to obtain toxin levels below the safety threshold of 100 µg GYM/kg DG. To optimise the conditions for GYM detoxification in clams, feeding with nontoxic algae can be started some days after the beginning of the detoxification process (after 3 days of starvation, for instance). However, more information is needed about seasonal variability and the effect of salinity, specific toxicity of algal strains, bloom duration and cell concentration on the detoxification rates. Further experiments are also needed on naturally contaminated clams. Taking into consideration these different aspects should considerably reduce concerns about health risks related to the consumption of gymnodimine-contaminated *R. decussatus*.

### ***Acknowledgements***

This work was supported by the convention framework between the Tunisian National Institute of Marine Science and Technologies (INSTM) and the French Research Institute for Exploitation of the Sea (IFREMER).



### 3. Approche naturelle

#### Etude de l'impact de l'alimentation sur la détoxification de la palourde *Ruditapes decussatus* contaminée *in situ* par les gymnodimines (lagune de Boughrara, sud de la Tunisie)

##### 3.1 Introduction

La contamination des coquillages par les phycotoxines est un phénomène naturel qui est la cause de pertes économiques importantes au niveau de l'aquaculture mondiale, particulièrement dans le secteur conchylicole. La Tunisie n'a pas échappé à ce phénomène.

En effet, depuis les proliférations d'algues toxiques de 1994 (Hamza et El Abed, 1994 ; Hansen *et al.*, 2004) les palourdes *Ruditapes decussatus* du Golfe de Gabès (sud de la Tunisie) sont fréquemment contaminées par la micro-algue toxique *Karenia selliformis*. Ce dinoflagellé marin produit la Gymnodimine, un composé qui fait partie de la famille des phycotoxines du type 'imines cycliques' (Stirling *et al.*, 2002 ; Biré *et al.*, 2002). Cette micro-algue se développe plus particulièrement dans la lagune de Boughrara où la production de la palourde est affectée de façon continue. Ces contaminations ont engendré de sérieux problèmes socio-économiques puisque la décontamination naturelle peut prendre de plusieurs semaines à plusieurs mois. La contamination des mollusques bivalves par les phycotoxines est un problème mondial qui a très vite nécessité d'apporter des solutions aux problèmes économiques engendrés par les interdictions de vente de coquillages contaminés. Ainsi, différents procédés ont été mis au point dans le but de réduire rapidement le contenu en toxines dans la chair des mollusques bivalves comestibles. Un des procédés les plus simples consiste à transférer les animaux contenant des toxines dans un site non contaminé pour faciliter le processus d'auto-épuration. Malheureusement, cette méthode présente l'inconvénient majeur d'une contamination secondaire possible de la zone saine par revivification des kystes d'espèces toxiques comme *Alexandrium* spp (toxines PSP) (Bricelj *et al.*, 1993 ; Schwinghamer *et al.*, 1994 ; Harper *et al.*, 1997). Shumway *et al.* (1995), ont proposé d'autres méthodes de traitement à terre notamment des stress thermiques ou salins, des chocs électriques, la réduction du pH, la chloration. Cependant, les effets ne sont pas convaincants.

Le traitement à l'ozone reste le procédé qui a été le plus testé bien que les résultats obtenus soient controversés. Blogoslawski (1988) a signalé que l'eau ozonée permettait de détoxifier les bivalves récemment contaminés par des cellules productrices de toxines paralysantes alors que Shumway *et al.* (1995) estiment que l'ozone est inefficace pour

détoxifier des bivalves qui ont ingéré des kystes d'espèces toxiques ou qui ont bioaccumulé depuis longtemps des toxines paralysantes déjà métabolisées et liées aux tissus. Ce même procédé utilisé pour les toxines diarrhéiques (DSP) n'a pas montré une réduction significative de ces toxines chez les moules traitées (Reboreda *et al.*, 2009).

L'apport de nourriture non toxique au cours de la détoxification, a été également utilisé par différents auteurs bien que les effets obtenus soient parfois contradictoires. Plusieurs auteurs considèrent néanmoins que la disponibilité d'une nourriture non toxique est le principal facteur permettant d'accélérer la détoxification de coquillages vivants (Haamer *et al.*, 1990; Sampayo *et al.*, 1990; Marcaillou-Le Baut *et al.*, 1993; Poletti *et al.*, 1996; Blanco *et al.*, 1999 ; Bauder *et al.*, 1996).

A l'opposé, d'autres travaux ont comparé des individus alimentés et non alimentés et ont montré que la détoxification des bivalves pouvait être obtenue sans l'ajout d'aliment non toxique (Haamer *et al.* 1990 ; Novaczek *et al.*, 1992 ; Wohlgeschaffen *et al.*, 1992 ; Croci *et al.*, 1994; Bjork et Gilek., 1997 ; Chen et Chou., 2001 et Svensson, 2003)

Par ailleurs, en ce qui concerne les toxines lipophiles, des essais de contamination/détoxification de différents bivalves comestibles tels que moules, huîtres, coquille Saint Jacques et palourdes (Madenwald 1985, Marcaillou-Le Baut *et al.*, 1993, Blanco *et al.* 1999, Svensson 2003, Duinker *et al.*, 2007) ont permis de mettre en évidence des différences 'espèce-dépendantes' dans les cinétiques de contamination et de détoxification.

En effet, les travaux portant sur la détermination des cinétiques de détoxification de la palourde *R. decussatus* contaminée dans son milieu naturel (lagune de Boughrara) par les gymnodimines sont limités. Le seul essai réalisé dans des conditions contrôlées et sans apport alimentaire a montré une durée de détoxification de 29 jours (Marrouchi *et al.*, 2010). Cependant, aucun procédé de détoxification n'a été appliqué pour pouvoir réduire cette durée.

C'est dans ce contexte que s'inscrit ce présent travail qui a pour objectifs d'étudier l'impact de l'ajout de l'alimentation en conditions contrôlées sur les vitesses de détoxification et de déterminer l'impact du pré-stockage sur la cinétique de détoxification, en particulier pendant les premiers jours de détoxification.

### **3.2. Matériels et méthodes**

#### ***Site d'échantillonnage***

La lagune de Boughrara est un milieu semi fermé présentant une communication limitée avec la mer. Cette lagune est un site exceptionnel pour la biodiversité marine. Cependant, son écosystème a connu depuis quelques années une détérioration progressive en

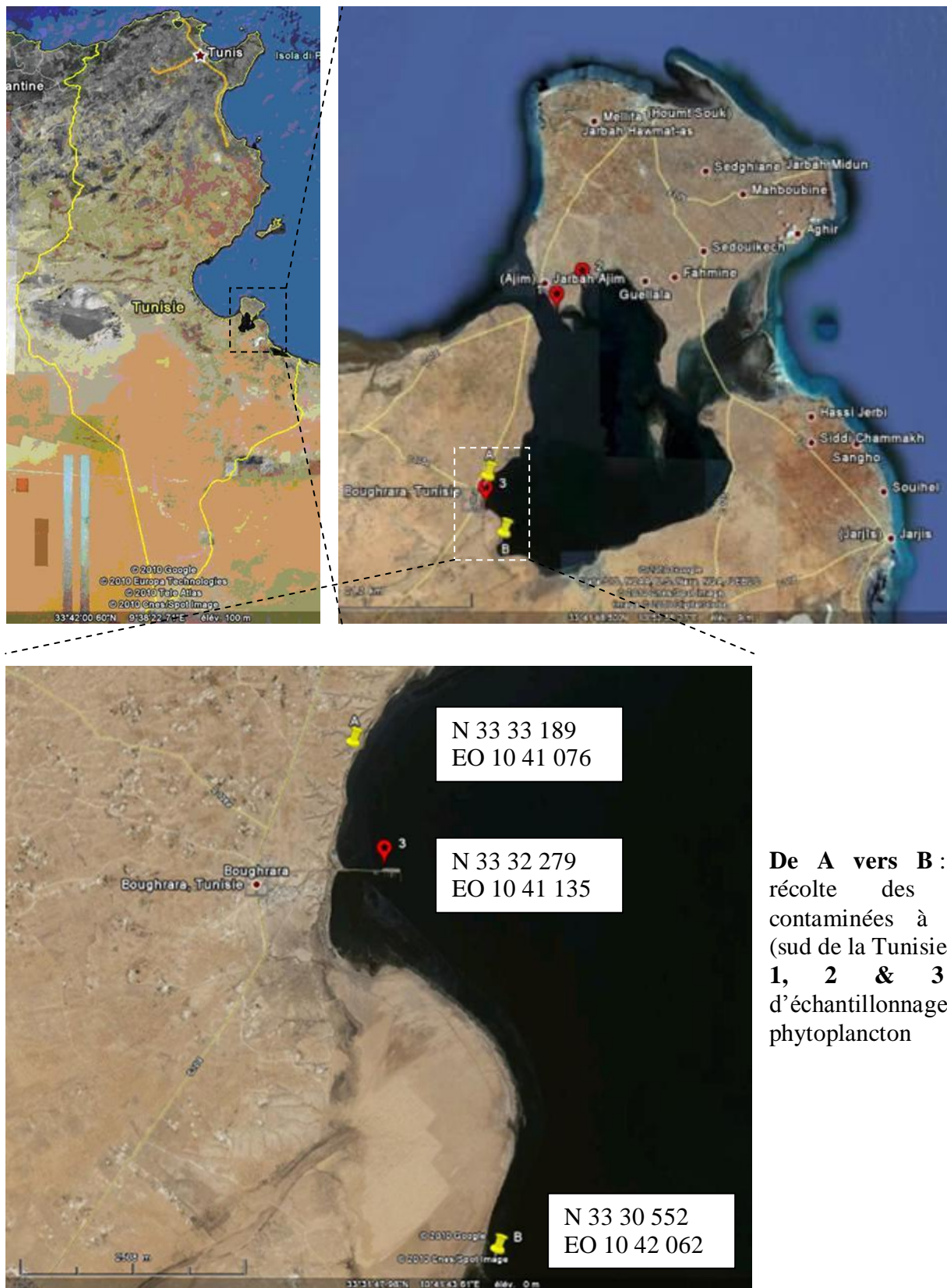
raison des contraintes naturelles et anthropiques qui lui sont imposées. En effet, en plus des conditions hydrodynamiques et climatiques sévères (déficit notable en eau continentale, faible profondeur, circulation d'eau limitée, évaporation intense), la lagune continue à subir les nuisances des activités aquacoles, des installations portuaires, de divers rejets industriels contribuant à sa dégradation (Ayari *et al.*, 2008). Par conséquent, la diversité biologique a subi une régression avec une réduction particulière des ressources halieutiques, entraînant la chute des revenus dans le secteur (Ayari *et al.*, 2008).

Cette lagune est située dans le sud-est tunisien entre les méridiens 10°45' et 10°57' et les parallèles 33°28' et 33°45' nord. Elle est définie en tant que mer intérieure, bordée par l'île de Djerba du côté nord et par le continent du côté sud. Son bassin versant, dont la superficie est de 2394 km<sup>2</sup>, est drainé par six principaux oueds qui se déversent dans la lagune. Elle présente une superficie de 50000 hectares avec une profondeur moyenne de l'ordre de 5m. La lagune est entourée de 5 sebkhas, qui correspondent à des dépressions planes, inondables et dont les sols salés interdisent toute végétation sur la plus grande partie de leur surface. Ce plan d'eau communique avec la mer par le canal Ajim-Jorf, large de 2.2 km et par une petite ouverture de 12 m de largeur, située sous le pont de la chaussée romaine dans le bassin d'El Kantara. La lagune de Boughrara est soumise à des phénomènes de marée, dont la valeur maximale de marnage, 80 cm en période de vives eaux, est enregistrée au niveau du port d'Ajim (Ayari *et al.*, 2008). Selon cet auteur, la salinité mensuelle mesurée au cours de l'année 1999 / 2000 a montré un maximum de 48.8 en septembre et un minimum de 47 au mois de mai. Un gradient croissant de salinité a été signalé, depuis la zone à influence marine vers la rive sud de la lagune (Anonyme, 2000). Plus tard, Féki *et al.* (2008) et Dammak-Zouari *et al.* (2009) enregistrent respectivement une salinité maximale de 50 à 52 psu. Les températures mensuelles des eaux de surface oscillent entre un minimum de 10.7°C et un maximum de 32.7°C (Benrejeb-Jenhani et Romdhane, 2002). Les valeurs en oxygène dissous sont comprises entre 4.8 mg/l et 16.0 mg/l (Anonyme, 2000).

### **Matériel biologique**

En mars 2009, 40 kg de palourdes *Ruditapes decussatus* de longueur et de poids moyens respectivement de 30,7 mm et 4,99 g, contaminées naturellement par la gymnodimine, ont été pêchés dans la lagune de Boughrara (Fig 25).

Les palourdes ont été acheminées au laboratoire d'aquaculture du Centre de l'INSTM de Monastir, après un stockage à température ambiante, durant une nuit, dans un sac humide.



**De A vers B :** Zone de récolte des palourdes contaminées à Boughrara (sud de la Tunisie)  
**1, 2 & 3 :** Points d'échantillonnages du phytoplancton

**Figure 25.** Zone de récolte des palourdes et points d'échantillonnage de l'eau de mer dans la lagune de Boughrara

La contamination de ces palourdes a été vérifiée, par des bioessais sur souris spécifiques, des toxines diarrhéiques DSP (Yasumoto *et al.*, 1978) et paralysantes PSP (AOAC95908, 1990) et par analyse chimique par HPLC pour les toxines amnésiantes ASP (Quilliam *et al.*, 1995).

### ***Protocole expérimental***

Huit raceways (180 litres/raceway), contenant chacun 6 kg de palourdes, ont été maintenus en circuit ouvert, avec une circulation d'eau de mer brute à la température moyenne de  $16,8 \pm 0,2$  °C, à la salinité de 38 psu. Cette eau est renouvelée trois fois par 24 heures et les raceways sont répartis en quatre lots comme suit :

- Deux raceways sans aliment sont maintenus en circuit ouvert (SA).
- Deux raceways sont alimentés et maintenus en circuit ouvert dès l'arrivée des palourdes (AA).
- Deux raceways sont alimentés, et maintenus en circuit ouvert, après stockage des palourdes à sec pendant 48 heures à la température ambiante de 15°C (AAT).
- Deux raceways sont alimentés et maintenus en circuit ouvert, après stockage des palourdes à sec pendant 48 heures à 8°C (AATB).

L'alimentation algale à base d'*Isochrysis galbana* souche Tahiti (*T.Iso*) a été distribuée tous les jours en continu, avec une ration moyenne  $R=1,3\%$ , définie comme le rapport : poids sec de l'algue distribuée / poids sec de la chair de palourdes, pendant toute la durée de l'expérimentation. La micro-algue a été cultivée en gaine de polyéthylène de 100 litres dans une eau de mer enrichie en milieu de Conway, à la salinité de 30 psu, à la température de 20°C, et à une intensité lumineuse de 70  $\mu\text{moles photon/m}^2/\text{s}$  mesuré à l'aide d'un luxmètre. La concentration cellulaire de cette micro-algue est contrôlée par le compteur de particules Multisizer 3<sup>®</sup>.

Les raceways ont été nettoyés tous les jours par siphonage afin d'éliminer les biodépôts.

Au cours de la période de détoxification, les palourdes des quatre lots ont été échantillonnées pour l'analyse quantitative de la GYM aux jours : 0, 1, 2, 3, 8, 12, 15, 17 pour le lot AA, 0, 1, 2, 3, 8, 12, 15, 17, 27, 39 pour le lot SA et 0, 1, 2, 5, 7, 8, 12, 15, 17 et 27 pour les lots AAT et AATB. Pour chaque lot, 10 individus (5 pièces/raceway) ont été choisis aléatoirement puis disséqués et divisés en quatre fractions: glande digestive, siphon, pied, branchies. Ces fractions ont été égouttées pendant 2 h sur des Büchner, pesées, puis congelées à -80°C. Dix individus supplémentaires ont été échantillonnés pour analyse individuelle aux

jours 0 et 15, pour chaque lot. Pour les bioessais sur souris, 2 kg/lot (1kg/raceway) de palourdes ont été prélevés séquentiellement suivant la fréquence indiquée dans le tableau 10.

**Tableau 10.** Jours d'échantillonnage pour le bioessai sur souris

Jour	0	8	10	12	15	17	27	39
AA	*	*	*	*	*	*		
SA	*			*		*	*	*
AAT	*	*			*			
AATB	*	*			*			

### **Indice de condition**

10 pièces/lot (5/raceway) ont été prélevées tous les 4 jours pour AA, SA, AAT et AATB. Deux prélèvements supplémentaires ont été effectués aux jours 27 et 39 pour le lot non alimenté (SA).

L'indice de condition IC est calculé suivant la formule suivante :

$$IC = (\text{Poids sec de la chair/poids sec de la coquille}) \times 100.$$

### **Extraction et analyse chimique par CL-SM/SM**

#### **Méthode d'extraction**

Les toxines lipophiles ont été extraites à partir de 2 g d'homogénat de glande digestive ou d'autres tissus avec 18 ml (3×6 ml) d'une solution méthanol/eau (90/10). Après centrifugation (x 3000g, 15min, 4°C) les surnageants ont été regroupés et homogénéisés. 1 ml d'échantillon a été ultra-filtré par centrifugation à travers une membrane d'épaisseur 0,2mm (filtre Whatman) à 10 000 g pendant 10 min. Cinq microlitres du filtrat ont été injectés dans le système CL-SM/SM.

#### **Analyse chimique par CL-SM/SM**

Les analyses CL-SM/SM ont été effectuées selon la méthode de Amzil *et al.* (2007) en utilisant un modèle Agilent 1100 LC<sup>®</sup> couplé à un spectromètre de masse API 2000.

Les toxines ont été éluées dans une colonne 3-µm hyperclone MOS C8 (50 mm x 2,0 mm, Phenomenex) à 20°C avec un gradient linéaire fixé à 0,2 ml / min. Les analyses ont été effectuées en utilisant la méthode (MRM : Multiple Reaction Monitoring) en mode d'ionisation positive et les deux ions produits les plus intenses par composé recherché ont été sélectionnés. Les conditions de transition choisies pour les gymnodimines sont indiquées dans le tableau 11.

**Tableau 11.** Conditions de transition pour la GYM-A et la GYM-B. m/z (rapport masse sur charge).

Toxine	Transitions m/z
GYM A	508.4>490.2/392.3
GYM B	524.4>506.4

### ***Bioessai sur souris***

#### **L'extraction des toxines**

Le test souris pour les toxines DSP a été réalisé selon la méthode de Yasumoto *et al.* (1978). Vingt grammes de glandes digestives (GD) de chaque échantillon de palourdes ont été extraits avec 50 ml d'acétone, homogénéisés par Ultra -Turax, filtrés et ensuite placés dans un évaporateur rotatif. Cette dernière étape a été répétée deux fois. Enfin, après évaporation du mélange eau / acétone, le résidu sec a été recueilli et agité avec des billes de verre dans 4 ml de Tween 60 à 1% avant d'être stocké à -80°C jusqu'à son utilisation.

#### **Inoculation**

Le résidu dilué dans 1 ml de Tween 60 à 1% est injecté par voie intra-péritonéale (*i.p*) à trois souris. La toxicité a été déterminée par le temps écoulé entre l'injection des extraits de palourdes et la mort de la souris. Trois souris témoins (sex mâle, poids = 20 ± 2 g et âgés de 45 à 60 jours), ont également été injectées avec 1 ml de Tween solution standard. Dès que l'inoculation a été faite, les souris ont dû être soigneusement observées, en accordant une attention particulière aux symptômes survenant dans les 15 premières minutes. L'essai biologique est considéré comme positif si au moins deux des trois souris sont mortes dans les 24h.

#### **Histologie**

Dix palourdes ont été choisies de façon aléatoire au premier et dernier jour de détoxification au niveau du lot AA. Dix palourdes supplémentaires non contaminées par la gymnodimine ont été choisies comme témoins. Les palourdes sont ensuite disséquées et divisées en deux fractions: glande digestive et reste des tissus.

Seules les glandes digestives ont été ensuite déshydratées dans une série de bains d'alcool de concentration croissante puis placées dans le toluène et ensuite imprégnées et incluses dans la paraffine.

Des coupes de 7 µm d'épaisseur ont été réalisées au microtome Leica RM 2165<sup>®</sup>, puis montées sur lames avant coloration par l'hématoxyline-éosine. Les coupes ont d'abord été

déparaffinées pour réhydrater les tissus. Elles subissent ensuite différents bains de toluène, puis d'éthanol de degré décroissant (100° puis 95°). Elles sont ensuite colorées par l'hématoxyline de Harris et l'éosine et lavées avec de l'eau distillée avant d'être à nouveau déshydratées par des bains d'éthanol de degré croissant et placées dans le toluène.

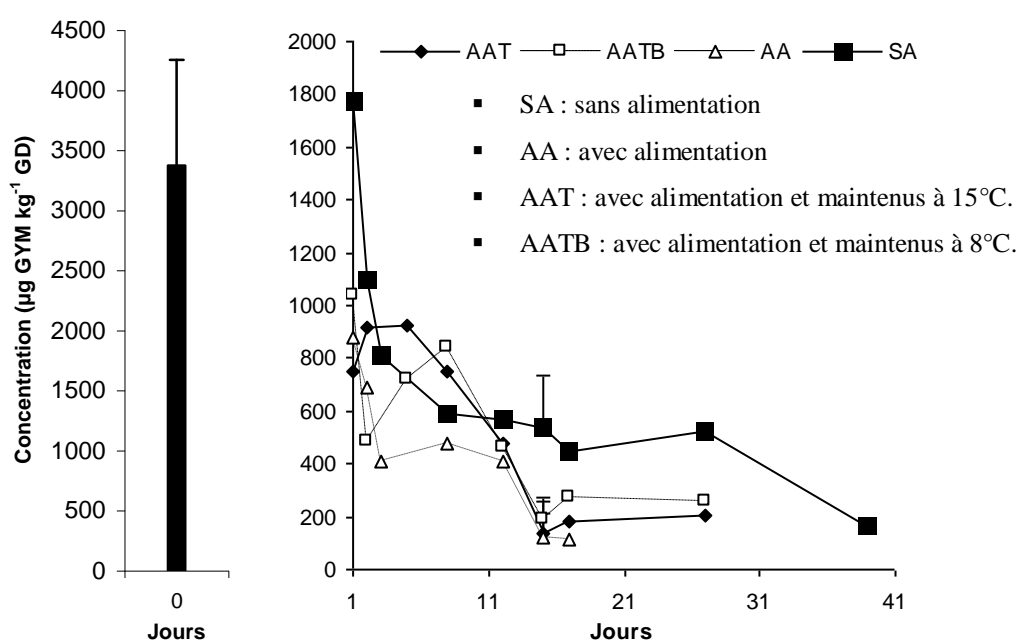
### Analyse statistique

L'étude comparative de la détoxification et de l'indice de condition entre les différents traitements a été effectuée à l'aide du Student T test. Le seuil de probabilité  $P < 0.05$  a été utilisé pour définir les différences significatives entre traitements, pour toutes les données. Le logiciel STATISTICA 5.5, a été utilisé pour les analyses statistiques.

## 3.3. Résultats

### Cinétiques de détoxification de la palourde *R. decussatus*

La cinétique de détoxification a été déterminée par analyse chimique du contenu en GYM dans la glande digestive (Fig 26). Le contenu en GYM dans la GD des palourdes récoltées dans le milieu naturel atteint  $3375 \mu\text{g GYM kg}^{-1}$  à T0. Le temps de détoxification pour atteindre un niveau inférieur à  $200 \mu\text{g GYM kg}^{-1}$  est de 15 jours pour les lots alimentés selon les conditions AA, AAT, AATB. La perte de toxine pour les animaux à jeun (SA) n'atteint que 82 % (approximativement  $600 \mu\text{g GYM kg}^{-1}$ ) à J15. Ce niveau de toxine est significativement supérieur à celui des animaux nourris (AA, AAT, AATB). Il faut 39 jours pour les animaux à jeun pour éliminer 95% de la toxine et passer en dessous de  $200 \mu\text{g GYM kg}^{-1}$  (Fig 26).





**Figure 26.** Cinétique de détoxification de palourdes contaminées naturellement par *Karenia selliformis* pour différentes conditions expérimentales.

Du point de vue de la cinétique, deux phases distinctes peuvent être distinguées en fonction de l'abattement en GYM .

Une première phase qui dure une journée et au cours de laquelle la concentration initiale chute drastiquement dans les différents lots pour atteindre 879, 750, 1039 et 1769 µg GYM kg<sup>-1</sup> GD respectivement pour AA, AAT, AATB et SA ce qui représente un abattement en toxine de 74, 78, 69 et 48 %. Une deuxième phase plus longue, qui s'étale sur 14 jours pour AA, AAT et AATB et 38 jours pour SA.

**Tableau 12.** Récapitulatif des conditions expérimentales, équations exponentielles, analyses chimiques, bioessais.

Lot	Pré-stockage	Période de détoxification	Concentration initiale µg GYM kg <sup>-1</sup> GD	Concentration finale µg GYM kg <sup>-1</sup> GD	Test souris DSP	Equation
AA	Pas de stockage	17		125 (J15)	-	Y=1297 exp(-0,14)
				113(J17)	-	R2=0,75
AAT	Stockage à température ambiante 15C°pendant 48 heures	15	3375	138	-	Y=1355 exp(-0,09) R2=0,70
AATB	Stockage à 8C°pendant 48 heures	15		185	-	Y=1202 exp(-0,07) R2=0,60
SA	Pas de stockage	39		449 (J17)	+	Y=1436 exp(-0,05)
				519 (J27)	+	
				164(J39)	-	R2=0,74

Ainsi le taux de détoxification de la palourde *R. decussatus* pour les lots alimentés et le lot non alimenté est décrit selon une fonction exponentielle négative de premier ordre  $y_1 = y_0 e^{-kt}$  qui correspond à un modèle simple pour lequel t (jours) : durée de détoxification ;  $y_0$  (µg eq GYM kg<sup>-1</sup>GD) : concentration initiale de la toxine et k (jour<sup>-1</sup>) : coefficient de détoxification.

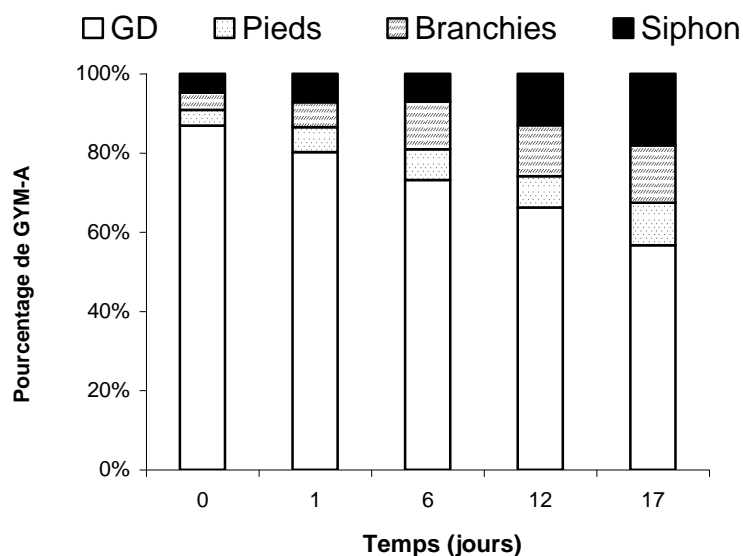
Les résultats des expérimentations (analyses chimiques et test souris DSP) sont présentés dans le Tableau 12 pour les différents lots testés.

Dans cette expérience les tests souris effectués au jour 8, 10, 12 et 15 pour les lots nourris n'ont été négatifs qu'au jour 15 avec des concentrations de 125, 138, 185 GYM kg<sup>-1</sup>

GD respectivement pour AA, AAT, AATB. En revanche, les tests souris effectués pour le lot non nourri ont été positifs aux jours 12, 17 et 27 avec des concentrations respectives de 568, 449 et 519 GYM kg<sup>-1</sup> GD. Ce bioessai n'a été négatif qu'au jour 39 avec une concentration de 164 GYM kg<sup>-1</sup> GD.

Dans cette expérience les coefficients de détoxification  $k$  respectifs des lots alimentés AA, AAT et AATB sont 0,14, 0,09 et 0,07 alors que le lot non alimenté présente un coefficient presque trois fois moins important (0,05) en comparaison du lot AA.

Les variations du pourcentage de GYM au niveau de la glande digestive et dans les autres tissus incluant le pied, les branchies et le siphon sont représentées dans la figure 27. Au début de la détoxification, le maximum de GYM est principalement situé dans la glande digestive avec 84 % de la toxicité totale de la chair alors que les autres tissus ne représentent que 16 % avec des proportions équivalentes entre le pied, les branchies et le siphon (Fig 27). Pendant toute la durée de la détoxification, le pourcentage de GYM au niveau de la glande digestive chute pour atteindre 60 % au bout de 17 jours alors que l'ensemble des autres tissus représente 40 % du contenu toxinique total (Fig 27).



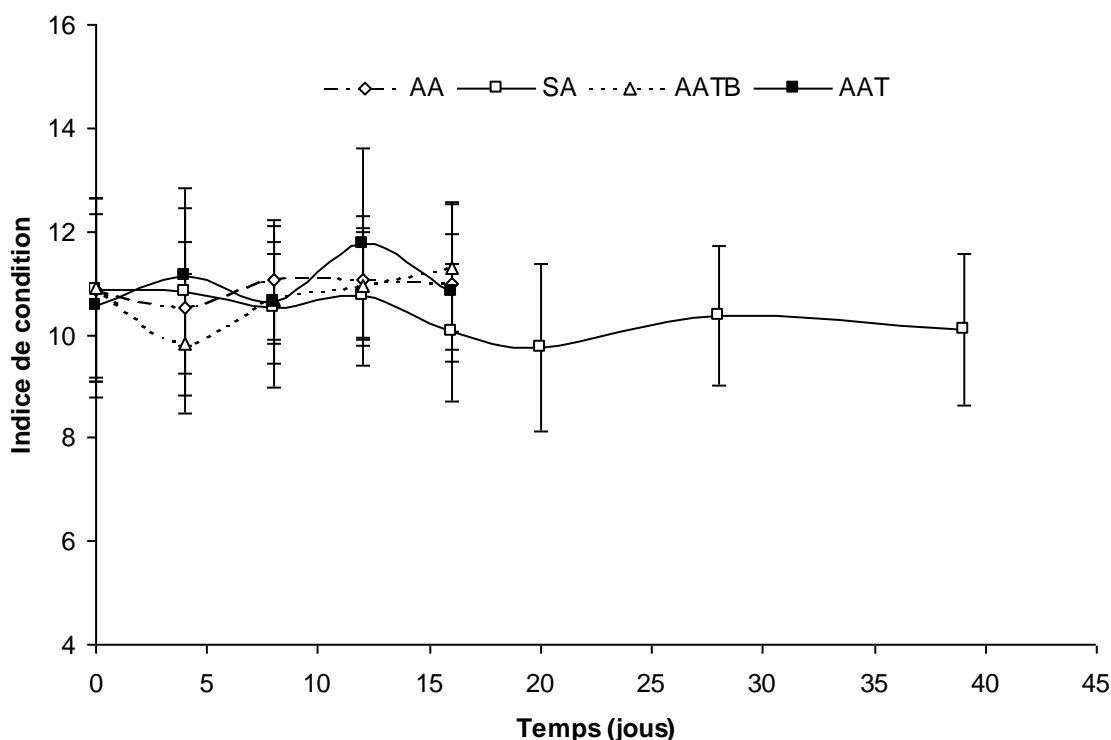
**Figure 27.** Distribution de la GYM (%) entre les différents organes de la palourde alimentée pendant la détoxification

### ***Indice de condition***

Les courbes des indices de condition (IC) sont différentes entre les lots alimentés et le lot non alimenté (Fig 28). En effet, pour les lots alimentés, des fluctuations non significatives des valeurs des IC sont observées mais elles restent similaires aux valeurs initiales.

L'IC du lot non alimenté montre une légère diminution non significative de 7% à la fin de l'expérience (jour 39). L'analyse statistique des IC ne montre une différence

significative à  $P < 0,05$  entre les lots alimentés (AA, AAT, AATB) et le lot non alimenté (SA) qu'à partir du 16<sup>ème</sup> jour.

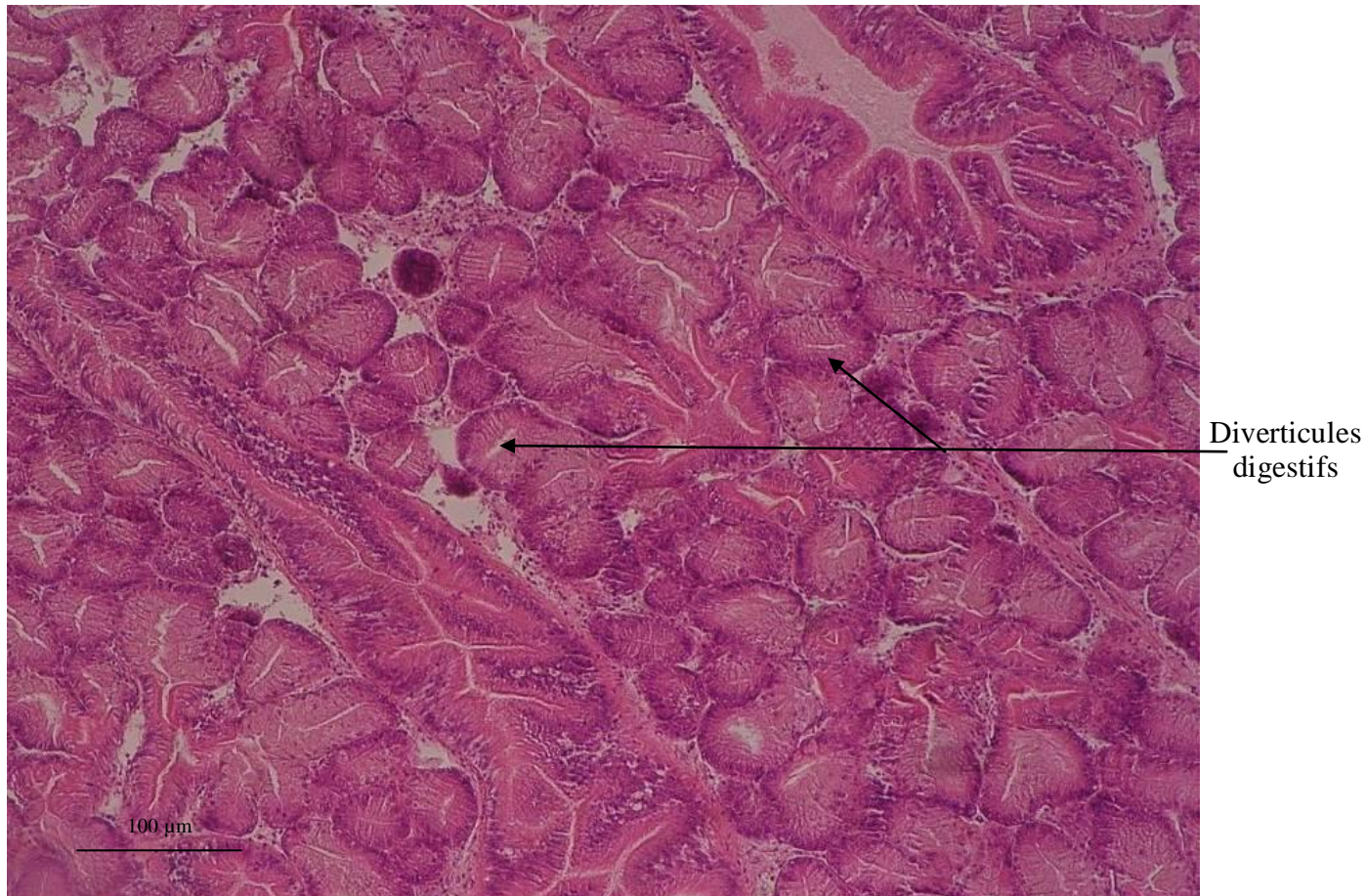


**Figure 28.** Variation de l'indice de condition des palourdes alimentées (AA, AAT, AATB) et des palourdes non alimentées (SA) pendant leur détoxification.

### Observations histologiques

Les observations histologiques réalisées au niveau des glandes digestives des palourdes contaminées naturellement par la gymnodimine puis détoxifiées ont montré un état normal de la glande digestive par rapport à des individus témoin non contaminés.

En effet, aucune présence de cellules de *K. selliformis* n'a été détectée au niveau des différents organes de la glande digestive incluant l'estomac, l'intestin et les diverticules digestifs. De plus, aucune différence n'a été observée concernant la forme des diverticules digestifs des palourdes témoins en comparaison avec des individus contaminés puis détoxifiés. En effet ces derniers montrent une présence massive de diverticules digestifs en bon état (Fig 29), caractérisées par un épithélium épais et un tissu conjonctif montrant une circulation hémocytaire modérée ; ce qui exclut la présence d'inflammation et d'infiltration hémocytaire au niveau de l'estomac et de l'intestin.



**Figure 29.** Etat non affecté de diverticules digestifs de palourdes contaminées *in-situ* par *Karenia selliformis*

### 3.4. Discussion

Différents procédés d'alimentation ont été testés dans le but d'accélérer l'élimination des toxines marines, de type DSP, des mollusques bivalves. Aucune tentative n'a été réalisée sur la détoxification de coquillages contaminés naturellement par la GYM. C'est dans ce cadre que s'inscrit ce travail. La méthode consiste à transférer, en conditions contrôlées, des palourdes contaminées naturellement dans le but de tester l'effet d'une alimentation avec une algue non toxique et les différentes méthodes de stockages utilisés sur la cinétique de détoxification des palourdes. Dans cette étude, le choix de la température de détoxification (17°C) est basé sur le comportement physiologique des bivalves. En effet, à des températures basses (inférieure à 12°C), Shumway et Cembella (1993) ont observé un ralentissement général de la détoxification des mollusques. De même, Fleet (1978) et Shumway (1996) ont montré une influence significative de la baisse de température sur les processus physiologiques des mollusques (arrêt de la filtration, ponte provoquée), et par conséquent sur

l'efficacité de l'élimination des micro-organismes et des composés toxiques. De même, dans les stations d'épuration de la palourde en Tunisie, la température utilisée avoisine 17°C.

Dans cette expérience, la cinétique de détoxification a été plus rapide chez les palourdes nourries avec *T.Iso* que chez les palourdes non alimentées. Ces résultats confirment les travaux de Medhioub *et al.* (2010) obtenus sur la détoxification des palourdes contaminées par la gymnodimine, en circuit ouvert et fermé, au laboratoire. En effet, la disponibilité de l'aliment non toxique a été proposée par plusieurs auteurs comme le meilleur procédé pour accélérer la cinétique de détoxification dans la mesure où une nutrition active accélère à la fois le transit dans la glande digestive et le métabolisme global (Haamer *et al.*, 1990; Sampayo *et al.*, 1990; Marcaillou-Le Baut *et al.*, 1993; Poletti *et al.*, 1996; Blanco *et al.*, 1999 ; Medhioub *et al.*, 2010). De même, Svensson (2003) a noté l'effet positif de la floraison printanière des micro-algues non toxiques sur la vitesse de détoxification de la moule en milieu naturel. Cependant, ce même auteur ne constate pas de différence entre les cinétiques de détoxification expérimentales des moules, nourries et non nourries, contaminées naturellement par l'acide okadaïque. Les études réalisées par Haamer *et al.* (1990) et Croci *et al.* (1994) ont montré que la détoxification des moules peut se produire même si aucune particule de nourriture n'est ajoutée au système. Toutefois, ces premiers auteurs ont signalé également une plus grande variabilité du contenu toxinique dans les moules qui n'ont pas reçu d'aliment.

Dans le cadre d'essais visant à déterminer la cinétique de détoxification des palourdes contaminées *in-situ*, dans des conditions contrôlées et sans apport alimentaire (Marrouchi *et al.*, 2010), il a été démontré que la cinétique de détoxification des palourdes, dans des conditions d'absence de nourriture, est de 29 jours. Cette cinétique présente un aspect biphasique caractérisé par une première longue période de 12 jours pendant laquelle un abattement de 64% a été déterminé suivi d'une deuxième phase qui dure 17 jours et qui correspond à un abattement de 11%. Il faut néanmoins noter que le contenu initial en GYM de la glande digestive est inférieur à celui retrouvé dans cette présente étude.

Dans la présente étude, les périodes de détoxification sont de 15 et 39 jours respectivement pour les palourdes nourries, quelle que soit la méthode de pré-stockage adoptée, et les palourdes non nourries. Le taux de détoxification de la GD des lots nourris et non nourris a été rapide au cours du premier jour avec 74, 47, 78 et 70 % respectivement pour AA, SA, AAT et AATB. Par la suite ce taux subit un ralentissement et est associé à un taux de détoxification lent dans les autres tissus. Les cinétiques de détoxification observées ici pour la GD et les autres tissus incluant les branchies, les siphons et le pied sont similaires à

celles décrites par Medhioub *et al.*, (2010) pour la même espèce mais après contamination expérimentale.

Cet aspect biphasique (rapide puis lent) de la cinétique de détoxification constaté dans la présente étude a déjà été observé pour d'autres types de toxines algales chez différentes espèces de mollusques, comme les DSP pour la moule (Marcaillou-Lebaut *et al.*, 1993 ; Fernandez *et al.*, 1998; Blanco *et al.*, 1999) et les PSP pour *Pecten maximus* (Lassus *et al.*, 1989) et *Spisula solidissima* (Bricelj et Cembella 1995). Les toxines semblent être réparties entre ces deux compartiments (GD et autres tissus) comme cela était observé chez la moule (Marcaillou-Le Baut *et al.* 1993) et la coquille Saint-Jacques (Bauder *et al.*, 1996) contaminées par des toxines DSP. Ces derniers auteurs ont constaté que la perte rapide en toxines au cours des 3 premiers jours de détoxification a coïncidé avec l'évacuation d'algues productrices de toxines à partir des viscères.

Par ailleurs, ce travail montre que la glande digestive accumule la quantité la plus importante en GYM (84 %). Les toxines restantes (16 %) ont été distribuées dans les autres tissus (siphons, pied, branchie). Cette accumulation différentielle entre les organes confirme les résultats obtenus par Medhioub *et al.* (2010) pour la même espèce, et aussi ceux trouvés pour les autres mollusques bivalves tels que la coquille Saint-Jacques *P. maximus* dont la glande digestive peut représenter de 94 à 99% de la charge totale en acide domoïque (Blanco *et al.*, 2002), la moule *M. edulis* avec 93% dans la GD (Grimmelt *et al.*, 1990), *C. virginica* avec 70% dans la glande digestive (Roelke *et al.*, 1993). Pour les DSP on retrouve 99% de la charge en toxines dans la glande digestive de *M. galloprovincialis* (Blanco *et al.*, 2007). De même, Bricelj *et al.*(1990) et Cembella *et al.*(1993) ont conclu que les GD des bivalves accumulent la plus grande partie de la charge totale en toxines, en dépit de la faible contribution de ces organes au poids corporel total.

La symptomatologie observée chez les souris auxquelles des extraits de palourdes toxiques ont été administrés par voie *i.p* est caractérisée par des réactions déjà décrites par Seki *et al.* (1996) et Munday *et al.* (2004) : étirement, agitation du corps, sursauts successifs immédiatement après injection, queue tendue, mouvements ralentis, paralysie des membres postérieurs, respiration difficile, exophtalmie. Ces symptômes sont tous de type neurologiques (Hu *et al.*, 1996; Cembella *et al.*, 2000; Takada *et al.* 2001).

En effet, une des caractéristiques de la GYM et de ses analogues, comme d'autres imine cyclique, réside dans la mortalité rapide des souris injectées par voie intrapéritoniale (Miles *et al.*, 2000), ce qui a conduit à leur attribuer l'appellation « toxines à action rapide » ou "fast-acting toxins, FAT" (Munday *et al.*, 2004). Ces mêmes auteurs précisent que la

mortalité survient en moins d'une minute à des doses létales et qu'aucune mortalité n'est enregistrée après 10-11min. De même, Medhioub *et al.* (2010) notent, lors de l'injection à des souris de la GYM extraite à partir des cellules de *Karenia selliformis*, soit une mortalité au bout de 3 à 7 minutes, soit réapparition d'un état normal après 20 minutes.

Différentes quantités d'extraits de palourdes ont été échantillonnées lors de la détoxification, puis injectées aux souris par voie *i.p.* afin de déterminer le potentiel toxique de la GYM. La correspondance de ces analyses chimiques avec les résultats du bioessai montre que les concentrations inférieures à  $185 \mu\text{g GYM kg}^{-1} \text{GD}$  permettent d'obtenir des test souris négatifs. Sachant que le poids corporel de la glande digestive représente un pourcentage relatif moyen de 13 %, l'expression de ces concentrations par kg de chair totale (CT) nous donne des concentrations de  $24 \mu\text{g GYM kg}^{-1} \text{CT}$ .

#### 4. Conclusion

La détoxification contrôlée, en circuit ouvert, appliquée à la palourde contaminée naturellement par la gymnodimine, est une des solutions pratiques à envisager pour la gestion de la pêche des palourdes afin d'assurer un approvisionnement continu du marché.

C'est dans ce contexte que les deux études décrites précédemment ont été réalisées. Pour ce faire, les travaux ont débuté par des contaminations contrôlées expérimentales d'une durée limitée (6 à 7 jours) et à petite échelle. Dans un deuxième temps, les travaux ont porté sur la détoxification à plus grande échelle de palourdes contaminées *in-situ* provenant de la lagune de Boughrara.

Rappelons que les objectifs visés lors de ces expérimentations consistaient à déterminer i) si l'introduction de la micro-algue fourrage *T.Iso* dans le circuit contenant les palourdes pouvait accélérer la cinétique de détoxification de ces bivalves fouisseurs, ii) quelle était la durée nécessaire de détoxification pour obtenir des animaux conformes à la consommation humaine.

Les résultats obtenus ont montré que la détoxification expérimentale des palourdes s'accélère en présence d'algues non toxiques quelle que soit l'origine de la contamination (expérimentale ou naturelle) et quel que soit le niveau initial en GYM-A. Dans ces conditions, les concentrations finales en GYM sont réduites et tombent à environ 5 à 10 % de la concentration initiale. La durée de détoxification varie du simple au double, soit de 7 à 15 jours selon le type de contamination étudiée, expérimentale ou naturelle, respectivement. Par contre, la méthode de pré-stockage n'induit pas de différences de cinétiques de détoxification sur 15 jours. Cette étude révèle également que le test souris est négatif dès lors que la

concentration en gymnodimine dans la glande digestive devient inférieure à  $185 \mu\text{g kg}^{-1}$  et ce quelle que soit la durée de la détoxification. Enfin, aucune lésion tissulaire significative, notamment au niveau de la glande digestive, n'a été observée chez les palourdes contaminées naturellement par *K. selliformis* par rapport à des individus témoins non contaminés.

Ces connaissances nous permettront de concevoir le principe d'une unité pilote de détoxification de la palourde après quelques travaux supplémentaires, nécessaires à l'optimisation des conditions de détoxification. Il est nécessaire, par exemple, i) de préciser les concentrations minimales de micro-algues 'fourrage' à ajouter pour réduire significativement le temps de détoxification par rapport à des palourdes non alimentées et, ii) d'étudier le devenir des cellules de *K. selliformis* et de la toxine dissoute dans l'eau de mer circulant dans le circuit de détoxification. Par ailleurs, d'autres expériences sont nécessaires pour caractériser la qualité nutritionnelle des coquillages après détoxification, en particulier la composition en lipides, protéines, glucides et les qualités organoleptiques des animaux produits.



## **CHAPITRE III. Croissance et toxicité d'*Alexandrium ostenfeldii***

### **3.1. Article 3- *Alexandrium ostenfeldii* growth and spiroclides production in batch culture and photobioreactor.**

*Article soumis le 04 janvier 2011 dans le journal 'Toxicon'*

Walid MEDHIOUB<sup>1,2</sup>, Véronique SECHET<sup>1</sup>, Philippe TRUQUET<sup>1</sup>, Michèle BARDOUIL<sup>1</sup>, Zouher AMZIL<sup>1</sup>, Patrick LASSUS<sup>1\*</sup> and Philippe SOUDANT<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Laboratoire Phycotoxines, IFREMER, Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer, BP21105 44311 Nantes CEDEX3, France.

<sup>2</sup> Laboratoire d'Aquaculture, INSTM, Institut National des Sciences et Technologies de la Mer, Route de Kniss - 5000 Monastir, Tunisie.

<sup>3</sup> Université de Bretagne Occidentale – IUEM, LEMAR CNRS UMR 6539, Place Nicolas Copernic, technopôle Brest Iroise – 29280 Plouzané, France.

### Résumé

Actuellement les efflorescences d'*A. ostenfeldii* sont de plus en plus fréquemment signalées. De nombreux travaux ont été publiés, en majorité sur la détermination des conditions environnementales favorisant le développement de ce dinoflagellé (croissance, survie) ainsi que la toxicité de cette espèce (Ravn *et al.*, 1995 ; John *et al.*, 2001 ; Maclean *et al.*, 2003 ; Otero *et al.*, 2010).

C'est dans ce contexte que s'inscrit ce travail qui, dans un premier temps, a pour but de déterminer les conditions optimales de croissance et de toxicité de la souche acclimatée au laboratoire. Cette première étape est essentielle pour envisager une production d'*A. ostenfeldii* en grand volume. La biomasse finale obtenue sera utilisée pour contaminer expérimentalement des huîtres afin de simuler les épisodes de contamination naturelle.

Ce travail avait pour but d'étudier i) la croissance et la production en spirovides du dinoflagellé toxique *Alexandrium ostenfeldii* (CCMP1773 souche danoise) sous différentes conditions et avec deux modes de cultures : en batch et en photobioréacteur (cultures en continu). Initialement, les performances de croissance et de production intracellulaire en spirovide ont été déterminées dans des conditions de culture statique (sans aération et agitation) à différentes températures (16 et 22°C) et pour différents milieux de culture (L1, f/2 et L1+extrait de terre).

La culture en continu a été menée en photobioréacteur à une température de 18°C en utilisant le milieu L1+extrait de terre. Cependant, le pH a été ajusté à 8,5 grâce à une régulation de l'apport en CO<sub>2</sub> et une agitation continue a été appliquée.

Cette étude a montré que la croissance d'*A. ostenfeldii* est significativement affectée par les méthodes de culture adoptées et les conditions environnementales. La culture en photobioréacteur améliore les performances de croissance optimale ( $\mu=0,16 \text{ div j}^{-1}$ ; concentration= $7 \times 10^4 \text{ cellule.ml}^{-1}$ ) par rapport aux cultures en batch ( $\mu=0,14 \text{ div j}^{-1}$ ; concentration= $1,4 \times 10^4 \text{ cellule.ml}^{-1}$ ). L'élévation de température entraîne une inhibition de la croissance et une diminution du diamètre des cellules.

Ce travail nous a permis de démontrer une corrélation négative entre la production totale en spirovide (exprimée en pg SPX eq 13-desMeC cell<sup>-1</sup>) et la concentration cellulaire, notamment lors de la culture en photobioréacteur.

L'étude de la variation du profil toxinique de cette espèce a révélé une dominance de la spirovide 13,19-didesMeC, particulièrement lors de la culture en continu (60-87%) et un impact des différentes conditions environnementales (température et milieu de culture) et des méthodes de culture utilisées sur ce profil.

Cependant, pour optimiser à la fois la production en spirolides et la croissance cellulaire d'*A.ostenfeldii*, d'autres travaux sont nécessaires afin d'étudier l'influence de certains facteurs environnementaux tels que l'intensité lumineuse, le pH et la température. C'est pour cette raison que des plans expérimentaux ont été débutés (annexe 4) dans le but d'étudier l'interaction de ces différents facteurs sur les performances de croissance et de production toxinique de cette espèce.

**Mots clés:** *Alexandrium ostenfeldii*, croissance, spirolides, batch, photobioreacteur.

### **Abstract**

Growth and spirolide production of the toxic dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* (Danish strain CCMP1773) were studied in batch culture and photobioreactor (continuous cultures). Initially, batch cultures were grown in 450 mL flask culture without aeration and under varying conditions of temperature (16 and 22°C) and culture medium (L1, f/2 and L1 with addition of soil extract). Subsequently, cultures were grown in 8 L aerated flat-bottomed vessels using L1 with soil extract as culture medium at 16°C. Continuous cultures in photobioreactor were conducted at 18°C in L1 with soil extract; pH was maintained at 8.5 and continuous stirring was applied.

This study showed that *A. ostenfeldii* growth was significantly affected by temperature. At the end of the exponential phase, maximum cell concentration and cell diameter were significantly higher at 16°C than at 22°C. In batch culture, maximum spirolide cell quota (approx. 5 pg SPX 13-desMeC eq cell<sup>-1</sup>) was detected during lag phase for all conditions used. Then, spirolide cell quota was negatively and significantly correlated to cell concentration according to the following equation:  $y=4013.9x^{-0.858}$ .

Temperature and culture medium affected spirolide profile which was characterized by the dominance of 13,19-didesMeC (29-46%), followed by SPX-D (21-28%), 13-desMeC (21-23%), and 13-desMeD (17-21%).

Stable growth of *A. ostenfeldii* was maintained in a photobioreactor over two months, with maximum cell concentration of  $7 \times 10^4$  cells mL<sup>-1</sup>. As in batch culture, maximum spirolide cell quota was found in lag phase and then decreased significantly throughout the exponential phase. Spirolide cell quota was negatively and significantly correlated to cell concentration according to the equation:  $y=12858x^{-0.8986}$ . In photobioreactor, spirolide profile was characterized by a higher proportion of 13,19-didesMeC (60-87%) and lower proportions of SPX-D (3-12%) and 13-desMeD (1.6-10%) as compared to batch culture.

**Keywords:** *Alexandrium ostenfeldii*, spirolide production, growth, batch, photobioreactor.

## 1. Introduction

Spirolides were first detected in mussels and clams from Nova Scotia (Canada) during spring and summer of 1991 (Sleno *et al.*, 2004 ; Richard *et al.*, 2000). More, recently, these toxins were found in Spain (Villar Gonzalez *et al.*, 2006), Italy (Ciminiello *et al.*, 2006), Scotland (John *et al.*, 2003), Norway (Aasen *et al.*, 2005), Denmark (MacKinnon *et al.*, 2006b) and France (Amzil *et al.*, 2007).

*Alexandrium ostenfeldii* was identified as the primary source of spirolides, a novel group of macrocyclic imines characterised as marine fast-acting toxins (Cembella *et al.*, 2000). Furthermore, the production of PSP toxins was also demonstrated for some *A. ostenfeldii* strains (Hansen *et al.*, 1992; Mackenzie *et al.*, 1996). *Alexandrium ostenfeldii* was considered as a cold-water mixotroph species (Jacobson and Anderson 1996; Gribble *et al.*, 2005), characterized by the presence of food vacuoles containing ciliates or phytoplankton residues (Jacobson and Anderson, 1996) and is known to be toxic to the tintinnid *Favella ehrenbergii* (Hansen *et al.*, 1992). Moreover, some *A. ostenfeldii* strains can cause short-term toxic effects on heterotrophic dinoflagellates (Tillmann and John, 2002).

The LD<sub>50</sub> of a mixture of spirolides, comprising mostly 13-desMeC, was determined to be 40 µg/kg after intraperitoneal injection in mice and 1 mg/kg after oral administration (Richard *et al.*, 2000). However, toxic effects in humans due to the ingestion of shellfish contaminated solely with spirolides had never been reported yet.

Great divergences were observed in spirolide toxin profiles among *A. ostenfeldii* in culture and in natural bloom isolates from different geographical regions. For example, the typical spirolide profile of species from the northeast Atlantic region often contain primarily 13-desMeC, 13,19-didesMeC and 20-methyl G spirolides, but this is accompanied at the same time by considerable inter- and intrapopulation heterogeneity (Botana, 2008). The toxin profiles from plankton size fractions containing *A. ostenfeldii* and collected at Ship Harbor, Nova Scotia (Canada), were dominated by spirolides A, B, C, and 13-desMeC, whereas those collected at Graves Shoal, less than 100 km south, were remarkably different, with spirolides B, D, and isomer D2 as the major components (Cembella *et al.*, 2001). A clonal cultured isolate (AOSH1) from Ship Harbor yielded a similar profile to the natural mixed population, that is, dominated by 13-desMeC (Cembella *et al.*, 1999; 2000) but another strain AOSH2 isolated simultaneously from the same water body produced primarily spirolide C and 20-methyl G (Cembella *et al.*, 2007). MacKinnon *et al.* (2006a) identified two derivatives, spirolide G and 13,19-didesMeG, in Danish strain (LF37 and LF38). Finally, major

components of the toxin profile of cultured *A. ostenfeldii* from Limfjord, Denmark (CCMP1773) were 13,19-didesMeC and spirolides 13-desMe C (Otero *et al.*, 2010a,b).

The effects of environmental factors on growth of *Alexandrium ostenfeldii* and toxin production are discussed in a few studies (Jensen and Moestrup 1997; John *et al.*, 2001; Maclean *et al.*, 2003; Ravn *et al.*, 1995). Maclean *et al.* (2003) reported that growth of *A. ostenfeldii* was related to environmental conditions, and was strongly limited under sub-optimal regimes of light ( $> 150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), salinity ( $< 15$  psu) and low nutrients ( $< 20 \mu\text{M}$  initial nitrate). These same authors suggest that the amount of spirolides in culture synthesized by *A. ostenfeldii* increased with cell concentration, but spirolide amount per cell and toxin composition do not differ significantly in response to variations of the environmental parameters. Other authors show that total toxin in batch culture is affected by light intensity and photoperiod (John *et al.*, 2001). Moreover Ravn *et al.* (1995) showed that when *A. ostenfeldii* was cultured under conditions of limiting soil extract, the cell division rate is reduced and toxin profile was modified. Finally, Jensen and Moestrup (1997) demonstrated that maximum division rate of *A. ostenfeldii* occurred at 20°C and from 15 to 20 psu and that variations in cell size were observed according to temperatures and salinities.

In this paper, we examine growth, toxin and cell quota profile of *A. ostenfeldii* (i) in batch culture to determine the effects of temperature and culture medium and (ii) in photobioreactor cultures to develop procedures suitable for mass cultures.

## 2. Materials and Methods

### *Micro-algae*

The harmful algal species used in this study was the CCMP1773 strain of *Alexandrium ostenfeldii* (Balech) isolated from Limfjorden (Denmark) and obtained from the Provasoli Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton. This strain was selected for its complex spirolide profile and the absence of PSP toxins (Otero *et al.*, 2010a,b; Botana 2008; Ciminiello *et al.*, 2006, 2010).

*A. ostenfeldii* was maintained in sea water enriched with L1 nutrients (Guillard and Hargraves, 1993), in 45 mL flask at 16°C, 35 psu, and  $155 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$  provided by cool-white fluorescent lamps on 12h:12h light:dark cycle in a culture room.

### *Growth in batch cultures*

Initial cultures of *A. ostenfeldii* were grown in 450 mL culture flasks IWAKI® at 16 and 22°C using sterile sea water at a salinity of 35 psu and enriched with three media: f/2 (Guillard and Ryther 1962, Guillard, 1975), L1 (Guillard and Hargraves, 1993), and L1 + soil extract at a concentration of 3 ml per litre according to Ravn *et al.* (1995). Six experimental

treatments were applied in triplicate, under a 16h:8h light:dark regime with a photon irradiance rate of  $190 \mu\text{mole m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

Subsequently, *A. ostenfeldii* cultures were carried out using flat-bottomed vessels designed for 8 l cultures with aeration. All cultures were grown in triplicate in L1 medium (Guillard and Ryther 1962, Guillard, 1975), with soil extract added at the same concentration (3 ml/l). Sterile sea water at a salinity of 35 psu was maintained at  $16^{\circ}\text{C}$  under a 12h:12h light : dark regime and at a photon irradiance rate of  $155 \mu\text{mole m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

#### ***Soil extract preparation***

The soil used to generate the extract was collected from a natural environment rich in nutrients according to Loeblich and Smith (1968). No fungicides, insecticides, fertilizers, or other harmful compounds were present. First, the soil was sifted once through a coarse sieve (1 mm) to eliminate the dry ground and then through a fine sieve ( $60 \mu\text{m}$ ). Soil (300 g) was mixed in 600 millilitres of distilled water and autoclaved for 60 minutes at  $121^{\circ}\text{C}$ . The solution was centrifuged at 4000 rpm for 20 minutes in 45 ml polyethylene tubes and then supernatants were collected and filtered through  $0.22\mu\text{m}$ . Finally, sterile soil extract was divided in 15 ml tubes and wrapped with parafilm to prevent bacteria contamination then stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### ***Culture in 100 l photobioreactor***

*Alexandrium ostenfeldii* was also cultured in 100 l bioreactors. Cells were inoculated at a concentration of approx.  $8 \times 10^3 \text{ cell ml}^{-1}$  in sterile sea water at a salinity of 35 psu enriched with L1 + soil extract (3 ml/l). The bioreactors were made of 100 l polymethyl methacrylate stirred-tanks (0.29 m diameter, 1.5 m length and 0.01 m container wall thickness). Cultures were stirred by 4-paddle impeller turbines at a rate of 50 rpm. The upper headplate of the bioreactors was designed to support all probes and tubing. An on-line pH-meter transmitted measurements to a central computer that controlled pH value by injecting  $\text{CO}_2$  into the bioreactors. The system was controlled by a computer equipped with specific software developed in Visual Basic<sup>®</sup>, which managed probe calibration and on-line recording of culture parameters. The reactors were placed in a regulated room at  $18^{\circ}\text{C}$  with light supplied at a 16h:8h regime and a photon irradiance of  $188 \mu\text{mole m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

The system was adapted to continuous-flow culture by the addition of a peristaltic pump supplying nutrients at a flow rate of  $0.2 \text{ ml min}^{-1}$  and another pump collecting overflow fractions.

**Analytical methods**

Aliquots (5 ml) of the cultures were taken every two days to determine cell density with a Coulter-counter Multisizer<sup>®</sup> III. Growth rates ( $\mu$ ) during all phases were calculated using the equation (Guillard 1973).

$$\mu = (\ln X_t - \ln X_0) / t$$

where  $X_0$  is the initial cell density and  $X_t$  is the cell density after  $t$  days.

**Toxin analysis**

Spirolide production and composition were determined from 10 ml samples taken from: i) triplicate flask cultures in all treatments after 3, 8 and 16 days following inoculation; ii) triplicate flat bottomed vessel cultures at days 0, 3, 10 and 18; and, iii) one photobioreactor culture during all culture phases (days 1, 5, 7, 12, 14, 20, 26, 34, 41, 46, 62, 78, 98, and 118).

Cells were collected by centrifugation (4000g, 10 min, 4°C), resuspended in 1 ml methanol/water (95/5) and sonicated 20 mn on ice with a Vibra Cell<sup>®</sup> 75115 device. The extracts were collected in 2 ml eppendorf tubes and then frozen at – 80°C.

The LC-MS/MS analysis were performed according to Amzil *et al*, (2007) using a Shimadzu LC-20 AD XR<sup>®</sup> model coupled with a triple quadruple mass spectrometer (Q TRAP, API 4000<sup>®</sup>) equipped with an electrospray ionisation source (ESI). Toxins were eluted in a 3  $\mu$ m hyperclone MOS C8 column (50X2.0mm, Phenomenex) at 20°C with a linear gradient set at 0.2 ml/min. The mobile phase consisted of two components (A) water and (B) acetonitrile/water (95:5), both containing 50 mM formic acid and 2 mM ammonium formate.

Analyses were carried out in multiple reaction monitoring (MRM) positive ion mode and the two most intense produced ions per component were selected (Table 13).

In the present study, this method was used to detect and quantify known spirolides in *A. ostenfeldii* culture by comparing them with certified standards of 13-desMeC (NRCC, National Research Council (Canada). Good linear calibration data were obtained for spirolide standard in solution ( $r^2=0.9958$ ).

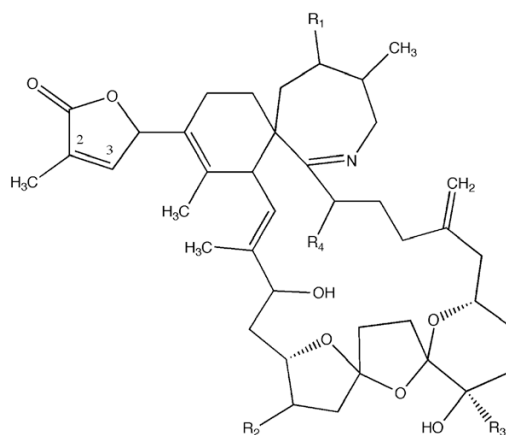
**Statistical analysis**

Experimental data were analysed using Statgraphics software. Effects of temperature and culture media on the growth (cell concentration and division rate), and spirolide cell quota and profile of the toxic dinoflagellate *A. ostenfeldii* were assessed using two ways-MANOVA. Regression analyses were used to investigate the relationship between cell concentration and total spirolide cell quota.



The growth rate and spirolide profile were arcsin-square root(x) transformed prior to statistical analysis but presented as untransformed data. Differences between means were considered statistically significant at  $P \leq 0.05$ .

**Tableau 13.** Structural components of spirolides found among *A. ostenfeldii* (strain CCMP1773) and transition conditions. m/z (mass to charge ratio).



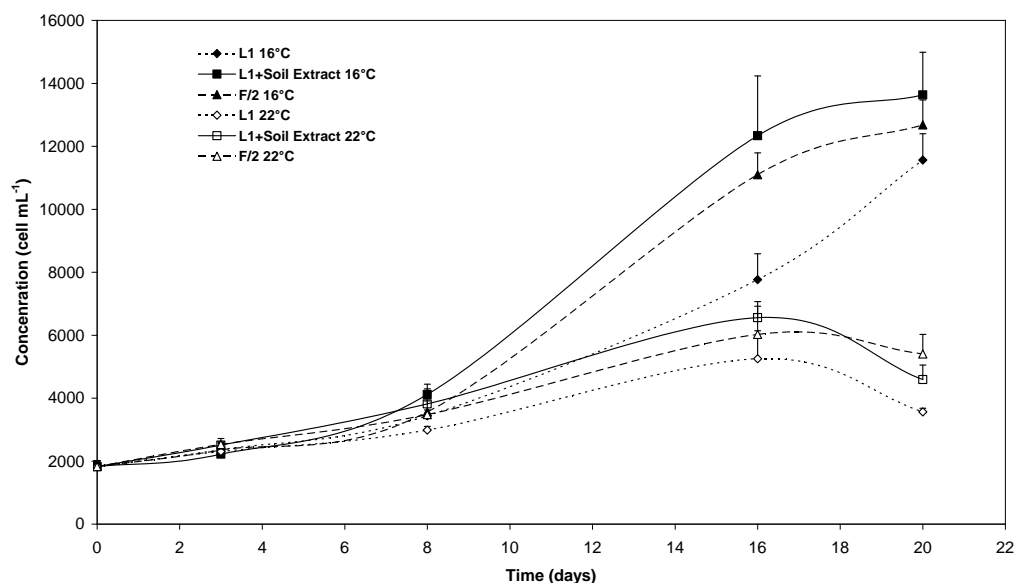
Spirolides (SPX)	R1	R2	R3	R4	$\Delta$	Transitions m/z
D	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H		708.5>690.5/164
13-desMeC	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	H	$\Delta^{2,3}$	692.7>444.3/164.2
13, 19-didesMeC	CH <sub>3</sub>	H	H	H	$\Delta^{2,3}$	678.5>660.4/642.4/624.4 /430.5
13-desMeD	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	H		694.5>444.3/164.5

### 3. Results

#### *Cell growth*

*A. ostenfeldii* growth in 450 ml flasks under different temperatures and culture medium conditions was characterized by low growth during the first 8 days followed by an exponential growth which ended after 16-20 days of culture (Fig. 30). The highest cell concentrations were obtained after 20 days of culture at 16°C and after 16 days of culture at 22°C. After 16 days of culture, maximum cell concentration and growth rate were significantly different ( $P < 0.01$ ) between the temperatures used (16°C and 22°C).

Addition of soil extract to the L1 medium resulted in slightly but not significantly higher maximum cell concentration and growth rate as compared to L1 and f/2 medium at both culture temperatures (Table 14).

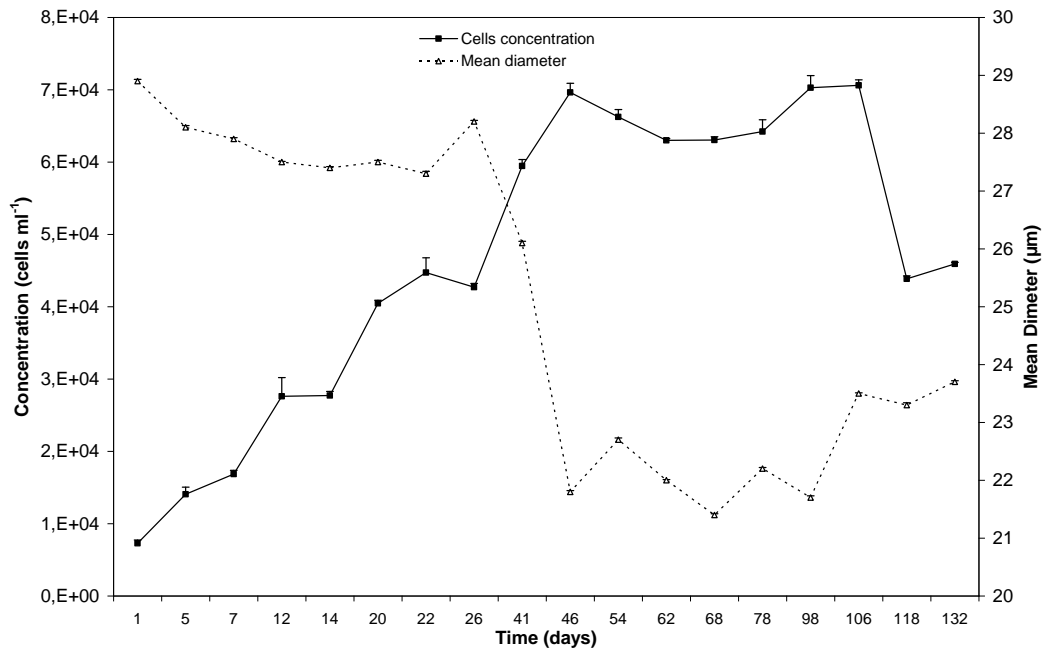


**Figure 30.** *A. ostenfeldii* growth of in 450 ml flask culture and for six experimental conditions using three medium (L1, L1+ soil extract, f/2) and two temperatures (16 and 22°C). All values are means of triplicate cultures ( $n=3$ ).

**Tableau 14.** Maximum cell concentration and growth rate for *A. ostenfeldii* (CCMP1773) determined through the exponential phase of growth in batch and photobioreactor culture under different environmental conditions.

Conditions		Maximum cell concentration (cell mL <sup>-1</sup> )	$\mu_{\max}$ (div d <sup>-1</sup> )
<b>450 ml flask culture without aeration</b>			
16°C	L1	10560 ± 836	0.12 ± 0.02
	L1 + soil extract	14630 ± 1356	0.14 ± 0.03
	f/2	12680 ± 790	0.14 ± 0.02
22°C	L1	5250 ± 890	0.08 ± 0.02
	L1 + soil extract	6557 ± 507	0.1 ± 0.03
	f/2	6026 ± 892	0.10 ± 0.02
<b>Flat bottomed vessel with aeration</b>			
16°C	8 l culture (L1 + soil extract)	16788 ± 1700	0.13 ± 0.03
<b>Photobioreactor with aeration, agitation and pH regulation</b>			
18°C	100 l culture (L1 + soil Extract)	70600 ± 766	0.16 ± 0.01

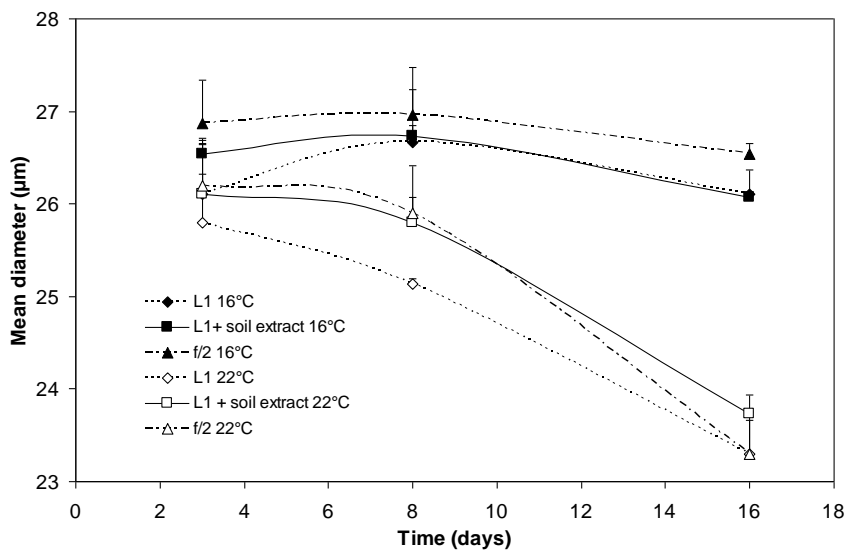
Cells grown in photobioreactor with aeration, agitation and pH regulation at 18°C showed the highest specific growth rate (0.16 div d<sup>-1</sup>) and maximum cell concentration (7 10<sup>4</sup> cell mL<sup>-1</sup>) on day 106 (Fig. 31 & Table 14).



**Figure 31.** Cell concentrations and mean cell diameters of *Alexandrium ostenfeldii* during its growth in 100L-photobioreactor.

*Changes in cell diameter during growth in batch and photobioreactor cultures*

Growth of *A. ostenfeldii* in flask culture under different conditions showed that after 3 days of culture mean cell diameters were ranging between 26 and 27 μm with lower and upper limits corresponding to 17 and 40 μm (Fig 32 and Fig 33a, b).

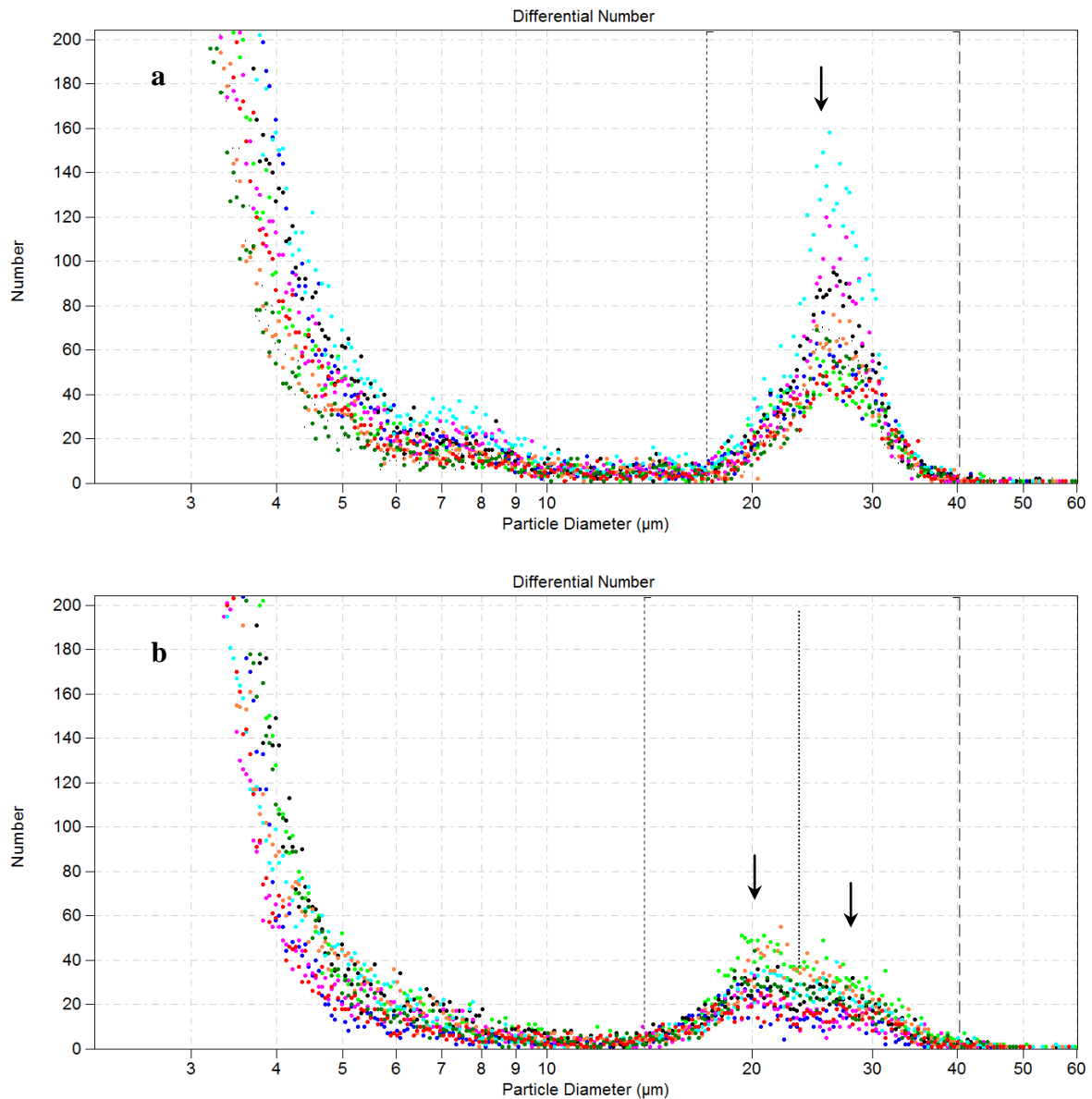


**Figure 32.** Mean cell diameter of *Alexandrium ostenfeldii* during growth in 450 ml flask culture under different condition.

However, on day 8 and 16, *A. ostenfeldii* grown at 22°C showed a significant decrease ( $P < 0.01$ ) in mean cell diameters (ranging between 25 and 26 μm at  $D_8$  and between 23 and 24 μm at  $D_{16}$ ) as compared to mean diameter (ranging between 26 and 27 μm at  $D_8$  and  $D_{16}$ ) of

cells grown at 16°C (Fig 32). There are no significant differences in mean cell diameter ( $P>0.05$ ) between the three culture regardless of culture days or temperature (Fig 32).

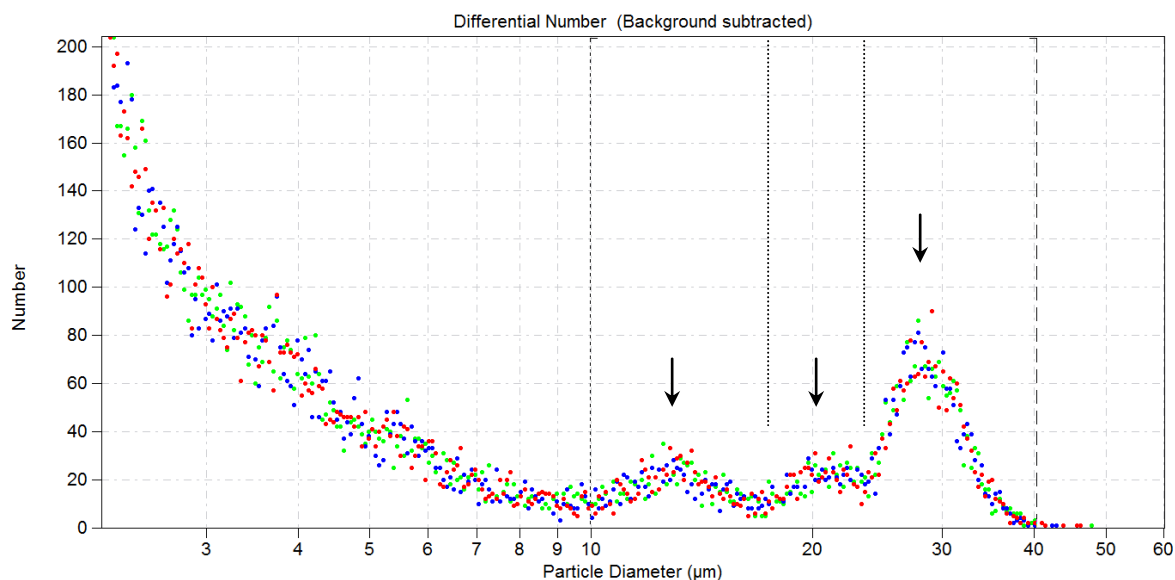
After 16 days culture, cells diameter grown at 16°C showed one peak with cell diameter between 19 and 40 µm. However, at 22°C, cells showed two distribution modes of cell size (Fig 33a). The first is located between 14 and 24 µm and the second between 24 and 40 µm (Fig 33b).



**Figure 33.** Cell diameter spectrum in 450 ml flask culture after 16 days culture at 16°C (a) and at 22°C (b).

Significant decrease of mean cell diameter of *A. ostenfeldii* cells was observed during growth in photobioreactor culture. The initial mean cell diameter was 28.5 µm in the inoculum. After 34 days culture, mean cell diameter began to decrease and was 23.6 µm. At this time, cells of *A. ostenfeldii* showed three distribution modes of cell size. The first peak is

located between 10 and 17  $\mu\text{m}$ , the second between 17 and 23  $\mu\text{m}$  and the last peak between 23 and 40  $\mu\text{m}$  (Fig 34). Mean cell diameter continued to decline progressively during the exponential growth phase to reach 21.4  $\mu\text{m}$  on day 68 (Fig. 31). Conversely, cell concentration increased progressively over the same period (Fig. 31).

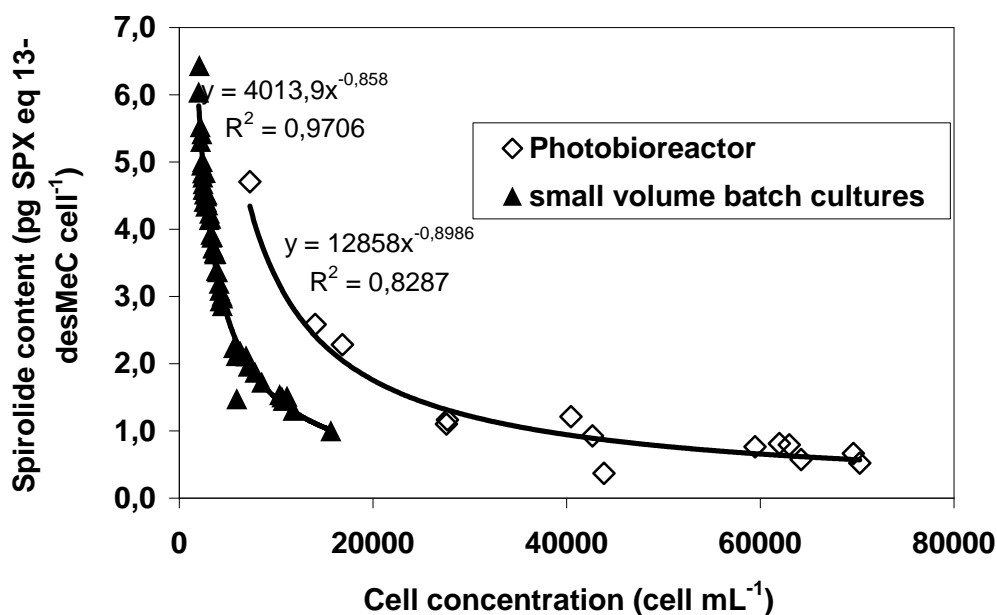


**Figure 34.** Cell diameter spectrum in photobioreactor culture after 34 days culture.

### *Spirolide cell quota*

Spirolide cell quota (expressed as  $\text{pg cell}^{-1}$ ) in batch and photobioreactor culture was significantly related to cell concentration, respectively, according to the following equations:  $y=4013.9x^{-0.858}$  and  $y=12858x^{-0.8986}$  where “y” represents the spiroside cell quota and “x” the corresponding cell concentration (Fig 35).

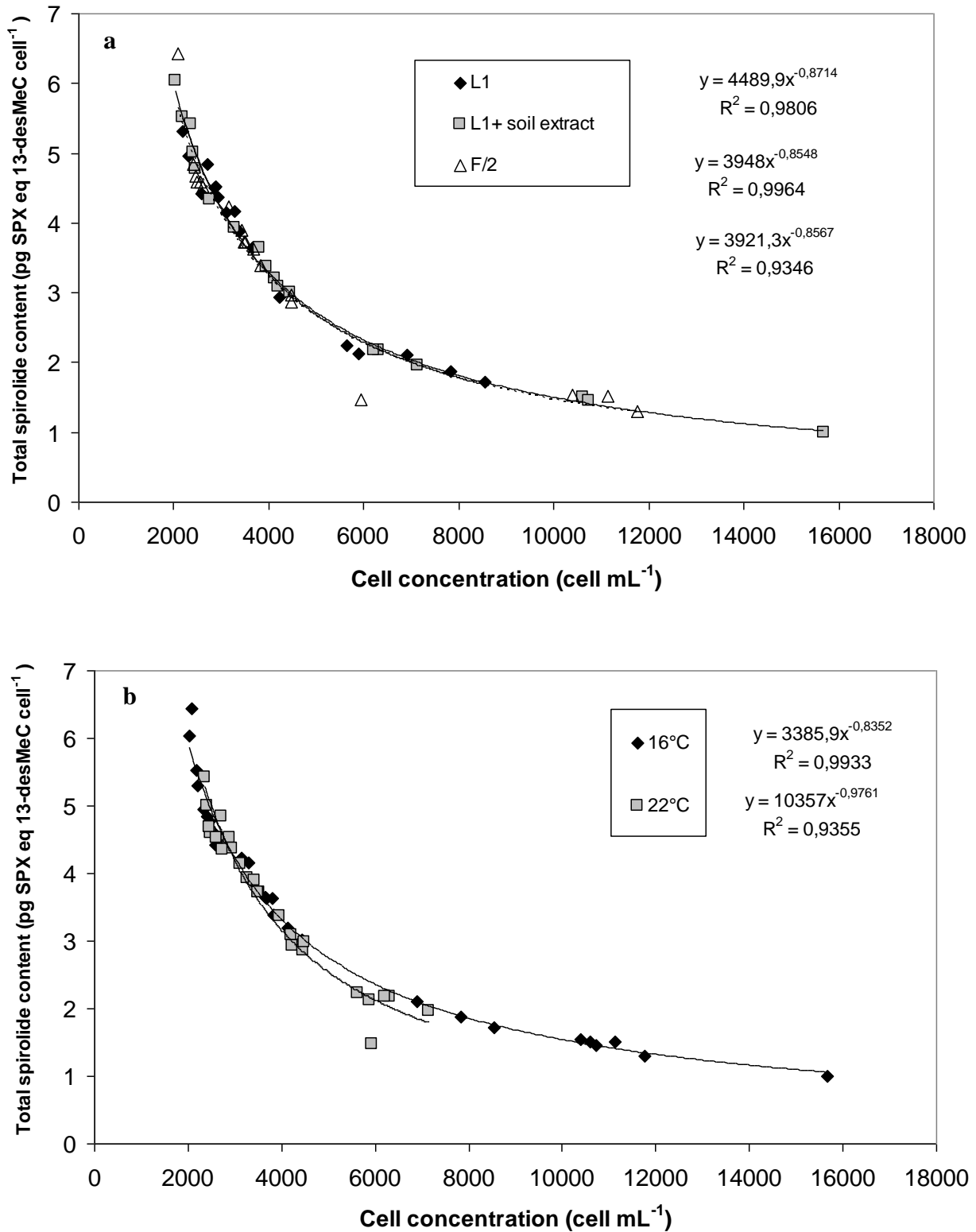
In all batch culture conditions used, total spiroside content at day 3 was approx. 5  $\text{pg SPX eq 13-desMeC cell}^{-1}$  and decreased steadily and significantly with culture aging to reach low levels ranging between 1.3 and 2.4  $\text{pg SPX eq 13-desMeC cell}^{-1}$  at day 16 (Table 15). At this time, total spiroside production was significantly higher at 22°C than at 16°C regardless of medium composition ( $P<0.01$ ). However, despite the different medium composition and temperature used, spiroside contents were always significantly related to the cell concentration (Fig 36a,b).



**Figure 35.** Relationship between cell concentration and intracellular spirolide content in photobioreactor and small volume batch cultures.

Cells grown in 8 l showed that total spirolides decreased with the age of the culture to reach 1.7 pg SPX eq 13-desMeC cell<sup>-1</sup> at day 18 (Table 15). Overall, total spirolide contents were similar to those obtained with 450 ml non aerated culture conditions.

Total spirolide cell quota in photobioreactor culture, decreased rapidly during the first 14 days from 4.7 pg to 1.1 pg SPX eq 13-desMeC cell<sup>-1</sup> (Table 15). Then, total spirolide cell quota continued to decrease steadily to reach 0.37 pg SPX eq 13-desMeC cell<sup>-1</sup> after 118 days of culture (Table 15).



**Figure 36.** Relationship between cell concentration and intracellular spriolide content in small volume batch cultures under three different culture media (L1, L1+ Soil Extract, f/2) (a) and at two temperatures (16 °C and 22°C) (b).

**Tableau 15.** Spirolide profile for *A. ostenfeldii* (CCMP1773) determined through growth in batch and photobioreactor culture under different environmental conditions.

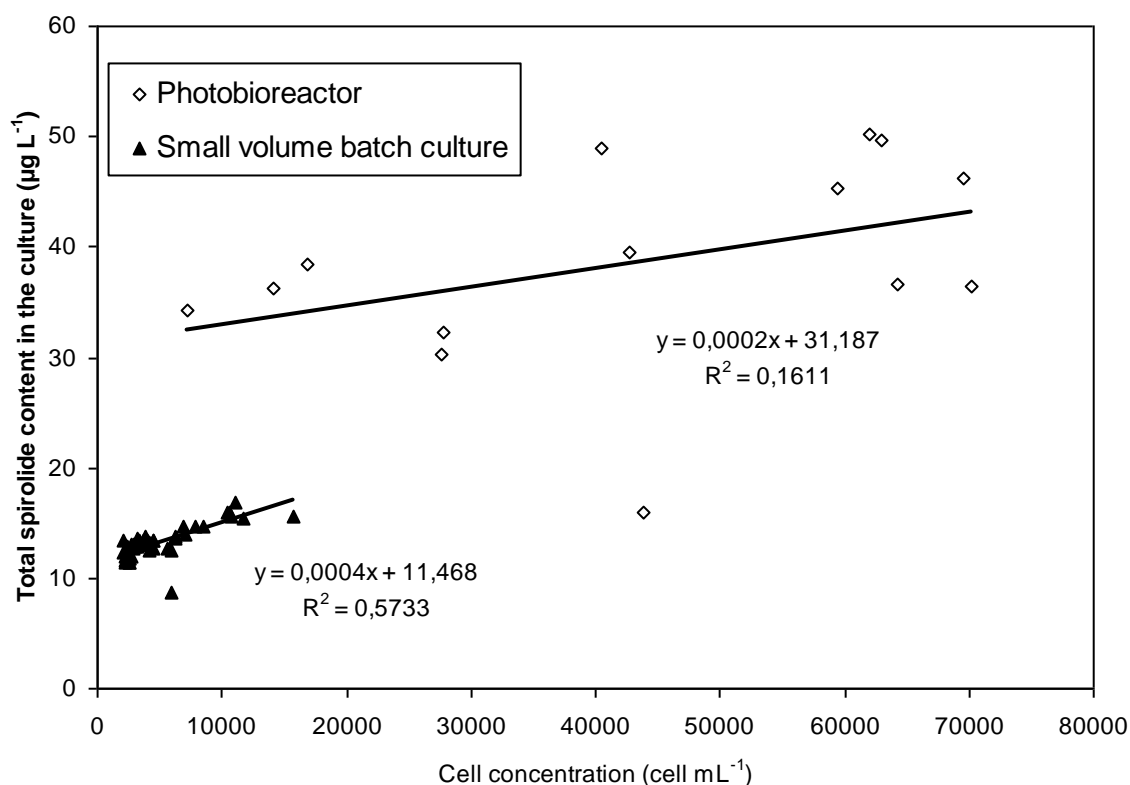
T (°C)	Medium/ volume culture	Days	Toxins (%)				Total (pg SPX eq 13- desMeC cell <sup>-1</sup> )
			13,19- didesMeC	13- desMeC	13- desMeD	SPX- D	
<b>Flask culture without aeration</b>							
16°C	L1 450 ml	3	29.1	22.2	20.8	27.8	<b>4.9 ± 0.4</b>
		8	33.3	22.1	20.1	24.5	<b>3.9 ± 0.3</b>
		16	37.8	21.5	18.4	22.3	<b>1.9 ± 0.2</b>
	L1 + soil extract 450 ml	3	31.4	22.1	20.2	26.3	<b>5.4 ± 0.6</b>
		8	33.6	22.3	19.9	24.2	<b>3.3 ± 0.3</b>
		16	41.1	20.7	17.4	20.8	<b>1.3 ± 0.3</b>
	f/2 450 ml	3	32.7	21.9	19.5	25.8	<b>5.3 ± 1</b>
		8	33.0	22.0	20.3	24.6	<b>3.7 ± 0.4</b>
		16	45.7	22.9	18.7	22.7	<b>1.3 ± 0.3</b>
22°C	L1 450 ml	3	34.1	21.7	18.8	25.3	<b>4.6 ± 0.1</b>
		8	31.8	22.4	20.7	25.0	<b>3.8 ± 0.1</b>
		16	29.9	22.9	21.4	25.7	<b>2.4 ± 0.8</b>
	L1 + soil extract 450 ml	3	32.3	21.9	19.6	26.2	<b>4.6 ± 0.2</b>
		8	32.1	22.2	20.5	25.1	<b>4.3 ± 0.2</b>
		16	34.7	22.3	19.6	23.3	<b>2.4 ± 0.4</b>
	f/2 450 ml	3	29.2	22.1	20.7	28.0	<b>4.9 ± 0.5</b>
		8	32.3	22.4	20.5	24.8	<b>3.5 ± 0.4</b>
		16	32.1	22.6	20.5	24.8	<b>2.1 ± 0.1</b>
<b>Flat bottomed vessel with aeration</b>							
16°C	L1 + soil extract 8 l	3	36.8	21.8	19.2	22.1	<b>4.2 ± 1</b>
		10	50.7	18.7	13.7	16.9	<b>2.3 ± 0.4</b>
		14	54.5	18.2	12.3	15.0	<b>2.0 ± 0.2</b>
		18	54.5	18.2	12.3	15.0	<b>1.7 ± 0.2</b>
<b>Photobioreactor with aeration, agitation and pH regulation</b>							
18°C	L1 + soil extract 100 l	1	67.2	16.3	8.7	7.8	<b>4.7</b>
		5	68.2	17.3	7.5	6.9	<b>2.6</b>
		7	70.9	16.8	6.6	5.7	<b>2.3</b>
		12	60.2	17.7	10.4	11.7	<b>1.1</b>
		14	62.9	17.5	8.0	10.6	<b>1.2</b>
		20	68.1	19.7	6.3	5.8	<b>1.2</b>
		26	68.3	16.7	7.7	7.3	<b>0.9</b>
		34	72.0	16.0	6.3	5.6	<b>0.8</b>
		41	66.7	15.7	7.3	10.4	<b>0.8</b>
		46	67.3	16.0	7.3	9.3	<b>0.7</b>
		62	74.8	14	6.3	4.9	<b>0.8</b>
78	86.0	8.8	1.7	3.5	<b>0.6</b>		



	98	87.0	7.9	1.6	3.4	<b>0.5</b>
	118	80.4	13.5	2.2	3.9	<b>0.4</b>

### *Spirolide content in culture*

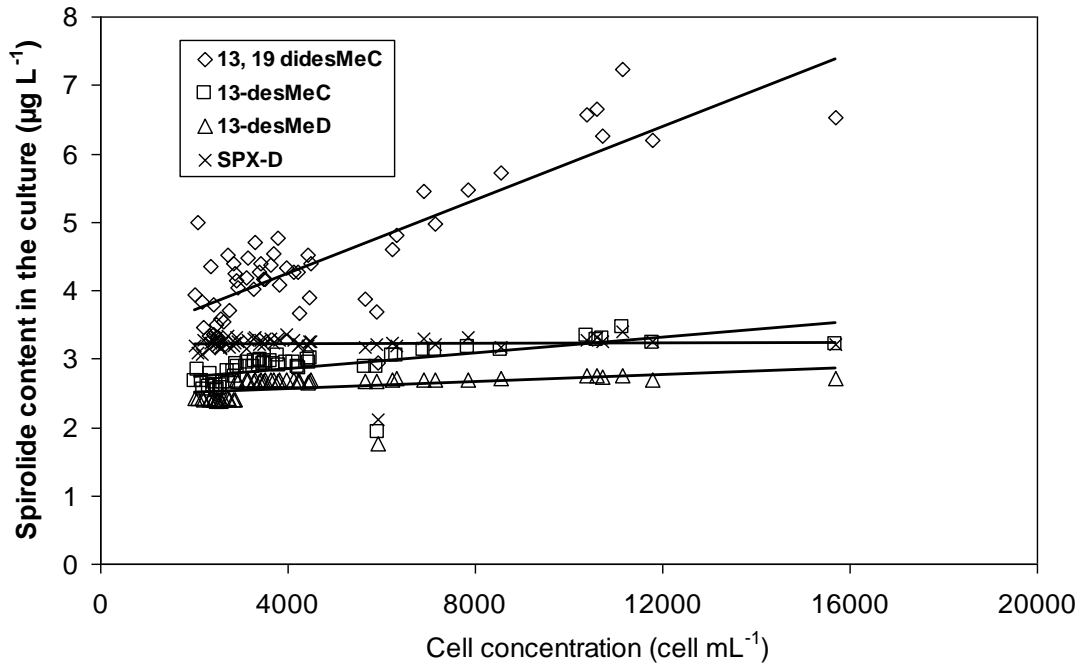
Total spiroside content in batch and photobioreactor culture (expressed as  $\mu\text{g l}^{-1}$ ) showed a slight increase when cell concentration was high (Fig 37).



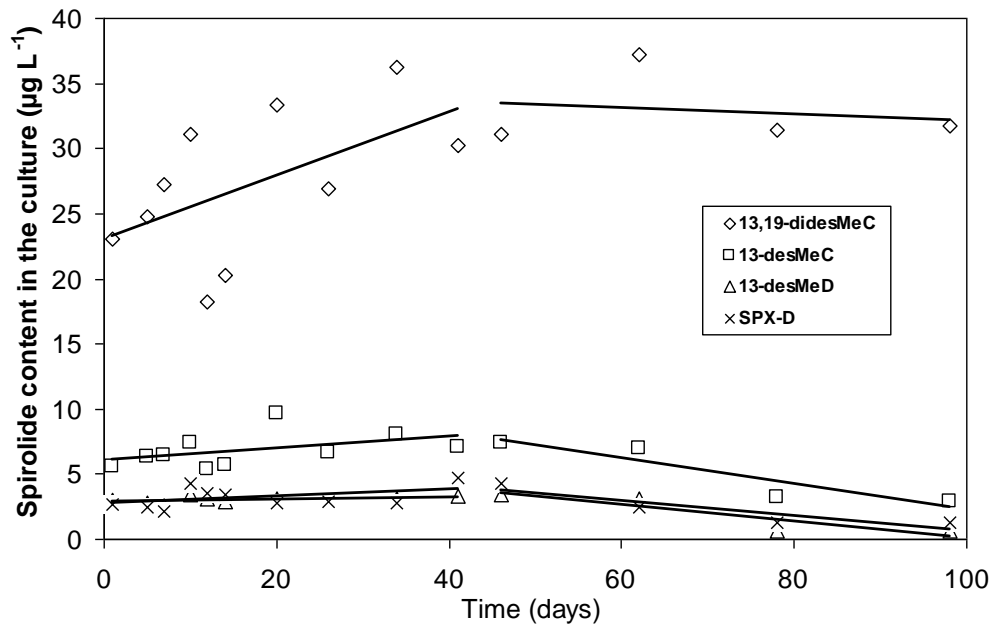
**Figure 37.** Variation of total spiroside concentration in the cellular fraction per unit volume of culture ( $\mu\text{g l}^{-1}$ ) according to the cell concentration

Moreover, during the exponential phase, spiroside content in all batch culture condition, showed a significant increase (approx. 2-fold) in 13,19-didesMeC as cell concentration increased in the culture. Meantime, other components remained relatively stable (Fig 38).

In photobioreactor culture, spiroside content per unit volume culture was higher than that obtained in batch culture, specifically the 13,19-didesMeC which was approx 5-fold higher (Fig 39). Moreover, during the exponential growth phase (until 41 days culture), only the 13,19-didesMeC showed an increase in concentration, while other components remained relatively stable (Fig 39). During stationary phase, concentration of 13,19-didesMeC in culture remained constant whereas other components showed a slight decrease (Fig 39).



**Figure 38.** Variation of individual spirolide concentrations in the cellular fraction per unit volume of culture ( $\mu\text{g l}^{-1}$ ) during growth in small volume bath culture.



**Figure 39.** Variation of individual spirolides concentrations in the cellular fraction per unit volume of culture ( $\mu\text{g l}^{-1}$ ) during growth in photobioreactor.

### *Spirolide profile*

Spirolide profile of *A. ostenfeldii* during growth in 450 ml flask culture remained relatively stable regardless of temperature and culture media used. At the end of exponential phase, 13,19-didesMeC was slightly higher than the other components (between 29 and 46 %) followed by SPX-D, 13-desMeC and 13-desMeD in similar proportions (17-28 %) (Table 15).

Spirolide profile of *A. ostenfeldii* grown in 8 l flat-bottomed vessels with L1+soil extract at 16°C changed significantly according to the age of the culture. The 13,19-didesMeC increased steadily from 37% to 54.5% in 8 l vessel. Meantime, proportions of 13-desMeC, SPX-D and 13-desMeD decreased. When comparing to that obtained in 450 ml flask culture, 13, 19-didesMeC was generally higher in 8 l aerated vessels (Table 15).

*A. ostenfeldii* cells grown in photobioreactor with L1+soil extract at 18°C was predominated by the spirolide 13,19-didesMeC (60-87%), followed by 13-desMeC (8-18%), SPX-D (3-12%), 13-desMeD (1.6-10%) (Table 15). This profile is drastically different than that obtained in batch cultures in term of proportions. However, as in batch culture, the 13,19-didesMeC increased with the age of the culture and was above 80% the last 40 days of culture.

#### 4. Discussion

##### *Alexandrium ostenfeldii* growth

Growth of plant cell culture is, to a great extent, determined by general environmental parameters such as nutrient availability, light, temperature (Boyer *et al.*, 1987, Ogata *et al.*, 1987, 1989; Anderson *et al.*, 1990), salinity (White 1978), and trace components (Harrison *et al.*, 1988; Okaishi *et al.*, 1987; Wells *et al.*, 1991).

In the present study, the effects of medium composition and temperature were tested in batch culture.

##### *Effects of temperature and media culture*

The growth (maximum cell concentration and growth rate) of the dinoflagellate *A. ostenfeldii* was higher at 16°C than at 22°C. These results are in contradiction with other studies where *A. ostenfeldii* optimum growth was obtained at 20°C and 15-20 psu i.e: growth rate of 0.3 div d<sup>-1</sup> (Jensen et Moestrup, 1997). In coastal environments, *A. ostenfeldii* has been found in such different geographical areas as Greenland (Ostenfeld et Paulsen, 1911) and New Zealand (Mackenzie *et al.*, 1996). Unfortunately, data available from field studies concerning the ecology of *A. ostenfeldii* are limited. *A. ostenfeldii* has been observed at temperatures ranging from -0.8°C (Ostenfeld et Paulsen, 1911) to approximately 16-20°C (summer water temperature in Denmark) (Jensen and Moestrup 1997). The better growth at 16°C noticed in our experimental conditions is not only in good agreement with the above observations but also with culture experiments conducted with other *Alexandrium* species

originating from temperate waters. For example, optimal growth of *A. tamarense* from Japan was obtained at 15°C (Ichimi *et al.*, 2001).

No statistically significant differences in growth of *A. ostenfeldii* were observed according to culture medium composition (L1, L1+Soil Extract, f/2). Nevertheless, cell maximum concentration tended to be higher with soil extract supplemented medium (3ml/l) compared to non supplemented medium. When *A. ostenfeldii* (strain LF R-287) is grown under conditions of limited soil extract, maximum cell concentration is reduced (Ravn *et al.*, 1995). The soil extract rich in humic acid was shown to promote the growth of different dinoflagellate species (Granéli and Moreira 1987; Hansen *et al.*, 1992). However, as growth elicitation by soil extract was very mild in the present study, it is hypothesised that cells were stressed by absence of acclimation to culture medium before the experiment and can be considered as a stress. This may have prevented the absorption of new components present in the medium.

#### ***Photobioreactor culture***

Cultivation of *A. ostenfeldii* has already been obtained in photobioreactors using GP+selenium medium, 12h:12h light:dark cycle with 190  $\mu\text{mole photons/m}^2/\text{s}$ , pH control at 8.3 and at a temperature of 18°C. These conditions allowed obtaining cell concentration as high as  $2.9 \times 10^4 \text{ cell ml}^{-1}$  but with low growth rate of  $0.028 \text{ div d}^{-1}$  (Beuzenberg *et al.*, 2007). Authors stated that this dinoflagellate grew faster and reached higher cell densities in bioreactor than in carboy batch culture ( $0.4 \times 10^4 \text{ cells ml}^{-1}$  and  $0.012 \text{ div d}^{-1}$ ). In the present study, *A. ostenfeldii* was grown and maintained in 100 l photobioreactor with aeration, agitation and pH control at 8.5. These conditions allowed *A. ostenfeldii* reaching concentrations between  $6-7 \times 10^4 \text{ cells ml}^{-1}$  for more than 60 days with a growth rate of  $0.16 \text{ div d}^{-1}$ . Furthermore, *A. ostenfeldii* culture in photobioreactor resulted in a higher cell concentration compared to batch culture performed in 8 L flat-bottomed vessel ( $1.67 \times 10^4 \text{ cells ml}^{-1}$  after 18 days of culture). Growth of *A. ostenfeldii* in photobioreactor followed a pattern similar to that described for other species of dinoflagellates (Séchet *et al.*, 2003). These authors reported that *A. minutum* originating from the North Atlantic and *A. catenella* from the Thau Lagoon (West Mediterranean coast) produced cultures with a relatively high division rate ( $0.5 \text{ div d}^{-1}$ ) and maximum cell concentrations of 80 and  $60 \times 10^3 \text{ cells ml}^{-1}$  respectively.

### ***Cell diameters***

Cell growth in flask culture at 22°C revealed a significant decrease in mean cell diameter compared to *A. ostenfeldii* inoculated at 16°C. Our result is in agreement with Jensen and Moestrup (1997) who reported similar changes in cell diameter of *A. ostenfeldii* cultivated at different temperatures and salinities. According to these authors, mean cell diameter was closely correlated with division rate that changed according to investigated temperatures (11.3-23.7°C) and salinities (10-30 psu).

Mean cell diameter of *A. ostenfeldii* also varied greatly during culture in photobioreactor from approx. 28 µm to approx. 21 µm. Cell diameters remained high during the first days (29-27 µm) of exponential growth but decreased rapidly when maximal cell concentration was almost reached. Decrease in mean cell diameter is the consequence of the significant appearance of two smaller cell groups ranging between 10-17 µm and between 17-23 µm corresponding together to approx. 44% of total population.

We believe that reduction in cell diameter in both batch culture and photobioreactor reflects apparition of temporary cysts. This is probably due to cellular stress provoked by variation in environmental factors such as high temperature (batch culture) and the combination of continuous agitation in addition to pH regulation applied to the cells in photobioreactor culture. Temporary cysts generally have a more variable and smaller size than vegetative cells (Jensen and Moestrup, 1997). Temporary cysts are very common in unfavourable culture conditions that did not allow good growth such as ageing cultures (Jensen and Moestrup, 1997), deficiencies in specific nutrients (Anderson and Wall, 1978; Doucette *et al.*, 1989; Fritz *et al.*, 1989), changes in temperature (Schmitter, 1979), and bacterial attack (Nagasaki *et al.*, 2000).

### ***Total spirolide production and profile***

#### **Spirolide production**

Previous studies on the culture of *A. ostenfeldii* indicated high variability in total spirolide production per cell : 0.3 pg cell<sup>-1</sup> (Maclean *et al.*, 2003), 2.55 pg cell<sup>-1</sup> (Otero *et al.*, 2010) and 85 pg cell<sup>-1</sup> (John *et al.*, 2001). These variations are likely related to the strain of *A. ostenfeldii* used and to the environmental conditions applied.

John *et al.* (2001) demonstrated that the total spirolide concentration per volume of culture was directly related to the concentration of cells and chlorophyll *a*, but spirolide content per cell or per culture were modulated by light:dark cycle. Spirolide cell quota drastically increased at the beginning of the dark phase and decreased during the light phase.

Authors reported that biosynthesis of these toxins is governed by light during cell division and that toxins are produced before cell cytokinesis (cell division).

Maclean *et al.* (2003) showed that amount of spirolide present in the cellular fraction of the culture ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ ) was directly proportional to cellular concentration. Maximum spirolide amount (from 2.1 to 2.8  $\mu\text{g l}^{-1}$ ) was achieved under favourable growth condition i.e. moderate light intensity (100  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), salinity (from 25 to 33 psu) and at high inorganic nitrogen concentration (880  $\mu\text{mol l}^{-1}$ ). Moreover, these authors revealed that spirolide cell quota (ranging between approx. 0.03 and 0.3  $\text{pg cell}^{-1}$ ) remains relatively stable upon variations of environmental conditions.

The present study revealed that in all cultures used (i) spirolide cell quota (ranging between approx. 0.4 and 5  $\text{pg SPX eq 13-desMeC cell}^{-1}$ ) was negatively related to cellular concentration under the different culture conditions used and (ii), spirolide content per litre was proportional to cell concentration during exponential phase.

Similarly, Beuzenberg *et al.* (2007) using a New Zealand strain obtained 7.1  $\text{pg 13-desMeC cell}^{-1}$  of 13-desMeC in 15l carboy batch culture and 1.5  $\text{pg 13-desMeC cell}^{-1}$  in photobioreactor culture with cell concentrations of 3800  $\text{cells.l}^{-1}$  and 30000  $\text{cells.l}^{-1}$ , respectively. This also suggests an inverse proportional relationship between cell concentration and spirolide cell quota during culture growth in *A. ostenfeldii*. Thus, spirolide content per litre was positively related to inoculum size (number of cells). As spirolide content per liter increased only slightly during the culture, most of the spirolides in the culture appeared to be synthesized upon the cell transfer into a fresh medium. Altogether, these results led to speculate that as cells divide, a significant fraction of the toxin is partitioned between daughter cells and as a consequence spirolide cell quota decreased by half at each cell division. However, as spirolide content per litre increased slightly during exponential phase, this suggests that spirolide production still occur at a lower extent during this phase, most notably for the 13, 19 didesMeC SPX.

The maximum spirolide culture content (from 15 to 40  $\mu\text{g l}^{-1}$  at the end of the exponential phase respectively in batch and photobioreactor culture) were achieved in conditions which allowed a good growth.

Regarding the effect of temperature on *A. ostenfeldii* spirolide production, cells grown at 22°C had a higher total spirolide cell quota compared to those grown at 16°C after 16 days of culture. But, this indeed reflects the higher division rate of cells maintained at 16°C. Ichimi *et al.* (2002) also found an inverse relationship between toxin cell content and growth rate,

explaining that the decrease of cell toxicity is an indirect response to the increase in growth rate.

Nevertheless, above 4000 cells.ml<sup>-1</sup>, cells grown at 16°C tend to have higher cell quota than those maintained at 22°C suggesting that lower temperature favour spirolide synthesis in addition to the initial quota produced upon culture inoculation.

Regarding the effect of culture media, no significant difference in total spirolide production was obtained between different culture media even when used with addition of soil extract. Conversely, Ravn *et al.* (1995) showed that the use of soil extract in *A. ostenfeldii* culture is responsible for an increase in PSP concentration because of the stress provoked by the elicitor. But authors noted that this variation increase was not encountered systematically.

In photobioreactor culture, variation in total spirolide cell quota revealed a rapid and significant decrease during the first days of the culture to fall as low as <80% of the initial toxicity. One may argue that such decrease of intracellular SPX may reflect its release into the extra-cellular medium throughout the culture cycle. Maclean *et al.* (2003) indicate that in batch cultures the proportion of extracellular spirolides was higher when *A. ostenfeldii* is grown in low nitrate conditions, suggesting that nutrient stress may affect leakage or excretion of these compounds, presumably due to higher cell mortality and loss of membrane integrity. During the first 25 days culture, the liquid-liquid extractions of extra-cellular medium were performed and analysis revealed a low proportion of spirolides (1 to 3%) in the spent medium. John *et al.* (2001) also found a low concentration of spirolides in the medium (<3% of the total spirolide of the whole culture). This indicates that in photobioreactor culture, spirolide accumulation in the medium does not vary even with increasing cell numbers. Bacterial or enzymatic degradation or reassimilation of spirolides by the dinoflagellates can be speculated as factors limiting release or presence of SPX in the medium.

### **Spirolide profile**

*A. ostenfeldii* spirolide profile of different strains were assessed by several investigators (Otero *et al.*, 2010; John *et al.*, 2001 ; Maclean *et al.*, 2003). However, the impact of different environmental parameters in spirolide composition remains controversial. Otero *et al.* (2010a) reported that the type of spirolides produced by *A. ostenfeldii* is linked to a genetic origin, but their proportions can vary considerably depending on external environmental factors. The authors reported that 13,19-didesMeC (81.1-97.6%) and 13-desMeC (2.4-19.9%) proportions were modulated by medium composition, salinity and

photoperiod. However, other authors claimed that whatever environmental changes, toxin pattern remains stable (John *et al.*, 2001; Maclean *et al.*, 2003).

In our study, spirolide analyses of *A. ostenfeldii* (strain CCMP1773) under different conditions and culture methods, revealed the presence of four spirolides : 13,19-didesMeC, 13-desMeC, 13-desMeD and SPX-D. The 13,19-didesMeC, was the major dominant component as previously reported by Otero *et al.* (2010a). In the present study, temperature (16 and 22°C) and culture medium composition (L1, L1+ soil extract and f/2) had little impact on *A. ostenfeldii* spirolide analogue proportions. These are not in agreement with the study of Otero *et al.* (2010) that reported changes of spirolide proportions according to medium composition. However, it clearly appeared that culture mode can influence the spirolide profile produced by *A. ostenfeldii* dinoflagellate. In photobioreactor culture, *A. ostenfeldii* synthesized much larger amount of 13,19-didesMeC (above 80% of total spirolides at the end of the culture) than in batch culture. The 13-desMeC (approx. 15%) was found in similar amount than in batch culture, while proportion of 13-desMeD and SPX-D in photobioreactor were significantly lower than those obtained in batch culture. This is the first evidence of change in spirolide profile according to the culture technique. Such variation could be due to physico-chemical factors such as cell agitation and pH regulation that characterize the photobioreactor functioning. These factors may promote cellular stress, and probably influence spirolide proportions.

Toxicological study performed by Mackinnon *et al.* (2006b) revealed that the loss of the methyl group at C-19 in 13-desMeC results in a 5-fold loss of toxicity. This means that the 13,19-didesMeC is five times less toxic than spirolide 13-desMeC. This result suggests that cells cultured in photobioreactor with continuous stirring become less toxic than cells cultured in batch culture. For these reasons, more studies are necessary to investigate the chemical or the physical factors that can directly influence the toxin profile in *A. ostenfeldii*.

Although *A. ostenfeldii* has been grown successfully in high density using a photobioreactor, experimental conditions need optimisation. First, supplying culture media at a higher flow rate during the exponential phase could possibly achieve the maximum cell concentration in a shorter time. Second, to increase cell spirolide quota, we propose to increase nitrate concentration during the stationary phase as N contributes to the generation of the imine function of spirolides. However, determination of intra and extracellular N:P ratios in *A. ostenfeldii* experimental culture would be needed to investigate the relationship between nutrient availability and spirolide production.



Overall, further studies are needed to investigate the relationship between cell size, growth and the spirolide production according to culture modality (e.g. volume, aeration, agitation).

## **CHAPITRE IV. Etude expérimentale de la détoxification des huîtres.**

### **4.1 Article 4- Spirolide uptake and detoxification by *Crassostrea gigas* exposed to the toxic dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii*.**

*Article soumis le 04 décembre 2011 dans le journal 'Aquaculture'.*

Walid MEDHIOUB<sup>1,2</sup>, Patrick LASSUS<sup>1\*</sup>, Philippe TRUQUET<sup>1</sup>, Michèle BARDOUIL<sup>1</sup>, Zouher AMZIL<sup>1</sup>, Véronique SECHET<sup>1</sup>, Manoella SIBAT<sup>1</sup> and Philippe SOUDANT<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Laboratoire Phycotoxines, IFREMER, Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer, BP21105 44311 Nantes CEDEX3, France.

<sup>2</sup>Laboratoire d'Aquaculture, INSTM, Institut National des Sciences et Technologies de la Mer, Route de Kniss - 5000 Monastir, Tunisie.

<sup>3</sup>Université de Bretagne Occidentale – IUEM, LEMAR CNRS UMR 6539, Place Nicolas Copernic, technopôle Brest Iroise – 29280 Plouzané, France.

## Résumé

Depuis les premières détections de spirolides dans les moules et les palourdes de la Nouvelle-Écosse (Canada) (Sleno *et al.*, 2004, Richard *et al.*, 2000), leur présence dans les coquillages ne cesse d'augmenter dans le monde. En Europe, ces toxines ont été trouvées en Espagne dans la moule *Mytilus galloprovincialis* et la palourde *Venerupis pullastra* (Villar Gonzalez *et al.*, 2006), en Norvège dans la moule *Mytilus edulis* (Aasen *et al.*, 2005) et en France (Amzil *et al.*, 2007) chez *Mytilus edulis* également et aussi chez des huîtres *Crassostrea gigas*. Cependant, l'étude de la distribution des spirolides au niveau des organes des mollusques pendant la contamination et la détoxification ainsi que l'impact physiologique sur le bivalve contaminé restent méconnus et non étudiés.

C'est dans ce cadre que s'inscrit l'objectif de ce travail. Il s'agit de contaminer des huîtres avec *A. ostenfeldii* en conditions contrôlées et d'étudier i) l'impact d'ajout d'algue 'fourrage' sur les cinétiques de détoxification au niveau des organes accumulateurs et des autres tissus d'huîtres par rapport à des témoins non contaminés ii) l'impact physiologique de l'exposition à ce dinoflagellé toxique sur les organes digestifs incluant l'intestin, l'estomac et les diverticules digestifs et enfin iii) la capacité de récupération après détoxification avec ou sans alimentation.

Pour ce faire, l'étude a porté sur l'exposition de l'huître creuse (*Crassostrea gigas*) pendant 4 jours à des cultures d'*Alexandrium ostenfeldii*, suivie de sept jours de détoxification. Lors de cette phase, les huîtres ont été nourries soit avec la micro-algue non toxique *Isochrysis galbana* souche Tahiti (T.Iso), soit maintenues à jeun.

Les analyses chimiques réalisées par CL-SM/SM ont montré i) une accumulation majoritaire des spirolides au niveau de la glande digestive (83% de la charge totale en spirolides) et ii) un effet positif de l'alimentation sur la vitesse de détoxification mesurée au niveau de la glande digestive (GD). Le niveau initial en spirolides se trouvant dans la GD a pu ainsi être réduit à environ 10% de la teneur initiale en toxines.

L'étude histologique réalisée après l'exposition des huîtres à l'espèce toxique *A. ostenfeldii* a révélé une altération significative des diverticules digestifs. Cette altération consistait en une réduction de l'épaisseur de la paroi épithéliale et en une augmentation de la surface de la lumière des diverticules digestifs. Une réaction inflammatoire développée dans la glande digestive de certains individus contaminés a également été observée. Cette réaction s'est caractérisée par une agrégation massive d'hémocytes autour des différents organes et tissus de la glande digestive : l'estomac, l'intestin ainsi que les conduits et tubules digestifs.

Des hémocytes en diapédèse au niveau de l'épithélium de l'intestin ont également été observés.

À la fin de la phase de détoxification, une différence significative des pourcentages de diverticules digestifs actifs a été mise en évidence entre les huîtres à jeûn et les huîtres nourries. Lorsque les huîtres étaient nourries avec *T.Iso*, 80% des tubules digestives étaient actifs, révélant ainsi une récupération rapide après exposition à la micro-algue toxique.

**Mots clés:** *Crassostrea gigas*, *Alexandrium ostenfeldii*, spirocides, histologie, glande digestive.

## Abstract

Oysters (*Crassostrea gigas*) were exposed 4 days to cultures of the toxic dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* (strain CCMP1773) that produces spirolides belonging to fast acting toxins (FAT) and let depurate for 7 days. During depuration, oysters were either fed the non-toxic algae *Isochrysis galbana* Tahitian clone (T. *Iso*) or starved. The objectives of this experiment were to evaluate (i) spirolide uptake and depuration by oysters (ii) spirolide effects on oysters and (iii) oyster recovery according to food supply during depuration.

*A. ostenfeldii* cells were filtered and ingested by oysters while faeces contained numerous intact cells of the toxic diet. This suggested that ingested cells were not totally digested by oysters. Contents of spirolides (SPX) in digestive gland and remaining meat during contamination and detoxification periods were measured by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Four different SPX analogues (13,19-didesMeC, 13-desMeC, 13-desMeD and trace of SPX-D) were detected. The 13,19-didesMeC-SPX dominated in both digestive gland and remaining meat. After four days exposure, digestive gland (DG) contained 83 % of the total initial spirolide burden, whereas remaining meat contained only 17 %. During detoxification, spirolide content in DG was lower in fed than in unfed oysters but similar in remaining meat.

Exposure to *A. ostenfeldii* resulted in an inflammatory response consisting of hemocyte infiltration and diapedesis into the intestinal tract of the oysters. Percentage of active digestive tubules in oysters fed *A. ostenfeldii* was significantly lower than in control (prior exposition) oysters (36% and 61%, respectively). At the end of the detoxification period, inflammatory responses disappeared faster in fed oysters than in unfed oysters. There was also a significant difference in the percentage of active digestive tubules ( $P < 0.001$ ) between fed and unfed oysters. When oysters were fed T-*Iso* following the *A. ostenfeldii* exposure, 80 % of digestive tubules were active, thus revealing a rapid recovery after toxic algae exposure.

**Key words:** Harmful Algae, spirolides, *Alexandrium ostenfeldii*, contamination, depuration, *Crassostrea gigas*, inflammatory responses, digestive gland structure.

## 1. Introduction

The marine dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* has been identified as the only micro-organism producing spirolide toxins (Cembella *et al.*, 2000a and b). This species has been found in Denmark (Moestrup and Hansen, 1988), Scotland (John *et al.*, 2003a), Norway (Balech and Tangen, 1985) and Spain (Fraga and Sanchez, 1985), and it produces either saxitoxin analogues, i.e paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins, or spirolide toxins, which belong to cyclic imine group. Some *A. ostenfeldii* strains can produce spirolides and PSP toxins at the same time, as demonstrated in Denmark (Hansen *et al.*, 1992; McKinnon *et al.*, 2004) with local strains.

Compared to other *Alexandrium* species, relatively little is known to date about the biology and ecology of *A. ostenfeldii*. This may be partly attributed to the fact that it typically occurs at low concentrations of  $10^2$  to  $10^3$  cells  $L^{-1}$  in phytoplankton mixed assemblages which already contain other bloom-forming dinoflagellates (Balech and Tangen, 1985; Moestrup and Hansen 1988; John *et al.*, 2003b; Gribble *et al.*, 2005). *A. ostenfeldii* is known for its capability to behave as a mixotrophic species (Jacobson and Anderson 1996; Gribble *et al.*, 2005) and to produce allelochemical compounds (Hansen *et al.*, 1992; Tillmann *et al.*, 2007).

*A. ostenfeldii* life cycle includes two types of cysts. Temporary cysts are commonly formed when cells are subjected to stress either in cultures or at field (Østergaard-Jensen and Moestrup 1997; Cembella *et al.*, 2001). Resting cysts are formed in winter and are generally isolated from coastal sediment (MacKenzie *et al.*, 1996b; Bravo *et al.*, 2006).

Like other *Alexandrium* species, *A. ostenfeldii* can produce paralytic shellfish toxins (PSTs) (Hansen *et al.*, 1992; MacKenzie *et al.*, 1996b). PST profiles and specific toxicities in culture may vary largely according to strains and localities. It has been noticed that Danish *A. ostenfeldii* strains, predominantly, produce low potency saxitoxin derivatives (Hansen *et al.*, 1992), whereas in New Zealand strains PSP toxicity ranged from 0 to much higher levels (up to 217 pg STX eq cell<sup>-1</sup>) than usually observed in cells of other potent *Alexandrium* species (MacKenzie *et al.*, 1996a,b,c). North Atlantic populations of *A. ostenfeldii* do not seem to produce PST's at all (Cembella *et al.*, 2000b; Gribble *et al.*, 2005). Instead, spirolides, a recently isolated group of highly potent neurotoxins (Hu *et al.*, 1995; Richard *et al.*, 2000) are commonly found in cultured strains and natural samples (Cembella *et al.*, 2000b; John *et al.*, 2003b; Gribble *et al.*, 2005).

In June 2005, the French Phytoplankton and Phycotoxin monitoring Network (REPHY) revealed the presence of *A. ostenfeldii* for a short period in Arcachon Bay (French

S.W coasts). For the first time, spirolides were detected (Amzil *et al.*, 2007) in local oyster digestive glands. When shellfish are contaminated by this toxic microalga at a level giving a positive DSP mouse bioassay, they are no longer harvested and marketed resulting in serious economic losses. Spirolides are 'Fast Acting Toxins' (FAT), causing neurotoxic symptoms and rapid death in laboratory mice when intraperitoneally (*i.p*) injected or administered orally (Hu *et al.*, 1995). However, no adverse effects in humans have been reported so far. Although their toxicity to humans and their mode of action are still under investigation (Gribble *et al.*, 2005), spirolides are known to produce an antagonistic effect at the muscarinic acetylcholine receptor (Richard *et al.*, 2000).

So far, most common spirolides are named A, B, C, D, E and F. Spirolide G has been recently identified (MacKinnon *et al.*, 2006), as well as des-methyl derivatives of spirolides C and D, namely, 13-desmethyl spirolide C (13-desMeC) (Hu *et al.*, 2001), 13,19-didesmethyl spirolide C (13,19-didesMeC) (MacKinnon *et al.*, 2006), and 13-desmethyl spirolide D (13-desMeD) (Sleno *et al.*, 2004).

The oral and intraperitoneal toxicities of spirolides were determined by toxicological studies in mice. The intraperitoneal LD<sub>50</sub> of pure 13-desMeC is 5-8 µg kg<sup>-1</sup> (Munday, 2008). Orally, the toxicity of 13-desMeC is much lower and the LD<sub>50</sub> is 150 µg kg<sup>-1</sup> when administered by gavage (Munday 2008).

Insofar as no regulatory limits have been established for macrocyclic imines (FAO/IOC/WHO report, 2004), no data were available about spirolide bioaccumulation and elimination pathways in shellfish.

The present study investigated (i) the uptake and detoxification of spirolides by oysters, (ii) the impact of non-toxic algal food on detoxification rates, testing the hypothesis that oysters fed *I. galbana* detoxified faster than unfed (control) oysters (iii) the effects of *A. ostentfeldii* experimental exposure on tissue structures and recovery ability of contaminated oysters during depuration.

## **2. Materials and Methods**

### ***Experimental animals***

Triploid oysters, *Crassostrea gigas* (64.3 ± 2.8 mm mean shell length), were obtained from the IFREMER coastal laboratory located in Bouin (French Atlantic coast). Mean of oyster total fresh meat weight was 6.26 g ± 0.91 g. Oysters were cleaned from epiphytes and other encrusting organisms and acclimated for 3 days before experiment. All oysters were free

from lipophilic toxins (okadaic acid, pectenotoxins, azaspiracides, yessotoxines, spirolide and gymnodimine groups).

### ***Algal cultures***

The harmful algal species used in this study was the CCMP1773 strain of *Alexandrium ostenfeldii* (Balech) isolated from Limfjorden (Denmark) and obtained from the Provasoli Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton. In addition, the non-toxic Tahitian clone of *Isochrysis galbana* (T. *Iso*) was used as a non-toxic detoxification diet. *A. ostenfeldii* was grown in 10-liters batch cultures and 100-liters photo-bioreactors using sterile sea water supplemented with L1 nutrient enrichment (Guillard and Hargaves, 1993). T. *Iso* was grown in 10-liters culture vessels filled with autoclaved and filtered seawater enriched with Conway medium.

Batch cultures were maintained at 16°C under a 12h:12h L:D cycle at 150  $\mu\text{mole photon/m}^2/\text{s}$ . Cultures in 100-liters photobioreactor were maintained at 17°C under a 16h:8h (L:D) cycle and at 170  $\mu\text{mole photon/m}^2/\text{s}$ .

T. *Iso* and *A. ostenfeldii* cultures were harvested for oyster feeding at days 4 and 14, respectively.

### ***Experimental design for A. ostenfeldii exposures***

90 oysters were distributed randomly into two raceways filled with 150 l seawater at a salinity of 35 psu and a temperature of 16°C. The experimental setting was similar to that previously described in Lassus *et al.* (1999). A 40 l buffer tank placed within the circuit just after the flume outlet contained the heat exchanger and the pumps, ensuring circulation of the water and continuous measurement of chlorophyll with a Turner Design fluorometer equipped with 340-500 nm excitation and 665 nm emission filters. Toxic and non-toxic micro-algae inputs at the flume inlet were supplied by an Ismatec peristaltic micropump with flow rate regulated according to the settings established at the beginning of the experiment. Continuous measurements provided by the fluorometer were integrated via a LABVIEW<sup>®</sup> acquisition and control card and a data-logger connected to a microcomputer.

Prior exposure to *A. ostenfeldii*, oysters were acclimatized for 3 days in a raceway filled with seawater at 16 °C and fed on T.*Iso* for only one day. Oysters were then fed *A. ostenfeldii* at a concentration of 200 cell.ml<sup>-1</sup> in a recirculated seawater circuit (flow rate of 800 l.h<sup>-1</sup>) for 4 days. Sea water was totally renewed every two days. Following *A. ostenfeldii* exposure, oysters were divided in two groups: 45 oysters were fed T. *Iso* at 12000 cell.ml<sup>-1</sup> for 7 days, whereas, another 45 oysters group was not fed (sea water only) during the same



period. Faeces and pseudo-faeces were removed every day from each raceway with a pipette and examined to verify the status of the cells using light microscopy.

Oysters samples were collected before exposure (non exposed control), after 4 days exposure to the toxic dinoflagellate (day 0), and during detoxification period, i.e on days 1, 4, and 7. At each sampling time, 8 oysters were removed from the raceway, pooled and processed for spiroside extraction and analysis. Ten oysters were also sampled for the histopathology study before and after exposure to *A. ostenfeldii*, and after 7 days detoxification with or without food supply.

#### ***Spirolides extraction and LC-MS/MS analysis***

Soft parts of eight oysters were dissected and then divided into two fractions: digestive gland and remaining tissues (including gill, adductor muscle and mantle). These two fractions (which pooled organs from eight oysters) were drained on a Büchner funnel, weighed, and then frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Lipophilic toxins were extracted from 2 g of homogenized digestive gland or remaining tissue with 8 ml (3,3,2 ml) of a methanol/water (95/5) solution. After centrifugation (3000 g, 15 minutes,  $4^{\circ}\text{C}$ ) supernatants were combined and homogenized. A 2 ml sample was ultra-filtered by centrifugation through a  $0.2\ \mu\text{m}$  membrane (Vivaspin2<sup>®</sup> membrane 10000 KDa PES) at (4000 g, 20 minutes,  $4^{\circ}\text{C}$ ). 5  $\mu\text{l}$  of the filtrate were injected into the LC-MS/MS system. For *A. ostenfeldii* culture, spiroside production and profiles were determined from 10 mL samples taken from photobioreactor cultures. Cells were collected by centrifugation (4000g, 10 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ), resuspended in 1 ml methanol/water (95/5) and sonicated 20 mn on ice with a Vibra Cell<sup>®</sup> 75115 device. The extracts were collected in 2 mL eppendorf tubes and then frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$ . The LC-MS/MS analysis were performed according to Amzil *et al*, (2007) using a Shimadzu LC-20 AD XR<sup>®</sup> model coupled with a Q TRAP<sup>®</sup> mass spectrometer (API 4000). Toxins were eluted in a  $3\ \mu\text{m}$  hyperclone MOS C8 column (50X2.0mm, Phenomenex) at  $20^{\circ}\text{C}$  with a linear gradient set at 0.2 ml/min. Analyses were carried out in multiple reaction monitoring (MRM) positive ion mode and the two most intense product ions per compound were selected. The transition conditions chosen for spiroside toxins are presented in table 16.

**Tableau 16.** m/z transition conditions for spiroptides toxins. m/z (mass to charge ratio).

<b>Spirolides (SPX) detected by LC-MS/MS</b>	<b>Transitions m/z</b>
D	708.5>690.5/164
13-desMeC	692.7>444.3/164.2
13,19-didesMeC	678.5>660.4/642.4/624.4/430.5
13-desMeD	694.5>444.3/164.5

### ***Histology***

A 5-mm cross-section was taken from each of the ten oysters sampled for histology, including digestive gland, gills and mantle. The dissected tissues were fixed in Davidson's fixative (Shaw and Battle, 1957) for 48 h. Then the section was dehydrated in ethanol solutions, cleared with Claral, and embedded in paraffin. After processing, 5 µm sections were stained using hematoxylin-eosin. Slides were examined under a light microscope and tissue damaging level was evaluated referring to Haberkorn *et al.* (2010). Intensity of pathological figures was ranked as stage 0 for absence or very light, stage 1 for moderate and stage 2 for heavy. Results were expressed as mean of stage intensity for ten individuals per treatment.

The thickness of digestive gland tubule was measured. In this study, active and inactive digestive gland tubules were characterized by thickness between 20 µm to 30 µm and thickness between 10 and 20 µm, respectively. The percentage of active digestive gland was determined on ten oysters for each treatment. Measurements involved three readings on 70 tubules chosen for each individual oyster using Leica Application Suite 2.8.1. software.

### ***Statistical analysis***

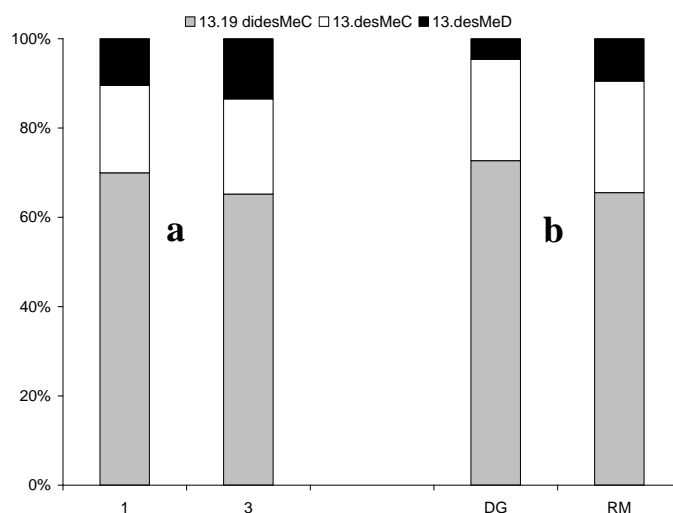
Results obtained on digestive gland tubule thickness were compared between treatments after 7 days detoxification using *T* test. Ratio and percentage were transformed as arcsin(squareroot) before statistical analysis but presented as untransformed data.

Intensity of pathological effects observed by histology was compared statistically using the Pearson chi-square test to assess differences between treatments after detoxification. Significant differences between treatments (with or without feeding) are considered statistically significant at a 95% confidence level.

## **3. Results**

### ***Toxin profile of *Alexandrium ostenfeldii* culture***

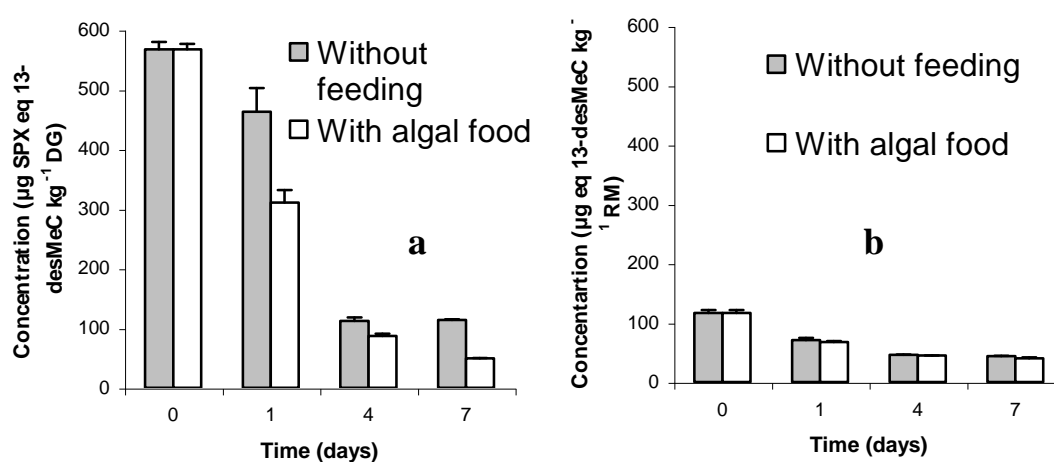
All spirolide analogues were analysed through three successive injections. Toxin profile of *A. ostenfeldii* during the exponential phase comprised spirolides 13,19-didesMeC, 13-desMeC, 13-desMeD and trace of SPX-D, with 13,19-didesMeC as predominant analogue (Fig 1a). Total toxin content of *A. ostenfeldii* cells was  $2.1 \pm 0.1$  pg 13-desMeC eq. pg cell<sup>-1</sup> (Table 17).



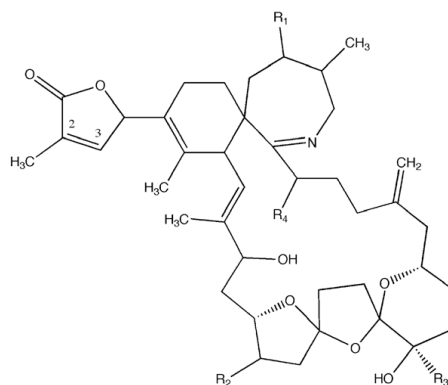
**Figure 40.** Toxin profiles (expressed as %) of (a) *Alexandrium ostenfeldii* at days 1 & 3 of the experiment and (b) of digestive gland (DG) and remaining meat (RM) of oysters after 4 days exposure.

#### *Spirolides distribution and profile in oysters following A. ostenfeldii exposure*

Toxin content of digestive gland after 4 days contamination was  $567.5 \mu\text{g}$  13-desMeC eq.  $\text{kg}^{-1}$  (Fig. 41a), whereas toxin content of remaining meat was much lower, i.e :  $116.2 \mu\text{g}$  13-desMeC eq.  $\text{kg}^{-1}$  (Fig. 41b). 83 % of total toxin body burden was found in digestive gland while only 17 % was found in remaining meat. After 4 days exposure, toxin profiles in digestive gland and remaining meat were similar to that of *A. ostenfeldii* (Fig. 40 a and b). Spirolide 13,19-didesMeC toxin dominated in all organs, and accounted for 72.5 % and 65.5 % of total toxins respectively in digestive gland and remaining meat, immediately followed by spirolides 13-desMeC (22.5 % and 25 %, respectively) and 13-desMeD (4.5% and 9.5%, respectively) (Fig. 40 b).



**Figure 41.** SPXs detoxification of digestive gland (a) and remaining meat (b) from contaminated oysters. (Mean and S.D. of 3 analysis).

**Tableau 17.** Structures of known SPX toxin analogues and their concentration in *A. ostentfeldii* culture (strain CCMP1773).


Spirolides (SPX)	R1	R2	R3	R4	$\Delta$	Quantity (pg eq 13-desMeC cell <sup>-1</sup> )
A	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	$\Delta^{2,3}$	-
B	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H		-
C	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	$\Delta^{2,3}$	-
D	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H		trace
13-desMeC	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	H	$\Delta^{2,3}$	0.43
13, 19-didesMeC	CH <sub>3</sub>	H	H	H	$\Delta^{2,3}$	1.4
13-desMeD	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	H		0.25
27-OH-13,19-didesMeC	CH <sub>3</sub>	H	H	CH <sub>3</sub>	$\Delta^{2,3}$	-

During 7 days detoxification, toxin accumulated in oysters (GD and remaining meat) decreased rapidly in both *T.Iso* fed and unfed oysters (Fig. 41a and b). However, toxin contents of digestive gland decreased faster in oysters fed *T.Iso* than in unfed oysters (Fig. 41a) while in contrast no differences were observed in remaining meat (Fig. 41b). After 7 days detoxification, DG of fed oysters had lost 92% of their toxins whereas meantime unfed oysters lost only 80%. Detoxification coefficients were 0.84 day<sup>-1</sup> in unfed oysters and 0.97 day<sup>-1</sup> in *T.Iso* fed oysters (1.15 time faster). Slow detoxification was found in remaining meat and the final concentration was similar for fed and unfed oysters (Table 18). Whatever the dietary treatments and organs used, most of the detoxification was accomplished within 4 days.

**Tableau 18.** Spirolides concentrations in digestive gland and remaining meat ( $\mu\text{g SPX eq 13-desMeC kg}^{-1}$ ) during the detoxification period

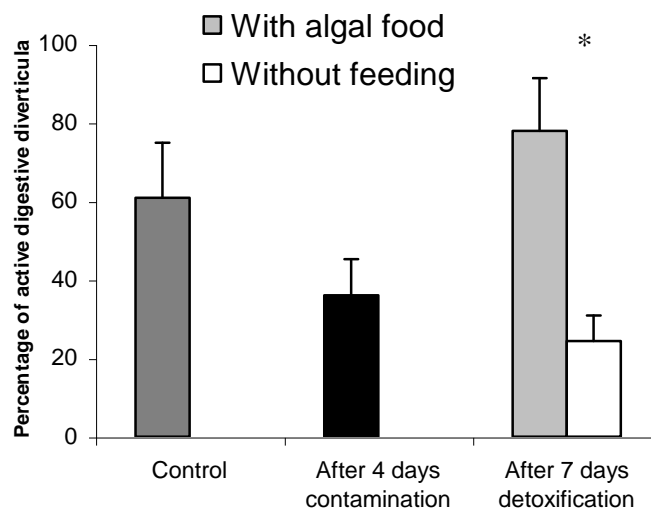
<b>Spirolide concentrations in digestive gland (<math>\mu\text{g SPX eq 13-desMeC kg}^{-1}</math>)</b>					
<b>Time</b>	<b>Treatments</b>	<b>13,19-didesMeC</b>	<b>13-desMeC</b>	<b>13-desMeD</b>	<b>Total</b>
0	-	412.5±9.1 (100%)	128.9±1.2 (100%)	26.1±1.7 (100%)	567.5±12.0 (100%)
1	Without feeding	353.1±39.6 (85.6%)	88.4±10.5 (68.6%)	25.8±1.7 (98.8%)	462.8±53.9 (81.5%)
	With algal food	220.6±21 (53.5%)	64.3±10.6 (49.9%)	21.3±1.2 (81.6%)	310.7±39.8 (54.7%)
4	Without feeding	73.6±6.1 (17.9%)	27.4±1.5 (21.2%)	10.7±0.1 (41%)	111.8±7.8 (19.7%)
	With algal food	56.8±3.5 (13.8%)	21.4±1.2 (16.6%)	8.7±1.3 (33.3%)	86.9±6.0 (15.3%)
7	Without feeding	80.6±2.9 (19.5%)	25.2±2.8 (19.8%)	8.0±0.1 (30.6%)	113.7±5.7 (20%)
	With algal food	30.9±0.7 (7.5%)	10.2±0.2 (7.9%)	8.0±0.1 (30.6%)	49.1±0.9 (8.65%)
<b>Spirolide concentrations in remaining meat (<math>\mu\text{g SPX eq 13-desMeC kg}^{-1}</math>)</b>					
0	-	76.1±3 (100%)	29.0±1.7 (100%)	11.0±0.4 (100%)	116.2±5.1 (100%)
1	Without feeding	37.4±1.5 (49.1%)	20.3±1.9 (70%)	9.6±0.1 (87.27%)	70.8±3.5 (60.9%)
	With algal food	39.7±1 (52.2%)	21.1±0.5 (72.7%)	10.0±0.3 (90.9%)	67.3±1.7 (59.7%)
4	Without feeding	21.7±0.2 (28.5%)	13.8±0.6 (47.6%)	9.0±0.1 (81.8%)	45.8±0.8 (39.4%)
	With algal food	22.1±0.2 (29%)	14.9±0.2 (51.4%)	8.9±0.1 (80.9%)	44.5±0.4 (38.3%)
7	Without feeding	17.5±0.4 (23%)	12.8±0.5 (44.1%)	8.7±0.1 (79.1%)	43.5±0.9 (37.4%)
	With algal food	21.0±0.7 (27.6%)	13.4±0.7 (46.2%)	9.2±0.1 (83.6%)	39.0±1.5 (33.6%)

Considering individual congeners, detoxification of 13, 19 didesMeC and 13-desMeC was faster than those of 13-desMeD. Less than 10% of the initial 13,19 didesMeC and 13-desMeC contents were left in fed oysters and less than 25% in unfed oysters (Table 18). Detoxification of 13-desMeD was similar in fed and unfed oysters and reached less than 35% after 7 days of detoxification (Table 18).

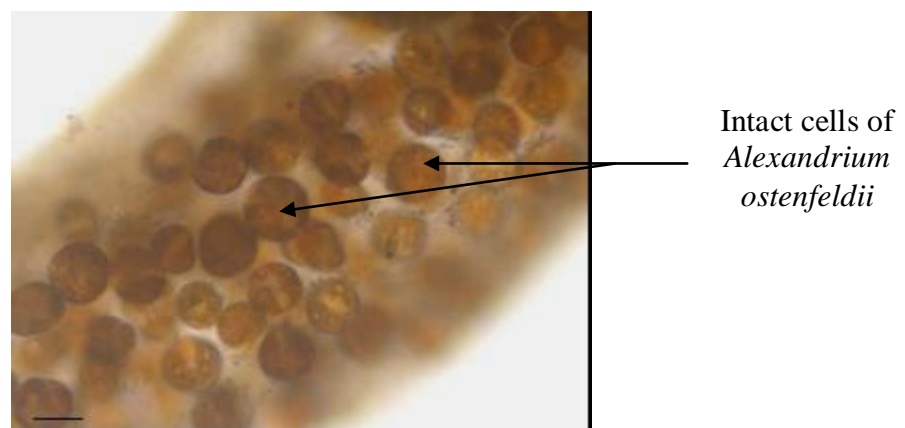
At the end of the detoxification period, spirolide analogue concentrations were similar in digestive gland and remaining meat for the two treatments (with or without feeding) except the higher concentrations of 13,19-didesMeC and 13-desMeC in digestive gland of unfed oyster (Table 18).

### Histology

Digestive tubules of all oysters exposed to *A. ostenfeldii*, except one oyster (Fig. 42), showed a decrease in the digestive gland tubule thickness and the percentage of active digestive tubules was significantly lower than in control oysters (36% and 61 %, respectively). After 7 days detoxification, percentage of active digestive tubules was significantly higher ( $P<0.001$ ) in oysters fed *T. Iso* (77.9%) than in unfed oysters (24%).



**Figure 42.** Percentage of active digestive gland tubules during the experiment. From left to right: reference before exposure to *A. ostenfeldii*; after contamination with *A. ostenfeldii* and finally after 7 days of detoxification (gray bar referring to oyster fed and white bar referring to oyster without feeding). \* significant differences between treatment for levels ( $P<0.05$ ).



**Figure 43.** Intact cells of *Alexandrium ostenfeldii* found in faeces from *Crassostrea gigas* during exposure (scale bar = 20  $\mu$ m).

High numbers of intact *A. ostentfeldii* cells were observed in intestinal lumen of oysters exposed to *A. ostentfeldii* (Fig. 44) and in feces (Fig. 43). No *A. ostentfeldii* cells were observed in digestive tubules. No *T.Iso* cells were observed intact in any part of the digestive gland.

**Tableau 19.** Intensity of pathological effects of *A. ostentfeldii* before and after 4 days exposure and 7 days detoxification in oyster digestive gland. Results are expressed as mean of stage intensity  $\pm$  Confidence interval (n = 10), with stage 0 = absence or very light, 1= moderate and stage 2 = heavy. Significant differences between the two treatments with or without feeding are indicated by\* when  $p < 0.05$ .

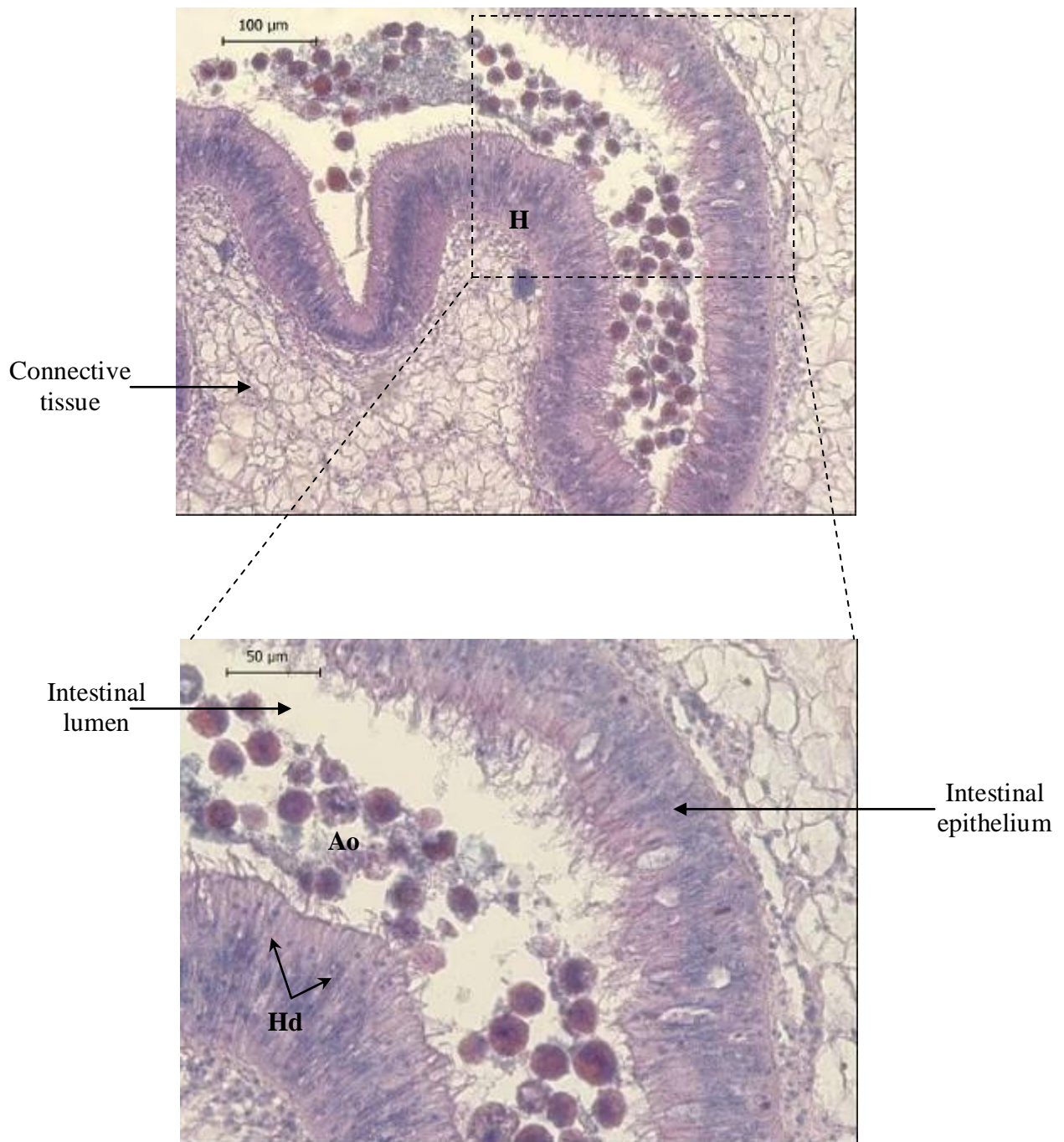
Organ	Variable	Before exposure	After 4 days exposure	After 7 days detoxification		Chi-square test
				Without feeding	With algal food	
Intestine	Presence of <i>A. ostentfeldii</i>	0	1.3 $\pm$ 0.8	0.3 $\pm$ 0.5	0.1 $\pm$ 0.3	NS
	Hemocyte surrounding in intestinal groove	0.3 $\pm$ 0.5	1 $\pm$ 0.7	1 $\pm$ 0.8	0.5 $\pm$ 0.53	NS
Digestive gland	Hemocyte surrounding in digestive tubules	0.2 $\pm$ 0.4	1.1 $\pm$ 0.6	0.7 $\pm$ 0.7	0.6 $\pm$ 0.7	NS
	Hemocyttes in diapodesis in intestinal groove	0.6 $\pm$ 0.5	0.8 $\pm$ 0.8	0.4 $\pm$ 0.5	0.3 $\pm$ 0.7	NS
	Hemocyttes in diapodesis in digestive tubules	0.3 $\pm$ 0.7	0.6 $\pm$ 0.7	0.5 $\pm$ 0.7	0.4 $\pm$ 0.7	NS

Observed pathologies consisted mainly in inflammatory responses (Fig. 44); aggregation of hemocytes into the connective tissue surrounding the intestine and hemocyte migrations through the intestinal epithelia (diapodesis) (Fig. 44). Gill tissue structures were not altered, and no production of mucus was observed in *A. ostentfeldii*-exposed oysters.

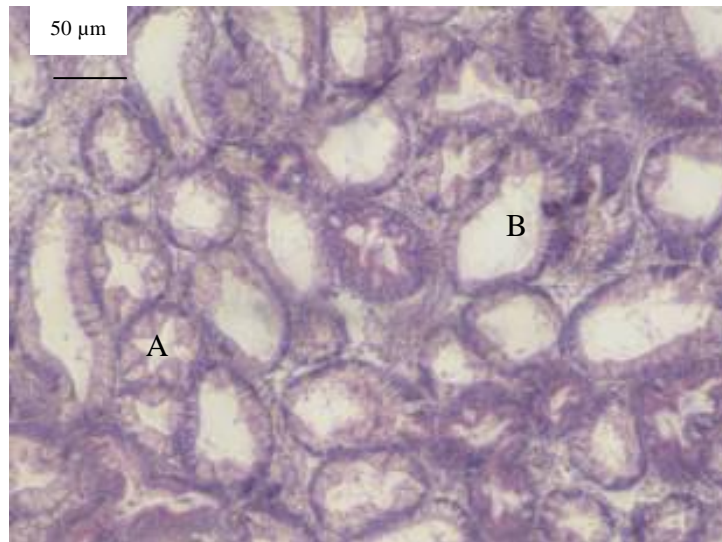
Although some damages were observed in control oysters, damages in digestive gland after exposure to *A. ostentfeldii* were significantly more frequent than before exposure (Table 19).

Recovery from these pathological conditions (hemocyte surrounding and diapedesis in intestinal groove and digestive tubules, tubule dilation) was faster in fed than in unfed oysters after 7 days of detoxification.





**Figure 44.** Inflammatory response in the intestine of *A. ostensfeldii*-exposed oysters. Aggregation of hemocytes in the connective tissue surrounding the intestine and hemocytes in diapedesis through the intestine epithelium. Hematoxylin-eosin stained paraffin sections (5 µm). (Ao) *A. ostensfeldii* in intestine (I) of *C. gigas*. (H) surrounding hemocytes and (Hd) hemocytes in diapedesis.



**Figure 45.** Structure of digestive gland tubule, characteristic dilation shape of active tubule (A) inactive tubule (B).

#### 4. Discussion

##### *Spirolide accumulation and detoxification in oysters*

Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, accumulated spirolides within a short time (4 days) when experimentally exposed to *A. ostenfeldii* concentrations of 200 cells ml<sup>-1</sup>. These results give credit to the hypothesis that, in natural environment, oysters are able to accumulate these toxins from a few cells. After 4 days of exposure, toxin profiles of *A. ostenfeldii* contaminated oysters, in both digestive gland and remaining meat, were similar to that of *A. ostenfeldii* culture used in this experiment. These profiles were predominated by 13,19-didesMeC associated to smaller amounts of 13-desMeC and 13-desMeD. SPX E and F were not detected in any tissue indicating that biotransformation of spirolides did not occur in *C. gigas* during contamination. After 4 days exposure, most spirolides (83 %) were accumulated in digestive gland. Similarly, digestive glands generally contain 80% or more of Paralytic Shellfish Toxin (PST) body burden (Bricelj and Shumway, 1998) in oysters. Similar results were observed for mussels (Bricelj *et al.*, 1990), and scallops (Cembella *et al.*, 1993; Choi *et al.*, 2003) contaminated with PSP and for clams (Medhioub *et al.*, 2010) contaminated with gymnodimines.

Various physico-chemical treatments including thermal and osmotic stress, electric shocks, pH decrease, ozonised seawater and chlorination have been tested to speed up detoxification of diarrhetic and paralytic toxins accumulated by bivalves. All proposed methods were either too dangerous, too long, too expensive, or modified organoleptic characteristics of the product. Effective ways to detoxify shellfish contaminated by emergent toxins such as spirolides toxins remain to be developed. No attempt has been made so far to

detoxify SPX-contaminated shellfish. In this work, food supply was selected as a detoxification process to speed up spirolide elimination. SPX detoxification kinetics in digestive gland was found to be faster in oysters fed on *T.Iso* than in unfed oysters. This is in good agreement with previous field and laboratory studies highlighting that non toxic food availability and quantity was the most important factor regulating PSP and DSP detoxifications (Lassus *et al.*, 1999 ; 2002 ; 2005; Guéguén *et al.*, 2008a ; Haamer *et al.*, 1990; Sampayo *et al.*, 1990; Marcaillou-Le Baut *et al.*, 1993; Bauder *et al.*, 1996; Poletti *et al.*, 1996; Blanco *et al.*, 1999). Similarly, experiments on gymnodimine (another cyclic imine) detoxification by grooved carpet shell *Ruditapes decussatus* revealed that feeding clams with *T.Iso* accelerated gymnodimine detoxification (Medhioub *et al.*, 2010). In the same way, Guéguen *et al.* (2008) showed that PST detoxification of Pacific oyster *Crassostrea gigas* fed on *Skeletonema costatum* diets optimised oyster detoxification in both digestive gland and remaining flesh. Also, phytoplankton abundance was associated with an increase of detoxification rate after DSP and PSP episodes (Sampayo *et al.*, 1990 ; Blanco *et al.*, 1997).

Conversely, detoxification of PST in purple clam, *Hiatula rostrata*, and lipophilic phycotoxin (okadaic acid) in mussels were unaffected by food availability (Chen and Chou, 2001 ; Svensson, 2003).

In Arcachon Bay, spirolide content in oyster (SPX-A and 13-desMeC) is generally reported as quite low, ranging from 0.6 to 5  $\mu\text{g}$  13-desMeC eq.  $\text{kg}^{-1}$  total meat, and rapidly declining after disappearance of the causative dinoflagellate (Amzil *et al.*, 2007). Similarly, spirolide content rapidly decreased during the detoxification period in our controlled conditions. The final amount of spirolides obtained after detoxification is in the same range as that found in the natural environment (approx. 6  $\mu\text{g}$  13-desMeC eq.  $\text{kg}^{-1}$  total meat).

At the end of the detoxification period, total SPXs content was found in equal proportion in remaining tissues (6 %) and in digestive gland (7 %). Slower detoxifications in remaining tissues (including gill, mantle, and foot) were in agreement with previous studies on other phycotoxins : gymnodimines-contaminated grooved carpet shell, *Ruditapes decussatus* (Linné) (Medhioub *et al.*, 2010), PSP in king scallop *Pecten maximus* (Lassus *et al.*, 1989) or DSP in mussels (Blanco *et al.*, 1999). Rapid toxin loss during the first days of detoxification is generally coincident with the elimination of toxin-containing algae from digestive gland, whereas remaining toxins (resulting from microalgae digestion) were incorporated in the tissues.

During the detoxification period, we also found that individual spirolide analogues decreased at different rates. This may be due to the difference of structure of spirolide

analogues and/or the difference of toxin affinity for the tissues. However, investigations with different toxin profiles are necessary to obtain a comprehensive picture of detoxification mechanisms of SPX-toxins in bivalves.

### ***Histology study***

In our experiment, oysters ingested *A. ostentfeldii* as revealed by cyst or unbroken cells presence in feces. However, as most *A. ostentfeldii* cells appeared as temporary cyst, it is suggested that oyster failed to fully digest all toxic algae. Presence of intact, toxic cells in digestive system of exposed bivalves has already been observed by Galimany *et al.*, (2008a and c) and Hégaret *et al.* (2007, 2008a). Haberkorn *et al.* (2010) also reported intact vegetative cells and temporary cysts of *A. minutum* in oyster feces.

Oyster exposure to *A. ostentfeldii* at a concentration of 200 cell.ml<sup>-1</sup> for 4 days resulted in non-specific biological responses. Thickness of digestive gland tubules decreased indicating that feeding upon *A. ostentfeldii* altered digestive processes.

An inflammatory response was also revealed by hemocyte infiltration and diapedesis. Hemocyte migration through diapedesis from the semi-open vascular system into the stomach and intestine, as seen in *A. ostentfeldii* exposed oysters, has been described as part of a defence mechanism in bivalves (Stauber, 1950). Digestive gland tissues showed hemocyte infiltration following toxic algae exposure in most oysters sampled on day 4 after exposure. This reaction supports the hypothesis that hemocytes migrate into lumina of digestive organs to remove *A. ostentfeldii* cells and/or to protect tissues from toxicity as it has been reported for different phycotoxin-contaminated bivalve species. Galimany *et al.* (2008a, b, c) described similar inflammatory responses (hemocyte infiltration and diapedesis) in blue mussels *Mytilus edulis* exposed to *Alexandrium fundyense*, *Prorocentrum minimum* and *Karlodinium veneficum*. Hemocyte infiltration and diapedesis were also observed into intestine and gonad follicles of *Ruditapes philippinarum* exposed to *Prorocentrum minimum* (Hégaret *et al.*, 2009) and into the intestine and digestive gland of *Crassostrea gigas* exposed to *A. minutum* (Haberkorn *et al.*, 2010). Estrada *et al.* (2007) observed hemocyte aggregation in the digestive gland, mantle, and gills of the scallop, *Nodipecten subnodosus*, exposed to the PST producer *Gymnodinium catenatum*.

All pathological conditions described here were almost only observed in oysters exposed to *A. ostentfeldii*. Nevertheless, few control oysters presented marginally affected digestive gland tubules. Some studies (Haberkorn *et al.*, 2010; Galimany *et al.*, 2008a) have also occasionally reported alteration such as inflammatory responses in control oysters. Such

pathological conditions in control oysters can be found in the field and attributable to undefined environmental factors.

Altogether, these results suggest that *A. ostenfeldii* could have an adverse effect on the digestive gland tubules, impairing the digestive and absorption processes and thus accelerating animal vulnerability under stress conditions, like for instance, exposure to pathogens.

This study also demonstrated that after 7 days detoxification of the experiment, pathologies induced by *A. ostenfeldii* exposure decreased while in the meantime percentage of active DG tubules increased in fed oysters. This suggests that feeding non-toxic algae contribute to speed up recovery after *A. ostenfeldii* exposure. However, the uncompleted recovery of unfed oysters revealed that repairing the digestive gland tubules request significant energy supply.

Our findings are in agreement with others studies. After exposure, to *Gyrodinium aureolum*, juvenile mussels fed on *T.iso* during one week appeared to recover (Smolowitz and Shumway, 1997). Moreover, Galimany *et al.* (2008) showed that feeding non-toxic algae *Rhodomonas sp.*, all pathological conditions induced by *A. fundyense* exposure disappeared within a few days indicating a high and rapid capacity for recovery.

### **Conclusion**

Rapid detoxification occurs when a non-toxic alga is present in the detoxification system. SPX levels can be reduced within 7 days down to approximately 10% of the initial toxin content of laboratory-contaminated oysters. Taking into account that no regulatory limit has been established so far for spirolides, further experiments are needed to determine the level giving a negative DSP mouse bioassay.

Moreover, gut tubule thinning was the most common histopathological finding when oyster were exposed to *A. ostenfeldii*. We can hypothesize that this can be due to *A. ostenfeldii* haemolytic activity. However, recovery from exposure to toxic alga was rapid, although unfed oysters were unable to totally get back undamaged tubules. Feeding during the detoxification period accelerates both oyster recovery and detoxification processes. In the future, it would be worth testing longer and higher exposure to see whether effects increase with time and *A. ostenfeldii* density and whether oyster can still recover thereafter.

## CONCLUSIONS GENERALES & PERSPECTIVES

L'objectif de ce travail de thèse était d'étudier l'impact de l'alimentation sur la détoxification artificielle des palourdes *R. decussatus* et des huîtres *C. gigas* contenant des neurotoxines à action rapide. En premier lieu, les expériences de culture des dinoflagellés toxiques ont été développées dans des conditions environnementales différentes afin de définir i) les types de relations existant entre la croissance cellulaire et la production des toxines, ii) les facteurs environnementaux pouvant influencer cette production dans le but de simuler les épisodes de contamination naturelle. En deuxième lieu, ce travail s'est intéressé à l'étude de l'interaction de ces micro-algues toxiques avec les mollusques bivalves. Cette approche physiologique permet une meilleure compréhension de l'impact de ces neurotoxines émergentes au niveau des organes accumulateurs.

### *Croissance et toxicité des deux dinoflagellés toxiques.*

Différents facteurs environnementaux ou physico-chimiques (température, salinité, turbulence, besoins en lumière, disponibilité en CO<sub>2</sub> et concentrations en nutriments), considérés comme pouvant influencer l'apparition des efflorescences, sont souvent étudiés.

Dans le cadre de ce travail, les études de croissance et de production toxinique de *K. selliformis* et d'*A. ostensfeldii* ont été réalisées dans différentes conditions de température, de salinité, de milieu nutritif et avec différentes méthodes de culture. L'ensemble des résultats obtenus avec *K. selliformis* nous a conduit aux conclusions suivantes i) la meilleure croissance de *K. selliformis* est obtenue à la température de 20°C mais la concentration maximale en GYM est observée pour une salinité de 44 psu, ii) le contenu en Gymnodimines (GYM) exprimé en pg eq. GYM cell<sup>-1</sup> augmente en fonction de l'âge des cultures, iii) la neurotoxicité de la GYM (extrait de culture) a été confirmée par le test-souris. Le nombre de cellules nécessaire correspondant à la dose minimale mortelle est fonction de la teneur en GYM par cellule et donc de la phase de croissance: il est beaucoup plus élevé en phase exponentielle qu'en phase de déclin.

Il faut rappeler que dans le golfe de Gabès, *K. selliformis* fréquente des eaux de différentes gammes de salinité (36-37, 39-40, 41-44, et 47-52 psu), avec un gradient de salinité allant du nord au sud du golfe. Les plus faibles salinités se rencontrent au nord de Sfax, tandis que les salinités les plus élevées sont situées au sud de ce point. A Boughrara, la salinité enregistrée en période hivernale est de 41-44 et peut atteindre 47-52 psu en période estivale.

Par conséquent, nous pouvons envisager i) une prolifération intense de ce dinoflagellé toxique en milieu naturel lors de l'élévation de la température (période printanière) et ii) une toxicité d'autant plus importante que la prolifération en mer côtière va se prolonger. Il en résulterait un risque de contamination plus élevé des palourdes exposées à un 'bloom' de longue durée.

L'ensemble des travaux réunis dans cette étude a permis de déterminer les meilleures conditions de croissance de *K. selliformis in vitro* en petit volume (erlens et ballons de culture) et en grand volume (bacs de culture) avec une production maximale en GYM-A. Vu les difficultés de croissance de cette espèce dans les conditions d'agitation continue caractérisant le système en photobioréacteur, il reste encore à optimiser les cultures en masse de *K. selliformis*.

Généralement les cultures de dinoflagellés nus « sans thèque » comme *Karenia selliformis*, *Karenia mikimotoi* ou de dinoflagellés appartenant au genre *Gonyaulax* et *Karlodinium* sont plus délicates que les cultures d'autres micro-algues du genre *Alexandrium* qui sont facilement réalisées en batch, mais aussi en continu (photobioréacteurs), dans des conditions de fortes agitation et aération. En effet, différents auteurs (White 1976 ; Pollinger et Zemel 1981) ont démontré une inhibition de la croissance des dinoflagellés provoquant des mortalités cellulaires significatives, dans le cas où l'agitation est maintenue ou renforcée. Ces conditions particulières de culture en grand volume présentent un défi pour la production en biomasse. Cependant une piste envisageable pour *K. selliformis* consiste à développer un photobioréacteur horizontal nécessitant une régulation du pH et une agitation adaptée en discontinue.

L'étude de la croissance et de la production en toxine d'*A. ostenfeldii* a été réalisée dans un deuxième temps. Les résultats nous ont conduit aux conclusions suivante i) l'acclimatation d'*A. ostenfeldii* dans les différents milieux nutritifs testés ne présente pas de difficulté particulière en terme de croissance et n'entraîne pas de modifications profondes dans la morphologie des cellules. Cependant la croissance d'*A. ostenfeldii* semble très sensible aux variations de température. Par ailleurs, lors de la culture en batch sous différentes conditions de température (16 et 22°C) et de milieu de culture (L1, f/2 et L1+ extrait de terre), la production totale en spirolide présente une corrélation négative avec la croissance cellulaire à l'opposé de la production toxinique en gymnodimine par *K. selliformis*. Cette observation a été confirmée lors du maintien de la croissance en photobioréacteur.

La corrélation négative entre croissance cellulaire et production totale en spirolides caractérisant la souche CCMP1773 laisse supposer une libération significative des spirolides

dans le milieu de culture. Cependant les résultats des extractions liquide-liquide indiquent une perte mineure (<3%). Cela implique donc une modification significative de la production et du profil toxinique intra-cellulaire à des niveaux de croissance différents. En effet, ce dinoflagellé, qui est capable de produire des composés allélopathiques (Hansen *et al.*, 1992; Tillmann *et al.*, 2007), se trouve généralement en faible concentration cellulaire dans le milieu naturel. A ce jour, aucune prolifération exceptionnelle d'*A. ostenfeldii*, n'a été reportée en Europe. Cela pourrait laisser supposer que la caractéristique du maintien à des concentrations faibles avec une production maximale en spirolides est un moyen de résistance et de compétition de cette espèce dans son milieu. Cependant d'autres travaux sont nécessaires pour pouvoir valider cette hypothèse. Pour cela, l'utilisation de tests hémolytiques appliqués à des concentrations cellulaires différentes et à des concentrations différentes en spirolides serait un moyen efficace pour appréhender ce type de question.

A l'inverse des performances de croissance de *K. selliformis*, la culture d'*A. ostenfeldii* en photobioréacteur dans des conditions optimales d'agitation (agitation continue) et de régulation de pH à 8.5 semble être un moyen efficace pour l'obtention d'une biomasse importante permettant de procéder à des contaminations expérimentales. Cependant, d'autres essais sont nécessaires pour optimiser la production en spirolides. En effet, en se basant sur les travaux de Maclean *et al.*, 2003, il a été démontré que lors de la culture d'*Alexandrium ostenfeldii* (souche AOSH1), une diminution de la production totale en spirolide par cellule a été observée dans des conditions limitante en azote ( $20\mu\text{mol l}^{-1}$ ) ou dans des conditions à faible rapport N :P (<16). Pour cela, lors du maintien de la culture en phase stationnaire, il est envisageable de stimuler les cellules par un apport supplémentaire en azote dans le sens où cet élément chimique sera essentiel à la régénération du groupement imine cyclique des spirolides.

### ***Impact de l'alimentation sur la détoxification***

Après contamination expérimentale ou naturelle des palourdes par *K. selliformis* et des huîtres par *A. ostenfeldii*, les gymnodimines et les spirolides se répartissent majoritairement dans la glande digestive avec des proportions respectives de 97% et 83%. Ces résultats montrent bien la répartition disproportionnelle des neurotoxines à action rapide entre la glande digestive et les autres tissus comme dans le cas des toxines DSP.

Les essais de détoxification menés sur des palourdes contaminées au laboratoire (avec des concentrations initiales en GYM-A égales à 1240 et 9500  $\mu\text{g GYM kg}^{-1}$  GD), nous a permis d'obtenir au bout de 7 à 8 jours des animaux salubres avec des concentrations en



GYM pouvant être réduites à 5% de la concentration initiale. Cependant, les essais réalisés sur les palourdes naturellement contaminées provenant de la lagune de Boughrara (avec une concentration initiale en GYM-A égale à  $3375 \mu\text{g GYM kg}^{-1} \text{GD}$ ) ont montré une durée nettement supérieure, entre 15 et 39 jours respectivement pour les lots alimentés et non alimentés. En effet la différence observée aux niveaux des périodes de détoxification ne peut pas être attribuée à la quantité initiale en GYM se trouvant dans la glande digestive. En effet, malgré le fait que les niveaux de contamination en GYM soient similaires entre palourdes contaminées au laboratoire et celles provenant de la lagune de Boughrara, les durées de détoxification passent du simple au double.

Cependant la durée limitée de la contamination des palourdes au niveau expérimental est un facteur significatif pouvant influencer les vitesses de détoxification. Vu la présence endémique des cellules de *Karenia selliformis* dans la lagune de Boughrara, la liaison de la GYM au niveau des organes accumulateurs et des tissus des palourdes est favorisée, en conséquence la durée de détoxification est plus longue. L'explication la plus probable de cette longue durée notamment pendant les derniers jours de détoxification est attribuable à la fixation de cette toxine au niveau des tissus. Ainsi, dans le but d'optimiser la durée d'obtention des animaux salubre, il serait intéressant d'agir directement sur ces sites de fixation. Cependant, il est primordial que des anticorps monoclonaux anti-GYM-A soient disponibles afin de développer une approche immunohistologique qui permettrait de localiser la toxine au niveau tissulaire.

Quelle que soit la différence notée pendant la période de détoxification entre les palourdes contaminées naturellement ou artificiellement l'apport d'un aliment à base d'algue fourrage est un élément important pour accélérer le processus de détoxification et atteindre le seuil de sécurité sanitaire (test souris DSP négatif) ainsi que pour maintenir l'indice de condition à un état compatible avec la commercialisation du produit.

La correspondance entre les résultats des analyses chimiques et les résultats des bio essais a mis en évidence un test souris DSP négatif dès lors que la concentration en gymnodimine dans la glande digestive est  $\leq 185 \mu\text{g kg}^{-1}$  quels que soient la durée, le régime alimentaire lors de la détoxification ainsi que les conditions de pré-stockages utilisées.

Les deux études réalisées respectivement sur les palourdes contenant des gymnodimines et sur les huîtres contenant des spiroïdes ont révélé une dynamique biphasique de la détoxification : une première phase rapide correspond principalement à l'élimination des toxines présentes au niveau de la glande digestive (toxines non assimilées) et la deuxième phase, plus lente, à celle des toxines incorporées aux tissus. Ces résultats confortent

l'hypothèse de l'importance de la nourriture dans le processus de détoxification dans la mesure où la nutrition augmente à la fois le transit dans le tube digestif et le métabolisme global des animaux expérimentés.

Ces résultats sont encourageants pour la mise en place d'un procédé de détoxification des palourdes. Cependant, des travaux supplémentaires sont nécessaires afin de pouvoir optimiser les conditions de détoxification. Il est nécessaire, par exemple, d'ajuster les concentrations minimales de micro-algues ajoutées permettant de réduire significativement la durée de détoxification par rapport à des palourdes non alimentées. Il faudrait également étudier le devenir des cellules de *K. selliformis* et de la toxine dissoute dans l'eau de mer circulant dans le circuit de détoxification.

### ***Impact physiologiques des neurotoxines à action rapide aux niveaux des organes accumulateurs***

L'étude portant sur la contamination de *C. gigas* par *A. ostensfeldii* a mis en évidence une altération des diverticules digestifs. Cette altération consiste en une réduction de l'épaisseur de la paroi épithéliale et en une augmentation de la surface de la lumière des diverticules digestifs. Il ne s'agit pas d'une réaction spécifique pour ce modèle d'étude puisque des altérations semblables ont été observées chez l'huître du Pacifique *C. gigas* après exposition à *Prorocentrum rhathymum* (Pearce *et al.*, 2005) et chez la moule *M. edulis* après contamination avec le dinoflagellé *Gyrodinium aureolum* (Smolowitz et Shumway 1997).

En effet, si ce type d'altération observé aux niveaux des diverticules digestifs survient du fait d'un arrêt de l'alimentation, des mortalités d'huîtres pourraient être observées. Cela n'a pas été observé au cours de notre expérimentation dans des conditions de température supérieure à 14°C. De plus, le suivi de l'activité alimentaire ne nous a pas permis de détecter une modification significative du comportement alimentaire lors de l'exposition des huîtres à *A. ostensfeldii* ce qui écarte l'hypothèse d'une inhibition alimentaire. Cependant, les propriétés allélopathiques de ce dinoflagellé toxique pourraient permettre d'envisager une activité hémolytique sur les cellules de l'épithélium des diverticules digestifs.

De plus les observations histologiques nous ont permis de déterminer chez certains individus contaminés par les cellules d'*A. ostensfeldii*, une réaction inflammatoire dans la glande digestive. Cette réaction se caractérise par une agrégation massive d'hémocytes autour de différents organes et tissus de la glande digestive : l'estomac, l'intestin ainsi que les conduits et tubules digestifs. Des hémocytes en diapédèse au niveau de l'épithélium de l'intestin ont également été observés. La présence de débris cellulaires et de kystes

temporaires d'*A. ostenfeldii* dans la glande digestive peut en partie expliquer cette réaction inflammatoire. En effet, les hémocytes sont impliqués dans la réponse immunitaire des bivalves face aux pathogènes et aux polluants (Chu et Lapeyre, 1993 ; Ford *et al.*, 1993 ; Fisher *et al.*, 2000). De plus, la réaction inflammatoire décrite précédemment n'est pas spécifique à l'exposition à *A. ostenfeldii* mais s'applique aussi à d'autres modèles d'étude comme les huîtres *C. gigas* contaminées par *A. minutum* (Haberkorn *et al.*, 2010) et les palourdes *Ruditapes philippinarum* exposées à *Prorocentrum minimum* (Hégaret *et al.*, 2009).

Dans le cas des contaminations naturelles et expérimentales des palourdes à la gymnodimine, les observations histologiques et microscopiques n'ont pas permis de détecter la présence de cellules intactes de *K. selliformis* que ce soit au niveau de différents organes et tissus de la glande digestive ou au niveau des biodépôts. De plus, les analyses histologiques réalisées n'ont pas permis de mettre en évidence des signes d'altération de la glande digestive comme dans le cas des huîtres contaminées par *A. ostenfeldii*.

En effet, les deux dinoflagellés toxiques utilisés dans notre travail se différencient par la présence ou l'absence de thèque pecto-cellulosique. Ainsi, le dinoflagellé *K. selliformis* (sans thèque) s'avère plus sensible aux conditions environnementales et plus particulièrement aux enzymes digestives et au broyage provoqué par le stylet lorsque les cellules sont ingérées par les mollusques. Ceci suggère un transfert facile des gymnodimes vers les organes accumulateurs et les tissus des palourdes. Cette observation pourrait expliquer en partie la contamination endémique et le haut niveau en GYM-A au niveau de la glande digestive des palourdes se trouvant dans la lagune de Boughrara. Cependant, aucune conclusion formelle ne pourra être émise en ce qui concerne l'effet négatif direct de la toxine sur la glande digestive ou la nature des cellules toxiques ingérées.

Pour cela, d'autres travaux de recherches sont nécessaires. Une piste envisageable consiste en un suivi histologique comparatif entre huîtres exposées à une souche toxique et à une souche non toxique appartenant à la même espèce.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

## A

- Aasen, J.A., MacKinnon, S.L., LeBlanc, P., Walter, J.A., Hovgaard, P., Aune, T., Quilliam, M.A., 2005. Detection and identification of spirolides in Norwegian shellfish and plankton. *Chemical Research in Toxicology*, **18**, 509-515.
- Aasen, J.A., Hardstaff, W., Aune, T., Quilliam, M.A., 2006. Discovery of fatty acid ester metabolites of spirolide toxins in mussels from Norway using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **20**, 1531-1537.
- Amandi, M.F., Furey, A., Lehane, M., Ramstad, H., James, K.J., 2002. Liquid chromatography with electrospray ion-trap mass spectrometry for the determination of yessotoxins in shellfish. *Journal of Chromatography A*, **976**, 329-334.
- Amzil, Z., Sibat, M., Royer, F., Masson, N., Abadie, E., 2007. Report on the first detection of Pectenotoxin-2, Spirolide-A and their derivatives in French shellfish. *Marine Drug*, **5**, 168-179.
- Anderson, D. M. & Wall, D., 1978. Potential importance of benthic cysts of *Gonyaulax tamarensis* and *G. excavata* in initiating toxic dinoflagellate blooms. *Journal of Phycology*, **14**, 224-234.
- Anderson, D.M., Kulis, D., Sullivan, J.J., Hall, S., Lee, C., 1990. Dynamic of physiology of saxitoxin production by the dinoflagellates *Alexandrium spp.* *Marine Biologie*. **104**, 511-524.
- Anderson, D.M. & White, A.W., 1992. Marine biotoxins at the top of the food chain. *Oceanus* **35** (3):55-61.
- Anderson, D.M., Glibert, P.M., Burkholder, J.M., 2002. Harmful Algal Blooms and Eutrophication: Nutrient Sources, Composition, and Consequences. *Estuaries and Coasts*. **25**, 704-726.
- Anonyme. 2000. Etude de l'amélioration de la qualité de l'eau de la lagune de Bougrara. Rapport Ministère de l'Agriculture. SCET - Tunisie. *Eco-Ressources International*, 180 p.
- Arakawa, K. Y., 1990. Competitors and fouling organisms in the hanging culture of the pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg) *Mar. Behav. Physiol.*, **17**, 67-94.
- Arzul, G., Turki, S., Hamza, A., Daniel, P., Merceron, M., 1995. Fish kills induced by phycotoxins. *Toxicon* **33**. 1119 p.
- Ayari, M., Allegue, M., Tlili, I., 2008. Etude pour la construction d'un ouvrage de communication au niveau de la chaussée romaine entre la lagune de Bougrara et la mer méditerranée. Xèmes Journées Nationales Génie Côtier – Génie Civil, 14-16 octobre 2008, Sophia Antipolis. 666 p.

## B

- Balech, E. & Tangen, K., 1985. Morphology and taxonomy of toxic species in the *tamarensis* group (Dinophyceae): *Alexandrium excavatum* (Baarud) comb. nov. and *Alexandrium ostenfeldii* (Paulsen) comb. nov. *Sarsia* **70**, 333-343.
- Balech, E., 1995. The Genus *Alexandrium* Halim (Dinoflagellata). Sherkin Island Marine Station Publication, Sherkin Island, County Cork, Ireland. 151 p.
- Baouendi, A., Ben Moussa, B., Gajo, M., Hentati, A., Krichen, S., Soussi, N., 2005. Pour un développement durable dans le Gouvernorat de Gabès : Action proposée pour la préparation du 11<sup>ème</sup> plan régional de développement 2006-2011. *Edit Ministère de l'environnement*. 40 p.
- Bardouil, M., Bohec, M., Cormerais, M., Bougrier, S., Lassus, P., 1993. Experimental study of the effects of the toxic micralgal diest on feeding of the oyster *Crassostrea gigas* Thunberg. *Journal of Shellfish Research* **12**, 417-422
- Barille, L., Heral, M., BarilleBoyer, A.L., 1997. Ecophysiological deterministic model for *Crassostrea gigas* in an estuarine environment. *Aquatic Living Resources*. **10**, 31-48.
- Bates. S.S., Bird. C. J., Defreitas. A.S.W., Foxall. R., Gilgan. M., Hanic. L.A., Johnson. G.R., McCulloch. A. W., Odense. P., Pocklington. R., Quilliam. M.A., Sim. P.G., Smith. J.C.,

- Subba Rao, D.V., Todd, E.C.D., Walter, J.A., Wright, J.L.C., 1989. Pennate diatom *Nitzschia pungens* as the primary source of domoic acid, a toxin in shellfish from eastern Prince Edward Island, Canada. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **46**, 1203-1215.
- Bauder, A. G., Cembella, A.D., Quilliam, M.A., 1996. Dynamics of Diarrhetic Shellfish Toxins from the dinoflagellate *Prorocentrum lima*, in the bay scallop, *Argopecten irradians*. In: Yasumoto, T., Oshima, Y. Eds, *Harmful and Toxic Algal Blooms*, Elsevier, Amsterdam. 433-436.
- Bayne, B.L. & Newell, R.C., 1983. Physiological Energetics of Marine Molluscs. In: Saleuddin ASM, Wilbur KM (eds.) *The Mollusca Physiology*, Part 1. Academic Press, New York. **4**, 407-515.
- Beitler, M.K. & Liston, J., 1990. Uptake and tissue distribution of PSP toxins in butter clams. In: Graneli, E., Sundstrom, B., Edler, L., Anderson, D.M. (Eds.), *Toxic Marine Phytoplankton*. Elsevier, New York. 257-262.
- Belarbi, E.H., Contreras Gómez, A., Chisti, Y., García Camacho, F., Molina Grima, E., 2003. Producing drugs from marine sponges. *Biotechnol Adv.* **21**, 585-98.
- Ben Mustapha, K., Hattour, A., Mhetli, M., El Abed, A., Tritar, B., 1999. Bionomie des étages infra et circalittoral du golfe de Gabès. *Bull. Inst. Natl. Sci. Tech. Mer.* **26**, 5-48.
- Beninger, P.G, Stjean, S.D., Poussart, Y., 1995. Labial palps of the blue mussel *Mytilus edulis* (Bivalvia, Mytilidae). *Marine Biology.* **123**, 293-303.
- Benrejeb-Jenhani, A. et Romdhane, M.S., 2002. Impact des perturbations anthropiques sur l'évolution du phytoplancton de la lagune de Boughrara, (Tunisie). *Bull. Inst. Natn. Scien. Tech. Mer de Salammbô.* **29**, 65-75.
- Berdalet, E. & Estrada, M., 1993. Effects of turbulence on several dinoflagellate species. In: Smayda TJ, Shimizu Y, editors. *Effects phytoplankton blooms in the sea*. Amsterdam: Elsevier. 40-737.
- Beuzenberg, V., Mountfort, D., MacKenzie, L., 2007. Enhancement of toxin production in photobioreactor culture systems for toxic micro-algae. Cawthron Institute, Nelson, New Zealand. in 6th International Conference on Molluscan Shellfish Safety Blenheim, New Zealand. Blackburn. 18-23 March 2007.
- Biré, R., Krys, S., Fremy, J.M., Dragacci, S., Stirling, D., Kharrat, R., 2002. First evidence on occurrence of GYM in clams from Tunisia. *Journal of natural toxins.* **11**, 269-275.
- Bjork, M. & Gilek, M., 1997. Bioaccumulation kinetics of PCB 31, 49 and 153 in the blue mussel, *Mytilus edulis* L. as a function of algal food concentration. *Aquat. Toxicol.* **38**, 101-123.
- Blanco, J. & Campos, M.J., 1988. The effect of water conditioned by a PSP-producing dinoflagellate on the growth of four algal species used as food for vertebrates. *Aquaculture.* **68**, 289-298.
- Blanco, J., Morono, A., Franco, J., Reyero, M.I., 1997. PSP detoxification kinetics in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. one and two-compartment models and the effect of some environmental variables. *Mar. Ecol., Prog. Ser.* **176**, 165-175.
- Blanco, J., Fernandez, M.J., Miguez, A., Morono, A., 1999. Okadaic acid depuration in the mussel *Mytilus galloprovincialis*: one and two-compartment models and the effect of environmental conditions. *Mar. Ecol., Prog. Ser.* **176**, 153-359.
- Blanco, J., Acosta, C.P., Bermudez de la Puente, M., Salgado, C., 2002. Depuration and anatomical distribution of the amnesic shellfish poisoning (ASP) toxin domoic acid in the king scallop *Pecten maximus*. *Aquat. Toxicol.* **60**, 111-121.
- Blanco, J., Marino, C., Martin, M., Acosta, C.P., 2007. Anatomical distribution of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicon.* **50**, 1011-1018.
- Blogoslawski, W., Stewart, M., Hurst, J.J., Kern, F.r., 1979. Ozone detoxification of paralytic shellfish poison in the softshell clam (*Mya arenaria*). *Toxicon.* **17** (6), 650-654.
- Borowitzka, M.A., 1993. Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically-active compounds. *J Appl Phycol.* **7**, 3-15.

- Botana, L.M., 2008. Seafood and Freshwater Toxins. Pharmacology, physiology and detection, Second edition. *Food science and technology*. New York. 561-592.
- Bougrier, S., Lassus, P., Bardouil, M., Masselin, P., Truquet, P., 2003. Paralytic shellfish poison accumulation yields and feeding timeactivity in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and king scallop (*Pecten maximus*). *Aquat. Living Resour.* **16**, 347–352.
- Boyer, G.L., Sullivan, J.J., Anderson, R.J., Harrison, P.J., Taylor, F.J.R., 1987. Effect of nutriment limitation on toxin production and composition in marine dinoflagellate *Protogonyaulax tamarensis*. *Mar. Bio.* **96**, 123-128.
- Brana Magdalena, A., Lehane, M., Moroney, C., Furey, A., James, K.J., 2003. Food safety implications of the distribution of azaspiracids in the tissue compartments of scallops (*Pecten maximus*). *Food Addit. Contam.* **20** (2), 154–160.
- Bravo, I., Garcés, E., Diogéne, J, Fraga, S., Sampedro, N., Figueroa, R.I., 2006. Resting cysts of the toxigenic dinoflagellate genus *Alexandrium* in recent sediments from the Western Mediterranean coast, including first description of cysts of *A. kutnerae* and *A. peruvianum*. *Eur. J. Phycol.* **41**, 293-302.
- Bricelj, V.M., Lee, J.H., Cembella, A.D., Anderson, D.M., 1990. Uptake kinetics of paralytic shellfish toxins from the dinoflagellate *Alexandrium fundyense* in the mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* **63**, 177-188.
- Bricelj, V.M., Lee, J.H, Cembella, A.D., 1991. Influence of dinoflagellate cell toxicity on uptake and loss of paralytic shellfish toxins in the northern quahog *Mercenaria mercenaria*. *Mar Ecol Prog Ser.* **74**, 33-46.
- Bricelj, V.M. & Cembella, AD., 1995. Fate of gonyautoxins in surf-clams, *spisula solidissima*, grazing upon toxigenic *Alexandrium*. In: Lassus P, Arzul G, Erard E, Gentien P, Marcaillou C eds. *Harmful marine algal blooms*. Lavoisier, Intercept Ltd, Paris, 413-418.
- Bricelj, V.M. & Shumway S.E., 1998. Paralytic shellfish toxins in bivalve mollusks: occurrence, transfer kinetics and biotransformation. *Rev. Fisheries Science.* **6** (4), 315-383.
- Bricelj, V.M., MacQuarrie, S.P., Smolowitz, R., 2004. Concentration dependent effects of toxic and non-toxic isolates of the brown tide alga *Aureococcus anophagefferens* on growth of juvenile bivalves. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **282**, 101-114.
- Bricelj, V.M., Connell, L., Konoki, K., MacQuarrie, S.P., Scheuer, T., Catterall, W.A., Trainer, V., 2005. Sodium channel mutation leading to saxitoxin resistance in clams increases risk of PSP. *Nature.* 434, 763-767
- Brillant, M.G.S. & MacDonald, B.A., 2000. Postingestive selection in the sea scallop, *Placopecten magellanicus* (Gmelin): the role of particle size and density. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **253**, 211–227.

## C

- Cembella, A.D., 1998. Ecophysiology and metabolism of paralytic shellfish toxins in marine microalgae, In: Anderson D. M., Cembella A.D., Hallegareff G.M. (Eds). *Physiology Ecology of Harmful algae Blooms*. Springer, Berlin. 381-403.
- Cembella, A.D., Shumway, S.E., Lewis, N.I., 1993. Anatomical distribution and spatio-temporal variation in paralytic shellfish toxin composition in two bivalve species from the Gulf of Maine. *J. Shellfish. Res.* **12** (2), 389-403.
- Cembella, A.D., Lewis, N.I., Quilliam, M.A., 1999. Spirolide composition of micro-extracted pooled cells isolated from natural plankton assemblages and from cultures of the dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii*, *Nat. Toxins.* **7** (5), 197–206.
- Cembella, A.D., Bauder, A.G., Lewis, N.I., Quilliam, M.A., 2000a. Population dynamics and spirolide composition of the toxigenic dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* in coastal embayments of Nova Scotia. In: Hallegrauff, G.M., Blackburn, S.I., Bolch, J.S., Lewis, R.J.

- (Eds.), IX International Conference on Harmful Algal Blooms. *Intergovernmental Oceanographic Commission, Hobart, Australia*. 173–176.
- Cembella, A. D., Lewis, N. I., Quilliam, M., 2000b. The marine dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) as the causative organism of spirolide shellfish toxins. *Phycologia*. **39**, 67-74.
- Cembella, A.D., Bauder, A.G., Lewis, N.I., Quilliam, M.A., 2001. Association of the gonyaulacoid dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* with spirolide toxins in size fractionated plankton. *J. Plank. Res.* **23**, 1413–1419.
- Cembella, A.D., Krock, B., 2007. Biogeography of spirolides in *Alexandrium ostenfeldii* from the North Atlantic—implications for shellfish toxicity and seafood safety, in *6th International Conference on Molluscan Shellfish Safety* Blenheim, New Zealand. Blackburn SI, Bolch CJ, Lewis RJ, eds, Harmful Algal Blooms 2000. *United Nations Educational, Scientific, and Cultural Organization*. Paris, France. 383–386.
- Chen, C. Y. & Chou, H.N., 2001. Accumulation and depuration of paralytic shellfish poisoning toxins by purple clam *Hiatula rostrata* Lightfoot. *Toxicon* **39**, 1029-1034.
- Choi, M.C., Hsieh, D.P.H., Lam, P.K.S., Wang, W.X., 2003. Field depuration and biotransformation of paralytic shellfish toxins in scallop *Chlamys nobilis* and green-lipped mussel *Perna viridis*. *Mar. Bio.* **143**, 927-934.
- Choi, M.C., Yu, P.K.N., Hsieh, D.P.H., Lam, P.K.S., 2006. Trophic transfer of paralytic shellfish toxins from clams (*Ruditapes philippinarum*) to gastropods (*Nassarius festivus*). *Chemosphere*. **64**, 1642-1649
- Chou, T.T., de Freitas, A. S. W., Curtis, J. L. C., 1996. Isolation and structure of prorocontrolide B a fast-acting toxin from *Prorocentrum maculosum*. *J. Nat. Prod.* **59**, 1010-1014.
- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Magno, S., Poletti, R., 2002. The detection and identification of 42, 43, 44, 45, 46, 47, 55-heptanor-41-oxoyessotoxin, a new marine toxin from Adriatic shellfish, by liquid chromatography mass spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.* **15**, 979–984.
- Ciminiello P, Dell'Aversano C, Fattorusso E, Magno S, Tartaglione L, Cangini M, Pompei M, Guerrini F, Boni L and Pistocchi R, 2006. Toxin profile of *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) from the Northern Adriatic Sea revealed by liquid chromatography-mass spectrometry. *Toxicon*, **47**, 597-604.
- Commission européenne, 1996. 96/77/EC: Commission Decision of 18 January 1996 establishing the conditions for the harvesting and processing of certain bivalve molluscs coming from areas where the paralytic shellfish poison level exceeds the limit laid down by Council Directive 91/492/EEC. *Official Journal of European Communities*. **15**, 46–47.
- Commission européenne, 2002. COMMISSION DECISION 2002/226/EC of 15 March 2002, establishing special health checks for the harvesting and processing of certain bivalve molluscs with a level of amnesic shellfish poison (ASP) exceeding the limit laid down by Council Directive 91/492/EEC. *Official Journal of European Communities*. 65–66.
- Croci, L., Toti, L., De Medici, D., Cozzi, L., 1994. Diarrhetic shellfish poisoning in mussels: comparison of methods of detection and determination of the effectiveness of depuration. *Int. J. Food Microbiol.* **24**, 337-342.
- Croci, L., Stacchini, A., Cozzi, A., 2001. Evaluation of rapid methods for the determination of okadaic acid in mussels. *J. Appl. Microbiol.* **90**, 7-73.
- Crossetti, L.O., Bicudo, D.C., Bicudo, C.E.M., Bini, L.M., 2008. Phytoplankton biodiversity changes in a shallow tropical reservoir during the hypertrophication process. *Brazilian Journal of Biology*. **68**, 1061-1067.

**D**

- Dammak-Zouari, H., Hamza, A., Bouain, A., 2009. Gymnodiniales in the Gulf of Gabes (Tunisia). *Cahiers de Biologie Marine*. **50**, 153-170.
- De Zwaan, A. & Mathieu, M., 1992. Cellular energy metabolism in the Mytilidae: an overview. In: Gosling, E. (Ed.), *The Mussel Mytilus: Ecology, Physiology, Genetics and Culture*. Elsevier, Amsterdam. 223–307.
- Deltreil, J.P., 2006. Historique de l'ostréiculture dans le Bassin d'Arcachon. *DOP LER Arcachon*. 13-15.
- DGPA (Direction Générale de la pêche et de l'aquaculture), Ministère de l'agriculture, Tunisie, *annuaire statistique*, 2005-2009.
- Dittmann, E. & Wiegand, C., 2006. Cyanobacterial toxins — occurrence, biosynthesis and impact on human affairs. *Mol Nutr Food Res*. **50**, 7–17.
- Donovan, C., Ku, J., Quilliam, M., Gill, T., 2008. Bacterial degradation of paralytic shellfish toxins. *Toxicon*. **52** (1), 91–100.
- Drira, Z., Hamza, A., Belhassen, M., Ayadi, H., Aleya, L., 2008. Dynamics of dinoflagellates and environmental factors during the summer in the Gulf of Gabès (Tunisia, Eastern Mediterranean Sea). *Scientia Marina*. **72**, 59-71.
- Drum A.S., Siebens T.L., Crecelius E.A., Elston R.A., 1993, Domoic acid in the Pacific razor clam *Siliqua patula* (Dixon, 1789). *J. Shellfish Res.* **12**, 443-450.
- Dubois, M. & Amzil, Z., 2009. Programme National Arcachon. Toxicité atypique des coquillages du bassin d'Arcachon (épisode 2005-2006). Rapport Tâche T-3a. 31-32.
- Duinker, A., Bergslien, M., Strand, O., Olseng, C.D., Svardal, A., 2007. The effect of size and age on depuration rates of diarrhetic shellfish toxins (DST) in mussels (*Mytilus edulis* L.). *Harmful Algae*. **6**, 288-300.
- Dupuy. C., 1999. Role fonctionnel des protistes hetero/mixotrophes dans le reseau trophique d'un écosystème conchylicole : le marais atlantique. These de doctorat, universite de La Rochelle, France. 83 p.

**E-F**

- Estrada, N., de Jesus Romero, M., Campa-Cordova, A., Luna, A., Ascencio, F., 2007. Effects of the toxic dinoflagellate, *Gymnodinium catenatum* on hydrolytic and antioxidant enzymes, in tissues of the giant lions-paw scallop *Nodipecten subnodosus*. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* **146**, 502–510.
- FAO/WHO/IOC 2005. Report of the Joint FAO/IOC/WHO ad hoc Expert Consultation on Biotoxins in Bivalve Molluscs. 8 p.
- FAO 2009. La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture 2008, Rome. <http://www.fao.org/docrep/011/i0250f/i0250f00.htm>, 2009
- Farley, C.A., 1988. Histochemistry as a tool for examining possible pathologic cause-and effect relationships between heavy metal and inflammatory lesions in oysters, *Crassostrea virginica*. *Mar. Environ. Res.* **24**, 271-275.
- Farrington, J.W., 1989. Bioaccumulation of hydrophobic organic pollutant compounds. In: Levin, S.A., Harwell J.R., Kelly J.R., Kimball K.D. (Eds.), *Ecotoxicology: Problems and Approaches*. Springer-Verlag, New York. 279–313.
- Fernandez, M.L., Miguez, A., Morono, A., Cacho, E., Martinez, A., Blanco, J., 1998. Detoxification of low polarity toxins (DTX-3) from mussels *Mytilus galloprovincialis* in Spain. In: Reguera, B., Blanco, J., Fernandez, M.L., Wyatt, T. (Eds.), *Harmful Algae*. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. 449– 452.
- Fernandez, M.L., Shumway, S.E., Blanco, J., 2003. Management of shellfish resources In: Hallegraef GM, D.M. A, Cembella AD (eds). *Manual on harmful marine microalgae*. IOC Manuals and guides. 657-692



- Fernández-Reiriz, M.J., Navarro, J.M., Contreras, A.M., Labarta, U., 2008. Trophic interactions between the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* and *Mytilus chilensis*: Feeding and digestive behaviour to long-term exposure. *Aquat. Toxicol.* **87**, 245–251.
- Fiki W., Hamza A., Bel Hassen M. & Rebai A., 2008. Les efflorescences phytoplanctoniques dans le golfe de gabes (Tunisie) au cours de dix ans de surveillance (1995-2005). *Bulletin de l'Institut National des Sciences et Technologies de la Mer.* **35**, 105-116.
- Fleet, G. H., 1978. Oyster depuration - a review. *Food Technology in Australia.* **30**, 444-454.
- Flynn, K., Franco, J.M., Fernández, P., Reguera, B., Zapata, M., Wood, G., Flynn, K.J., 1994. Changes in toxin content, biomass and pigments of the dinoflagellate *Alexandrium minutum* during nitrogen refeeding and growth into nitrogen and phosphorus stress. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **111**, 99–109.
- Fraga, S. & Sánchez, F., 1985. Toxic and potentially toxic dinoflagellates found in Galacian Rias (NW Spain). In: Anderson, D.M., White, A., Baden, D. (Eds.), *Toxic Dinoflagellates*. Elsevier Science Publishing. Co., Inc., New York. 51–54.
- Frangopulos, M., Guisande, C., deBlas, E., Maneiro, I., 2004. Toxin production and competitive abilities under phosphorus limitation of *Alexandrium* species. *Harmful algae.* **3**, 131-139.
- Fritz, L., Anderson, D. M. and Triemer, R. E., 1989. Ultrastructural aspects of sexual reproduction in the red tide dinoflagellate *Gonyaulax tamarensis*. *J. Phycol.* **25**, 95–107

## G

- Gainey, L.F. & Shumway, S.E., 1988. A compendium of the response of bivalve mollusks to toxic dinoflagellates. *J. Shellfish Res.* **7**, 623-628.
- Galimany, E., Sunila, I., Hégaret, H., Ramón, M., Wikfors, G.H., 2008a. Experimental exposure of the blue mussel (*Mytilus edulis*, L.) to the toxic dinoflagellate *Alexandrium fundyense*: Histopathology, immune responses, and recovery. *Harmful Algae.* **7**, 702-711.
- Galimany, E., Sunila, I., Hégaret, H., Ramón, M., Wikfors, G.H., 2008b. Pathology and immune response of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.) after an exposure to the harmful dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. *Harmful Algae.* **7**, 630–638.
- Galimany, E., Place, A.R., Ramon, M., Jutson, M., Pipe, R.K., 2008c. The effects of feeding *Karlodinium veneficum* (PLY # 103; *Gymnodinium veneficum* Ballantine) to the blue mussel *Mytilus edulis*. *Harmful Algae.* **7**, 91–98.
- Gill S., Murphy, M., Clausen J., Richards, D., Quilliam, M.A., MacKinnon, S., LeBlanc, P., Mueller R., Pulido, O., 2003. Neural injury biomarkers of novel shellfish toxins, spirolides: a pilot study using immunochemical and transcriptional analysis. *NeuroToxicology.* **24**, 593–604.
- Gonzalez, J.C., Leira, F., Vieytes, M.R., Vieites, J.M., Botana, A. M., Botana, L.M., 2000. Development and validation of high-performance liquid chromatographic method using fluorimetric detection for the determination of the diarrhetic shellfish poisoning toxin okadaic acid without chlorinated solvents. *J. Chromatogar. A.* **876**, 117-25.
- Gonzalez, J.C., Fontal, O.I., Vieytes, M.R., Vieites, J.M., Botana, L.M., 2002. Basis for a new procedure to eliminate diarrhetic shellfish toxins from a contaminated matrix. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **50** (2), 400–405.
- Granéli, E., Olsson, P., Sundstrom, B., Edler, L., 1987. In situ studies of the effects of humic acids in dinoflagellates and diatoms. In Red Tides; Biol. Environ. Sci. Toxicol. Pror. Int. Symp. 1987. Edited by Okaichi, T., Anderson, D., Nemoto, T). *Elsevier, New York.* 209-212
- Gribble, K.E., Keafer, B.A., Quilliam, M.A., Cembella, A.D., Kulis, D.M., Manahan, A., Anderson, D.M., 2005. Distribution and toxicity of *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) in the Gulf of Maine, USA. *Deep-Sea Res. II.* **52**, 2745-2763.
- Grimmelt, B., Nijjar, M.S., Brown, J., Macnair, N., Wagner, S., Johnson, G.R., Amend, J.F., 1990. Relationship between domoic acid levels in the blue mussel (*Mytilus edulis*) and toxicity in mice. *Toxicon.* **28**, 501–508.

- Grzebyk, D., Béchemin, C., Ward, C. J., Vérité, C., Codd, G. A., Maestrini, S. Y., 2003. Effects of salinity and two coastal waters on the growth and toxin content of the dinoflagellate *Alexandrium minutum*. *Journal of Plankton research*. **25**, 1185-119.
- Guéguen, M., Bardouil, M., Baron, R., Lassus, P., Truquet, P., Massardier, J., Amzil, Z., 2008a Detoxification of Pacific oyster *Crassostrea gigas* fed on diet of *Skeletonema costatum* with and without silt, following PSP contamination by *Alexandrium minutum*. *Aquat. Living Resour.* **21**, 13–20.
- Guéguen, M., Lassus, P., Laabir, M., Bardouil, M., Baron, R., Sechet, V., Truquet, P., Amzil, Z., Barille, L., 2008b. Gut passage times in two bivalve molluscs fed toxic microalgae: *Alexandrium minutum*, *A.catenella* and *Pseudo-nitzschia calliantha*. *Aquatic Living Resources.* **21**, 21-29
- Guelorget, O., 1991. Etude de la crise survenue en mer Boughrara au cours de l'été 1991. Rapport : *Commissariat Générale de la Pêche (CGP)*. 7 p.
- Guillard R.R.L. 1973. Division rates. In: Stein J.R. (ed.), *Handbook of Phycological Methods*. Cambridge Univ. Press, Cambridge. 289–312.
- Guillard, R.R.L., 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In Smith, W.L. and Chanley. M.H. *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Plenum Press, New York, USA. 26-60.
- Guillard, R.R.L., Hargraves, P.E., 1993. *Stichochrysis immobilis* is a diatom, not a chrysophyte. *Phycologia.* **32**, 234–236.
- Guillard, R.R.L., Ryther, J.H., 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. *Canadian Journal Microbiology.* **8**, 229-239.
- Guillou, L., Nézan, E., Cuffe, V., Erard-Le Denn, E., Cambon-Bonavita, M., Gentiens, P., Barbier, G., 2002. Genetic diversity and molecular detection of three toxic dinoflagellate genera (*Alexandrium*, *Dinophysis*, and *Karenia*) from French Coasts. *Protist.* **153**, 223-238.
- Guisande, C., Frangopulos, M., Maneiro, I., Vergara, A.R., Riveiro, I., 2002. Ecological advantages of toxin production by the dinoflagellate *Alexandrium minutum* under phosphorus limitation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **225**, 169-176.

## H

- Haamer, J., Andersson, P.O., Lange, S., Li, X.P., Edebo, L., 1990. Effects of transplantation and reimmersion of mussels *Mytilus edulis* L. on their contents of okadaic acid. *J. Shellfish Res.* **9** (1), 109-112.
- Haberkorn, H., Lambert, C., Le Goïc, N., Moal, J., Suquet, M., Gueguen, M., Sunila, I., Soudant, P., 2010. Effects of *Alexandrium minutum* exposure on nutrition-related processes and reproductive output in oysters *Crassostrea gigas*, *Harmful Algae*. In press.
- Hall, S., 1982. Toxins and toxicity of *Protogonyaulax* from the Northeast Pacific. PhD dissertation, university of Alaska, Fairbanks. 196 p.
- Hallegraeff, G.M., 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia.* **32**, 79-99.
- Hamza A. & EL Abed, A., 1994. Les eaux colorées dans le golfe de Gabès : Bilan de six ans de surveillance (1989-1994). *Bulletin Institut National Sciences Technologies Mer.* **21**, 66-72.
- Hamza, A., El Abed, A., Bouain, A., 2001. Statut du phytoplancton toxique dans le golf de Gabès, In IV Congrès Maghrébin des Sciences de la Mer, Mahdia. 9-11.
- Hamza, A., Bouain A., El Abed, A., 1999. Le *Gymnodinium sp.* Phytoplancton toxique du golfe de Gabès. Actes des 3<sup>èmes</sup> journées tunisiennes des Sciences de la mer. *Bulletin Institut National Sciences Technologies Mer.* **4**, 49-51.
- Hamza, A., 2003. Le phytoplancton marin du Golfe de Gabès : Surveillance et Identification du statut. Thèse de Doctorat en Sciences Biologiques. Uni. Sfax. 33-34.

- Hansen, P.J., Cembella, A.D., Moestrup, O., 1992. The marine dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii*: paralytic shellfish toxin concentration, composition, and toxicity to a tintinnid ciliate. *J. Phycol.* **28**, 597-603.
- Hansen, G., Erard-Le Denn, E., Daugbjerg, N., Rodriguez, F., 2004. *Karenia selliformis* responsible for the fish-kills in the Gulf of Gabes, Tunisia 1994. Communication Ifremer: Poster présenté à la Conférence Internationale sur le phytoplancton toxique.
- Haque, S.M., Oneoue, Y., 2002a. Variation in toxin compositions of two harmful raphidophytes, *Chattonella antiqua* and *Chattonella marina*, at different salinities. *Environmental Toxicology*. **17**, 113-118.
- Haque S.M., Oneoue Y., 2002b. Effects of salinity on growth and toxin production of a noxious phytoflagellate, *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). *Botanica Marina* **45**, 356-363.
- Harrison, P.J., Yu, P.W., Thompson, P.A., Price, N.M., Phillips, D.J., 1988. Survey of selenium requirements in marine phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **47**, 89-96.
- Hashimoto, S., Suzuki, T., Shiota, Y., Honma, M., Itabashi, Y., Chyounan, T., Kamiyama, T., 2006. Lipophilic toxin profiles associated with diarrhetic shellfish poisoning in scallops, *Patinopecten yessoensis*, collected in Hokkaido and comparison of the quantitative results between LC/MS and mouse bioassay. *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* **47**, 33-40.
- Hawkins, A.J.S., Smith, R.F.M., Bayne, B.L., Héral, M., 1996. Novel observations underlying fast growth of suspension-feeding shellfish in turbid environments: *Mytilus edulis*. *Mar.Ecol.Progrs.Ser.* **131**,179-190.
- Haywood, A.J., Steidinger, K.A., Truby, E.W., Bergquist, P.R., Bergquist, P.L., Adamson J., MacKenzie, L., 2004. Comparative morphology and molecular phylogenetic analysis of three newspecies of the genus *Karenia* (Dinophyceae) from New Zealand. *Journal Phycology*. **40**, 165-179.
- Hégaret, H., Wikfors, G., Soudant, P., Lambert, C., Shumway, S., Bérard, J., Lassus, P., 2007. Toxic dinoflagellates (*Alexandrium fundyense* and *A. catenella*) have minimal apparent effects on oyster hemocytes. *Mar. Biol.* **152**, 441-447.
- Hégaret, H., Shumway, S.E., Wikfors, G.H., Pate, S., Burkholder, J.M., 2008a. Potential transport of harmful algae via relocation of bivalve mollusks. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **361**, 169-179.
- Hégaret, H., da Silva, P., Sunila, I., Dixon, M.S., Alix, J., Shumway, S.E., Wikfors, G.H., Soudant, P., 2009. Perkinsosis in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* affects responses to the harmful-alga, *Prorocentrum minimum*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **371**, 112-120.
- Heil, C.A., Glibert, P.M., Al-Sarawi, M.A., Faraj, M., Behbehani, M., Husain, M., 2001. First record of a fish-killing *Gymnodinium sp.* bloom in Kuwait Bay, Arabian Sea: chronology and potential causes. *Marine Ecology Progress Ser.* **214**, 15-23.
- Hess, P., McMahan, T., Slattery, D., Swords, D., Dowling, G., McCarron, M., Clarke, D., Gibbons, W., Silke, J., O' Cinneide, M., 2003. Use of LC-MS testing to identify lipophilic toxins, to establish local trends and interspecies differences and to test the comparability of LC-MS testing with the mouse bioassay: an example from the Irish Biotoxin Monitoring Programme 2001. In: Villalba, A., Reguera, B., Romalde, J.L., Beiras, R. (Eds.), *Molluscan Shellfish Safety Xunta de Galicia and UNESCO, Spain*. 57-66.
- Holland, P.T., McNabb, P., Selwood, A., Page, T., Bell, K., Mackenzie, L., 2002. Marine biotoxin monitoring of New Zealand shellfish—a new management programme based on LC-MS. In: *Proceedings of the second International Conference on Harmful Algae Management and Mitigation, November 2001*. 62 p.
- Holmes, M.J., Teo, S.L.M., Lee, F.C., Khoo, H.W., 1999. Persistent low concentration of diarrhetic shellfish toxins in green mussels *Perna viridis* from the Johor Strait, Singapore: first record of diarrhetic shellfish toxins from South-East Asia. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **181**, 68-257.

- Hu, T., Curtis, J.M., Oshima, Y., Quilliam, M., Walter, J.A., Wastson-Wright, W.M., Wright, J. L., 1995. Spirolides B and D, two novel macrocycles isolated from the digestive glands of shellfish. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 2159-2161.
- Hu, T., deFreitas, A. S., Curtis, J. M., Oshima, Y., Walter, J. A., Wright, J. L., 1996. Isolation and structure of prorocentrolide B, a fast-acting toxin from *Prorocentrum maculosum*. *J. Nat. Prod.* **59**, 1010-1014.
- Hu, T., Burton, I. W., Cembella, A. D., Curtis, J. M., Quilliam, M. A., Walter, J. A., Wright, J. L., 2001. Characterization of spirolides A, C, and 13-desmethyl C, new marine toxins isolated from toxic plankton and contaminated shellfish. *J. Nat. Prod.* **64**, 308-312.
- Huang, X., Hsu, K., Chu, F.S., 1996. Direct competitive enzyme-linked-immuno-sorbent-assay for saxitoxin and neosaxitoxin. *J. Agricul. Food Chem.* **44**, 35-1029.
- Hudnell, H.K., 2008. Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs (Eds). *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 619), Springer-Verlag, Berlin, Germany, 950 p.
- Huntley, M., Sykes, P., Rohan, S., Marin, V., 1986. Chemically-mediated rejection of dinoflagellate prey by the copepods *Calanus pacificus* and *Paracalanus parvus*: mechanism, occurrence and significance. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **28**, 105-120.

## I-J

- Ichimi, K., Yamasaki, M., Okumura, Y., Suzuki, T., 2001. The growth and cyst formation of a toxic dinoflagellate, *Alexandrium tamarense*, at low water temperatures in northeastern Japan. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **261**, 17-29.
- Jacobson, D.M. & Anderson, D.M., 1996. Widespread phagocytosis of ciliates and other protists by marine mixotrophic and heterotrophic thecate dinoflagellates. *J. Phycol.* **32**, 279-285.
- James, K.J., Furey, A., Lehane, M., Ramstad, H., Aune, T., Hovgaard, P., Morris, S., Higan, W., Satake, M., Yasumoto, T., 2002. First evidence of an extensive Northern European distribution of Azaspiracid Poisoning (AZP) toxins in shellfish. *Toxicon.* **40**, 909-915.
- Jensen M., Moestrup, O., 1997. Autecology of the toxic dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii*: life history and growth at different temperatures and salinities. *European Journal of Phycology.* **32**, 9-18.
- Jiang, T.J, Niu, T, Xu, Y.X., 2006. Transfer and metabolism of paralytic shellfish poisoning from scallop (*Chlamys nobilis*) to spiny lobster (*Panulirus stimpsoni*). *Toxicon.* **48**, 988-994 .
- Jiang, T.J, Wang, D.Z, Niu, T., Xu, Y.X., 2007. Trophic transfer of paralytic shellfish toxins from the cladoceran (*Moina mongolica*) to larvae of the fish (*Sciaenops ocellatus*). *Toxicon.* **50**, 639-645.
- John, E.H., Flynn, K.J., 2000. Modelling changes in paralytic shellfish toxin content of dinoflagellates in response to nitrogen and phosphorus supply. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **225**, 147-160.
- John, U., Cembella, A., Hummert, C., Elebrachter, M., Groben, R., Medlin, L., 2003b. Discrimination of the toxigenic dinoflagellates *Alexandrium tamarense* and *A.ostenfeldii* in co-occurring natural populations from Scottish coastal waters. *Eur. J. Phycol.* **38**, 25-40.
- John, U., Fensome, R.A., Medlin, L.K., 2003a. The application of a molecular clock based on molecular sequences and the fossil record to explain biogeographic distributions within the *Alexandrium tamarense* "species complex" (Dinophyceae). *Mol. Biol. Evol.* **20**, 1015-1027.

**K**

- Kao, C.Y., 1993. Paralytic shellfish poisoning. In: Falconer IR (ed) *Algal Toxins in Seafood and drinking water*. Academic Press, San Diego. 75-86
- Kharrat, R., Servent, D., Girard, E., Ouanounou, G., Amar, M., Marrouchi, R., Benoit, E., Molgo, J., 2008. The marine phycotoxin gymnodimine targets muscular and neuronal nicotinic acetylcholine receptor subtypes with high affinity. *J. neurochem.* **107**, 952-963.
- Kim, Y.S., Martin D.F., 1974. Effects of salinity on synthesis of DNA, acidic polysaccharide, and ichthyotoxin in *Gymnodinium breve*. *Phytochemistry*. **13**. 533-538.
- Kodama, M., Ogata, T., Sakamoto, S., Sato, S., Honda, T., Miwatani, T., 1990. Production of paralytic shellfish toxins by a bacterium *Moraxella* sp. Isolated from protogonyaulax tamarensis. *Toxicon*. **28**, 707-714.
- Kogawa, A., Nomura, M., Murakawi, J., Kobayashi, E., 1989. The effect of free fatty acids upon the mouse tests of diarrhetic shellfish poisons and determination of the poison components. *Can. Transl. Fish, Aquat, Sci.* **5485**. 22 p.
- Konovalova, G.V., 1991. The morphology of *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyta) from littoral waters of eastern Kamchatka. *Botanicheskiy Zhurnal (Leningrad)*. 76, 79-94.
- Koroleff, F., 1969. Direct determination of ammonia in natural waters as indophenol blue. *CM ICES/C.* **9**, 19-22.
- Kroken, G., Loken, J., Myklebust, B., 2006. Detoxification of Shellfish. WIPO, Norway.
- Kvitek, R.G. & Beitler, M.K., 1988. A case for sequestering of paralytic shellfish toxins as a chemical defense. *J. Shellfish Res.* **7**, 629-636.
- Kvitek, R.G., Goldberg, J.D., Smith, G.J., Doucette, G.J., Silver, M.W., 2008. Domoic acid contamination within eight representative species from the benthic food web of Monterey Bay, California, USA. *Marine Ecology-Progress Series.* **367**, 35-47.

**L**

- Lagos, N., Rutman, M., Blamey, J., Ocaranza, M.P., Chiong, M., Hinrichsen, J.P., Lopez, C., 2001. Procedure for detoxification of shellfish contaminated with paralytic shellfish toxins. *US.* 6,171,626 B1.
- Langdon, C.J. & Newell, R.I.E., 1996. Digestion and nutrition in larvae and adults. In *The Eastern oyster Crassostrea virginica* (eds V.S. Kennedy, R.I.E. Newell & A.F. Eble). *Maryland Sea Grant, College Park, Maryland.* 231-269
- Larsen, J. & Moestrup, O., 1989. Guide to toxic and potentially toxic marine algae. *Fish Inspection Service. Ministry of Fisheries*, Copenhagen, 61 p.
- Lassus, P., Fremy, J.M., Ledoux, M., Bardouil, M., Bohec, M., 1989. Patterns of experimental contamination by *Protogonyaulax tamarensis* in some French commercial shellfish. *Toxicon*. **12**, 1313-1321.
- Lassus, P., 1999. Effect of a continuous supply of the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum halim* on the feeding behavior of the pacific oyster (*Crassostrea gigas Thunberg*). *J. Shell. Rea.* **18** (1), 211-216.
- Lassus P., Bardouil, M., Beliaeff, B., Bougrier, S., Gubbins, M., Masselin, P., Mornet, F., Thébaud, O., Truquet, P., 2002. Coquillage contaminés par des phycotoxines paralysantes: vers une procédure de détoxification. 48 p.
- Lassus, P., Baron, R., Garen, P., Truquet, P., Masselin, P., Bardouil, M., Leguay, D., Amzil, Z., 2004. Paralytic shellfish poison outbreaks in the Penze estuary: Environmental factors affecting toxin uptake in the oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquat. Living Resour.* **17**, 207-214.
- Lassus, P., Bardouil, M., Baron, R., Berard, J.B., Masselin, P., Truquet, P., Pitrat, J.P., 2005. Improving detoxification efficiency of PSP contaminated oysters (*Crassostrea gigas Thunberg*). *Aquaculture Europe.* 3-6

- Le Gall, S., Bel Hassen, M., Le Gall, P., 1997. Ingestion of a bacterivorous ciliate by the oyster *Crassostrea gigas*: protozoa as a trophic link between picoplankton and benthic suspension-feeders. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* **152**, 301-306.
- Lebeau, T. & Robert, J.M., 2003a. Diatom cultivation and biotechnologically relevant products. Part I: Cultivation at various scales. *Appl Microbiol Biotechnol.* **60**, 612-23.
- Lebeau, T. & Robert, J.M., 2003b. Diatom cultivation and biotechnologically relevant products. Part II: Current and putative products. *Appl Microbiol Biotechnol.* **60**, 624-32.
- Levasseur, M., Berard-Therriault, L., Bonneau, E., Roy, S., 1997. Distribution of the toxic dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* in the Gulf of St. Lawrence, Canada. In: Reguerra, B., Blanco, J., Ferná' ndez, M.L., Wyatt, T. (Eds.), VIII International Conference on Harmful Algae. Xunta de Galicia, Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Vigo, Spain. 54-57.
- Levinton, J.S., Ward, J.E., Shumway, S.E., 2002. Feeding responses of the bivalves *Crassostrea gigas* and *Mytilus trossulus* to chemical composition of fresh and aged kelp detritus. *Marine Biology.* **141**, 367-376.
- Li, A.M.Y., Yu, P.K.N., Hsieh, D.P.H., Wang, W.-X., Wu, R.S.S., Lam, P.K.S., 2005. Uptake and depuration of paralytic shellfish toxins in the green-lipped mussel, *Perna viridis*: a dynamic model. *Environ. Toxicol. Chem.* **24**, 129-135.
- Li, S.C. & Wang, W.X., 2001. Radiotracer studies on the feeding of two marine bivalves on the toxic and nontoxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **263**, 65-75.
- Livingstone, D.R. & Pipe, R.K., 1992. Mussels and environmental contaminants: molecular and cellular aspects. In: Gosling, E. (Ed.), *The Mussel Mytilus: Ecology, Physiology, Genetics and Culture*. Elsevier, Amsterdam. 425-464.
- Loeblich, A. R., Smith, V. E., 1968. Chloroplast pigments of the marine dinoflagellate *Gyrodinium resplendens*. *Lipids.* **8**, 5-13.
- Lu, C.K., Lee, G.H., Huang, R., Chou, H., 2001. Spiro-prorocentrimine, a novel macrocyclic lactone from a benthic *Prorocentrum* sp. of Taiwan. *Tetrahedron Letters.* **42**, 1713-1716
- Luckenbach, M. W., Sellner, K. G., Shumway, S. E., and Greene, K., 1993. Effects of two bloom-forming dinoflagellates, *Prorocentrum minimum* and *Gyrodinium uncatenum*, on the growth and survival of the eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin 1791). *Journal of Shellfish Research.* **12** (2), 411-415.

## M-N

- MacKenzie, A. L., Rhodes, L., Till, D., Chang, F.H., Kaspar H., Haywood, A., Kapa J., Walker, B., 1995. A gymnodinium sp. Bloom and the contamination of shellfish with lipid soluble toxins in New Zealand, Jan-April 1993. In: *Harmful Marine Algal Blooms* Lassus, P., Arzul, G., Erard-Le Denn, E., Gentien, P., & Marcaillou-Le Baut, C., (eds). Lavoisier, Paris, 795-800.
- MacKenzie, A. L., Haywood, A., Adamson, J., Truman, P., Till, D., Seki, T., Satake, M., Yasumoto, T., 1996. Gymnodimine contamination of shellfish in New Zealand. In: Yasumoto, T., Oshima, Y., Fukuyo, Y., (Eds). *Harmful and Toxic Algal Bloom*, IOC-UNESCO Publish. 97-100.
- MacKenzie, L., White, D., Adamson, J., 1996a. Temporal variatio and tissue localisation of paralytic shellfish toxins in the New Zealand Tuatua (surfclam), *Paphies subtriangulata*. *J. Shell. Res.* **15**, 735-740.
- MacKenzie, L., White, D., Oshima, Y., Kapa, J., 1996b. The resting cyst and toxicity of *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) in New Zealand. *Phycologia.* **35**, 148-155.
- MacKenzie, L., Adamson, J., White, D., Todd, K., 1996c. *Alexandrium catenella* and PSP-toxin contamination of shellfish in the Bay of Plenty: progress to date on an investigation of the April/May 1996 bloom. In: Proceedings of the Marine Biotxin Science Workshop No. 6, Wellington, 18 October 1996. 72-75.

- MacKenzie, L., Beuzenberg, V., McNabb, P., 2002. Production of gymnodimine by *Karenia selliformis* (Haywood *et al.*) In: Steidinger, K. A., Landsberg, J.H., Tomas, C.R., Vargo, G.A. (Eds), *Florida Fish and Wildlife Conservation. Commission and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO*. 160-162.
- MacKinnon, S.L., Cembella, A.D., Quilliam, M.A., LeBlanc, P., Lewis, N.I., Hardstaff, W.R., Burton, I.W., Walter, J.A., 2004. The characterization of two new spirolides isolated from Danish strains of the toxigenic dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii*. In: Steidinger, K.A., Landsberg, J.H., Tomas, C.R., Vargo, G.A. (Eds.), *Harmful Algae 2002*. Florida Fish and Wildlife Conservation Commission, Florida Institute of Oceanography, and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, St.Petersburg, FL, USA, St. Pete Beach, FL. 186–188.
- MacKinnon, SL, Walter, J.A, Quilliam, M.A, Cembella A.D, Leblanc, P., Burton, I.W., Hardstaff , W.R., Lewis, N.I., 2006. Spirolides isolated from Danish strains of the toxigenic dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii*. *J. Nat. Prod.* **69**, 983–987.
- Maclean, C., Cembella, A.D., Quilliam, M.A., 2003. Effects of light, salinity and inorganic nitrogen on cell growth and spirolide production in the marine dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* (Paulsen) Balech et Tangent. *Botanica Marina.* **46** (5), 466-476.
- Madenwald, N.D., 1985. Effect of water temperature on the loss of paralytic shellfish poison from the butter clam, *Saxidomus giganteus*. In: Anderson D.M., White A.W., Baden D.G. (eds) *Toxic Dinoflagellates. Elsevier- North Holland*. New York. 479-484.
- Magaña, H.A., Villareal, T.A., 2006. The effects of environmental factors on the growth rate of *Karenia brevis* (Davis) G. Hansen and Moestrup. *Harmful Algae.* **5**, 192–198.
- Maier Brown, A.F., Dortch Q., Van Dolah F.M., Leighfield, T.A., Morrison, W., Thessen, A.E., Steidinger, K., Richardson, B., Moncreiff, C.A., Pennock, J.R., 2006. Effect of salinity on the distribution, growth and toxicity of *Karenia* spp. *Harmful Algae.* **5**, 199-212.
- Malagoli, D., Marchesini, E., Ottaviani, E., 2006. Lysosomes as the target of yessotoxin in invertebrate and vertebrate cell lines. *Toxicol. Lett.* **167** (1), 75–83.
- Marcaillou-Le Baut, C., Bardin, B., Bardouil, M., Bohec, M., Le Dean, L., Masselin, P., Truquet, P., 1993. DSP depuration rates mussels reared in a laboratory and an aquaculture pond. In: Smayda TJ, Shimizu Y (eds), *Toxic phytoplankton blooms at the sea*. Elsevier, Amsterdam. 531-535.
- Marrouchi, R., Dziri, F., Belayouni, N., Hamza, A., Benoit, E., Molgó, J., Kharrat, R., 2010. Quantitative Determination of Gymnodimine-A by High Performance Liquid chromatography in Contaminated Clams from Tunisia Coastline. *Marine Biotechnology*, 7 p.
- Masó, M. & Garcés, E., 2006. Harmful microalgae blooms (HAB); problematic and conditions that induce them. *Marine pollution bulletin.* **53**, 620–630.
- Mathers, N.F., 1972. The tracing of a natural algal food labelled with a carbon<sup>14</sup> isotope through the digestive tract of *Ostrea edulis*. *Pror, Malac. Soc. Lond.* **40**, 115-24.
- Mathers, N.F., 1973. A comparative histochemical survey of enzymes associated with the process of digestion in *Ostrea edulis* and *Crassostrea angulata* (Mollusca: Bivalvia). *J. Zoo., Lond.* **169**, 169-79
- Matsuyama, Y., Uchida, T., Honjo, T., 1997. Toxic effects of the dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* on clearance rate of the blue mussel *Mytilus gallopro incialis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **146**, 73–80.
- Maurer, D., Bec, B., Neaud-masson, N., Rumebe, M., Aubey, I., Grémare, A., 2010. Etude des relations entre le phytoplancton et les phénomènes de toxicité d'origine inconnue dans le bassin d'Arcachon. Rapport Ifremer de la tâche T3b du Programme National Arcachon : Toxicité due à des espèces phytoplanctoniques réputées toxiques ou encore méconnues dans le Bassin d'Arcachon. 29-31

- MacNabb, P., Selwood, A.I., Holland, P.T., 2005. Multiresidue method for determination of algal toxins in shellfish: single laboratory validation and interlaboratory study. *J. AOAC Int.* **88** (3), 761-772.
- Medhioub, W., Guéguen, M., Lassus, P., Bardouil, M., Truquet, P., Sibat, M., Medhioub, N., Soudant P., Kraiem, M., Amzil, Z., 2010. Detoxification enhancement in the gymnodimine-contaminated grooved carpet shell, *Ruditapes decussatus* (Linné). *Harmful Algae.* **9**, 200-207.
- Miles, C. O., Wilkins, A., Stirling, D., MacKenzie, L., 1999a. A new analogue of gymnodimine. In *Marine Biotoxin Science Workshop 11*. Wellington: Ministry of Agriculture and Forestry. 103-106.
- Miles, C. O., Hawkes, A. D., MacKenzie, L. A., Munday, R., Towers, N. R., Prinsep, M. R., 1999b. Chemistry and toxicity of gymnodimine. In *Marine Biotoxins Science Workshop 12*. Wellington: Ministry of Agriculture and Forestry. 94-98.
- Miles, C. O., Wilkins, A. L., Stirling, D. J., MacKenzie, A. L., 2000a. New analogue of gymnodimine from a *Gymnodinium* species. *J. Agric. Food. Chem.* **48**, 1373-1376.
- Miles, C. O., Wilkins, A. L., Stirling, D. J., MacKenzie, A. L., Munday, R., Prinsep, M. R., Hawkes, A. D., Towers, N., 2000b. Chemistry and toxicity of gymnodimine and analogues. In *Ninth International Conference on Harmful Algal Blooms*. Hobart, Tasmania.
- Miles, C.O., Wilkins, A.L., Stirling, D.J., MacKenzie, A.L., 2003. Gymnodimine C, an isomer of gymnodimine B, from *Karenia selliformis*. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 4838- 4840.
- Moestrup, Ø. & Hansen, P.J., 1988. On the occurrence of the potentially toxic dinoflagellates *Alexandrium tamarense* (*Gonyaulax excavata*) and *A. ostenfeldii* in Danish and Faroese waters. *Ophelia.* **28**, 195–213.
- Molgo, J., Girard, E., Benoit, E., 2007. The cyclic imines: an insight into this emerging group of bioactive marine toxins. In: *Phycotoxins: Chemistry and Biochemistry*. Botana L (Ed), Blackwell Publishing, Iowa, USA. 319-335.
- Molgó, J., Amar M., Araoz, R., Benoit, E., Silveira, P., Schlumberger, S., Lecardeur, S., Servent, D., 2008. The dinoflagellate toxin 13-Desmethyl Spirolide-C broadly targets muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors with high affinity. Book of Abstracts of the 16th European Section Meeting of the International Society on Toxinology, Leuven, Belgium, September 7-10, 2008.
- Molina Grima, E., Ación Fernández, F.G, García Camacho, F., Chisti, Y., 1999. Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup. *J Biotechnol.* **70**, 231-47.
- Molina Grima, E., Ación Fernández, F.G, García Camacho, F., Camacho Rubio, F., Chisti, Y., 2000a. Scale-up of tubular photobioreactors. *J Appl Phycol.* **12**, 355-68.
- Molina Grima, E., Belarbi, E.H, Ación Fernández, F.G, Robles Medina, A, Chisti, Y., 2000b. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnol Adv.* **20**, 491-515.
- Molina Grima, E., Fernández, J., Ación, F.G., Chisti, Y., 2001. Tubular photobioreactor design for algal cultures. *J. Biotechnol.* **92**, 113–31.
- Morono, A., Franco, J., Miranda, M., Reyero, M.I., Blanco, J., 2001. The effect of mussel size, temperature, seston volume, food quality and volume-specific toxin concentration on the uptake rate of PSP toxins by mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.* **257**, 117-132.
- Mountfort, D., Beuzenberg V, MacKenzie L, Rhodes L., 2006. Enhancement of growth and gymnodimine production by the marine dinoflagellate, *Karenia selliformis*. *Harmful Algae.* **5**, 658–64.
- Mountfort, D.O., Suzuki, T., Truman, P., 2001. Protein phosphatase inhibition assay adapted for determination of total DSP in contaminated mussels. *Toxicon.* **39**, 90-383.



- Munday, M., 2008. Toxicology of cyclic imines: gymnodimine, spirolides, pinnatoxins, pteriatoxins, prorocentrolide, spiro-prorocentrimine and symbioimines,,in: L.M. Botana (Ed.), *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*, 2nd edition, CRC Press, New York. 581 p.
- Munday, R., Towers, N.R., MacKenzie, L., Rhodes, L., Beuzenberg, V., Holland, P.T., Miles, C.O., 2004. Acute toxicity of gymnodimine in mice. *Toxicon*. **44**, 173–178.
- Mur, L.R., Skulberg, O.M., Utkilen, H., 1999. Cyanobacteria in the environment. In: *Toxic cyanobacteria in water*. Chorus I, Bartram J, (Eds), E & FN Spon, London and New York. 15-40.
- Nagasaki, K., Yamaguchi, M. and Imai, I., 2000. Algicidal activity of a killer bacterium against the harmful red tide dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* isolated from Ago Bay, Japan. *Nippon-Suisan-Gakkaish*. **66**, 666-673.
- Navarro, J.M., Muñoz, M.G., Contreras, A.M., 2006. Temperature as a factor regulating growth and toxin content in the dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Harmful Algae*. **5**, 762–9.
- Navarro, J.M., Contreras, A.M., Chaparro, O.R., 2008. Short-term feeding response of the mussel *Mytilus chilensis* exposed to diets containing the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Rev. Chil. Hist. Nat.* **81**, 41–49.
- Novaczek, I., Madhyastha, M.S., Ablett, R.F., Donald, A., Johnson, G., Nijjar, M.S., Sims, D.E., 1992. Depuration of domoic acid from live blue mussels (*Mytilus edulis*). *Can. J. Fish Aquat. Sci.* **49**,312-318.
- O**
- Ogata, T., Ishimaru, T., Kodama, M., 1987. Effect of water temperature and light intensity on growth rate and toxicity change in *Protogonyaulax tamarensis*. *Mar. Biol.* **95**, 217–220.
- Ogata, T., Kodama, M., Ishimaru, T. 1989. Effect of water temperature and light intensity on growth and toxin production of toxic dinoflagellate. In *Red Tides: boil. Environ. Sci. Toxicol. Proc. Int. Sym.* 1987. New York. 423-426.
- Okaishi, T., Montani, S., Hiragi, J., Hasui, A. 1987. The role of iron in the outbreaks of *Chattonella* red tide. In *Red Tides. Biol. Environ. Sci. Toxicol. Proc. Int. Symp.* 1987. New York. 353-356.
- Okolodkov, Y.B. & Dodge, J.D., 1996. Biodiversity and biogeography of planktonic dinoflagellates in the Arctic Ocean. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **202**, 19–27.
- Oshima, Y. & Narita, Y. 2001. Excretion is the major PSP depuration mechanism by short-necked clams *Tapes philippinarum*. In *Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences* **2386**. 68 p.
- Ostenfeld, C.H., Paulsen, O.,1911. Marine Plankton from the East- Greenland Sea. IV. General remarks on the microplankton. *Danmarks-ekspeditionen til Gronlands Nordostkyst*. 1906-1908.
- Ostergaard-Jensen, M. & Moestrup, Ø. 1997. Autecology of the toxic dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii*: life history and growth at different temperatures and salinities. *Eur.J. Phycol.* **31**, 9-18.
- Otero, P., Alfonso, A., Vieytes, M.R., Cabado, A.G., Vieites, J.M., Botana, L.M., 2010a. Effects of environmental regimens on the toxin profile of *Alexandrium ostenfeldii*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **29**, 301-310.
- Otero, P., Alfonso, A., Alfonso, C., Vieytes, M.R., Louzao, M.C., Botana, A.M., Botana, L.M., 2010b. New protocol to obtain spirolides from *Alexandrium ostenfeldii* cultures with high recovery and purity. *Biomedical Chromatography* .1380 p.
- Owen, G., 1955. Observation on the stomach and digestive diverticula of the lamellibranchia. *Quart. J. Microsc. Sci.* **96**, 517-37.

Owen, G., 1972. Lysosomes, peroxisomes and bivalves. *Sci. Prog., Oxf.* **60**, 299-318.

## P

Paerl, H.W. & Huisman, J., 2008. Blooms like it hot. *Science*. **320**, 57-58.

Parakash, A., 1967. Growth and toxicity of a marine dinoflagellate *Gonyaulax tamarensis*. *J. Fish. Res. Board. Can. Bull.* **24**, 1589-1606.

Parkhill, J.P. & Cembella, A.D., 1999. Effects of salinity, light and inorganic nitrogen on growth and toxigenicity of the marine dinoflagellate *Alexandrium tamarense* from northeastern Canada. *Journal of Plankton Research*. **21**, 939–955.

Parlement européen, C., 2004a. Corrigendum to Regulation (EC) No 853/ 2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin (OJ L 139, 30.4.2004). *Official Journal of the European Union*. **226**, 22–82.

Parlement européen, C., 2004b. Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin. *Official Journal of the European Union*. **139**, 55–205.

Paulsen, O., 1904. Plankton-investigations in the waters round Iceland in 1903. *Meddelelser fra Kommissionen for Havundersøgelser København Serie Plankton I* : 1-40.

Pearce, I., Handlinger, J.H., Hallegraeff, G.M., 2005. Histopathology in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spat caused by the dinoflagellate *Prorocentrum rhathymum*. *Harmful Algae* **4**, 61-74.

Pena-Llopis, S., Pena, J.B., Serrano, R., Pitarch, E., 2006. N-Acetylcysteine Boots Detoxification and Depuration of Organic Contaminants in Shellfish. Instituto de Plaguicidas y Aguas, Laboratorio de Analisis de Residuos de Plaguicidas.

Phillips, D.J.H., 1993. Bioaccumulation. In: Calow, P. (Ed.), Handbook of Ecotoxicology. Blackwell Scientific Publications. 378–398.

Poletti, R., Viviani, R., Cassadei, C., Lucentini, L., Funari, E., draisci, R., 1996. depuration dynamics of mussels naturally contaminated with diarrhetic toxins relocated to a basin of the Adriatic sea In : Yasumuto, T., Oshima, Y., Fukuyo, Y Eds Harmful and Toxic Algal Blooms. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. 429-432.

Pollinger, U. & Zemel E., 1981. In situ and experimental evidence of the influence of turbulence on cell division process of *Peridinium cinctum* forma westii (Lemm) Lefevre. *Br. Journal of Phycology*, **16**, 281-287.

Proctor, N.H., Chan, S.L., Trevor, A. J., 1975. Production of saxitoxin by culture of *Gonyaulax catenella*. *Toxicon*. **13**, 1-9.

Purchon RD, 1977. Biology of the Mollusca. Oxford, Pergamon Press; 2nd edition, 576 p.

Purchon, R.D., 1987. Classification and Evolution of the Bivalvia: An Analytical Study Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences. 316, 277-302.

## Q-R

Quilliam, M.A., Philipp H., Carmela, D.A., 2001. Recent development in the analysis of phycotoxins by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of AOAC International* **84**, 1615-1615.

Ravn, H., Schmidt, U.C., Sten, H., Anthoni, U., Christophersen, C., Nielsen, H.P., 1995. Elicitation of *Alexandrium ostenfeldii* (dinophyceae) affects the toxin profile. *Comp. Biochem. Physiol.* **3**, 405-412.

Reid, R. G. B., 1968. The distribution of digestive tract enzymes in lamellibranchiate bivalves. *Comp. Biochem. Physiol.* **24**, 727-44.

Rein, K. S., Borrone, J., 1999. Polyketides from dinoflagellates : origin, pharmacology and biosynthesis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*. **124**, 117-131.

Report of the Joint FAO/IOC/WHO ad hoc Expert Consultation on Biotoxins in Bivalve Molluscs Oslo, Norway, 26–30 September 2004. p 3.

- Rhodes, L.L., Selwood, A., McNabb, P., Briggs, L., van Ginkel, R., Adamson, J., Laczka, O., 2006. Trace metal effects on production of biotoxins by micro-algae. *African Journal of Marine*, September 2006. Science. **28** (5), 393-397.
- Rhodes, L., Smith, K., Selwood, A., McNabb, P., Van Ginkel, R., Holland, P., Munday, R., 2010. Production of pinnatoxins by a peridinoid dinoflagellate isolated from Northland, New Zealand. *Harmful Algae*. **9**, 384-389.
- Richard, D., Arsenault, E., Cembella, A., Quilliam, M.A., 2001. Investigations into the toxicology and pharmacology of spirolides, a novel group of shellfish toxins. In: Hallegraef, G.M., Blackburn, S.I., Bolch, C.J.S., Lewis, R.J. (Eds.), IX International Conference on Harmful Algal Blooms. Intergovernmental Oceanographic Commission, Hobart, Australia. 383-386.
- Roelke, D.L., Fryxell, G.A., Cifuentes, L.A., 1993. Effects on the oyster *Crassostrea virginica* caused by exposure to the toxic diatom *Nitzschia pungens f. multiseriata*. *J. Shellfish Res.* **12**. 143 p.
- Rouillon, G., & Navarro, E., 2001. Differential utilization of species of phytoplankton by the mussel *Mytilus edulis*. *International Plankton Symposium, Portugal*. 299-305.

## S

- Sampayo, M.A., Alvito, P., Franca, S., Sousa, I., 1990. Dinophysin spp, toxicity and relation to accompanying species. In: Granéli, E., Sundstrom, B., Edler, L., Anderson, D.M.M Eds, *Toxic Marine Phytoplankton*. Elsevier, New York. 215-220.
- Samsur, M., Yamaguchi, Y., Sagara, T., Takatani, T., Arakawa, O., Noguchi, T., 2006. Accumulation and depuration profiles of PSP toxins in the short-necked clam *Tapes japonica* fed with the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Toxicon* **48**, 323-330.
- Séchet, V., Berard, J., Bohec, M., Bougaran, G., Carré, C., Masselin, P., Truquet, P., 2003. Growth and toxicity of *Alexandrium catenella* from the Thau lagoon (France) cultured in stirred tank bioreactors. In: Villava, A., Reguera, B., Romalde, J.L., Beiras, R (Eds.), *Molluscan Shellfish Safety*. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO.
- Seki, T., Satake, M., Mackenzie, L., Kaspar, H.F., & Yasumoto, T., 1995. Gymnodimine, a new marine toxin of unprecedented structure isolated from New Zealand oysters and the dinoflagellate, *Gymnodinium sp.* *Tetrahedron Letters*. **36**, 7093-7096.
- Seki, T., Satake, M., MacKenzie, A. L., Kaspar, H. F. & Yasumoto, T., 1996. Gymnodimine, a novel toxic imine isolated from the Foveaux Strait oysters and *Gymnodinium sp.* In *Harmful and Toxic Algal Blooms*. Edited by T. Yasumoto, Y. Oshima & Y. Fukuyo. Paris: Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. 495-498.
- Selwood, A.I., Miles, C.O., Wilkins, A.L., Van Ginkel, R., Munday, R., Rise, F., McNabb, P., 2010. Isolation, structural determination and acute toxicity of pinnatoxins E, F and G. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **50**, 6532-6542.
- Shao, P., Chen, Y-Q., Zhou, H., Yuan, J., Qu, L-H., Zhao, D., Lin, Y-S., 2004. Genetic variability in Gymnodiniaceae ITS regions: implication for species identification and phylogenetic analyses. *Mar. Biol.* **144**, 215-224.
- Shaw, B.L. & Battle, H.I., 1957. The gross and microscopic anatomy of the digestive tract of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Can. J. Zool.* **35**, 325-347.
- Shili, A. & Ben Maiz, N., 2006. Diversité spécifique des peuplements phytobenthiques de la lagune de Boughrara (Tunisie méridionale), in: *Proceedings of the second Mediterranean symposium on marine vegetation*, Athens. 242-243.
- Schmitter, R. E., 1979. Temporary cysts of *Gonyaulax excavata*: effects of temperature and light. In Taylor, D. L. and Seliger, H. H. (eds), *Toxic Dinoflagellate Blooms*. Elsevier North Holland, New York. 123 p.
- Shumway, S. E., 1996. Natural Environmental Factors. In: V. S. Kennedy, R. I. E. Newell and A. F. Elbe (eds). *The Eastern Oyster Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant College, College Park, Maryland. 467-513.

- Shumway, S. E., Cucci, T. L., Gainey, L., Yentsch, C. M., 1985. A preliminary study of the behavioral and physiological effects of *Gonyaulax tamarensis* on bivalve molluscs. In Anderson, D. M., White, A. W., Baden, D., (Eds.). *Toxic dinoflagellates*. New York: Elsevier Science publishing. 389-394.
- Shumway, S.E. & Cucci, T.L., 1987. The effects of the toxic dinoflagellate *Protogonyaulax tamarensis* on the feeding and behaviour of bivalve molluscs. *Aquat. Toxicol.* **10**, 9-27.
- Shumway, S.E. & Cembella, A.D., 1993. The impact of toxic algae on scallop culture and fisheries. *Reviews in Fisheries Science.* **1**, 121-150.
- Silverman, H., Lynn, J.W., Beninger, P.G., Dietz, T.H., 1999. The role of latero-frontal cirri in particle capture by the gills of *Mytilus edulis*. *Biological Bulletin*, **197**, 368-376.
- Silvert, W.L. & Cembella, A.D., 1995. Dynamic modeling of phycotoxin kinetics in the blue mussel, *Mytilus edulis*, with implication for other marine-invertebrates. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **52**, 521-531
- Siu, G., Young, M., Chan, D., 1997. Environmental and nutritional factors which regulate population dynamics and toxin production in the dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Hydrobiologia* **352**, 117-140.
- Sleno, L., Windust, A.J., Volmer, D.A., 2004. Structural study of spirolide marine toxins by mass spectrometry. Part I. Fragmentation pathways of 13-desmethyl spirolide C by collision induced dissociation and infrared multiphoton dissociation mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* **378**, 969-976.
- Smayda, T.J., 1997. Harmful algal blooms: Their ecophysiology and general relevance to phytoplankton blooms in the sea. *Limnol. Oceanogr.* **42** (5, Supp2), 1137-1153.
- Smith, J.C., McLachlan, J.L., Cormier, P.G., Pauley, K.E., Bouchard, N., 1993. Growth and domoic acid production and retention by *Nitzschia pungens* forma multiseriata at low temperature; In: *Toxic phytoplankton blooms in the sea*. Smayda T.J., Shimizu. Y. (eds). Elsevier, New York, 631-636.
- Smolowitz, R. and Shumway, E.S., 1997. Possible cytotoxic effects of the dinoflagellate, *Gyrodinium aureolum*, on juvenile bivalve molluscs. *Aquaculture International.* **5**, 291-300.
- Sournia, A., 1995. Red tide and toxic marine phytoplankton of the world ocean: An inquiry into biodiversity. In: Lassus P, Arzul G, Erard-Le Denn E, Gentien P, Marcaillou-Le Baut C (eds) *Harmful Marine Algal Blooms - Proliférations d'algues nuisibles*. Paris France Lavoisier. 103-112.
- Stabell, O.B., Steffenak, I., Aune, T., 1992. An evaluation of the mouse bioassay applied to extracts of 'diarrhoeic' shellfish toxins. *Food Chem. Toxicol.* **30**, 139-144.
- Stauber, L.A., 1950. The fate of india ink injected intracardially into the oyster, *Ostrea virginica* Gmelin, *Biol. Bull.* **98**, 227-241.
- Steidinger, K.A., Tangen, K., 1996. Dinoflagellates. In: Tomas, C.R. (ed) *Identifying marine diatoms and dinoflagellates*. Academic Press. 598 p.
- Stewart, M., Blunt, J. W., Munro, M. H. G., Robinson, W. T., Hannah, D. J., 1997. The absolute stereochemistry of the New Zealand shellfish toxin gymnodimine. *Tetrahedron Letters* **38**, 4889-4890.
- Stewart, J.E., Marks, L.J., Gilgan, M.W., Pfeiffer, E., Zwicker, B.M., 1998. Microbial utilization of the neurotoxin domoic acid: blue mussels (*Mytilus edulis*) and soft shell clams (*Mya arenaria*) as sources of the microorganisms. *Canadian Journal of Microbiology.* **44** (5), 456-464.
- Stirling, D. J., 2001. Survey of historical New Zealand shellfish samples for accumulation of gymnodimine. *New Zealand Journal of Marine and freshwater Research.* **35**, 851-857.
- Stirling, D. and Kharrat, R., 2002. First Evidence on Occurrence of Gymnodimine in Clams from Tunis. *J. Nat. Tox.* **11** (4), 269-275.

- Stobo, L., Scott, A., Lacaze, J-P., Gallacher, S., Smith, E., Quilliam, M., 2005. Liquid chromatography with mass spectrometry—detection of lipophilic shellfish toxins. *J. AOAC INT.* **88**, 1371–1382.
- Sullivan, J.M., Swift, E., Donaghay, P.L., Rines, J.E.B., 2003. Small-scale turbulence affects the division rate and morphology of two redtide dinoflagellates. *Harmful Algae.* **2**, 183–99.
- Sullivan, J.M. & Swift, E., 2003. Effects of small-scale turbulence on net growth rate and size of ten species of marine dinoflagellates. *J. Phycol.* **39**, 83–94.
- Suzuki, T., Yasumoto, T., 2000. Liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry of the diarrhetic shellfish-poisoning toxins okadaic acid, dinophysins-1 and pectenotoxin-6 in bivalve. *J. Chromatogr. A.* **874**, 199–206.
- Svensson, S., 2003. Depuration of Okadaic acid (Diarrhetic Shellfish Toxin) in mussels, *Mytilus edulis* (Linnaeus), feeding on different quantities of nontoxic algae. *Aquaculture.* **218**, 277–291.

## T

- Takada, J., Umemura, N., Suenaga, K., Chou, T., Nagatsu, A., Haino, T., Yamada, K., Uemura, D., 2001a. Pinnatoxins B and C, the most toxic components in the pinnatoxin series from the Okinawan bivalve *Pinna muricata*. *Tetrahedron Letters*, **42**, 3491–3494.
- Takada, N., Umemura, N., Suenaga, K., Uemura, D., 2001b. Structural determination of pteriatoxins A, B and C, extremely potent toxins from the bivalve *Pteria penguin*. *Tetrahedron Letters.* **42**, 3495–3497.
- Takagi, T., Hayashi, K., Itabashi, Y., 1984. Toxic effect of free unsaturated fatty acids in the mouse assay of diarrhetic shellfish toxin by intraperitoneal injection. *Bull. Jpn. Cci. Fish.* **50** (8), 1413–1418.
- Teitelbaum, J.S., Zatorre, R.J., Carpenter, S. 1990. Neurological sequela of domoic acid intoxication due to the ingestion of contaminated mussels. *N. Engl. J. Med.* **322**, 1781–1787.
- Tillmann, U. and John, U., 2002. Toxic effects of *Alexandrium* spp. on heterotrophic dinoflagellates: an allelochemical defence mechanism independent of PSP toxins. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **230**, 47–58.
- Tillmann, U., John, U., Cembella, A.D., 2007. On the allelochemical potency of the marine dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* against heterotrophic and autotrophic protists. *J. Plankton Res.* **29**, 527–543.
- Tindall, D. R., Dickey, R. W., Carlson, R. D., Morey-Gaines, G., 1984. Ciguatoxic dinoflagellates from the Caribbean sea. In *Seafood toxins*. Edited by E. P. Ragelis. ACS Symposium Series 262. Washington, D.C. American Chemical Society. 225–240.
- Torigoe, K., Murata, M., Yasumoto, T., Iwashita, T., 1988. Prorocentrolide, a toxic nitrogenous macrocycle from a marine dinoflagellate, *Prorocentrum lima*. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 7876–7877.
- Turki, S., & Hamza, A., 2001. Le phytoplancton toxique. Effets des changements globaux sur les écosystèmes marins et les habitats côtiers. Colloque PRICAT 6 RIGEDMER, Sousse, mars 2001.
- Turki, S., Harzallah A., Sammari, C., 2006. Occurrence of Harmful dinoflagellates in two different Tunisian ecosystems: the Lake of Bizerte and the gulf of Gabes. *Cahiers de Biologie Marine*, **47**, 253–259.

## U- V-W

- Uemura, D., Chou, T., Haino, T., Nagatsu, A., Fukuzawa, S., Zheng, S., Chen, H., 1995. Pinnatoxin A, a toxic amphoteric macrocycle from Okinawan bivalve *Pinna muricata*. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 1155–1156.

- UNESCO, 2004. Report of the Joint FAO/IOC/WHO ad hoc Expert. Consultation on Biotoxins in Bivalve Molluscs. Oslo, Norway, 26–30
- Urratia, M.B., Iglesias J.I.P., Navarro E., Prou J., 1996. Feeding and absorption in *Cerastoderma edule* under environmental conditions in the Bay of Marennes-Oleron (western France). *J. Mar. Biol., Asso. UK*, **76** (2), 431-450.
- Vale, P., 2004. Differential dynamics of dinophysistoxins and pectenotoxins between blue mussel and common cockle: a phenomenon originating from the complex toxin profile of *Dinophysis acuta*. *Toxicon*. **44**, 123–134.
- Vale, P. & Sampayo, M.A.D., 1999. Comparaison between HPLC and a commercial immunoassay kit for detection of okadaic acid and esters in Portuguese bivalves. *Toxicon*. **37**, 77-1565.
- Van Dolah FM 2000. Marine Algal Toxins: origins, Health Effects, and their increased occurrence. *Environmental Health Perspectives*. **108**, 133-141.
- Van Egmond, H., 2004. Okadaic acid. In: FAO (Ed.), Joint FAO/IOC/WHO ad hoc Expert Consultation on Biotoxins in Bivalve Molluscs, Background Document. FAO, Oslo, Norway. 167-202.
- Vieites, J.M., Leira, F., Botana, L.M., Vieytes, M.R., 1996. Determination of DSP toxins: comparative study of HPLC and bioassay to reduce the observation time of the mouse bioassay. *Arch. Toxicol.* **70**, 440-443.
- Vieites, J.M., Botana, L.M., Vieytes, M.R., Leira, F.J., 1999. Canning process that diminishes paralytic shellfish poison in naturally contaminated mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Journal of Food Protection*. **62** (5), 515-519.
- Villar González, A., Rodríguez-Velasco, M.L., Ben-Gigirey, B., Botana, L.M., 2006. First evidence of spirolides in Spanish shellfish. *Toxicon*. **48**, 1068-1074.
- Walker, T.L, Purton, S., Becker, D.K., Collet, C., 2005. Microalgae as bioreactor. *Plant Cell Rep.* **24**, 629-41.
- Wang, D.Z. & Hsieh, D.P.H., 2002. Effects of different nitrogen/ phosphorus nutrient ratios on the growth and C2 toxin bioproduction in *Alexandrium tamarens* C101. *Mar. Poll. Bull.* **45**, 286-289.
- Weinstein, J.E., 1995. Fine structure of the digestive tubule of the eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin 1791). *J. Shellfish Res.* **14**, 97-103.
- Wells, M. L., Mayer, L.M., Guillard, R.R.L., 1991. Evaluation of iron as a triggering factor for red tide blooms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **69**, 93-102.
- White, A.W., 1976. Growth inhibition caused by turbulence in the toxic marine dinoflagellate *Gonyaulax excavata*. *J. Fish. Res. Bd. Can.* **33**, 2598-2602.
- White, A.W., 1978. Salinity effects on growth and toxin content of *Gonyaulax excavate*, a marine dinoflagellate causing paralytic shellfish poisoning. *J. Phycol.* **14**, 475–479.
- Widdows, J., Moore, M.N., Lowe, D.M., Salkeld, P.N., 1979. Some effect of a dinoflagellate bloom (*Gyrodinium aureolum*) on the mussel, *Mytilus edulis*. *J. mar. boil. Ass.* **59**, 522-524.
- Widdows, J. & Donkin, P., 1992 Mussels and environmental contaminants: bioaccumulation and physiological aspects. In: Gosling, E (ed) *The Mussel 'Mytilus edulis': Ecology, Physiology, Genetics, and Culture*, Elsevier, Amsterdam. 383-424.
- Wikfors, G.H. & Smolowitz, R.M., 1993. Detrimental effects of a *Prorocentrum* isolate upon hard clams and bay scallops in laboratory feeding studies. In Smayda, T.J., Shimizu, Y., eds., *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*. 447-452.
- Wikfors, G.H. & Smolowitz, R.M., 1995. Experimental and histological studies of four lifehistory stages of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, exposed to a cultured strain of the dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. *Biological Bulletin*. **188**, 313-328.
- Wildish, D., Lassus, P., Martin, J., Saulnier, A., Bardouil, M., 1998. Effect of the PSP-causing dinoflagellate, *Alexandrium sp.*, on the initial feeding response of *Crassostrea gigas*. *Aquat. Living Resour.* **11**, 35–43.

- 
- Wohlgeschaffen, G.D., Mann, K.H., Subba Rao, D.V., Pocklington, R., 1992. Dynamics of the phycotoxin domoic acid: accumulation and excretion in two commercially important bivalves. *J. Appl. Phycol.* **4**, 297-310.
- Woloszynska, J. & Conrad, W., 1939. Pyrodinium phoneus n. sp., agent de la toxicité des moules du canal maritime de Bruges à Zeebrugge. *Bulletin de Museum Royal d'Histoire Naturelle de Belgique.* **15**, 1-5.
- Yasumoto, T., Oshima, Y., Yamaguchi, M., 1978. Occurrence of a new type of shellfish poisoning in Tohoku district. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries.* **44**, 1249-1255.

---

# ANNEXE



## Annexe 1-A: Milieu de culture f/2 (Guillard & Ryther 1962, Guillard 1975)

### 1- Eléments majeurs

Quantité	Composant	Solution stock	Concentration Molaire finale au niveau du milieu
1 mL	NaNO <sub>3</sub>	75 g/L dH <sub>2</sub> O	8.83 x 10 <sup>-4</sup> M
1 mL	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	5 g/L dH <sub>2</sub> O	3.63 x 10 <sup>-5</sup> M

Ajouter 1 ml de chaque solution à un litre d'eau de mer filtrée.

### 2- Solution métallique

Quantité	Composant	Solution stock	Concentration Molaire finale au niveau du milieu
3.15 g	FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	-	1 x 10 <sup>-5</sup> M
4.36 g	Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O	-	1 x 10 <sup>-5</sup> M
1 mL	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	9.8 g/L dH <sub>2</sub> O	4 x 10 <sup>-8</sup> M
1 mL	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	6.3 g/L dH <sub>2</sub> O	3 x 10 <sup>-8</sup> M
1 mL	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	22.0 g/L dH <sub>2</sub> O	8 x 10 <sup>-8</sup> M
1 mL	CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	10.0 g/L dH <sub>2</sub> O	5 x 10 <sup>-8</sup> M
1 mL	MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	180.0 g/L dH <sub>2</sub> O	9 x 10 <sup>-7</sup> M

Ajouter 1 ml de la solution trace métallique à un litre d'eau de mer filtrée.

### 3-Solution de vitamine

Quantité	Composant	Solution stock	Concentration Molaire finale au niveau du milieu
1 mL	Vitamin B <sub>12</sub> (cyanocobalamin)	1.0 g/L dH <sub>2</sub> O	1 x 10 <sup>-10</sup> M
10 mL	Biotin	0.1 g/L dH <sub>2</sub> O	2 x 10 <sup>-9</sup> M
200 mg	Thiamine · HCl	-	3 x 10 <sup>-7</sup> M

Ajouter 0.5 ml de vitamine à un litre d'eau de mer filtrée.

## Annexe 1-B: Milieu de culture L1 (Guillard and Hargraves 1993)

### 1- Eléments majeurs

Quantité	Composant	Solution stock	Concentration Molaire finale au niveau du milieu
1 mL	NaNO <sub>3</sub>	75 g/L d'H <sub>2</sub> O	8.83 x 10 <sup>-4</sup> M
1 mL	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	5 g/L d'H <sub>2</sub> O	3.63 x 10 <sup>-5</sup> M
1 mL	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> 9 H <sub>2</sub> O	30.00 g/L d'H <sub>2</sub> O	1.06 x 10 <sup>-4</sup> M

Ajouter 1 ml de chaque solution à un litre d'eau de mer filtrée.

### 2- Solution métallique

Quantité	Composant	Solution stock	Concentration Molaire finale au niveau du milieu
1 mL	H <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	1.29 g/L d'H <sub>2</sub> O	1 x 10 <sup>-8</sup> M
3.15 g	FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	-	1 x 10 <sup>-5</sup> M
4.36 g	Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O	-	1 x 10 <sup>-5</sup> M
1 mL	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	2.50 g/L dH <sub>2</sub> O	1 x 10 <sup>-8</sup> M
1 mL	NiSO <sub>4</sub> · 6H <sub>2</sub> O	2.63 g L <sup>-1</sup> dH <sub>2</sub> O	1 x 10 <sup>-8</sup> M
1 mL	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	23.0 g/L dH <sub>2</sub> O	8 x 10 <sup>-8</sup> M
1 mL	CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	11.9 g/L dH <sub>2</sub> O	5 x 10 <sup>-8</sup> M
1 mL	MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	180.0 g/L dH <sub>2</sub> O	9 x 10 <sup>-7</sup> M
1 mL	K <sub>2</sub> CrO <sub>4</sub>	1.94 g/L dH <sub>2</sub> O	1 x 10 <sup>-8</sup> M
1 mL	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	19.9 g L <sup>-1</sup> dH <sub>2</sub> O	8.22 x 10 <sup>-8</sup> M
1 mL	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	1.84 g L <sup>-1</sup> dH <sub>2</sub> O	1 x 10 <sup>-8</sup> M

Ajouter 1 ml de la solution trace métallique à un litre d'eau de mer filtrée.

### 3-Solution de vitamine

Quantité	Composant	Solution stock	Concentration Molaire finale au niveau du milieu
1 mL	Vitamin B <sub>12</sub> (cyanocobalamin)	1.0 g/L dH <sub>2</sub> O	1 x 10 <sup>-10</sup> M
10 mL	Biotin	0.1 g/L dH <sub>2</sub> O	2 x 10 <sup>-9</sup> M
200 mg	Thiamine · HCl	-	3 x 10 <sup>-7</sup> M

Ajouter 0.5 ml de vitamine à un litre d'eau de mer filtrée.

## Annexe 1-C: Protocole de préparation de l'extrait de terre (Protocole du CMAR modifié)

La terre doit être collectée à partir d'un environnement naturel riche en éléments nutritifs. Aucun fongicides, insecticides, engrais de jardin ou autres composés nocifs devraient être présents. La terre collectée ne doit pas être stockée ou traitée dans le laboratoire de culture des algues, car elle peut être une importante source de contamination par des micro-organismes indésirables. La terre utilisée doit être gardé à sec et loin de la lumière à température ambiante.

Pour préparer l'extrait de terre :

1. Tamiser le sol à sec : une fois à travers un tamis grossier (> et une fois à travers une passoire fine (1mm de maille).
2. Mélanger 1 kg de terre dans 2 litres d'eau distillée.
3. Autoclaver pendant 60 minutes à 121 ° C et laisser refroidir pendant la nuit.
4. Filtrer à travers du coton absorbant emballé dans la tige d'un entonnoir en verre.
5. Centrifuger à 5000 tr / min pendant 20 minutes dans des tubes de 45 mL polyéthylène et recueillir le surnageant.
6. Récupérer les surnageants dans une 100 bouteille et filtrer la solution à 0.22µm
7. Diviser la solution totale dans des tubes de 15 mL et envelopper par la parafilm pour éviter la contamination atmosphérique.
8. Congeler les tubes à - 4 ° C.

## Annexe 2 : Protocole de préparation des photobioréacteurs pour les cultures d'*A. ostenfeldii*

### Maintenance des bioréacteurs

- S'assurer que les photobioréacteurs sont correctement montés et que les différentes pièces en plexiglass ont été serrées avec une noix de silicone pour l'étanchéité.
- Nettoyer les bioréacteurs au détergent doux puis avec un dégraissant spécial ALTUGLASS.
- Désinfecter le volume interne avec une solution d'acide peracétique de 5mL/L. Utiliser une pompe et une canne pour injecter tout liquide.
- Rincer à l'eau de mer filtrée plusieurs fois (x2) afin d'éliminer les traces d'acide et d'éviter un choc pH.

### Inoculation

- Préparer le milieu de culture (L1+Extrait de terre) avec de l'eau de mer filtrée.
- Utiliser un ballon de verre 10 L autoclavé à sec et rincé préalablement à l'eau de mer filtrée pour inoculer le photobioréacteur de 100L
- Inoculer à l'aide d'une canne et d'une pompe

### Réglage des instruments physico-chimiques

- Lancer le logiciel PHYSIO<sup>®</sup> (photobioréacteurs de 2.3 L) et le logiciel LabVIEW<sup>®</sup> (photobioréacteur de 100 L)
- Etalonner à l'aide de solutions tampons de 7 et de 10 les sondes pH et vérifier l'étalonnage des sondes température. Régler l'arrivée d'air et l'agitation des palmes (10 tr/min pour le photobioréacteur de 2.3 L et 50 tr/min pour le photobioréacteur de 100 L).
- Fixer la valeur seuil pour la régulation du pH (pH=8.5)

## Annexe 3 : Cultures d'*A. ostensfeldii* en photobioréacteurs de 2.3 L et 100 L.



**Photobioréacteur de 100 L**

Régulation pH = 8.5





Circuit de filtration de l'eau de mer (0.22 µm)

Agitation des palmes 50 tr min<sup>-1</sup>

Pompe péristaltique pour récupération de la culture

Pompes STEPDOS® pour injection du milieu  
d = 0.2 ml min<sup>-1</sup>

Réserve pour milieu nutritif (L1 + 3 mL extrait de terre L<sup>-1</sup>)

 = 180 µmol/m<sup>2</sup>/s  
 = 08h/16h  
 = 35 psu  
 = 18°C



**Photobioréacteur de 2 L**

Seringue pour prélèvement

Régulation pH = 8.4

Sonde température

Bullage et régulation CO<sub>2</sub>

Agitation des palmes 20 tr min<sup>-1</sup>

## Annexe 4 : Plan factoriel complet: conditions expérimentales

Facteurs	$-\alpha$	-1	0	1	$\alpha$	Unité
Température	13	15.83	20	24.16	27	°C
Irradiance	50	257	560	863	1070	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
pH	7	7.3	7.75	8.2	8.5	-

Numéro cuve	Température	Irradiance	pH
1	0	0	0
2	-1	1	1
3	1	1	-1
4	-1	-1	1
5	1	-1	-1
6	$-\alpha$	0	0
7	-1	1	-1
8	0	0	$\alpha$
9	$\alpha$	0	0
10	-1	-1	-1
11	0	0	0
12	1	1	1
13	0	0	$-\alpha$
14	1	-1	1
15	0	$-\alpha$	0
16	0	0	0
17	0	$\alpha$	0

Points centraux  
Points étoiles  
Plan  $2^k$



Module expérimental

- ▣ Nombre de cuves: 17
- ▣ Volume de culture : 200 ml
- ▣ Milieu de culture L1 + Extrait de terre ( $3 \text{ ml L}^{-1}$ )
- ▣ Croissance cellulaire : Chaque 2 jours
- ▣ Toxicité par cellule ( $\text{pg cell}^{-1}$ ) :  $J_0$ ,  $J_7$  &  $J_{14}$

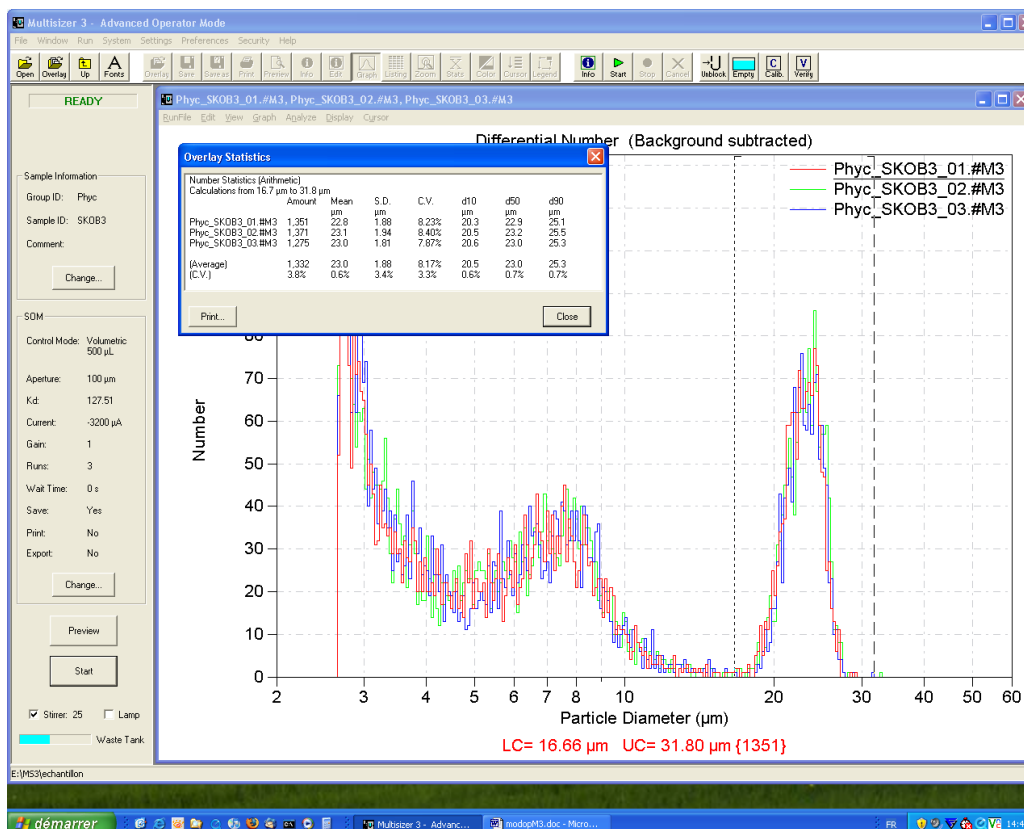


## Annexe 5 : Comptage cellulaire : Multisizer 3 (Beckman Coulter).

Le comptage des cellules permet de suivre la cinétique de croissance des cultures et la biomasse produite. Outre la quantification de la concentration finale obtenue en phase de plateau, les comptages permettent de détecter d'éventuels problèmes comme, par exemple, une contamination par un micro-organisme. Pour réaliser ce comptage, on prélève un volume de 1 à 5 mL à partir de la culture et on applique la dilution nécessaire afin de ne pas saturer le détecteur du compteur de particule

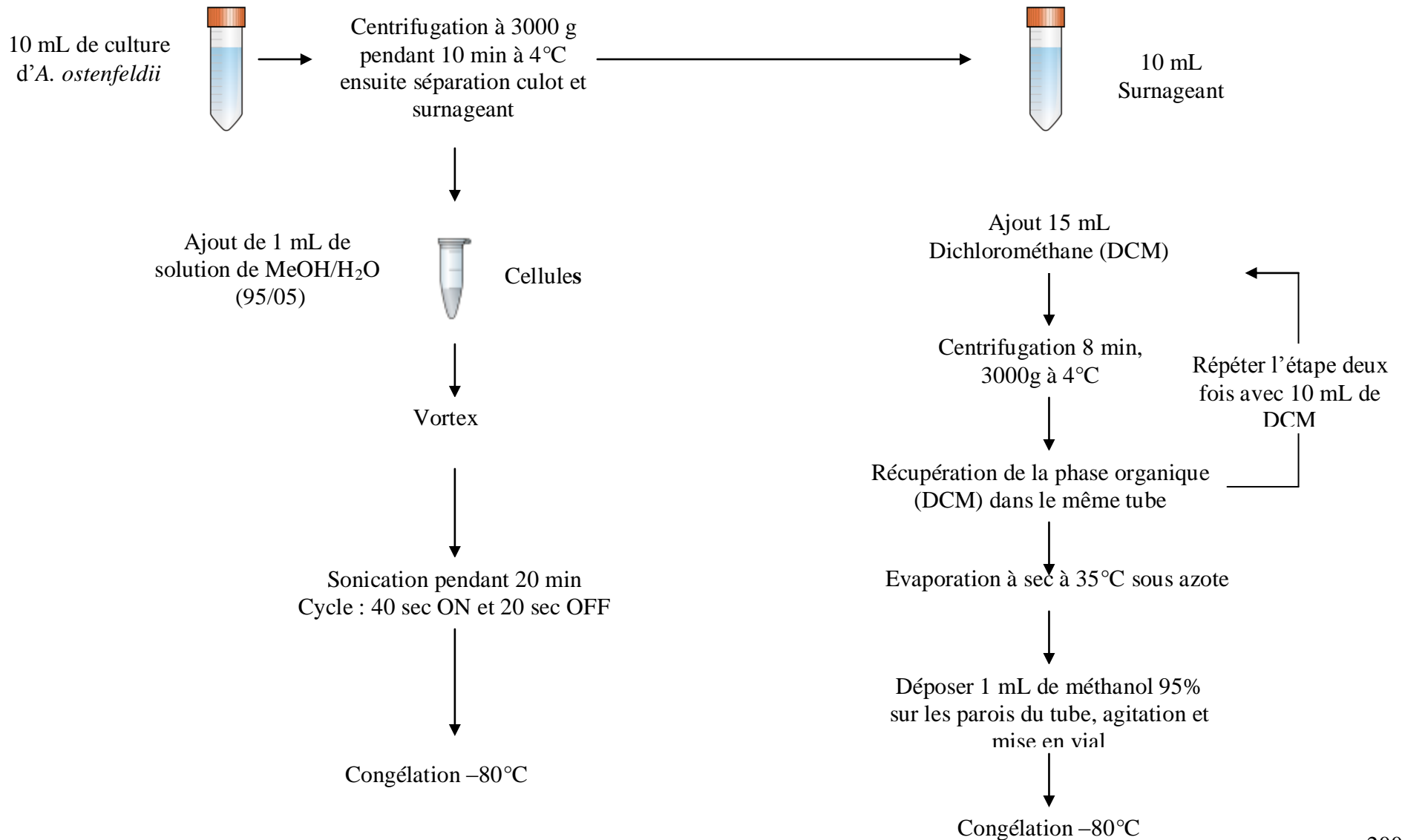
Avant de lancer le comptage, il faut vérifier le diamètre de la sonde du « cell counter » et la méthode. Les trois distributions de taille correspondant aux trois mesures effectuées sont placées sur un même graphique afin de sélectionner l'intervalle autour du pic.

Le comptage cellulaire permet le calcul du taux de croissance spécifique ( $\mu$ ) selon l'expression :  $\mu = (\ln X_t - \ln X_0)/t$ , avec  $X_0$  la concentration initiale et  $X_t$  la concentration cellulaire après un temps  $t$





## Annexe 6 : Protocole d'extraction des spiroïdes à partir des cellules et du milieu de culture d'*Alexandrium ostenfeldii*



## Annexe 7 : Analyse CL-SM/SM d'un extrait d'*Alexandrium ostenfeldii* en photobioréacteur

Les expériences sont réalisées sur un spectre de masse Q TRAP<sup>®</sup> API 4000 couplée à une chaîne Shimadzu LC-20 AD XR<sup>®</sup> qui inclut des réservoirs à solvants, un dégazeur, une pompe binaire et un passeur automatique réfrigéré La méthode utilisée est en mode positif MRM (Multy Reaction Monitoring), elle permet de sélectionner les ions choisis, de les fragmenter et de récupérer les ions fils. Cette méthode permet de confirmer l'identité du composé recherché.

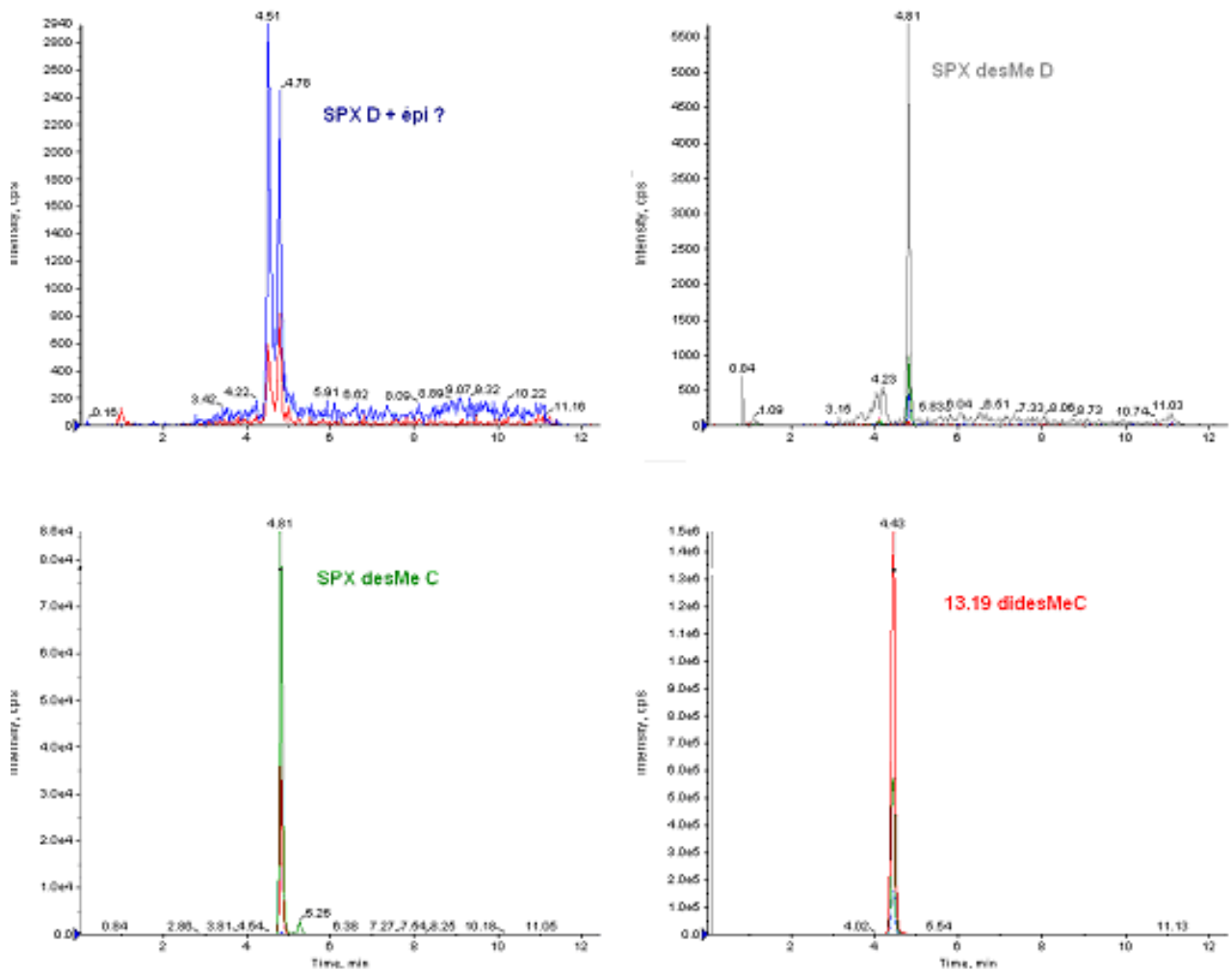
Les transitions m/z choisies sont :

SPX-D 708.5 → 708.5 (ion parent), le 708.5 → 690.5 et 708.5 → 164 (ion fils)

13-desMeC 692.7 → 692.7 (ion parent), le 692.7 → 444.3 et 692.7 → 444.3 (ion fils)

13,19-didesMeC 678.5 → 678.5 (ion parent), le 678.5 → 660.4, 678.5 → 642.4 et 678.5 → 430.5 (ion fils)

13-desMeD 694.5 → 694.5 (ion parent), le 694.5 → 444.3 et 694.5 → 164.5 (ion fils)



Chromatogramme analytique obtenu en CL-MS/MS mode positif d'un extrait de *Alexandrium ostenfeldii*

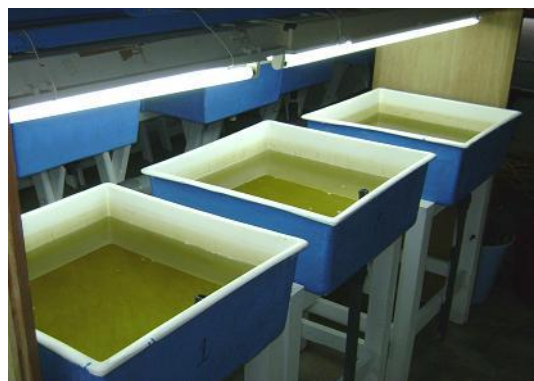
## Annexe 8 : Culture de *Karenia selliformis* en gaine horizontale et en bac.



Robinet de régulation du débit d'air






Seringue pour prélèvement

1/ Culture en gaine de 40 L



2/ Culture en bac de 40 L

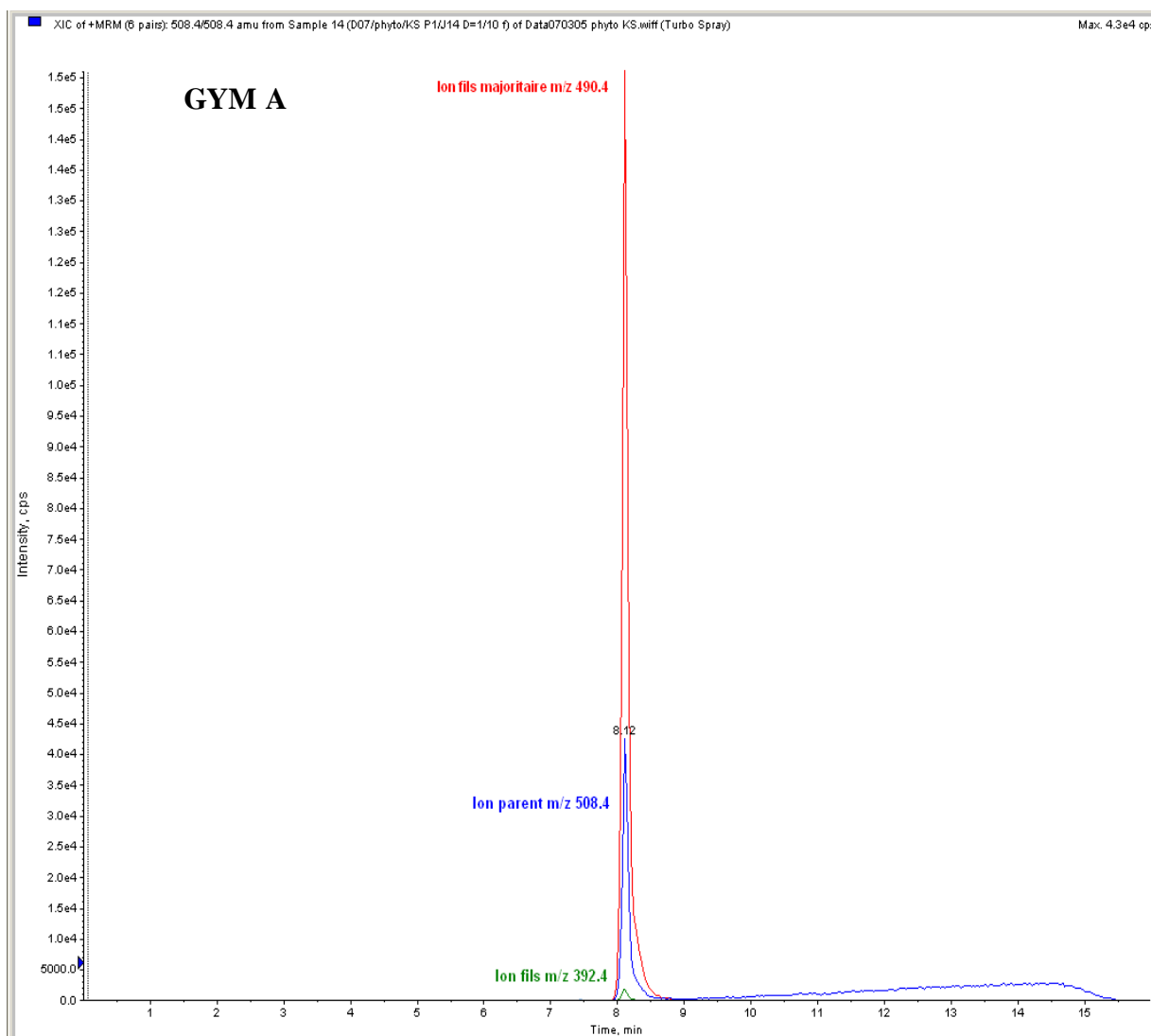
### Conditions de cultures

 = 145  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$   
 /  = 12h/12h  
 = 35 psu  
 = 20°C

## Annexe 9 : Analyse CL-SM/SM d'un extrait de culture de *Karenia selliformis*

Les expériences sont réalisées sur un spectre de masse PE-Sciex API-2000 triple quadripôle couplée à un chaîne HPLC Agilent série 1100 qui inclut des réservoirs à solvants, un dégazeur, une pompe binaire et un passeur automatique réfrigéré. La méthode utilisée est en mode positif MRM (Multy Reaction Monitoring), elle permet de sélectionner les ions choisis, de les fragmenter et de récupérer les ions fils. Cette méthode permet de confirmer l'identité du composé recherché.

Les transitions  $m/z$  choisies sont  $508.4 \rightarrow 508.4$  (ion parent), le  $508.4 \rightarrow 490.4$  et  $508.4 \rightarrow 392.4$

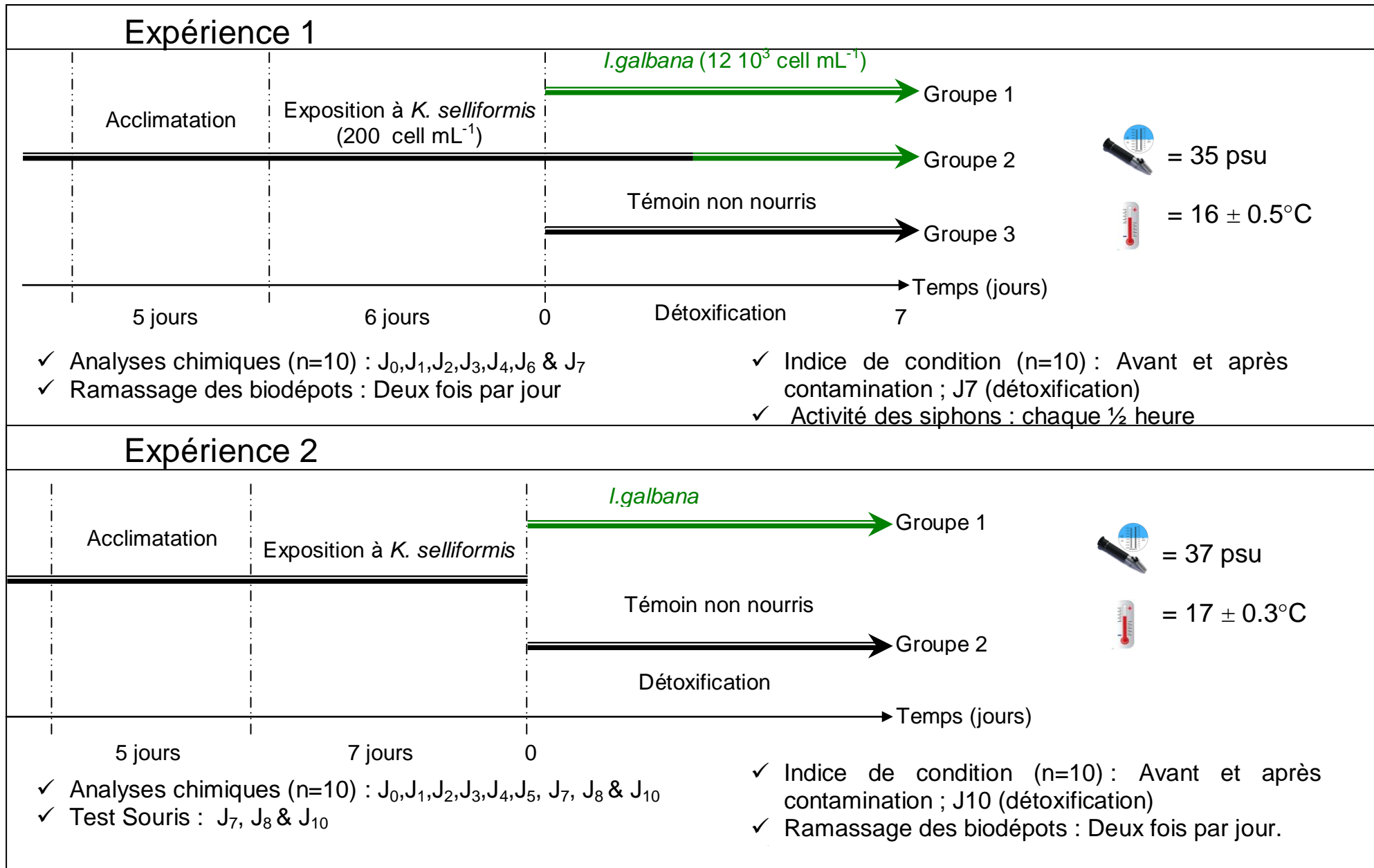


**Chromatogramme analytique obtenu en CL-MS/MS mode positif d'un extrait de *Karenia selliformis***



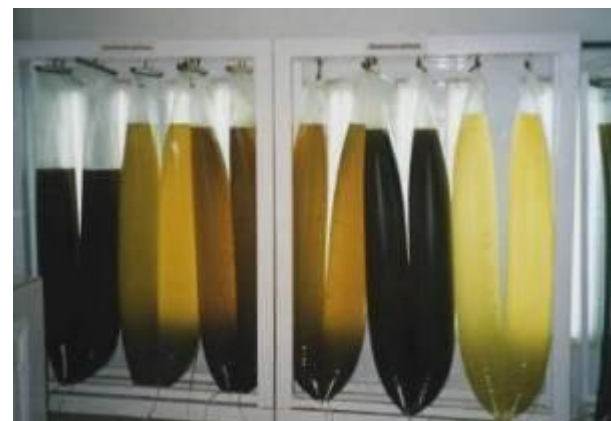
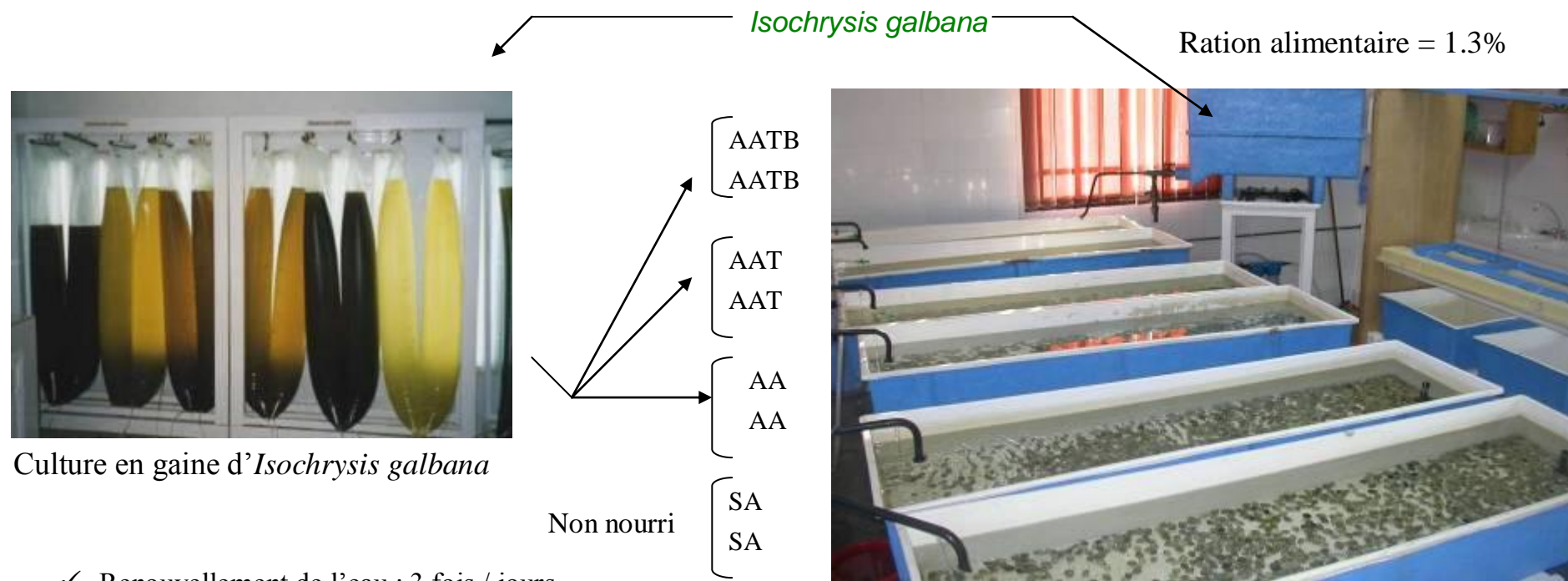
# Annexe 10 : Contamination et détoxification de la palourde par *K. selliformis* : conditions expérimentales et paramètres étudiés

ANNEXE



# Annexe 11 : Détoxification des palourdes contaminées naturellement : module, conditions expérimentales et paramètres étudiés

ANNEXE



Culture en gaine d'*Isochrysis galbana*

✓ Renouvellement de l'eau : 3 fois / jours.

Deux bacs (SA) maintenus en circuit ouvert sans ajout de micro algues

Deux bacs (AA) sont alimentés et maintenus en circuit ouvert dès l'arrivée des palourdes

Deux bacs (AA-T) sont alimentés, et maintenus en circuit ouvert, après stockage des palourdes à sec pendant 48 heures à 15°C (température ambiante).

Deux bacs (AA-TB) sont alimentés et maintenus en circuit ouvert, après stockage des palourdes à sec 8°C pendant 48 heures

Suivi	Nombre de palourde	Jour d'échantillonnage
Analyses chimiques	10	J <sub>0</sub> , J <sub>1</sub> , J <sub>2</sub> , J <sub>3</sub> , J <sub>8</sub> , J <sub>12</sub> , J <sub>15</sub> , J <sub>17</sub> & J <sub>39</sub>
Histologie	10	J <sub>0</sub> , J <sub>4</sub> , J <sub>8</sub> , J <sub>12</sub> , J <sub>15</sub>
Test souris	2 Kg	J <sub>10</sub> , J <sub>12</sub> , J <sub>15</sub> , J <sub>17</sub> , J <sub>19</sub> & J <sub>39</sub>
Indice de condition	15	Chaque 4 jours

## Annexe 12 : Contamination et détoxification des huîtres par *A. ostensfeldii* : Module, conditions expérimentales et paramètres étudiés

### Conditions expérimentales

	RC1	RC2
Nombre de huître	45	45
Contamination (4 jours)	<i>A. ostensfeldii</i> 200 Cell.ml <sup>-1</sup>	
Détoxification (7 jours)	<i>I. Galbana</i> 12.10 <sup>3</sup> Cell.ml <sup>-1</sup>	Non nourri

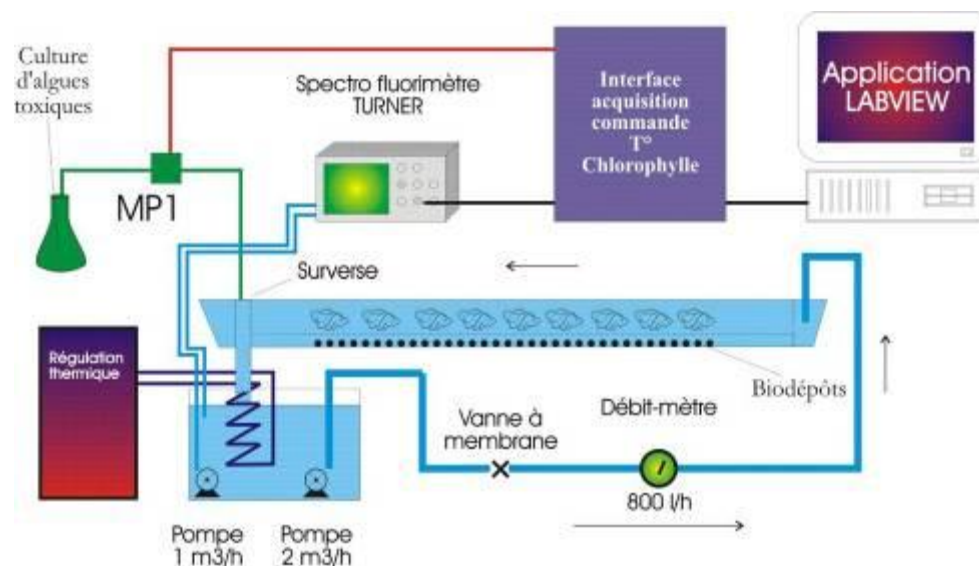
✓ Renouvellement de l'eau : Chaque 2 jours



= 16 ± 0.5°C



= 35 psu

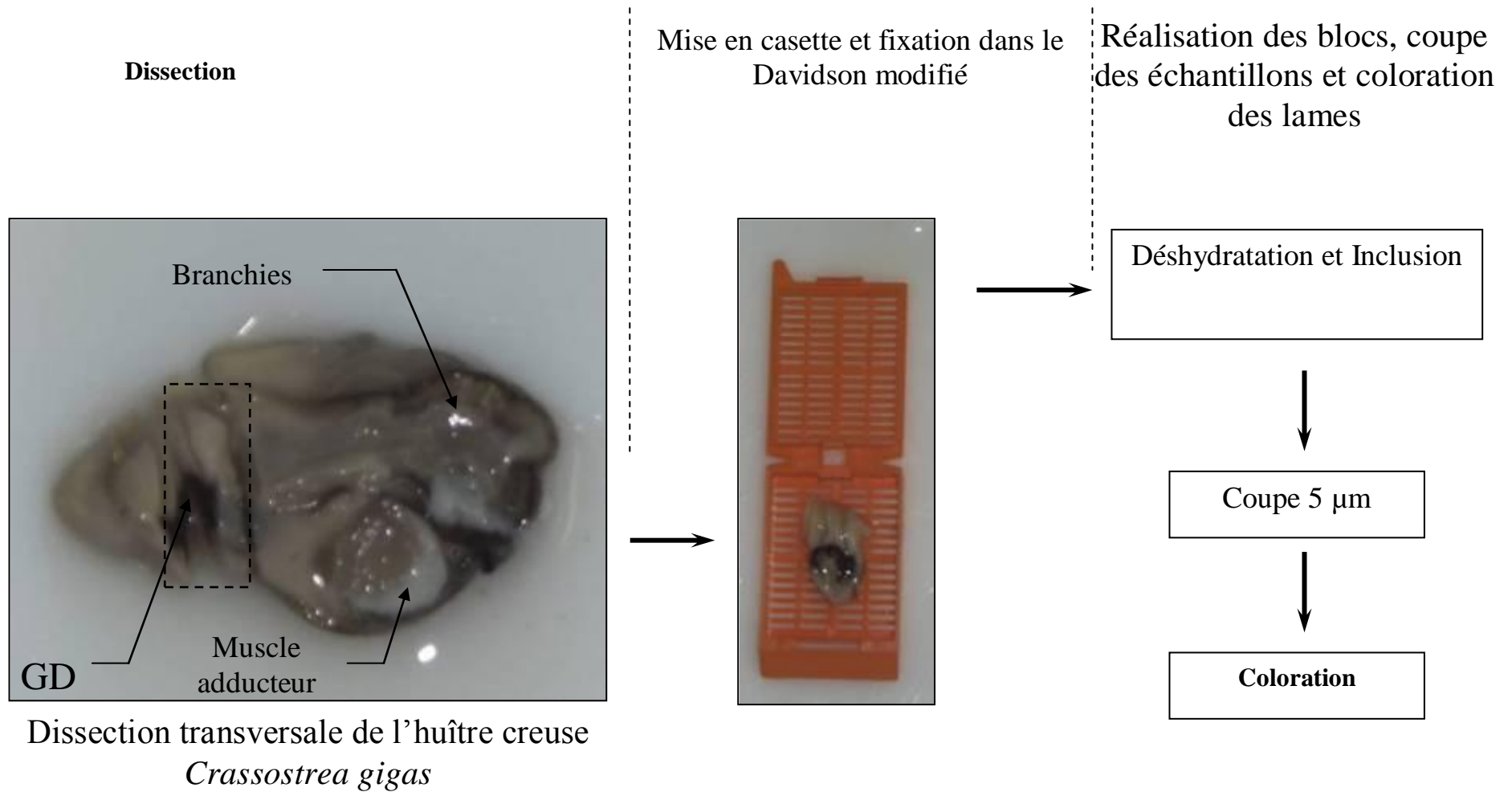


Module expérimental : circuit fermé

Suivi	Nombre d'huîtres	Jour d'échantillonnage
Analyses chimiques	10	J <sub>1</sub> , J <sub>4</sub> & J <sub>7</sub> (pour les deux conditions lors de la détoxification)
Histologie	10	Témoin (avant contamination), J <sub>0</sub> (après contamination et J <sub>7</sub> (en fin de détoxification pour les deux conditions.
Ramassage des biodépôts	-	2 fois par jours (contamination et détoxification)
Activité valvaire	-	Chaque 1/2 heure (contamination et détoxification)



## Annexe 13-A : Différentes étapes de réalisation des lames histologiques



## Annexe 13-B: Protocole d'inclusion en paraffine et coloration des lames histologiques

### Déshydratation et inclusion en paraffine

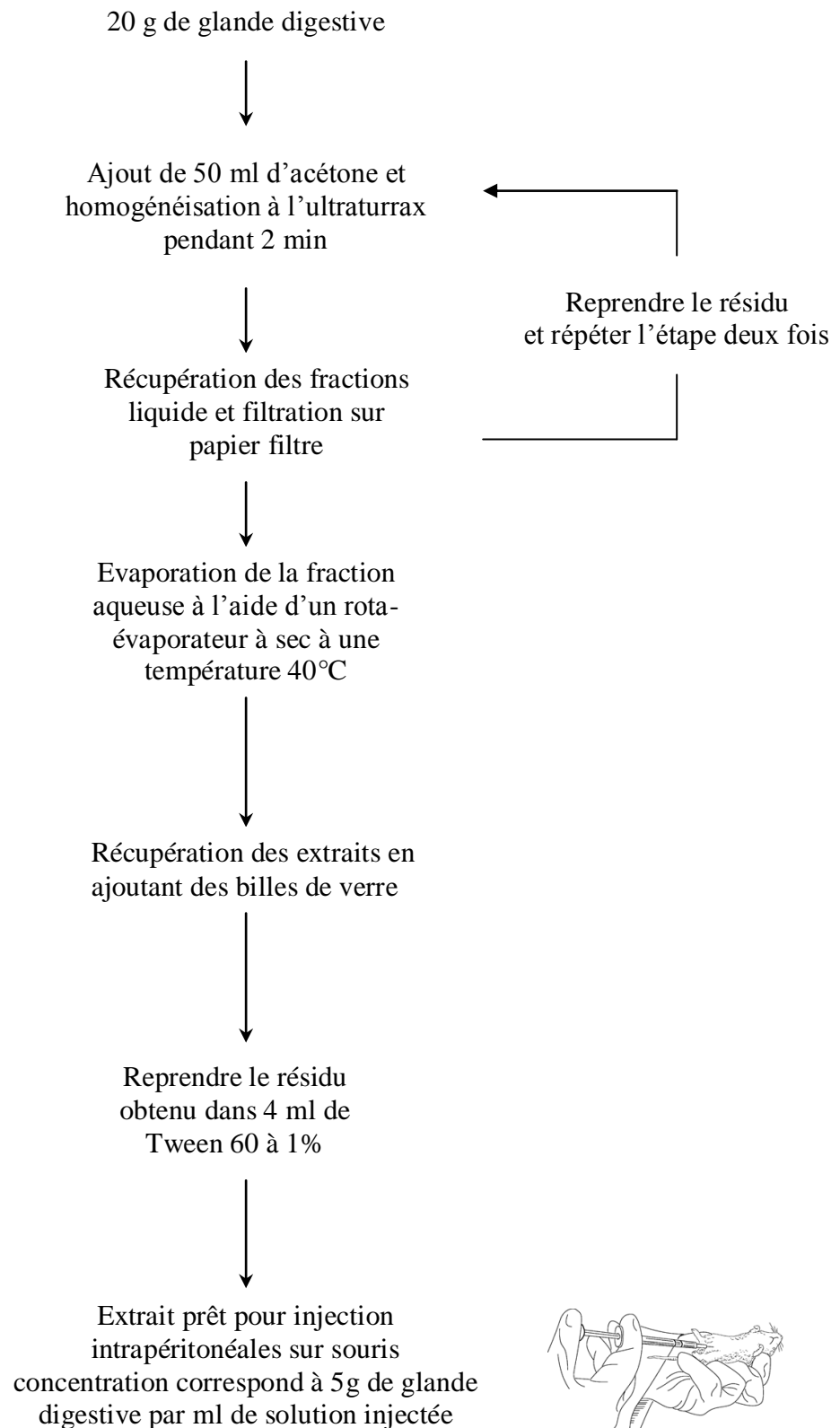
Étapes	Solvants	Temps (heures)
<b>Déshydratation</b>	Ethanol 80%	1
	Ethanol 95 %	2
	Ethanol 95 %	2
	Ethanol 95 %	1
	Ethanol 100 %	2
	Ethanol 100 %	2
	Ethanol 100 %	1
	Claral	1
	Claral	2
<b>Inclusion</b>	Paraffine	2
	Paraffine	2

### Coloration des lames

Étape	Solvants	Temps (minutes)
<b>Hydratation</b>	Claral	5
	Claral	5
	Ethanol 100°	5
	Ethanol 100°	5
	Ethanol 96°	5
	Ethanol 70°	5
	Eau distillée	5
<b>Coloration</b>	Hématoxyline de Harris	1 à 3 min
<b>e.g.</b>	Eau courante	3
	Eau acétifiée	2
<b>Coloration</b>	Eosine Y	3
<b>Déshydratation</b>	Ethanol 96°	5
	Ethanol 100°	5
	Claral	5
	Claral	5

---

## Annexe 14: Protocole de réalisation du test souris DSP d'après Yasumoto (1978).



---

## RESUME

Cette étude a pour objectif de maîtriser les conditions de culture et de production toxinique chez *Karenia selliformis* et *Alexandrium ostenfeldii* dans le but de réaliser des contaminations expérimentales indépendamment du caractère aléatoire des proliférations toxiques en zones côtières. Ce travail vise également à étudier l'impact de l'alimentation sur la détoxification artificielle de la palourde *Ruditapes decussatus* contaminée par des gymnodimines et de l'huître *Crassostrea gigas* contaminées par des spirolides et enfin d'étudier l'impact physiologique de ces micro-algues toxiques au niveau des organes accumulateurs des coquillages.

Dans un premier temps, il a été mis en évidence que les performances de croissance de *K. selliformis* (taux de croissance et concentration maximale) sont obtenues à une température de 22°C pour une salinité de 36 psu en utilisant le milieu f/2 alors que celles d'*A. ostenfeldii* sont obtenues à une température de 16°C pour une salinité de 35 psu en utilisant le milieu L1. Le contenu en gymnodimine dans les cellules de *K. selliformis* augmente en fonction de l'âge de la culture alors que le contenu en spirolide diminue au cours de la croissance cellulaire d'*A. ostenfeldii* plus particulièrement lors de la culture en photobioréacteur de 100 l.

Dans un deuxième temps, des études expérimentales portant sur l'interaction des micro-algues toxiques avec les mollusques ont permis d'apporter des connaissances nouvelles sur le devenir des imines cycliques après contamination et lors de la détoxification. Il a ainsi été mis en évidence i) une accumulation majoritaire des GYMs et des SPXs au niveau des glandes digestives des palourdes et des huîtres ii) une accélération des cinétiques de détoxification lors de l'ajout de l'alimentation.

Dans un troisième temps, les essais portant sur la contamination de *C. gigas* par *A. ostenfeldii* ont permis de déterminer i) une altération des diverticules digestifs consistant en une réduction de l'épaisseur de la paroi épithéliale et en une augmentation de la surface de la lumière des diverticules digestifs ii) une réaction inflammatoire dans la glande digestive de certains individus contaminés se caractérisant par une agglutination massive d'hémocytes autour de différents organes de la glande digestive: l'estomac, l'intestin ainsi que les conduits et tubules digestifs. Dans le cas des contaminations naturelles et expérimentales des palourdes les analyses histologiques réalisées n'ont pas permis de mettre en évidence des signes d'altération de la glande digestive comme dans le cas des huîtres contaminées par *A. ostenfeldii*.

**Mots clés :** *Karenia selliformis*, gymnodimine, *Ruditapes decussatus*, *Alexandrium. ostenfeldii*, spirolide, *Crassostrea gigas*, culture, détoxification, histologie.

## ABSTRACT

This study aimed to determine the optimal conditions of growth and toxin production in *Karenia selliformis* and *Alexandrium ostenfeldii* in order to produce cells at a high concentration with known toxicity to perform further contamination and detoxification trial on edible shellfish. Moreover, this work aims to study the impact of non-toxic microalga on the detoxification kinetics of clam *Ruditapes decussatus* contaminated by gymnodimines and oyster *Crassostrea gigas* contaminated by spirolides. The final goal of this study is to determine the physiological impact of toxic microalgae in the shellfish tissues.

Initially, results revealed that the growth performance of *K. selliformis* (growth rate and maximum concentration) is obtained at a temperature of 22°C and at a salinity of 36 psu when using the f/2 medium, while those of *A. ostenfeldii* are obtained at a temperature of 16°C and at a salinity of 35 psu using the L1 medium. Gymnodimine concentration increases with the age of the culture of *K. selliformis* while spirolide concentration decreases during cell growth of *A. ostenfeldii* especially during the culture in a photobioreactor of 100 l.

Secondly, the experimental studies focused on the interaction between toxic micro-algae with molluscs bivalves. The results revealed i) a major accumulation of GYMs and SPXs in digestive gland of clams and oysters ii) a rapid detoxification of contaminated shellfish when adding food.

Finally, this study addressed an important issue on the impact of toxic algae on shellfish. The exposure to *A. ostenfeldii* showed i) a decrease in the digestive gland tubule thickness and the percentage of active digestive tubules ii) an inflammatory response consisting of hemocyte infiltration and diapedesis into the intestinal tract of the oysters. Concerning the natural and experimental contamination of clams, histological analysis did not reveal any alteration of the digestive gland as demonstrated in oysters contaminated by *A. ostenfeldii*.

**Keywords:** *Karenia selliformis*, gymnodimine, *Ruditapes decussatus*, *Alexandrium. ostenfeldii*, spirolide, *Crassostrea gigas*, culture, detoxification, histology.