

DIRECTION DE L'ENVIRONNEMENT ET
DE L'AMÉNAGEMENT DU LITTORAL

Journées REPHY 1996

compte-rendu détaillé

Catherine BELIN

DEL / PN / Nantes

Il existe une version abrégée
de ce compte-rendu

JOURNÉES REPHY

1er au 3 avril 1996

SOMMAIRE

1. Les réseaux de surveillance du phytoplancton et des phycotoxines à l'étranger, en particulier en Europe : fonctionnement, méthodes utilisées, gestion des épisodes toxiques, diffusion de l'information. Comparaison avec le REPHY : points faibles et points forts.

Catherine BELIN

2. Conclusions du comité d'évaluation du PNEAT (Programme National Efflorescences Algales Toxiques) en janvier 1996. Intégration à prévoir dans REPHY de la "surveillance des phytoflagellés potentiellement toxiques" assurée jusqu'à maintenant dans le cadre du PNEAT.

Claude ALZIEU

3. Stratégie 'flore totale' (dénombrement de toutes les espèces phytoplanctoniques). Critères de choix pour une réduction des points échantillonnés pour ce paramètre.

Benoit BELIAEFF et Catherine BELIN

4. Point sur les méthodes utilisées dans REPHY (prélèvements, observations phytoplanctoniques, analyses toxicologiques). Mise en oeuvre d'une remise à jour des descriptions de méthodes.

Catherine BELIN

5. Taxinomie du phytoplancton / assurance qualité : bilan provisoire de la formation dispensée par Elisabeth NEZAN, perspectives.

Elisabeth NEZAN

6. Traitement des données populations phytoplanctoniques en Languedoc-Roussillon : communication présentée au colloque PNOG / séries temporelles à Arcachon en février 1995.

Benoit BELIAEFF

7. Présentation du travail de thèse en cours sur les variabilités temporelles et spatiales d'une micro-algue toxique *Dinophysis* spp. Impact sur sa stratégie d'échantillonnage.

Dominique SOUDANT

8. Présentation du **rapport annuel** du laboratoire côtier de Nantes **pour les résultats REPHY.**

Hubert GROSSEL

9. Présentation du poster '**Suivi du phytoplancton en rade de Brest**'

Elisabeth NEZAN

10. Premiers résultats des **campagnes DINOSEINE** (*Dinophysis* en baie de Seine)

Patrick GENTIEN

11. **Épisodes toxiques à *Gymnodinium cf. nagasakiense*** en juin – juillet 1995.

Jacky Chauvin, Hubert Grossel, Elisabeth Nezan

12. Activités du **CNEVA / LCHA** relatives aux phycotoxines, collaboration avec le laboratoire PN.

Martial LEDOUX

13. Mise au point sur les **méthodes d'extraction pour le test souris DSP**

Claire LE BAUT

14. **Test de détection des toxines DSP par cytotoxicité (DRAME)**

- présentation de la calibration du test au laboratoire de Concarneau

Dominique LE GAL

- mise en place d'une étude pilote

Zouher AMZIL

15. Présentation théorique et démonstration du **test hémolytique**, pour la mise en évidence de la production de substances toxiques pour les animaux marins.

Geneviève ARZUL

16. QUADRIGE. Avancement des travaux, compléments d'informations après la première session de formation.

Michel JOANNY

JOURNÉES REPHY 1996

PARTICIPANTS

Nom	Laboratoire	e.mail
Allenou Jean-Pierre	Nantes	jpalleno
Alzieu Claude	D / Issy	calzieu
Amzil Zouher	PN / Nantes	zamzil
Andral Bruno	D / Issy	bandral
Arzul Geneviève	ECP / Brest	garzul
Beliaeff Benoit	QM / Nantes	bbeliaef
Belin Catherine	PN / Nantes	cbelin
Bocquéne Francine	QM / Nantes	fbocquen
Bohec Madeleine	PN / Nantes	mvrignau
Cantin Christian	Arcachon	ccantin
Catherine Martial	QM / Nantes	mcather
Chauvin Jacky	La Trinité sur mer	jchauvin
Convenant Aliette	Saint Malo	rtaraud
De Kergariou Gabriel	La Trinité	cdespino
Deynu Danièle	Arcachon	ftrut
Dimeet Joel	La Trinité	jdimeet
Dumont Françoise	Nantes	fbonneau
Fortune Mireille	Nantes	mfortune
Fouché Dominique	La Tremblade	dfouche
Gentien Patrick	ECP / Brest	pgentien
Grossel Hubert	Nantes	fbonneau
Hébert Pascale	Boulogne	phebert
Hitier Benoit	Boulogne	bhitier
Jeanneret Hélène	Port en Bessin	hjeanner
Joanny Michel	QM / Brest	mjoanny
Lassus Patrick	PN / Nantes	plassus
Le Baut Claire	PN / Nantes	clebaut
Le Gal Dominique	Concarneau	mrivalai
Ledoux Martial	CNEVA / Paris	
Legrand Jacqueline	Port en Bessin	jalegran
Leguay Didier	l'Houmeau	dleguay
Margat Syvie	l'Houmeau	smargat
Masson Daniel	La Tremblade	dmasson
Ménanteau Chantal	Nantes	fbonneau
Mondeguer Florence	PN / Nantes	fmondeg
Neaud-Masson Nadine	Arcachon	nmasson
Nezan Elisabeth	Concarneau	mrivalai

Nom	Laboratoire	e.mail
Pezeron Annie	Nantes	fbonneau
Piclet Guy	Concarneau	mrivalai
Poggi Robert	QM / Nantes	rpoggi
Raffin Bernard	QM / Nantes	braffin
Raguenes Pierre	Concarneau	mrivalai
Ratiskol Gilles	Nantes	gratisko
Rumebe Myriam	Arcachon	frut
Soudant Dominique	QM / Nantes	dsoudant
Thomas Gérard	l'Houmeau	gerthom
Treguier Cathy	La Trinité	ctreguie

– 1 –

Les réseaux de surveillance du phytoplancton
et des phycotoxines à l'étranger,
en particulier en Europe

1. Les réseaux de surveillance du phytoplancton et des phycotoxines à l'étranger, en particulier en Europe.

Les informations présentées proviennent principalement d'un document de la Commission Océanographique Intergouvernementale (COI ou IOC), qui vient d'être publié¹.

Des informations complémentaires sur les méthodes et les seuils relatifs aux phycotoxines, ont également été fournies par Martial LeDoux (CNEVA, voir chapitre 12), suite à une **réunion des laboratoires de référence européens pour les phycotoxines**, en mars 1996 à Vigo (Espagne).

Le document COI est la compilation des réponses à un questionnaire envoyé début 1995 à tous les pays susceptibles d'avoir un système de surveillance des épisodes toxiques liés au phytoplancton en milieu marin. Une synthèse des différentes stratégies et méthodes utilisées pour ce type de surveillance y est réalisée, et quelques programmes nationaux ou régionaux y sont décrits de façon détaillée, dont le réseau français REPHY.

La prochaine action de la COI sur ce thème sera l'organisation d'une **conférence / atelier de travail sur la surveillance du phytoplancton et des phycotoxines et le management des blooms toxiques et nuisibles**, qui aura probablement lieu début 1998, dans un pays encore à définir. Il s'agit de la première conférence internationale entièrement consacrée à ce thème, ce qui est un signe de son importance croissante dans les préoccupations relatives à l'environnement littoral.

LES PROGRAMMES DE SURVEILLANCE DU PHYTOPLANCTON ET DES PHYCOTOXINES CONCERNENT 45 PAYS OU RÉGIONS DANS LE MONDE, DONT 19 EN EUROPE. Les programmes européens sont nationaux à l'exception de l'Espagne, de la Suède et du Royaume Uni.

Un certain nombre d'autres pays sont en train de mettre en oeuvre un réseau de surveillance (Maroc, Tunisie...), et attendent un soutien des pays déjà expérimentés. Un modèle de réseau n'est cependant pas transposable d'un pays à un autre, car plusieurs facteurs entrent en jeu : le type de ressource à surveiller (poissons, coquillages...), la structure de cette ressource (disséminée, concentrée...), les moyens disponibles, le nombre et le type des organismes assurant la coordination, les prélèvements, les analyses, etc.

Les responsables de la mise en oeuvre des programmes de surveillance sont en majorité des institutions gouvernementales ou administratives, mais **DANS QUELQUES PAYS, PLUSIEURS ORGANISATIONS, DONT DES ASSOCIATIONS DE PROFESSIONNELS, COLLABORENT POUR RÉALISER LA SURVEILLANCE EFFECTIVE**, et en financent même une partie (Danemark, Chili...). Le cas du Danemark est particulièrement intéressant, puisque les professionnels effectuent les prélèvements d'eau et de moules, et les envoient à leurs frais aux deux institutions effectuant l'observation du phytoplancton et l'analyse des toxines.

¹ Design and Implementation of some Harmful Algal Monitoring Systems (IOC technical series n°44, UNESCO, 1996).

Tous les réseaux mesurent les deux paramètres phytoplancton et phycotoxines : aucun exemple de surveillance des phycotoxines seules n'existe actuellement.

Les décisions d'interdiction sont souvent basées sur la combinaison des résultats *concentration du phytoplancton* dans l'eau et *toxines* dans les coquillages (pour environ 2/3 des pays). Elles sont très rarement basées sur le seul paramètre phytoplancton (en Europe : l'Angleterre / Pays de Galles), mais assez souvent (1/3 des pays) sur le seul paramètre phycotoxines (en Europe : la France, la Catalogne et l'Ecosse).

Les méthodes d'analyse et les seuils de tolérance des toxines dans les coquillages sont :

- homogènes pour **PSP** : test souris AOAC, 80 µg par 100 g de chair, dans presque tous les pays,
- très variables pour **DSP**, aussi bien pour les méthodes et les seuils que pour l'expression des résultats.

En ce qui concerne l'**ASP (Amnesic Shellfish Poison)**, quatre pays européens ont d'ores et déjà intégré ce paramètre dans leur programme de surveillance : le Danemark, l'Espagne/Galice, les Pays Bas et le Portugal (des traces d'acide domoïque, le principal composant de l'ASP, ont été détectées dans les deux premiers pays, soit dans des cellules phytoplanctoniques de *Pseudonitzschia*, soit dans des moules).

Le rapport coût / efficacité de la surveillance est nettement plus important quand elle concerne la conchyliculture ou les gisements naturels de coquillages, que quand elle concerne l'élevage de poissons. A titre d'exemple, le coût de la surveillance des gisements naturels en baie de Fundy (Canada) est estimé à 4% de la valeur des coquillages pêchés ; au Danemark, le coût est à peu près égal à 1% du revenu total de l'industrie liée à l'exploitation des moules.

Le compte-rendu détaillé / 1, comporte une liste non exhaustive des **points faibles et des points forts du réseau REPHY**, eu égard à ce qui se fait ailleurs, et en particulier en Europe. Il est important de souligner **LA FORTE RECONNAISSANCE DE REPHY AU NIVEAU INTERNATIONAL**, qui est principalement due à sa structure et à son organisation nationale, et à sa capacité à présenter facilement des résultats synthétiques, en particulier cartographiques.

REPHY a été mis en place lors d'une crise, mais son évolution au cours du temps a tenu compte des besoins spécifiques qui sont apparus. Ainsi, l'intérêt de tous les paramètres actuellement mesurés dans REPHY a été discuté, et les stratégies décrites correspondent bien à ce qui est conseillé au niveau international. **Le maillon faible concerne les méthodes**, dont plusieurs sont à re-décrire ou à adapter.

UNESCO / IOC
Science and Communication Centre on Harmful Algae
Copenhagen

créé en 1995 pour 5 ans

Assistance pratique pour

- l'identification des espèces phytoplanctoniques nuisibles
- l'évaluation des risques pour la santé

Synthèses écrites

Une base de données en cours

Cours de formation

Activités de recherche

BASE DE DONNÉES

répertoire des institutions et des personnes responsables des programmes de surveillance nationaux et régionaux

données sur les coquillages et les poissons connus pour accumuler les phycotoxines

données et bibliographie sur toutes les espèces nuisibles (taxonomie, écologie, biologie, toxicologie, effets)

répertoire des méthodes d'observation microscopique, qualitatives et quantitatives, des espèces phytoplanctoniques

répertoire des méthodes de détection des phycotoxines (+ information sur les standards disponibles)

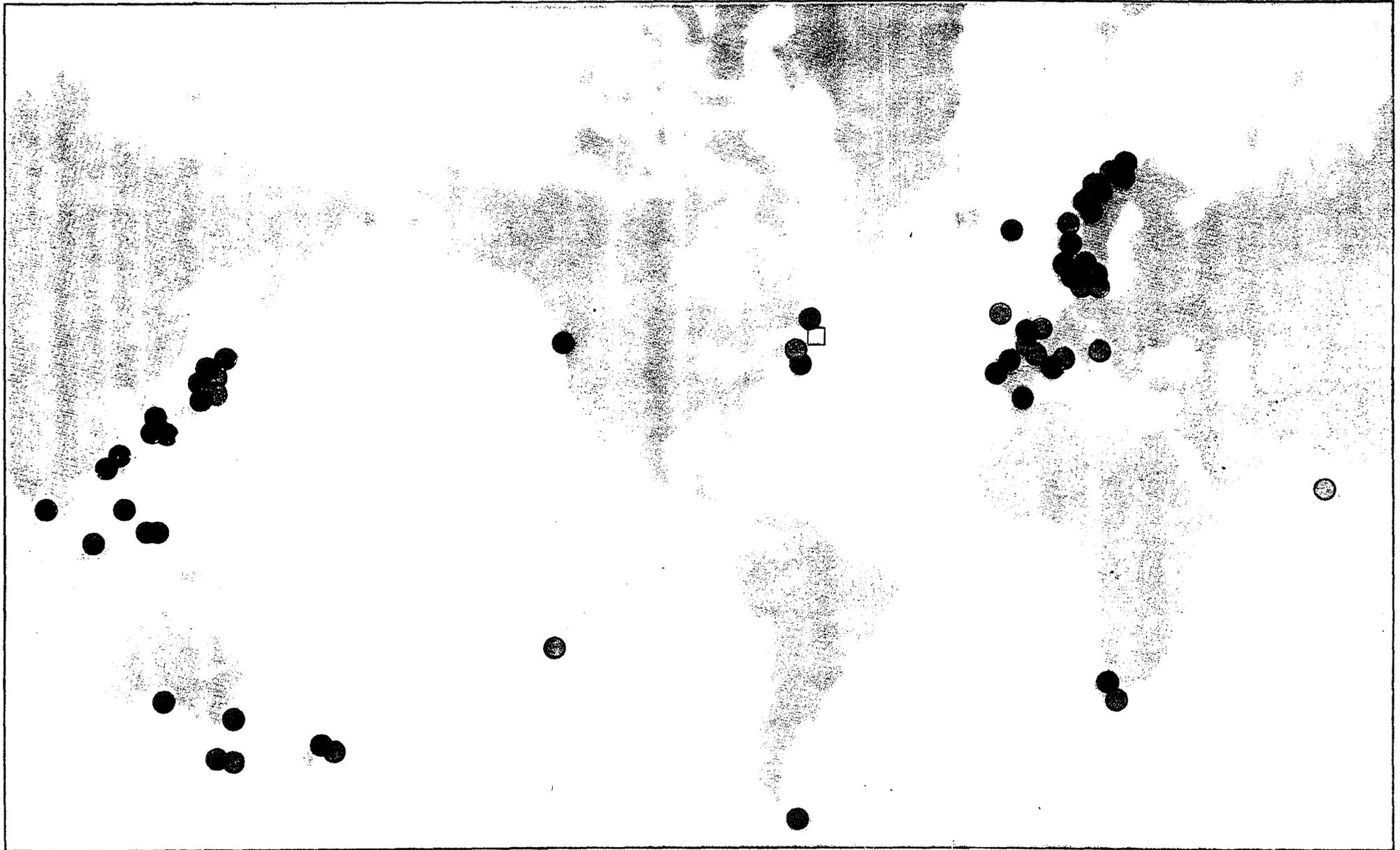
répertoire des effets nuisibles des blooms phytoplanctoniques

serveur de la COI ➔ <http://www.unesco.org:80/ioc>

● PSP

● DSP

□ ASP

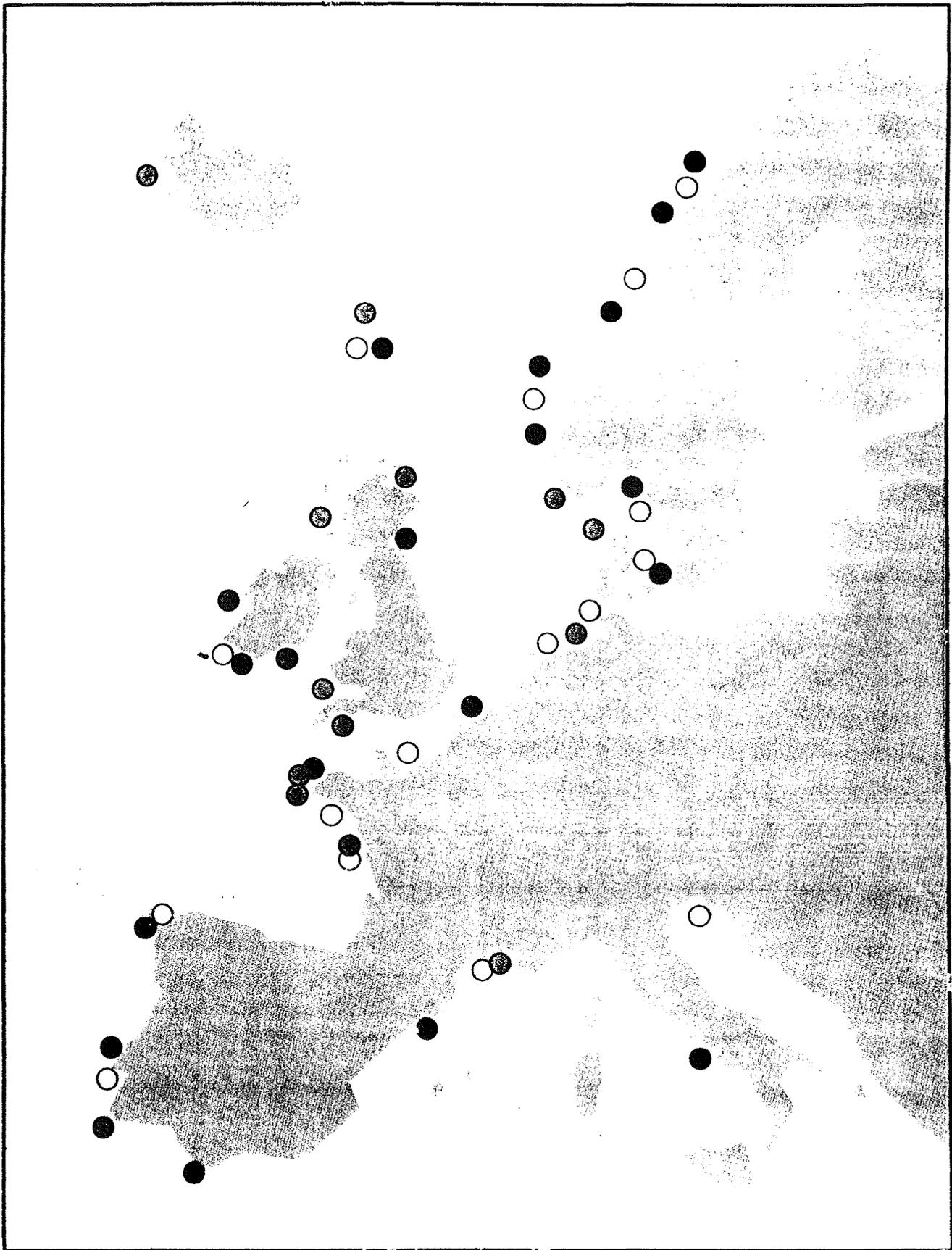


Global distribution of human intoxication by Paralytic Shellfish Poison (PSP),
Diarrhetic Shellfish Poison (DSP) and Amnesic Shellfish Poison (ASP).
(New records from Nov. 1987 to June 1989)

● PSP

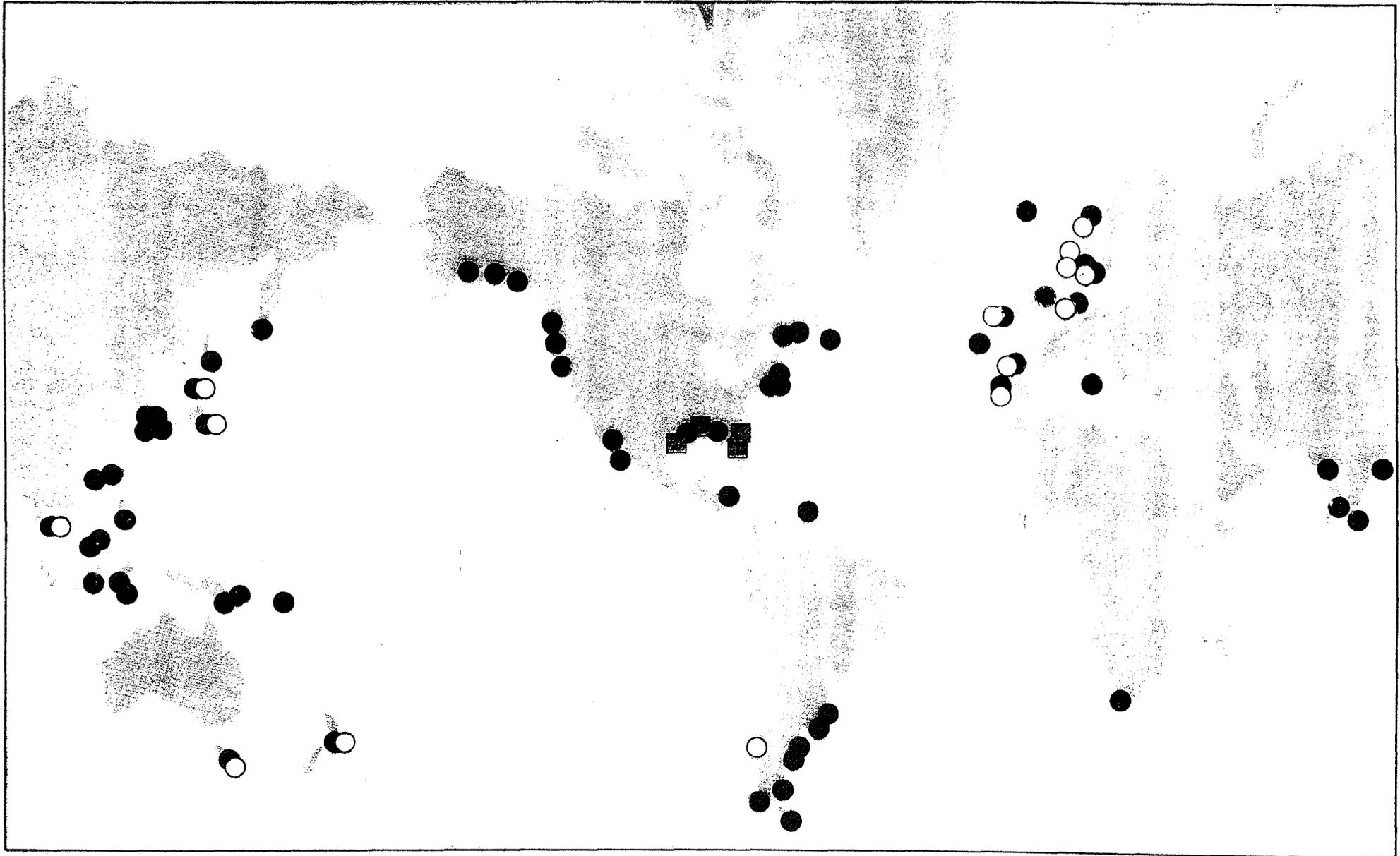
○ DSP

● IT



Distribution européenne des cas de: Paralytic Shellfish Poison (PSP),
Diarrhetic Shellfish Poison (DSP)
et Ichthyotoxines - mortalités d'animaux marins (IT).

● PSP ○ DSP ■ NSP



Global distribution of human intoxication by Paralytic Shellfish Poison (PSP),
Diarrhetic Shellfish Poison (DSP) and Neurological Shellfish Poison (NSP).
(Prior to November 1987)

PROGRAMMES DE SURVEILLANCE MONDIAUX

INFORMATION DISPONIBLE POUR 76 PAYS / REGIONS

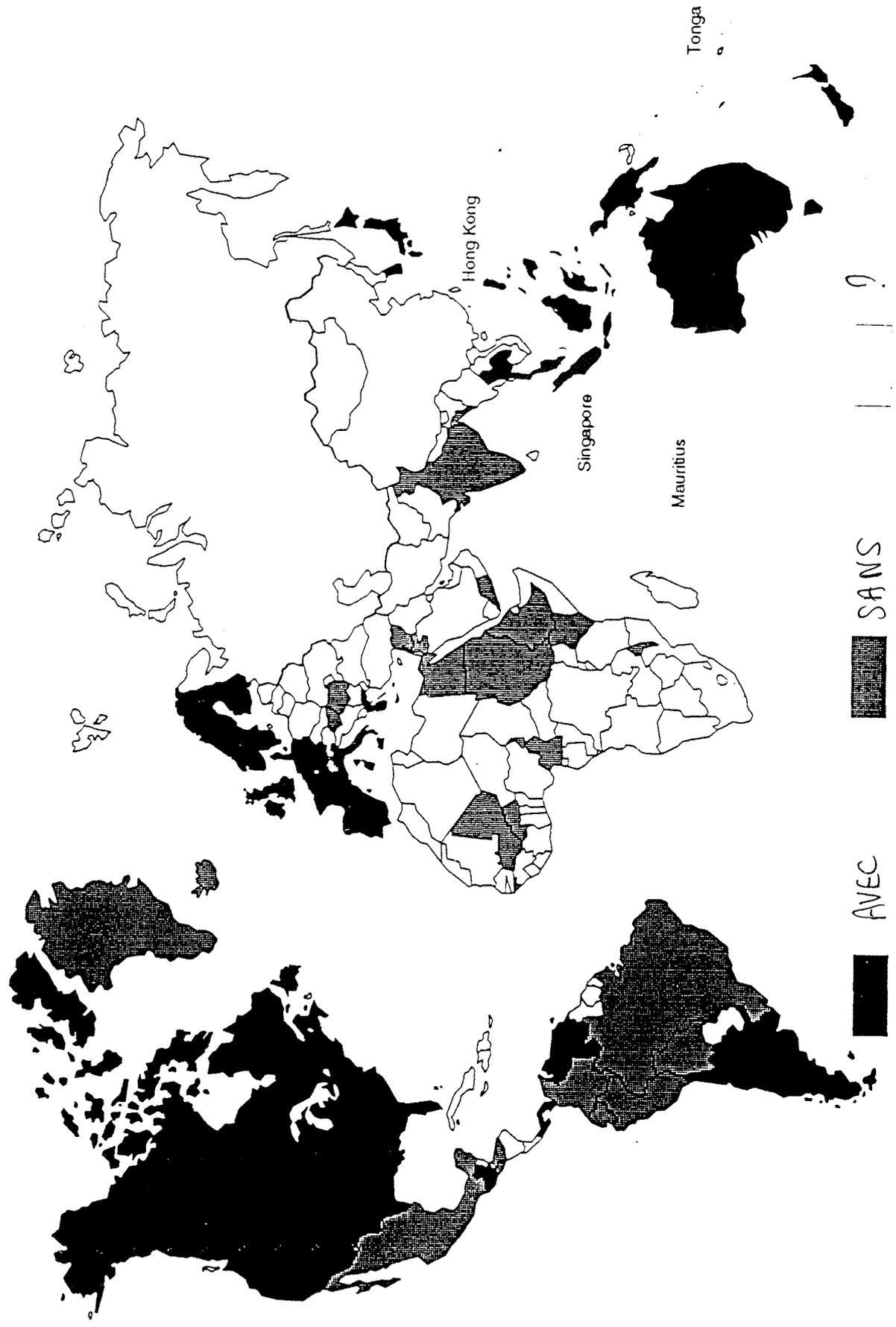
- ↗ 45 ont un programme de surveillance**
- ↘ 31 n'en ont pas**

**mise en oeuvre prévue pour un certain
nombre d'autres pays**

DEUX GRANDS TYPES de programmes de surveillance

- ◆ programmes dédiés à la surveillance phytoplancton / phycotoxines, en relation avec la conchyliculture et/ou l'aquaculture**
- ◆ partie d'un programme général de surveillance de l'environnement, sans objectif particulier de protection des ressources**

PROGRAMMES DE SURVEILLANCE



PROGRAMMES DE SURVEILLANCE MONDIAUX

PROGRAMMES NATIONAUX OU REGIONAUX

parmi les programmes nationaux :

↗ **surveillance large**, par ex. :

- phytoplancton**
- + phycotoxines dans les coquillages**
- + phytoplancton toxique pour poissons**

↗ **surveillance restreinte**, par ex. :

- phytoplancton**
- + phycotoxines dans les coquillages**
- ou**
- seulement phytoplancton toxique poissons**

dans certains pays, plusieurs programmes de surveillance, avec différents objectifs :

- conchyliculture**
- aquaculture**
- environnement**

BUTS DE LA SURVEILLANCE

70 % en relation avec **les coquillages** (en élevage ou sauvages)

55 % en relation avec **l'aquaculture**

33 % y incluent un **critère relatif à l'environnement**

Surveillance des efflorescences nuisibles

Il est nécessaire d'avoir, pour la région concernée, une connaissance de base sur les paramètres biologiques et physiques et sur leurs variations spatio-temporelles.

Les occurrences des espèces potentiellement toxiques et du phytoplancton en général, ainsi que l'évidence historique de leurs effets, sont des informations prioritaires.

Les paramètres importants à prendre en compte sont la température, la salinité, la présence d'une stratification de la masse d'eau, la chlorophylle (biomasse phytoplanctonique) et la circulation des courants de surface (transport des espèces).

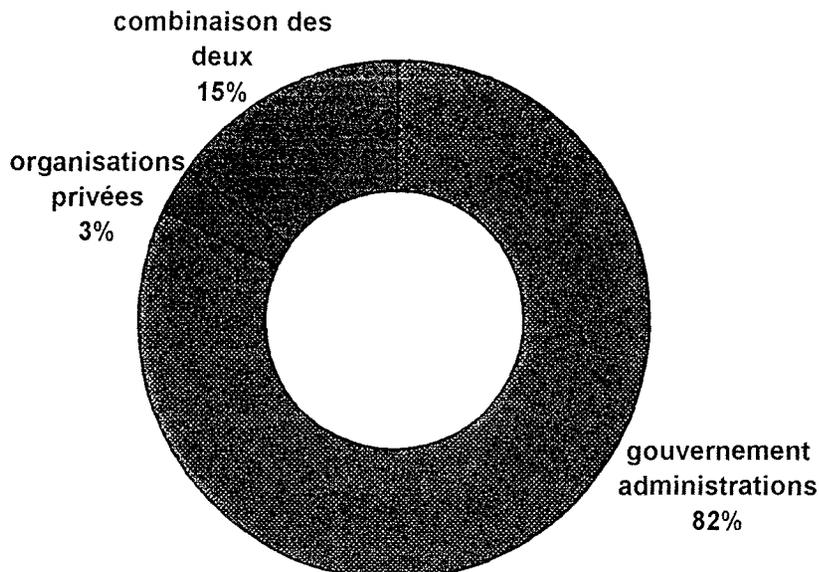
La connaissance de la distribution spatio-temporelle des nutriments inorganiques et de leurs sources, ainsi que des autres facteurs de croissance du phytoplancton, sont également importants lors de la mise en oeuvre d'un programme de surveillance

La définition d'un programme de surveillance doit commencer par la définition des informations utiles pour la protection des ressources spécifiques.

Ceci doit être fait en coopération entre les utilisateurs des résultats de la surveillance et les autorités / institutions / compagnies, impliquées dans la surveillance et l'évaluation de ses résultats

D'après le document COI "Design and Implementation of Harmful Algal Monitoring Systems" (sous presse)

ORGANISATIONS / INSTITUTIONS RESPONSABLES DE LA MISE EN OEUVRE DES PROGRAMMES DE SURVEILLANCE



Dans la plupart des cas, l'organisation responsable de la mise en place du programme de surveillance est aussi responsable de son fonctionnement

Dans quelques cas, plusieurs organisations (dont des associations de professionnels) collaborent pour réaliser la surveillance effective

FINANCEMENT

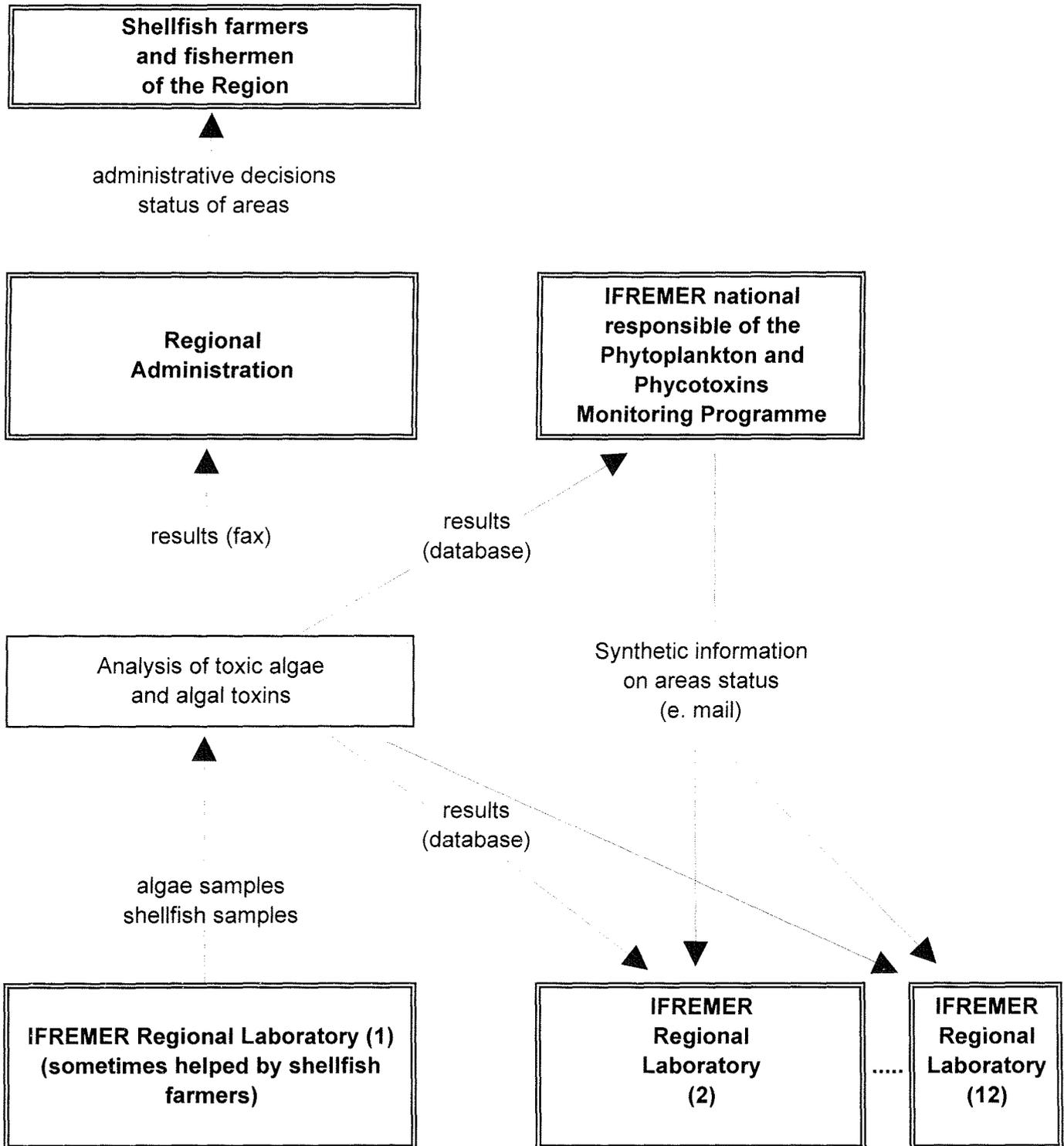
en majorité par les gouvernements/administrations (91%)

dans quelques pays, la surveillance est financée par les associations de professionnels

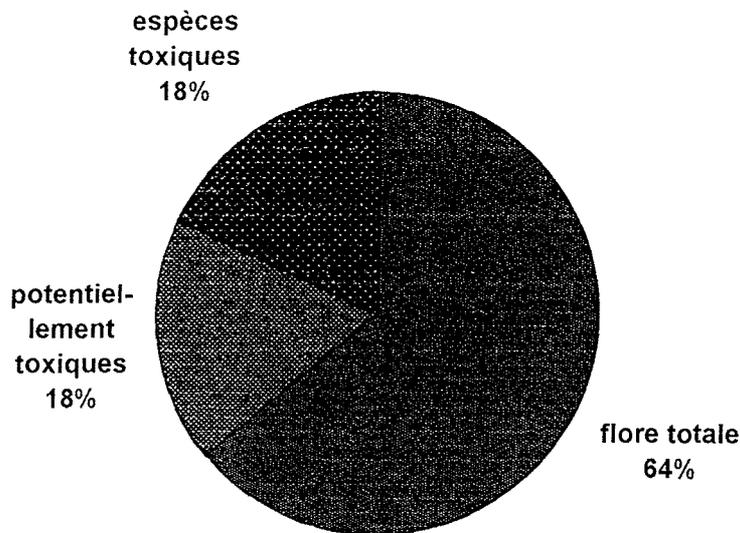
dans d'autres pays, financement partiel :

- par des utilisateurs privés des résultats
- ou par des organisations de recherche

Monitoring network used for shellfish poisoning monitoring in French coastal waters



PARAMETRES PHYTOPLANCTON



Dans tous les pays, les espèces sont identifiées et quantifiées en concentrations cellulaires

Dans 45% des cas, la biomasse chlorophyllienne est également mesurée

Les décisions réglementaires sont, dans certains pays, basées en partie sur les concentrations cellulaires de certaines espèces

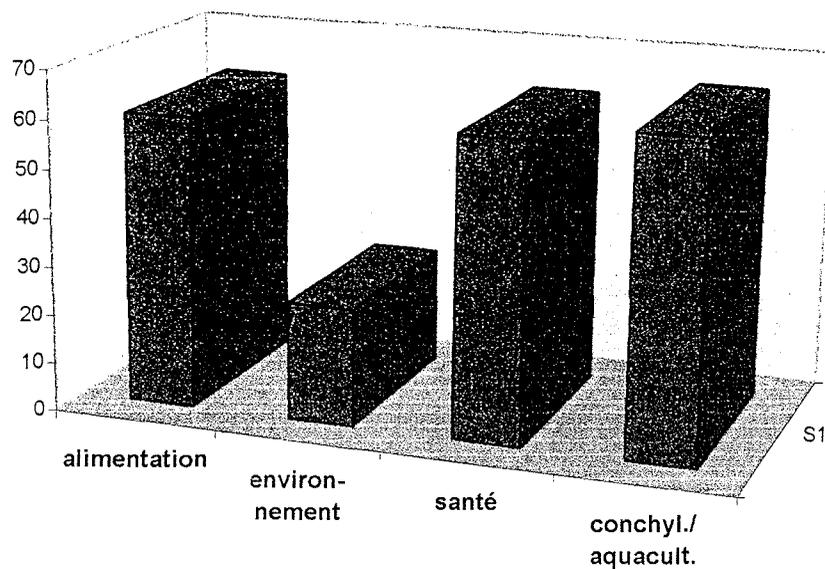
Les concentrations seuils sont très variables d'un pays à l'autre, et les éventuelles restrictions ne sont pas décrites de façon claire

PARAMETRES DE TOXICITE observés

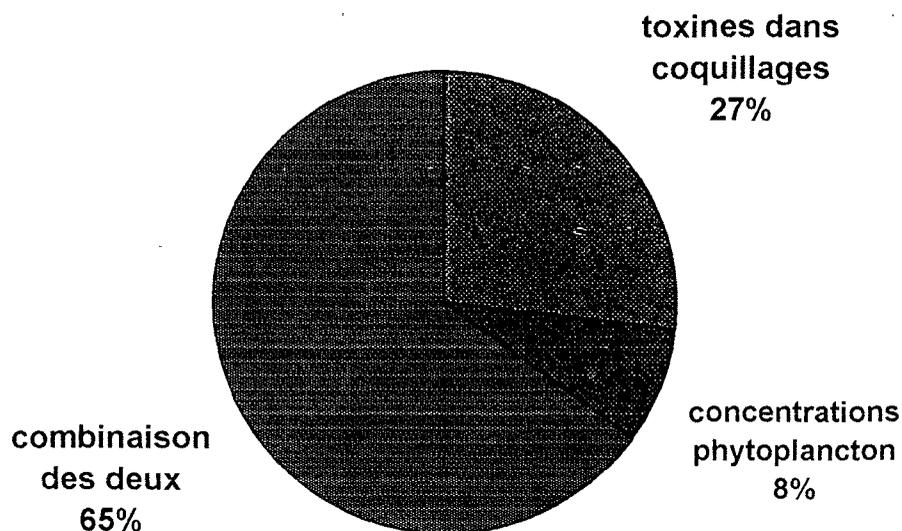
Toxines dans mollusques dans 64% des pays

Mortalités de poissons dans 30% des pays

Institutions responsables des décisions et de l'utilisation des données de la surveillance



Paramètres utilisés pour les décisions



MÉTHODES D'ANALYSE ET SEUILS DE TOLÉRANCE DES TOXINES DANS LES COQUILLAGES

PSP

surveillance dans **81% des pays**

☞ **tous les pays d'Europe**

test souris AOAC partout
confirmation éventuelle par HPLC

seuil = **80 µg / 100 g de chair** pour presque tous les pays

DSP

surveillance dans **45% des pays**

☞ **tous les pays d'Europe**

test souris le plus souvent
ou **test rat** (Allemagne, Irlande, Pays Bas)
confirmation éventuelle par HPLC (ou ELISA ou LCMS)

seuils très variables, exprimés dans des unités très différentes (US, µg / g de glande digestive, temps de survie, résultats qualitatifs...)

ASP

surveillance dans **26% des pays**

☞ en Europe ⇨ Danemark, Espagne, Pays Bas, Portugal

HPLC ou HPLC + test souris

seuil = **20 µg / g de chair**

RAPPORT COÛT / EFICACITÉ DES PROGRAMMES DE SURVEILLANCE

la surveillance en relation avec la conchyliculture est plus coûteuse que celle en relation avec l'aquaculture

ESTIMATION POUR CONCHYLICULTURE

☞ 1 à 5% de la valeur de la production



**coût de la surveillance phytoplancton +
phycotoxines**

ESTIMATION POUR AQUACULTURE

☞ 0.02 à 0.05% de la valeur de la production



**coût de la surveillance phytoplancton
seulement**

EXEMPLES TYPES DE RÉSEAUX DE SURVEILLANCE

EN RELATION AVEC LES COQUILLAGES

gisements naturels

- ☞ Canada**
- ☞ Danemark**

élevages

- ☞ France**
- ☞ Philippines**

EN RELATION AVEC LES POISSONS

populations sauvages

- ☞ Polynésie française**

élevages

- ☞ Norvège**
- ☞ Japon**

EN RELATION AVEC LA PÊCHE RÉCRÉATIVE

- ☞ Danemark**
- ☞ Italie**

REPHY

POINTS FAIBLES

méthodes de prélèvement

représentativité de l'échantillonnage du phytoplancton

hétérogénéité dans l'identification du phytoplancton

décentralisation

↳ transfert de l'information

POINTS FORTS

objectifs adaptés aux problèmes présents et à venir

structure nationale

↳ surveillance de l'ensemble du littoral

↳ organisation cohérente

↳ disponibilité des informations au niveau national

décentralisation

↳ connaissance du terrain

séries à long terme sur l'ensemble du littoral

expertise phytoplancton

soutien laboratoire de recherche pour phycotoxines

base de données

↳ nationale

↳ tous les résultats de la surveillance du littoral

↳ stratégies décrites

↳ procédures de validation et de qualification

reconnaissance au niveau

↳ national (PNOC / PNEAT)

↳ international (CIEM / COI)

— 2 —

Conclusions du comité d'évaluation du PNEAT
(Programme National Efflorescences Algales Toxiques)

Bilan des travaux du PNEAT 1989 – 1995

2. Conclusions du comité d'évaluation du PNEAT (Programme National Efflorescences Algales Toxiques).

Une présentation est faite des objectifs du PNEAT, des programmes de recherche soutenus par le PNEAT, de la répartition du financement entre contractants, et des différentes réalisations.

Le comité d'évaluation a considéré que le bilan était positif, et a émis un certain nombre de recommandations.

Une des questions posée lors de ce comité concerne directement le REPHY : **la surveillance des espèces potentiellement toxiques** (en particulier les phytoflagellés), **assurée depuis plusieurs années par Chantal BILLARD** (Université de Caen) **dans le cadre du PNEAT, peut elle être transférée au REPHY ?** En effet, ce qui relève manifestement d'une action de surveillance est actuellement financé par une structure destinée à soutenir des programmes de recherche.

Les discussions qui suivent pour la réponse à cette question ne conduisent pas à un assentiment général, l'inquiétude principale étant le désengagement éventuel de Chantal BILLARD des questions de surveillance, si ce transfert était effectué.

Rappelons que C. BILLARD et M.J. DINET (CNRS / Banyuls) sont les deux expertes du REPHY pour ce qui concerne la taxinomie du phytoplancton, en particulier des phytoflagellés. Il est important de noter que leur participation active à la réactualisation des listes de référence phytoplancton du REPHY, qui a abouti en 1995 à un document distribué dans tous les laboratoires côtiers, n'était pas associée au PNEAT : il n'y a donc pas lieu de mettre en doute leur volonté de poursuivre leur soutien au REPHY.

La nécessité de maintenir cette expertise extérieure étant évidente pour tous les participants, il s'agit maintenant de mieux définir la façon de le faire, par exemple par incitation.



BILAN DES TRAVAUX DU
PROGRAMME NATIONAL EFFLORESCENCES ALGALES TOXIQUES
1989 - 1995

Créé en 1989 le PNEAT avait pour objectif de comprendre les mécanismes impliqués dans les proliférations algales nuisibles observées sur les côtes françaises et d'étudier la structure et les effets des phycotoxines produites par ces micro-algues. Soutenu par le Ministère de l'Environnement, le Ministère de la Mer, l'IFREMER et le CNRS, le PNEAT a bénéficié d'un budget de 8,1 MF hors taxe qui a marqué un net recul depuis 1994 conduisant le Comité Directeur à ne financer que des études sectorielles jugées comme prioritaires. 114 contrats de recherche d'un montant moyen de 70 KF ont été financés à parts égales pour chacun des volets "Phycotoxines" et "Efflorescences". La production écrite représente 88 publications de rang A et B dans 24 revues internationales et 4 ouvrages collectifs. Huit thèses, dont quatre achevées ont été soutenues dans le cadre des thématiques du PNEAT.

I - VOLET "EFFLORESCENCES"

Dinophysis spp

La diagnose des espèces trouvées le long des côtes françaises, notamment *D. acuminata* et *sacculus* a été effectuée. La mise au point d'un système d'analyse d'image a permis d'améliorer la détection des espèces. Une sonde génomique a été obtenue mais elle demande à être validée en milieu naturel. Malgré de nombreux essais, il n'a pas été possible d'obtenir de culture permanente. Des observations en milieu naturel et des expérimentations sur des populations naturelles, grâce à la mise au point d'une technique de concentration, ont permis de montrer le caractère mixotrophe de *Dinophysis*. Pour la première fois des kystes ont été décrits, ainsi que des stades biologiques de petite taille dont la signification demeure inconnue. Le rôle de la stratification des eaux, vis-à-vis de l'abondance et de la distribution verticale a été établi, sans pouvoir généraliser les schémas obtenus à l'ensemble des situations hydrologiques.

Alexandrium minutum

La mise en culture a permis d'isoler plusieurs clones, d'en faire une description morphologique et d'en connaître le spectre toxinique. Des zones à risque ont été identifiées grâce à la mise en évidence et au dénombrement de kystes de résistance. Les études ont montré l'importance des processus d'enkystement/désenkystement et du transit sédimentaire en tant que facteur de dissémination géographique.

Gymnodinium cf nagasakiense

De nombreux résultats ont été obtenus, notamment l'existence de sous populations à taux de multiplication rapide, processus qui pourrait expliquer le développement des efflorescences. Le rôle de la thermocline et de la régénération de l'azote à partir de la matière organique dans l'apparition et le maintien des efflorescences a été prouvé en mer d'Iroise. L'action de la putrescine en tant que stimulant de croissance et celle régulatrice des exotoxines vis-à-vis des compétiteurs et des "brouteurs" ont été mis en évidence. Il apparaît que le contrôle des populations par le broutage n'est pas significatif. L'influence de la turbulence dans le taux de collision entre particules peut conduire à la floculation et à la sédimentation de l'efflorescence.

Procentrum minimum

Huit espèces dont quatre toxiques ont été isolées à partir d'échantillons du milieu naturel et mises en culture. Les études ont montré une capacité photohétérotrophique importante vis-à-vis de composés organiques azotés, ainsi que la nécessité d'un apport de thiamine, vitamine qui pourrait être excrétée par des diatomées notamment *Skeletonema costatum*, précédant *P. minimum* ou coaccompagnatrices. La validation en milieu naturel reste à faire. *P. minimum* caractérisé par un phototropisme positif, présente également une capacité importante à stocker l'azote.

Espèces potentiellement toxiques

L'inventaire et la surveillance des espèces potentiellement toxiques a permis l'observation et la mise en culture de plusieurs espèces appartenant aux genres *Heterosigma* (efflorescences toxiques à Camaret et La Rochelle), *Fibrocapsa* et *Chrysochromulina* (13 espèces). L'extension de *Phaeocystis globosa* en Bretagne a été signalée.

II - VOLET "PHYCOTOXINES"

Application de tests biologiques pour la détection

Plusieurs tests alternatifs au test souris ont été étudiés. Pour l'acide okadaïque (A.O), le test de cytotoxicité sur cellules KB est le plus performant, par rapport aux tests daphnies, microtox et rouge neutre. Un test sur hématies de cheval a été mis au point et sa grande sensibilité permet de quantifier les résultats pour les toxines hémolytiques (*Gymnodinium nagasakiense*). Pour la maïtotoxine, seul le test au rouge neutre sur fibroblaste a donné de bons résultats.

Détection physicochimique et biologique

La méthode Oshima est la plus adaptée pour détecter par CLHP les toxines paralysantes (performances supérieures vis-à-vis de la séparation des toxines C). Les méthodes biochimiques étudiées donnent de bons résultats et doivent être approfondies en particulier pour les gaunoytoxines. Pour l'A.O la méthode spécifique d'inhibition des protéines phosphatases a donné des résultats prometteurs, par contre en immunochimie (anticorps anti AO et anti DTX) les résultats sont inégaux. L'analyse en CLHP des ciguatoxines est décevante, mauvais couplage du réactif fluorescent, faible sensibilité, absence de corrélations avec le test souris.

Chimie extractive

La production de standards purifiés d'A.O et de DTX₁ a été tentée en utilisant des cultures de *P. Lima* et des coquillages contaminés. Les rendements d'extraction ont été respectivement de 73 et 70% pour 5 à 7 opérations d'extraction. La purification de la maïtotoxine a été réalisée, une fraction enrichie en MTX a été obtenue. Les toxines hémolytiques ont été identifiées; elles sont constituées d'un acide gras en C18 et d'un glycolipide dont l'étude structurale est en cours. Des toxines à caractère polaire ont été isolées de *P. minimum*.

Toxinogènèse

Parmi les facteurs qui influencent la production toxinique de *Gymnodinium cf nagasakiense* (synthèse et excrétion), la diminution d'intensité lumineuse et les variations de quota intracellulaire en phosphore sont apparus prépondérants. Des observations in situ ont montré que l'espèce produisait des exotoxines qui inhibaient la croissance de compétiteurs phytoplanctoniques. Les recherches ont permis de montrer que les bactéries n'avaient pas d'effet symbiotique sur la production d'A.O, par *P. lima*.

Pharmacotoxicologie

L'effet inotrope positif de l'A.O a été mis en évidence sur le muscle cardiaque. Cet effet est amplifié si le muscle est déficient (ischémié). Les recherches sur la formation d'adduits à l'ADN ont donné des résultats positifs sur cultures cellulaires, après exposition à des teneurs aussi basses que 0,1 à 1 mM d'A.O. Pour ce qui concerne la promotion tumorale de l'A.O les résultats sont fragmentaires; modification du cytosquelette d'actine des modèles cellulaires expérimentés, induction d'EROD dans des foies d'alevins de loupes.

Bioaccumulation

Les résultats ont montré la nécessité de confirmer les processus de bioaccumulation/épuration chez des poissons tropicaux pour les toxines diarihéiques, par une injection significative d'algues toxiques du genre *Prorocentrum*. Seuls des effets sur le comportement ont été mis en évidence. Chez l'huître contaminée par des toxines paralysantes, la production de biodépôts est apparue comme un paramètre sensible dans les premières heures d'exposition à une nourriture toxique monoalgue ou mixte. Malgré un profil toxinique pauvre, *Alexandrium* à de faibles concentrations peut en 4 à 5 jours conduire à une bioaccumulation dépassant les seuils de toxicité recommandés en santé publique. Les essais réalisés aussi bien sur la chair totale de plusieurs coquillages que sur les organes séparés de coquille Saint-Jacques ont montré la présence de produits de dégradation des toxines initialement présentes.

PUBLICATIONS SOUTENUES PAR LE PNEAT

VOLET EFFLORESCENCES

AN K.H., LASSUS P., MAGGI P., BARDOUIL M., TRUQUET P., (1992) Dinoflagellate cyst changes and winter environmental conditions in Vilaine Bay, Souther Brittany (France) *Botanica Marina* , 35 : 61 - 67.

ARZUL G., E. ERARD-LE DENN, C. VIDEAU, A.M. JEGOU and P. GENTIEN, 1993 Diatom growth repressing factors during an offshore bloom of *Gyrodinium* cf. *aureolum* in "Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea", Smayda T.J. and Shimizu Y. (Eds.), Elsevier, Amsterdam, pp 719-724

BELIN C., B. BELIAEFF, B. RAFFIN, M. RABIA & F. IBANEZ (1995) Phytoplankton time-series data of the French phytoplankton monitoring network: toxic and dominant species. In LASSUS P., G. ARZUL, E. ERARD-LE DENN, P. GENTIEN and C. MARCAILLOU-LE BAUT (eds.), *Harmful Marine Algal Blooms*. Lavoisier Publ., Paris, pp. 771-776.

BERLAND B. & D. GRZEBYK (1991) *Prorocentrum minimum*. In : SOURNIA A., C. BELIN, B. BERLAND, E. ERARD-LE DENN, P. GENTIEN, D. GRZEBYK, C. MARCAILLOU-LE BAUT, P. LASSUS & F. PARTENSKY, *Le phytoplancton nuisible des côtes de France. De la biologie à la prévention.*, Programme National "Efflorescences algales marines", CNRS - IFREMER, pp. 101-113.

BERLAND B., MAESTRINI S.Y., BECHEMIN C., LEGRAND C. (1994) Photosynthetic capability of the toxic dinoflagellate *Dinophysis acuminata* and *Dinophysis sacculus*. *La mer*, Tokyo, 32: 107 - 117.

BERLAND B., MAESTRINI S.Y., GRZEBYK D. (1995). Observation on possible life stage of the dinoflagellates *Dinophysis cf. acuminata*, *Dinophysis acuta* and *Dinophysis pavillardi*. *Aquat. Microb. Ecol.*, 9: 183 – 189.

BERLAND B., MAESTRINI S.Y., GRZEBYK D. THOMAS P (1995) Recent aspects of nutrition in the dinoflagellate *Dinophysis cf acuminata*. *Aquat. Microb. Ecol.*, 9: 191 – 198.

BILLARD C. (1992) *Fibrocapsa japonica* (Raphidophyceae) algue planctonique nouvelle pour les côtes de France. *Cryptogamie-Algologie*, 13, 225–231.

BILLARD C. (1994) Life cycles. In : J.C. GREEN, B.S.C. LEADBEATER (Eds.), *The Haptophyte Algae*, Systematics Association Special volume n° 51, Clarendon Press, Oxford, pp. 167–186.

BIRRIEN J.L., P. LE CORRE, P. MORIN and R. RISOB, 1992 Influence of the Iroise inner front on nutrient distribution and phytoplankton development in Douarnenez Bay. *J. Rech. Oceanogr.*, P, vol. 16, no. 3–4, 73

BODENNEC G., P. GENTIEN, C.C. PARRISH, G. ARZUL, A. YOUENOU and M.P. CRASSOUS, 1995 Production of suspected lipid phycotoxins by *Gymnodinium cf. nagasakiense* in batch cultures in " Harmful Marine Algal Blooms". P.Lassus, G.Arzul, E.Erard, P.Gentien, C. Marcaillou (Eds.) Lavoisier, Intercept Ltd. ,pp 407–412

CANN-MOISAN C., J. CAROFF, A. HOURMANT, C. VIDEAU and F. RAPT, (1994) Quantitative analysis of polyamines at trace levels by high performance liquid chromatography in high salt solutions. Application to seawater. *J. Liquid Chrom.*, 17(6), 1413–1417

CHRÉTIENNOT-DINET M.J., SOURNIA A., RICARD M., BILLARD C., 1993. A classification of the marine phytoplankton of the world from class to genus. *Phycologia*, 23:159–179.

CHRÉTIENNOT-DINET M.J., C. COURTIES, A. VAQUER, J. NEVEUX, H. CLAUSTRE, J. LAUTIER & M.C. MACHADO (1995) A new marine picoeucaryote : *Ostreococcus tauri* gen. et sp. nov. (Chlorophyta, Prasinophyceae). *Phycologia*, 34 (sous presse).

COURTIES C., A. VAQUER, M. TROUSSELIER, J. LAUTIER, M.J. CHRÉTIENNOT-DINET, J. NEVEUX & C. MACHADO (1994) Smallest eukaryotic organism. *Nature*, 370, 255.

DELMAS D., HERBLAND A., MAESTRINI S. Y. (1991): Conditions d'apparition de densités accrues des dinoflagellés *Dinophysis* dans les eaux littorales et du large adjacentes au pertuis d'Antioche. *Oceanologica acta*.

DELMAS D., HERBLAND A., MAESTRINI S. Y. (1992) Environmental conditions which lead to increase in cell density of the toxic dinoflagellates *Dinophysis* species in nutrient rich and nutrient poor waters of the french atlantic coast. *Mar. Ecol Progr. Ser.*, 89 : 53 – 61.

DELMAS D., HERBLAND A., MAESTRINI S. Y. (1993) Does *Dinophysis* spp. come from the "open sea" along the French Atlantic coast? In "Toxic phytoplankton bloom in the sea" ed by Smayda and Shimizu, Elsevier Publish, Amsterdam, 152 p.

ERARD-LE DENN E. (1991). *Alexandrium minutum* (Dinophycées). In : "Sournia *et al.* : Le phytoplankton nuisible des côtes de France", IFREMER/CNRS (Edit.), 83-90.

ERARD-LE DENN E. (1991). Recent occurrence of red-tide dinoflagellate *Alexandrium minutum* Halim from the North-Western coasts of France. In : "Recent Approaches on Red Tides", Park J.S. and H.G. Kim Eds., 85-98.

ERARD-LE DENN E. & V. BOULAY (1995). The resting cyst of *Alexandrium minutum* in marine sediment : quantification by three different methods. In : "Harmful Marine Algal Blooms", P. Lassus, G. Arzul, E. Erard-Le Denn, P. Gentien, C. Marcaillou, Eds, Lavoisier, Intercept Ltd, pp. 725-730.

ERARD-LE DENN E., E. DESBRUYERES & K. OLU (1993). *Alexandrium minutum* : resting cyst distribution in the sediments collected along Brittany coast, France. In : "Toxic phytoplankton blooms in the sea", Smayda T., Shimizu Y. Eds, Elsev. Publish., 109-114.

GENTIEEN P. and G. ARZUL, 1990 Exotoxin production by *Gyrodinium cf. aureolum* J. Mar. Biol. Assoc. U. K., vol. 70, no. 3, 571-581

GENTIEEN P. and G. ARZUL, 1990 A theoretical case of competition based on the ectocrin production by *Gyrodinium cf. aureolum* in " Toxic Marine Phytoplankton" Granéli E., Sundstroem B., Edler L., Anderson D.M. (Eds.), Elsevier, Amsterdam, 161-164

GENTIEEN P. and G. ARZUL, (1992). Some physiological features of the development of *Gyrodinium cf. aureolum*. in " Recent approaches on red tides" Park J. S. eand Kim H.G. eds, pp 73 - 84.

GRZEBYK D. (1993) Dinoflagellés marins toxiques: biologie, écophysiologie, toxicité. *Prorocentrum minimum*, *Dinophysis* spp., dinoflagellés ciguatériques. Th. Doct. Univ. Aix-Marseille 2, 203 p.

JENKINSON I.R., 1993 Viscosity and elasticity of *Gyrodinium cf. aureolum* and *Noctiluca scintillans* exudates, in relation to mortality of fish and damping of turbulence.in "Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea", Smayda T.J.and Shimizu Y. (Eds.), Elsevier, Amsterdam, pp 757-762

LARRAZABAL M.E., LASSUS P., MAGGI P., BARDOUIL (1990). Kystes modernes de dinoflagellés en baie de Vilaine-Bretagne Sud. Cryptogamie Algol., 11 (3): 171 - 185.

- LASSUS P., PRONIEWSKI F., PIGEONC., VERET L., LE DEAN L., BARDOUIL M., TRUQUET P., (1990). The diurnal vertical migrations of *Dinophysis acuminata* in the outdoor tank at Antifer. *Aquatic Living Resour.*, 3 : 143-182
- LASSUS P., BARDOUIL M., 1991. Le complexe "Dinophysis acuminata " identification des espèces le long des côtes françaises. *Cryptogamie Algo.*, 12 (1): 1 - 9.
- LASSUS P., M. LE DOUX, M. BARDOUIL, M. BOHEC & E. ERARD-LE DENN (1994). Kinetics of *Alexandrium minutum* Halim toxin accumulation in mussels and clams. *Natural toxins*, 2, 329-333.
- LE CORRE P., S. L'HELGUEN, P. MORIN, J.L. BIRRIEN, 1992 Instances of toxic red tides on the western English channel continental shelf: Example of *Gyrodinium aureolum* *Hydroecol. Appl.*, 1992, P, vol. 4, no.2, pp 173-188
- LE CORRE P. and S. L'HELGUEN, 1993 Nitrogen source for uptake by *Gyrodinium cf. aureolum* in a tidal fron *Limnol. Oceanogr.*, P , vol. 38, no. 2, pp 446-451
- LE DOUX M., E. NEZAN, E. ERARD-LE DENN & J.M. FREMY (1990). Recent occurrence of paralytic shellfish (PSP) toxins from the North West coast of France. In : NSA/SINA Meeting (1-4/4/1990, Williamsburg, Virginia).
- LE DOUX M., M. BARDOUIL, E. NEZAN & E. ERARD-LE DENN (1991). Field and experimental studies of shellfish contaminated by *Alexandrium minutum* strain. In : "Marine Biotoxins", J.M. Fremy Ed., 43-51.
- MENESGEN A., LASSUS P., de CREMOUX F., BOUTIBONNES L., (1990) Modelling Dinophysis blooms: a first approach. IN : Toxic phytoplankton, ed Graneli, Sundstrom, Edler, Anderson, Elsevier Publish., 195 - 199.
- NEZAN E., C. BILLARD & G. PICLET (1995) Une nouvelle algue toxique sur les côtes françaises. *La Recherche*, 273, 194-195.
- PARRISH C.C., G. BODENNEC, and P. GENTIEN, (1992). Separation of polyinsaturated and saturated lipids from marine phytoplankton on silica gel coated chromarods. *Journal of Chromatographie*; 607: 97 - 104.
- PARRISH C.C., G. BODENNEC, J.L. SEBEDIO and P. GENTIEN, 1993 Intra- and extracellular lipids in cultures of the toxic dinoflagellate, *Gyrodinium aureolum*. *Phytochemistry*, P, vol.32, no. 2, pp 291-295
- PARRISH C.C., G. BODENNEC and P. GENTIEN, 1994 Time courses of intracellular and extracellular lipid classes in batch cultures of the toxic dinoflagellate, *Gymnodinium cf. nagasakiense* *Mar. Chem.* 48, 71-82

- PARTENSKY F., P. GENTIEN AND A. SOURNIA, 1991 *Gymnodinium cf. nagasakiense* = *Gyrodinium cf. aureolum* (Dinophycées) in "Le phytoplancton nuisible des côtes de France : de la biologie à la prévention" A. Sournia, C. Belin, B. Berland, E. Erard-Le Denn, P. Gentien, D. Grzebyk, C. Marcaillou-Le Baut, P. Lassus et F. Partensky (Eds.), ISBN-2-9054 34-30-9, IFREMER Editions, pp 63 - 82
- PARTENSKY F. and D. VAULOT, 1991 Growth and cell cycle of two closely related red tide forming dinoflagellates: *Gymnodinium nagasakiense* and *G. cf. nagasakiense* J. Phycol., vol. 27, no. 6, 733-742
- PARTENSKY F and VAULOT, 1989 Cell size differentiation in the bloom forming dinoflagellate *Gymnodinium cf. nagasakiense* J. Phycol., vol. 25, no. 4, 741-750
- PAULMIER G., B. BERLAND, C. BILLARD & E. NEZAN (1995) *Gyrodinium corsicum* nov. sp. (Gymnodiniales, Dinophyceae), organisme responsable d'une "eau verte" dans l'étang marin de Diana (Corse), en avril 1994. *Cryptogamie-Algologie*, sous presse.
- SCIANDRA A. (1991a) *Prorocentrum minimum* - Détermination des constantes ecophysiologiques - Etude du cycle vital - Toxicité et conditions de son apparition. *Rapport PNEAT - Opération n°7*, 38 p.
- SCIANDRA A. (1991b) Coupling and uncoupling between nitrate uptake and growth rate in *Prorocentrum minimum* (Dinophyceae) under different frequencies of pulsed nitrate supply. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 72, 261-269.
- SOURNIA A., C. BELIN, B. BERLAND, E. ERARD-LE DENN, D. GRZEBYK, C. MARCAILLOU-LE BAUT, P. LASSUS & F. PARTENSKY (1990). Nuisances et intoxications causées en France par le phytoplancton et les "efflorescences" marines. Synthèse préliminaire. Programme National "Efflorescences Algales Marines [plaquette éditée par IFREMER], 25 p.
- SOURNIA A., E. ERARD-LE DENN, D. GRZEBYK, P. LASSUS & F. PARTENSKY (1990). Plancton nuisible sur les côtes de France. *Pour la Science*, 153, 60-67.
- SOURNIA A., C. BELIN, C. BILLARD, M. CATHERINE, E. ERARD-LE-DENN, J. FRESNEL, P. LASSUS, A. PASTOUREAUD & R. SOULARD (1992) The repetitive and expanding occurrence of a green bloom-forming dinoflagellate (Dinophyceae) on the coasts of France. *Cryptogamie-Algologie*, 13, 1-13.
- VAULOT D., BIRRIEN J.L., D. MARIE, R. CASOTTI, M.J.W. VELDHUIS, G.W. KRAAY & M.J. CHRÉTIENNOT-DINET (1994) Morphology, ploidy, pigment composition, and genome size of cultured strains of *Phaeocystis* (Prymnesiophyceae). *J. Phycol.*, 30, 1022-1035.
- VIDEAU C. and F. PARTENSKY, 1990 Variability in the growth characteristics of *Gymnodinium cf. nagasakiense* (Dinophyceae) and its consequences for the determination of *in situ* growth rates J. Exp. Mar. Biol. Ecol., vol. 142, no. 3, 169-182

VOLET PHYCOTOXINES

M. AMMAR, G.DIOGENE, S. PUISEUX-DAO, 1995. Selection of cytotoxic responses for evaluation of toxic potential of microalgal extracts. Seventh international conference on toxic phytoplankton, Sendai, juillet 1995.

AMZIL Z., POUCHUS Y. F., LE BOTERFF J., ROUSSAKIS C., VERBIST J. F., MARCAILLOU-LE BAUT C. & MASSELIN P., 1992. Short-time cytotoxicity of mussel extracts : A new bioassay for okadaic acid detection. *Toxicon* 30 : 11 : 1419-1425.

AMZYL Z.: l'acide okadaïque: optimisation de la purification, nouvelle méthode de détection biologique. Th. Univ. Nantes, 6. 12. 1993, 234 p.

AMZYL Z, POUCHUS Y. F., VERBIST J.F., LASSUS P. Modélisation of bioactive compound purification: optimisation of production of acide okadaï acid and DTX-1 from *Prorocentrum lima*. J. Pharm. Sc (submitted).

ARZUL G., GENTIEU P., & CRASSOUS M.P., 1992. A haemolytic test to assay toxins excreted by the marine dinoflagellate *Gyrodinium cf aureolum*. *Wat. Res.* vol. 28, N 4, pp. 961-965.

ARZUL G., E. ERARD-LE DENN, C. VIDEAU, A.M. JEGOU & P. GENTIEU (1993). Diatom growth repressing factors during an offshore bloom of *Gyrodinium cf. aureolum*. in : Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea. Smayda and Shimizu eds. Elsevier, pp. 719-724.

ARZUL G., P. GENTIEU, G. BODENNEC, F. TOULARASTEL, A. YOUENOU & M.P. CRASSOUS (1995). Comparison of toxic effects in *Gymnodinium cf. nagasakiense* polyunsaturated fatty acids. in : Harmful Marine Algal Blooms. Lassus *et al.* eds. Lavoisier, pp. 395-400.

BANSARD, J.P. VERNOUX, J.M. CHESNAIS, M.P. SAUVIAT, SIMOM J.F. , C. LEBAUT, 1995. Preliminary separation and characterization of a side-toxic extract obtained in addition to okadaic acid in *Dinophysis sp.* contaminated mussels. In Harmful Marine Algal Blooms, P. LASSUS, E. ERARD, P. GENTIEU, C. MARCAILLOU eds, Technique et Documentation-Lavoisier Intercept. pp 267-272.

- BARDOUIL M., BOHEC M., BOUGRIER S., LASSUS P., TRUQUET P., 1995. Ecophysiologic feeding responses of *Crassostrea gigas* (Thunberg) to inclusion of different proportions of toxic dinoflagellates in their diet. *Ocean. Acta* (soumis à publication).
- BERREUR-BONNENFANT, M. AMMAR, A. DUBREUIL, K. KIEFER, G. DIOGENE, P., 1994. METEZEAU, S. PUISEUX-DAO, 1994. Modulation of fibroblast response to maitotoxin along the cell division cycle. *Cell Biol, and Toxicol.* 10, 423-427.
- BODENNEC G., P. GENTIEN, C. PARRISH, G. ARZUL, A. YOUENOU & M.P. CRASSOUS (1995). Production of suspected lipids phycotoxins by *Gymnodinium* cf. *nagasakiense* in batch cultures. in : Harmful Marine Algal Blooms. Lassus *et al.* eds. Lavoisier, pp. 407-412.
- BODENNEC G., C.C. PARRISH & P. GENTIEN (1993). Intra-cellular and extra-cellular fatty acids in batch cultures of the toxic dinoflagellate *Gyrodinium* cf. *aureolum*, effects of environmental factors. Comm. au 84th American Oil Chemists' Society. Annual Meeting, April 1993.
- DIOGENE G. Cytotoxicité aspécifique et spécifique de la maitotoxine et d'extraits du dinoflagellé *Gambierdiscus toxicus*. Thèse Univ. Paris VII. 1993, 159 p.
- DIOGENE G., DUBREUIL A., BREITTMAYER J. P. & PUISEUX-DAO S., 1994. Cytotoxic quantification of maitotoxin-like activity from the dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*. *Toxic. in Vitro.* vol. 8, N 1, pp. 37-45.
- DIOGENE G., FESSARD V., AMMAR M., DUBREUIL A. & PUISEUX-DAO S., 1995. Evaluation of cytotoxic responses to a maitotoxin extract and okadaic acid. In Harmful Marine Algal Blooms. Lassus P., Arzul G., Erard-Le Denn E., Gentien P., Marcaillou-Le Baut C, Lavoisier Intercept Ltd, 285-289.
- FESSARD, A. PFOHL-LESZKOWICS, S. PUISEUX-DAO 1995. Okadaic acid treatment induces DNA adducts formation in BHK21 C13 fibroblasts and HESV keratinocytes. 5ème congrès de la Société de Pharmaco-Toxicologie Cellulaire, Paris.
- FREMY J. M. AND LEDOUX M., (1991). Application de la CLHP à l'étude d'efflorescences d'*Alexandrium* sp. *Rev. Int. Ocean. Med.* 101 - 104.
- LASSUS P., LEDOUX M., BARDOUIL M., BOHEC M., ERARD E., 1994. Kinetics of *Alexandrium minutum* Halim Toxin accumulation in Mussels and Clams. *Nat. Toxins.* 2 : 329-333.
- LASSUS P., BARDOUIL M., LEDOUX M., MURAIL I., BOHEC M., TRUQUET P., FREMY J. M., ROHMER V., 1992. Paralytic phycotoxin uptake by scallops (*Pecten maximus*). *Aquat. Living Res.*, 5 (4) : 319-324.

LASSUS P., BARDOUIL M., LEDOUX M., BOHEC M., MURAIL I., FREMY J. M., 1995. Role of the kidneys in bioaccumulation of paralytic Toxins by Scallop (*Pecten maximus*) Tissues. J. Nat. Toxins. (accepté pour publication).

LEDOUX M. (1991). Optimisation d'un dosage par CLHP des phycotoxines paralysantes: application à l'étude de la contamination des fruits de mer. Mémoire d'ingénieur CNAM, Paris.

MARCAILLOU LE BAUT C., AMZIL Z., VERNOUX J. P., POUCHUS Y. F., BOHEC M., SIMONJ. F. 1994. Studies on the detection of okadaic acid in mussels: preliminary comparaison of bioessay. Natural Toxins, 2: 312 – 317.

MARCAILLOU LE BAUT C. & P. MASSELIN (1990). Recent data on Diarrhetic Shellfish Poisoning in France. In : Toxic Marine Phytoplankton, Granéli *et al.* eds, Elsevier Science Publishing Co, Inc. pp. 487–492.

MORLAIX M. 1992. Thèse de doctorat de L'Université de Paris VI Orsay. Croissance et toxicité comparée de deux dinoflagellés *A. tamarense*, *Prorocentrum lima*

MORLAIX M. et LASSUS P. 1992. Influence de l'azote et du phosphore sur la croissance et la toxicité de *Prorocentrum lima*. Cryptogamie, algologie 1992, 13 (3), 187 – 195.

PARRISH C.C., G. BODENNEC, J.L. SEBEDIO & P. GENTIEN (1992). Separation of polyinsaturated and saturated lipids from marine phytoplankton on silicagel – coated chromarods. J. Chromatog. 607 : 97 – 104.

PARRISH C.C., G. BODENNEC, J.L. SEBEDIO & P. GENTIEN (1993). Intra- and extracellular lipids in cultures of the toxic dinoflagellate, *Gyrodinium aureolum*. Phytochemistry, 32, 291–295.

RAUSCH de TRAUBENBERG C., (1991) Rôle des bacteries associées dans des dinoflagellés marins: données récentes. *Oceanis* 17 (6) : 648 – 657.

RAUSCH de TRAUBENBERG C., (1993). Interactions entre un dinoflagellé et sa microflore bactérienne associée : rôle des bactéries dans la toxicité de *Prorocentrum lima* Ehrenberg (Dodge). Thèse de doctorat, Université de Nantes. 224 p.

RAUSCH de TRAUBENBERG C., M.L. GERARD, M.O. SOYER & D. EMDADI (1995 a). The toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* and its associated bacteria. 1. An ultrastructural study. *European Journal Protistol.*, Vol. 31.

RAUSCH de TRAUBENBERG C., M.O. SOYER, M.L. GERARD & M. ALBERT (1995 b). The toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* and its associated bacteria. 2. Immunolocalization of okadaic acid in axenic an non axenic cultures. *European Journal Protistol.*, Vol. 31.

RAUSCH de TRAUBENBERG C. & P. LASSUS (1991). Dinoflagellate toxicity : are marine bacteria invoved ? Evidence from the literature. *Marine Microbial Food Webs*, 5, (2) : 205–226.

RAUSCH de TRAUBENBERG C. & M. MORLAIX (1995). Evidence of okadaic acid release into extracellular medium in cultures of *Prorocentrum lima* (Ehrenberg) Dodge. In : Harmful Marine Algal Blooms. Lassus et al. eds, Lavoisier publ.

SAUVIAT M. P., VERNOUX J.P., LE BAUT C., BANSARD S., HAMELIN M. Effect of a side toxin isolated from *Dinophysis* sp. contaminated french mussels on the electrical and mechanical activity of frog heart. Nat. Toxins (submitted).

SIMON J. F. et VERNOUX J. P. (1994). High sensitive assay of okadaic acid using protein phosphatase and paranitrophenyl phosphatase. Natural toxins, 2: 293 – 301.

VERNOUX J. P., LE BAUT C., MASSELIN P., MARAIS C., BARON B., CHOUMILOFF R., PRONIEWSKI F., NIZARD G., & BOHEC M., 1993b. The use of *Daphnia magna* for detection of okadaic acid in mussel extracts. Food Additive Contaminants 10 (5) : 603–608.

VERNOUX J.P. , BANSARD S., SIMON J.F., NWAL – AMANG D., LE BAUT C., GLEIZES E., FREMY J. M., LASNE M.C. 1994. Cooked mussels contaminated by *Dinophysis* sp: a source of okadaic acid. Nat. Toxins, 2, 184 – 188.

– 3 –

Stratégie 'flore totale'

3. Stratégie flore totale.

L'intérêt de déterminer l'ensemble des espèces phytoplanctoniques présentes, sur un certain nombre de points du REPHY, est parfois contesté. Il était donc utile de faire le point sur ce sujet.

Pourquoi surveiller le phytoplancton?

Tous les réseaux de surveillance des blooms toxiques et nuisibles décrits dans le monde possèdent les deux composantes **surveillance du phytoplancton ET surveillance des phycotoxines** (voir chapitre 1).

La surveillance du phytoplancton déclenche généralement la surveillance des phycotoxines. Dans le cas du REPHY, cela apparaît comme un bon compromis, adapté à une configuration de zones d'élevage disséminées : **une stratégie de surveillance des phycotoxines seules, en aveugle, serait à l'évidence trop lourde et trop coûteuse**. De plus elle serait dangereuse, car il y aurait plus de risques de ne pas déclarer une zone contaminée quand elle l'est.

Pourquoi des flores totales?

Les recommandations internationales incluent toujours l'observation de toutes les espèces, et pas seulement des espèces toxiques, dans la description d'un programme de surveillance idéal.

ainsi, « les occurrences des espèces potentiellement toxiques et du phytoplancton en général, ainsi que l'évidence historique de leurs effets, sont des informations prioritaires » (UNESCO/COI/1996).

Les séries historiques fournissent en outre des informations précieuses en cas d'apparition d'une nouvelle espèce toxique (ex. : *Heterosigma carterae* en Bretagne), ou bien si une variété d'une espèce endémique devient toxique (ce pourrait être le cas de *Pseudonitzschia pseudodelicatissima*, espèce actuellement non toxique en France, alors que l'espèce similaire canadienne produit des toxines ASP –Amnesic Shellfish Poison–).

Les observations de type flore totale doivent néanmoins être limitées à un certain nombre de points, pour ne pas être prohibitives. Il est cependant nécessaire de rappeler que **le temps passé sur une flore partielle est également très important** (voir chapitre 5), puisqu'elle comporte la détermination et la quantification de toutes les espèces toxiques, nuisibles et douteuses, c'est à dire un minimum de vingt à trente espèces.

Pourquoi des séries à long terme?

De façon générale, les séries à long terme permettent l'étude des fluctuations périodiques et l'estimation des tendances. L'acquisition de ce type de données peut paraître ingrate, puisqu'elle ne donne pas de résultats immédiats, mais **les bénéfices à terme sont souvent inespérés** : c'est le cas des séries du REPHY, dont certaines ont maintenant dix ans, et dont le traitement donne des résultats tout à fait intéressants (en voir un exemple chapitre 6).

Les séries flores totales du REPHY permettent ainsi, entre autres, la comparaison de l'évolution d'une espèce dans deux sites différents, ou la comparaison de l'évolution d'espèces différentes dans un même site. Elles permettent également la mise en évidence de cycles, la détection d'efflorescences atypiques, ou la mise en évidence de l'apparition d'une nouvelle espèce...

La finalité des séries flores totales s'intègre complètement dans la stratégie globale du REPHY, en participant de façon équivalente à ses trois objectifs : outre une meilleure connaissance de la biodiversité, elles permettent également l'étude de la dynamique à long terme des espèces toxiques et nuisibles au sein de leur communauté.

Les principaux travaux effectués sur les séries flores totales du REPHY ont abouti à :

- un manuel descriptif des populations phytoplanctoniques sur le littoral français, avec description de méthodes simples de traitement (1991),
- une publication² dans les actes de la Conférence Internationale Phytoplancton, Nantes, 1993, sur l'identification de structures spatiales à l'échelle nationale,
- une publication³ dans les actes du Colloque International Séries à long terme du PNOG, Arcachon, 1995, sur une étude fine de séries à l'échelle régionale (laboratoire côtier de Sète).

Les documents « **Qualité du Milieu Marin Littoral** » et « **Qualité des eaux littorales en Languedoc-Roussillon** » ont également largement puisé dans ces séries, et quelques laboratoires côtiers travaillent actuellement à une analyse de leurs données (en voir un exemple chapitre 9).

Tout ceci conforte l'intérêt des flores totales réalisées sur l'ensemble du littoral depuis l'existence du réseau et justifie la nécessité d'en maintenir l'existence, sur un nombre limité de points.

Points « flore totale » du REPHY : historique

Dès la création du réseau en 1984, les points dits "de suivi" sont échantillonnés pour flore totale. Les données correspondantes sont saisies dans la base REPHY / REMI à partir de 1987.

Un traitement est effectué dans le cadre du PNOG, en 1991-1992, sur les séries de 31 points sélectionnés. La sélection ne porte dans un premier temps que sur deux critères : longue série (depuis 1987), et série bien documentée (sans « trous »).

Le traitement, en particulier la comparaison des genres dominants de chaque site, aboutit en 1994, à des **propositions écrites de suppression des points redondants**. Ces

² BELIN C., BELIAEFF B., RAFFIN B., RABIA M. and IBANEZ F., 1995. – Phytoplankton time-series data of the French phytoplankton monitoring network : toxic and dominant species. – Harmful Marine Algal Blooms (Proliférations d'algues marines nuisibles). Lassus, Arzul, Erard-Le Denn, Gentien and Marcaillou-Le Baut Eds. Lavoisier, 771-776.

³ LE BEC C., BELIN C., GAERTNER J.C., BELIAEFF B., RAFFIN B. et IBANEZ Frédéric. – Séries temporelles du réseau de surveillance du phytoplancton (REPHY), étude de deux écosystèmes de la côte ouest Méditerranée. Actes du Colloque international sur "Les changements à long terme dans les écosystèmes marins", PNOG (Programme National d'Océanographie côtière), Arcachon, 1-3 février 1995 (sous presse).

propositions, ainsi que le statut actuel des points flore totale, tels qu'ils sont décrits dans QUADRIGE, sont dans le compte-rendu détaillé / 3. En conclusion, **LE NOMBRE DE POINTS flore totale EST RESTÉ ÉGAL À 31, ALORS QU'IL AURAIT DÛ DIMINUER D'ENVIRON 10.**

Il est maintenant urgent de définir précisément quels sont les points qui doivent garder ce statut. Tous les participants sont d'accord pour en réduire le nombre, mais le temps gagné devra être récupéré pour améliorer la détermination pour les flores partielles (voir chapitre 5).

Des propositions seront faites dès que la disponibilité des données dans QUADRIGE permettra de le faire. Il est en effet nécessaire de reprendre l'ensemble de ces 31 séries afin d'avoir des critères objectifs de choix : régularité des observations, diversité des espèces observées, dominances, présence d'espèces rares, etc.

Ces propositions seront accompagnées d'une instruction DEL/D, entérinant l'ensemble des stratégies décrites sur les points REPHY.
--

La liste de référence des espèces phytoplanctoniques du REPHY (1995) décrit en détail les espèces susceptibles d'être identifiées avec les compétences et les moyens dont disposent les laboratoires côtiers, **ainsi que les restrictions éventuelles** (espèces ne pouvant être identifiées que sur des échantillons vivants, espèces pour lesquelles l'identification doit être validée par un expert...).

Le problème des espèces inférieures à une certaine taille (nanoplancton) est évoqué : en effet, celles-ci ne sont pas dénombrées dans tous les laboratoires côtiers. Ce sujet sera évoqué lors de la prochaine session du groupe de travail taxinomie (voir chapitre 4).

REPHY

RÉSEAU DE SURVEILLANCE DU PHYTOPLANCTON ET DES PHYCOTOXINES

Stratégie basée sur la détection des espèces toxiques dans l'eau

économise la surveillance permanente et à priori des coquillages, souvent très contraignante

c'est une stratégie adoptée par la plupart des pays possédant un réseau de surveillance :

présence d'espèces toxiques dans l'eau



facteur déclenchant



analyses de toxines dans les coquillages

Décisions basées sur la quantité de toxines dans les coquillages

la plupart des pays européens utilisent la combinaison des critères phytoplancton / phycotoxines

en France, le paramètre toxines est plus précis que la paramètre phytoplancton (les concentrations dans l'eau de l'espèce *Dinophysis* ne sont pas bien corrélées aux quantités de toxines dans les coquillages)

le double suivi phytoplancton / phycotoxines, pendant un épisode toxique, permet une certaine 'prévision' de la phase de décontamination

Le nombre d'espèces recensées comme nuisibles étant apparemment en augmentation, le programme idéal comporte la détermination de la composition spécifique phytoplanctonique, toute l'année, dans les zones d'élevage et les zones de pêche récréative.

Cependant, ceci n'étant pas réalisable pour toutes les administrations et organisations, la surveillance doit dans ce cas être restreinte aux espèces connues ou suspectées nuisibles.

En soi, la surveillance du phytoplancton n'assure pas une protection suffisante de la santé publique. Il peut cependant assurer une détection précoce, sur laquelle une surveillance intensive des produits d'élevage peut être basée. Pour l'aquaculture, la surveillance du phytoplancton est souvent la seule méthode d'alerte sur la présence d'une espèce nuisible.

CIEM / 1992

Surveillance des efflorescences nuisibles

Il est nécessaire d'avoir, pour la région concernée, une connaissance de base sur les paramètres biologiques et physiques et sur leurs variations spatio-temporelles.

Les occurrences des espèces potentiellement toxiques et du phytoplancton en général, ainsi que l'évidence historique de leurs effets, sont des informations prioritaires.

UNESCO / COI / 1996

FLORE TOTALE

détermination et quantification de TOUTES
les espèces RECONNAISSABLES

FLORE PARTIELLE

détermination et quantification des espèces
TOXIQUES, NUISIBLES ET DOUTEUSES

une FLORE PARTIELLE nécessite :

- ⇒ une observation de toutes les espèces présentes
- ⇒ l'identification d'un nombre important d'espèces

FLORE TOTALE

sa pratique régulière permet de garder une VIGILANCE SUFFISANTE pour les espèces potentiellement toxiques, nuisibles et douteuses

les séries historiques sur les populations phytoplanctoniques fournissent des informations précieuses si apparition d'une nouvelle espèce toxique, ou si une variété d'une espèce endémique devient toxique

Gymnodinium cf. nagasakiense

Heterosigma carterae

Pseudonitzschia

Prorocentrum minimum

Gymnodinium cf. breve

Gymnodinium catenatum....

ESPECES TOXIQUES, NUISIBLES OU DOUTEUSES observées en France

ESPECES TOXIQUES

Alexandrium minutum

Dinophysis sp.

Dinophysis acuminata

Dinophysis caudata

Dinophysis rotundata

Dinophysis sacculus

Dinophysis tripos

Prorocentrum lima

Gymnodinium cf. *nagasakiense* (= *G.* cf. *mikimotoi* = *Gyrodinium aureolum*)

Heterosigma carterae (= *H. akashiwo*)

ESPECES NUISIBLES OU DOUTEUSES

Dictyocha speculum

Fibrocapsa japonica

Gymnodinium 'sp.1982'

Gyrodinium spirale

Lingulodinium polyedra (= *Gonyaulax polyedra*)

Olisthodiscus sp.

Phaeocystis

ESPECES A SURVEILLER : potentiellement toxiques

TOUTES LES ESPECES DE :

Alexandrium

Dinophysis

Gymnodinium

☞ *G. breve* + *G. cf. breve* (= *Ptychodiscus brevis*)

☞ *G. catenatum*

Gyrodinium

Prorocentrum

⚡ *P. minimum*

Pseudonitzschia

☞ *P. pseudodelicatissima*

CERTAINES ESPECES DE :

Chattonella, *Chrysochromulina*, *Microcystis*...

FLORES TOTALES

■ Objectif

- Pourquoi des séries à long terme ?

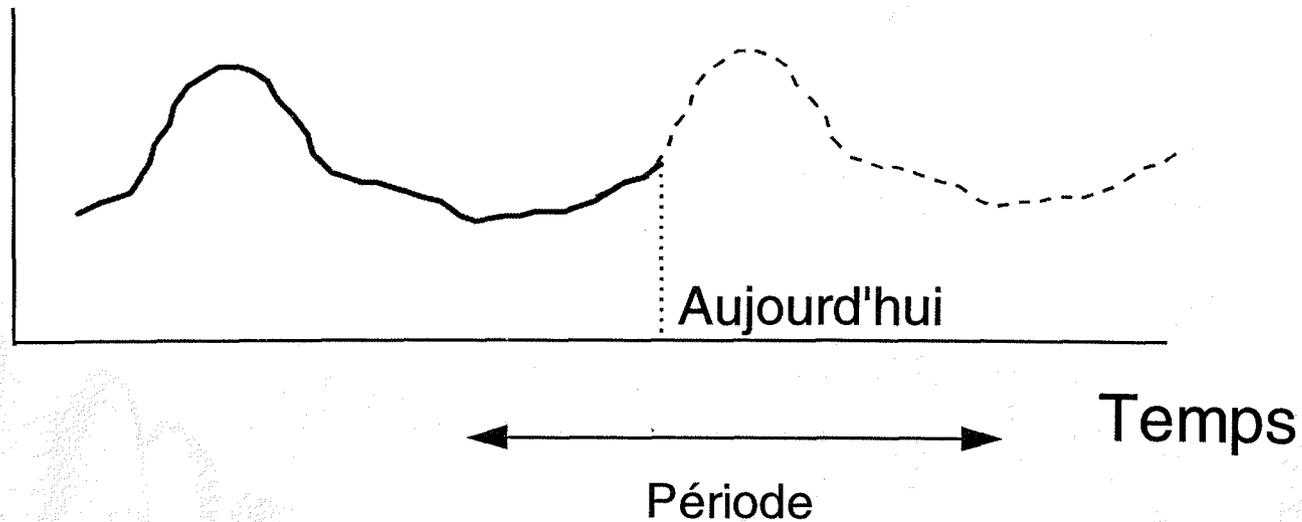
■ Stratégies

■ Traitement des données

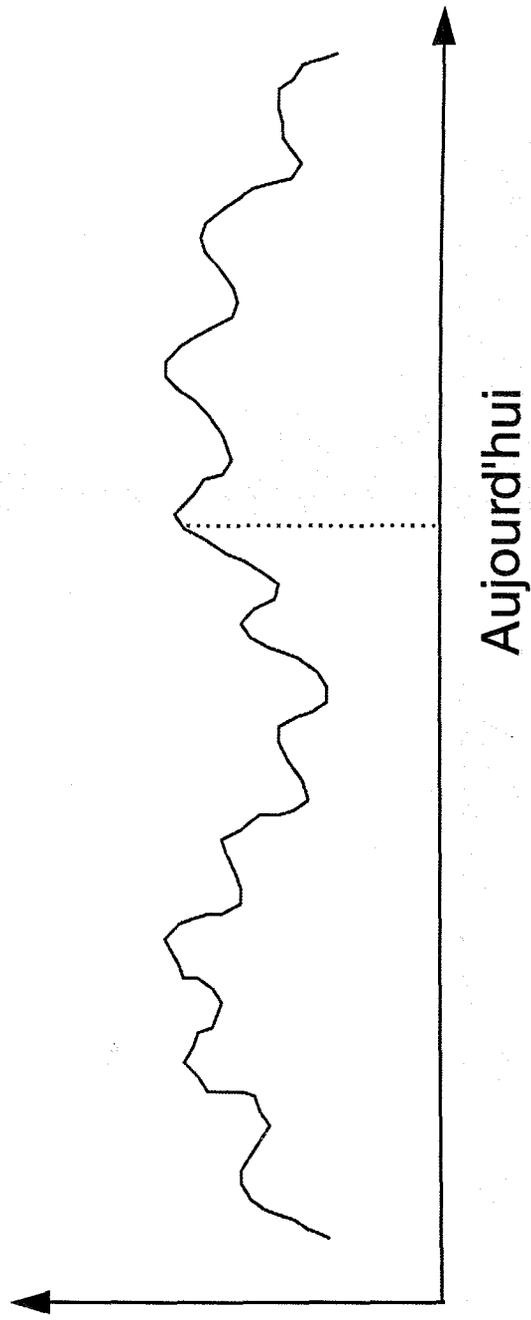
- Méthodes
- Résultats

Séries à long terme ? (1)

- Etude des fluctuations périodiques
- Estimation de la tendance

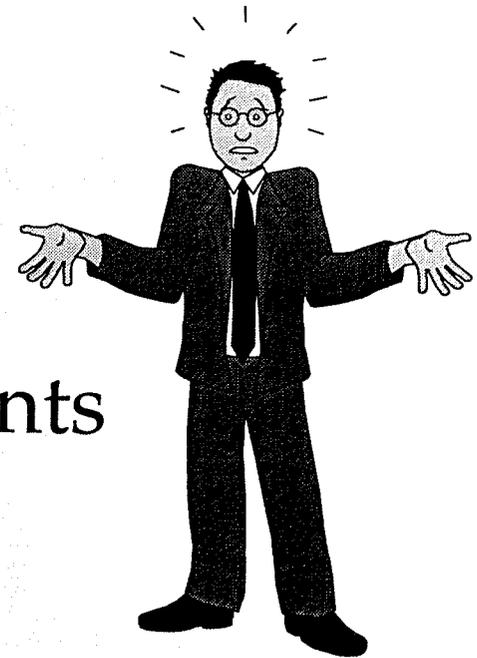


Séries à long terme ? (2)



Séries à long terme ? (3)

- Coûteux
- Exigeant
- Routinier
- Bénéfices pas forcément évidents

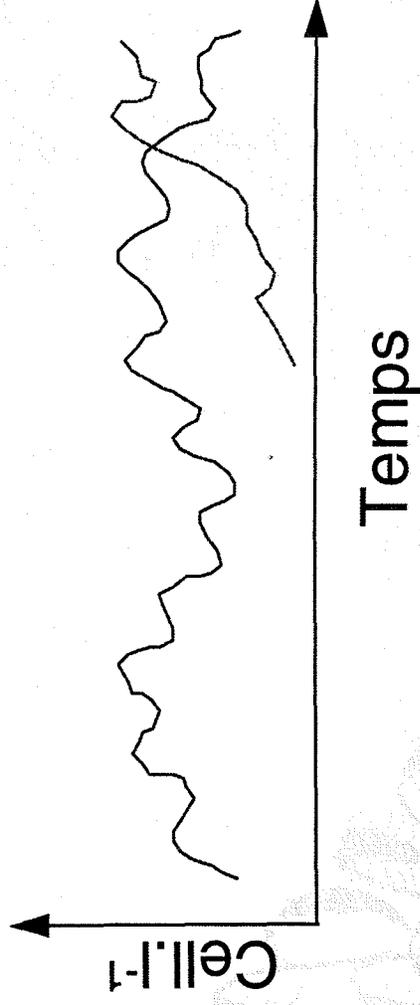
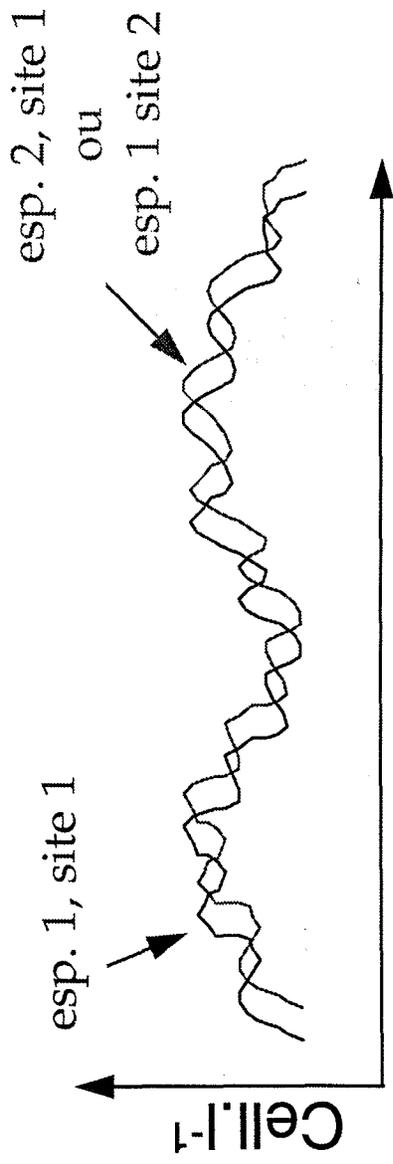


Séries à long terme ? (4)

- Information essentielle sur les fluctuations pluri-annuelles
- Bénéfices parfois inespérés



Séries flores totales : objectifs (1)



Séries flores totales : objectifs (2)

- Evolution dans le temps et dans l'espace des populations phytoplanktoniques
 - Fluctuations saisonnières (*Blooms*)
 - Phénomènes "apériodiques"
 - ◆ Apparition ou disparition d'un nouveau taxon
 - ◆ *Blooms* dits "sporadiques"

Séries flores totales : finalités

■ Environnementale

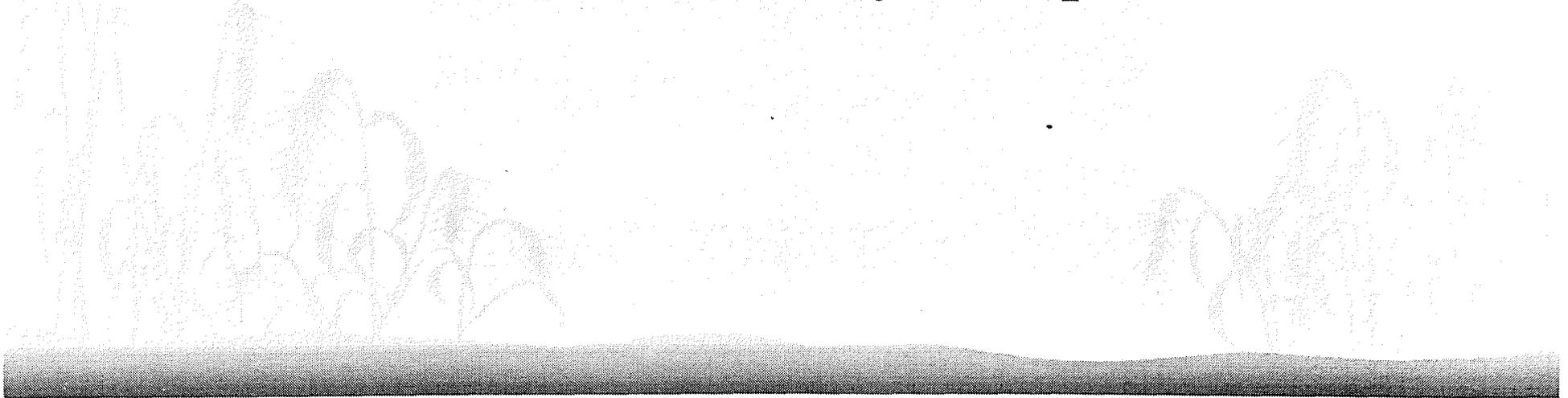
- Générale : biodiversité et meilleure connaissance du milieu marin
- Spécifique : indice d'évolution de la production en milieu marin

■ Protection de la santé animale ou humaine

- Dynamique à long terme des espèces toxiques ou nuisibles au sein de leur communauté
- Interaction avec la stratégie "flore partielle"

Flores totales : stratégies (1)

- Couverture du littoral
- Fréquence bimensuelle
- Echantillonnage à un niveau de profondeur au seau (côte) ou à la bouteille (large)
- Covariables : température, salinité, météorologiques, hydrodynamiques,...



Flores totales : stratégies (2)

■ Représentativité spatiale

- Petite échelle : verticale ?
- Grande échelle : comparaison inter-sites

■ Représentativité temporelle

- Mise en évidence de cycles
- Détection d'efflorescences atypiques

Méthodes et résultats (1)

- Développement d'une base méthodologique pour la **description des données**



Manuel

***Les populations phytoplanctoniques
sur le littoral français***

Résultats préliminaires

Méthodes et résultats (2)

- Identification de structures spatiales à l'échelle nationale : classification



**Communication (Nantes, 1993)
*Les séries chronologiques du réseau
de surveillance phytoplanctonique : genres
dominants et espèces toxiques***

Méthodes et résultats (3)

- Etude fine des séries chronologiques à l'échelle régionale : Sommes Cumulées et Analyse en Composantes Principales (ACP)



**Communication (Arcachon, 1995)
*Séries temporelles du REPHY
Etude de deux écosystèmes
de la côte ouest-Méditerranée***

Méthodes et résultats (4)

SYNTHESES

- A l'échelle nationale
 - Atlas Q.M.M.L.
- A l'échelle régionale
 - Suivi des efflorescences phytoplanctoniques en Charente-Maritime
 - Qualité des eaux littorales en Languedoc-Roussillon
 - Les Flores Totales du Finistère

retenus PNOC 92	propositions septembre 1994	points flore totale actuels	
--------------------	-----------------------------	--------------------------------	--

Boulogne

			01001022 Dunkerque- Calais	point SRN / REPHY
003019	A GARDER 2 points sont suffisants		02003019 Boulonnais	
006001			03006001 Baie de Somme	

Port en Bessin

			05010xxx Antifer	Antifer ponton pêche
013006	A GARDER avec Université de Caen		06013006 Courseulles- Port en Bessin	
014016	A SUPPRIMER prélèvement dans réserves d'eau			
021001				

retenus PNOC 92	propositions septembre 1994	points flore totale actuels	
--------------------	-----------------------------	--------------------------------	--

St Malo

023001	genres dominants ☞ point proche de 027001	1 ou 2 de ces 4 points peuvent être SUPPRIMES		
025001	genres dominants ☞ point proche de 029001		12025001 Arguenon-Fresnaye	
027001	genres dominants ☞ point proche de 023001			
029001	genres dominants ☞ point proche de 025001		14029001 Paimpol-Trieux-Bréhat	

La Trinité

047002	genres dominants ☞ points proches	point côtier ☞ A SUPPRIMER		
049001		point au large ☞ A GARDER	25049001 Baie de Quiberon	
057005		A GARDER	27057005 Baie de Vilaine	

retenus PNOC 92	propositions septembre 1994	points flore totale actuels	
--------------------	-----------------------------	--------------------------------	--

Concarneau

033001	genres dominants ☞ point proche du groupe 039/041	les 3 points A GARDER	16033001 Baie de Morlaix	
037001	genres dominants ☞ point proche du groupe 039/041/033		☞ rôle d'expert	
		☞ très bien répartis sur littoral	18038025 Aulne-Rade de Brest	nouveau point FT (remplace 037001)
039001	genres dominants ☞ points proches	OK pour création nouveau point en 041	19039001 Baie de Douarnenez	
041001				
			21041003 Les Glénans	FT depuis 1994

La Tremblade

070001	l'un de ces deux points est A GARDER			
070002			32070002 Nord Marennes Oléron	
			32071002 Sud Marennes Oléron	depuis 1995

retenus PNOC 92	propositions septembre 1994	points flore totale actuels	
--------------------	-----------------------------	-----------------------------------	--

Nantes

057007	n'est plus échantillonné en flore totale ☞ A SUPPRIMER			
	étant donné la proximité de points FT en 057, le nouveau point 057058 est à laisser en FP		27057058 Baie de Vilaine	depuis 1994
059001	A GARDER		27059001 Traicts du Croisic	
061001	n'est plus échantillonné en flore totale ☞ A SUPPRIMER			
	Création d'un nouveau point flore totale en 061 à voir		28061004 Baie de Bourgneuf	depuis 1994

La Rochelle

065002	genres dominants ☞ point plus proche des points en 070 que de ceux en 066 et 068 A GARDER		30065002 Pertuis Breton	
066001	genres dominants ☞ points proches	A SUPPRIMER		
068003		A GARDER	31068003 Chatellaillon- Ile d'Aix	

retenus PNOc 92	propositions septembre 1994	points flore totale actuels	
--------------------	-----------------------------	--------------------------------	--

Arcachon

077004	A GARDER		34077004 Bassin d'Arcachon	
--------	----------	--	-------------------------------	--

Sète

081002	genres dominants ☞ points proches	2 régions 2 écosystèmes ☞ A GARDER Etude ultérieure PNOc	36081002 Côte audoise	
083002			36083002 Etang de Salses Leucate	
087001	genres dominants ☞ points proches		37087001 Etang de Thau	
088002			37088002 Côte languedocienne	

retenus PNOC 92	propositions septembre 1994	points flore totale actuels	
--------------------	-----------------------------	--------------------------------	--

Toulon

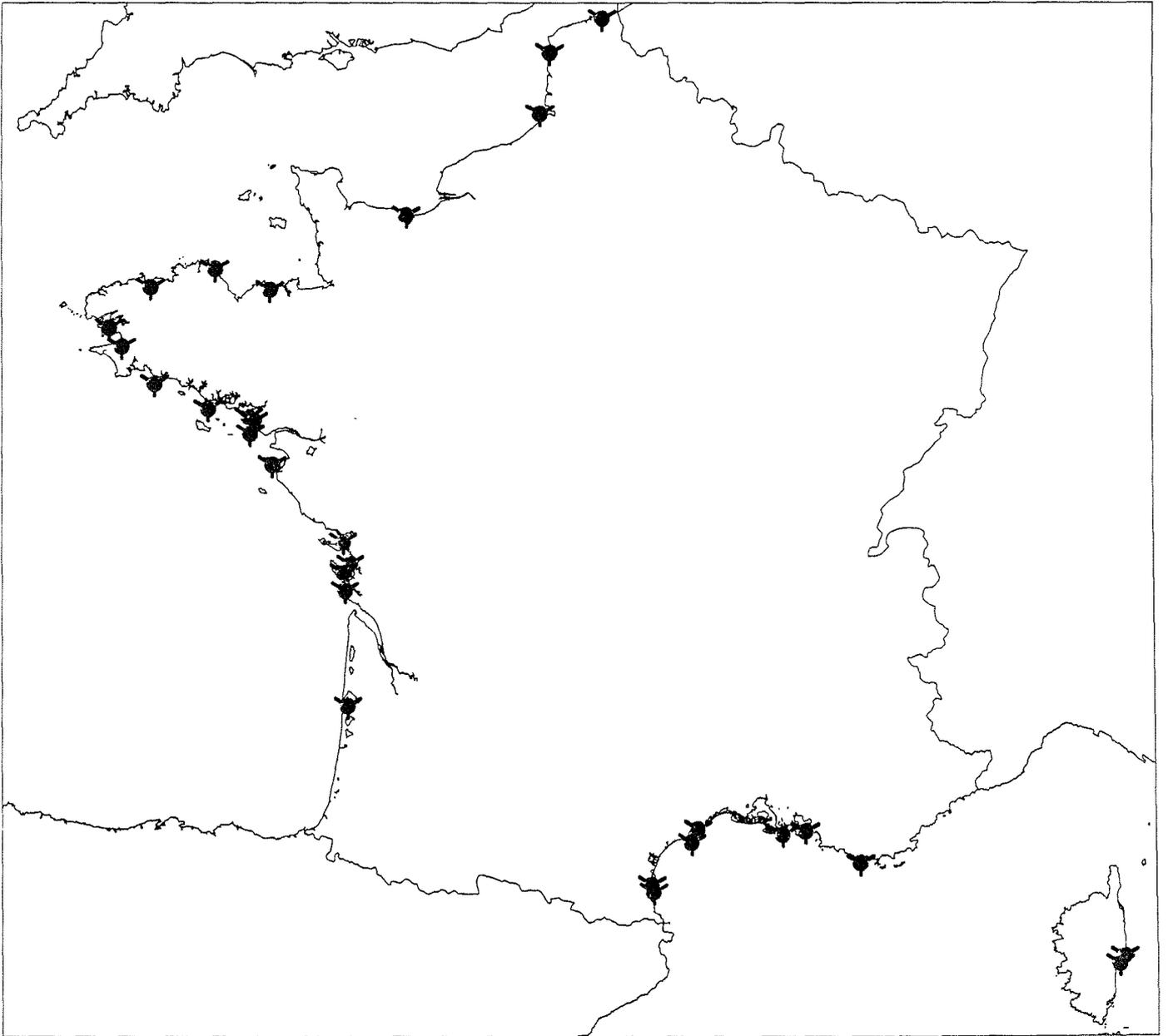
	Pas de points flore totale en 093		
094002	A GARDER Pas d'autres points FT en 094 Ajouter éventuellement un point en 095 (spécificité étang)		38094002 Golfe de Fos
			38095001 Berre Vaine FT depuis 1991?
100001	A GARDER		40100001 Rade de Toulon
			41109xxx Baie des Anges Nouveau point / station zoo Villefranche

Corse

			43114001 Etangs de Diana Urbino	FT depuis 1994?
			43114002	

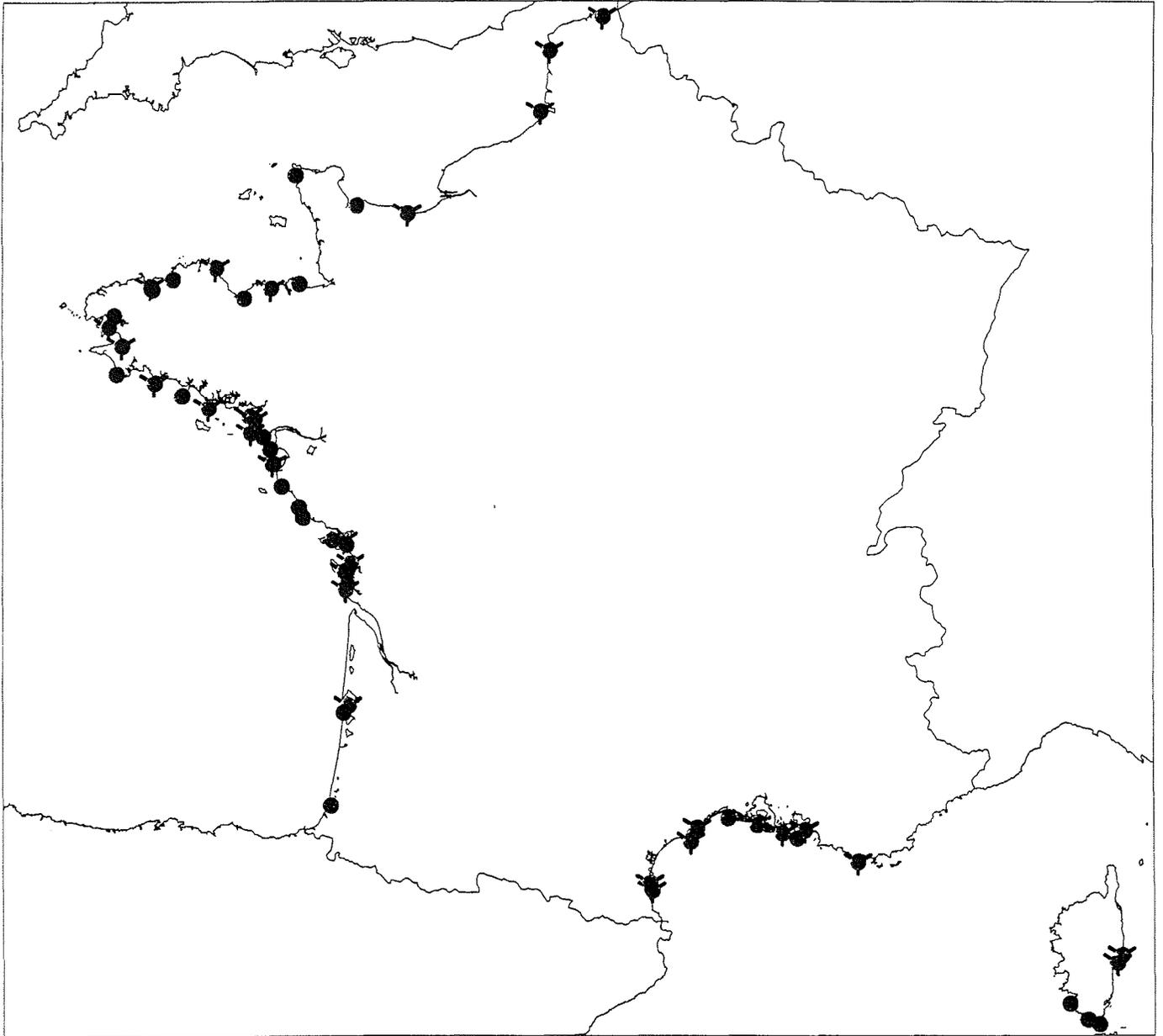
REPHY

📍 Points flore totale



REPHY

- Points flore partielle régulière
- ✚ Points flore totale



– 4 –

Point sur les méthodes utilisées dans REPHY

Extrait du rapport CIEM, "Effects of Harmful Algal Blooms on Mariculture and Marine Fisheries", 1992

Sommaire du "Manual on Harmful Marine Microalgae", UNESCO, 1995

4. Point sur les méthodes utilisées dans REPHY.

Les méthodes de prélèvement, d'observation du phytoplancton, d'analyse des toxines, et de mesure des paramètres physico-chimiques, ont évolué depuis la création du REPHY. Les différents documents écrits, souvent transmis sous couvert d'une simple note, ne sont pas référencés et sont quelquefois obsolètes.

Il était donc urgent de réfléchir à un document de référence des méthodes REPHY, en attendant un ouvrage plus général sur les méthodes utilisées pour la surveillance à IFREMER.

Un point est fait sur les recommandations internationales à ce sujet, et sur ce qui est effectivement fait dans le cadre du REPHY. Seules les méthodes sont examinées ici, et non la pertinence des paramètres mesurés.

Sources des recommandations internationales

Trois documents de référence ont été retenus, parce qu'ils sont proposés par des instances reconnues, comme le CIEM (Conseil International pour l'Exploration de la Mer), et la COI (Commission Océanographique Internationale) de l'UNESCO :

- le document CIEM / 1992⁴ est une **compilation d'avis et de recommandations sur les stratégies et les méthodes**. Ce n'est pas un manuel, mais plutôt un ouvrage général. Son édition ayant pris beaucoup de temps, il est parfois déjà périmé, en particulier en ce qui concerne les méthodes d'analyse des phycotoxines. Le chapitre sur la surveillance des espèces nuisibles mérite toutefois d'être examiné : une traduction en a été faite dans le compte-rendu détaillé / 4.
- le 1er document COI⁵, tout juste publié, fait une **synthèse des programmes de surveillance existant dans le monde** (voir chapitre 1 pour plus de détails).
- le 2ème document COI⁶ est un **manuel**, qui vient également d'être publié, et décrivant dans le détail de nombreuses **méthodes** relatives aux microalgues marines nuisibles (voir sommaire dans le compte-rendu détaillé / 4).

Tous ces documents sont en anglais. En conclusion d'une discussion qui a lieu sur le sujet, il n'est pas possible d'envisager une traduction systématique de tous les documents et de toutes les publications intéressantes.

⁴ Effects of Harmful Algal Blooms on Mariculture and Marine Fisheries. ICES Cooperative Research Report, n° 181, 1992.

⁵ Design and Implementation of some Harmful Algal Monitoring Systems (IOC technical series n°44, UNESCO, 1996).

⁶ Manual on Harmful Marine Microalgae.- Hallegraeff G.M., Anderson D.M. and Cembella A.D. Eds.- IOC Manuals and Guides No. 33, UNESCO 1995.

Méthodes REPHY

Les méthodes utilisées sont théoriquement identiques dans tous les laboratoires côtiers. Le plus souvent, soit elles sont complètement différentes (mesure de certains paramètres physico-chimiques), soit elles ont divergé à partir d'une même méthode de base (analyse des toxines).

Analyse des toxines

Un « **Manuel des méthodes de détection des phycotoxines DSP et PSP pour REPHY** » (avril 1996) est distribué à tous les participants.

Il s'agit d'un **rapport provisoire**, soumis au comité de lecture des rapports internes de la DEL. **Ce manuel est à usage strictement interne**, puisqu'un certain nombre de commentaires sur les erreurs à ne plus faire y ont été introduits : par exemple, l'interprétation du test souris PSP réalisé à IFREMER ne suivait pas exactement la méthode officielle. Son édition sous une forme rapport interne est une étape préliminaire à une publication dans un ouvrage de référence.

En attendant, **CE MANUEL DOIT D'ORES ET DÉJÀ ÊTRE CONSIDÉRÉ COMME LE MANUEL DE RÉFÉRENCE POUR REPHY**, et sa diffusion sous sa forme définitive, après corrections, sera accompagnée d'une instruction DEL/D. **Il est impératif de respecter intégralement la méthode décrite : les modifications ultérieures feront l'objet de nouvelles versions écrites**, mais ne doivent être appliquées qu'après réception de celles ci.

Tous les commentaires relatifs au manuel des méthodes, doivent être envoyés par écrit ou par mail à C. Belin, qui assurera le suivi des versions successives.

Prélèvements d'eau pour observation du phytoplancton

En comparant ce qui est actuellement effectué, les modifications proposées et qui n'ont pas été ou qui n'ont pas pu être prises en compte, et les recommandations internationales (voir compte-rendu détaillé / 4), il en ressort que **deux méthodes de prélèvement devraient être associées** :

- **trait de filet à plancton** sur la hauteur d'eau, permettant une détection précoce des espèces toxiques présentes en faible concentration, pour une **analyse qualitative**,
- **bouteille à prélèvement** sur plusieurs profondeurs (avec éventuellement un mélange des échantillons pour avoir un échantillon représentatif de la colonne d'eau), **OU tube** prélevant un échantillon intégré de la colonne d'eau, pour une **analyse quantitative**.

Des prélèvements au filet à plancton sont actuellement réalisés régulièrement dans deux laboratoires côtiers. Le paramètre correspondant va prochainement être créé dans QUADRIGE, et sera inclus dans la description de la stratégie pour les points accessibles en bateau.

Observation du phytoplancton

L'identification des espèces phytoplanctoniques est très liée à la méthode de prélèvement et à la méthode d'observation.

Les recommandations internationales montrent que :

- l'**observation microscopique** reste la méthode conseillée (microscope inversé, ou mieux, en épifluorescence),
- l'**identification** des espèces n'est efficace que sur des échantillons **vivants**, les échantillons **fixés** servant à la **quantification**,
- la mesure de la **chlorophylle** ne peut remplacer l'observation des espèces, même si elle en est un complément intéressant.

Tous les détails de la méthode utilisée pour REPHY, sont à re-préciser : fixation, dilution éventuelle, sous échantillonnage..., de nombreuses divergences ayant été constatées.

Identification du phytoplancton

Le travail réalisé par un groupe de taxinomistes (IFREMER et non IFREMER) de 1992 à 1995, sur la liste des espèces décrites dans l'ancienne base de données, a permis d'aboutir en 1993 puis en 1995, à une **LISTE DE RÉFÉRENCE REPHY DES ESPÈCES PHYTOPLANCTONIQUES**, comportant un certain nombre d'indications, par exemple sur la toxicité potentielle, sur la nécessité d'une expertise pour une identification fiable, sur la confusion possible avec d'autres espèces, etc.

Cette liste a servi de base à la description des taxons phytoplanctoniques dans QUADRIGE, recensés dans l' « **Édition des taxons décrits dans QUADRIGE** » (mai 1996), et n'évoluera plus maintenant que de façon assez mineure.

Conclusions

Les différentes méthodes utilisées pour REPHY sont, soit à ré-écrire complètement, soit en cours de rédaction.

Il est donc proposé la création de **GROUPES DE TRAVAIL THÉMATIQUES** ayant pour **objectif la production d'un document écrit**, et dont les tâches seront :

- ⇒ une validation du choix des méthodes, paramètre par paramètre,
- ⇒ des tâches spécifiques à décrire,
- ⇒ la rédaction détaillée des méthodes.

Les participants actuellement identifiés sont listés ci dessous. Les volontaires supplémentaires seront les bienvenus. Les animateurs pressentis sont le ou les deux premiers de chaque groupe, à confirmer. Les premières réunions de chaque groupe devront se faire à partir de septembre 1996 (coordination générale des réunions : Catherine Belin), et les documents devront être prêts pour les prochaines journées REPHY (automne 1997).

Groupe de travail ***Prélèvement d'eau pour observation du phytoplancton / échantillonnage***

Le thème inclut l'aspect stratégie d'échantillonnage, non dissociable de l'aspect prélèvement. Une des tâches spécifiques sera la description des méthodes de prélèvement, par type de point (point à la côte, point au large...).

Benoit Beliaeff (QM/Nantes)
Patrick Gentien (ECP/Brest)
Jacky Chauvin (La Trinité)
Jacqueline Legrand (Port en Bessin)
Didier Le Guay (L'Houmeau)
Nadine Neaud-Masson (Arcachon)
Pierre Raguenes (Concarneau)
Dominique Soudant (QM/Nantes)

Groupe de travail ***Identification du phytoplancton / taxinomie***

Ce groupe existe depuis 1992. Deux documents sont disponibles : le « Guide pratique à l'usage des analystes du REPHY » (dernière mise à jour : avril 1996), et la « liste de référence REPHY des espèces phytoplanctoniques » (1995).

Une des tâches spécifiques sera de préciser les conditions d'observation requises pour une meilleure fiabilité de l'identification (par exemple : espèces non identifiables sans dissection).

Elisabeth Nezan (Concarneau)
Chantal Billard (Université/Caen)
Marie Josèphe Dinet (CNRS/Banyuls)
Evelyne Erard-Le Denn (ECP/Brest)
Patrick Lassus (PN/Nantes)
Mireille Ryckaert (AA/Brest)

Groupe de travail *Phycotoxines*

Le document de travail sera le « Manuel des méthodes de détection des phycotoxines DSP et PSP pour REPHY » (avril 1996). Une des tâches spécifiques sera de le modifier pour en faire un véritable document de référence. L'évolution des méthodes existantes, corollaire à l'harmonisation européenne (DSP), ainsi que la mise en place de nouvelles méthodes (test de cytotoxicité), seront également étudiées.

Claire Le Baut (PN/Nantes)
Zouher Amzil (PN/Nantes)
Christian Cantin (Arcachon)
Martial LeDoux (CNEVA/Paris)
Dominique Le Gal (Concarneau)
Sylvie Margat (L'Houmeau)

Groupe de travail *Paramètres physico-chimiques*

Une des tâches spécifiques du groupe sera de désigner les méthodes recommandées, pour chaque paramètre, parmi celles qui sont actuellement utilisées, et d'en préciser les conditions d'application.

Michel Joanny (QM/Brest)
Alain Aminot (CMCN/Brest)
Mireille Fortune (Nantes)
Dominique Le Gal (Concarneau)

MÉTHODES / REPHY

PHYCOTOXINES

⇒ Manuel des méthodes de détection des phycotoxines DSP et PSP pour REPHY (avril 96)

PARAMÈTRES PHYSICO-CHIMIQUES

PRÉLÈVEMENTS

- ◆ coquillages
- ◆ eau ⇒ phytoplancton

PHYTOPLANCTON

- ◆ méthodes d'observation
- ◆ identification / taxonomie

DOCUMENTS DE RÉFÉRENCE

CIEM / 1992

**EFFETS DES EFFLORESCENCES PHYTOPLANCTON-
NIQUES NUISIBLES SUR LA CONCHYLICULTURE
ET L'AQUACULTURE**

***EFFECTS OF HARMFUL ALGAL BLOOMS ON MARICULTURE
AND MARINE FISHERIES***

**RAPPORT DES RECHERCHES COLLECTIVES CIEM, N° 181
Conseil International pour l'Exploration de la Mer**

UNESCO / COI / 1996

**MISE EN OEUVRE DES PROGRAMMES DE
SURVEILLANCE DU PHYTOPLANCTON ET DES
PHYCOTOXINES**

***DESIGN AND IMPLEMENTATION OF HARMFUL ALGAL
BLOOM (HAB) MONITORING SYSTEMS***

sous presse

UNESCO / COI / 1996

**MANUEL SUR LES MICROALGUES MARINES
NUISIBLES**

MANUAL ON HARMFUL MARINE MICROALGAE

sous presse

REPHY / STRATÉGIES

Méthodes différentes utilisées par les laboratoires côtiers pour certains paramètres.

	TEMP	SALINITÉ	CHLORO	TS DSP
Boulogne	thermomètre	titrage du chlorure	spectro	acétone
Port en Bessin	sonde de température	conductimétrie / sonde de salinité	spectro	acétone
Saint Malo	sonde de température	conductimétrie / salinomètre	spectro	acétone
Concarneau	sonde de température ou thermomètre	conductimétrie / salinomètre	spectro	acétone
La Trinité	sonde de température	conductimétrie / salinomètre	spectro	acétone
Nantes	thermomètre	conductimétrie / salinomètre	fluo	acétone
La Rochelle	sonde de température	conductimétrie / salinomètre	fluo	acétone
La Tremblade	sonde de température	conductimétrie / salinomètre	fluo	acétone
Arcachon	thermomètre	conductimétrie / salinomètre	fluo	dichloro
Sète	sonde de température	conductimétrie / salinomètre	spectro	dichloro
Toulon	thermomètre	conductimétrie / salinomètre	spectro	acétone
Corse	thermomètre	conductimétrie / salinomètre	spectro	acétone

PRÉLÈVEMENTS D'EAU

ce qui est fait dans REPHY

seau ⇒ points à la côte
bouteille ⇒ points au large
filet à plancton ⇒ parfois

en surface ou à -1 m
rarement à 2 ou 3 profondeurs

méthodes discutées lors des journées REPHY

1993

- ↳ tube / intégration de la colonne d'eau
- ↳ prélèvement à 3 profondeurs pour certains points

1994

- ↳ intérêt prélèvement au filet
- ↳ application techniques du microzooplancton

PRÉLÈVEMENTS D'EAU

trait vertical au filet à plancton (20-30 μm)

☞ méthode qualitative pour détection espèces à faible concentration

☞ permet détection très précoce de la présence d'une espèce toxique dans la colonne d'eau

mais les espèces petites ou fragiles ne peuvent être correctement collectées de cette manière

○ les espèces toxiques ne sont pas toutes collectées au filet

○ des données quantitatives sont nécessaires

☞ nécessité de prélever un échantillon intégrant la colonne d'eau (tube)

☞ nécessité de prélever aussi des échantillons d'eau à plusieurs profondeurs pour estimer la concentration cellulaire maximum

CIEM / 1992

Prélèvement pour analyse qualitative et quantitative

☞ filet à plancton (20 μm) + bouteille (Niskin, Nansen)

OU ☞ tube

POUR ANALYSE QUALITATIVE

☞ trait de filet vertical sur la hauteur d'eau intéressante (plusieurs fois si hauteur faible)

POUR ANALYSE QUANTITATIVE

☞ bouteille à plusieurs profondeurs, choisies en fonction de la hauteur d'eau (intervalles 2-5 m)

les échantillons peuvent être mélangés pour faire un échantillon représentatif de la colonne d'eau

☞ alternative = tube

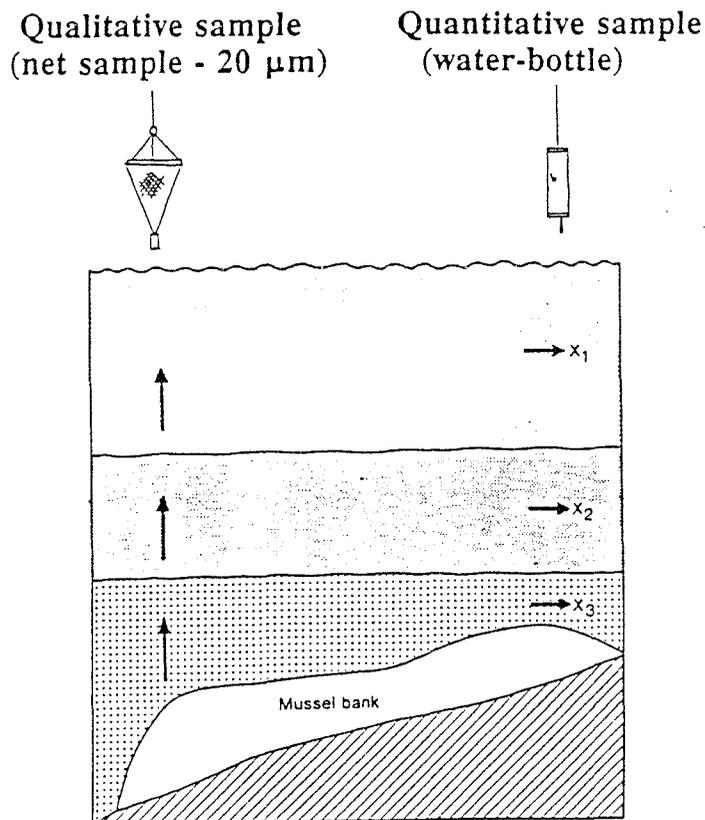
UNESCO / COI / 1996

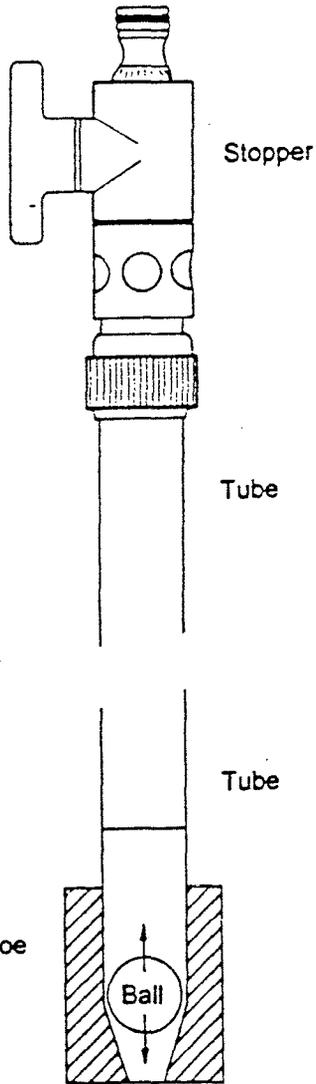
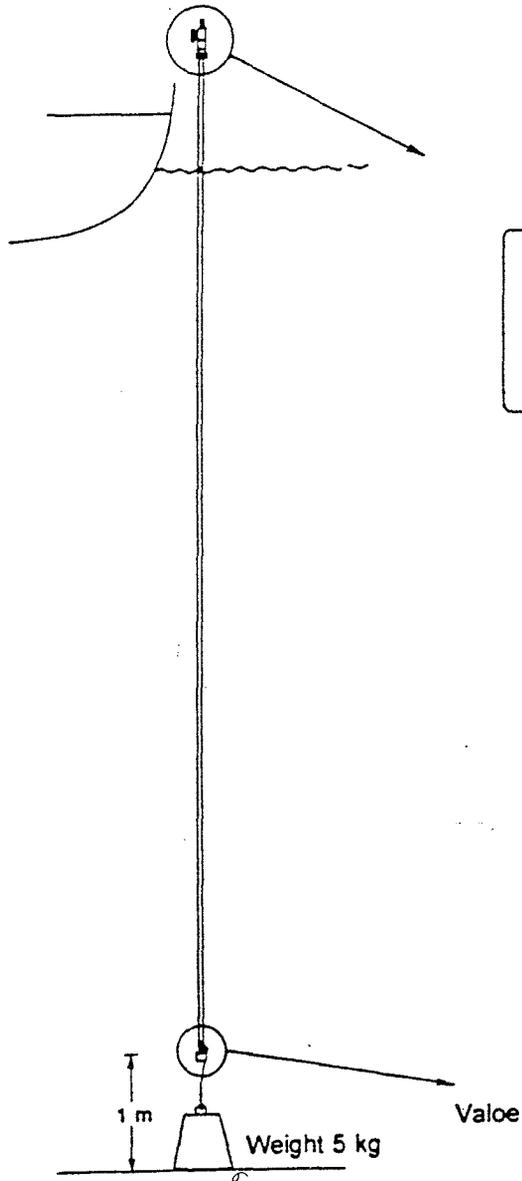
PRÉLÈVEMENTS D'EAU

trait de filet	ET	bouteille ou tube
↓		↓
analyse qualitative (identification)		analyse quantitative

TUBE  nécessite matériel non disponible actuellement

BOUTEILLE  mélange de trois échantillons (1, 3, 5 m par exemple)





OBSERVATION DU PHYTOPLANCTON

La seule méthode sans ambiguïté pour détecter la présence d'une espèce toxique → observation microscopique

identification	←	échantillons vivants
quantification	←	échantillons fixés

Chlorophylle → méthode standard pour la quantification de la biomasse phytoplanctonique

→ peut être utilisée pour séries temporelles sur l'accumulation de la biomasse algale

mais ne distingue pas les espèces individuellement

certaines espèces nuisibles ne représentent qu'un faible pourcentage de l'ensemble du phytoplancton

→ la seule estimation de la chlorophylle ne peut être utilisée comme outil de surveillance des espèces toxiques

LE GROUPE DE TRAVAIL CONSIDÈRE COMME ESSENTIEL QUE LA PRIORITÉ SOIT DONNÉE À L'OBSERVATION MICROSCOPIQUE DU PHYTOPLANCTON

OBSERVATION DU PHYTOPLANCTON

**analyse qualitative sur échantillons vivants
avant analyse quantitative**

analyse quantitative / microscope inversé

- très adaptée aux concentrations faibles et moyennes (< 1000 cellules par litre)
- si la concentration est forte (> 1000 cellules par litre) → dilution par filtration

sédimentation

- ⇒ environ 12 heures pour grandes cellules (>10µm)
- ⇒ environ 24 heures pour petites cellules

analyse quantitative / microscopie en épifluorescence

- très adaptée aux concentrations faibles et moyennes (< 1000 cellules par litre)
- avantages
 - ↳ préparation rapide de grands volumes d'échantillons
 - ↳ excellente discrimination des dinoflagellés à thèque, même en faible concentration dans un échantillon chargé en phytoplancton

en situation de bloom monospécifique

→ chlorophylle très utile

Code	Nom	Groupe taxinomique	Groupe écologique	Expertise nécessaire	Identification seulement sur vivant	Confusion possible	Nuisible ou douteuse	Potentiellement toxique
ALEX	<i>Alexandrium sp.</i>	Dinophycées cuirassées				KRYP + PROI (FRAI)		certaines espèces
ALEXMIN	<i>Alexandrium minutum</i>	Dinophycées cuirassées	côtière			ALEXAND		
CHRU	<i>Chrysochromulina sp.</i>	Prymnésio phycées / Haptophycées	ubiquiste			MICO + PRYM PHAE (cellules mobiles)		certaines espèces
DINOACU	<i>Dinophysis acuminata</i> + <i>D. cf. acuminata</i>	Dinophycées cuirassées	côtière			DINOSAC		
DINOCAU	<i>Dinophysis caudata</i>	Dinophycées cuirassées	côtière					
GYMN	<i>Gymnodinium sp.</i>	Dinophycées nues						certaines espèces
GYMN-82	<i>Gymnodinium 'sp. 1982'</i>	Dinophycées nues	côtière					
GYMNCAT	<i>Gymnodinium catenatum</i>	Dinophycées nues	côtière					
GYMNNAG	<i>Gymnodinium cf. nagasakiense</i> (= <i>Gymnodinium mikimotoi</i> = <i>Gyrodinium cf. aureolum</i>)	Dinophycées nues	côtière					
SKELCOS	<i>Skeletonema costatum</i>	Diatomophycées centrales	côtière					

RAPPORT DES RECHERCHES COLLECTIVES CIEM
ICES COOPERATIVE RESEARCH REPORT
N° 181

**EFFETS DES EFFLORESCENCES PHYTOPLANCTONIQUES
NUISIBLES SUR LA CONCHYLICULTURE ET L'AQUACULTURE**
*EFFECTS OF HARMFUL ALGAL BLOOMS ON MARICULTURE AND
MARINE FISHERIES*

Conseil International pour l'Exploration de la Mer
International Council for the Exploration of the Sea

Traduction française
Catherine BELIN
IFREMER / Nantes

3. SURVEILLANCE DES ESPÈCES PHYTOPLANCTONIQUES NUISIBLES

3.1. Introduction

Les efflorescences de phytoplancton nuisible peuvent avoir des impacts importants, outre ceux sur la santé publique, sur l'utilisation des eaux côtières pour l'aquaculture, la conchyliculture, et la pêche récréative. Etant donné la nécessité de réduire les pertes économiques provoquées par ces efflorescences, deux stratégies de surveillance ont été utilisées :

- observation des apparitions de phytoplancton nuisible dans les eaux côtières,
- analyse des toxines dans les produits.

Il est essentiel, lors de la mise en oeuvre des programmes de surveillance, de s'assurer que :

- la mise en évidence des espèces toxiques et de la toxicité soit effectuée suffisamment tôt pour protéger la santé publique et pour prendre les mesures adéquates,
- les programmes de surveillance aient un bon rapport cout / efficacité.

Les programmes de surveillance dépendent en partie de la compréhension de l'hydrographie et de l'écologie du phytoplancton dans la zone concernée. Dans certaines régions, l'absence de données peut rendre difficile le développement d'un programme adapté : il n'y a alors pas d'autre alternative que de commencer par une surveillance extensive, qui sera ajustée au fur et à mesure de la disponibilité des informations. C'est ainsi que l'hydrographie et l'écologie du phytoplancton sont des considérations importantes à prendre en compte dans le développement de programmes de surveillance adaptés.

3.2. Surveillance du phytoplancton

INTRODUCTION

Le nombre d'espèces recensées comme nuisibles étant apparemment en augmentation, le programme idéal comporte la détermination de la composition spécifique phytoplanctonique, toute l'année, dans les zones d'élevage et les zones de pêche récréative. Cependant, ceci n'étant pas réalisable pour toutes les administrations et organisations, la surveillance doit dans ce cas être restreinte aux espèces connues ou suspectées nuisibles.

En soi, la surveillance du phytoplancton n'assure pas une protection suffisante de la santé publique. Il peut cependant assurer une détection précoce, sur laquelle une surveillance intensive des produits d'élevage peut être basée. Pour l'aquaculture, la surveillance du phytoplancton est souvent la seule méthode d'alerte sur la présence d'une espèce nuisible.

POINTS DE PRELEVEMENT INITIAUX

Pour établir la première grille d'échantillonnage, un certain nombre de facteurs sont à considérer, comme décrit ci-dessous.

Données historiques

Quand il existe des données sur l'occurrence ou sur les effets d'espèces nuisibles, cette information est primordiale pour la localisation des premiers points de surveillance.

Mouvements des masses d'eau

.....

Position des fronts entre les masses d'eau

.....

STRATEGIES D'ECHANTILLONNAGE

Phytoplancton

Le trait vertical au filet à plancton (maille 20 - 30 µm) est une méthode qualitative pour la détection des espèces présentes à faible concentration.

Cette méthode permet une détection très précoce de la présence d'une espèce toxique dans la colonne d'eau. Cependant, les espèces petites ou fragiles (par ex. *Chrysochromulina poplylepis*, *Heterosigma akashiwo*, *Aureococcus anophagefferens*) ne peuvent être correctement collectées de cette manière.

Parce que les espèces toxiques ne sont pas toutes collectées au filet, et parce que des données quantitatives sont nécessaires, il est nécessaire de prélever un échantillon intégrant la colonne d'eau, avec une pompe ou un tube, système décrit par Lindahl (1986). Cependant, pour estimer la concentration cellulaire maximum, il est nécessaire de prélever aussi des échantillons d'eau à plusieurs profondeurs.

La seule méthode permettant de détecter la présence d'une espèce toxique sans ambiguïté, est l'observation microscopique des échantillons d'eau. Autant que possible, les échantillons doivent être observés vivants pour l'identification des espèces, les échantillons fixés étant utilisés pour la quantification de ces espèces.

La surveillance de routine est effectuée par microscopie optique. Cependant, pour beaucoup de microflagellés et pour le picoplancton, la confirmation de l'identification nécessite la microscopie électronique.

Une méthode standard pour la quantification de la biomasse phytoplanctonique dans l'eau consiste en l'estimation des pigments chlorophylliens. Cette méthode peut être utilisée pour l'acquisition de séries temporelles sur l'accumulation de la biomasse algale. Elle ne distingue cependant pas les espèces individuellement. En outre, puisque des espèces sont nuisibles alors qu'elles ne représentent qu'un faible pourcentage de l'ensemble du phytoplancton, la seule estimation de la chlorophylle ne peut être utilisée comme outil de surveillance des espèces toxiques.

Le groupe de travail considère comme essentiel que la priorité soit donnée à l'observation microscopique du phytoplancton.

Paramètres physico-chimiques

Des mesures de routine des variables physiques et chimiques fondamentales dans la zone, sont importantes pour la compréhension de la dynamique (fréquence d'apparition, durée de la contamination, etc.) et de la distribution spatiale des espèces nuisibles. Les paramètres à surveiller devraient au moins inclure :

- des profils verticaux de température et salinité (nécessaires pour définir la structure physique de la colonne d'eau, qui influence à l'échelle la distribution du phytoplancton),
- la pénétration de la lumière, mesurée par un disque de Secchi ou un équipement optique, pour identifier les changements soudains dans la biomasse algale,
- des observations simples sur la marée et la météorologie (tempêtes, vents dominants, pluies, etc.), qui peuvent influencer la croissance du phytoplancton et son transport.

Fréquence d'échantillonnage

La fréquence d'échantillonnage devrait varier selon les abondances saisonnières des espèces nuisibles considérées, et si possible, prendre en compte le taux de croissance et / ou le taux d'accumulation de l'espèce à surveiller. Il est clair qu'il n'est pas possible de décrire un programme de surveillance qui couvre toutes les éventualités, en particulier en ce qui concerne les épisodes toxiques résultant d'un changement dans les conditions hydrologiques ou météorologiques.

Néanmoins, pour les espèces à croissance rapide, il serait souhaitable d'échantillonner tous les trois ou quatre jours, alors que pour les espèces à croissance lente, un intervalle de sept à dix jours semble suffisant.

Quand les concentrations cellulaires augmentent, le protocole de surveillance doit être modifié et inclure des prélèvements supplémentaires. La surveillance régulière du comportement des stocks, et la mesure de l'oxygène dissous, de la chlorophylle et du pH, sont recommandés en plus des paramètres listés ci dessus.

En cas d'apparition d'une nouvelle espèce, il est souhaitable de collecter et de concentrer du phytoplancton vivant. Les échantillons vivants peuvent être utilisés pour l'identification, l'isolement et la culture, et des sous-échantillons congelés pour l'analyse toxinique.

La surveillance en continu de la chlorophylle en fluorescence *in vivo* fournit des informations sur l'accumulation de la biomasse phytoplanctonique, et peut servir à cartographier la distribution de cette biomasse.

Kystes / sédiments

Si les espèces nuisibles en question produisent des kystes ou des cellules dormantes, il est utile de surveiller, au moins pendant la période d'hiver, la distribution et l'abondance des kystes dans la couche supérieure du sédiment. Des mesures complémentaires, tels que l'oxygène dissous et la température près du fond, sont également nécessaires pour estimer le potentiel de germination de cette population (Anderson *et al.*, 1983 ; Anderson and Keafer, 1985 ; Cembella *et al.*, 1988)

Intergovernmental
Oceanographic
Commission

Manuals and Guides

33

MANUAL ON HARMFUL MARINE MICROALGAE

Edited by

G.M. Hallegraeff
Department of Plant Science, University of Tasmania
Australia

D.M. Anderson
Woods Hole Oceanographic Institution, Woods Hole
United States of America

A.D. Cembella
National Research Council, Nova Scotia
Canada

Technical Editor

H.O. Enevoldsen
IOC Science and Communication Centre on Harmful Algae
Denmark

1995 UNESCO

The designations employed and the presentation of the material in this publication do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the Secretariats of UNESCO and IOC concerning the legal status of any country or territory, or its authorities, or concerning the delimitations of the frontiers of any country or territory.

For bibliographic purposes, this document should be cited as follows:

Manual on Harmful Marine Microalgae
Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., Cembella, A.D. (Eds)
IOC Manuals and Guides No. 33. UNESCO 1995
(English only)

The preparation of this Manual was supported by the Danish International Development Assistance (DANIDA), and the Danish Institute for Fisheries Research.

Published in 1995
by the United Nations Educational,
Scientific and Cultural Organization,
7, Place de Fontenoy, 75352 Paris 07 SP

Printed in UNESCO's Workshops

UNESCO 1995
Printed in France

Contents

Preface	III
<i>G. Kullenberg</i>	
List of Contributors	XI
Introduction	XV
<i>G.M. Hallegraeff</i>	
1. Harmful Algal Blooms: A global overview	1
<i>G.M. Hallegraeff</i>	
Global increase of blooms	4
Increased scientific awareness of toxic species	4
Increased utilisation of coastal waters for aquaculture	7
Increase of algal blooms by cultural eutrophication	10
Stimulation of algal blooms by unusual climatological conditions	14
Transport of dinoflagellate cysts in ships ballast water or associated with the translocation of shellfish stocks	18
Conclusions	18
PART I. METHODS	
2. Sampling Techniques and Strategies for Coastal Phytoplankton Blooms	25
<i>P.J.S. Franks</i>	
Sampling equipment	25
Discussion	39
3. Culture Methods	45
<i>R.R.L. Guillard</i>	
General laboratory procedures	45
Material and apparatus	47
Isolation procedures - sampling and incubation	51
Manipulations-enrichments cultures	53
Manipulations-antibiotics	55
Maintenance of stocks and production	55
Media for maintenance of cultures	56
4. Estimating Cell Numbers	63
<i>J. Throndsen</i>	
Serial dilution culture (SDC) method	63
Counting methods	72

Toxin analysis - Instrumental methods

- 5. Post-column derivatization HPLC methods for Paralytic Shellfish Poisons 81**
Y. Oshima
- Methods 81
 Discussion 85
 Appendix 89
- 6. Methods for Diarrhetic Shellfish Poisons 95**
M.A. Quilliam and J.L.C. Wright
- Chemistry 96
 Toxicology 96
 Bioassay methods 99
 Chemical analysis 100
 Biochemical analysis 101
 Appendix 1, Commercial sources 103
 Appendix 2, HPLC analysis of DSP toxins 104
- 7. Methods for Domoic Acid, the Amnesic Shellfish Poisons 113**
J.L.C. Wright and M.A. Quilliam
- Chemistry 114
 Toxicology 116
 Bioassay methods 117
 Chemical analysis 117
 Biochemical methods 123
 Appendix 1, Commercial sources 123
 Appendix 2, HPLC-UV determination of Domoic Acid in shellfish tissue 124
 Appendix 3, HPLC determination of Domoic Acid in seawater and plankton 127
- 8. Detection of Ciguatoxins and related Benthic Dinoflagellate Toxins: *in vivo* and *in vitro* Methods 135**
R.J. Lewis
- In vitro assays 135
 In vivo bioassays for ciguatoxin 142
 Chemical methods for detecting ciguatoxins 149
 Conclusions 152
- 9. Cyanobacterial Toxins 163**
W.W. Carmichael
- Etiology and toxicosis 163
 Clinical findings and lesions 167
 Diagnosis 167
 Control 168
 Treatment 168
 Monitoring and risk assessment 168
 Detection and analysis of toxins 169

	Toxin analysis	
10.	<i>In Vitro</i> Biochemical Methods and Mammalian Bioassays for Phycotoxins	177
	<i>A.D. Cembella, L. Milenkovic, G. Doucette and M. Fernandez</i>	
	Major phycotoxin syndromes and mode of action	177
	Part A, <i>in vitro</i> biochemical and cellular assays	181
	<i>A.D. Cembella, L. Milenkovic, G. Doucette</i>	
	Immunoassays	182
	Enzyme-inhibition assays	188
	Neuroreceptor binding assays	188
	Cytotoxicity bioassays	193
	Appendix 1, Extraction methods and sample preparation	194
	Appendix 2, Immunoassays	196
	Appendix 3, Enzyme assays	199
	Appendix 4, Neuroreceptor binding assays	200
	Appendix 5, Cytotoxicity assays	203
	Appendix 6, Availability of test kits, standards and reagents	207
	Glossary	208
	Part B, Mammalian bioassays	213
	<i>M. Fernandez and A.D. Cembella</i>	
	PSP mouse bioassay	214
	ASP mouse bioassay	215
	DSP bioassays	216
	NSP mouse bioassays	219
	Appendix 1, Mouse bioassay for ASP	220
	Appendix 2, Mouse bioassay for NSP	224
11.	Cyst Methodologies	229
	<i>D.M. Anderson, Y. Fukuyo and K. Matsuoka</i>	
	General concepts, definitions	229
	Field studies	232
	Sample collection	233
	Sample processing	236
	Cyst enumeration	240
	Cyst dynamics	241
	Excystment	243
	Laboratory studies	243
	Isolation and germination	243
	Encystment studies	244
	Excystment studies	245
12.	Methods of Nutrient Analysis	251
	<i>J.C. Valderrama</i>	
	Determination of ammonia	252
	Determination of nitrite	256
	Determination of nitrate	258
	Determination of dissolved inorganic phosphate	260

	Determination of reactive silicate	262	
	Simultaneous determination of total phosphorus and total nitrogen		265
13.	Trace metals as nutrients	269	
	<i>C. Haraldsson and E. Graneli</i>		
	Case study: cobalt and the <i>Chrysochromulina polylepis</i> bloom		269
	Response of different algal groups to cobalt additions		270
	Acid precipitation in coastal areas	271	
	Determination of trace elements	271	
 PART II. TAXONOMY			
14	Taxonomic principles	279	
	<i>G.M. Hallegraeff</i>		
15.	Taxonomy of Harmful Dinoflagellates		283
	<i>F.J.R. Taylor, Y. Fukuyo and J. Larsen</i>		
	What are dinoflagellates	283	
	General comments about harmful dinoflagellate species		283
	Gymnodinioids and Noctilucooids	285	
	Peridinoids	292	
	Gonyaulacoids	292	
	Dinophysoids	303	
	Prorocentroids	309	
16.	Taxonomy of Toxic Haptophytes (Prymnesiophytes)		319
	<i>Ø. Moestrup and H. Thomsen</i>		
	Description of the class	319	
	Key to genera	321	
17.	Taxonomy of Diatoms		
	<i>G.R. Hasle and G.A. Fryxell</i>		
	Methodology	339	
	Harmful events	340	
	Description of genera and species		341
18.	Taxonomy of Harmful Marine Raphidophytes		365
	<i>G.M. Hallegraeff and Y. Hara</i>		
19.	Taxonomy of Cyanobacteria	373	
	<i>E.J. Carpenter and W.W. Carmichael</i>		
	Collection	373	
	Preservation	373	
	Identification and quantification		374
	Toxic genera	374	
20.	Taxonomy of Cysts		
	<i>K. Matsuoka and Y. Fukuyo</i>		
	Descriptive terminology of dinoflagellate cysts		381

Description of harmful marine dinoflagellate cysts	387
Cysts of Gymnodiniales	388
Cysts of Gonyaulacales	390
Cysts of Peridinales	392
Cysts of other harmful phytoplankton	392
Appendix	399

PART III. MONITORING AND MANAGEMENT

21. Environmental Monitoring	405
<i>T.J. Smayda</i>	
Introduction	405
Sampling design	406
Sampling	418
Some specific types of monitoring surveys	425
Conclusion	427
22. Management of Shellfish Resources	433
<i>S.E. Shumway, H.P. von Egmond, J.W. Hurst and L.L.Bean</i>	
Intoxification and detoxification of shellfish	433
Detoxification-depuration	434
Regulation and monitoring programmes	437
Conclusions	448
Interstate Shellfish Sanitation Committee and National Shellfish Sanitation Program	448
23. Management of finfish aquaculture resources	463
<i>J. Rensel</i>	
Overview of harmful algal bloom effects and mitigation strategies	463
Methods of avoiding and detecting harmful algal blooms	465
Mitigative practices	466
Overview of fish kill sampling procedures	470
24. Epidemiology and Public Health	475
<i>L.E. Fleming, J.A. Bean and D.G. Baden</i>	
Epidemiological issues	475
Epidemiological issues & harmful marine phytoplankton	477
Prevention of disease in human populations from harmful marine phytoplankton	480
Appendix	481
Discussion	483

PART IV. RESOURCES

25. Algal Culture Collections and Toxic Algal Strains	489
<i>R.J. Andersen, S.I. Blackburn, F.J.R. Taylor and C. Tomas</i>	

**26. Agencies and Addresses: International and Regional Organisations
with Programmes or Activities on Harmful Microalgae 533**

H.O. Enevoldsen

Governmental organisations 533

Non-governmental organisations 540

Index 545

– 5 –

Taxinomie du phytoplancton
formation

5. Taxinomie du phytoplancton / formation.

Un bilan est fait sur toutes les actions de formation relatives à l'identification du phytoplancton depuis la création du réseau en 1984.

En ce qui concerne le cycle de formation avancée, assurée par Elisabeth Nezan à Concarneau, trois sessions ont eu lieu en 1995, qui concernaient 8 laboratoires côtiers ; la quatrième session, pour trois autres laboratoires côtiers, a été reportée. Le contenu de la formation, ainsi que les étapes nécessaires à une analyse correcte des espèces phytoplanctoniques, est décrit dans le compte-rendu détaillé / 5.

Le bilan de ces sessions fait ressortir que :

- **la motivation**, indispensable pour des identifications correctes, n'est pas présente chez tous les observateurs.
- **le temps nécessaire pour une flore totale est extrêmement variable** (4 heures, ou plus s'il y a un problème de détermination), ce qui n'est pas toujours pris en compte ni reconnu, eu égard aux autres analyses effectuées dans le laboratoire. A ce propos, il convient de rappeler que **le temps passé sur une flore partielle est également très important, puisqu'elle comporte la détermination et la quantification de toutes les espèces toxiques, nuisibles et douteuses, c'est à dire un minimum de vingt à trente espèces.**
- certaines étapes de l'identification sont rarement ou jamais effectuées : c'est le cas de **l'étude des tabulations** de certaines espèces, **indispensable pour les flores totales, mais aussi pour les flores partielles**, puisque, parmi les espèces difficiles à déterminer, se trouvent nombre d'espèces toxiques et douteuses (*Alexandrium*, *Goniodoma*...).

Avant de reprendre le cycle de formation, E. Nezan souhaite des éclaircissements sur les priorités et sur ce qui doit être poursuivi ou non. La discussion qui suit est résumée ci dessous :

G. Piclet : l'observation du phytoplancton est elle vraiment une priorité, étant donné l'énorme contrainte de temps qui lui est associée? Tous les laboratoires côtiers doivent ils faire le même choix que Concarneau, c'est à dire une personne à temps plein sur l'observation du phytoplancton?

C. Belin : la surveillance est une des priorités d'IFREMER, et la prise en compte des problèmes liés aux blooms toxiques ne peut se faire sans une surveillance du phytoplancton dans le milieu (voir chapitre 1). L'expertise d'E. Nezan est un des points forts du REPHY, qu'il est absolument nécessaire de préserver et d'encourager. Il n'est bien évidemment pas demandé à tous les laboratoires côtiers de développer une compétence équivalente.

C. Alzieu : la compétence et l'expertise reconnue du laboratoire de Concarneau sur ce sujet ne sont pas à remettre en cause. En outre, la relation entre les problèmes d'environnement et les problèmes de santé publique, est une problématique importante à IFREMER.

Tous les participants pensent que **la motivation est l'un des principaux moteurs de la qualité des résultats, en particulier dans un domaine comme celui de l'observation du**

phytoplancton, qui demande des qualités particulières d'attention, et qui peut apparaître très ingrat à qui n'est pas motivé.

E. Nezan envisage la poursuite de la formation, en deux niveaux : (1) espèces toxiques, nuisibles et douteuses (flore partielle), (2) tous les autres genres connus (flore totale).

Les observateurs de quelques laboratoires côtiers souhaitent aller plus loin sur les problèmes de tabulation. **L'inquiétude reste sur le problème du temps**, car il est patent qu'une liste floristique avec dénombrement, même partielle, nécessite de faire appel à des **observations sur du matériel vivant** (cas des Gymnodiniales et des Phytoflagellés : *Chrysochromulina*, *Heterosigma*...) et à des **examens détaillés de la tabulation** (cas des Péridiniales). Il en va de la qualité des résultats.

Le temps gagné avec la diminution du nombre de flores totales devra être redistribué sur des déterminations plus précises.

C. Belin rappelle que les traitements réalisés sur les séries temporelles, au niveau national (6ème Conférence Phytoplancton, Nantes, 1993), mais aussi au niveau d'une région (Colloque PNOG, Arcachon, 1995), ont fait apparaître des éléments tout à fait intéressants malgré quelques erreurs et imprécisions, les possibilités de regroupements d'espèces permettant en effet de s'affranchir de supposées erreurs d'identification.

Il serait donc dommage d'être trop critique sur des séries de données pouvant fournir des informations intéressantes jusqu'à un certain niveau de détail. **Il est par contre impératif d'être plus précis dans la reconnaissance d'espèces potentiellement toxiques, et la liste en est longue...**

Le réseau REPHY et la **Formation** (Information) relatifs aux populations phytoplanctoniques

De 1984 (mise en place du réseau) à 1985

- Un stage d'**initiation** à la reconnaissance des espèces courantes : **2 jours** (18-19 juin 1985)
- Un stage d'**initiation** aux phénomènes de perturbations phytoplanctoniques : **2 jours** (4-5 décembre 1985)

Des 1986 (décentralisation des prestations analytiques « **Dinophysis** ») et mise en place de la stratégie « **flore totale** ») à 1991

- Un stage de **perfectionnement** sur la diagnose sommaire des dinoflagellés et en particulier des espèces toxiques : **2 jours** (26-27 mars 1986)
- Un séminaire sur les efflorescences phytoplanctoniques : **2 jours** (7-8 décembre 1987)

Depuis 1992 dans un cadre d'assurance de qualité et de pôle d'actions spécifiques à Concarneau (Phytoplancton - Identification)

- Un stage de **perfectionnement** sur l'identification des espèces phytoplanctoniques : **5 jours** (10-14 février 1992)
- Un cycle de formation interne (**ateliers**) sur l'identification des espèces phytoplanctoniques : 4 sessions de **3 jours** en 1995

Cycle de formation interne (ateliers) sur l'identification des espèces phytoplanctoniques

Objectifs

- Améliorer les savoir – faire
- Encourager les bonnes pratiques
- Rehausser le niveau de qualification des observateurs

Contenu

	Temps
1ère partie (théorique)	
Rappels de systématique (avec support vidéo)	0.5 jour
2ème partie (pratique)	
Optimisation du matériel optique : - réglage et équipements complémentaires	
Préparation des échantillons : - fixation	
Techniques de dénombrement selon que la flore est : - diversifiée - dominée par une espèce	2.25 jours
Identification : - lectures de cuves à partir d'échantillons * propres aux participants * sélectionnés en fonction de la demande - techniques complémentaires : * observation de matériel vivant * examen de cellules sous divers angles * examen des plaques thécales (tabulation)	
3ème partie (bilan)	
Commentaires – Observations – Suggestions	0.25 jour
Remise d'une documentation : « Ce qu'il faut savoir »	

Liste des participants

Session des 11-12-13 avril 1995	Jacqueline LE GRAND (Port en Bessin) Dominique FOUCHE (La Tremblade)
Session des 3-4-5 Octobre 1995	Jacky CHAUVIN (La Trinité) Didier LEGUAY (La Rochelle) Nadine MASSON (Arcachon)
Session des 14-15-16 novembre 1995	Pierre RAGUENES (Concarneau) Françoise DUMONT (Nantes) Sylvie MARGAT (La Rochelle) Claude CHIANTELLA (Sète)
Session des 12-13-14 décembre 1995	Etaient prévus : Benoist HITIER (Boulogne) Aliette CONVENANT (St Malo) Françoise MARCO (Toulon)

Bilan et Perspectives

- Il apparaît un manque de motivation chez certains observateurs **désignés** pour l'analyse des populations phytoplanctoniques.

- Pour les flores totales, il n'existe pas de méthode rapide d'analyse et **le temps agent**, très variable d'un échantillon à un autre, **ne se prévoit pas** contrairement à la plupart des autres analyses effectuées par les laboratoires côtiers. Il faut donc laisser **le temps nécessaire et suffisant** aux analystes.

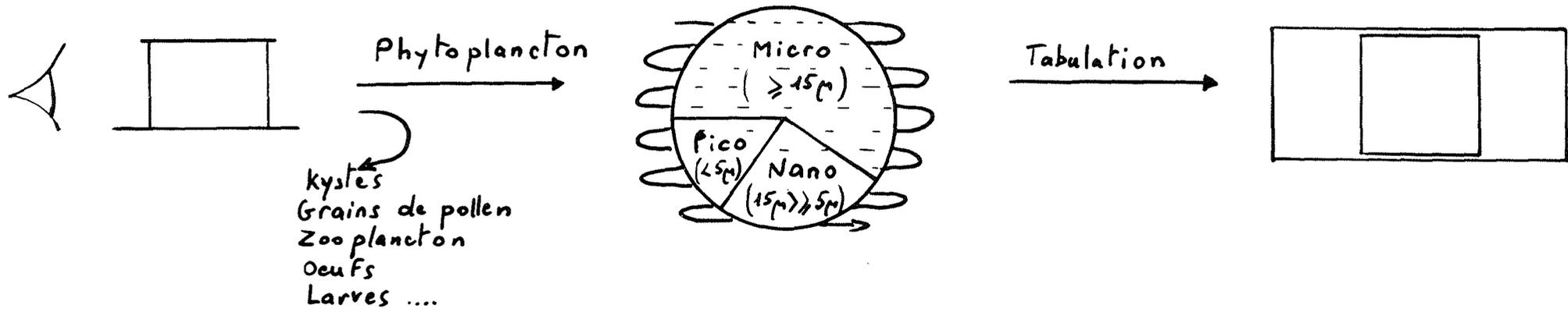
Conséquences :

- Certaines étapes, indispensables dans l'analyse des populations phytoplanctoniques, demeurent trop souvent occasionnelles voire exceptionnelles ou inexistantes ; d'où des **erreurs d'identification** et un problème de **qualité de données** phytoplanctoniques.

- Avant d'envisager la poursuite de ce cycle de formation :

Faut-il continuer l'analyse des populations phytoplanctoniques et où ?

Analyse des populations phytoplanctoniques



Etapes 1 et 2

- Trier, identifier par la **taille** et la **forme générale**, dénombrer
- Identifier par un examen de la **nage**, de l'insertion des flagelles, de la **torsion** cellulaire... (formes flagellées)

Etape 3

- Confirmer l'identification par un examen sous divers angles des cellules et l'étude de leur **tabulation** (péridiniales)

Etape 4

- Pour l'analyse systématique de certains organismes, faire appel à la microscopie interférentielle (organisation interne) ou à la microscopie électronique à balayage ou à transmission (ultrastructure)

– 6 –

Traitement des données populations
phytoplanctoniques en Languedoc–Roussillon

6. Traitement des données populations phytoplanctoniques en Languedoc-Roussillon.

Une analyse des données « populations phytoplanctoniques » des quatre sites du littoral ouest Méditerranée a été effectuée, avec pour principal objectif de détecter une éventuelle redondance entre deux sites, afin d'optimiser le réseau de surveillance, si tel était le cas. Deux sites sont situés en étang (Leucate et Thau), les deux autres étant en mer ouverte, chacun un face de l'un des étangs. La période étudiée est 1987–1994.

Cette étude, initiée dans le cadre du PNOC, est l'exemple d'une collaboration réussie entre un laboratoire côtier (Sète), la coordination REPHY et le service QM, pour ce qui concerne le traitement des données REPHY. Elle a fait l'objet d'une communication orale lors du Colloque International sur les séries à long terme, organisé par le PNOC à Arcachon en février 1995, et sera prochainement publiée dans un numéro spécial d'Océanologica Acta⁷

Les méthodes utilisées, décrites dans le compte-rendu détaillé / 6, peuvent être appliquées sur toutes les données du même type. La méthode de **l'Analyse en Composantes Principales (ACP)** peut nécessiter l'aide d'un spécialiste pour l'interprétation des résultats. Par contre, la méthode des **Sommes Cumulées** est simple à appliquer sur une série temporelle avec un outil comme Excel.

Les conclusions principales de l'étude sont :

- une spécificité forte de l'étang de Leucate, par rapport aux trois autres sites, avec, entre autres, une richesse spécifique nettement plus faible,
- une spécificité également de l'étang de Thau, avec une abondance totale plus faible et une absence de blooms durant la période,
- les évolutions d'abondance totale, se ressemblent beaucoup plus entre sites d'une même région qu'entre sites d'un même écosystème (étang / mer ouverte),
- des traits communs aux quatre sites : une abondance totale globalement plus forte à partir de fin 1993 que sur l'ensemble de la période ; une richesse spécifique qui semble croissante ; un gradient temporel dans les espèces identifiées, certaines d'entre elles étant beaucoup plus présentes en fin de période et vice versa.

Les quatre sites présentent chacun des caractéristiques particulières et des tendances intéressantes. Il n'y a donc pas d'évidence claire d'une possibilité de suppression d'un site du réseau de surveillance, au vu des données 1987–1994.

⁷ LE BEC Claude, BELIN Catherine, GAERTNER Jean-Claude, BELIAEFF Benoit, RAFFIN Bernard et IBANEZ Frédéric- Séries temporelles du réseau de surveillance du phytoplancton (REPHY)- Étude de deux écosystèmes de la côte ouest Méditerranée. (sous presse).

Une étude préliminaire avait été effectuée sur les résultats de 31 sites répartis sur toute la côte française : toutes espèces phytoplanctoniques, deux fois par mois depuis 1987.

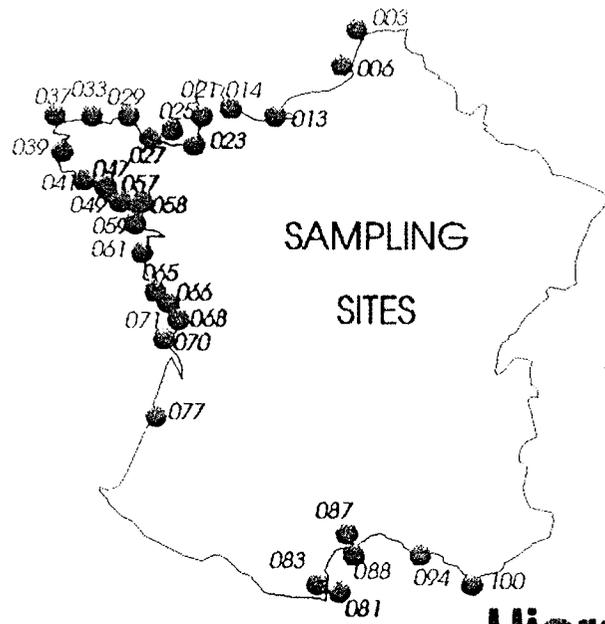
La première étude sur les données 1987–1992, a consisté à comparer les **espèces dominantes**.

L'indice de Sanders a été retenu pour la définition de la dominance, car il prend en compte, pour chaque date, le rang d'un genre par rapport à un autre, et non sa concentration : cela réduit donc le poids des espèces à blooms, parfois extrêmement abondantes pendant une très courte période, mais absentes le reste du temps.

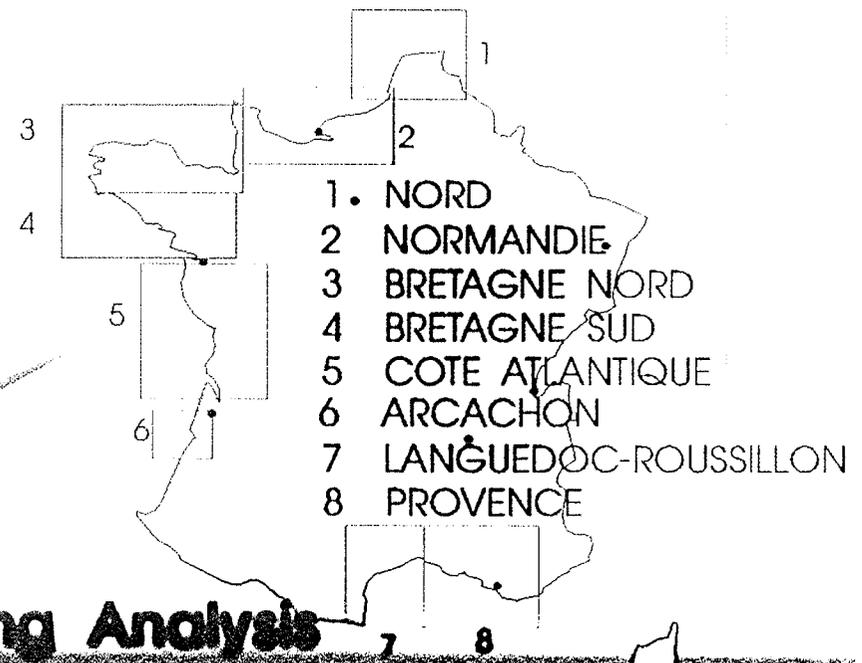
(c'est le niveau taxinomique « genre » qui a généralement été retenu pour cette étude, afin que les résultats exprimés, soit par genre, soit par espèce, soient traités de façon homogène)

Sur les 31 sites étudiés, une **Classification Ascendante Hiérarchique (CAH)** a été appliquée sur la matrice des indices de Sanders par genre et par site. Le résultat sur l'arbre de classification montre huit groupes de sites, correspondant remarquablement à huit zones géographiques.

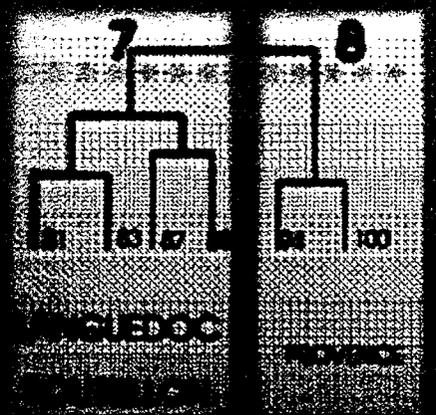
La Méditerranée est très détachée de l'ensemble Manche–Atlantique. L'Ouest Méditerranée, comprenant les quatre sites de notre étude, forme également une entité séparée de l'Est Méditerranée.



SAMPLING
SITES



Hierarchical Clustering Analysis

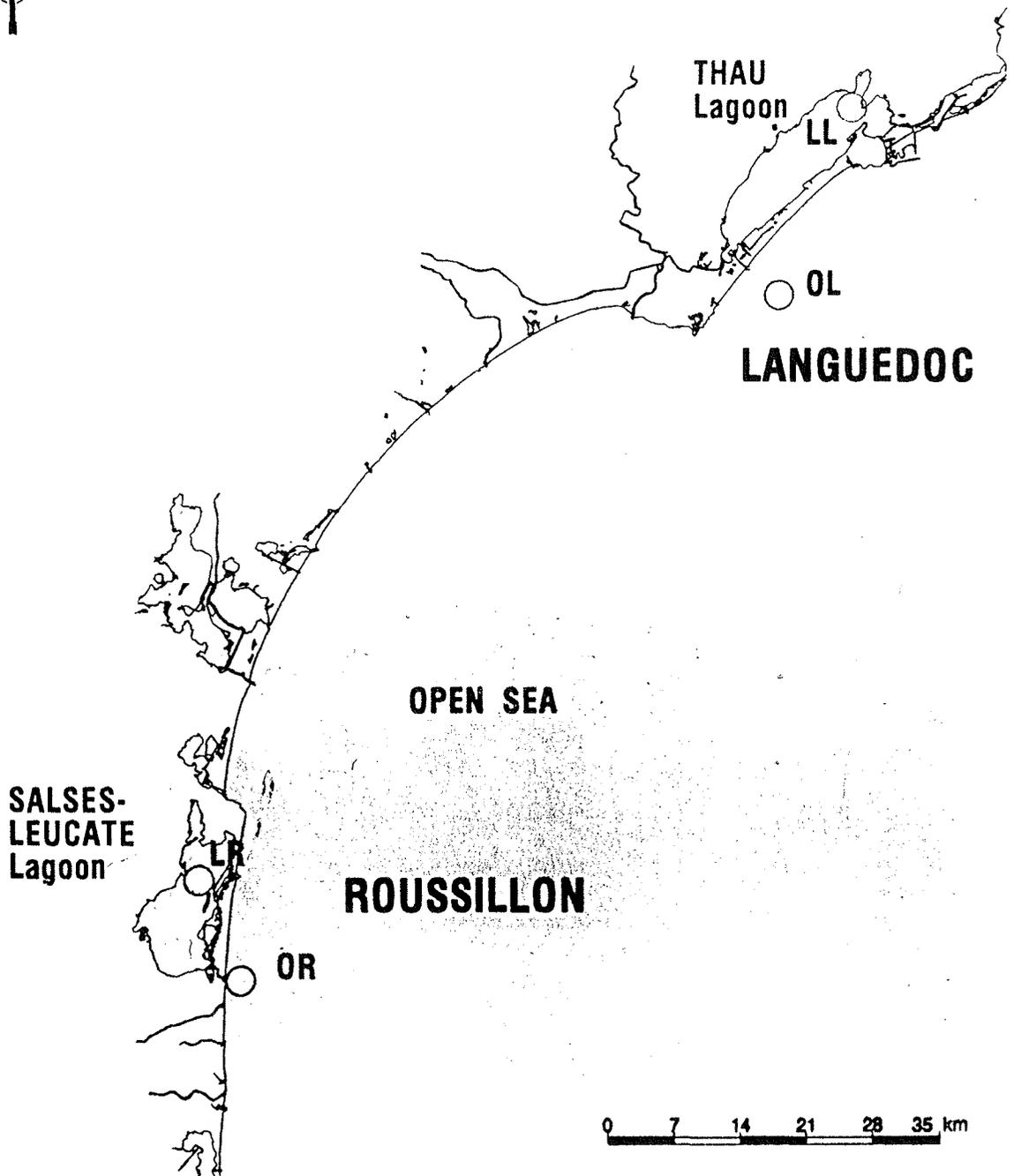
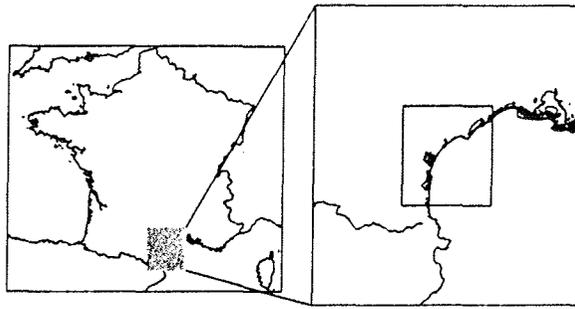


Les quatre sites étudiés dans la région Ouest Méditerranée correspondent à :

- deux sites en étang (Thau / LL et Leucate / LR), dans chacune des deux régions Roussillon et Languedoc,
- deux sites en mer ouverte (OL et OR), dans chacune des deux mêmes régions.

Le résultat de la CAH avait regroupé de façon surprenante les deux sites Roussillon ensemble, et les deux sites Languedoc ensemble, alors qu'un regroupement mer ouverte / étang semblait à priori plus plausible.

L'étude présentée ici a pour principal objectif de détecter une éventuelle redondance entre deux sites, afin d'optimiser le réseau de surveillance, si tel était le cas.



La codification utilisée pour les graphiques est la suivante :

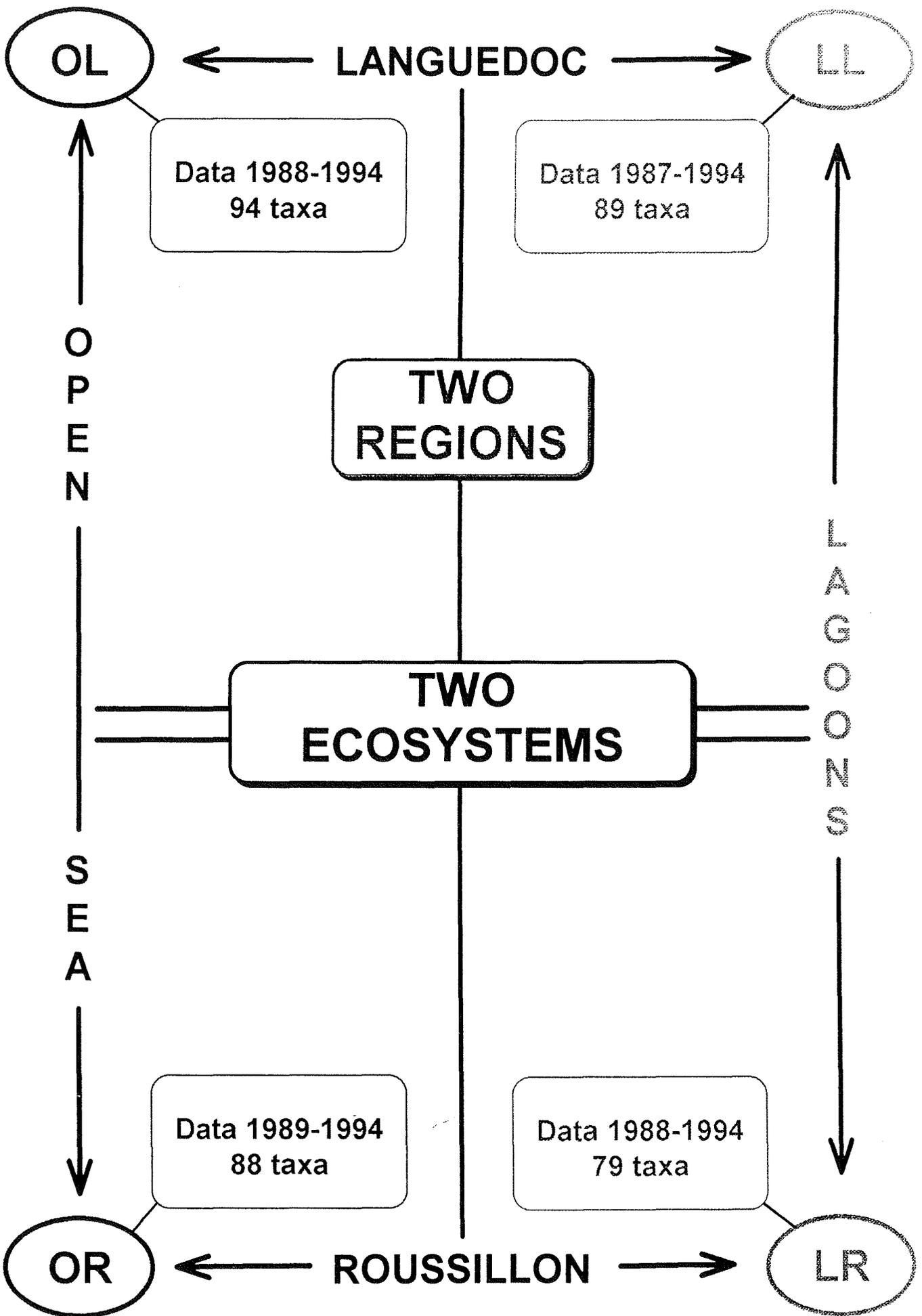
O : mer ouverte

L : étang

R : région Roussillon

L : région Languedoc

Une première particularité sur le **nombre total de taxons** déterminés sur la période : il est **plus faible pour LR (étang de Leucate)** que pour les autres sites.



Espèces dominantes France entière

Pour la comparabilité des résultats sur tous les sites, **une liste commune de genres dominants a été établie pour toute la France** : il s'agit de l'ensemble des genres, en ordre décroissant des indices de Sanders, sommés sur tous les sites.

Deux caractéristiques ont été examinées, pour une première comparaison entre espèces dominantes :

- le pourcentage de zéros dans la série, significatif d'une **présence** plus ou moins régulière du genre pendant la période étudiée,
- le rang de **dominance**, significatif, s'il est élevé, d'une présence régulière avec une abondance plutôt importante.

Les résultats en sont présentés dans les deux transparents suivants.

COMMON LIST OF DOMINANT GENUS
all French sites together
for comparability of results on all sites

Chaetoceros
Navicula
Nitzschia
Melosira
Coscinodiscus
Rhizosolenia
Leptocylindrus
Skeletonema
Thalassiosira
Asterionella



Set of genus, in decreasing order of Sanders index,
summed over all French sites.

COMPARISON BETWEEN DOMINANT SPECIES:

- of ALL FRENCH SITES
- of WEST MEDITERRANEAN

Two characteristics are studied :

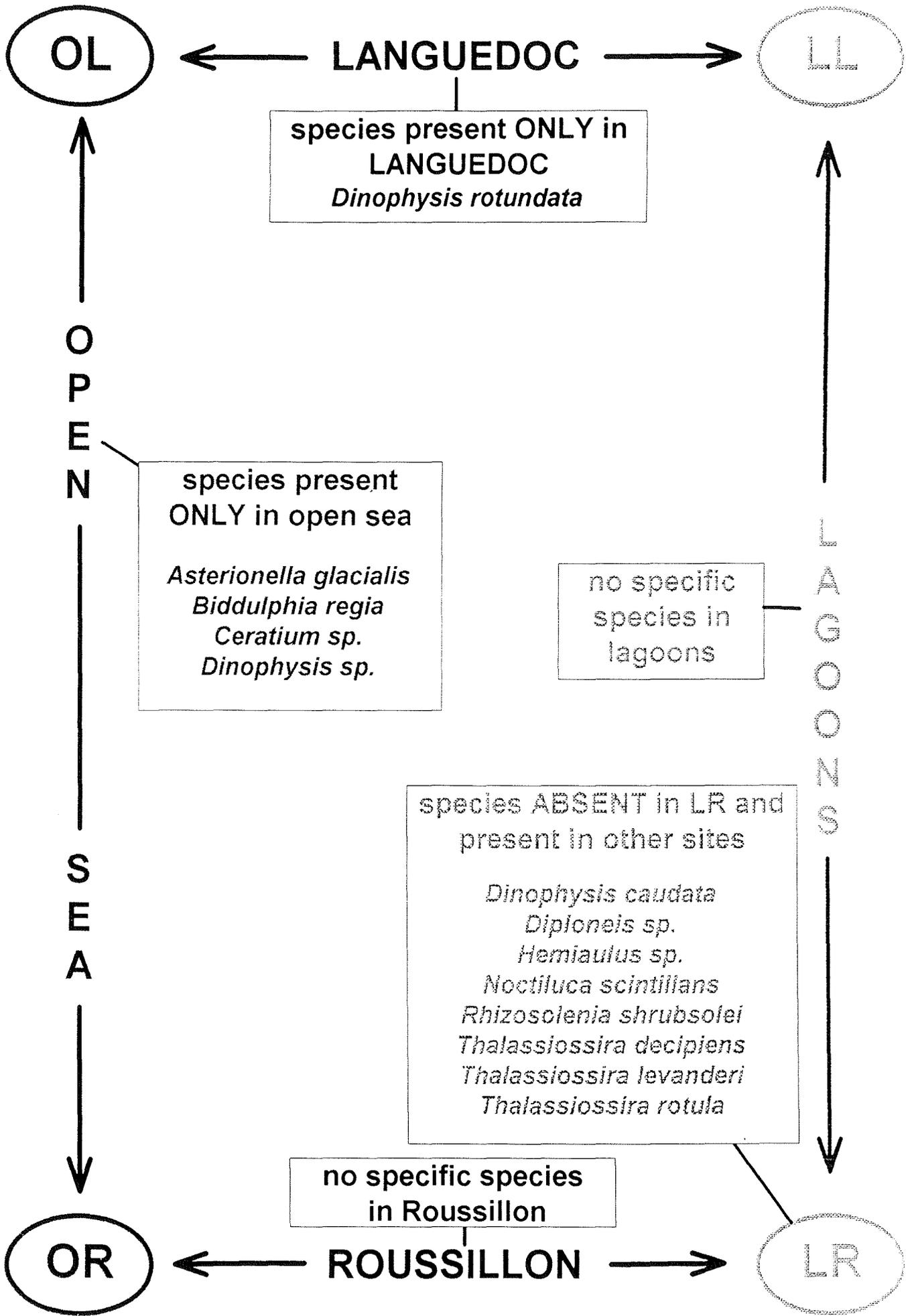
☞ **PERCENTAGE OF ZEROS IN TIME-SERIES**
weak percentage = regular presence

☞ **RANK OF DOMINANCE**
high rank = regular presence with
rather high abundance

Dissemblances / espèces spécifiques

Certaines espèces ont été significativement observées :

- sur un site seulement,
- sur une région seulement,
- sur un écosystème seulement.

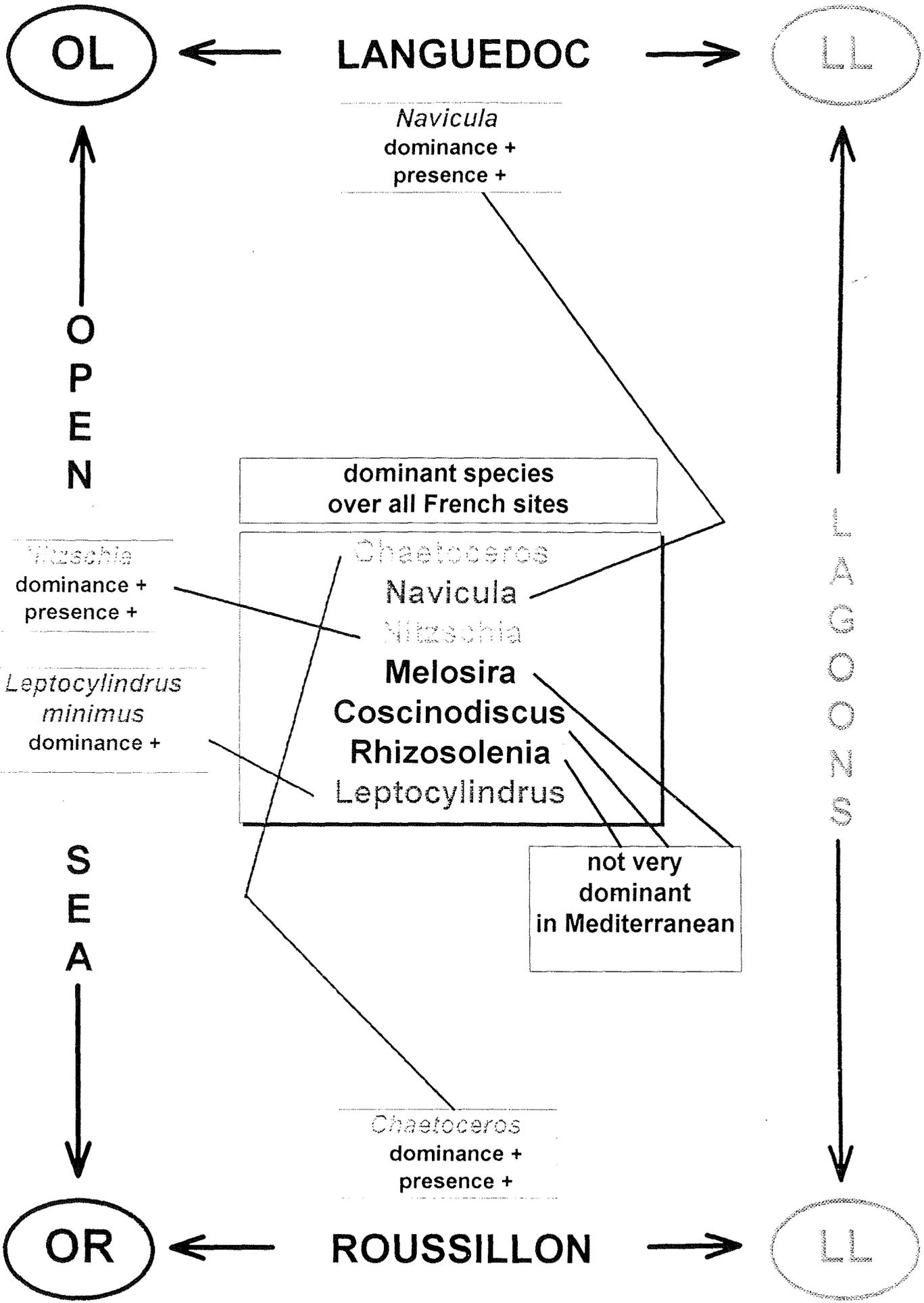


Spécificité par région et / ou écosystème

Le genre *Chaetoceros*, espèce côtière, est plus présent et plus dominant en Roussillon, alors que *Navicula*, espèce benthique, l'est plus en Languedoc.

Nitzschia, qui regroupe en réalité les genres *Nitzschia* et *Pseudonitzschia* (espèces côtières), se retrouve plutôt en mer ouverte qu'en étang.

Les trois genres *Melosira*, *Coscinodiscus* et *Rhizosolenia*, très dominants en Atlantique et Manche, ne le sont pas du tout en Méditerranée.

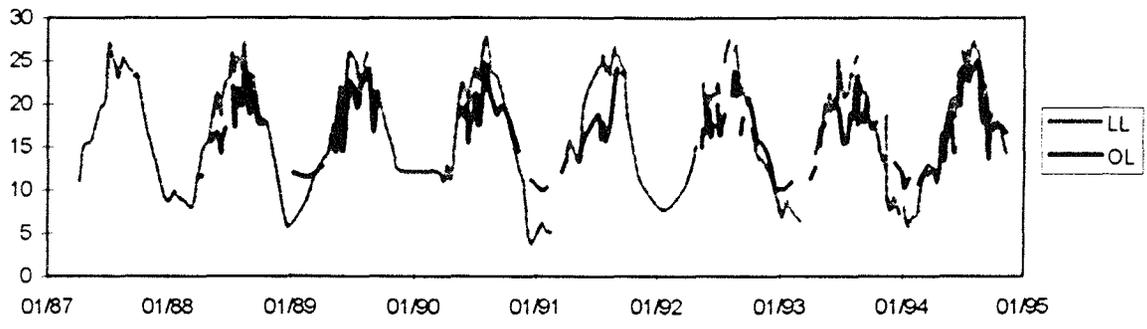


Température / salinité

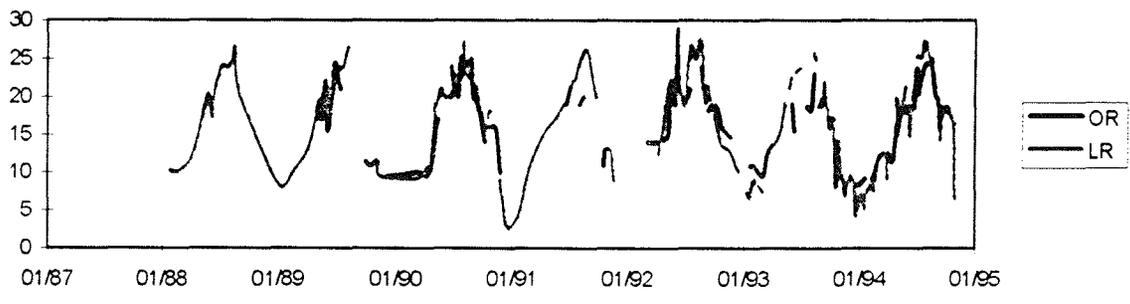
La comparaison des deux principaux paramètres physico-chimiques montre que :

- **les fluctuations de température sont beaucoup plus importantes dans l'étang de Thau qu'en mer ouverte** ; la quantité de données manquantes dans la série Roussillon mer ouverte (OR), ne permet aucune conclusion.
- les fluctuations de salinité sont également plus importantes dans les étangs.

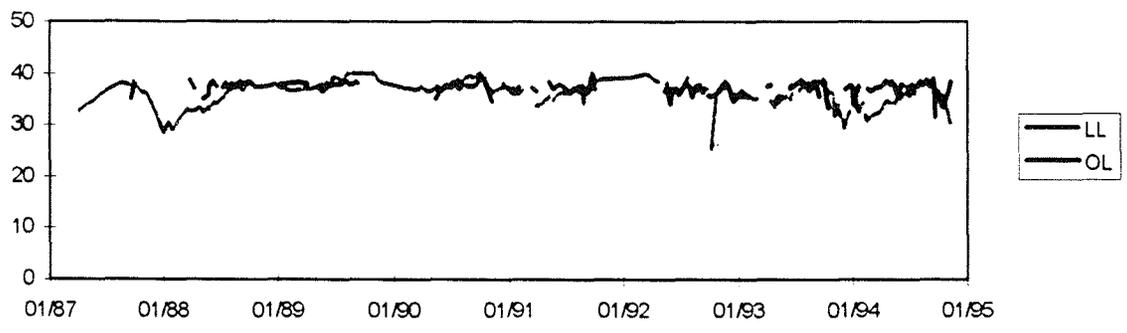
TEMPERATURE - LANGUEDOC (°C)



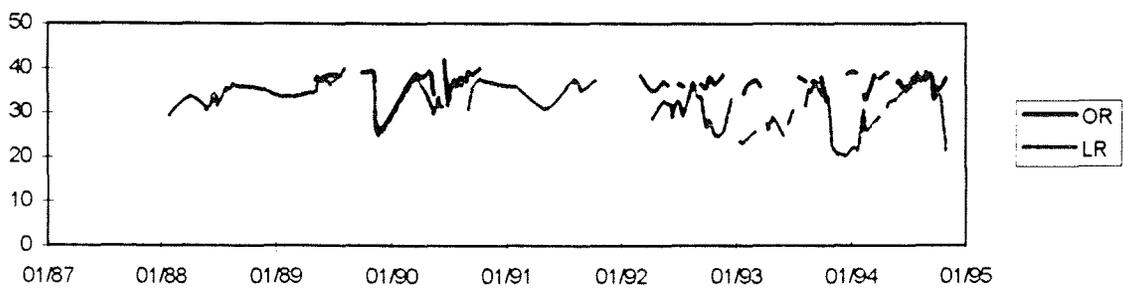
TEMPERATURE - ROUSSILLON (°C)



SALINITY - LANGUEDOC



SALINITY - ROUSSILLON



Analyse en Composantes Principales (ACP) sur la matrice des indices de Sanders

Première étude sur les relations SITES / TAXONS DOMINANTS

La question est : existe t'il des taxons dominants spécifiques d'un site, ou spécifiques d'un écosystème (étang, mer ouverte)?

- les variables sont les sites,
- les individus sont les taxons,
- les valeurs utilisées pour l'analyse sont les indices de Sanders / taxon / site.

- * la figure à gauche visualise les sites projetés dans l'espace des taxons
- * la figure à droite visualise les taxons projetés dans l'espace des sites

les axes 2 et 3 ont été retenus, car ils discriminent bien les sites

Tentative d'interprétation :

Les deux genres principalement dominants en Ouest Méditerranée, *Chaetoceros* et *Navicula*, qui sont aussi les deux genres dominants tous sites français confondus, se retrouvent associés chacun à une région différente :

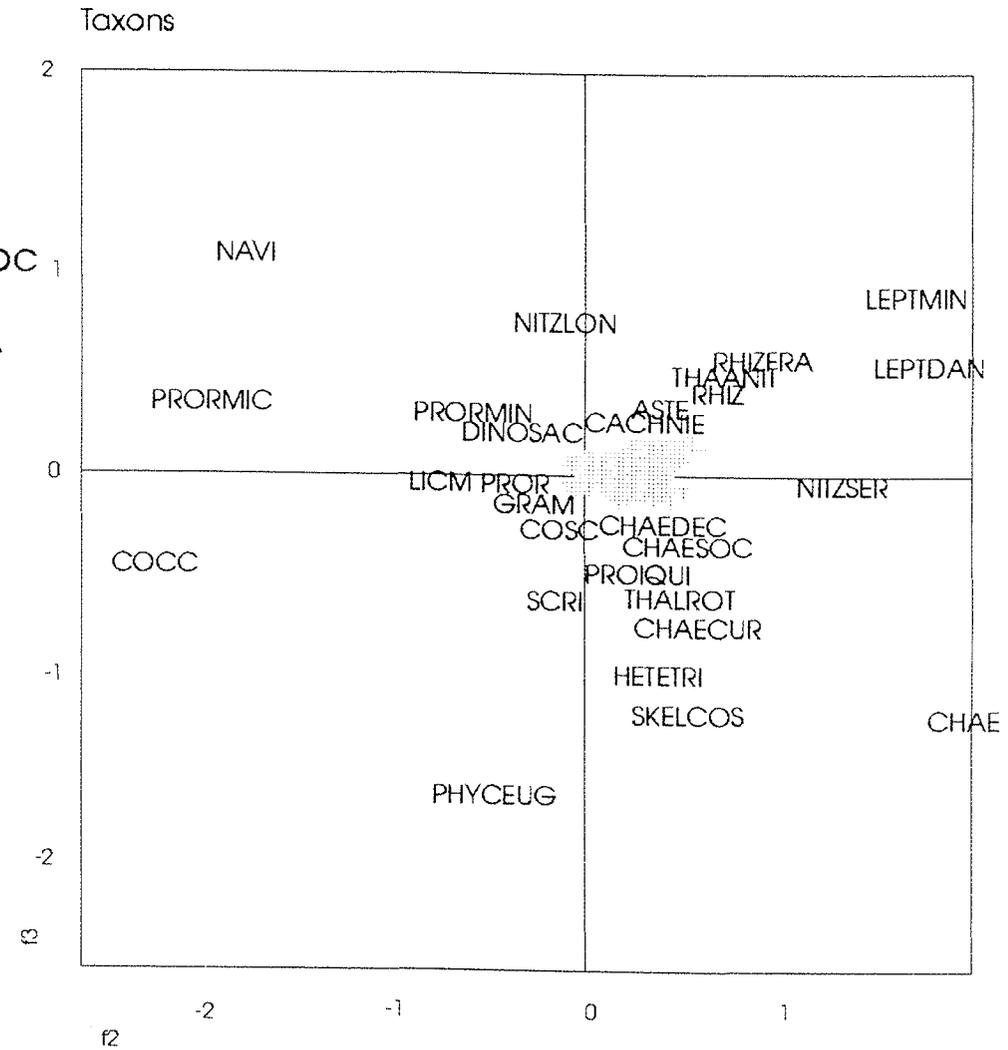
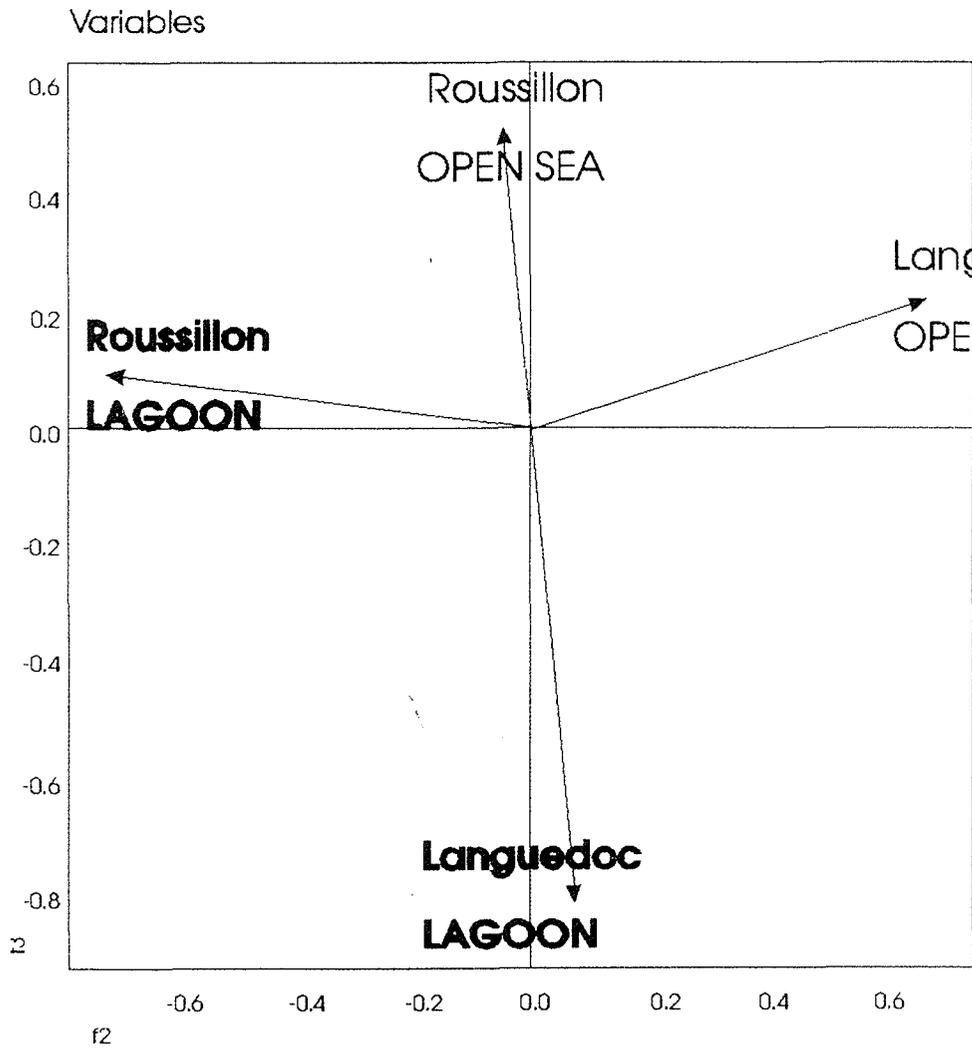
- *Chaetoceros* (CHAE), espèce côtière, associée au Languedoc,
- *Navicula* (NAVI), espèce benthique, associée au Roussillon.

L'écosystème « mer ouverte » (open sea) est associé à deux espèces de *Leptocylindrus* (LEPTMIN et LEPTDAN), espèces côtières, ainsi qu'à une espèce de *Nitzschia* (NITZLON) et une espèce de *Pseudonitzschia* (NITZSER).

L'étang de Thau (Languedoc lagoon) est associé à la classe des Euglénophycées (PHYCEUG) et à *Skeletonema costatum* (SKELCOS).

L'étang de Leucate est associé à *Prorocentrum micans* (PRORMIC).

PRINCIPAL COMPONENTS ANALYSIS on SANDERS MATRIX
(All Data 1987 to 1994)



Sommes cumulées

Un autre examen des séries temporelles et des changements dans les niveaux moyens des séries, a été effectué grâce à la méthode des sommes cumulées, dont la fonction est écrite ci-contre.

Les données brutes, en cellules par litre, ont d'abord été transformées en log. La moyenne de la série a été choisie comme valeur de référence **k**.

La courbe des sommes cumulées a donc une **pente négative**, si les valeurs successives de la série sont inférieures à la moyenne globale de la série ; elle a une **pente positive** si les valeurs successives sont supérieures à cette moyenne.

Cette fonction a été appliquée aux abondances totales de phytoplancton, aux grands groupes « écologiques » de phytoplancton, et au genre toxique *Dinophysis*.

**STUDY OF DISCONTINUITIES
on the four sites
WITH CUMULATED FUNCTION
(after IBANEZ)**

**detection of changes in a series, and determination
of date and intensity of these changes**

$$Sp = \sum_{i=1}^p x_i - pk$$

k = mean of the series

$x_i = \text{Log}(\text{cells.l-1})$

horizontal slope

if successive values of the series are EQUAL to k

positive slope

if successive values are HIGHER than k

negative slope

if successive values are LOWER than k

Abondance totale

Les graphiques représentent les **données brutes de l'abondance totale** de phytoplancton, en cellules par litre, sur les quatre sites.

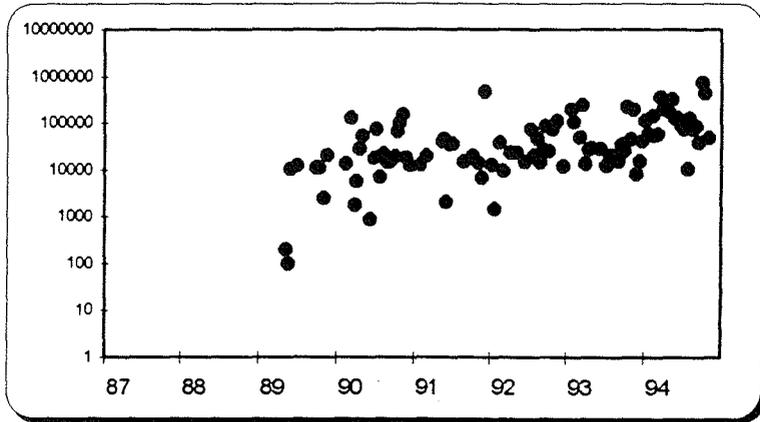
Les blooms, c'est à dire les concentrations dépassant un million de cellules par litre au total, sont accompagnés du nom de l'espèce responsable du bloom, qui, en général, représente une grande partie de l'abondance totale.

On remarque :

- l'absence de blooms pour le site OR (Roussillon mer ouverte),
- l'omniprésence de *Chaetoceros* comme espèce responsable de blooms.

TOTAL ABUNDANCE (cells.l-1)

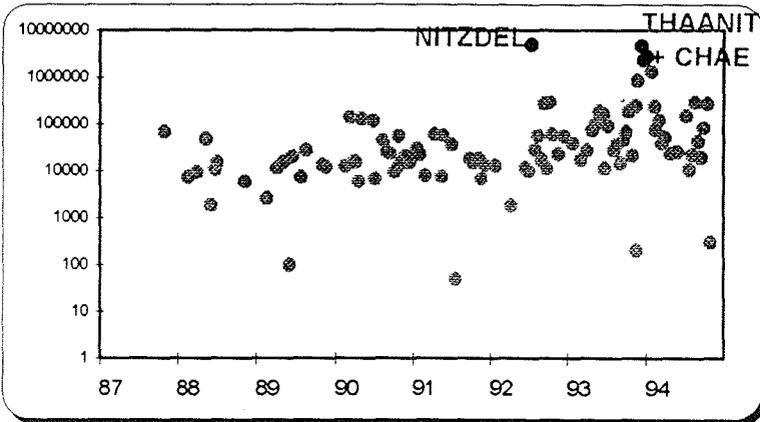
OR / OPEN SEA - ROUSSILLON



CHAE
Chaetoceros

CHAE CUR
Chaetoceros curvisetum +
C. debile

LR / LAGOON - ROUSSILLON

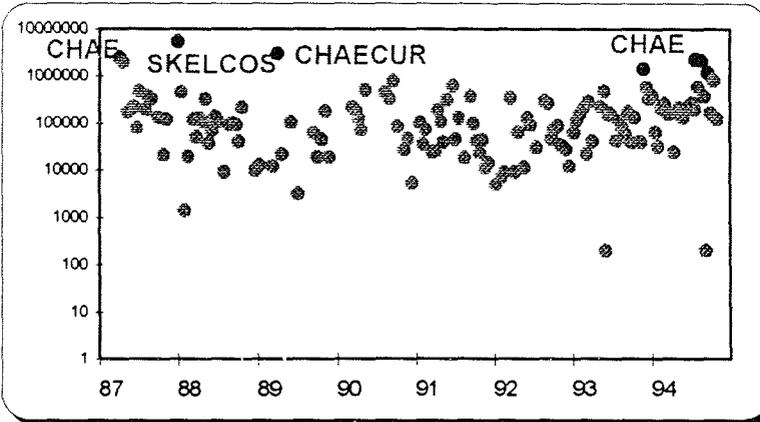


NITZDEL
Pseudonitzschia
delicatissima

SKELCOS
Skeletonema costatum

THAANIT
Thalassionema nitzschioides

LL / LAGOON - LANGUEDOC

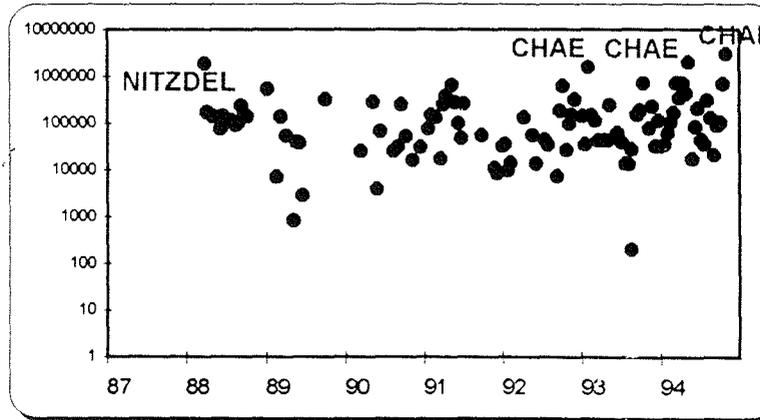


BLOOMS $>10^6$ cells.l-1
in red

No blooms on OR

Omnipresence of
Chaetoceros as
blooming species

OL / OPEN SEA - LANGUEDOC



Abondance totale / sommes cumulées

Les graphiques des sommes cumulées de l'abondance totale montrent que :

- les moyennes des séries, reportées sur les graphiques, sont sensiblement égales sur trois sites, mais elle est plus faible pour OR (Roussillon mer ouverte), ce qui est probablement dû à l'absence de blooms sur ce site.
- il existe une même pente positive **entre fin 93–début 94 et fin 94**, sur tous les sites, montrant que **l'abondance totale pendant cette période est supérieure à la moyenne globale 1987–1994**. Cette configuration est certainement due en partie au fait que le genre *Chaetoceros* tire l'ensemble, au moins pour les trois sites comportant des blooms de cette espèce à cette période.

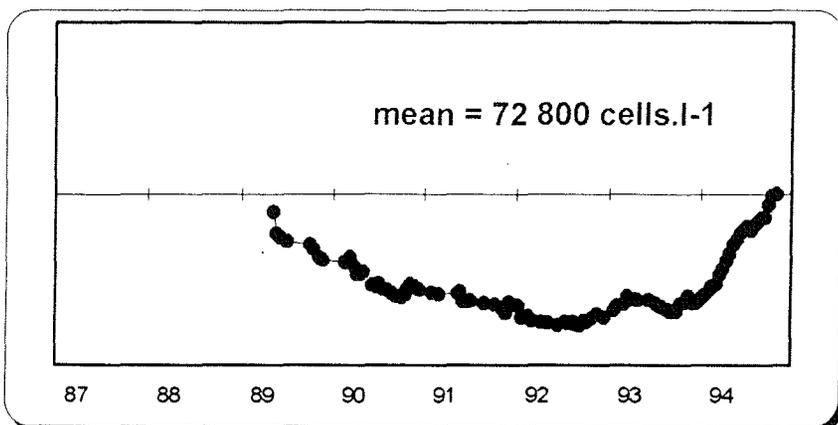
On observe une configuration remarquablement identique pour les sites OR (Roussillon mer ouverte) et LR (Roussillon étang de Leucate), qui ne s'explique pas uniquement par *Chaetoceros*, beaucoup moins présent sur OR : une même discontinuité sépare en effet les deux mêmes périodes pour ces deux sites (avant et après mi-92), ce qui pourrait montrer un enrichissement global, du point de vue de l'abondance totale, de ces deux sites, à partir de la mi-92.

Les séries sont cependant trop courtes pour en tirer une conclusion formelle.

Les courbes des sites LL (Languedoc étang de Thau) et OL (Languedoc mer ouverte) sont beaucoup plus fluctuantes.

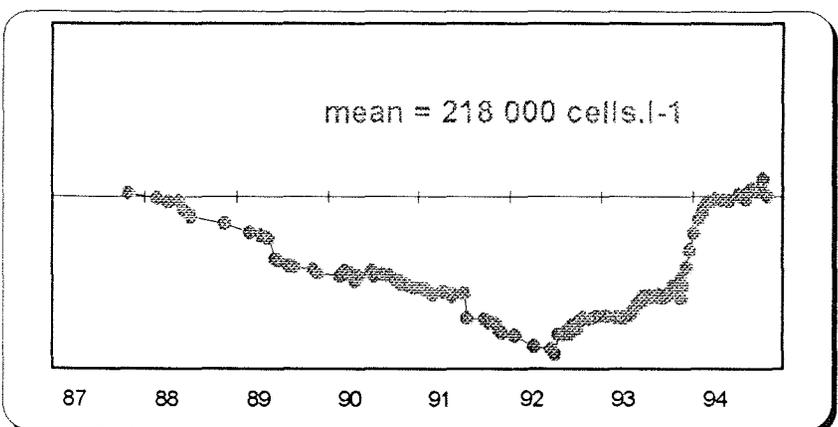
CUMULATED FUNCTION (Total abundance)

OR / OPEN SEA - ROUSSILLON



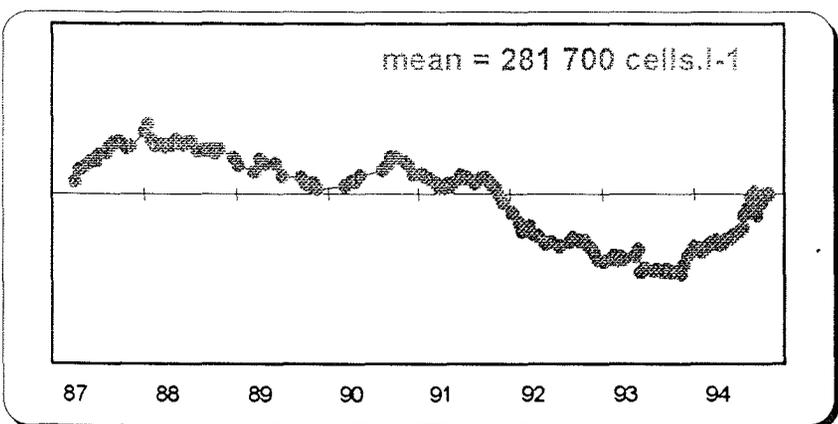
LOWER MEAN
FOR OR
probably due to
absence of blooms

LR / LAGOON - ROUSSILLON



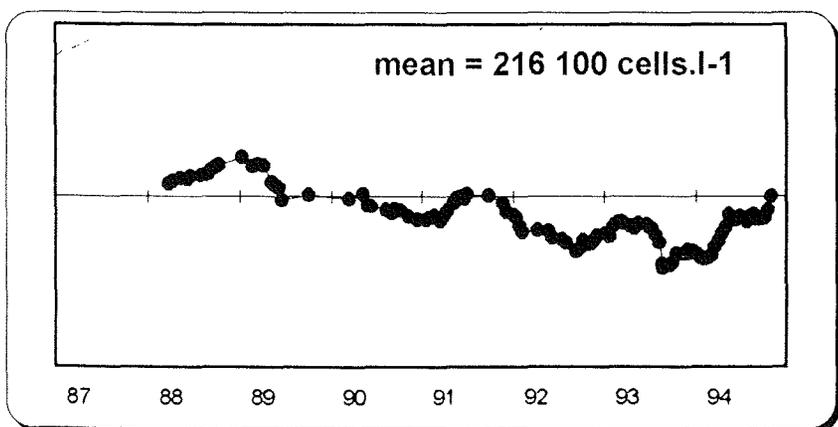
Same configuration
for OR and LR :
---> two dissimilar
periods :
. before mid 92
. late 92 to late 94

LL / LAGOON - LANGUEDOC



LL and OL
fluctuations from 87
to late 93

OL / OPEN SEA - LANGUEDOC



positive slope
late 93 and 94

Groupes « écologiques »

Les espèces phytoplanctoniques ont été regroupées par préférence écologique :

- en **foncé** : les espèces **benthiques et tychopélagiques**, qui, si elles sont observées dans la colonne d'eau, sont caractéristiques d'un brassage de l'eau avec remise en suspension à partir du fond,
- en **très clair** : les espèces **océaniques**, très rarement présentes à la côte,
- en **clair** : les espèces **néritiques ou côtières**, qui sont les plus nombreuses.

Les espèces d'eau douce, dont la présence pourrait indiquer de fortes dessalures, n'ont jamais été trouvées.

L'examen des graphiques des données brutes (à gauche), en cellules par litre, montre :

- la quasi absence d'espèces océaniques (la seule identifiée étant une espèce de *Chaetoceros*, *C. decipiens + lorenzianus*),
- les espèces benthiques ont une moyenne sensiblement égale sur les quatre sites (assez faible),
- pour les espèces côtières, la moyenne du site OR « Roussillon mer ouverte » est nettement plus faible.

Les espèces côtières expliquent donc la particularité du site OR en terme d'abondance totale, également plus faible que pour les autres sites.

Groupes « écologiques » / sommes cumulées

Espèces benthiques : tous les sites présentent la même discontinuité, début ou mi-90 (c'est à dire que l'abondance est globalement plus forte après 90 que sur l'ensemble de la période 87-94).

Roussillon / espèces côtières : les courbes ont le même aspect que les courbes d'abondance totale, avec deux périodes dissemblables avant et après mi-92.

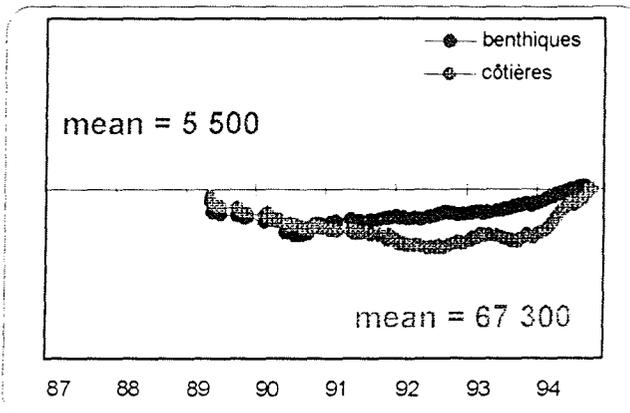
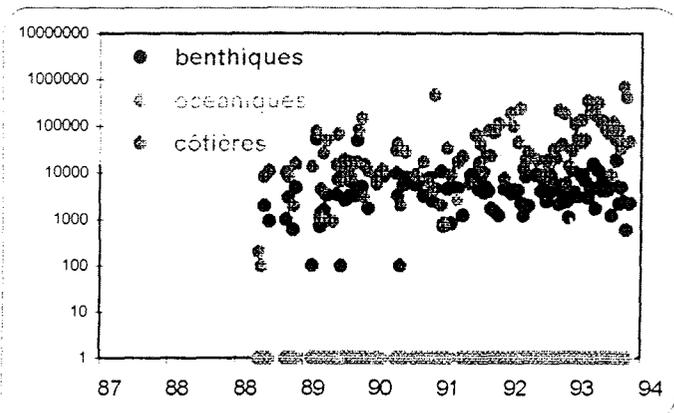
Languedoc : on observe une même progression des espèces benthiques par rapport aux espèces côtières, sur les deux sites.

ECOLOGY GROUPS

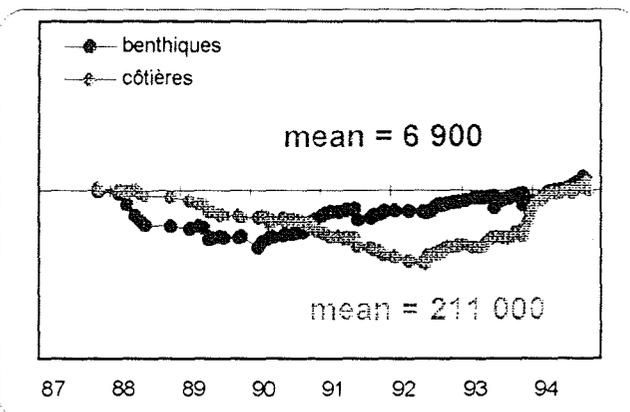
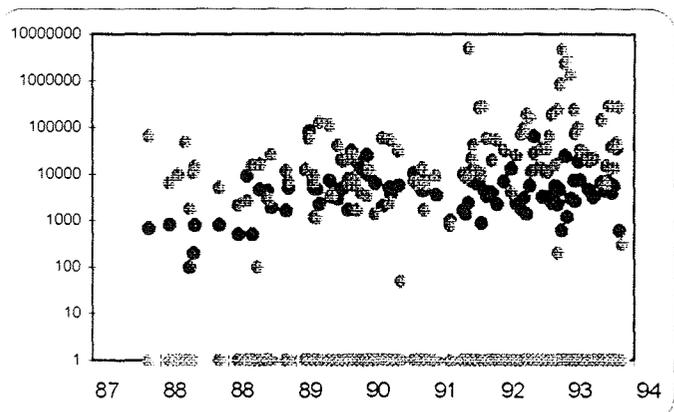
DATA

CUMULATED SUMS

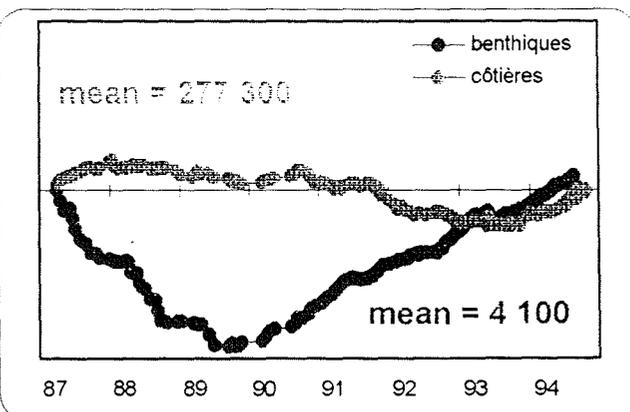
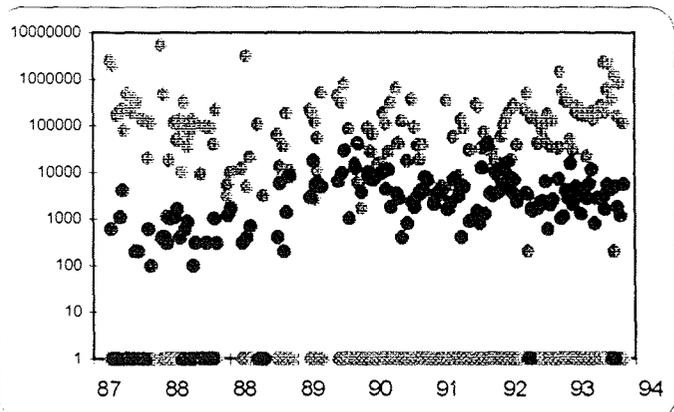
ROUSSILLON - OPEN SEA



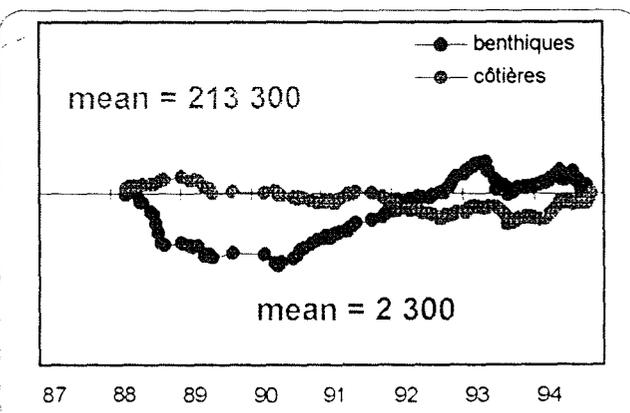
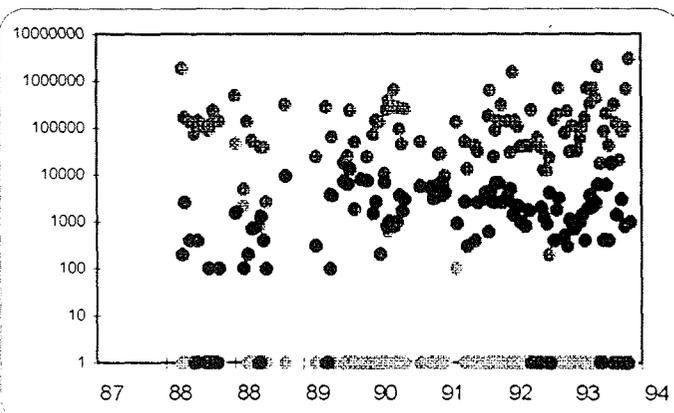
ROUSSILLON - LAGOON



LANGUEDOC - LAGOON



LANGUEDOC - OPEN SEA



***Dinophysis* / Roussillon**

Les espèces de *Dinophysis* identifiées sont plus diversifiées en mer ouverte qu'en étang.

On observe la même discontinuité sur les deux sites mi-91, mais avec une évolution totalement en sens inverse. La méconnaissance des conditions d'apparition et de développement de *Dinophysis* ne permet pas d'en conclure quoi que ce soit actuellement.

Le diagramme des moyennes trimestrielles de *Dinophysis* montre des tendances complètement opposées sur les deux sites :

- croissante pour LR (étang de Leucate),
- décroissante pour OR (mer ouverte).

La présence de *Dinophysis* est **plus fréquente au printemps en mer ouverte**, et **plus tardive**, c'est à dire en été, automne et même hiver, **dans l'étang de Leucate**.

***Dinophysis* / Languedoc**

Les espèces de *Dinophysis* sont plus diversifiées en mer ouverte, comme pour le Roussillon, mais les courbes sont beaucoup plus fluctuantes, avec de nombreuses discontinuités.

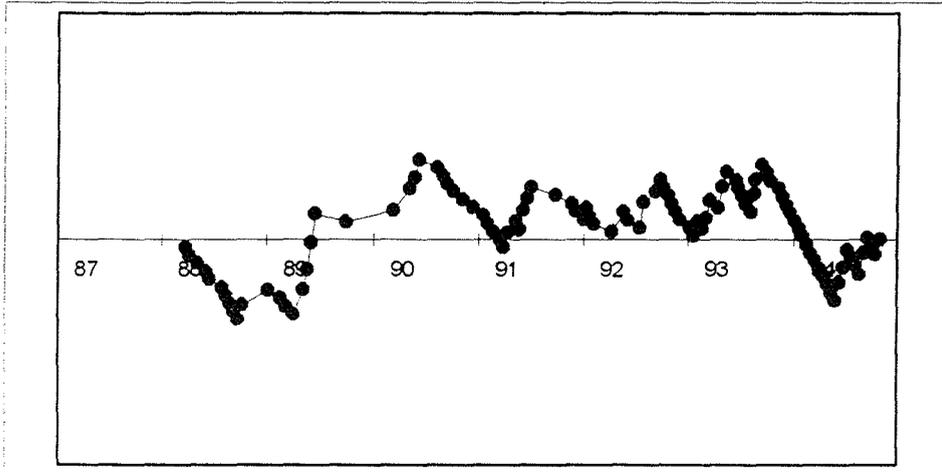
Le diagramme des moyennes trimestrielles montre une tendance décroissante en mer ouverte, comme pour le Roussillon. L'étang de Thau ne présente pas de tendance particulière, avec des concentrations qui sont toujours restées très faibles.

Dinophysis spp.

LANGUEDOC

CUMULATED FUNCTION

OL / OPEN SEA - LANGUEDOC

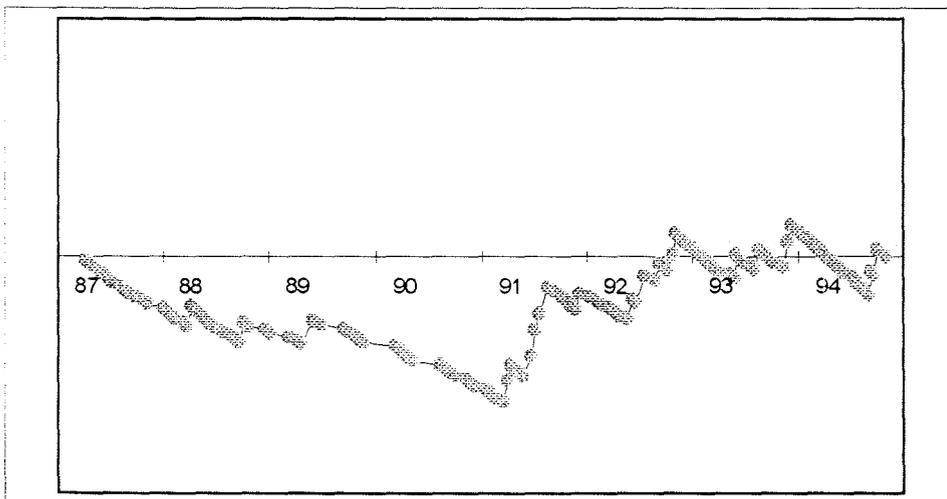


Dinophysis sp.
Dinophysis acuta
Dinophysis acuminata
Dinophysis caudata
Dinophysis rotundata
Dinophysis sacculus
Dinophysis tripos

mean = 90 cells.l-1

maximum = 1800 cells.l-1

LL / LAGOON - LANGUEDOC



Dinophysis acuminata
Dinophysis caudata
Dinophysis rotundata
Dinophysis sacculus

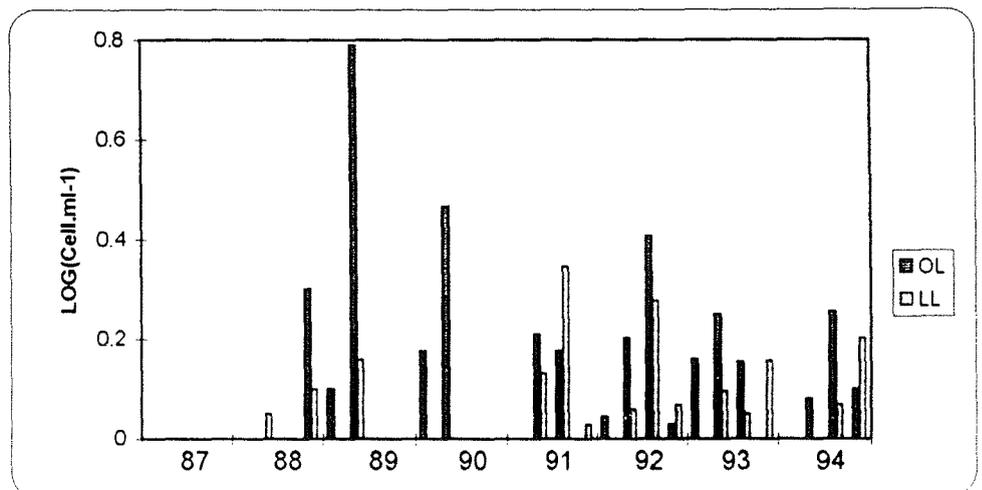
mean = 20 cells.l-1

maximum = 350 cells.l-1

TRIMESTRIAL MEANS OF *Dinophysis*

decreasing trend
for OL

low presence in
LL



Analyse en Composantes Principales (ACP) sur les moyennes saisonnières

- les variables sont les taxons,
- les individus sont les années/saisons,
- les valeurs utilisées pour l'analyse sont les log des moyennes saisonnières par taxon.

Graphes des taxons

On observe sur l'axe 1, un faisceau de genres / espèces qui évoluent de la même façon, et en outre, évoluent au cours du temps (*Chaetoceros*, *Gymnodinium...*)

On peut distinguer plusieurs types de peuplements, selon l'évolution au cours du temps :

sur l'axe 1 :

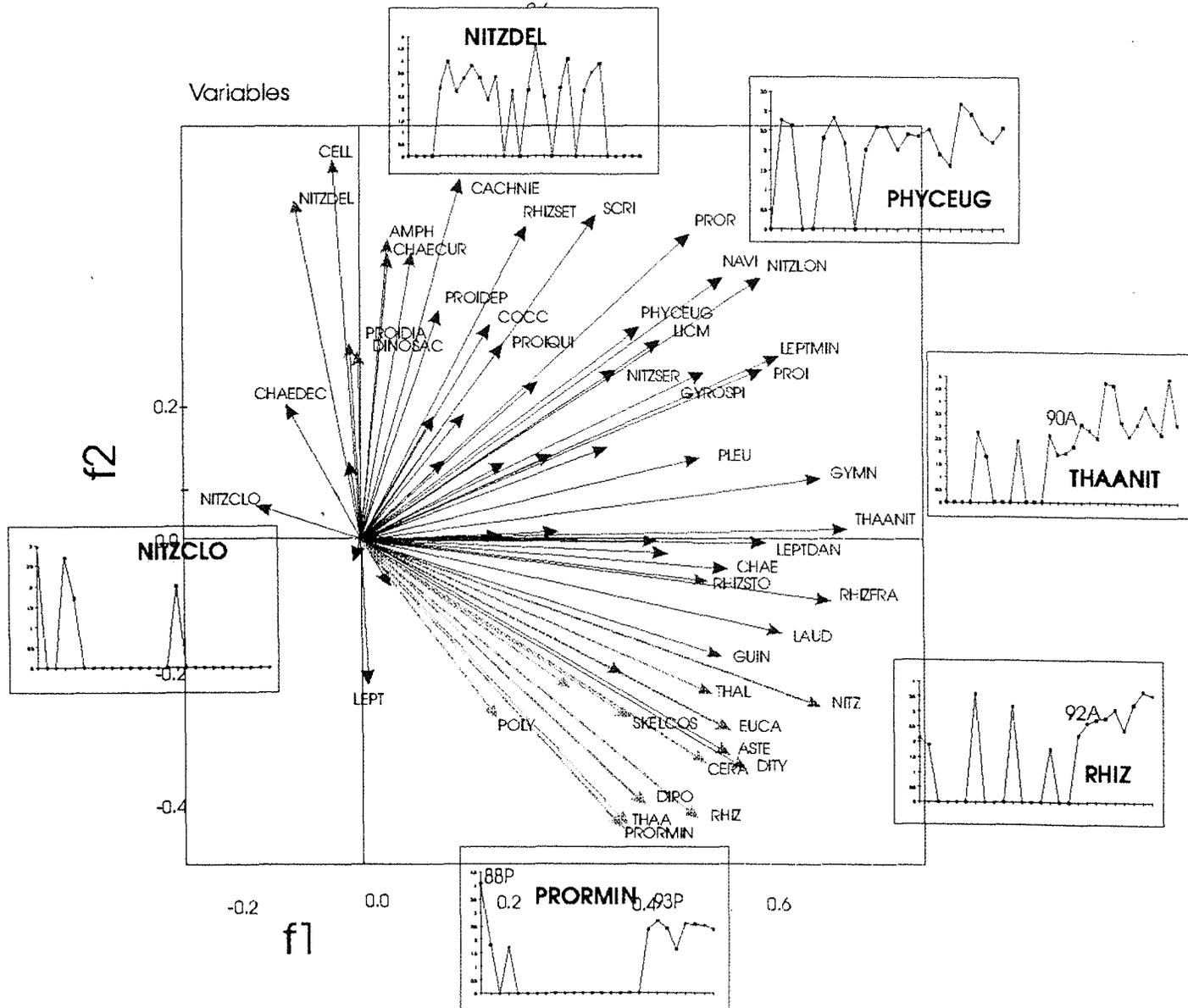
- une augmentation en fin de période (THAANIT *Thalassionema nitzschioides*)
- une disparition en fin de période (NITZCLO *Cylindrotheca closterium* = *Nitzschia closterium*)

sur l'axe 2, les cas contraires, avec les deux extrêmes :

- une présence seulement en milieu de période (NITZDEL *Pseudonitzschia delicatissima* = *Nitzschia delicatissima*)
- une présence seulement en début et en fin de période (PRORMIN *Prorocentrum minimum*).

PHYCEUG (Euglénophycées) et RHIZ (*Rhizosolenia*) sont des cas intermédiaires.

PRINCIPAL COMPONENTS ANALYSIS on SPECIES or GENUS
(Species or Genus means/season/year)



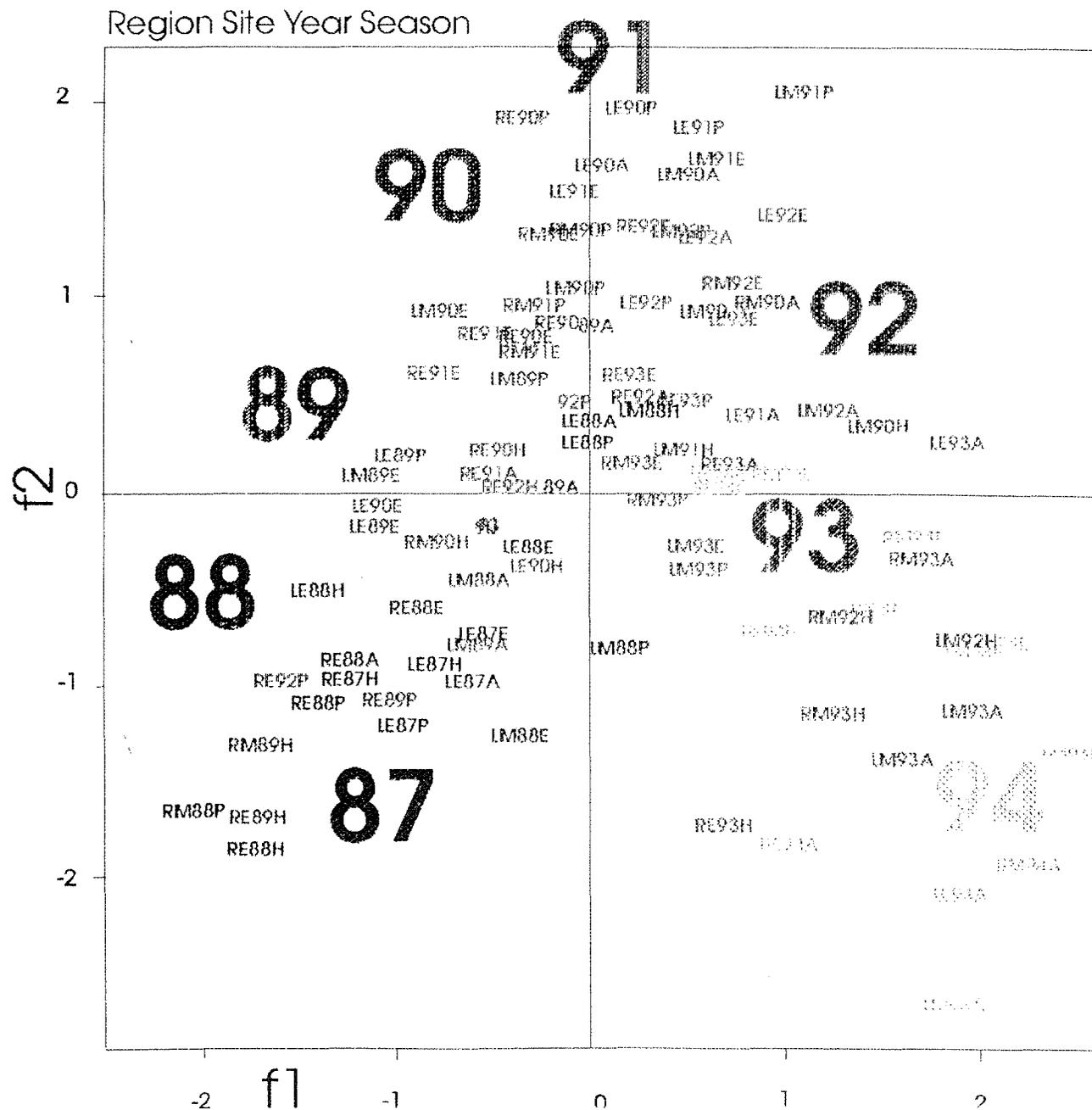
Analyse en Composantes Principales (ACP) sur les moyennes saisonnières

Graphe des individus

Représentation de chaque site/année/saison
par exemple LE88H = Languedoc Etang 1988 Hiver

On observe un gradient temporel remarquable de 1987 à 1994, qui ressemble à un effet GUTTMANN, ce qui signifie entre autres que **les espèces présentes en fin de période n'étaient pas présentes au début, et vice versa.**

PRINCIPAL COMPONENTS ANALYSIS on SPECIES or GENUS
(Species or Genus means/season/year)

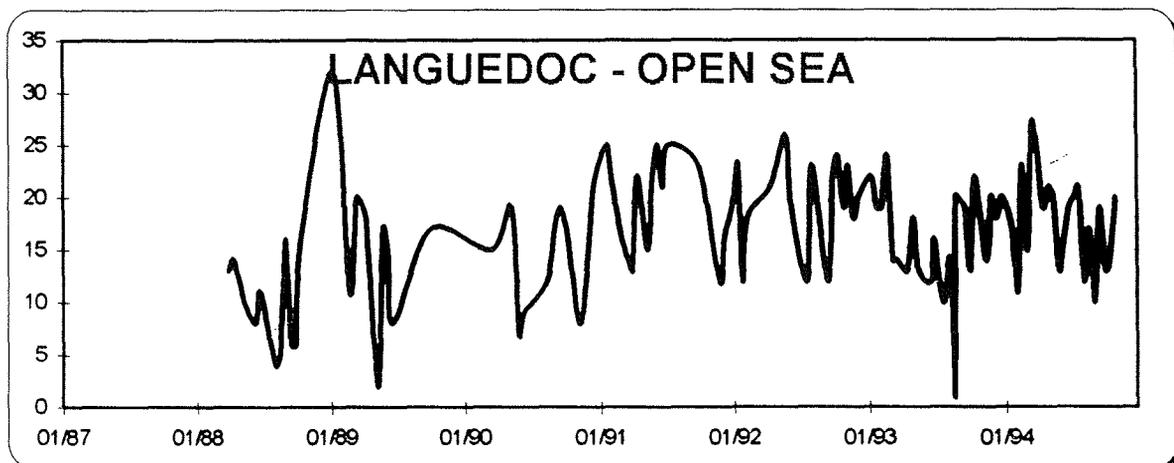
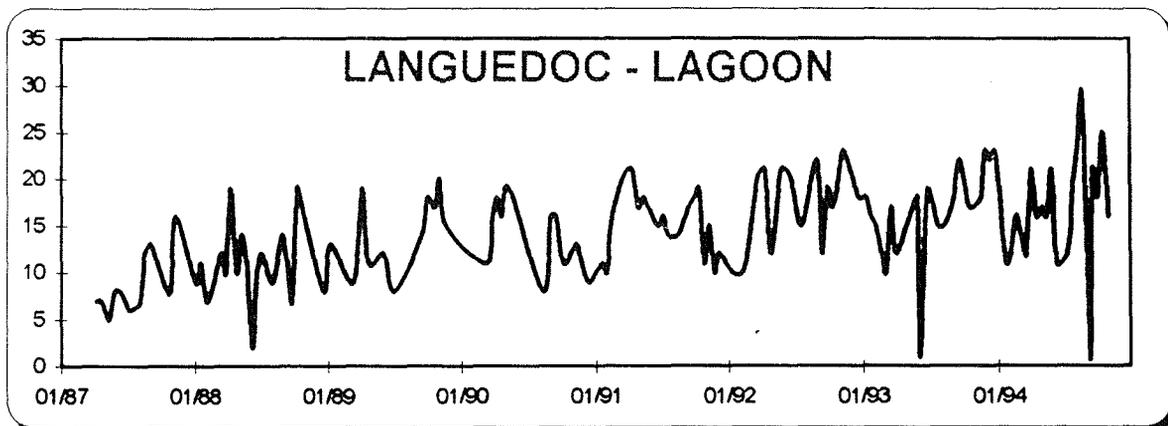
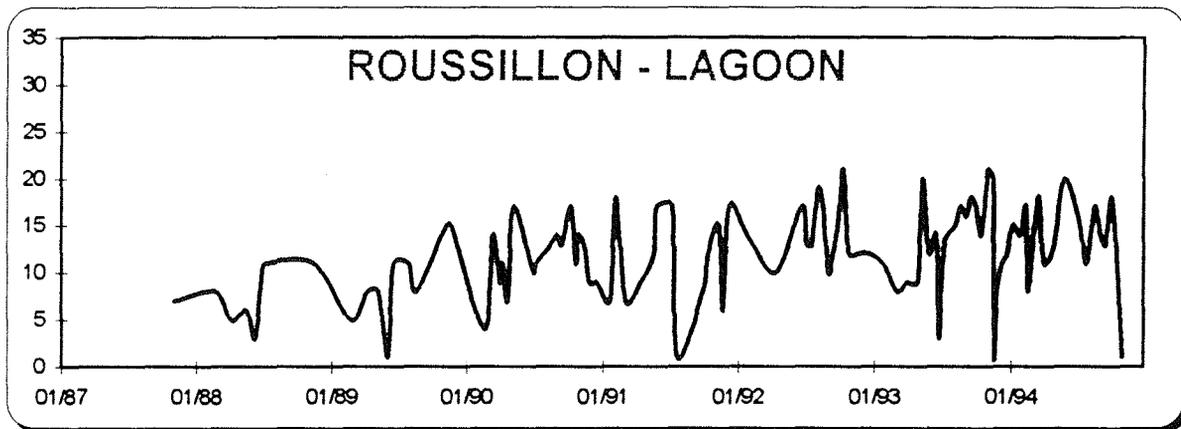
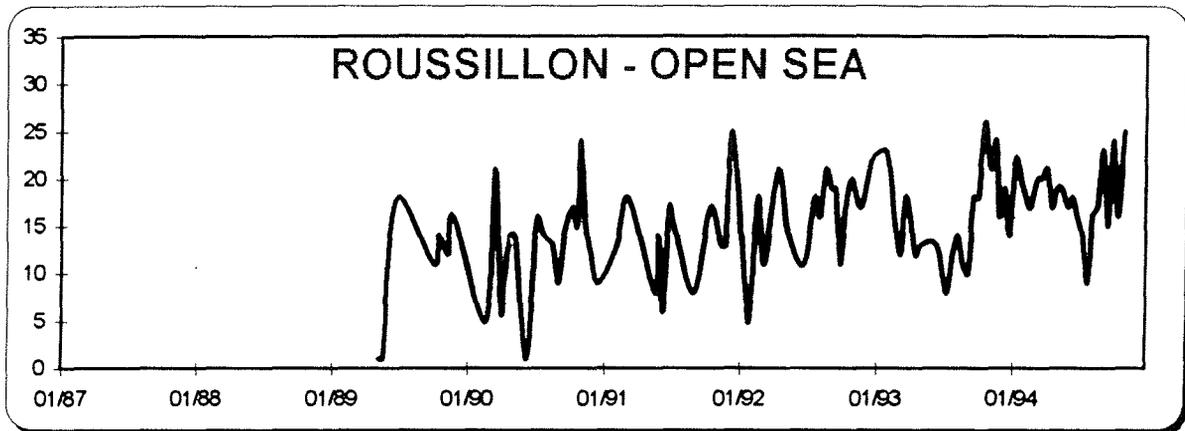


Richesse spécifique

Le gradient temporel, observé sur le graphe des individus, dans l'ACP sur les moyennes saisonnières, pose tout de même une question : ce gradient, très net et sans ambiguïté, n'est il pas le résultat d'un « **effet observateur** » ? En effet, l'observateur, devenant de plus en plus compétent au cours du temps, reconnaît de plus en plus d'espèces différentes.

Ce doute sur l'effet observateur peut être corroboré par la tendance croissante nette sur les graphiques de **richesse spécifique** (représentant le nombre de taxons identifiés à chaque date), tendance qui peut ne pas paraître tout à fait naturelle.

NUMBER OF TAXA IDENTIFIED FOR EACH DATE

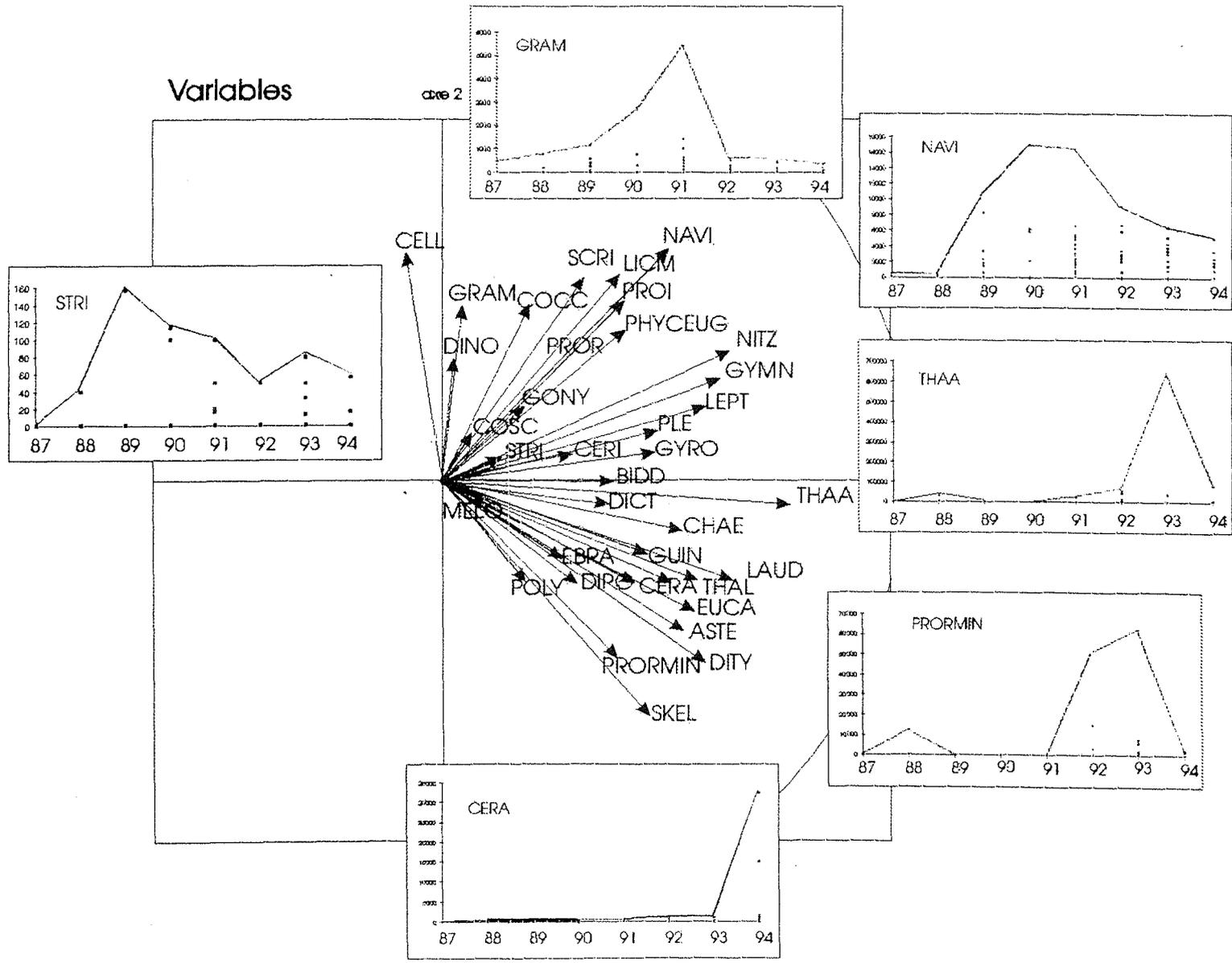


ACP sur les moyennes saisonnières

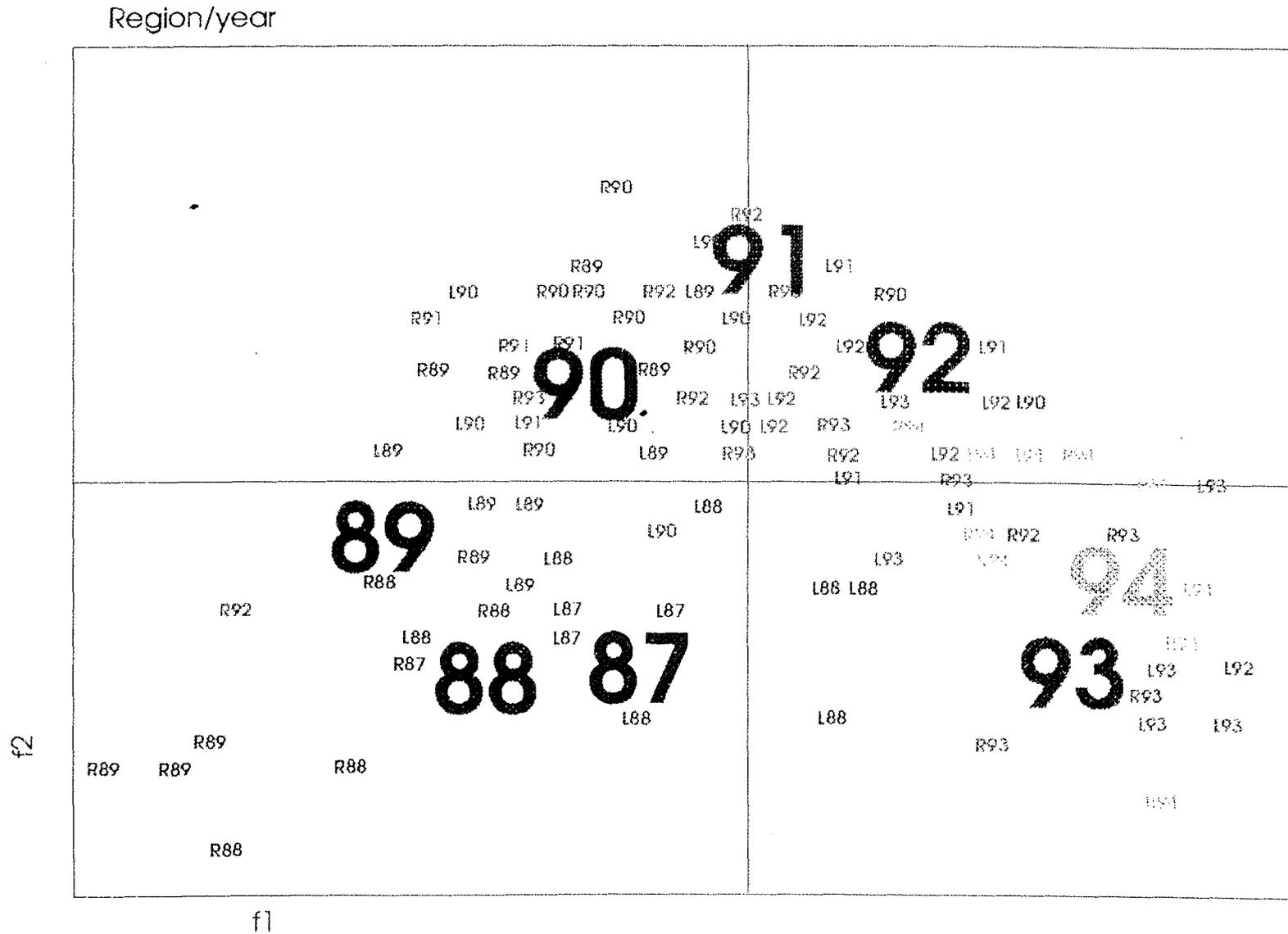
Or l'ACP, refaite après regroupement de toutes les espèces en genres (sauf PRORMIN *Prorocentrum minimum*), montre le même gradient (voir graphe suivant).

Ce gradient ne peut donc être dû qu'au seul « effet observateur », puisque l'observateur indique lui même qu'il y a peu de chance qu'il ait fait des erreurs sur les genres depuis 1987, alors qu'il y a un certain risque pour ce qui concerne les espèces.

PRINCIPAL COMPONENTS ANALYSIS on GENUS (Genus means/season/year)



PRINCIPAL COMPONENTS ANALYSIS on GENUS
(Genus means/season/year)



Conclusions

Les traits particuliers sont les suivants :

Spécificité forte de l'étang de Leucate :

- un nombre de taxons identifiés sur la période, inférieur à celui des autres sites,
- une richesse spécifique nettement plus faible,
- une tendance croissante de *Dinophysis*, à l'inverse des autres sites.

Spécificité de l'étang de Thau :

- une abondance totale plus faible,
- pas de blooms observés durant la période.

Aucune ressemblance particulière entre les deux étangs n'a été mise en évidence.

Traits caractéristiques d'une région par rapport à l'autre :

les évolutions d'abondances totales, expliquées par les évolutions des espèces côtières, ainsi que les évolutions de *Dinophysis*, **se ressemblent beaucoup plus entre sites d'une même région**, qu'entre sites d'un même écosystème ; les points d'une même région sont géographiquement proches, et malgré l'appartenance à un écosystème différent, les populations phytoplanctoniques de l'étang de Leucate, par exemple, suivent des évolutions semblables à celles du site en mer ouverte proche.

Traits communs aux quatre sites :

- une abondance totale globalement plus forte fin 93 et 94 que sur la période 87-93,
- une abondance plus forte des espèces benthiques de 90 à 94 qu'avant 90,
- une richesse spécifique qui semble croissante,
- un gradient temporel dans les espèces identifiées, certaines d'entre elles étant beaucoup plus présentes en fin de période et vice versa.

Les quatre sites présentent chacun des caractéristiques particulières et des tendances intéressantes. Il n'y a donc pas d'évidence claire d'une possibilité de suppression d'un site du réseau de surveillance, d'autant qu'aucune hypothèse sur l'évolution future de l'espèce toxique *Dinophysis*, ne peut être faite au vu des données actuelles.

– 7 –

Thèse sur les variabilités temporelles et spatiales
d'une micro-algue toxique *Dinophysis* spp.
Impact sur sa stratégie d'échantillonnage

7. Thèse en cours sur les variabilités temporelles et spatiales d'une micro-algue toxique *Dinophysis* spp. Impact sur sa stratégie d'échantillonnage.

La variabilité temporelle a été étudiée sur des résultats de mesures et d'observations effectuées sur des échantillons d'eau prélevés à Antifer (Seine Maritime), et concernant les concentrations en *Dinophysis* et quelques paramètres physico-chimiques. Des données météorologiques complètent l'information disponible. L'intérêt de cette série de données en est la **fréquence quasi-journalière**.

Les méthodes utilisées dans l'ensemble des travaux réalisés sur ces données semblaient inadaptées à la nature des relations liant la concentration en *Dinophysis* et les paramètres environnementaux. **Les modèles de régression dynamique** sont des modèles statistiques autorisant des relations variables dans le temps. Les résultats obtenus avec ces modèles ont permis une approche nouvelle des variabilités temporelles.

Les variables physiques expliquent une grande partie de la variabilité de *Dinophysis*. Par exemple, le vent semble induire des phénomènes d'accumulation et de dispersion des cellules sur le site d'Antifer. Ainsi, il apparaît que les fluctuations temporelles observées relèvent plus de la variabilité spatiale que de la variabilité temporelle. **L'étude des structures spatiales est donc désormais considérée comme fondamentale.**

Variabilités temporelle et spatiale d'une microalgue toxique: *Dinophysis*

Variabilité temporelle

Données prélevées à Antifer

- de 1987 à 1993
- période estivale
- fréquence quasi journalière
- mesure de la concentration en *Dinophysis* et de paramètres environnementaux

Première analyse: régression

⇒ résultats médiocres

Seconde analyse: régression **dynamique**

Régression simple (statique)

Des mesures d'une quantité X et d'une quantité Y sont réalisées.

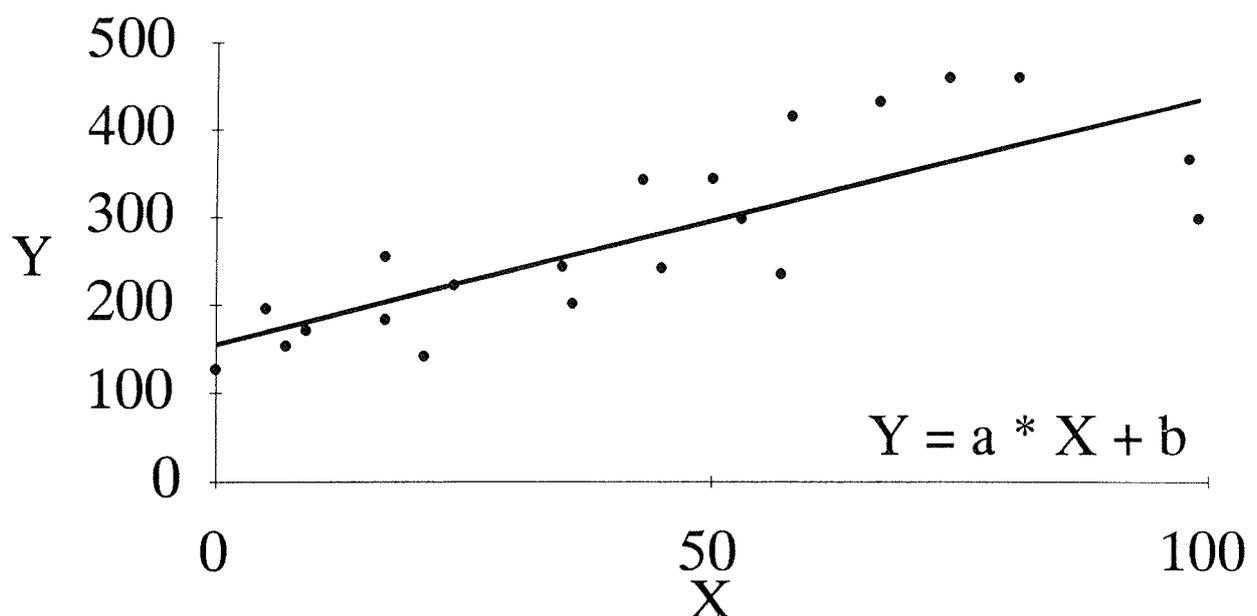
Le nuage de points des valeurs de Y en fonction de celles de X, laisse supposer une liaison linéaire entre X et Y. Cette liaison peut prendre la forme d'une droite d'équation $Y=aX+b$.

L'objet d'une régression est l'estimation optimale, au regard d'un critère donné – ici le critère des moindres carrés – des coefficients a et b.

La droite de régression obtenue résume assez bien la nature de la liaison entre X et Y, c'est à dire que la connaissance de la valeur de X fournit une information sur la valeur de Y.

Rappel: la régression

Y (ex: phyto)	196	299	...	343	254
X (ex: PO4)	5	53	...	43	17



Y est la variable dépendante ou à **expliquer**
X est la variable indépendante ou **explicative**

Si les mesures ont été effectuées à différentes dates, alors, à une date donnée, on peut associer :

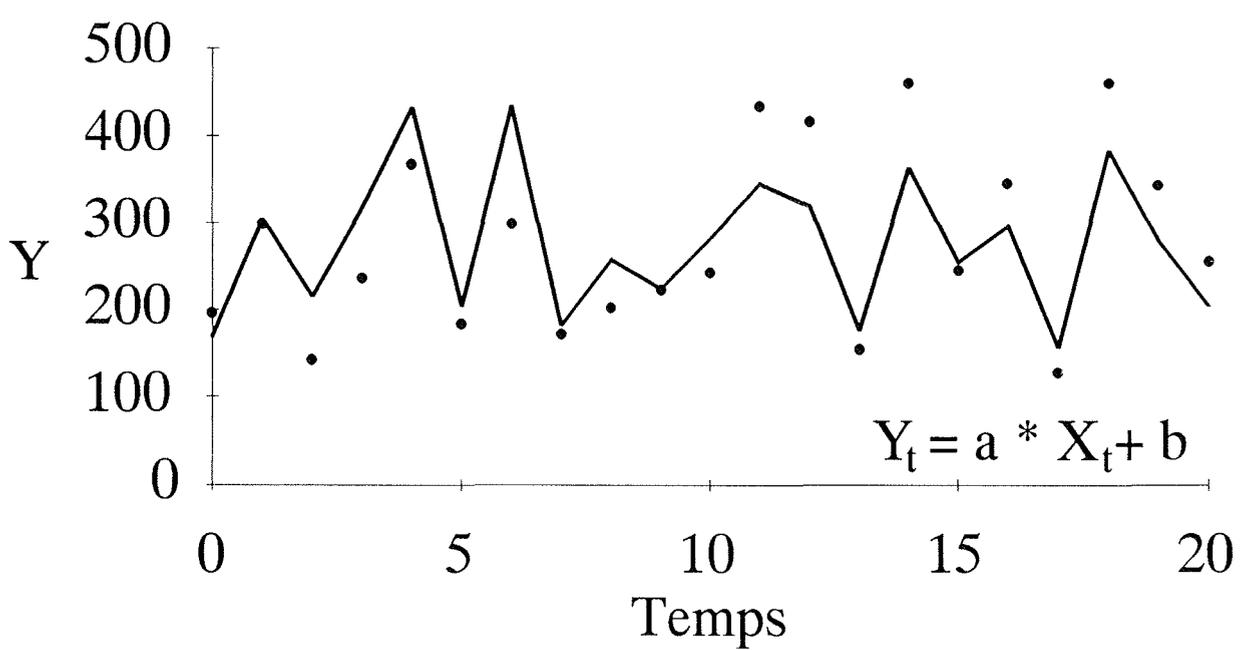
- . une mesure de X,
- . une mesure de Y,
- . une valeur calculée $Y=aX+b$

Ici, le temps est porté en abscisse, Y en ordonnée, et la ligne brisée représente la série temporelle des valeurs de la régression $Y=aX+b$.

Comme la régression est utilisée comme outil d'analyse d'une série temporelle, on doit indiquer son équation par le temps : seules les variables X et Y sont indicées, car leurs valeurs varient dans le temps. Les coefficients a et b ne le sont pas, car, estimés à partir de toutes les valeurs de X et de Y, ils sont constants sur toute la période d'observation,.

Sur le graphique, on constate qu'à une augmentation de Y correspond bien une augmentation des valeurs de la régression, mais les erreurs sont parfois importantes.

Temps	0	1	...	19	20
Y	196	299	...	343	254
X	5	53	...	43	17
Y=aX+b	169	305	...	276	203



Régression dynamique avec les mêmes données

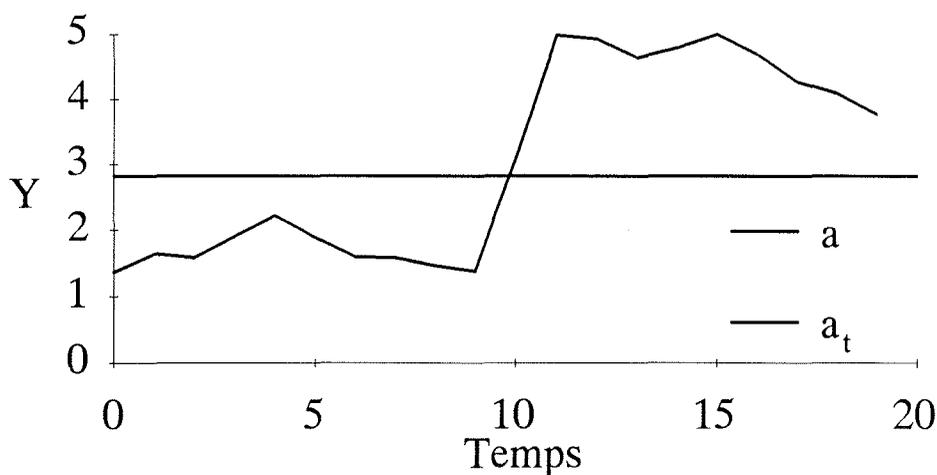
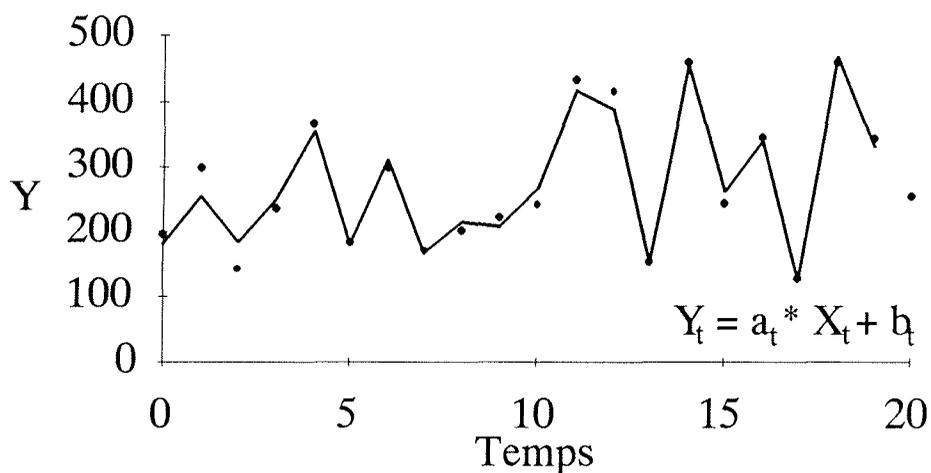
Les erreurs sont beaucoup moins importantes. La différence entre la régression dynamique et la précédente régression (statique), réside dans l'expression de Y en X : les coefficients a et b sont indicés par le temps, ce qui signifie qu'ils ne sont plus constants mais variables dans le temps.

Le 2ème graphique représente le coefficient constant a de la régression statique, et la série temporelle du coefficient a_t de la régression dynamique. Deux périodes apparaissent distinctement : de la date 0 à la date 9, a_t varie entre 1 et 2, et de la date 11 à la date 19, il varie entre 4 et 5. Ce changement de niveau correspond bien à une réalité de la série temporelle, car les données utilisées sont des données simulées (pour les neuf premières valeurs de Y, la vraie valeur de a est 2, elle est de 3 pour la date 10 et de 4 pour les dix dernières valeurs).

Dans la régression statique, à une valeur X donnée, on associe une et une seule valeur $Y=aX+b$. Dans la régression dynamique, la valeur associée n'est pas unique, car dépendante des valeurs variables dans le temps des paramètres a_t et b_t . Ainsi, l'effet de X sur Y est variable dans le temps.

Toutefois, à l'instar de la régression statique, la régression dynamique quantifie des relations entre des séries de nombres mais n'établit pas de relations de causalité. L'hypothèse d'une relation de causalité est laissée à l'interprétation de l'utilisateur.

Régression dynamique:



Le coefficient de la variable indépendante
peut varier dans le temps



L'influence de la variable indépendante
peut varier dans le temps

L'application réalisée sur les données d'Antifer est une **régression dynamique multiple**, c'est à dire qu'au lieu d'une seule variable explicative X, il y en a plusieurs.

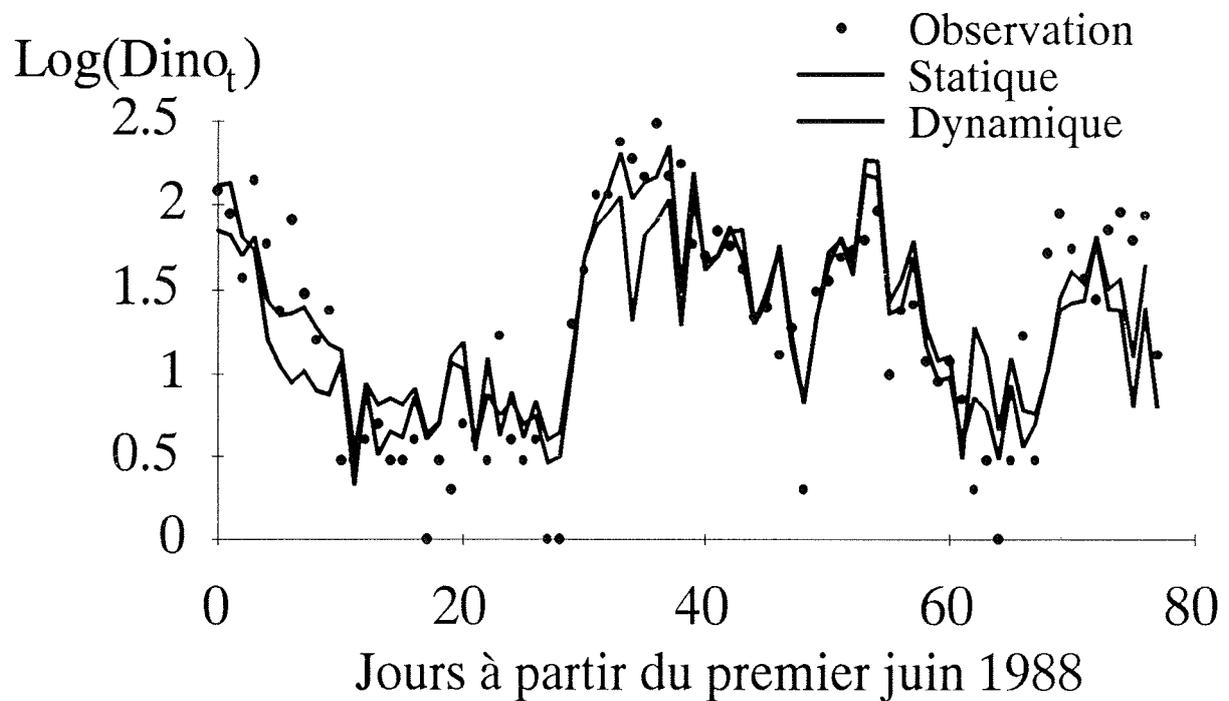
Les données sont celles de l'année 1988 et le modèle retenu est composé d'une constante, et, par ordre décroissant d'influence, du débit de la Seine, de la température, de l'insolation, des phosphates, et des vents en provenance du sud-ouest.

Bien que le résultat soit moins spectaculaire qu'avec les données simulées, la régression dynamique commet des erreurs moins importantes que la régression statique ; plus précisément, la somme des carrés des erreurs est deux fois moins importante.

Application: Antifer 1988

Modèle retenu:

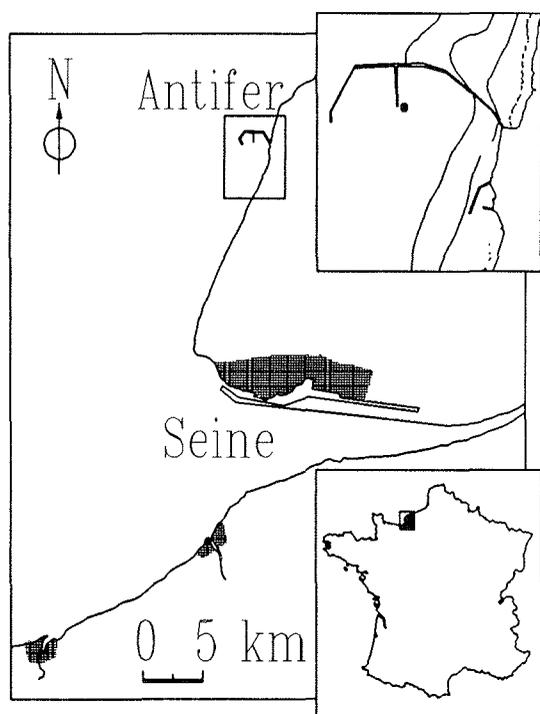
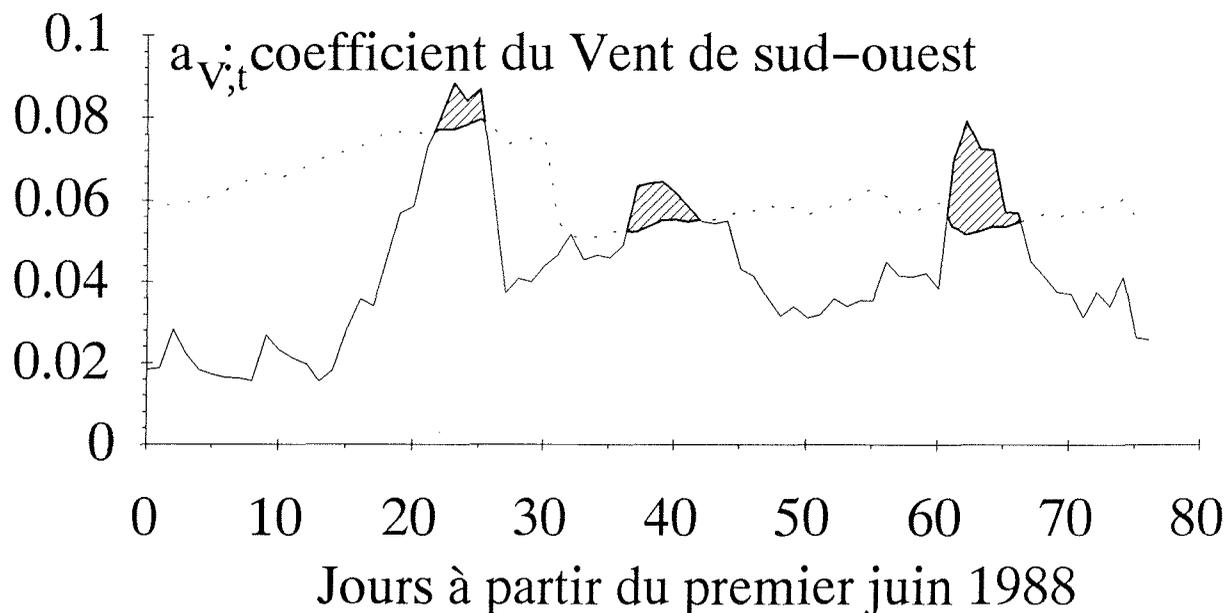
$$\begin{aligned} \log(\text{Dino}_t) = & b_t \quad (\text{constante}) \\ & + a_{D,t} * \text{DebitSeine}_t \\ & + a_{T,t} * \text{Température}_t \\ & + a_{I,t} * \text{Insolation}_t \\ & + a_{P,t} * \text{Phosphates}_t \\ & + a_{V,t} * \text{VentSudOuest}_t \end{aligned}$$



Le graphique décrit la variation temporelle du coefficient de la **variable « vents de sud-ouest »** : la courbe en pointillé est le seuil de signification et les parties hachurées correspondent à des coefficients significativement différents de zéro. Le coefficient présente de brusques variations, et il est significatif sur des périodes de quelques jours.

En tenant compte de la configuration du site d'échantillonnage, on peut admettre que les vents de sud-ouest induisent des phénomènes d'accumulation des cellules de *Dinophysis*. C'est précisément ce comportement que l'on saisit avec les variations du coefficient de la variable « vents de sud-ouest ».

Cependant, la première et la dernière période correspondent à des vents de nord-est induisant des phénomènes de dispersion qui n'avaient pas été envisagés dans un premier temps.



On peut admettre:

Vent de sud-ouest



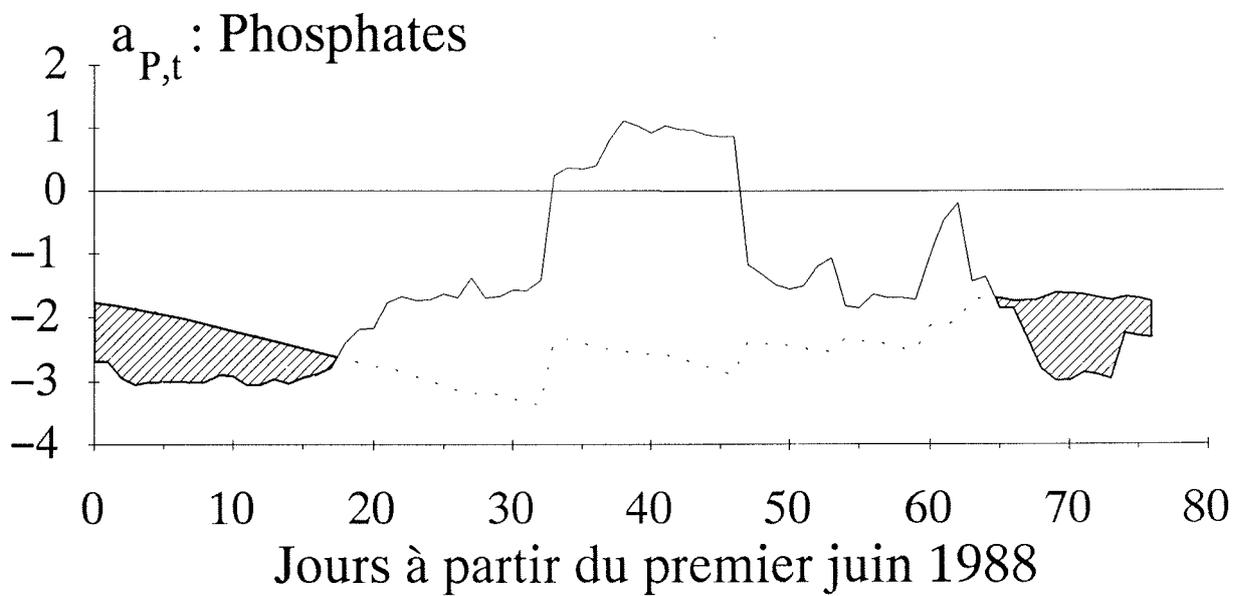
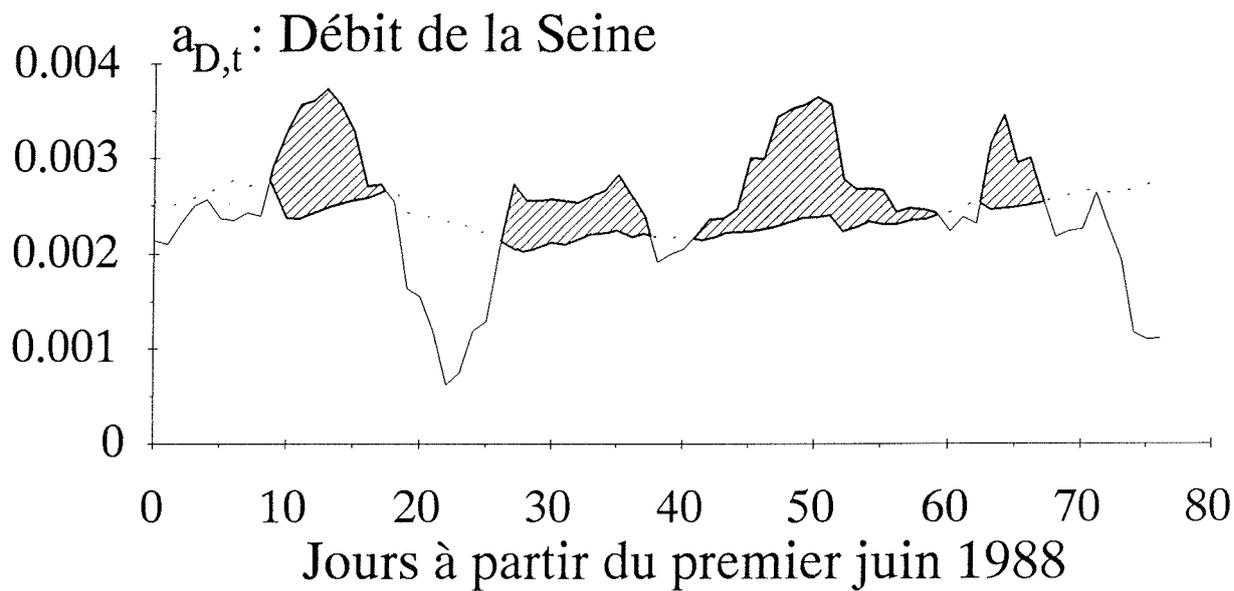
accumulations

L'influence du vent de sud-ouest est dépendante de la force du vent de sud-ouest et de la concentration en *Dinophysis*.

Le coefficient de la **variable « débit de la Seine »** est plus difficile à interpréter. Son évolution est globalement moins accidentée. Les périodes significatives, correspondant à des augmentations du débit, sont plus larges. De telles augmentations peuvent correspondre à une dessalure de surface, et donc à une augmentation de la stratification. Or *Dinophysis* est observé préférentiellement en eau stratifiée.

L'augmentation du débit peut également correspondre à des mouvements hydrodynamiques importants : les variations du coefficient seraient alors significatives du passage de masses d'eaux.

Le coefficient de la **variable « phosphates »** est encore plus problématique. Il est globalement négatif, ce qui infirme une hypothèse éventuelle de consommation des phosphates par *Dinophysis*. Les deux périodes pendant lesquelles ce coefficient est significativement différent de zéro, ne présentent aucune particularité permettant une interprétation.



Conclusions

- Les modèles dynamiques permettent une approche nouvelle des variabilités temporelles
- Les variables physiques expliquent une grande partie de la variabilité temporelle de *Dinophysis*
- Les fluctuations temporelles observées relèvent plus de la variabilité spatiale que de la variabilité temporelle

Variabilité spatiale

Existe t-il une structure spatiale?

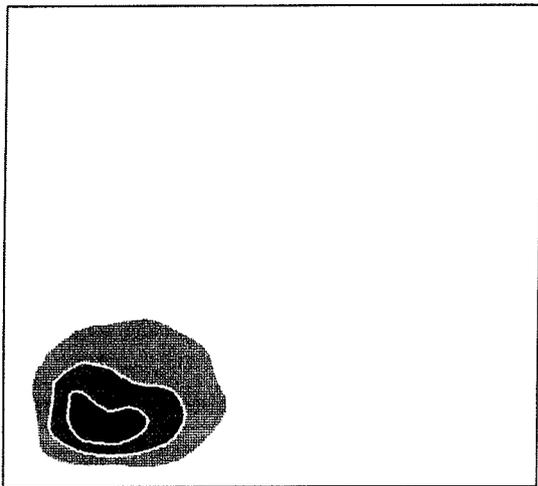
Evolution temporelle d'une telle structure spatiale?

L'étude de la variabilité spatiale de *Dinophysis* est considérée comme fondamentale.

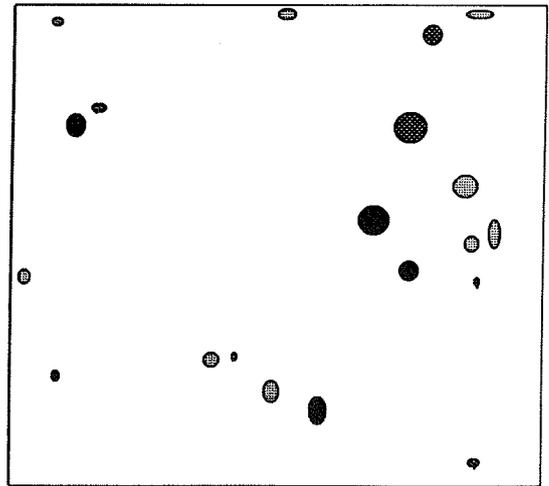
On entend par **structure spatiale**, l'existence de gradients donnant lieu à des structures en forme de taches ; à l'inverse, l'absence de structure se caractérise par une distribution aléatoire dans l'espace. La caractérisation de présence ou d'absence de structure spatiale est relative aux échelles d'observation choisies.

S'il existe une structure spatiale, alors une mesure apporte de l'information sur son environnement. Mais l'observation d'une structure spatiale a une validité limitée dans le temps : d'une part, la tache est déplacée par les forces hydrodynamiques, d'autre part, les cellules phytoplanctoniques y continuent leur évolution.

Structure spatiale



Présence d'une
structure spatiale



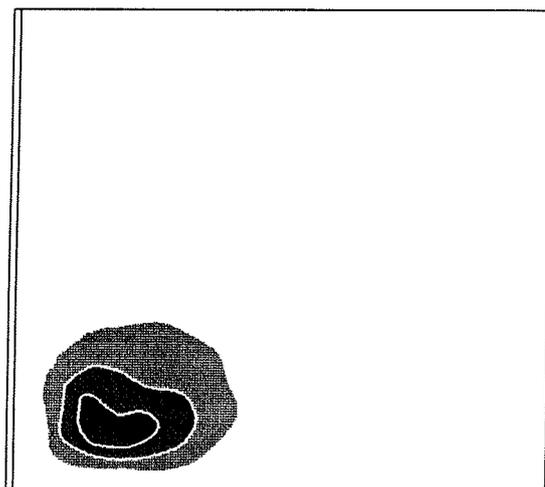
Absence de
structure spatiale

Le suivi temporel d'une structure spatiale pourrait ressembler à celle ci :

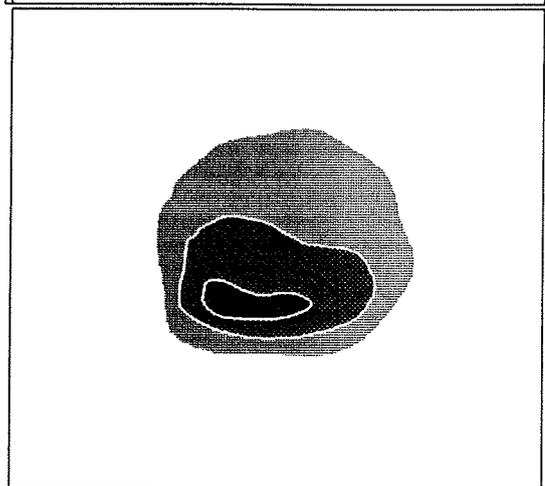
- au temps 1, on réalise la première observation,
- au temps 2, on observe un déplacement et une augmentation de la surface de la tache,
- au temps 3, on constate l'apparition d'un nouveau foyer de développement.

Evolution d'une structure spatiale

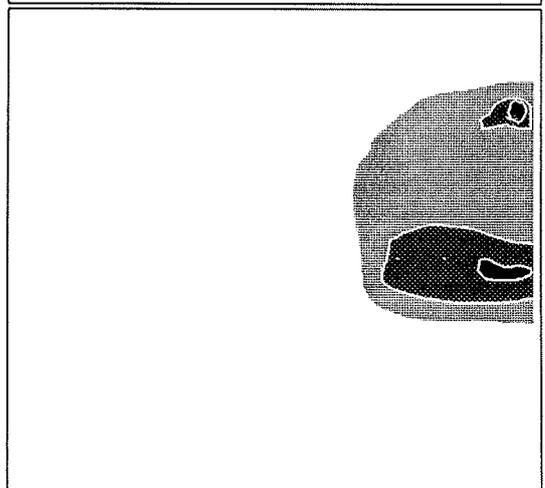
Temps 1



Temps 2



Temps 3



Impact sur la stratégie d'échantillonnage

Connaissance de la structure spatiale
caractéristique d'une microalgue toxique

+

Connaissance de l'hydrodynamique du
bassin considéré

⇒

Optimisation de l'emplacement des points
d'échantillonnage

-- 8 --

Rapport annuel du laboratoire côtier de Nantes
pour les résultats REPHY

8. Rapport annuel du laboratoire côtier de Nantes pour les résultats REPHY.

La nécessité de mieux faire connaître le REPHY aux différents partenaires régionaux, a conduit le laboratoire côtier de Nantes à éditer un rapport annuel, pour une meilleure diffusion des résultats. Le premier rapport est sorti en 1994, et celui de 1995⁸ contient une page de synthèse en couleur pouvant être éventuellement extraite du document.

L'aspect descriptif a été privilégié, avec des représentations simples de séries temporelles, sans traitement statistique.

De l'avis général, **ce type de rapport**, synthétique et rapide à parcourir, est très intéressant, et **mérite d'être réalisé tous les ans ou tous les deux ans dans chaque laboratoire côtier.**

C. Belin estime que celui ci peut servir de modèle au départ, mais qu'il ne faut pas figer définitivement la forme d'un tel rapport, celui ci devant pouvoir évoluer au fur et à mesure des améliorations que chaque laboratoire côtier y apportera.

Ce rapport n'est pas enregistré comme rapport interne, afin que sa diffusion à l'extérieur ne soit pas en contradiction avec la définition même du rapport « interne ». **Cela pose le problème de L'INEXISTENCE D'UNE FORMULE ADÉQUATE pour tous les rapports de ce type, ainsi que pour les rapports de méthodologie, QUI ONT POURTANT ABSOLUMENT BESOIN D'ÊTRE ENREGISTRÉS OFFICIELLEMENT POUR ÊTRE CONNUS ET CITÉS DANS UNE BIBLIOGRAPHIE.**

C. Belin souligne le contenu très intéressant et la présentation claire et agréable. Les termes et concepts doivent cependant être harmonisés, par exemple :

- le vrai nom du REPHY : Réseau de Surveillance du Phytoplancton et des Phycotoxines,
- il n'y a pas de hiérarchie dans les trois objectifs du REPHY, et donc pas d'objectif « principal »,
- les termes « suivi » et « alerte », ne doivent plus être employés, car ils ne correspondent plus aux stratégies actuellement décrites,
- d'autres termes sont devenus institutionnels : « flore totale », « flore partielle »...

voir extrait du rapport dans les pages suivantes

⁸ Résultats du REPHY, de la pointe de Merquel (Loire Atlantique) aux Sables d'Olonne (Vendée), année 1995. Laboratoire DEL/Nantes.

DIRECTION DE L'ENVIRONNEMENT
ET DE L'AMENAGEMENT DU LITTORAL

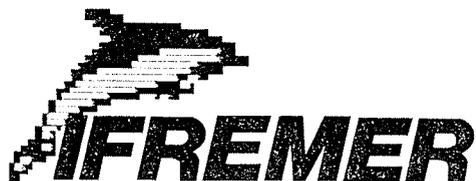
LABORATOIRE COTIER DE NANTES

RESULTATS DU REPHY

(REseau de surveillance PHYtoplanctonique)

de la pointe de Merquel (Loire-Atlantique)
aux Sables d'Olonne (Vendée)

ANNEE 1995



diamètre d'une cellule: 20 à 30 microns

cellules en chaîne. diamètre d'une cellule: 10 à 50 microns

RESUME DES FAITS MARQUANTS DE L'ANNEE 1995

On peut considérer que l'année 1995 aura été en plusieurs points remarquable :

- La météorologie s'est caractérisée par les forts apports pluvieux de la fin 1994 et du début 1995, donnant lieu à de nombreuses crues et inondations qui n'ont pu que favoriser l'enrichissement du milieu marin littoral en éléments nutritifs à cette période. Malgré cela, le bilan hydrique annuel n'est pas excédentaire, les pluies devenant ensuite très faibles jusqu'à l'automne.
- Une analyse du rayonnement solaire met en évidence plusieurs périodes stables de fort apport énergétique, témoins d'un beau temps durable. Comme on le sait, ces périodes, si elles ne sont pas forcément à l'origine de l'apparition des espèces phytoplanctoniques, sont par contre nécessaires à leur expression dans le milieu marin pour donner des "eaux colorées" génératrices d'événements remarquables.

L'ensemble de ces conditions explique certainement en grande partie les importantes eaux colorées non toxiques à *Noctiluques* et à *Mesodinium rubrum* (micro-zooplancton responsable du phénomène d'"huîtres rouges"), en avril.

De même, début mai, se caractérise par la forte prédominance des diatomées du genre *Rhizosolenia*.

Comme chaque année, *Dinophysis* fut l'objet d'un suivi attentif et sa présence déclencha des tests de toxicité avec fermeture de zones en juin dans la région des Sables d'Olonne. Sa période de plus grande abondance coïncide avec la 3ème période de beau temps en début juin, avec les diatomées *Pseudonitzschia* et *Leptocylindrus*.

Mais l'événement remarquable de l'année 1995 reste l'apparition et la multiplication du dinoflagellé *Gymnodinium*, toxique pour la faune marine, qui s'est développé sur un très vaste secteur du littoral atlantique, et qui a connu son plein développement lors de la seconde quinzaine de juin, pour ne disparaître vraiment qu'en fin juillet.

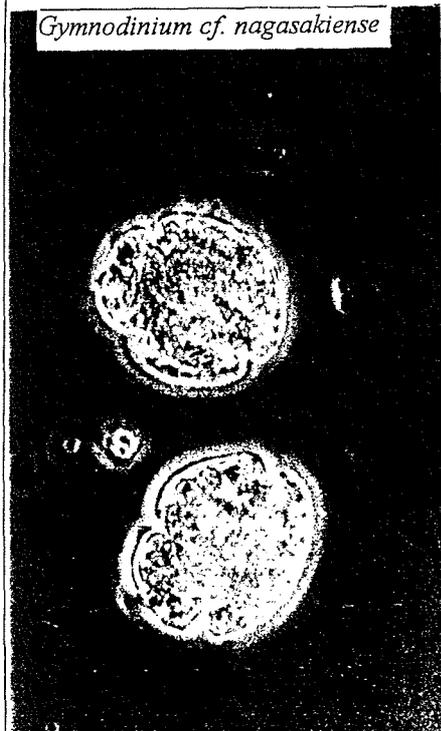
La faune marine en fut fortement affectée (vers, poissons et mollusques) avec des pertes économiques sensibles pour la conchyliculture.

Dinophysis



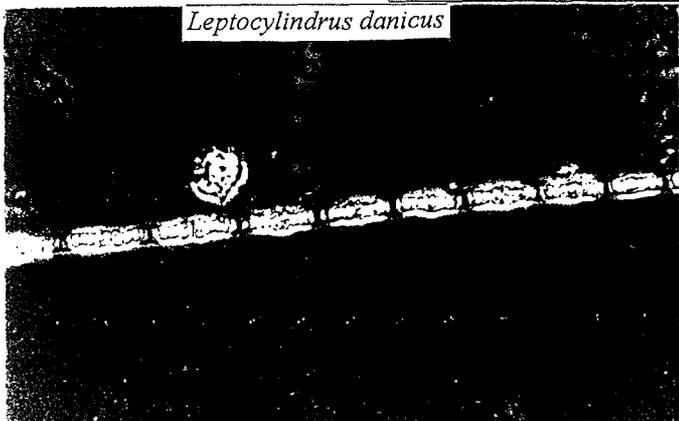
longueur d'une cellule: 30 à 100 microns

Gymnodinium cf. nagasakiense



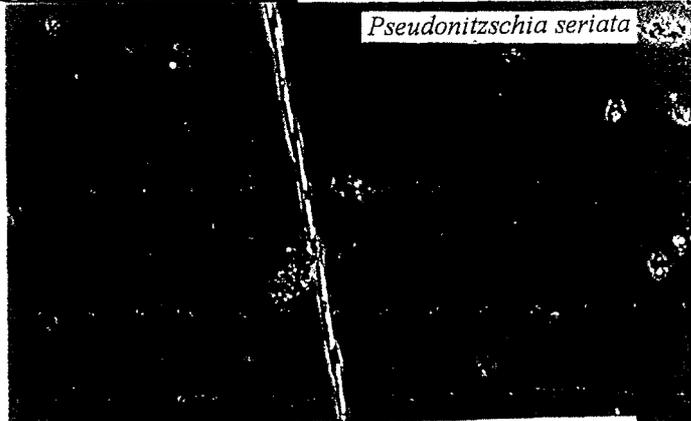
longueur d'une cellule: 24 à 40 microns

Leptocylindrus danicus



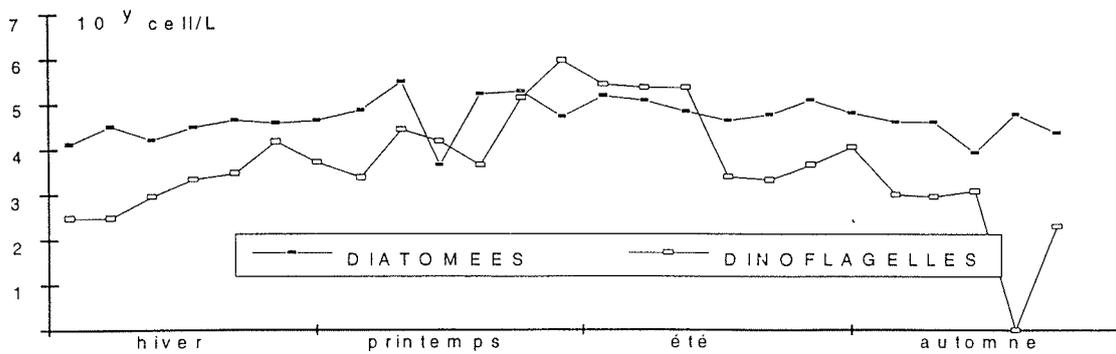
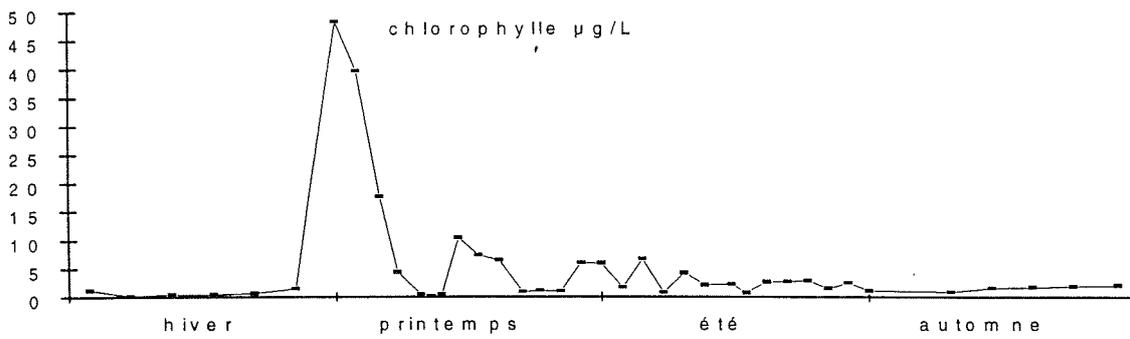
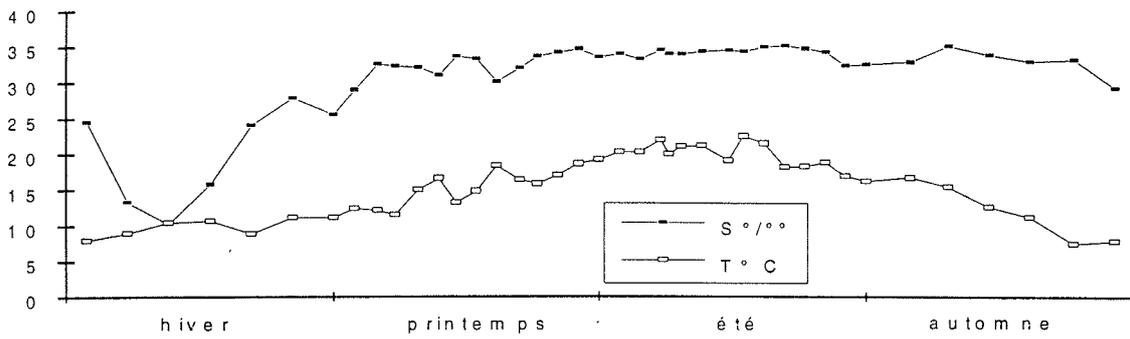
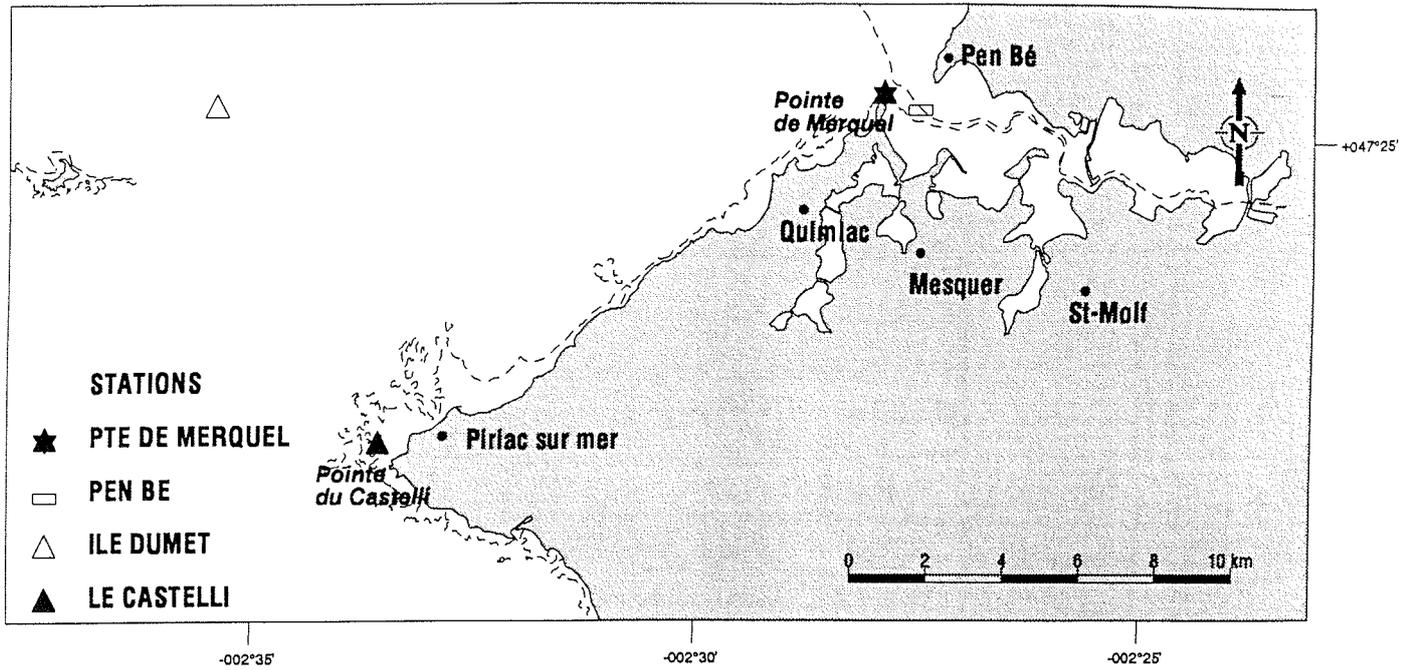
cellules en chaîne. diamètre d'une cellule: 2 à 10 microns

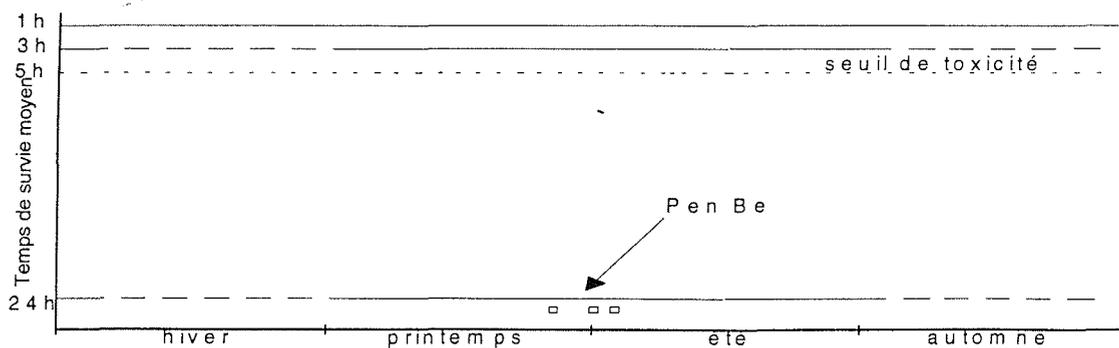
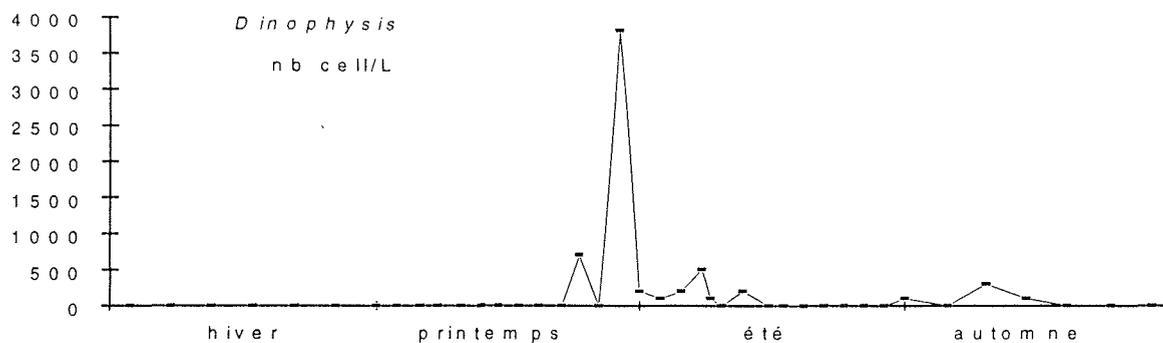
Pseudonitzschia seriata



cellules en chaîne. diamètre d'une cellule: 6 microns

PEN BE 1995





COMMENTAIRES

- Le prélèvement d'eau se fait à l'extrémité de la jetée de Merquel.
- La température moyenne est de 14.4°C (minimum à 7.5 °C le 12/12 , maximum à 22.5°C le 21/08).
- La salinité moyenne est de 29.8 g/l (minimum à 10.2 g/l le 06/02, maximum à 35.2 g/l les 04/09 et 30/10).
- Fin mars, la teneur en chlorophylle atteint 48µg/l, pour redescendre progressivement jusqu'à fin mai. Les teneurs, par la suite, seront comparables à celles de l'année 1994 (inférieures à 10µg/l).
- La présence marquée des diatomées (plus de 300 000 cell/l), commence début mai avec une prédominance de *Rhizosolenia* (83%). Au 15 mai, on assiste à une chute de la teneur totale en diatomées. Elle restera inférieure à 200 000 cell/l tout au long du printemps et de l'été (contre 400 000 cell/l à 1 600 000 cell/l l'an passé).
- Les dinoflagellés dominent les diatomées de juin à début aout, lors de la prolifération de *Gymnodinium nagasakiense*, qui représente 89% de la flore totale le 26/06, date à laquelle sont repérées les eaux colorées.
- Les *Dinophysis* apparaissent fin mai et atteignent 3800cell/l le 26/6 sans que les tests souris ne décèlent la présence de toxine.

Poster " suivi du phytoplancton en rade de Brest"

9. Poster 'Suivi du phytoplancton en rade de Brest'

Ce poster a été présenté à l'occasion de journées organisées par la CUB (Communauté Urbaine de Brest) en mars 1995. Les résultats présentés sur ce poster sont repris dans la synthèse sur la rade de Brest demandée par la CUB, actuellement sous presse. Il s'agit d'un exemple de valorisation des données REPHY, facilement transposable à un autre laboratoire côtier.

— 10 —

Premiers résultats des campagnes DINOSEINE

10. Premiers résultats des campagnes DINOSEINE (*Dinophysis* en baie de Seine).

Les campagnes Dinoseine ont soulevé le problème de la collaboration entre un laboratoire de recherche (DEL/ECP/Brest) et un laboratoire côtier (DEL/Port en Bessin) pour ce type d'étude, car le temps à consacrer par ce dernier est une très lourde charge.

Le matériel utilisé est un **profileur granulométrique**, permettant de trouver les zones de concentration des dinoflagellés. Les échantillons ont généralement été prélevés à trois profondeurs : en surface, dans la pycnocline, au fond. **La présence de *Dinophysis* fut observée en 1994, mais pas en 1995** ; à noter que la stratification observée fut beaucoup plus forte en 1994 qu'en 1995.

En juillet 1994, une structure stable est observée pendant dix jours, avec des courbes concentriques autour du maximum de *Dinophysis*. Ce maximum se situe près de la surface près de la côte, mais au fond plus au large. L'observation microscopique de cellules vivantes de *Dinophysis*, en lumière naturelle, ainsi que les résultats des tests de toxicité sur des moules en mouillage, met en évidence **une différence entre deux populations de *Dinophysis***, puisqu'au large, les cellules apparaissent vertes (chlorophylle) et semblent peu toxiques, alors qu'à la côte, les cellules apparaissent rouges (phycoérythrine) et semblent plus toxiques.

Il n'y a pas de relation entre *Dinophysis* et chlorophylle : le maximum de *Dinophysis* ne se situe jamais dans le maximum de chlorophylle, ce qui corrobore les résultats des campagnes Dinopertuis.

En 1994, *Dinophysis* est présent dans la pycnocline, dans une couche d'environ 20 à 30 cm d'épaisseur.

Les hypothèses avancées sont : une arrivée du large des cellules de *Dinophysis*, une expulsion ultérieure dans le panache de la Seine, un maintien dynamique de la population, un transport par le vent.

Les propositions pour une surveillance en baie de Seine sont : l'installation d'un mouillage de moules et un suivi des toxines dans les moules.

- 11 -

Épisodes toxiques *Gymnodinium* cf. *nagasakiense*
en juin - juillet 1995

11. Épisodes toxiques à *Gymnodinium cf. nagasakiense* en juin – juillet 1995.

Finistère

Gymnodinium cf. nagasakiense est une espèce cible qui est systématiquement dénombrée dans les flores partielles.

Dans ce cadre, des concentrations cellulaires supérieures à 1 million de cellules par litre ont été décelées en 1987 et 1995 dans plusieurs secteurs du Finistère, associées à des mortalités de la faune marine. **Ce qui caractérise l'épisode 1995, c'est son ampleur dans l'espace et dans le temps, et les densités cellulaires observées** (jusqu'à $6,6 \cdot 10^6$ cells.l⁻¹).

Tous les secteurs du Finistère ont été touchés, avec une évolution du sud vers le nord du département en début de phénomène (début mai à début juillet). L'épisode a duré de 1 à 4 mois selon les secteurs, les bassins de la façade ouest ayant été le plus longtemps affectés. Des arrêtés d'interdiction de pêche de coquillages sur l'estran, et de ramassage de ceux ci sur les concessions ont été pris par le préfet du département.

Deux épisodes successifs ont été observés dans les secteurs sud, et au nord de la rade de Brest, pour lesquels les courants de marée auraient joué un rôle prépondérant.

En ce qui concerne les conséquences financières, les chiffres d'indemnisation calamités agricoles peuvent servir d'estimation, mais il est très difficile de chiffrer les mortalités d'animaux sauvages.

A signaler la **présence simultanée mais récente (1994), sur les côtes finistériennes, d'une autre espèce toxique, *Gymnodinium cf. breve***, connue dans le golfe du Mexique et en Floride, notamment pour provoquer à la fois des mortalités de poissons (ichthyotoxines), des intoxications humaines (NSP = Neurotoxic Shellfish Poisoning) par le biais du vecteur coquillages, et des irritations des voies respiratoires causées par les embruns chez les promeneurs.

Morbihan

Le phénomène a débuté en rivière d'Etel avec une eau colorée à 1,5 million de cellules par litre et des mortalités de palourdes et de coques, puis s'est propagé en baie de Quiberon (500 000 cellules par litre), enfin en baie de Vilaine.

Les mortalités ont été inégalement réparties, selon l'espèce et selon la classe d'âge, et ont le plus souvent été observées après les maxima de concentrations.

Loire Atlantique – Vendée

Les premières observations ont été relatives à d'importantes mortalités de congres en baie de Vilaine. L'épisode toxique a eu des conséquences très graves à Noirmoutier, avec la destruction de 700 tonnes de moules. En Loire Atlantique, les mortalités ont été observées plus tardivement, mais ont été parfois importantes (Pen Bé).

Des indemnisations calamités agricoles et AGRIDIF (agriculture en difficulté) ont été demandées.

Des concentrations assez fortes de *Gymnodinium cf. nagasakiense* avaient déjà été observées au Croisic auparavant (1 million de cellules par litre en 1987)

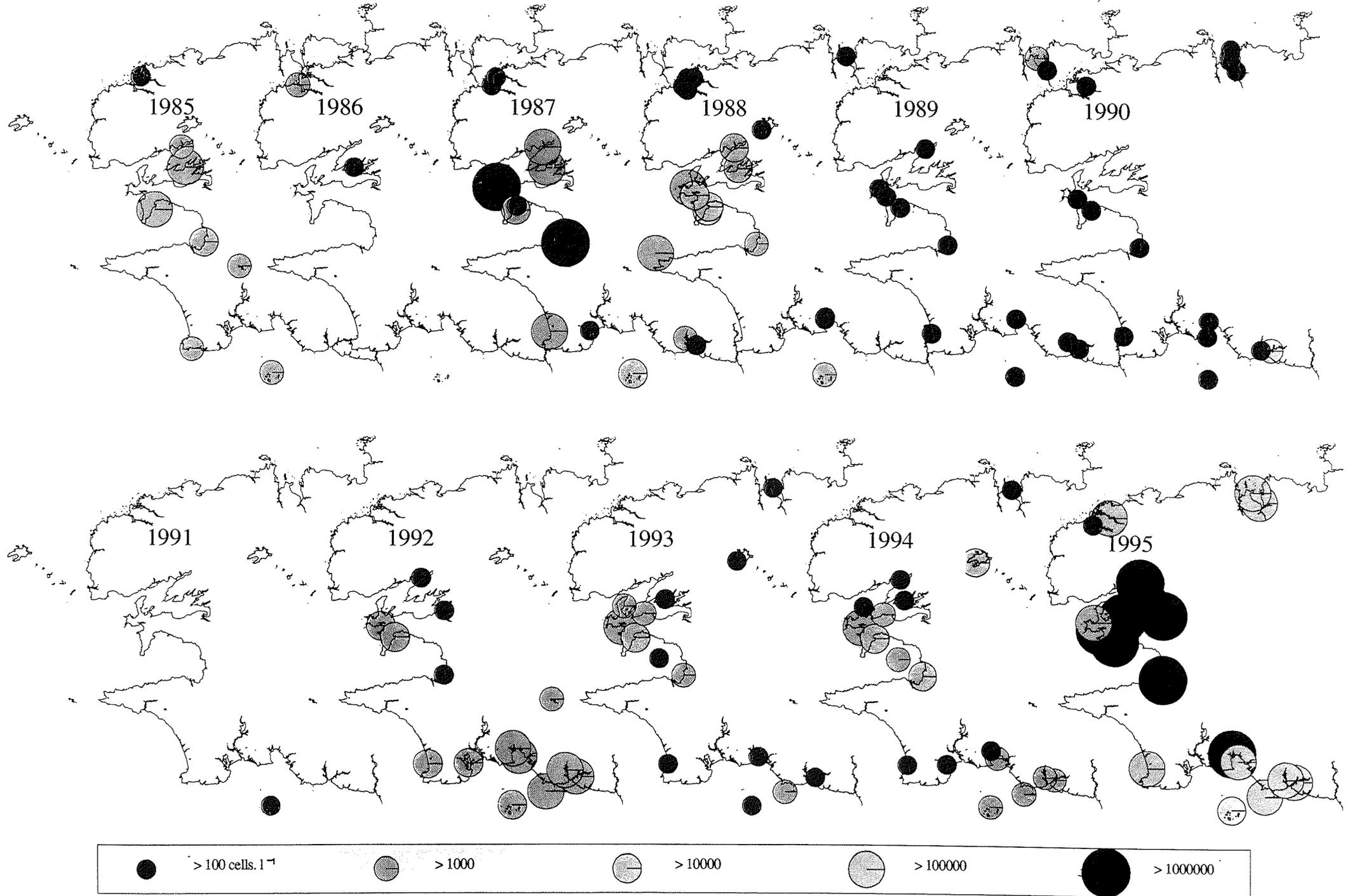
Conclusion

C'est le premier épisode de grande ampleur causé par une espèce ichthyotoxique, depuis la création du réseau en 1984. Un certain nombre d'épisodes de ce type, mais plus localisés, a néanmoins été observé ces dernières années (*Heterosigma carterae*, *Gyrodinium corsicum*...). C'est un aspect de la surveillance qui a parfois été oublié, il est donc utile de rappeler que **LA PROTECTION DE LA SANTÉ DES ANIMAUX MARINS EST L'UN DES OBJECTIFS DU REPHY, et que ces objectifs, loin d'être antinomiques, se complètent les uns les autres.**

Par ailleurs, une étude a été engagée par Patrick Gentien (DEL/ECP/Brest) et Pascal Lazure (DEL/LHS/Brest) : **il semble que des structures hydrodynamiques particulières en 1995 puissent peut-être expliquer l'importance du bloom.** Les données du REPHY concernant *Gymnodinium* cf. *nagasakiense* sur tout le littoral atlantique depuis 1987, vont ainsi être mises en parallèle avec les structures hydrodynamiques de ces mêmes années.

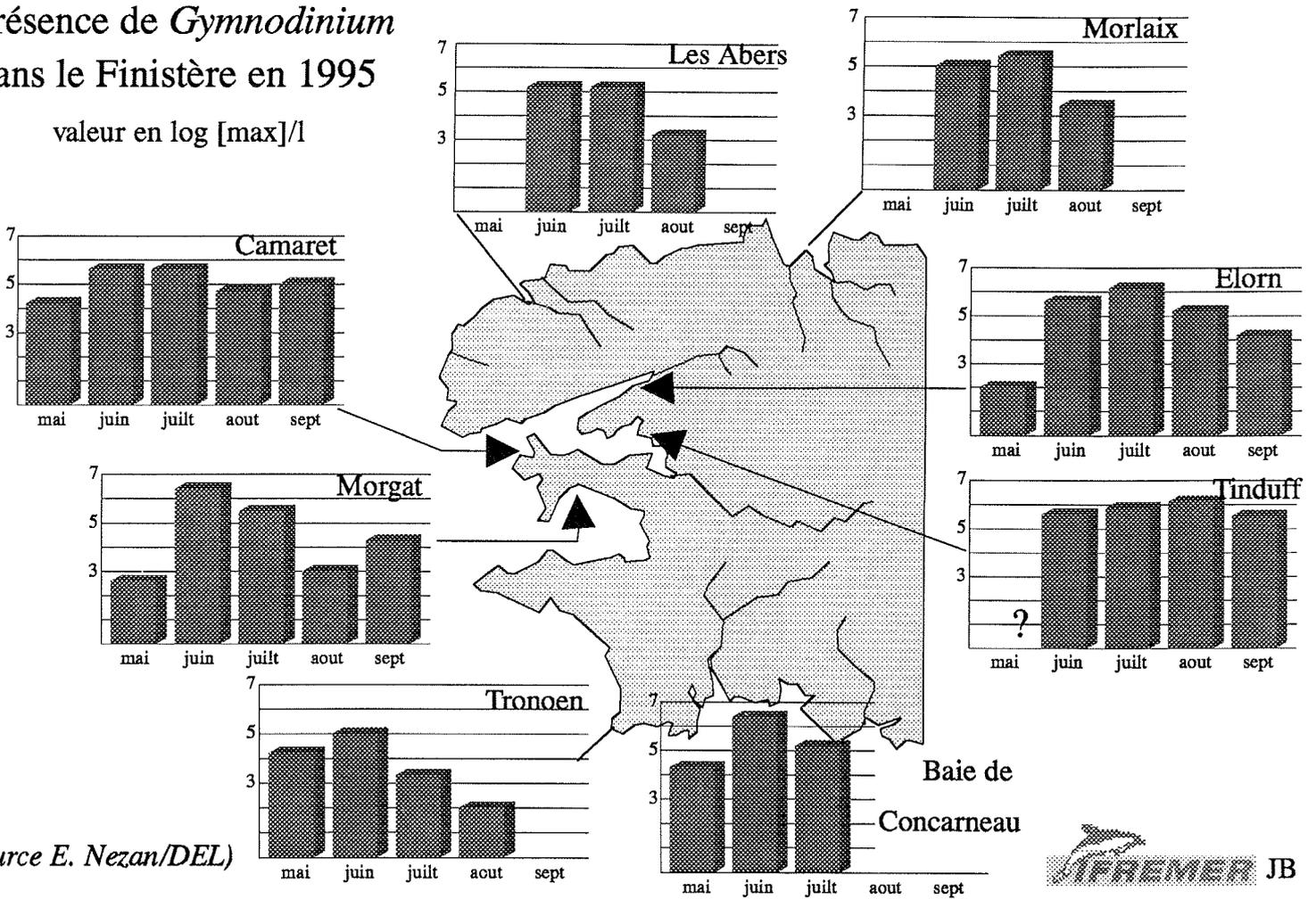
Finistère

Gymnodinium cf. nagasakiense (= *Gyrodinium cf. aureolum*) Finistère (1985 – 1995)

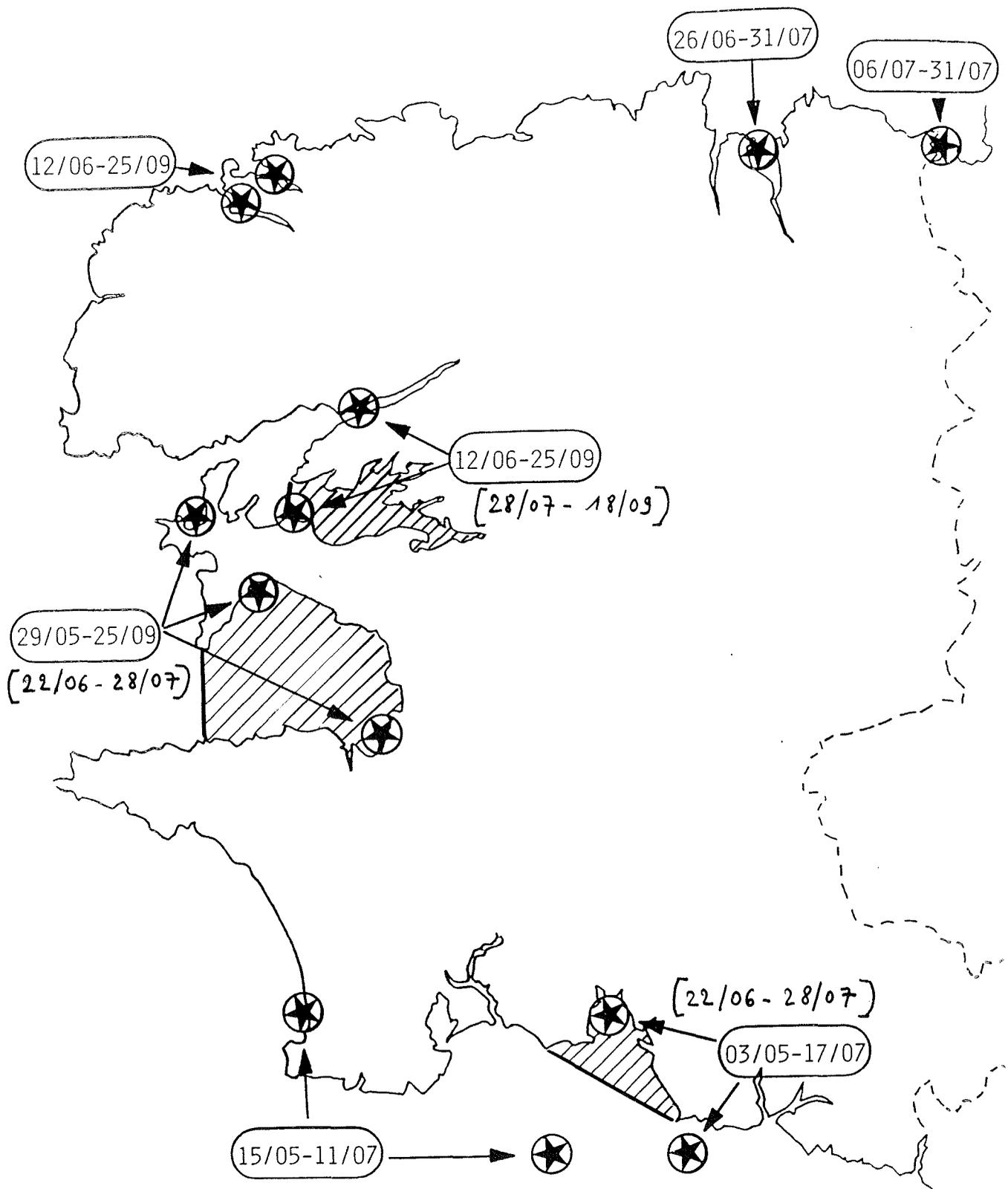


Présence de *Gymnodinium* dans le Finistère en 1995

valeur en log [max]/l



(source E. Nezan/DEL)

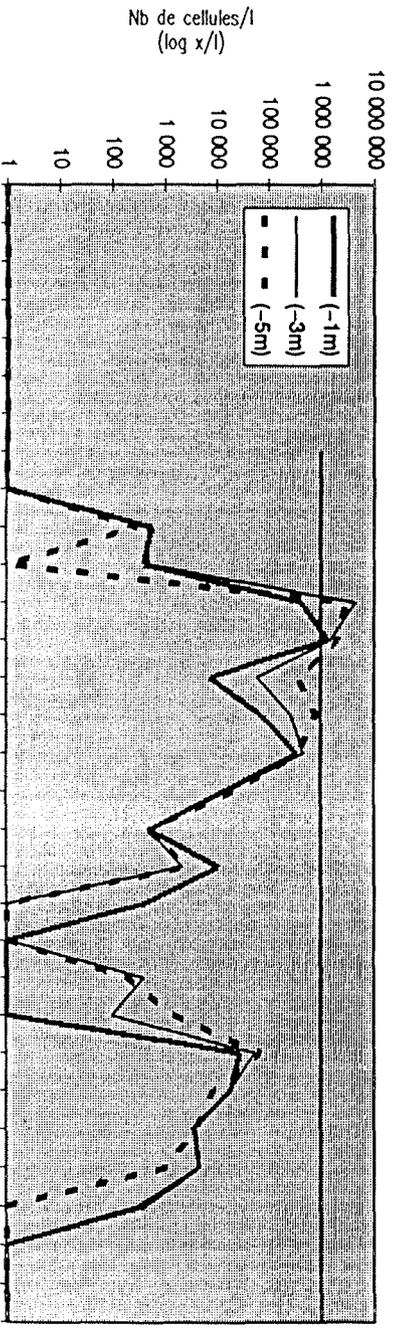


SUIVI 1995 DE *Gymnodinium* cf. *nagasakiense* DANS LE FINISTERE

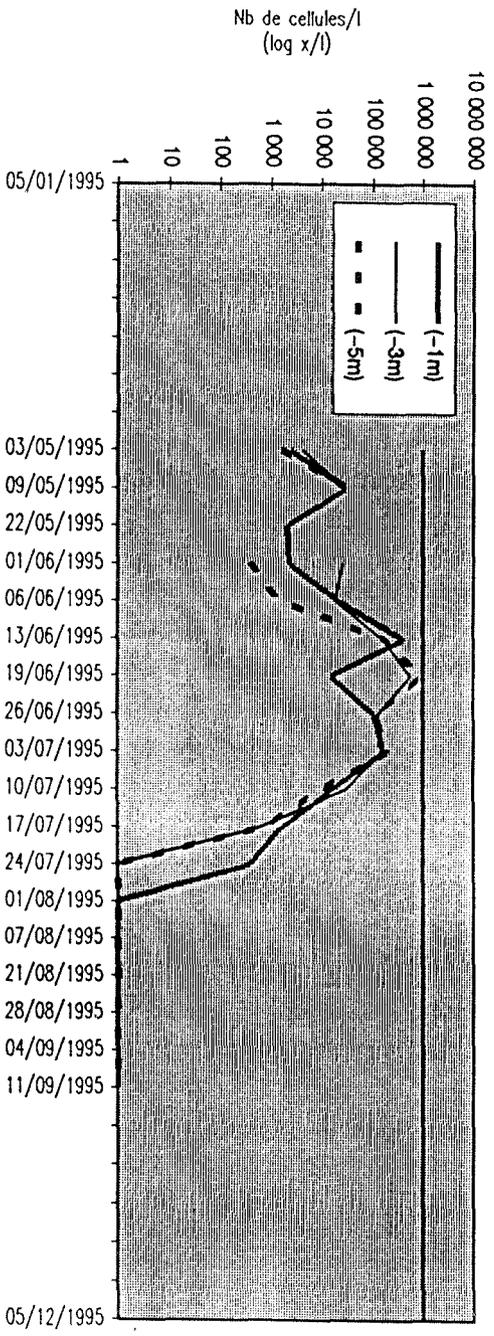
▨ Pêche et Ramassage interdits avec dates [jj/mm - jj/mm] des arrêtés de fermeture et de réouverture.

(jj/mm - jj/mm) Durée de la présence à raison d'au moins 1000 cellules / litre.

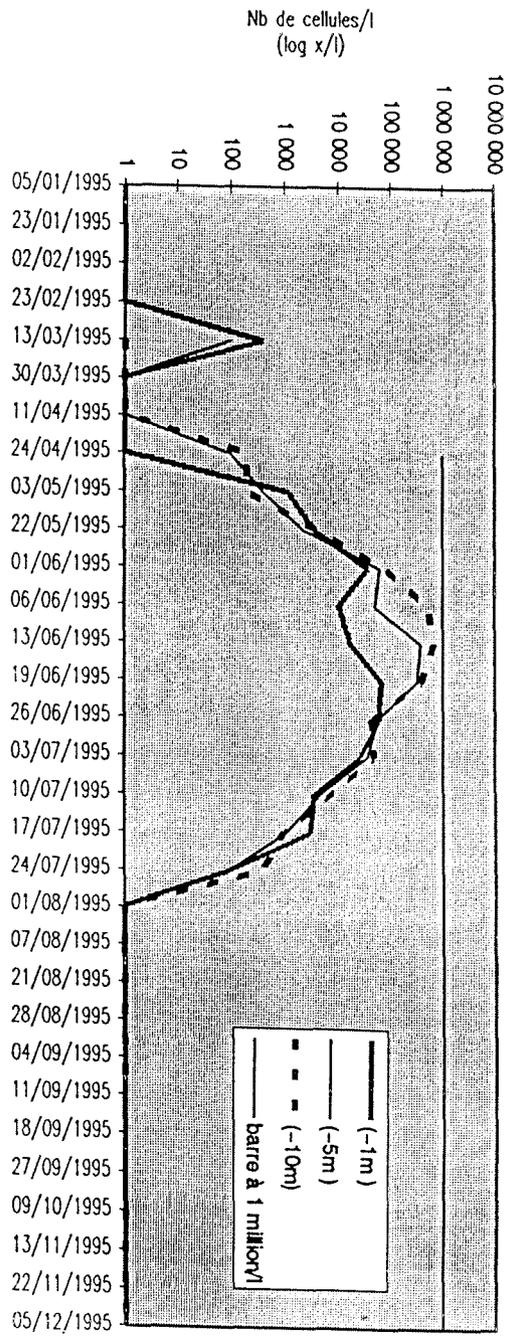
Suivi du *Gymnodinium* cf. *nagasakiense* en 1995 dans 3 bassins du Finistère
(044 - 043 - 039)



Baie de DOUARNENEZ
(Port de Morgat)

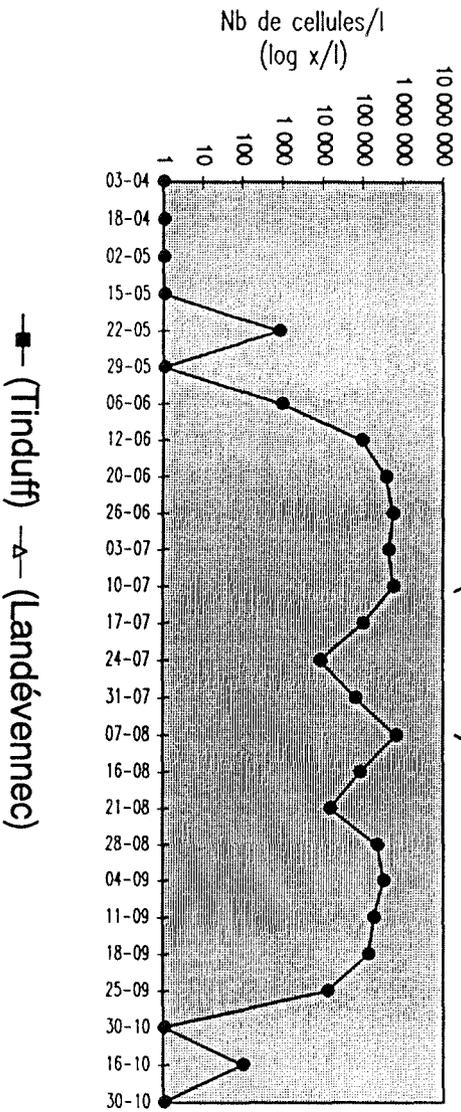
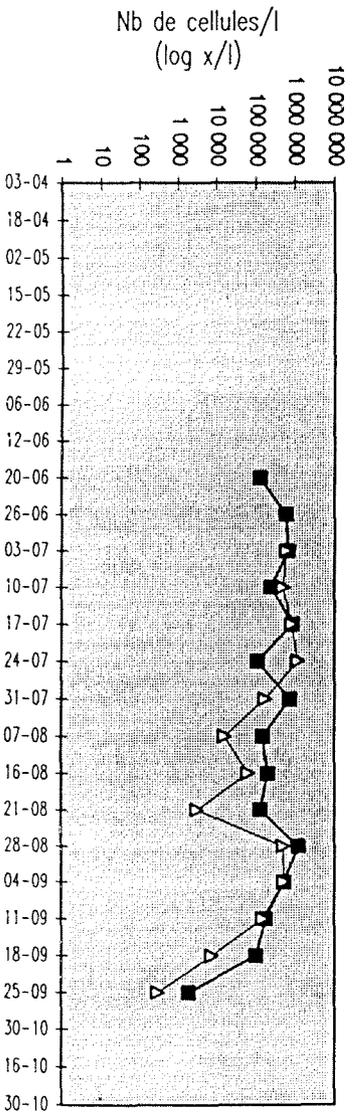


Baie de CONCARNEAU
(filières du Scoré)

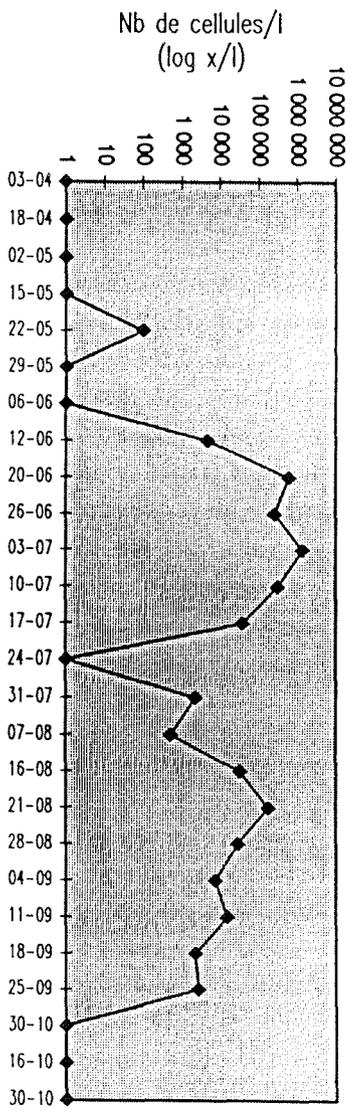


Men Du
(1.5 mile Sud Baie de Concarneau)

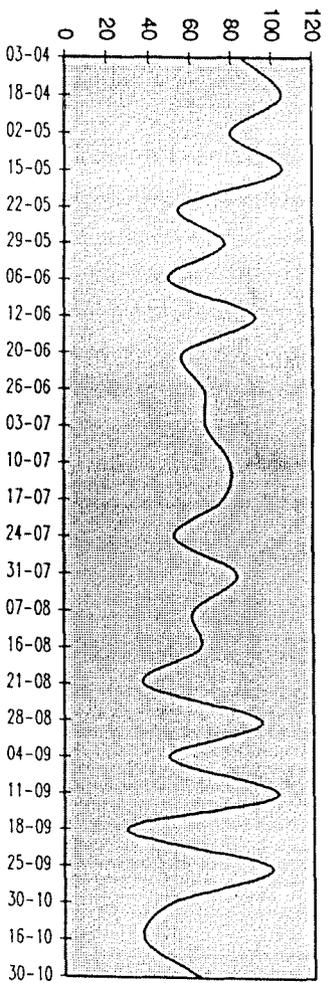
Suivi de *Gymnodinium* cf. *nagasakiense* en rade de Brest en 1995

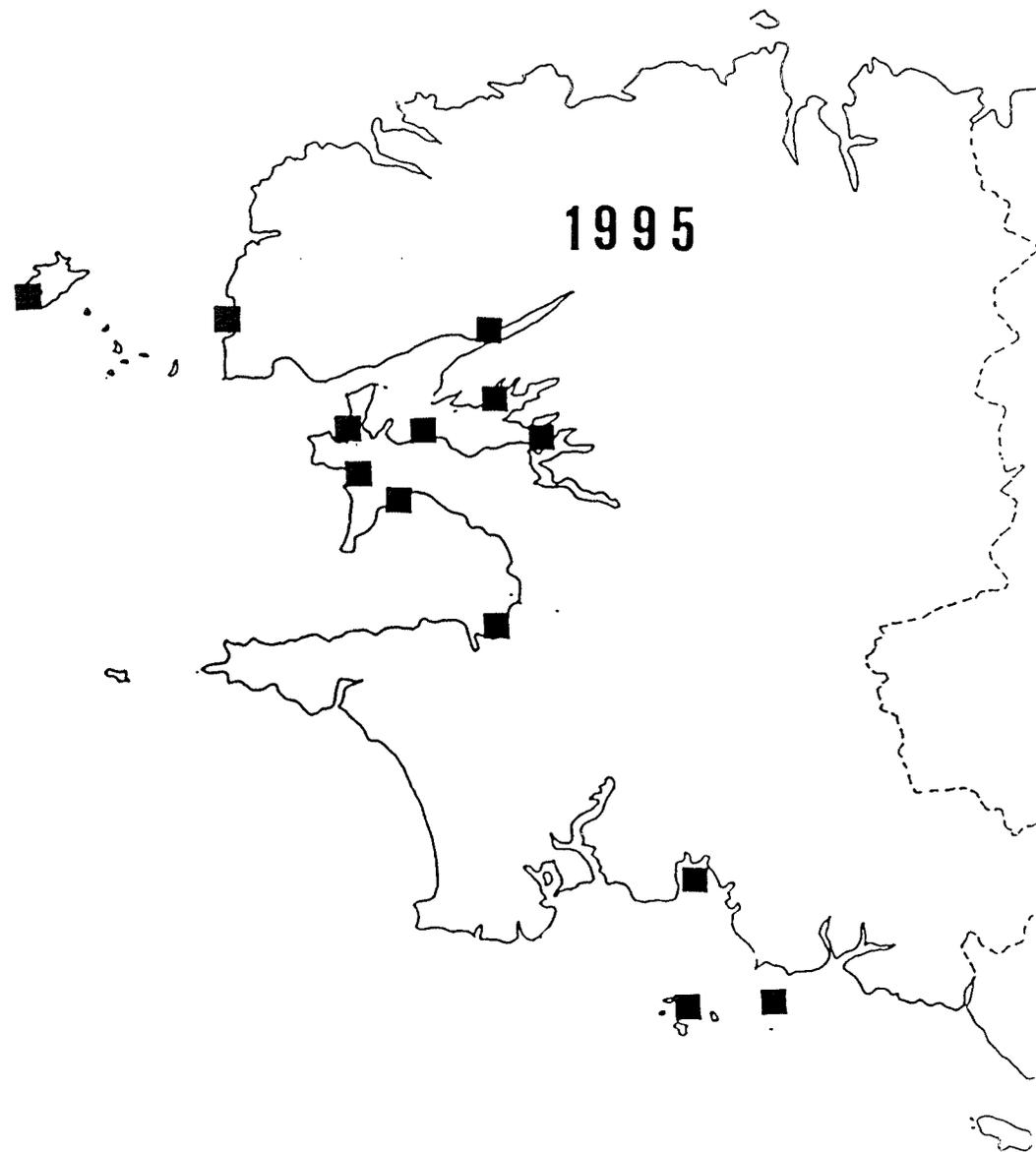
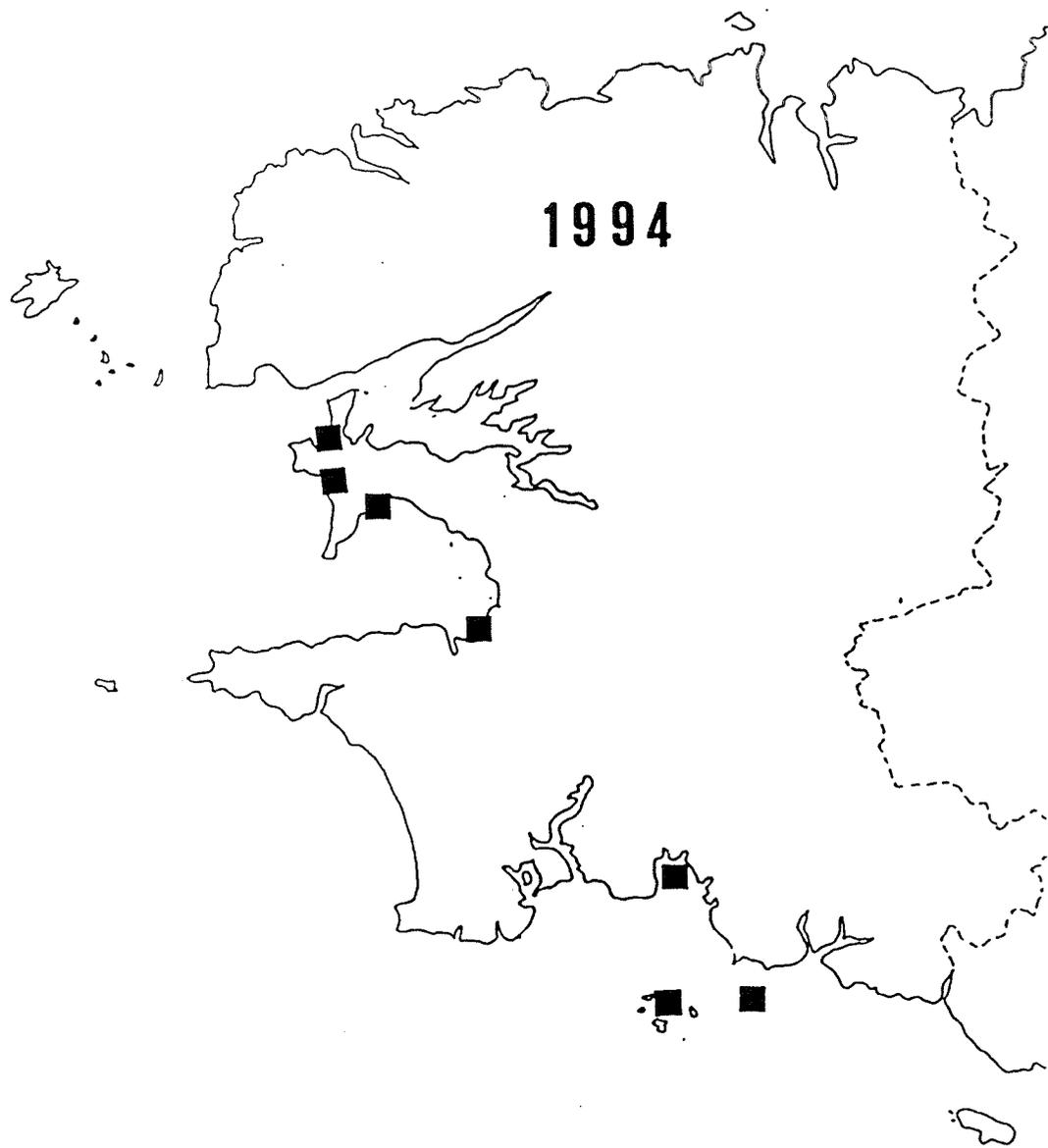


Rade Sud de BREST
(Lanvéoc)



Rade Nord de BREST
(Le Passage)

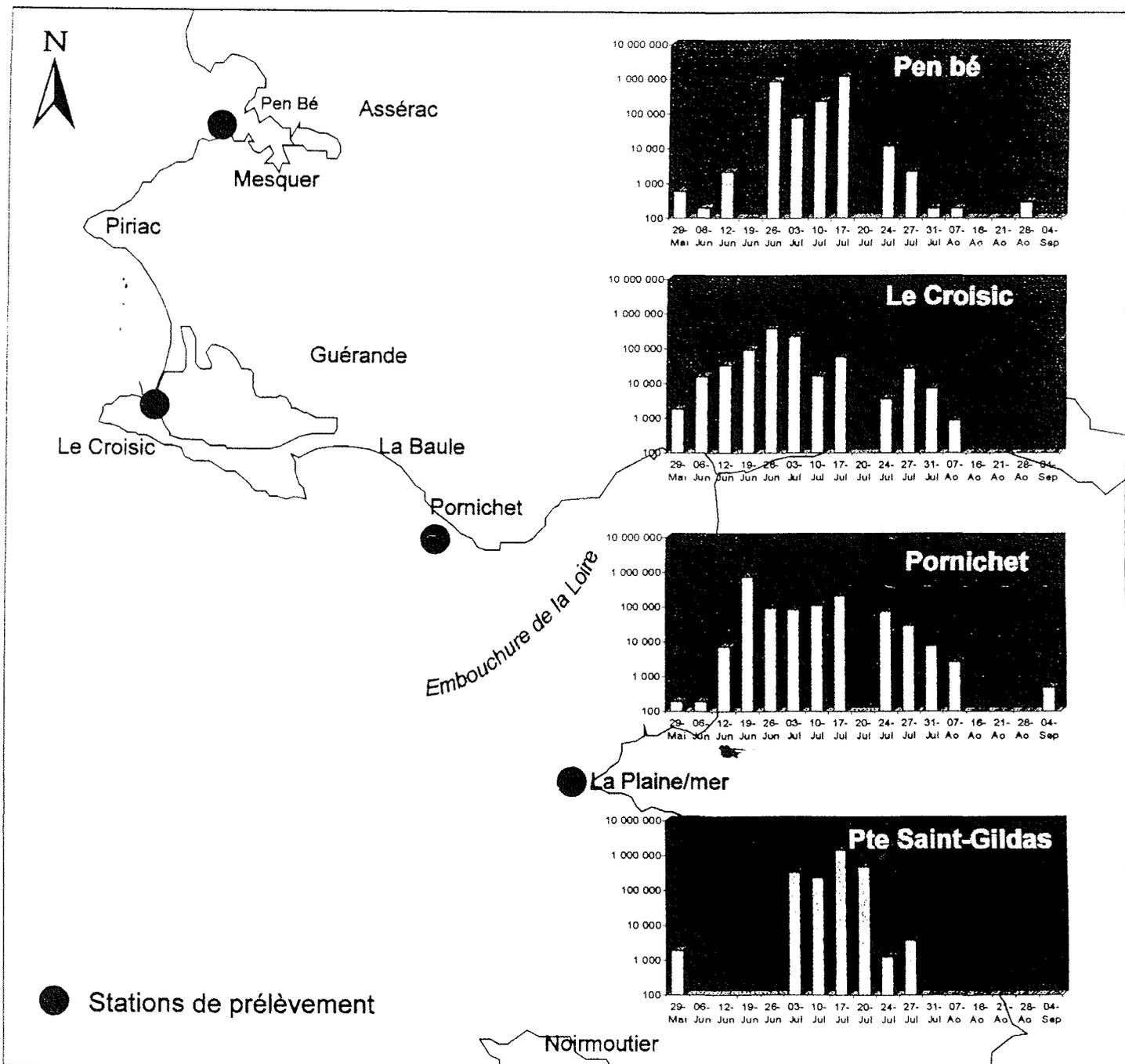




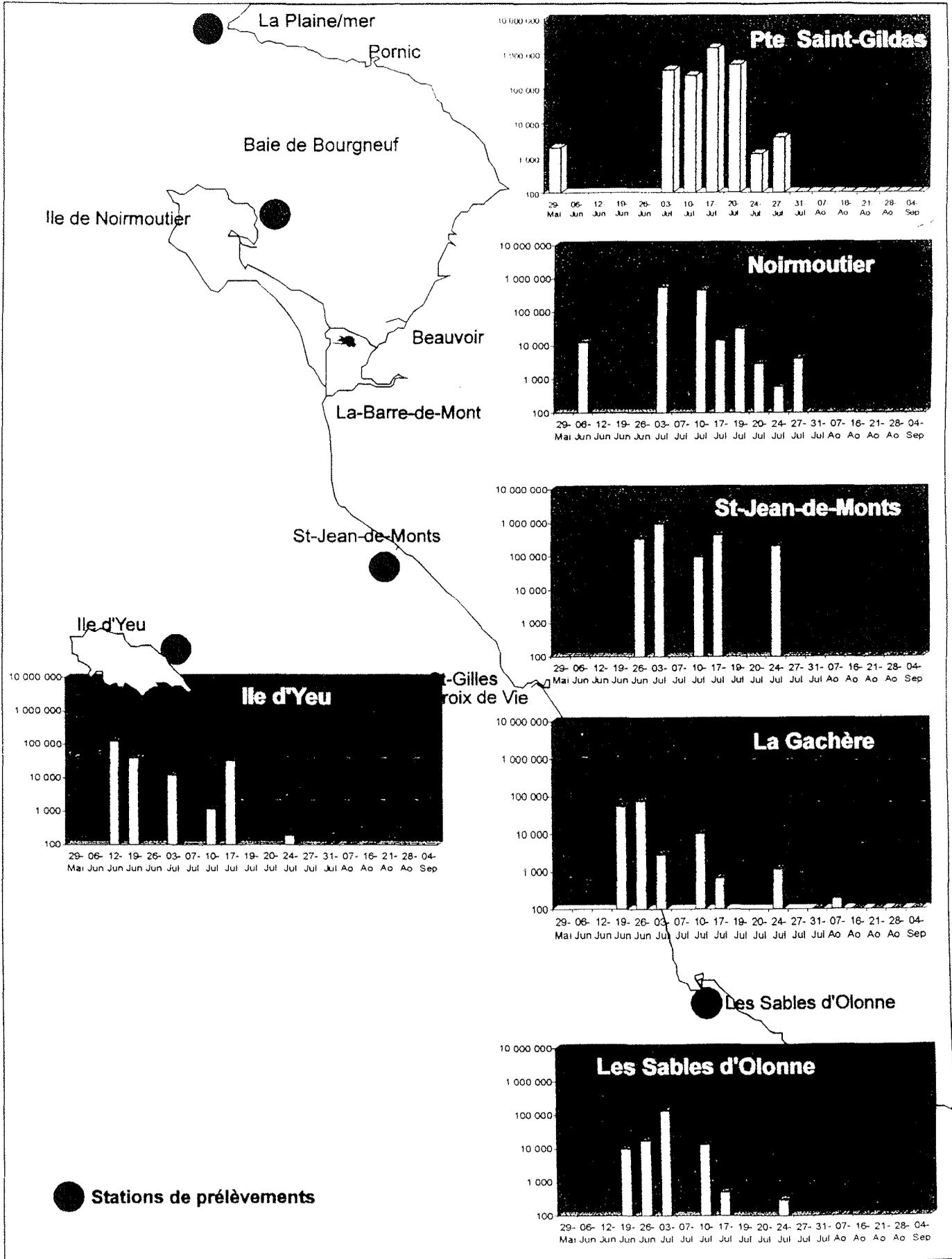
APPARITION DE *Gymnodinium breve* (brevetoxines) SUR LES COTES FINISTERIENNES

Loire Atlantique
Vendée

Evolution des concentrations de *Gymnodinium cf. nagasakiense* en Loire-Atlantique durant l'été 1995



Evolution des concentrations de *Gymnodinium cf. nagasakiense* en Vendée durant l'été 1995



- 12 -

Activités du CNEVA / LCHA relatives aux phycotoxines
Collaboration avec le laboratoire DEL / PN

12. Activités du CNEVA / LCHA relatives aux phycotoxines, collaboration avec le laboratoire PN.

Le CNEVA (Centre National des Études Vétérinaires Alimentaires) est sous tutelle de la DGAL (Direction Générale de l'Alimentation), et est composé de treize laboratoires (DSV / Direction des Services Vétérinaires, et LVD / Laboratoire Vétérinaire Départemental), l'un d'entre eux étant le LCHA (Laboratoire Central d'Hygiène Alimentaire).

Le LCHA a pour tâche de prospecter les problèmes nouveaux, bâtir des programmes de recherche appliqués, décentraliser les méthodes et assurer la formation continue des laboratoires vétérinaires départementaux. Il possède cinq unités : deux pour la microbiologie, une pour la qualité des produits laitiers, une pour les contaminants de l'environnement, **une pour les toxines microbiennes et les phycotoxines (TOMI).**

Une collaboration existe depuis huit ans avec le laboratoire DEL / PN, sur les problèmes de l'analyse chimique par HPLC des toxines PSP. Une collaboration a également débuté en 1988 avec le laboratoire côtier de Concarneau, pour la détermination des profils des toxines produites par *Alexandrium minutum*, puis avec l'ensemble des laboratoires côtiers pour l'initiation d'un programme de recherche sur la **présence d'acide domoïque dans les coquillages français.**

Le LCHA a été nommé LABORATOIRE DE RÉFÉRENCE FRANÇAIS POUR LES PHYCOTOXINES, dans le cadre des LABORATOIRES EUROPÉENS DE RÉFÉRENCE.

Les perspectives principales concernant la collaboration LCHA / IFREMER sont :

- un projet de mise en oeuvre d'un **essai d'aptitude pour le test souris PSP**, qui pourrait associer des laboratoires vétérinaires et quelques laboratoires côtiers de l'IFREMER,
- **la suite de l'étude sur l'acide domoïque** ; en effet, les premiers résultats ont conclu à l'absence d'acide domoïque dans les coquillages du littoral français (publication en cours dans les actes de la 7ème conférence internationale sur le phytoplancton, une version française du manuscrit a déjà été envoyée aux laboratoires côtiers). Il est cependant nécessaire de confirmer ces résultats avec une observation sur un cycle annuel.

Or, une autre méthode d'analyse de cette toxine vient d'être proposée par l'AOAC, et le LCHA est volontaire pour une analyse collaborative. Il est donc prévu d'effectuer des analyses, directement sur les échantillons de phytoplancton, avec cette nouvelle méthode. Les laboratoires côtiers seront donc de nouveau sollicités.

En attendant, **en cas de bloom de *Pseudonitzschia*, le LCHA est fortement intéressé par des échantillons concentrés, à environ un million de cellules par ml d'eau.**

– 13 –

Mise au point sur les méthodes d'extraction
pour le test souris DSP

13. Mise au point sur les méthodes d'extraction pour le test souris DSP

Il est maintenant démontré que l'extraction à l'acétone, réalisée pendant des années dans le cadre de REPHY, conduit à des interférences entre les toxines DSP et les toxines « atypiques ». **L'extraction pour le test souris DSP, doit donc désormais être effectuée au méthanol / hexane / dichlorométhane** (voir le « **Manuel des méthodes de détection des phycotoxines DSP et PSP pour REPHY** »), plus spécifique des toxines DSP, afin que l'interprétation de la toxicité réelle soit possible.

A noter que le test souris actuellement utilisé n'est pas un test spécifique DSP : l'extraction doit donc être elle-même spécifique et ne retenir que les toxines en cause. Il existe par contre des tests réellement spécifiques DSP (test DRAME, phosphatases...), qui ne nécessitent pas d'extraction spécifique.

Lors de la réunion des laboratoires de référence européens pour les phycotoxines, à Vigo (Espagne), en mars dernier, **l'ensemble des pays s'est montré favorable au maintien d'un test global**, par exemple avec extraction acétonique, afin de couvrir l'ensemble des toxines, connues et inconnues, et **qui serait le test de référence en cas de litige entre pays**.

LA MODIFICATION APPORTÉE AU TEST FRANÇAIS POUR UNE PLUS GRANDE SPÉCIFICITÉ DSP, VA DONC A L'ENCONTRE DES RECOMMANDATIONS EUROPÉENNES. Ceci dit, il semble que la détection de plus en plus fréquente de toxines atypiques dans diverses régions du monde, conduit les autres pays à une attitude également contradictoire.

Il faut noter que les méthodes de détection DSP sont extrêmement variées en Europe (voir chapitre 1), et qu'elles évolueront certainement pour se mettre en harmonisation. Les descriptions de méthodes risquent ainsi d'être rapidement périmées ; en attendant, étant donné les dérives importantes constatées dans la réalisation du test souris, il est nécessaire de repartir d'une base commune.

La version provisoire du « **MANUEL DES MÉTHODES DE DÉTECTION DES PHYCOTOXINES DSP ET PSP POUR REPHY** » doit donc être lue très attentivement : en effet, certaines pratiques sont totalement remises en cause, et cette première version met en évidence les choses à ne plus faire, aussi bien pour le test DSP que pour l'interprétation du test PSP. **IL EST IMPÉRATIF DE RESPECTER INTÉGRALEMENT LA MÉTHODE DÉCRITE** : les modifications ultérieures feront l'objet de nouvelles versions écrites, mais ne doivent être appliquées qu'après réception de celles-ci. **Tous les commentaires relatifs au manuel des méthodes, doivent être envoyés par écrit ou par mail à C. Belin, qui assurera le suivi des versions successives.**

Une des modifications qui pourraient être apportées suite à une harmonisation européenne concerne **l'extraction des toxines sur la chair totale**, et non plus sur la seule glande digestive ; en effet, les discussions récentes des laboratoires de référence européens laissent à penser que l'unité retenue pourrait être le « μg d'équivalent acide okadaïque par gramme de

chair totale ». Il serait donc utile d'ores et déjà de faire le rapport des poids de la chair totale et de la glande digestive, **mais en attendant de nouvelles directives écrites, l'extraction continuera à se faire sur la glande digestive.**

Un problème évoqué est celui des coquillages autres que les moules, dont l'ouverture se fait souvent à chaud : l'absence de données comparables sur des coquillages crus, ne permet pas la moindre conclusion quant à l'impact éventuel de la chaleur sur les résultats des tests.

– 14 –

Test de détection des toxines DSP
par cytotoxicité (DRAME)

14. Test de détection des toxines DSP par cytotoxicité (DRAME).

Calibration du test au laboratoire de Concarneau

Le laboratoire a commencé à s'investir en 1994 dans des études relatives à ce test.

La comparaison des résultats obtenus avec : le test souris/extraction acétone, le test souris/extraction dichlorométhane, le test DRAME, ont permis de montrer :

- **une meilleure extraction des toxines au dichlorométhane**, puisque les temps de survie des souris sont plus courts qu'avec l'extraction acétone,
- **une très bonne corrélation entre le test souris/dichlorométhane et le test DRAME.**

Après un premier échec dans la culture des cellules, un essai concluant a été effectué avec une deuxième lignée cellulaire, y compris l'étape de congélation des cellules.

Les difficultés rencontrées concernent, par exemple, la non spécificité du local, conduisant à une contamination des cellules.

Mise en place d'une étude pilote

Un des intérêts du test DRAME est que le résultat est exprimé en **concentration d'acide okadaïque**, et par conséquent comparable avec les résultats d'autres tests.

Une étude pilote sur deux ans, avec deux laboratoires côtiers (Concarneau et Nantes), et sur un nombre important d'échantillons, est proposée avant une validation à l'échelle nationale, puis internationale.

Cette étude prévoit une simplification des protocoles, et la mise en place d'une production centralisée de cellules.

Calibration du test

DRAME

Détermination Rapide de l'Acide okadaïque dans les Moules après Extraction

POURQUOI

remplacement du test souris DSP

COMMENT

test de cytotoxicité sur la lignée cellulaire KB
(carcinome humain du rhinopharynx-EAGLE/USA-1956).

INTERET

sensibilité démontrée à l'acide Okadaïque et ses dérivés.

Essais menés en 1994-1995 à CONCARNEAU

Objectifs : Tester la méthode en routine

Comparer les résultats DRAME aux résultats TEST SOURIS

Méthodologie : DRAME selon Z.AMZIL & col.

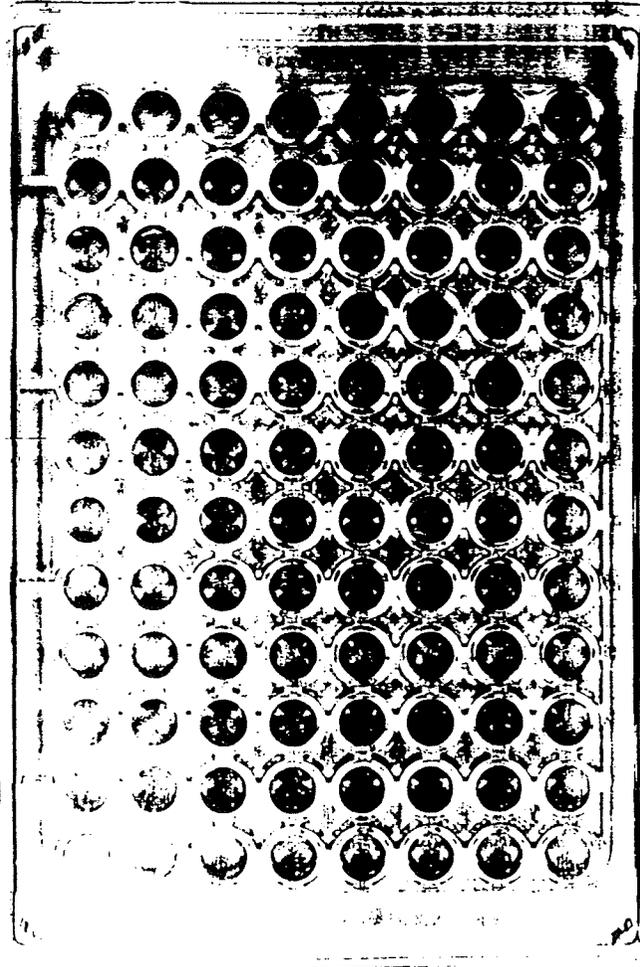
Contraintes et Difficultés rencontrées:

- Technique d'entretien de la lignée cellulaire
- Technique d'extraction
- Détermination de la CMA et interprétation

Résultats

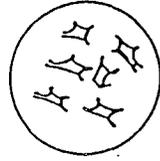
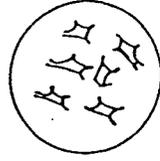
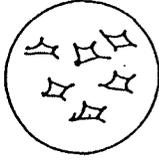
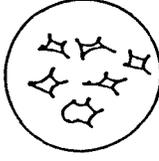
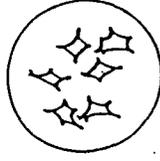
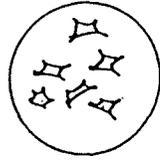
Conclusions et recommandations

SCHEMA DE PRINCIPE TEST DRAME

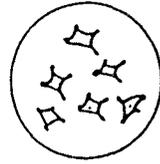
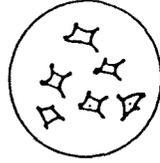
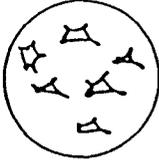
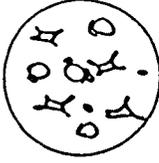
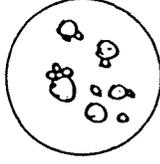
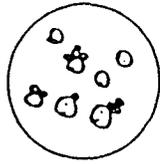


4 µg
8 µg
16 µg
32 µg
64 µg
128 µg

TEMOIN



EXTRAIT



4 µg

8 µg

16 µg

32 µg

64 µg

128 µg

EXTRACTION

Pour 50 grammes d'hépatopancréas

Broyer dans 100 ml dans une solution Méthanol /eau (8/2)

Centrifuger 15 minutes à 4000 t/mn

Garder le surnageant dans une ampoule à décanter

Reprendre le culot avec 50 ml de Méthanol/eau (8/2)

Centrifuger puis récupérer le surnageant dans l'ampoule à décanter

Répéter l'opération une troisième fois.

Laver 3 fois la fraction Méthanol à l'aide de 100 ml d'Hexane de manière à éliminer les composés apolaires. L'agitation de l'ampoule doit être assez douce de manière à ne pas provoquer d'émulsion qui prolonge sensiblement la séparation des phases.

Récupérer la phase Méthanol et en mesurer le volume.

Rajouter environ 70 ml d'eau distillée soit 1.65 ml d'eau pour 1 ml de Méthanol afin d'augmenter la polarité.

Laver 3 fois cette fraction à l'aide de 100 ml de dichlorométhane. La fraction dichlorométhane est plus lourde que l'eau.

Evaporer le dichlorométhane à 35-40 °C.

Peser l'extrait sec.

PREPARATION DE LA GAMME DE DILUTION

Préparation de l'extrait à 256 µg

Exemple : A partir d'un extrait sec de 140 mg

Ajouter 10 ml de dichlorométhane : donc dans 1 ml = 14 mg
soit 2,8 mg dans 200 µl

Il faut ramener la concentration à 1 mg/ml on rajoute donc 2,6 ml de dichlorométhane pour obtenir 2,8 mg dans 2,8 ml.

Introduire 256 µl soit 256 µg de cette solution dans un tube à hémolyse.
Evaporer à sec.

Préparation de la gamme de dilution

Solubiliser l'extrait sec 256 µg à l'aide de 20 µL d'ETHANOL à 95%.

Ajouter 980 µL de milieu de culture on obtient une solution à 256 µg/ml.

On réalise ensuite une gamme de dilution à 128, 64, 32, 16,8 µg/ml dans le milieu de culture

TABLEAU RECAPITULATIF DES RESULTATS

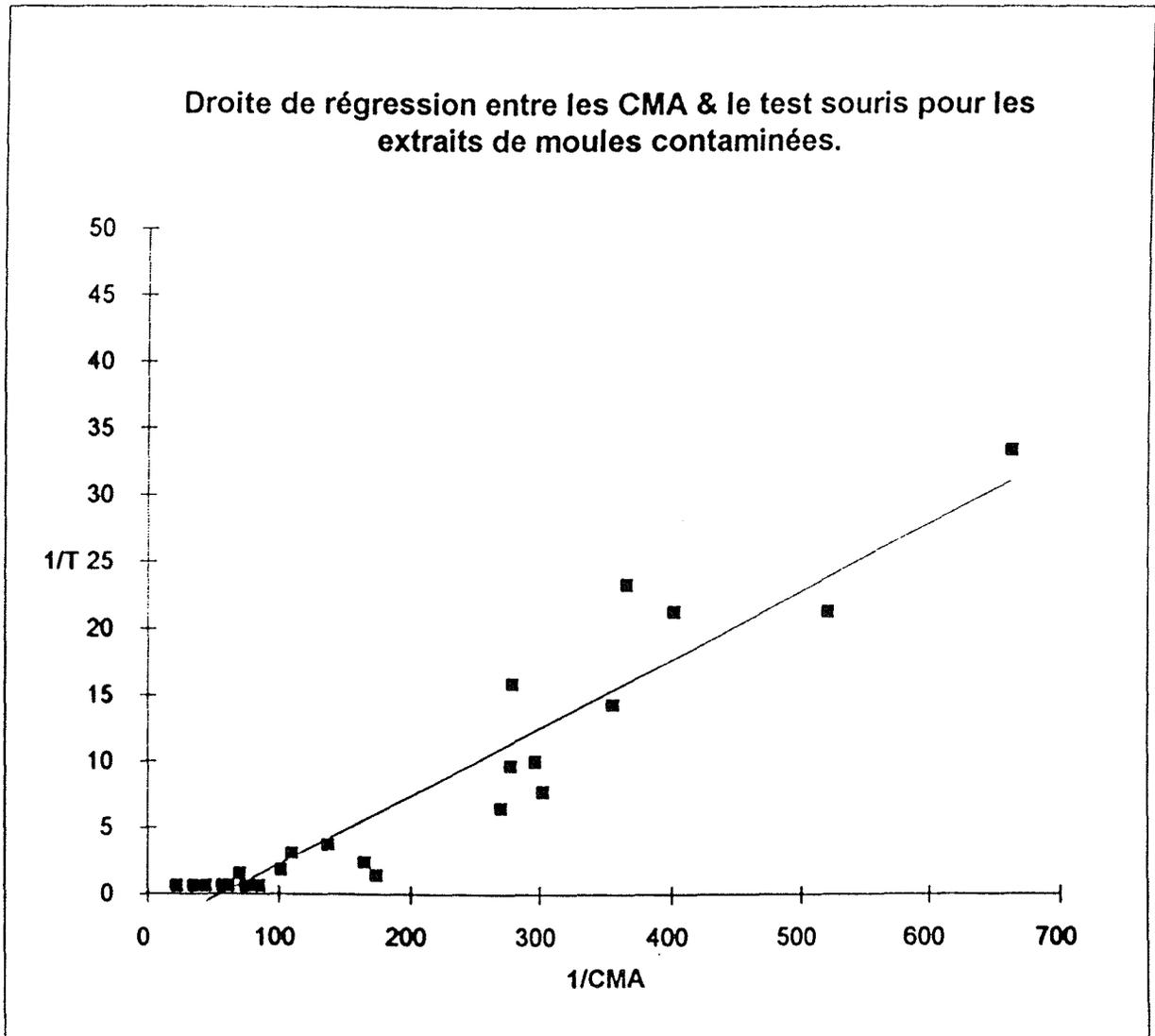
COMPARAISON TEST SOURIS DSP/ TEST CYTOTOXICITE KB
(*DRAME*)

DATE	LIEU	CMA lue µgEXT/ml	CMA hépato mgHP/ml	[A.O.] µg/gHP	T.S. Acétone Mortalité en minutes	T.S.Dichloro Mortalité en minutes
27/06/1994	<i>KERIST</i>	32	44.44	1.228	1500	1500
04/07/1994	<i>KERIST</i>	32	43.25	1.26	1500	1500
11/07/1994	<i>KERIST</i>	32	17.34	3.14	1500	1500
18/07/1994	<i>KERIST</i>	32	28.07	1.94	1500	1500
26/07/1994	<i>KERIST</i>	32	13.349	4.09	1500	1500
27/06/1994	<i>SCORE</i>	8	9.1	6.06	325	197
04/07/1994	<i>SCORE</i>	4	3.3	16.38	130	68
11/07/1994	<i>SCORE</i>	4	3.7	14.74	154	125
18/07/1994	<i>SCORE</i>	8	7.27	7.5	270	206
27/07/1994	<i>SCORE</i>	16	6.066	9	420	240
18/08/1994	<i>SCORE</i>	8	2.808	19.45	70	
28/09/1994	<i>SCORE</i>	16	9.82	5.556	537	
24/05/1993	<i>MORGAT</i>	4/8	1.507	36.218	30	
01/06/1993	<i>MORGAT</i>	4/8	1.918	28.45	47	
16/08/1994	<i>MORGAT</i>	4	3.597	15.18	103	
23/08/1994	<i>MORGAT</i>	4	3.584	15.24	63	
05/09/1994	<i>MORGAT</i>	8/16	14.181	3.85	630	
01/06/1993	<i>LANVEOC</i>	4/8	2.487	21.95	47	
14/06/1993	<i>LANVEOC</i>	8	2.727	20.01	43	
28/06/1993	<i>LANVEOC</i>	8/16	3.373	16.185	100	
12/07/1993	<i>LANVEOC</i>	16	5.737	9.51	690	
20/07/1993	<i>LANVEOC</i>	16/32	16.13	3.387	1500	
28/07/1993	<i>LANVEOC</i>	16	11.752	4.645	1500	
02/08/1993	<i>LANVEOC</i>	16	22.38	2.479	1500	

date	lieu	cma lue µgExtr/ml	cma mgHP/ml	con ao µg/gHP	ts acet min	ts dichlo min	
27/06	kerist	32	44,44	1,23	1500	1500	
		32	43,25	1,26	1500	1500	
		32	17,34	3,14	1500	1500	
		32	28,07	1,94	1500	1500	
		32	13,35	4,09	1500	1500	
		8	9,1	6,06	325	197	
		4	3,3	16,38	130	68	
		4	3,7	14,74	154	125	
		8	7,27	7,5	270	206	
		16	6,07	9	420	240	
		8	2,81	19,45	70		
		16	9,82	5,56	537		
		08-Avr	1,51	36,22	30		
		08-Avr	1,92	28,45	47		
		4	3,6	15,18	103		
		4	3,58	15,24	63		
		16-Aoû	14,18	3,85	630		
		08-Avr	2,49	21,95	47		
		8	2,73	20,01	43		
		16-Aoû	3,37	16,19	100		
		16	5,73	9,51	690		
		16/32		16,13	3,39	1500	
		16		11,75	4,65	1500	
		16		22,38	2,48	1500	

REGRESSION LINEAIRE

 r = 0,947
 a = 0,051
 b = -2,861
 N = 24



T : Temps de survie des souris en minutes
CMA : Concentration Minimale Active en mg HP/ml

CONGELATION DE LA LIGNEE KB

Il faut une culture en phase exponentielle (48h) d'une densité de 5 millions de Cellules.

Préparer les deux milieux:

A : Serum de veau Foetal

B : Serum de veau foetal + DMSO (8/2) à conserver dans la glace.

Préparation du culot de congélation

Vider la boîte de culture de son milieu laver les cellules avec 10 ml de PBS

Jeter le liquide

Trypsiner avec 5 ml pendant une minute;

Ajouter 10 ml de milieu complet BME

Effectuer une numération.

Transférer dans un tube à centrifuger et centrifuger 3 minutes à 1200T/mn.

Congélation

Transférer le culot dans un tube à congélation y ajouter:

1 ml de solution A et 1ml de solution B

Homogénéiser et laisser dans la glace pendant 15 mn.

mettre en congélation à -80°C

La culture peut ainsi se conserver 1 an

Si congélation dans l'azote liquide la conservation peut être plus longue.

Décongélation

Sortir le tube et le décongeler rapidement en surface sous un robinet d'eau chaude.

Transférer le bloc dans une grande boîte de culture.

Rajouter 23 ml de milieu BME complet.

Mettre à incuber pendant 8 heures.

Changer alors le milieu.

Après 24 heures trypsiner et relancer la culture classique.

DECONGELATION ET RELANCE D'UNE LIGNEE KB

2 souches :

A congelée le 10/10/1994 : 5.10^6 Cellules/ml
 B congelée le 04/11/1994 : $2,5.10^6$ Cellules/ml

date	heure	observations
07/03/1995	8h30	-Décongélation et mise en culture en boîtes de 75 ml
	11h00	-Cellules fixées -peu de déchets
	17h30	-Division et premières cellules étoilées - remplacement du milieu
08/03/1995	8h30	-bonne division : toutes cellules étoilées
	17h00	-bon étalement - cellules en tapis
09/03/1995	9h30	-bon état général- forte concentration cellulaire -trypsination des cultures et numération : A = 8.10^5 C/ml ---B = $3,1.10^5$ C/ml -repiquage 0.5 ml en boîte 25ml avec 8ml milieu BME = A1 et B1 -repiquage 1 ml en boîte 25 ml avec 8 ml milieu BME = A2 et B2
	11h30	-Cellules fixées
	13h45	-Début division
10/03/1995	13h30	-Bon développement sur les 4 boîtes A1 et B1 très riches
11/03/1995	9h00	-Bonne tenue des cellules -B1 :milieu légèrement viré / A1 A2 B2 normaux
12/03/1995	9h00	-B1 quelques cellules mortes en suspension : remplacement du milieu -A1 A2 B2 : développement normal
13/03/1995	9h00	-Trypsination numération repiquage -Préparation et congélation d'un culot.

CONCLUSION.

La maintenance d'une lignée cellulaire nécessite rigueur et savoir faire. Les risques de contaminations et de perte de la souche sont le principal obstacle à surmonter de manière à pouvoir utiliser une lignée propre pour la mise en oeuvre du test. Les aléas sont bien évidemment imprévisibles.

Techniquement les temps passés à l'entretien de la lignée demandent des temps acceptables; deux repiquages par semaine suffisent lorsque la culture est maîtrisée; soit environ deux heures par semaine.

La préparation des micro plaques pour la mise en oeuvre du test et l'inoculation sont également des manipulations assez rapides.

Le problème "temps" est presque exclusivement lié à la technique d'extraction qui est très sensiblement allongée par rapport au test classique à l'Acétone.

Le choix d'adopter cette nouvelle technique doit donc être fondé sur d'autres critères.

L'aspect sélectivité paraît être le plus important. Dans le cas où on cherche à révéler la toxicité de l'Acide Okadaïque, la technique d'extraction complexe avec séparation finale dans le dichlorométhane est plus fiable que la simple extraction à l'acétone qui est réputée recueillir l'ensemble des toxines ainsi qu'un certain nombre d'autres composants susceptibles d'aboutir à des "faux positifs".

Avec le test DRAME la réponse chiffrée d'une concentration en Acide Okadaïque ne manque pas d'intérêt.

Les quelques résultats obtenus semblent donner des réponses cohérentes par rapport aux tests souris, mais ils sont insuffisants.

Il serait intéressant d'une part de continuer à explorer les réponses DRAME pour des tests biologiques sur souris donnant des résultats voisins des 5 heures, et d'autre part d'essayer de définir un seuil de concentration en Acide Okadaïque susceptible de satisfaire à la protection du consommateur.

Le travail mené dans notre laboratoire a permis de mettre en évidence les difficultés d'application de ce test. La mise en place d'un groupe de travail "Assurance Qualité" devrait permettre de meilleures conditions d'adaptation de la méthode à nos besoins. Celle-ci va de paire avec une formation minimale des utilisateurs.

Recommandations

- Local réservé à ces manipulations (contaminations).
- Disposer d'une souche de **bonne qualité** et d'au moins un culot congelé en cas de problème.
- Veiller à la **bonne conservation des milieux et à la stérilité parfaite** du matériel.
- Fractionner le BME en **flacons stériles dès ouverture de la** bouteille.
- **Idem** pour le sérum.(à décongelé à **température ambiante**).
- Veiller à la **stabilité** des cultures.
- **Se méfier de l'évaporation rapide du dichlorométhane** sur les prises d'essais (intérêt de travailler avec **ballon à col et bouchon rodé**).
- Etc.
- Etc..... : « **Assurance Qualité** »

Mise en place d'une étude pilote

Etude pilote du test de cytodétection des toxines diarrhéiques : *test DRAME*

Le test DRAME (Détection Rapide de l'Acide okadaïque dans les Moules après Extraction) (Amzil et al., 1992) a été mis au point pour remplacer à terme le test de toxicité sur souris actuellement pratiqué par le réseau REPHY.

Ce test est aujourd'hui parfaitement fonctionnel. A la suite d'une formation des personnels du REPHY, une première étude d'implantation en laboratoire côtier a été menée à CONCARNEAU. Des remarques d'ordre pratique exposées à la suite de ce protocole nous ont conduit à proposer une étude d'amélioration du test. Tout d'abord, il faudrait simplifier la technique d'extraction qui fait appel à une prépurification par partages liquide/liquide successifs. Cette méthode est très performante mais relativement longue à mettre en oeuvre, surtout lorsqu'il faut traiter plusieurs échantillons à la suite. Le deuxième point à étudier concerne les cultures cellulaires : les laboratoires côtiers chargés de la surveillance ont une charge de travail importante et l'entretien régulier de la lignée cellulaire KB vient en surcroît de cette charge. Il serait donc intéressant d'étudier la possibilité de préparer des cultures cellulaires en kit qui seraient fournies aux laboratoires utilisateurs par un laboratoire central. Nous proposons donc l'étude suivante :

– Simplification de la technique

- **simplification du protocole d'extraction des coquillages à tester**

La détection étant basée sur un phénomène spécifique des toxines recherchées (inhibition des protéines phosphatases cellulaires induisant des changements morphologiques), une extraction simplifiée des moules sans étape de prépurification devrait conduire au même résultat. Il conviendra toutefois de réajuster la gamme des doses testées aux nouveaux rendements d'extraction.

- **simplification du protocole du test**

Une diminution du nombre de dilutions testées pourrait faire gagner du temps pour les tests réalisés à partir de nombreux échantillons.

- **mise au point de kits à envoyer dans les laboratoires côtiers pour leur permettre de réaliser le test en les dispensant de l'entretien des cellules**

La réalisation de kits permettrait une simplification du travail des utilisateurs (entretien des lignées). Pour cela nous allons étudier la possibilité de l'envoi de cultures cellulaires depuis un laboratoire central producteur vers les laboratoires utilisateurs. Les conditions de transport des cellules devront être déterminées pour que celles-ci arrivent dans un état satisfaisant pour la réalisation du test.

Une étude de brevetabilité des kits développés est à envisager.

- Etude de faisabilité au niveau du réseau REPHY

Les modifications proposées seront testées sur deux saisons de récolte entre un laboratoire central situé à Nantes et deux laboratoires côtiers d'IFREMER chargés de la surveillance (Concarneau, Nantes).

Cette étude, si elle donne un résultat positif, servira de base pour réaliser un protocole de validation à plus grande échelle en association avec des équipes Irlandaises et Espagnoles.

TEST DE CYTODETECTION DES TOXINES DIARRHEIQUES

La méthode est basée sur les modifications de la morphologie de cellules mises en contact avec des toxines du type acide okadaïque

Avantages : spécifique et rapide

L'étude proposée :

- ☞ Simplification du protocole d'extraction**
- ☞ Simplification du protocole du test**
- ☞ Production centralisée des cellules et expédition des cultures aux laboratoires côtiers**
- ☞ Essai *in-situ* avec deux laboratoires côtiers :
Concarneau, Nantes**

Cette étude servira de base pour réaliser un protocole de validation à plus grande échelle

**METHODE RETENUE POUR LA PREPARATION DES EXTRAITS DE MOULES POUR
RECHERCHER L'ACIDE OKADAÏQUE (PHASE CH₂CL₂) ET EVENTUELLEMENT D'AUTRES
TOXINES ATYPIQUES (PHASES AQUEUSE ET/OU CH₂CL₂)**

MOULES

séparation des hépatopancréas

CHAIR

30 g HEPATOPANCREAS (HP)

broyage

Conserver 2 fois 5 g HP au congélateur
pour l'analyse CLHP et le test DRAME

20 g HP

+ Méthanol/eau 90/10
extractions répétées (3 fois 50 ml)

filtration
(ou centrifugation)

résidu

FILTRAT
(ou surnageant)

+ Hexane
extraction liquide/liquide (2 fois 60 ml)

PHASE HEXANE
(produits apolaires)

PHASE AQUEUSE
+ 45 ml eau → méthanol/eau 70/30

+ Dichlorométhane (CH₂Cl₂)
extraction liquide/liquide (3 fois 50 ml)

phase dichlorométhane
(produits moyennement polaires)
- évaporer à sec

phase aqueuse
(produits très polaires)
- évaporer à sec
- reprendre dans le méthanol seul afin
d'éliminer les impuretés (sels minéraux ...)
- centrifuger à 1500 t/min pendant 8 min
- récupérer le surnageant et évaporer à sec

EXTRAIT

EXTRAIT

Test souris : pour chaque extrait à tester, reprendre dans 4 ml de Tween 60 à 1 % et injecter par voie intrapéritonéale à un lot de 3 souris mâles de 20 g (1 ml de solution par souris).

– 15 –

Test hémolytique, pour la mise en évidence de la
production de substances toxiques
pour les animaux marins

15. Présentation théorique et démonstration du test hémolytique, pour la mise en évidence de la production de substances toxiques pour les animaux marins.

Ce test permet de mesurer le **pouvoir hémolytique de l'eau** contenant des cellules de *Gymnodinium cf. nagasakiense*, espèce produisant des toxines à caractère hémolytique.

Il s'agit d'un test non spécifique, car tout ce qui peut agir sur la pression osmotique donne un résultat positif par éclatement des globules rouges. En outre, la relation entre les concentrations cellulaires et l'activité hémolytique du milieu dépend de plusieurs facteurs, et une évolution à prévoir du test concerne la détection d'un cofacteur favorisant l'action de la toxine.

Ce test permet cependant d'avoir une estimation tout à fait intéressante du risque encouru par les animaux marins lors d'un bloom de *Gymnodinium cf. nagasakiense* ou d'une espèce équivalente.

Il est donc recommandé d'effectuer un test hémolytique quand les concentrations dans l'eau dépassent quelques milliers de cellules par litre. Des mortalités peuvent être observées à partir de 200 UH (Unités Hémolytiques) dans le tube analysé, c'est à dire environ 800 UH dans l'échantillon.

Test hémolytique

Geneviève Arzul
Laboratoire Ecologie Pélagique
Brest

Les études sur le déterminisme des efflorescences algales réalisées depuis 1984 dans l'équipe Ecologie Pélagique utilisent le comportement de l'algue *Gymnodinium* cf. *nagasakiense* comme modèle.

Cette algue était déjà connue pour ses effets sur la faune : mortalités de bivalves, d'invertébrés, de poissons, et des lésions tissulaires étaient mentionnées (Mahoney *et al.*, 1990 ; Jones *et al.*, 1982 ; Tangen, 1977 ; Erard-Le Denn *et al.*, 1990) . Les travaux réalisés dans notre équipe ont mis en évidence la production par *G.* cf; *nagasakiense*, de substances hydrosolubles capables de réprimer le développement d'autres algues en particulier la diatomée *Chaetoceros gracile* : c'est la propriété allélopathique (Gentien and Arzul, 1990). De plus, la propriété allélopathique est apparue comme occasionnelle et labile. Parallèlement, d'autres équipes de chercheurs travaillaient sur la toxicité de *G.* cf. *nagasakiense*, en particulier l'équipe du Pr Yasumoto (Yasumoto *et al.*, 1990), montrant la composition lipidique et glycolipidique de substances produites par l'algue. Les japonais ont montré que l'une des particularités de ces substances est d'être hémolytique. Des indications complémentaires ont été apportées par notre équipe sur la structure de cette toxine (Bodennec *et al.*, 1993 et 1995).

Afin de poursuivre nos études sur cette espèce, il est devenu nécessaire de détecter le caractère toxique de l'eau. En cumulant ces données : toxicité, hydrosolubilité, propriété hémolytique traduisant des lésions membranaires, nous avons tenté de détecter la substance toxique hydrosoluble et hémolytique de *Gymnodinium* directement dans l'eau. L'objectif était d'introduire des globules rouges dans l'eau suspecte, et de voir s'il y avait rupture des membranes et donc hémolyse. Les résultats ont été positifs, et après adaptation, cette technique est maintenant utilisable en routine (Arzul *et al.*, 1994).

Principe

L'algue *Gymnodinium cf. nagasakiense* produit une toxine composée d'acides gras polyinsaturés qui ont la propriété de perforer les membranes cellulaires. Ce caractère cytolytique peut être mis en évidence en utilisant des membranes cellulaires de globules rouges. Lorsque celles-ci sont attaquées, la cellule sanguine libère l'hémoglobine colorée en rouge. L'intensité de la couleur est d'autant plus forte que le nombre de globules perforés est important.

Méthode

Afin de mettre en évidence ce phénomène il est nécessaire de respecter 3 étapes :

1 - Préparation des globules rouges

Pour cela, les cellules sanguines (prélèvement hépariné) sont lavées avec une solution dite solution de lavage tampon pH7 (voir annexe 1) 3 fois. Ceci permet de débarrasser les membranes des protéines et anticorps de surface et de les rendre accessibles à l'attaque des substances à détecter. La solution de lavage est éliminée après centrifugation. Les globules rouges sont ensuite dilués à 1/10 dans la solution de stockage (annexe 2). Conserver recouvert de parafilm, au frigo pendant 1 jour maximum.

2 - Préparation de l'échantillon à tester

L'eau de mer contenant les cellules algales doit être fraîchement collectée ou conservée dans des conditions favorables à la survie des cellules : pénombre, température 4 à 15 °C environ. Après avoir mesuré la salinité, diluer l'eau à 9 ‰ avec de l'eau distillée afin de la rendre isotonique avec le contenu intracellulaire des globules rouges. Utiliser l'eau immédiatement : voir ci-après.

3 - Préparation des tubes à hémolyse

Prévoir 3 tubes par échantillon, 3 tubes pour l'hémolyse spontanée, 3 tubes pour l'hémolyse totale. (annexe voir l'exemple Tableau 1)

Chaque tube reçoit l'eau à 9 ‰, les globules rouges qu'on va apporter à 1/10 du volume total afin d'avoir 1/100 de la concentration en globules initiale dans le sang. L'hémolyse spontanée qui rend compte de l'éclatement naturel dû à la manipulation, est estimée en utilisant une solution de **NaCl à 9 g/L dans de l'eau distillée**. L'hémolyse totale est réalisée en utilisant de l'eau distillée, ce qui provoque l'éclatement de la totalité des cellules sanguines.

L'incubation est réalisée pendant 90 minutes à température 18-20 °C. Elle est stoppée par centrifugation (10 minutes à 2500 tr/min). Les globules non éclatés sédimentent et l'intensité de la couleur du surnageant est comparée à celle de l'hémolyse spontanée. Le résultat est souvent visible à l'oeil. Il est mesurable par photométrie à 540 nm.

4 - La méthode peut être rendue quantitative

Pour cela, lors de la préparation des tubes il faut prévoir quelque tubes supplémentaires pour les tests de standardisation. (voir annexe exemple Tableau 2).

Le standard utilisé est la **saponine Sigma**. C'est une substance végétale, en poudre, soluble dans l'eau, relativement stable, et dont l'activité hémolytique est très voisine de celle de l'un des acides gras qui composent la toxine. L'inconvénient des acides gras est leur instabilité.

Nous utilisons la **saponine à 1 g/L dans une solution de NaCl à 9 ‰**. L'activité hémolytique est quantifiable, et on a évalué que :

1 unité hémolytique équivaut à l'activité de 10 µg de saponine.

L'expérience est réalisée selon le protocole précédent, et l'intensité de la coloration en fonction de la concentration en saponine permet d'évaluer la capacité hémolytique de l'échantillon.

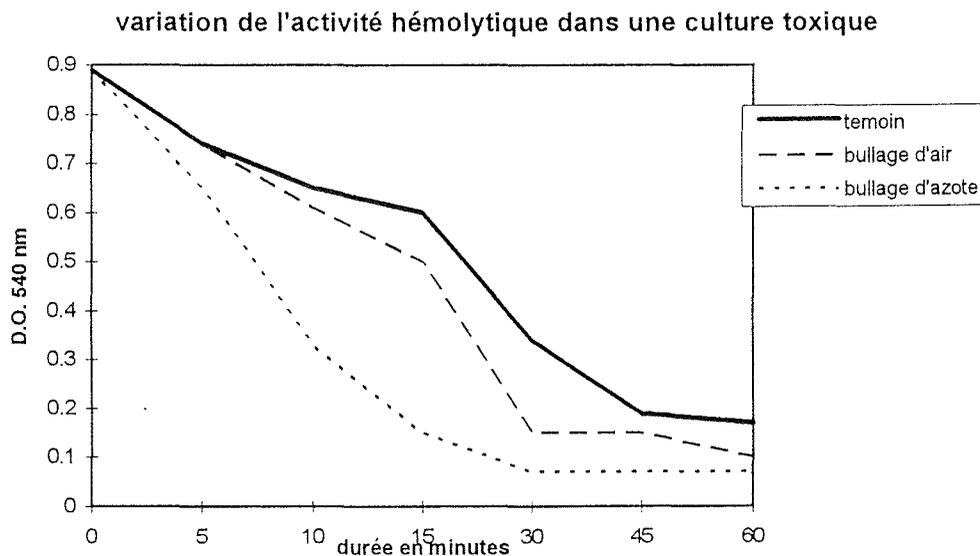
Remarques

L'échantillon

La propriété hémolytique est instable : quand les cellules de *Gymnodinium* cf. *nagasakiense* sont mortes ou absentes, cette activité disparaît très rapidement. Donc pour avoir un résultat le plus exact possible, il importe de travailler avec un échantillon bien conservé. La congélation peut être un moyen de stockage intéressant, mais la décongélation est délicate car les substances se dégradent vite.

La figure suivante présente la diminution de l'activité hémolytique dans une eau de culture de *Gymnodinium* sp. toxique

non filtrée et diluée à 9 ‰. Elle montre la rapidité avec laquelle le principe toxique se désactive, probablement par oxydation et réactivité avec les substances organiques dissoutes.



Les globules rouges

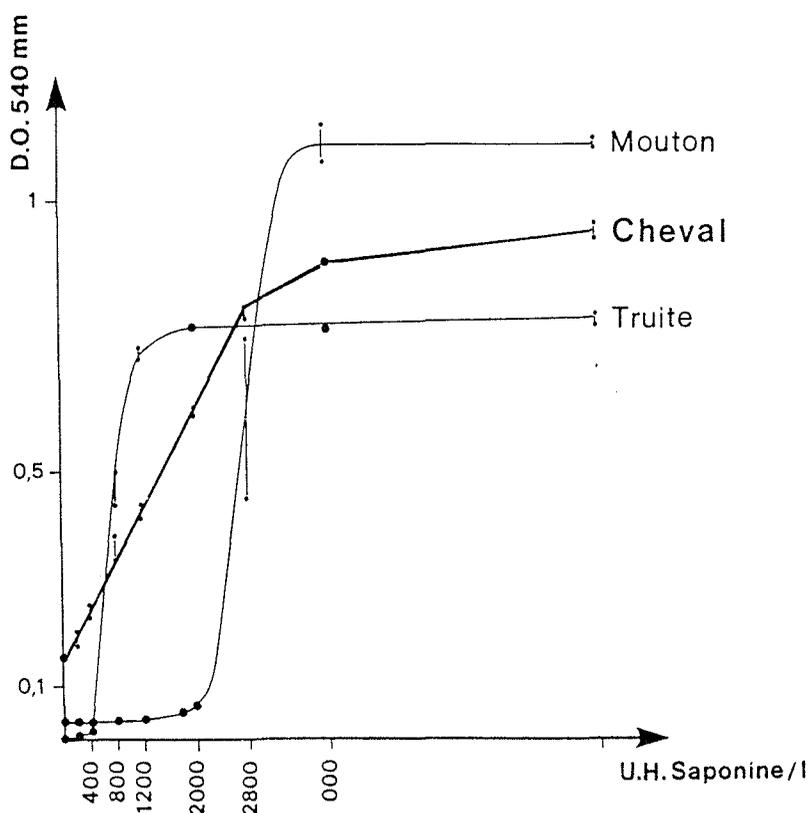
Selon l'origine des globules rouges les tests sont plus ou moins sensibles. Les résultats ont montré que les cellules sanguines de cheval sont les plus sensibles vis-à-vis de la toxine de *Gymnodinium* cf. *nagasakiense*. Les cellules humaines sont également sensibles à cette toxine. Les cellules humaines, de mouton et de truite sont moins sensibles aux problèmes de salinité que celles du cheval. Une petite erreur dans la dilution à 9 ‰ de l'échantillon peut donner un faux positif avec ces dernières.

Pour se procurer ce matériel : Institut Pasteur-Sanofi (environ 10 f TTC les 5ml et 70 f le transport), ou abattoire, ou pisciculture, ou CTS.

La figure suivante compare les effets de la saponine sur les différentes cellules.

Comparaison de la sensibilité des 3 types de globules rouges testés vis-à-vis de la saponine utilisée comme standard

(1 Unité Hémolytique équivaut 10 µg)



Conclusion

Cette technique est :

- rapide : en 3 heures on peut donner un résultat
- peu coûteuse
- ne nécessite pas de matériel compliqué : un réfractomètre ou tout autre appareil pour mesurer la salinité, une centrifugeuse, un colorimètre, des tubes et des pipettes.

Ce test n'est pas spécifique : il rend compte de la présence de toute substance capable de perforer les membranes cellulaires : substances protéiques (enzymes), acides gras polyinsaturés, saponines (aglycones d'hétérosides)... ou de modifier la pression osmotique intracellulaire.

Quelques références

Arzul G., Gentien P. and Crassous M. P., 1994. A haemolytic test to assay toxins excreted by the marine dinoflagellate *Gyrodinium cf. aureolum*. *Wat. Res.* Vol. 28, N° 4, pp 961-965.

Bodennec G., Gentien P., Parrish C., Arzul G., Youenou A., Crassous M.P., 1995. Production of suspected lipids phycotoxins by *Gymnodinium cf. nagasakiense* in batch cultures. in : *Harmful Marine Algal Blooms*. Lassus *et al.* eds. Lavoisier.

Bodennec G., Parrish C.C. & Gentien P.(1993). Intra-cellular and extra-cellular fatty acids in batch cultures of the toxic dinoflagellate *Gyrodinium cf. aureolum*, effects of environmental factors. *Comm. au 84th American Oil Chemists' Society. Annual Meeting, April 1993.*

Erard - Le Denn E., Morlaix M. and Dao J.C., 1990 Effect of *Gyrodinium cf. aureolum* on *Pecten maximus* (post larvae, juveniles and adults). in : *Toxic Marine Phytoplankton*. Granéli E. *et al.* eds. Elsevier, pp. 132-136.

Gentien P. and Arzul G., 1990. Exotoxin production by *Gymnodinium cf. aureolum* (Dinophyceae). *J. mar. biol. Ass. U. K.* (1990), 70, pp 571-581.

Tangen K., 1977. Blooms of *Gyrodinium aureolum* (dinophyceae) in north european waters, accompanied by mortality in marine organisms. Sarsia 63 (2) pp.123-133.

Yasumoto T., Underdal, Aune T, Hormazabal V., Skulberg O.M. & Oshima Y. 1990. Screening for hemolytic and ichthyotoxic components of *Chrysochromulina polylepis* and *Gyrodinium aureolum* from Norwegian coastal waters. In : E. Granéli, B. Sundstrom, L. Edler and D.M. Anderson (Editors), Toxic Marine Phytoplankton. Proc. 4th Int. Conf. Toxic Marine Phytoplankton, June 1989, Lund, Sweden. Elsevier, New York, pp. 436-440.

Annexe

Solution de lavage

B. Edvardsen , F. Moy and E. Paasche - 1990 .Hemolytic activity in extracts of *Chrysochromulina polylepis* grown at different levels of selenite and phosphate . In : Toxic Marine Phytoplankton. Edna Granéli et al. editors. pp 284 - 290 .

Laver 3 fois avec :

150 mM NaCl = 8.82 g
3.20 mM KCl = 0.239 g
1.25 mM MgSO₄ = 0.150 g
12.2 mM Tris Base = 1.477 g

eau MilliQ qsp 1 litre . Ajuster le pH à 7 à 10 ° C, avec HCl 1 N (0.5 à 0.6 ml)

Conserver au réfrigérateur .

Les cellules sont mises en suspension dans environ 50 mL de cette solution et centrifugées pendant 15 minutes à 2500 tours par minutes . Le surnageant est rejeté, les cellules sont agitées quelques secondes sur Vortex, et l'opération est refaite encore deux fois .

Solution de stockage

Mettre en suspension dans la même solution contenant en plus :

3.75 mM CaCl₂ = 0.417 g ou 0.551 g quand di-hydraté . Cette solution est à 11 % .
Pour qu'elle soit à 9 % il faut ajouter 222 mL d'eau MilliQ .

Conserver au réfrigérateur .

Le culot de cellules est agité légèrement puis mis en suspension dans 50 mL de cette solution . Avant chaque prélèvement agiter légèrement le récipient afin d'homogénéiser la suspension . On a une suspension à 1/10.

Exemple Tableau 1

N° Tubes	volume d'eau à 9 ‰	suspension d'hématies à 1/10
1-2-3	4500 μ L NaCl	500 μ L
4-5-6	4500 μ L échantillon	500 μ L
7-8-9	4500 μ L eau distillée	500 μ L

Exemple Tableau 2

N° Tubes	Volume d'eau à 9 ‰	Volume de saponine à 1 g/L	suspension d'hématies à 1/10
1-2-3	4500 μ L NaCl		500 μ L
4-5-6	4500 μ L échantillon		500 μ L
7-8-9	4480 μ L NaCl	20 μ L	500 μ L
10-11-12	4460 μ L NaCl	40 μ L	500 μ L
13-14-15	4440 μ L NaCl	60 μ L	500 μ L
16-17-18	4420 μ L NaCl	80 μ L	500 μ L
19-20-21	4150 μ L NaCl	100 μ L	500 μ L

- 16 -

QUADRIGE
Avancement des travaux

16. QUADRIGE. Avancement des travaux.

La prochaine phase importante de QUADRIGE concerne les traitements qui seront **proposés en standard** : extractions de données, éditions, etc. Un travail important a déjà été réalisé, et les grandes options choisies, ainsi, **le caractère primordial et urgent d'un outil puissant d'extraction des données sur des critères complexes**, et la possibilité d'un accès convivial à la base (par exemple par l'intermédiaire de cartes).

Les traitements sophistiqués, faisant appel à des outils mathématiques développés par ailleurs, **ne sont par contre pas retenus**. Les seules sorties graphiques qui pourraient être retenues concernent des graphiques descriptifs et non interprétés : par exemple, des séries temporelles simples.

Les traitements sujets à interprétation seront toujours laissés à l'initiative de l'utilisateur des données. En corollaire, il a été jugé nécessaire de recenser les logiciels d'analyse et de traitement de données disponibles sur le marché, afin d'en faire une analyse critique.

La question de l'accès direct aux données de QUADRIGE par des partenaires extérieurs est évoquée. Il est probable qu'un accès futur à des données déjà agrégées, par exemple dans un serveur Internet, ou la demande directe de données déjà interprétées, comme cela arrive le plus souvent, sera largement favorisée.