

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ECOLE DOCTORALE VEGETAL, ENVIRONNEMENT, NUTRITION,
AGROALIMENTAIRE, MER

Année 2013

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Évaluation d'une suite de bio-essais pour la détection et l'étude de composés lipophiles de micro-organismes marins issus de mollusques bivalves et de leur environnement

THÈSE DE DOCTORAT

Mention : Sciences de la Vie et de la Terre
Discipline : Sciences Pharmaceutiques
Spécialité : Biotoxines Marines

*Présentée
et soutenue publiquement par*

Marie GEIGER

Le 25 Septembre 2013, devant le jury ci-dessous :

<i>Rapporteurs</i>	Pierre CHAMPY, Professeur, Université Paris-Sud Benoît SAUTOUR, Professeur, Université de Bordeaux 1
<i>Président</i>	Joël BOUSTIE, Professeur, Université de Rennes 1
<i>Directeurs de thèse</i>	Yves François POUCHUS, Professeur, Université de Nantes Philipp HESS, Cadre de Recherche, IFREMER
<i>Membre invité</i>	Jean-Marc FREMY, Directeur de Recherche Honoraire, ANSES

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ECOLE DOCTORALE VEGETAL, ENVIRONNEMENT, NUTRITION,
AGROALIMENTAIRE, MER

Année 2013

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Évaluation d'une suite de bio-essais pour la détection et l'étude de composés lipophiles de micro-organismes marins issus de mollusques bivalves et de leur environnement

THÈSE DE DOCTORAT

Mention : Sciences de la Vie et de la Terre
Discipline : Sciences Pharmaceutiques
Spécialité : Biotoxines Marines

*Présentée
et soutenue publiquement par*

Marie GEIGER

Le 25 Septembre 2013, devant le jury ci-dessous :

<i>Rapporteurs</i>	Pierre CHAMPY, Professeur, Université Paris-Sud Benoît SAUTOUR, Professeur, Université de Bordeaux 1
<i>Président</i>	Joël BOUSTIE, Professeur, Université de Rennes 1
<i>Directeurs de thèse</i>	Yves François POUCHUS, Professeur, Université de Nantes Philipp HESS, Cadre de Recherche, IFREMER
<i>Membre invité</i>	Jean-Marc FREMY, Directeur de Recherche Honoraire, ANSES

A mes grands-parents

A mes parents

A mes frères

A Julien

*La lumière de la connaissance, la lumière de la
science est d'une extraordinaire beauté.*

Elle éclaire le monde et nous éclaire.

Mais elle ne doit jamais, nous ne devons jamais

la laisser noyer cette flamme à jamais inconnue

qui brûle en chacun de nous et dont nous ne

percevons que des reflets.

Et quand la lumière commence à effacer les ombres,

quand la lumière commence à aveugler au lieu de

simplement éclairer, la nuit tombe.

En plein jour, comme elle est si souvent tombée.

Jean Claude Ameisen

Remerciements

Cette thèse s'est déroulée entre le Laboratoire Mer, Molécules, Santé, de la Faculté de Pharmacie de Nantes, et le Laboratoire Phycotoxines de l'Ifremer de Nantes. Je souhaite en premier lieu remercier toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.

Je tiens tout d'abord à exprimer ma reconnaissance et mes plus sincères remerciements à mes directeurs de thèse, M. Yves François Pouchus et M. Philipp Hess, pour m'avoir fait confiance et accueilli au sein de leur laboratoire. Travailler à vos côtés a été une expérience d'une très grande richesse.

M. Yves François Pouchus, merci de m'avoir fait découvrir, au travers de votre regard très pertinent, le monde des champignons. J'espère, à vos côtés, avoir pu m'imprégner un peu de votre savoir. Vos compétences, vos conseils scientifiques, votre jugement critique de ce manuscrit, mais également vos encouragements, votre disponibilité, votre gentillesse et votre bonne humeur, m'ont été très précieux pour l'aboutissement de ce travail.

J'adresse également mes plus vifs remerciements à M. Philipp Hess, co-directeur et initiateur de ce projet de thèse, pour m'avoir ouvert les portes du domaine passionnant des phycotoxines en me confiant ce projet. Merci pour ton encadrement rigoureux, tes conseils avisés, tes compétences et connaissances scientifiques et ta disponibilité de tout instant.

Je remercie également chaleureusement M. Olivier Grovel et Mme Véronique Séchet, pour avoir co-encadré ce travail de thèse, respectivement au Laboratoire MMS et au Laboratoire Phycotoxines. Olivier, merci de m'avoir guidée et encouragée, ta rigueur scientifique, tes conseils avisés, ton enthousiasme et ta gentillesse ont été d'une très grande aide. Travailler à tes côtés a été un plaisir. Véronique, merci de m'avoir initiée à la culture des micro-algues, ainsi que pour ton soutien et ta bonne humeur.

M. Benoît Sautour, Professeur d'écologie marine à l'Université de Bordeaux 1, et Mr Pierre Champy, Professeur de pharmacognosie à l'Université Paris-Sud, je vous suis très reconnaissante de juger ce travail en tant que rapporteurs.

M. Joël Boustie, Professeur de pharmacognosie à l'Université de Rennes 1, je vous remercie de m'avoir éclairée de vos conseils et de votre expertise au cours des comités de thèse, et d'avoir accepté de faire partie de ce jury.

M. Jean-Marc Frémy, Directeur de Recherche Honoraire à l'ANSES de Maison-Alfort, je vous remercie de me faire l'honneur de participer à ce jury en tant que membre invité.

M. Mohamed Laabir, Maître de Conférences à l'Université de Montpellier 2, je vous remercie du regard extérieur que vous avez accepté de porter sur ce travail au travers des comités de thèse, et qui a contribué au bon déroulement de ce projet.

Je tiens à remercier l'ensemble de l'équipe du Laboratoire MMS. Merci à Mme Marie-Claude Boumard de m'avoir appris à asticoter des larves, et à M. Thibaut Robiou du Pont de m'avoir appris à manipuler les cellules KB et cultiver des champignons. Vos conseils ont été très précieux. M. Yann Guitton, merci de m'avoir rendu le travail de dérégulation et la spectrométrie de masse un peu moins obscurs, merci pour ton aide et ton investissement dans mon projet de thèse, ainsi que de ta présence au quotidien, qui a été un réel soutien. M. Nicolas Ruiz,

Mme Karina Petit, Mme Catherine Roullier, Mme Aurélie Couzinet-Mossion, Mme Gaëtane Wielgosz-Collin, Mme Vony Rabesaotra, merci à tous pour les discussions scientifiques enrichissantes, pour votre soutien, votre gentillesse et votre disponibilité. Merci à chacun d'entre vous de contribuer à cette belle ambiance qui règne dans l'équipe. Merci également à Mme Christine Herrenknecht, M. Joël Fleurence, Mme Laurence Poirier, Mme Aurore Zalouk-Vergnoux, pour leur présence et leur gentillesse. Merci à M. Joseph Baudet, naturaliste et entomologiste, de m'avoir initiée à un monde totalement inconnu, celui des mouches ! Merci pour les cours de reconnaissance et de classification, ainsi que pour les essais - plus ou moins fructueux - de dissection de mouches et de larves.

Je remercie M. François Lang, Professeur de pharmacologie à la Faculté de Pharmacie de Nantes, pour son aide dans l'interprétation du bio-essai sur larves, et Mme Nathalie Caroff, Maître de Conférences en bactériologie à la Faculté de Pharmacie de Nantes, pour son aide dans l'interprétation des tests antibactériens.

Je tiens à remercier l'ensemble de l'équipe Phycotoxines de l'Ifremer. M. Zouher Amzil, merci de m'avoir accueillie au sein du laboratoire, ainsi que pour tes conseils. Merci à M. Patrick Lassus, Mme Claire Marcaillou-Le Baut, Mme Michèle Bardouil, Mme Florence Mondeguer, Mme Fabienne Hervé, M. Philippe Truquet, Mme Manoella Sibat-Dubois, Mme Véronique Savar, Mme Florence Royer, M. Georges-Augustin Rovillon, Mme Virginie Raimbault, Mme Nathalie Jarnoux, pour vos conseils et votre soutien tout au long de ce travail de thèse. Michèle, merci pour ton écoute, ton attention et ta prévenance ! Florence M., merci de ta disponibilité et de ton aide.

Merci à l'équipe du Laboratoire Santé, Environnement et Microbiologie de l'Ifremer, de m'avoir accueillie et permis de réaliser une partie de mes expérimentations. M. Antoine Veron, merci de m'avoir appris un certain nombre de techniques de microbiologie, ton aide a été très précieuse, merci également de ta disponibilité. M. Jacques Dupont, merci d'avoir supervisé la mise en place des tests antibactériens. M. Martial Catherine, Mme Emilie Vallade, Mme Chantal Menanteau, Mme Gaëlle Kaelin, merci de votre appui technique et de vos conseils. J'espère ne vous avoir pas trop envahis !

Merci également aux membres du Laboratoire Physiologie et Biotechnologie des Algues de l'Ifremer, voisins de palier très sympathiques. Merci tout particulièrement à M. Jean-Paul Cadoret, M. Raymond Kaas, M. Jean-Baptiste Berard, M. Bruno Saint-Jean, Mme Elodie Nicolau, M. Matthieu Garnier, M. Gaël Bougaran, pour votre aide tant sur le plan scientifique que moral ! Les discussions de palier ont été très enrichissantes et motivantes. Elodie, merci pour ta présence et ton soutien qui m'ont été salutaires.

Je tiens également à remercier un certain nombre de personnes du Laboratoire de l'ANSES à Fougères : M. Christophe Soumet, Mme Mireille Bruneau, Mme Agnès Perrin-Guyomard, Mme Catherine Poirier, Mme Valérie Fessard. Merci de m'avoir accueillie pendant une semaine au sein de vos équipes, et de m'avoir permis d'appréhender la démarche de mise en place de tests antibactériens. Valérie, merci de tes conseils avisés sur le test de cytotoxicité, ainsi que pour ta collaboration.

Merci aux deux techniciens qui ont été plus particulièrement impliqués dans ce travail, Solène Brochard et Thomas Leprêtre. Solène, merci pour ton aide efficace pour la culture et l'extraction des micro-algues et des champignons, ainsi que pour la réalisation des tests. Thomas, grâce à toi ce travail de thèse a fait un grand saut en avant ! Merci de l'intérêt que tu as porté à ce sujet, merci pour ton investissement et ta persévérance, et merci pour ton amitié.

Merci à mes petites stagiaires anglaises, Lindsey Marshall et Lucie Rounds, pour leur aide dans la réalisation des

nombreux tests biologiques, et merci à mon grand stagiaire, Benjamin Serraz, pour son aide dans la réalisation et l'interprétation du test larve.

Un grand merci à tous les doctorants – ou docteurs à présent - avec qui j'ai partagé ce quotidien de thèse : la team Ifremer avec Benoît, Charline, Thierry, Myriam, Karine, Zita, Damien, Vincent, et la team MMS avec Elodie, Marieke, Mickaël, Pierre-Emmanuel, Olivia, Anne-Isaline, Melha, Nuria, Mathilde, Anthony, Cécile, et j'en oublie sûrement. Merci pour tous les bons moments passés ensemble, les fous-rires, les jeux de mots stupides, les chansons à tue-tête, les potins avérés ou non, la cagnotte anti-plainte qui ne connaît pas la crise, la minute culturelle, les pauses en refaisant le monde, les innombrables apéros, les soirées à thème, les week-ends à thème. Merci pour votre présence, votre amitié et votre épaule bienveillante dans les moments les plus durs. Merci aussi pour les discussions et conseils scientifiques, et les coups de pouce lors de manip fastidieuses. Elodie, merci pour ton soutien inestimable tout au long de cette thèse, et plus particulièrement sur le rush de la fin. Merci pour tes conseils et les relectures, you're definitely a superstar !

Merci à mes fidèles amis du lycée, Fanny, Aurélie, Céline, Célia, Marco, Thomas, Jeff. Merci d'être là encore et toujours, ainsi que pour vos efforts pour tenter de comprendre mon sujet de thèse !

Merci aux amis de St-Brieuc, Marion, Guilian, Damien, Sabrina, Francis, Maëlla, Richard et toute l'équipe, pour votre soutien et vos encouragements.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude et ma reconnaissance envers ma famille, à qui je dois beaucoup. A mes grands-parents tout d'abord, merci pour votre attention, votre sollicitude, et l'intérêt que vous avez toujours porté à mes études et travaux. Je suis fière de marcher sur les traces de mon grand-père, qui a obtenu son doctorat de chimie en 1946. A mes parents, merci de m'avoir permis de faire ces belles études, de m'avoir toujours soutenue et encouragée dans mes choix, et d'être là tout simplement. J'ai la chance d'être entourée de deux formidables frères, grand frère et petit frère. Malgré la distance, depuis les neiges du nord et de l'est de la France, ou depuis les ardeurs de l'Afrique de l'Est, merci pour votre soutien et votre réconfort.

Julien, mon phare dans la tempête, ma boussole dans la tourmente, tu es resté à la barre même en plein maelström pour me mener à bon port. Du fond du cœur, merci.

A tous, merci.

Sommaire

Introduction et objectifs de l'étude	1
Chapitre 1 – État de l'art : Salubrité des mollusques bivalves	9
1. Les risques associés à la consommation de coquillages	11
1.1. Les phycotoxines réglementées	11
1.1.1. Les toxines hydrophiles	11
1.1.1.1. Le groupe de l'acide domoïque	11
1.1.1.2. Le groupe de la saxitoxine	12
1.1.2. Les toxines lipophiles	13
1.1.2.1. Le groupe de la brevétoxine	13
1.1.2.2. Le groupe de l'acide okadaïque et des dinophysistoxines	15
1.1.2.3. Le groupe des azaspiracides	19
1.1.2.4. Le groupe de la pecténotoxine	23
1.1.2.5. Le groupe de la yessotoxine	25
1.2. Les phycotoxines émergentes	27
1.2.1. Définition	27
1.2.2. Les imines cycliques	28
1.2.2.1. Les pinnatoxines	29
1.2.2.2. Les pirolides, gymnodimines, ptériatoxines et procenterolides	31
1.2.3. Le groupe de la palytoxine	33
1.3. Les toxicités atypiques	35
1.4. Les champignons isolés du milieu marin	36
2. Protection du consommateur de coquillages	37
2.1. Les seuils réglementaires des toxines lipophiles	38
2.2. Les méthodes de détection des toxines lipophiles	39
2.2.1. La controverse du « test souris »	39
2.2.2. Les méthodes alternatives au bio-essai sur souris	43
2.2.2.1. Les méthodes <i>in vivo</i>	43
2.2.2.2. Les méthodes <i>in vitro</i>	43
2.2.2.3. Mise en place de l'analyse chimique pour la surveillance des toxines lipophiles	46
3. Conclusion	47
Chapitre 2 – Méthodologie : Adaptation de tests biologiques à l'étude de micro-organismes issus du milieu marin	51
1. Introduction	53
2. Test de cytotoxicité sur cellules KB	54
2.1. Historique	54
2.2. Motivations pour le choix de ce test	54
2.3. Connaissances méthodologiques sur le test	55
2.3.1. Entretien et repiquage	55
2.3.2. Préparation des extraits	56
2.3.3. Déroulement du test	56
2.3.4. Evaluation de la cytotoxicité par le MTT	56
2.3.5. Interprétation des résultats	57
2.4. Adaptations de protocoles mises en place	57
2.4.1. Adaptation pour une étude avec différentes durées d'incubation	57
2.4.2. Remplacement du MTT par du XTT	58
2.4.3. Choix d'un témoin positif	59
2.4.4. Augmentation de la quantité de sérum de veau fœtal	59
2.5. Conclusion sur le développement du test de cytotoxicité sur cellules KB	59
3. Test sur larves de diptères	60
3.1. Historique et motivations pour le choix de ce test	60
3.2. Modèle d'étude	61
3.3. Connaissances méthodologiques du test de toxicité sur larves de diptères par injection	63
3.3.1. Obtention des larves	63
3.3.2. Mode opératoire	63
3.3.3. Définition des symptômes	64
3.3.4. Influence du solvant	64
3.4. Adaptations de protocoles mises en place	65
3.4.1. Tolérance aux solvants	65
3.4.2. Définition des symptômes	66

3.4.2.1.	Symptômes définissant un effet sur la mobilité	66
3.4.2.2.	Symptômes définissant un effet sur la contractilité.....	67
3.4.3.	Résultats : évaluation du périmètre de détection du test	68
3.4.3.1.	Molécules agissant sur les canaux calciques.....	73
3.4.3.2.	Molécules agissant sur les canaux sodiques.....	73
3.4.3.3.	Molécules agissant sur les canaux potassiques.....	74
3.4.3.4.	Molécules agissant sur les récepteurs à l'acétylcholine	75
3.4.3.5.	Molécules agissant sur les récepteurs au glutamate et au GABA.....	76
3.4.3.6.	Molécules agissant sur les récepteurs adrénergiques.....	78
3.5.	Conclusion et perspectives sur le développement du bio-essai sur larves de diptères	78
3.5.1.	Développements méthodologiques.....	78
3.5.2.	Périmètre de détection du test	79
4.	Tests d'activité antibactérienne.....	82
4.1.	Motivations pour le choix de ces tests	82
4.2.	Développement des tests antibactériens sur bactéries marines.....	82
4.2.1.	Choix des bactéries	82
4.2.2.	Choix du type de test	85
4.2.3.	Définition des conditions de culture	86
4.2.4.	Préparation d'un inoculum	88
4.2.5.	Courbes de croissance en Bioscreen et différentes interprétations	88
4.2.6.	Évaluation de la tolérance à différents solvants et agents de solubilisation.....	93
4.2.6.1.	Solvants	93
4.2.6.2.	Tween 80.....	94
4.2.6.3.	β -cyclodextrines	95
4.2.7.	Choix de témoins positifs	96
4.3.	Conclusion et perspectives sur le développement des tests antibactériens	97
5.	Conclusion	98

Chapitre 3 – *Application* : Utilisation des bio-essais pour la détection et l'étude de phycotoxines lipophiles..... 99

1.	Introduction	101
2.	Matériel et méthodes.....	101
2.1.	Culture des micro-algues et obtention d'extraits bruts.....	101
2.1.1.	Choix des micro-algues	101
2.1.2.	Mise en culture et extraction	102
2.2.	Obtention d'extraits de moules partiellement purifiés pour les essais de dopage	103
2.3.	Déroulement des tests.....	104
2.4.	Analyse des données	104
3.	Résultats : Détectabilité de phycotoxines lipophiles par le test de cytotoxicité sur cellules KB.....	104
3.1.	Screening de différentes familles de micro-algues	104
3.2.	Étude des seuils de détection d'extraits de micro-algues toxiques et de toxines pures	106
3.2.1.	<i>Prorocentrum lima</i> et acide okadaïque	106
3.2.3.	<i>Azadinium spinosum</i> et AZA1	107
3.2.5.	Discussion sur la réponse des cellules KB à une exposition à des extraits bruts toxiques ou non toxiques, et à des toxines pures.....	108
3.3.	Étude des effets d'extraits de moules dopés	110
3.3.1.	Évaluation des effets de matrices induits par des extraits d'hépatopancréas de moules non contaminées.....	110
3.3.1.1.	Obtention d'extraits bruts et d'extraits purifiés.....	110
3.3.1.2.	Évaluation biologique des extraits bruts et purifiés.....	110
3.3.2.	Évaluation de la cytotoxicité de matrices de moules dopées	111
3.3.3.	Rendements d'extraction d'AZA1 après dopage et purification de matrices de moules.....	113
3.4.	Étude d'autres toxines	113
3.5.	Toxicités atypiques	114
3.6.	Conclusion sur le test de cytotoxicité sur cellules KB.....	114
4.	Résultats : Détectabilité de phycotoxines lipophiles par le bio-essai sur larves de diptères	116
4.1.	Screening de différentes familles de micro-algues	116
4.2.	Étude des seuils de détection d'extraits de micro-algues toxiques et de toxines pures	117
4.3.	Étude des effets d'extraits de moules dopés	118
4.3.1.	Évaluation des effets de matrices induits par des extraits d'hépatopancréas de moules non contaminées.....	118
4.3.2.	Évaluation de l'activité sur larves de matrices de moules dopées	119
4.4.	Toxicités atypiques	120
4.5.	Conclusion sur le bio-essai sur larves de diptères	120
5.	Résultats : Production de toxines par des micro-algues, une raison d'être écologique ?	122

5.1. Evaluation du potentiel antibactérien de micro-algues toxiques.....	123
5.2. Evaluation d'extraits d'hépatopancreas de moules ayant montré une toxicité atypique	124
5.3. Conclusion sur les tests antibactériens	125
6. Conclusion et perspectives sur l'utilisation de la suite d'essais pour détecter des toxines lipophiles dans des matrices de coquillages	127

Chapitre 4 – Application : Evaluation par bio-essais du potentiel toxique de *Penicillium* issus de mollusques bivalves..... 131

1. Introduction	133
2. Matériel et méthodes.....	135
2.1. Souches de champignons étudiées.....	135
2.2. Milieux de culture et extraction	139
2.3. Tests biologiques	140
2.4. Analyses en spectrométrie de masse et déréplication.....	141
3. Résultats : Etude de la cytotoxicité des <i>Penicillium</i> sur cellules KB.....	141
3.1. Influence du milieu de culture sur la croissance et l'aspect des souches.....	141
3.2. Influence de l'origine des souches	143
3.3. Influence du milieu de culture sur l'activité cytotoxique de souches isolées de mollusques bivalves	144
3.4. Déreplication d'extraits bruts bio-actifs.....	145
3.4.2. Déreplication de la souche MMS417	148
3.4.3. Déreplication de la souche MMS163	150
3.5. Discussion sur l'activité cytotoxique d'extraits fongiques isolés de mollusques bivalves	153
4. Résultats : Etude de l'activité des <i>Penicillium</i> sur larves de diptères	156
5. Résultats : Etude de l'activité antibactérienne des <i>Penicillium</i>	157
6. Conclusion	160

Chapitre 5 – Application : Contribution des bio-essais à la connaissance du dinoflagellé *Vulcanodinium rugosum* et de l'ascomycète *Beauveria brongniartii*..... 163

1. Introduction	165
2. <i>Vulcanodinium rugosum</i> : mise en évidence d'un potentiel toxique particulier.....	165
2.1. Rappel sur la toxicité de <i>V. rugosum</i> et de la pinnatoxine G	165
2.2. Matériel et méthodes.....	166
2.2.1. Mise en culture de l'organisme	166
2.2.2. Extraction, purification et fractionnement d'extraits de <i>V. rugosum</i>	166
2.2.2.1. Comparaison de l'efficacité de deux méthodes d'extraction de la PnTX-G	166
2.2.2.2. Fractionnement d'un extrait de <i>V. rugosum</i>	167
2.2.2.3. Analyse d'une culture axénique de <i>V. rugosum</i>	168
2.2.2.4. Quantification de la PnTX-G en CL-SM.....	168
2.2.2.5. Analyse métabolomique de fractions de <i>V. rugosum</i> par CL-SM	169
2.2.3. Bio-essais	169
2.2.4. Analyse des données des tests	170
2.3. Résultats	170
2.3.1. Comparaison de l'efficacité de deux méthodes d'extraction de la PnTX-G.....	170
2.3.2. Reproductibilité du fractionnement sur SPE.....	171
2.3.3. Quantification de la PnTX-G au long des processus de purification	172
2.3.4. Regroupement des fractions en vue de leur évaluation biologique.....	172
2.3.5. Evaluation de la bio-activité d'un extrait brut de <i>V. rugosum</i> et de la PnTX-G	173
2.3.5.1. Test de cytotoxicité sur cellules KB	173
2.3.5.2. Confirmation de l'activité cytotoxique sur d'autres lignées tumorales.....	175
2.3.5.3. Test d'activité sur larves de diptères	175
2.3.5.4. Tests d'activité antibactérienne	176
2.3.5.5. Conclusion sur la bio-activité d'un extrait brut de <i>V. rugosum</i> et de la PnTX-G	176
2.3.6. Evaluation de la bio-activité d'extraits purifiés de <i>V. rugosum</i>	176
2.3.7. Evaluation de l'activité des différentes fractions.....	177
2.3.8. Déreplication de composés présents dans des extraits de <i>V. rugosum</i>	178
3. <i>Beauveria brongniartii</i>	182
3.1. Introduction	182
3.2. Matériel et méthodes.....	184
3.2.1. La souche MMS1411 : origine, description et identification.....	184
3.2.2. Culture, extraction, purification et fractionnement	186
3.2.3. Bio-essais.....	187
3.2.4. Analyse des données des tests	187

3.3. Résultats et discussion	187
3.3.1. Rendements des cultures	187
3.3.2. Activités biologiques des extraits bruts.....	188
3.3.2.1. Test de cytotoxicité sur cellules KB	188
3.3.2.2. Test d'activité sur larves d'insectes	188
3.3.2.3. Tests d'activité antibactérienne	189
3.3.3. Fractionnement par chromatographie flash	190
3.3.4. Activité biologique des fractions sur cellules KB.....	191
3.3.5. Déréplication des fractions cytotoxiques	191
4. Conclusion du chapitre.....	196
Conclusions et Perspectives	197
Références bibliographiques.....	205
Publications.....	255
Annexes	295

Liste des Figures

Figure 1 :	Chaîne alimentaire montrant le risque d'accumulation des toxines produites par des micro-algues toxiques au sein des différents organismes le long de différentes chaînes alimentaires (Wikfors, 2013).	4
Figure 2 :	Structure chimique de l'acide domoïque (Quilliam, 2001).	12
Figure 3 :	Structure chimique de la saxitoxine et de ses dérivés (STX = saxitoxine, NEO = neosaxitoxine, GTX = gonyautoxine, dc = decarbamoyl), d'après EFSA, 2009c.	13
Figure 4 :	Photographie prise au microscope électronique à balayage de <i>Karenia brevis</i>	14
Figure 5 :	Structure chimique des brevétoxines et de leurs dérivés (Baden et al., 2005).	14
Figure 6 :	Photographies prises au microscope électronique à balayage de : <i>Dinophysis acuminata</i> (a) et <i>Prorocentrum lima</i> (b). (M. Bardouil, Photothèque du Laboratoire Phycotoxines, Ifremer Nantes).	16
Figure 7 :	Structures chimiques de l'AO et de ses dérivés, les DTX-1, -2 et -3 (Larsen et al., 2007). ...	16
Figure 8 :	Structure chimique de l'azaspiracide-1 (AZA1) et de ses 23 premiers analogues (Nicolau et al., 2006; Rehmann et al., 2008).	20
Figure 9 :	Photographie prise au microscope électronique à balayage de <i>Azadinium spinosum</i> (Tillmann et al., 2009).	21
Figure 10 :	Structure chimique des PTX.	23
Figure 11 :	Photographie prise au microscope électronique à balayage du dinoflagellé <i>Protoceratium reticulatum</i>	26
Figure 12 :	Structure chimique de la yessotoxine (Murata et al., 1987).	26
Figure 13 :	Structure des principales pinnatoxines connues (McCarron et al., 2012).	29
Figure 14 :	Observation de <i>Vulcanodinium rugosum</i> par microscopie électronique à transmission (Rhodes et al., 2010).	30
Figure 15 :	Structure de base des imines cycliques.	32
Figure 16 :	Structure chimique de la palytoxine (EFSA, 2009b).	34
Figure 17 :	Photographie des cellules KB prise au microscope électronique à transmission.	54
Figure 18 :	Schéma de la morphologie interne d'une larve de <i>Calliphora</i> (d'après Grassé, 1951 et Séguy, 1951).	62
Figure 19 :	Schéma du système nerveux d'une larve de <i>Calliphora</i> sp. (d'après Grassé, 1951).	62
Figure 20 :	Photographie de l'injection d'un extrait dans la partie postérieure d'une larve.	64
Figure 21 :	Photographie montrant une larve témoin (a) et une paralysie totale contractile (b,c et d) provoquée par l'acide kaïnique à la concentration de 18,2 mM.	67
Figure 22 :	Photographie montrant une contraction en U provoquée par l'acide L-glutamique à la concentration de 5 mg.mL ⁻¹	68
Figure 23 :	Schéma de fonctionnement de récepteurs ionotropes et métabotropes.	69
Figure 24 :	Schématisation de la complexité d'interprétation de la diversité des symptômes observés sur larves, de leur enchaînement et de leur apparition dans le temps en fonction de la concentration d'une molécule testée.	80
Figure 25 :	Arbre décisionnel pour une conclusion potentielle sur un mécanisme d'action particulier après injection d'un composé pur à des larves de diptères.	80
Figure 26 :	Différentes courbes de croissance de <i>Vagococcus salmoninarum</i>	88
Figure 27 :	Schéma des différents paramètres théoriques définissable sur une courbe de croissance bactérienne (d'après Zwietering et al., 1990; Dalgaard et Koutsoumanis, 2001).	89
Figure 28 :	Définition des équations établissant la relation entre la DO à 600 nm et le nombre d'UFC.mL ⁻¹ pour les différentes souches de <i>Vibrio</i> , à l'aide du logiciel Matlab.	90
Figure 29 :	Ajustement du modèle de Gompertz à la courbe de croissance de <i>V. gigantis</i> . N et N ₀ sont exprimés en UFC.mL ⁻¹	90
Figure 30 :	Exemple d'une courbe de croissance bactérienne non modélisable par le modèle de Gompertz : extrait brut de champignon marin testé sur <i>V. gigantis</i> à la concentration de 50 µg.mL ⁻¹	91
Figure 31 :	Paramètres pris en compte pour l'interprétation des courbes de croissance bactériennes, avec détermination de la valeur maximale de croissance (a.) et de la vitesse maximale de délai et son délai d'apparition (b.).	91
Figure 32 :	Paramètres définis pour l'interprétation des courbes de croissance bactérienne.	92
Figure 33 :	Evaluation de la tolérance à différents solvants de la souche <i>V. crassostreae</i>	93
Figure 34 :	Evaluation de la tolérance au Tween 80 des souches <i>V. crassostreae</i> et <i>V. gigantis</i>	94
Figure 35 :	Evaluation de la tolérance aux β-cyclodextrines des souches <i>V. mytili</i> et <i>L. garvieae</i>	95
Figure 36 :	Evaluation de l'effet d'une gamme d'érythromycine sur la croissance de <i>E. coli</i> (a.) et de <i>V. mytili</i> (b.).	96

Figure 37 :	Evaluation de l'effet d'une gamme de carbénicilline sur la croissance de <i>C. piscicola</i> (a.) et de <i>L. garvieae</i> (b.).....	97
Figure 38 :	Description de la procédure de préparation des extraits de moules utilisées pour les essais de dopage.	103
Figure 39 :	Screening sur cellules KB d'extraits bruts de 12 micro-algues. Ces micro-algues se répartissent sur quatre familles : a- <i>Dinophyceae</i> , b- <i>Cryptophyceae</i> , c- <i>Prymnesiophyceae</i> et d- <i>Prasinophyceae</i> . Pour chaque espèce la toxicité communément admise est précisée (toxique/non toxique).....	105
Figure 40 :	Evaluation de la cytotoxicité d'un extrait brut de <i>P. lima</i> (a) et de l'AO (b) sur cellules KB à différents temps d'exposition : 24, 48 et 72 h.	106
Figure 41 :	Evaluation de la cytotoxicité d'un extrait brut d' <i>A. spinosum</i> (a) et d'AZA1 (b) sur cellules KB à différents temps d'exposition : 24, 48 et 72 h.	107
Figure 42 :	Evaluation de l'activité cytotoxique d'un extrait brut (EB) d'HP de moules et de deux extraits partiellement purifié, EP1 et EP2. Les concentrations de EP1 et EP2 sont exprimées en équivalent extrait brut.	111
Figure 43 :	Evaluation des effets de matrices moules partiellement purifiées, par dopage de ces matrices avec une gamme d'extrait brut de <i>P. lima</i> (a) et <i>A. spinosum</i> (c) et une gamme de toxine pure AO (b) et AZA1 (d).....	112
Figure 44 :	Evaluation de l'activité cytotoxique de la yessotoxine (YTX) et de la pecténotoxine-2 (PTX-2) sur cellules KB après 72 h d'incubation.....	114
Figure 45 :	Screening d'extraits bruts de 13 micro-algues pour la recherche d'une neuro-activité. a. micro-algues non toxiques et b. micro-algues toxiques.	117
Figure 46 :	Evaluation de l'effet d'une gamme d'extrait brut de <i>P. lima</i> et d' <i>A. spinosum</i> , et des toxines AO et AZA1 sur le délai d'apparition d'une immobilisation sur le test larve.	118
Figure 47 :	Evaluation de l'activité sur larves d'insectes d'un extrait brut (EB) d'HP de moules et de deux extraits partiellement purifié, EP1 et EP2. Les concentrations	119
Figure 48 :	Evaluation des effets de matrices moules partiellement purifiées, par dopage de ces matrices avec une gamme d'extrait brut de <i>P. lima</i> (a.) et <i>A. spinosum</i> (b.)	120
Figure 49 :	Structure des conidiophores de <i>Penicillium</i> , a :conidiophore monoverticillé, b : biverticillé, c : triverticillé et d : quadriverticillé (d'après Samson <i>et al.</i> , 2004).	134
Figure 50 :	Exemple de variations phénotypiques de la souche MMS417 cultivée en boîtes de Pétri sur 6 milieux différents. Observations macroscopiques du recto et du verso de chaque culture.....	142
Figure 51 :	Observation macroscopique des souches MMS393 et MMS270 cultivées sur les milieux MES, YES et PDA.....	143
Figure 52 :	Répartition du niveau d'activité cytotoxique d'extraits bruts de souches de <i>Penicillium</i> isolées du milieu marin.	143
Figure 53 :	Profils métaboliques obtenus en CLHP-SM/SM (base peak) en mode positif de la souche MMS266 cultivée sur milieux YES et MES. Les pics provenant de constituants des milieux sont notés respectivement YES et MES.....	147
Figure 54 :	Profils métaboliques obtenus en CLHP-SM/SM (base peak) en mode positif de la souche MMS417 cultivée sur milieux YES et MES.	149
Figure 55 :	Profils métaboliques obtenus en CLHP-SM/SM (base peak) pour la souche MMS163 cultivée sur 6 milieux différents (MES, MEA, YES, CYA, DCA, PDA) et indication des composés connus détectés.....	150
Figure 56 :	Profils métaboliques obtenus en CLHP-UV (276 nm) pour la souche.....	152
Figure 57 :	Structure chimique de la patuline et de la chrysogine.	155
Figure 58 :	Répartition des masses au cours du fractionnement sur SPE,.....	171
Figure 59 :	Cumul des répartitions totales des 5 SPE par fraction, ainsi que de la PnTX-G, et schéma de regroupement des 11 fractions en 5 fractions.	173
Figure 60 :	Evaluation de la cytotoxicité d'un extrait brut de <i>V. rugosum</i> sur cellules KB à différents temps d'exposition : 24, 48 et 72 h.....	174
Figure 61 :	Evaluation de l'activité cytotoxique de la PnTX-G sur cellules KB après 72 h d'incubation.	174
Figure 62 :	Evaluation de l'effet d'une gamme d'extrait brut de <i>V. rugosum</i> sur le délai d'apparition d'une paralysie (partielle ou totale) sur larves.	175
Figure 63 :	Evaluation de la cytotoxicité d'extraits purifiés de <i>V. rugosum</i> sur cellules KB au bout de 72 h d'exposition.	177
Figure 64 :	Evaluation de la cytotoxicité de fractions de <i>V. rugosum</i> obtenues par SPE sur silice sur cellules KB au bout de 72 h d'exposition.....	178
Figure 65 :	Annotation des pics observés sur les chromatogrammes obtenus pour un extrait brut d'une culture axénique (a), et pour la fraction F2 d'une culture non-axénique de <i>V. rugosum</i> (b).179	
Figure 66 :	Structure des principaux métabolites décrits dans le genre <i>Beauveria</i>	184
Figure 67 :	Observation macroscopique du recto (a) et du verso (b) de la souche MMS1411 cultivée sur milieu DCA pendant 9 jours.....	185
Figure 68 :	Schéma de l'organisation des cellules conidiogènes et des spores de <i>Beauveria brongniartii</i> cultivée sur SDAY (dextrose agar yeast extract) (a-c) ou sur un insecte hôte (d-g) (Tzean <i>et al.</i> ,	

	1997). Observation microscopique (x400) des structures de <i>Beauveria brongniartii</i> assurant la multiplication asexuée, coloration au rouge congo (h-j) et au bleu coton (k).	185
Figure 69 :	Evaluation de la cytotoxicité sur cellules KB d'extrait bruts de la souche MMS1411 cultivée sur milieux YES, CYA, MES, MEA, DCA et PDA.	188
Figure 70 :	Evaluation de la cytotoxicité sur cellules KB des 11 fractions de la souche MMS1411 obtenues par fractionnement sur chromatographie flash.	191
Figure 71 :	Analyses CLHP-SM sur spectromètre Q-TOF des fractions C, D et E. Chromatogramme représentant les ions majoritaires détectés (m/z) en fonction du temps de rétention (a) et spectre de masse représentant l'abondance des ions détectés dans la totalité des fractions en fonction de leur m/z (b).	192
Figure 72 :	Spectres de masse obtenus avec le LCQ pour la fraction E et représentant les ions $[M+Na]^+$. L'ion majoritaire de m/z 806,5 correspond à la beauvéricine. Zoom sur la partie du spectre correspondant potentiellement à la série des beauvériolides et des beauvérolides.	195
Figure 73 :	Arbre décisionnel pour une conclusion sur la présence potentielle de composés actif et/ou toxiques ainsi que sur leurs mécanismes d'action possibles dans des extraits purifiés d'hépatopancréas de moules.	203

Liste des Tableaux

Tableau 1 :	Lignées cellulaires utilisées pour la compréhension du mécanisme d'action de l'AO, DTX-1 et DTX-2.	18
Tableau 2 :	Létalité induite par des toxines DSP après injection intra-péritonéale sur souris (DL ₅₀ = dose létale 50 ; DML = dose minimale létale).	19
Tableau 3 :	Lignées cellulaires utilisées pour étudier le caractère cytotoxique et les mécanismes d'action des AZA1, -2 et -3.	22
Tableau 4 :	Cl ₅₀ des PTX sur différentes lignées cellulaires (Jung <i>et al.</i> , 1995; Chae <i>et al.</i> , 2005).	25
Tableau 5 :	Lignées cellulaires utilisées et effets des YTX observés.	27
Tableau 6 :	Origine et occurrences de toxines appartenant au groupe des imines cycliques.	31
Tableau 7 :	Seuils réglementaires, ARfD et LOAEL fixés par l'EFSA (2009 et 2010).	38
Tableau 8 :	Groupes de phycotoxines recherchées par analyse chimique en CL-SM/SM.	46
Tableau 9 :	Modifications du déroulement du test de cytotoxicité sur cellules KB afin de l'adapter à un protocole impliquant différents temps d'incubation.	58
Tableau 10 :	Evaluation de la compatibilité de différents solvants avec le test larve.	66
Tableau 11 :	Principaux effets observés lors de l'injection de composés neuro-actifs purs à des larves de diptères actifs purs à des larves de diptères.	70
Tableau 12 :	Description des souches bactériennes retenues pour le développement des tests antibactériens.	83
Tableau 13 :	Définition du milieu de culture et de la température d'incubation optimaux des différentes souches bactériennes.	87
Tableau 14 :	Evaluation de l'effet du MeOH à 1,5% sur la croissance des différentes souches bactériennes.	94
Tableau 15 :	Détail des conditions de culture des différentes souches de micro-algues sélectionnées pour un criblage.	102
Tableau 16 :	Valeurs de Cl ₅₀ et intervalles de confiance à 95% (IC 95%) obtenues pour les extraits bruts de <i>P. lima</i> et <i>A. spinosum</i> ainsi que pour AO et AZA1 à différents temps d'incubation.	107
Tableau 17 :	Comparaison des Cl ₅₀ obtenues dans cette étude pour les toxines pures AO et AZA1 et comparaison avec des données de la littérature.	109
Tableau 18 :	Valeurs de Cl ₅₀ et intervalles de confiance à 95% (IC 95%) obtenues pour les extraits bruts de <i>P. lima</i> et <i>A. spinosum</i> ainsi que pour AO et AZA1 en dopage des matrices EP1 et EP2.	112
Tableau 19 :	Evaluation des rendements d'extraction d'AZA1 après dopage de matrices de moules EB avec un extrait brut d' <i>A. spinosum</i> à différentes concentrations.	113
Tableau 20 :	Evaluation de l'activité antibactérienne d'extraits bruts de micro-algues toxiques.	124
Tableau 21 :	Evaluation des effets des matrices de moules EB, EP1 et EP2 sur la croissance de différentes souches bactériennes.	125
Tableau 22 :	Récapitulatif des différents types d'extraits détectables par les trois bio-essais utilisés.	127
Tableau 23 :	Définition des termes fondamentaux appliqués à un processus de validation de méthode (d'après Barile, 2008).	129
Tableau 24 :	Avantages et inconvénients de la suite de bio-essais.	130
Tableau 25 :	Classification des sections reliées au genre <i>Penicillium</i> (d'après Houbraken <i>et al.</i> , 2011).	134
Tableau 26 :	Détails de l'identification et de l'origine des souches étudiées.	136
Tableau 27 :	Observation morphologique macroscopique (milieu DCA) des 24 souches de <i>Penicillium</i> étudiées.	137
Tableau 28 :	Détail de la composition des milieux de culture classiques utilisés pour la croissance des souches fongiques.	139
Tableau 29 :	Cytotoxicité d'extraits de souches de <i>Penicillium</i> isolées de coquillages et cultivées sur 6 milieux différents (valeurs de Cl ₅₀ en µg.mL ⁻¹).	145
Tableau 30 :	Annotation des pics de la Figure 53, pour la souche MMS266 cultivée sur milieu MES.	147
Tableau 31 :	Annotation des pics de la Figure 54, pour la souche MMS417 cultivée sur milieu YES et MES.	149
Tableau 32 :	Annotation des pics observés dans l'extrait MMS163.	151
Tableau 33 :	Activité sur larves de diptères d'extraits de souches de <i>Penicillium</i> isolées de coquillages et cultivées sur 6 milieux différents.	156
Tableau 34 :	Screening de souches de <i>Penicillium</i> isolées de bivalves pour la recherche d'une activité antibactérienne.	159
Tableau 35 :	Bilan du screening sur les trois tests de souches de <i>Penicillium</i> isolés de mollusques bivalves	161
Tableau 36 :	Phases mobiles et volumes éluants utilisés pour le fractionnement sur cartouches SPE d'un extrait purifié de <i>V. rugosum</i>	167
Tableau 37 :	Comparaison des quantités d'extrait brut et de PnTX-G obtenues par extraction au MeOH ou résine HP-20.	170
Tableau 38 :	Répartition des masses et des quantités de PnTX-G après purification par partage liquide-liquide et fractionnement sur SPE.	172
Tableau 39 :	Détail des masses, du contenu en PnTX-G et des Cl ₅₀ de chaque fraction.	178

Tableau 40 : Annotation possible des pics observés sur le chromatogramme (Figure 65) d'un extrait brut d'une culture axénique de <i>V. rugosum</i>	180
Tableau 41 : Paramètres du système éluant pour le fractionnement de l'extrait soluble de la souche MMS1411 en chromatographie flash.....	186
Tableau 42 : Rendements de la souche MMS1411 cultivée sur les 6 milieux.....	187
Tableau 43 : Evaluation de l'activité antibactérienne de la souche MMS1411 cultivée sur 6 milieux différents	189
Tableau 44 : Répartition des masses de chaque fraction obtenue par chromatographie flash.....	190
Tableau 45 : Bilan des ions $[M+Na]^+$ retrouvés au cours du travail de déréplication et comparaison avec des données de la littérature.....	193
Tableau 46 : Bilan des résultats obtenus avec les différents extraits bruts et toxines pures évalués sur les trois bio-essais, et comparaison avec les données du tes de toxicité aigüe sur souris.....	202

Liste des Annexes

Annexe 1 :	Protocole du test de toxicité aigüe sur souris (<i>in</i> EFSA, 2008b).....	297
Annexe 2 :	Protocoles des tests de cytotoxicité sur cellules KB.....	298
Annexe 3 :	Tableau détaillé des symptômes induit chez les larves aux différentes concentrations de produits purs testés.....	300
Annexe 4 :	Protocole du bio-essai sur larves de diptères.....	303
Annexe 5 :	Evaluation de l'effet de différents solvants sur la croissance de la souche <i>V. crassostreae</i>	304
Annexe 6 :	Evaluation de l'effet d'agents de solubilisation sur la croissance de bactéries.....	305
Annexe 7 :	Evaluation de l'effet d'une gamme d'érythromycine sur la croissance de bactéries.....	306
Annexe 8 :	Evaluation de l'effet d'une gamme de carbénicilline sur la croissance de bactéries.....	307
Annexe 9 :	Protocole final des tests antibactériens.....	308
Annexe 10 :	Protocole pour une analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux.....	309
Annexe 11 :	Screening de souches de micro-algues marines pour la recherche d'activités antibactériennes.....	310
Annexe 12 :	Evaluation sur bactéries des effets de matrice de moules non contaminées et partiellement purifiées.....	314
Annexe 13 :	Screening de souches de micro-mycètes marins pour la recherche d'activités antibactériennes.....	317
Annexe 14 :	Screening de la souche MMS1411 (<i>Beauveria bassiana</i>) pour la recherche d'activités antibactériennes.....	342

Liste des Abréviations

ACh : Acétylcholine	MTT : bromure de 3-(4,5-diméthyl-2-thiazolyl)-2,5-diphényl-2H-tétrazolium
ACP : Analyse en composante principale	NCI : <i>National cancer institute</i>
AD : Acide domoïque	NMDA : N-méthyl-D-aspartate
AMP : Adénosine monophosphate	NRCC : <i>National research council of Canada</i>
AMPA : α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazoleproionate	NSP : Neurologic shellfish poisoning
ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail	OAV : Office alimentaire et vétérinaire
AO : Acide okadaïque	PBS : Phosphate buffered saline
AP : Acide pénicillique	PbTx : Brévétotoxine
API : Aldéhyde poly-insaturé	P.c. : Poids corporel
ARfD : <i>Acute reference dose</i>	PDA : Potato dextrose agar
ASP : <i>Amnesic shellfish poisoning</i>	PITX : Palytoxine
AZA : AZApiracide	PnTX : Pinnatoxine
AZP : <i>Azadinium shellfish poisoning</i>	PP1 : Protéine phosphatase 1
β -CD : β -cyclodextrine	PP2A : Protéine phosphatase 2A
BHI : Brain heart infusion	PSP : <i>Paralytic shellfish poisoning</i>
BME : Basal medium eagle	PTX : Pecténotoxine
BTX : Brévétotoxine	PTX2sa : Pecténotoxine-2-seco-acide
Cl ₅₀ : Concentration inhibitrice 50	REPHY : Réseau de surveillance du phytoplancton et des phycotoxines
CIP : Collection institut pasteur	RmACh : Récepteur muscarinique à acétylcholine
CLHP : Chromatographie liquide haute performance	RnACh : Récepteur nicotinique à acétylcholine
CL-SM/SM : Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse	SNC : Système nerveux central
CLSI : Clinical and laboratory standards institute	SPE : <i>Solid phase extraction</i>
CMA : Concentration minimale active	STX : Saxitoxine
CMI : Concentration minimale inhibitrice	SVF : Sérum de veau foetal
CYA : <i>Czapek yeast agar</i>	T80 : Tween 80
DCA : <i>Dextrose Casein Agar</i>	TS : Test de toxicité aigüe sur souris
DCM : Dichlorométhane	UFC : Unité formant colonie
DG Sanco : Direction générale de la santé et des consommateurs	XTT : 2,3-bis(2-méthoxy-4-nitro-5-sulfophényl)-5-[(phénylamino)carbonyl]-2H-tétrazolium
DGAI : Direction générale de l'alimentation	YES : <i>Yeast extract sucrose</i>
DL ₅₀ : Dose létale 50	YTX : Yessotoxine
DML : Dose minimale létale	
DMSO : Diméthyl sulfoxyde	
DSP : <i>Diarrhetic shellfish poisoning</i>	
DTX : Dinophysistoxine	
DUM : <i>Dorsal unpaired median</i>	
EB : Extrait brut	
EFSA : <i>European food safety authority</i>	
ELISA : <i>Enzyme-linked immuno-sorbent assay</i>	
EP : Extrait purifié	
EPHT : Eau physiologique tamponnée	
GABA : Acide γ -amino-butérique	
HP : Hépatopancréas	
i.p. : intra-péritonéal	
ITS : Internal transcribed spacer	
LOAEL : <i>Lowest observed adverse effect level</i>	
LOD : <i>Limit of detection</i>	
MDM : Méthanol + 1,4 dioxane + acétonitrile	
MEA : <i>Malt extract agar</i>	
MeOHaq. : Méthanol aqueux	
MES : <i>Mussel extract sucrose</i>	
MH : Mueller-Hinton	

Liste des travaux réalisés au cours de ce travail

- **Publications dans des revues à comité de lecture**

Cytotoxicity and mycotoxin production of shellfish-derived *Penicillium* spp., a risk for shellfish consumers

Geiger M., Guitton Y., Vansteelandt M., Kerzaon I., Blanchet E., Robiou du Pont T., Frisvad J.C., Hess P., Pouchus Y.F., Grovel O.

Letters in Applied Microbiology (sous presse)

Cytotoxicity, fractionation and dereplication of extracts of the dinoflagellate *Vulcanodinium rugosum*, a producer of Pinnatoxin G

Geiger M., Desanglois G., Hogeveen K., Fessard V., Leprêtre T., Mondeguer F., Guitton Y., Hervé, F., Séchet V., Grovel O., Pouchus Y.F., Hess P.

Marine Drugs (accepté avec révisions mineures)

- **Chapitre d'ouvrage scientifique**

Development of a liquid-medium assay for screening antimicrobial natural products against marine bacteria

Geiger M., Dupont J., Grovel O., Pouchus Y.F., Hess P.

In: Science and Technology Against Microbial Pathogens: Research, Development and Evaluation, Proceedings of the International Conference on Antimicrobial Research (ICAR2010), A. Mendes-Vilas Ed., World Scientific Publishing Co.Pte Ltd., pp 219-224.

- **Communications orales dans des congrès internationaux**

Development of a bioassay suite for the detection of bioactive compounds from microalgae and fungi in shellfish

Geiger M., Pouchus Y.F., Hess, P.

7th Conference of the World Mycotoxin Forum® and XIIIth IUPAC International Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, Rotterdam (Pays-Bas), 5-9 novembre 2012

High resolution mass spectrometric techniques coupled to a cytotoxicity assay for the characterisation of the metabolome of harmful algae, with a focus on *Vulcanodinium rugosum*, an emerging producer of Pinnatoxins

Hess P., Geiger M., Wüst B., Mondeguer F., Sibat M., Glauner T., LeRoy E., Leprêtre T., Hervé F., Vanel F., Grovel O., Pouchus Y.F. and Séchet V. (2012)

15th International Conference on Harmful Algae (ICHA), Changwon (Korea), 29 octobre – 2 novembre 2012

Natural and semisynthetic fumagillin derivatives as anti-osteosarcoma agents

Blanchet E., Vansteelandt M., Geiger M., Le Bot R., Egorov M., Petit K.E., Pouchus Y.F., Grovel O.
Natural Anticancer Drugs 2012, Olomouc (République Tchèque.), 30 juin - 4 juillet 2012

- **Communications orales dans des congrès nationaux**

Towards the development of metabolomics for marine micro-organisms compounds discovery

Guitton Y., Blanchet E., Vansteelandt M., Roullier C., Geiger M., Pouchus Y.F., Grovel O.
7e Journées Scientifiques du Réseau Français de Métabolomique et Fluxomique, Amiens (France), 10-12 juin 2013

Sesquiterpènes des *Penicillium* marins: la marche sur le métabolome

Blanchet E., Vansteelandt M., Geiger M., Le Bot R., Egorov M., Petit K.E., Pouchus Y.F., Grovel O.
GDR BioChiMar, Gif-sur-Yvette (France), 10-12 décembre 2012

Bio-essais pour le screening de composés fongiques et micro-algaux issus du milieu marin environnant les mollusques bivalves

Geiger M., Grovel O., Séchet V., Pouchus Y.F., Hess P.
GDR BioChiMar, Paris (France), 27-28 juin 2011

- **Communications affichées dans des congrès internationaux**

Development of a liquid medium assay for screening antimicrobial natural products against marine bacteria

Geiger M., Dupont J., Grovel O., Pouchus Y.F., Hess P.
1st International Conference on Antimicrobial Research (ICAR2010), Valladolid, (Espagne), 3-5 novembre 2010

- **Communications affichées dans des congrès nationaux**

MeHaloCoA project (MarinE HALOgenated COmpounds Analysis)

Guitton Y., Blanchet E., Vansteelandt M., Roullier C., Geiger M., Pouchus Y.F., Grovel O. 7e Journées Scientifiques du Réseau Français de Métabolomique et Fluxomique, Amiens (France), 10-12 juin 2013

Usefulness and limitations of a cytotoxicity assay using KB cells to detect lipophilic toxins in algal and mussel (*Mytilus edulis*) matrices

Geiger M., Brochard S., Grovel O., Pouchus Y.F., Séchet V., Hess P.
20th Meeting de la Société Française pour l'Etude des Toxines, Paris (France), 10-11 décembre 2012

In vitro* toxicity of Pinnatoxin G, crude and fractionated extracts of *Vulcanodinium rugosum

Geiger M., Desanglois G., Hogeveen K., Fessard V., Abadie E., Leprêtre T., Mondeguer F., Hervé F., Séchet V., Aráoz R., Molgó J., Grovel O., Pouchus Y.F., Hess P.
20th Meeting de la Société Française pour l'Etude des Toxines, Paris (France), 10-11 décembre 2012

LC-HRMS/MS investigation of a new marine-derived *Penicillium* species for the rapid detection of original bioactive compounds

Blanchet E., Vansteelandt M., Geiger M., Le Bot R., Pouchus Y.F., Grovel O. Journées VENAM, Oniris Nantes (France), 25-26 octobre 2012

Introduction et objectifs de l'étude

L'embranchement des Mollusques est un des plus larges, des plus divers et des plus importants groupes du règne animal. Près de 50 000 espèces ont été décrites à ce jour, dont près de 30 000 sont retrouvées en milieu marin. Cet embranchement est divisé en 6 classes, dont la classe des Bivalves ou Lamellibranches, qui regroupe des animaux dont la principale caractéristique morphologique est une coquille divisée en deux parties distinctes. Bien que cette classe comprenne relativement peu d'espèces, environ 7500, elle constitue un groupe important car beaucoup d'entre elles présentent un intérêt nutritionnel, et sont consommées en grande quantité par l'Homme (Gosling, 2003), telles que : les huîtres (*Crassostrea gigas*, *Crassostrea virginica*, *Ostrea edulis*, etc.), les moules (*Mytilus edulis*, *Mytilus galloprovincialis*, etc.), les coques (*Cerastoderma edule*), les palourdes (*Ruditapes ducussatus*, *Ruditapes philippinarum*) ou encore les coquilles Saint-Jacques (*Pecten maximus*, *Pactinopecten yessoensis*, etc.). La conchyliculture est un secteur très actif en France, et d'après le Comité National de Conchyliculture, la production française se place au 2^{ème} rang européen derrière l'Espagne, avec une production moyenne de 200 000 tonnes de coquillages par an pour un chiffre d'affaires de l'ordre de 774 millions d'euros. L'ostréiculture produit 130 000 tonnes d'huîtres en moyenne, volume qui représente un chiffre d'affaire estimé à 630 millions d'euros, et la mytiliculture, avec une production de 65 000 tonnes de moules environ, engendre un chiffre d'affaire autour de 120 millions d'euros.

Les mollusques bivalves sont des suspensivores : ils se nourrissent par filtration de l'eau de mer en utilisant leurs branchies, et retiennent grâce à leurs palpes labiaux, des micro-organismes phytoplanctoniques, mais également des bactéries, du microzooplancton, des particules issues de la dégradation de macro-algues, ou encore des sucres et des acides aminés dissous (Le Gall *et al.*, 1997; Levinton *et al.*, 2002; Gosling, 2003; Espinosa *et al.*, 2010).

Le phytoplancton (du grec *phyto* : plante et *plagktos* : errant) et le microphytobenthos (du grec *benthos* : profondeur), ont une place capitale dans les écosystèmes marins car de par leur productivité primaire, ils jouent un rôle trophique majeur et sont à la base de la grande majorité des chaînes alimentaires (Daranas *et al.*, 2001). D'une façon générale, en milieu marin le terme de micro-algue comprend à la fois le phytoplancton et le microphytobenthos, qui désignent respectivement des organismes eucaryotes photosynthétiques se déplaçant dans la colonne d'eau ou nécessitant un support pour se développer, mais également les cyanobactéries marines qui sont des organismes procaryotes photosynthétiques. A ce jour, près de 5000 espèces appartenant au phytoplancton marin sont connues, dont environ 300 peuvent présenter une véritable explosion de leur taux de prolifération, phénomène appelé efflorescence algale ou *bloom*. Ces efflorescences peuvent conduire à une coloration de la mer en rouge, brun ou vert, et à la formation d'écumes importantes à la surface de la mer ou sur les plages. Ces phénomènes peuvent entraîner une diminution de la concentration en oxygène et une dégradation de la qualité de l'eau, affectant ainsi des populations de poissons ou de mammifères marins. Parmi les espèces impliquées dans des efflorescences, environ 40 sont connues pour produire des toxines. Dans ce cas, les toxines peuvent s'accumuler le long des chaînes trophiques, et affecter la santé d'oiseaux, de poissons, d'invertébrés, de mammifères marins, ainsi que la santé humaine, Figure 1 (Sournia *et al.*, 1991). Ce type d'efflorescence est appelé *Harmful Algae Bloom* (HAB).

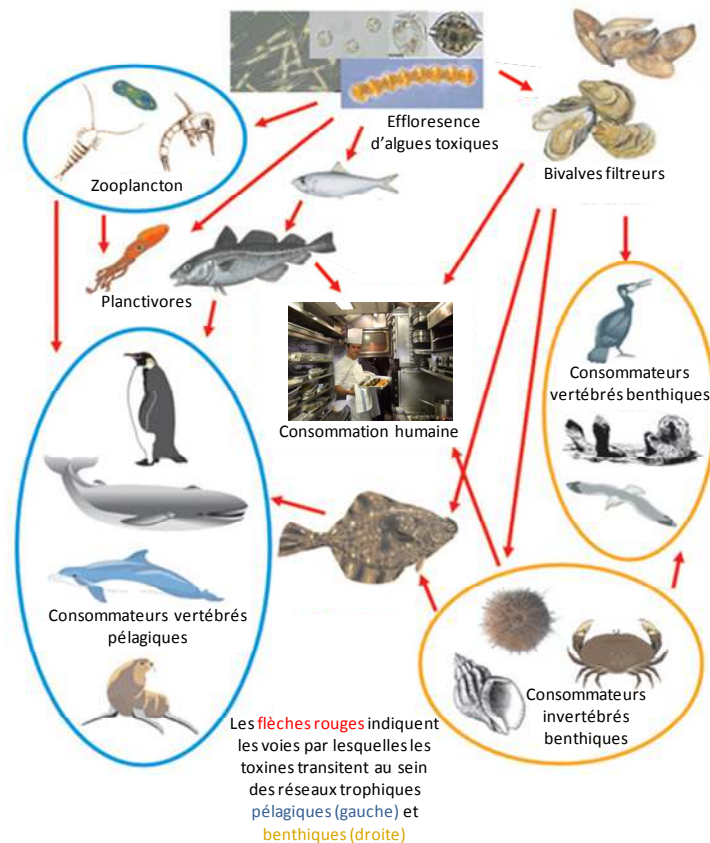


Figure 1 : Chaîne alimentaire montrant le risque d'accumulation des toxines produites par des micro-algues toxiques au sein des différents organismes le long de différentes chaînes alimentaires (Wikfors, 2013).

Il semble que la première trace écrite évoquant des efflorescences algales toxiques remonte à 1000 ans av. J.C. et apparaisse dans la Bible : « ... toutes les eaux qui étaient dans le fleuve furent changées en sang. Et le poisson qui était dans le fleuve mourut ; et le fleuve devint puant, et les Égyptiens ne pouvaient boire de l'eau du fleuve... » (Exode 7 : 20-1). L'origine de l'apparition de ces efflorescences n'est pas encore élucidée à ce jour mais semble sous l'influence de conditions climatiques et hydrographiques particulières (Cembella, 2003; Moore *et al.*, 2008; Granéli *et al.*, 2011). Il est généralement accepté que les efflorescences d'algues toxiques ont augmenté en fréquence, en intensité et en durée dans tous les environnements aquatiques à une échelle mondiale, et ceci pourrait avoir un lien avec des changements climatiques. Cependant, très peu de travaux ont été réalisés pour essayer de caractériser ce lien, principalement à cause de la difficulté à différencier l'influence de changements climatiques - d'origine naturelle ou anthropique - de l'influence des activités humaines induisant une eutrophisation des eaux et une introduction d'eaux de ballasts, connues pour contribuer à l'apparition d'efflorescences algales (Sellner *et al.*, 2003). Les efflorescences d'algues toxiques ont des répercussions négatives sur les secteurs de la conchyliculture, des loisirs et du tourisme. En 2005, les pertes liées à ces efflorescences ont été

estimées en Europe à près de 920 millions d'euros (Hoagland et Scatasta, 2006).

Le risque pour la santé humaine peut être fortement augmenté par ces phénomènes d'efflorescences d'algues toxiques, car les mollusques bivalves, en consommant ces micro-algues toxiques, peuvent accumuler de grandes quantités de toxines dans leur glande digestive, et donc devenir impropres à la consommation humaine. Ainsi, les toxines de micro-algues sont responsables de près de 60 000 intoxications humaines par an (Dolah et Ramsdell, 2001). Ces intoxications induisent divers types de symptômes plus ou moins sévères en fonction des toxines impliquées, pouvant aller de simples troubles digestifs à une issue fatale. Les toxines de micro-algues peuvent être classées en fonction de la symptomatologie qu'elles induisent chez l'homme, ce qui permet de distinguer des intoxications par des toxines diarrhéiques, paralysantes, amnésiantes, neurotoxiques, mais également par des azaspiracides ou des ciguatoxines, ces dernières touchant surtout des consommateurs de poissons. Une autre classification des toxines de micro-algues se base sur leurs propriétés chimiques, et permet de distinguer les toxines hydrophiles de toxines lipophiles.

Ainsi, pour assurer la salubrité des mollusques bivalves et la santé de leurs consommateurs, un certain nombre de toxines sont réglementées : leur concentration dans les bivalves est surveillée, et le dépassement de valeurs-seuil entraîne la fermeture des zones de conchyliculture ou de pêche concernées par ces contaminations. Jusqu'en 2009, la surveillance des toxines lipophiles était réalisée par utilisation d'un bio-essai, le test de toxicité aigüe sur souris. Le principe de ce test consistait à injecter un extrait de chair de bivalves à trois souris par voie intra-péritonéale. Si la mort d'au moins deux souris sur trois intervenait dans les 24 h, les coquillages étaient considérés comme impropres à la consommation. Cependant, ce test n'avait jamais été validé par la communauté internationale, et présentait de nombreux inconvénients, notamment éthiques et méthodologiques. Depuis plusieurs années des études étaient donc menées pour développer des méthodes alternatives pour le remplacer. Au 1^{er} janvier 2010, le test de toxicité aigüe sur souris a donc été abandonné, et remplacé par des analyses physico-chimiques des extraits de bivalves, avec utilisation de techniques de chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse. Pour les toxines lipophiles connues, cette technique s'avère beaucoup plus sensible que le bio-essai sur souris, et permet surtout une quantification des toxines présentes.

Par ailleurs, des phénomènes de toxicités non expliquées sur souris, appelées toxicités atypiques, ont également contribué à entretenir la polémique sur l'utilisation de ce test. En effet, dans certains cas une mortalité des souris était observée après l'injection d'extraits de coquillages, mais aucune toxine connue ou polluant chimique connu n'avait pu être mis en évidence à des concentrations suffisamment importantes pour induire la mort des souris. Deux hypothèses majeures ont donc été avancées pour tenter d'expliquer ces phénomènes de toxicités atypiques. D'une part, le domaine des toxines marines est très dynamique, et de nouvelles toxines ou de nouveaux analogues structuraux, regroupés sous le terme de toxines émergentes, sont régulièrement découverts, et pourraient être responsables de cette toxicité sur souris. Ainsi, le test de toxicité aigüe sur souris est toujours utilisé dans un plan de vigilance, afin de surveiller la contamination potentielle de mollusques bivalves par ce type de toxines. Cependant, pour les mêmes raisons que précédemment, l'utilisation de ce test ne semble pas viable. D'autre part, les toxicités atypiques pourraient être dues à la présence de

contaminants de type fongique dans les mollusques bivalves. Les zones conchylicoles ont en effet été démontrées comme étant riches en diverses espèces de micromycètes, notamment du genre *Penicillium* (Sallenave-Namont *et al.*, 2000; Matallah-Boutiba *et al.*, 2012), et de plus certaines toxines de micromycètes se sont révélées capables de potentialiser l'effet de toxines de micro-algues (Ruiz *et al.*, 2010).

Dans ce contexte, ce travail de thèse a présenté deux grands objectifs :

- évaluer la capacité d'une suite de bio-essais à détecter des composés lipophiles bio-actifs produits par des micro-organismes marins - micro-algues et micromycètes – et contaminant potentiellement les mollusques bivalves, dans l'optique à long terme de remplacer le bio-essai sur souris,
- appliquer cette suite d'essais à l'évaluation du potentiel toxique de micro-algues et micromycètes isolés de bivalves ou présents dans leur environnement marin.

Le **chapitre 1** développe un état de l'art concernant dans un premier temps les risques associés à la consommation de mollusques bivalves, en décrivant les différentes phycotoxines marines, leurs activités *in vivo* et *in vitro* et leur symptomatologie associée, ainsi que les phycotoxines émergentes et les phénomènes de toxicité atypique. Dans un second temps, ce chapitre aborde le thème de la protection des consommateurs de mollusques bivalves, en faisant un point sur la réglementation des concentrations en toxines, ainsi que sur les méthodes de détection mises en place.

Le **chapitre 2**, divisé en trois parties, présente d'un point de vue méthodologique les trois tests biologiques utilisés. Pour le test de cytotoxicité sur cellules KB et le test d'activité sur larves de diptères, les connaissances méthodologiques préalables puis les adaptations de protocoles réalisées sont détaillées. Les tests d'activité antibactérienne sur bactéries marines ont été intégralement mis en place et développés dans le cadre de cette étude, et la troisième partie de ce chapitre présente les mises au point de protocoles et l'interprétation de ces tests. Pour chacun de ces tests, un protocole final a été établi et figure en annexe.

Le **chapitre 3** présente une première application de la suite de bio-essais, à savoir la détection et l'étude de phycotoxines lipophiles connues. Les tests de cytotoxicité sur cellules KB et le test d'activité sur larves de diptères ont tout d'abord été évalués pour leur capacité à détecter une toxicité dans différents types de matrices. Ce travail a été effectué à différentes échelles : échelle d'une toxine pure, échelle d'un extrait de micro-organisme toxique, et échelle de matrices de mollusque partiellement purifiées et dopées avec des toxines pures ou des extraits de micro-algues toxiques. Les résultats sont étudiés au regard des statuts réglementaires des différentes toxines. Les tests antibactériens ont été appliqués plus spécifiquement à l'étude d'un potentiel rôle écologique de la production de toxines par des micro-algues, à savoir une compétition envers des bactéries marines.

Le **chapitre 4** présente une deuxième application de la suite d'essais, utilisée ici pour l'étude de *Penicillium* isolés de mollusques bivalves. Ainsi, 10 souches de *Penicillium* isolées de bivalves ont été mises en culture sur 6 milieux différents, dont un nouveau milieu créé pour cette étude et basé sur un extrait de chair de moules. Les extraits ont présenté différents niveaux d'activité en fonction du milieu de culture et du test biologique utilisé. Les extraits ayant présenté des activités intéressantes sur le test de cytotoxicité ont fait l'objet d'une étude chimique plus approfondie grâce à leur dérégulation.

Le **chapitre 5** présente la troisième et dernière application de cette suite de bio-essais. En effet, celle-ci a pu être utilisée pour étudier plus en détail le potentiel toxique d'une micro-algue, le dinoflagellé *Vulcanodinium rugosum*, producteur de la pinnatoxine G, une toxine émergente, et d'un micromycète marin, l'ascomycète *Beauveria brongniartii*, producteur potentiel d'une autre toxine émergente, la beauvéricine. Les extraits bruts de ces organismes ont été fractionnés, et les fractions les plus actives ont été dérégulées afin d'essayer d'identifier les composés responsables des activités observées.

Chapitre 1 – *État de l'art* : Salubrité des mollusques
bivalves

1. Les risques associés à la consommation de coquillages

1.1. Les phycotoxines réglementées

Les phycotoxines peuvent être classées de différentes façons. Dans un premier temps, elles ont été classées selon la symptomatologie qu'elles induisaient chez l'homme après consommation de coquillages contaminés. Ainsi étaient considérées les toxines diarrhéiques, les neurotoxines, les toxines amnésiantes, les toxines paralysantes. Cependant, en 2004 le workshop commun de la FAO/IOC/WHO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations / Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO / World Health Organization*) a jugé plus pertinent de classer les toxines en fonction de leurs caractéristiques chimiques et de leur polarité (FAO/IOC/WHO, 2005). A ce jour, les deux classifications sont retrouvées, et la seconde sera retenue dans cette étude. Cette partie recense donc les toxines hydrophiles avec le groupe de l'acide domoïque et le groupe de la saxitoxine d'une part, et les toxines lipophiles avec le groupe de la brevétoxine, le groupe de l'acide okadaïque et des dinophysistoxines, le groupe des azaspiracides, le groupe de la pecténotoxine et le groupe de la yessotoxine.

1.1.1. Les toxines hydrophiles

1.1.1.1. Le groupe de l'acide domoïque

L'acide domoïque (AD) et ses dérivés sont les toxines responsables du syndrome d'intoxication amnésiante par les fruits de mer (*Amnesic Shellfish Poisoning, ASP*). Ces toxines sont produites principalement par des algues rouges du genre *Chondria* et des diatomées du genre *Pseudonitzschia*. Elles ont été détectées au Canada, aux Etats-Unis et en Europe. Les syndromes induits impliquent des effets gastro-intestinaux (nausées, vomissements, diarrhées ou crampes abdominales) apparaissant environ 24 h après consommation de coquillages contaminés et/ou des symptômes neurologiques (confusion, pertes de mémoire, épilepsie, coma) apparaissant au cours des 48 h. Le premier épisode confirmé d'ASP a eu lieu au Canada en 1987 et était lié à la contamination de moules suite à une efflorescence de *Pseudonitzschia*. Des isomères de l'AD ont également été détectés aux Etats-Unis et en Europe (EFSA, 2009a).

L'AD est un acide aminé cyclique de 311 Da. Ses trois fonctions acide carboxylique lui confèrent sa solubilité dans l'eau et sa polarité relativement importante (Quilliam, 2001), Figure 2.

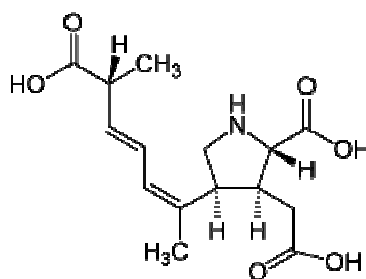


Figure 2 : Structure chimique de l'acide domoïque (Quilliam, 2001).

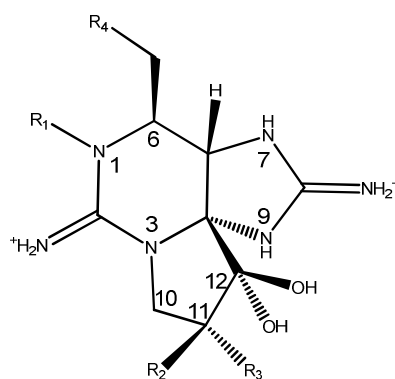
L'AD est un agoniste des récepteurs au glutamate de type AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionate) et des récepteurs au kaïnate. Son action sur ces récepteurs induit une perturbation de la neurotransmission (Ozawa *et al.*, 1998).

La dose minimale avec effet nocif observé (LOAEL, *Lowest Observed Adverse Effect Level*) pour des symptômes légers est de $0,9 \text{ mg.kg}^{-1}$ poids corporel (p.c.). Bien que la toxicité orale aiguë ne soit pas bien caractérisée chez l'homme, la dose de référence aiguë (ARfD, *Acute Reference Dose*) a été définie sur la base de la LOAEL. Ainsi en appliquant un facteur de sureté de 30, l'ARfD a été établie à $30 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$ p.c., et l'AD se trouve réglementé à hauteur de 20 mg.kg^{-1} chair totale pour des mesures réalisées par chromatographie liquide à haute performance avec détection en ultraviolet (CLHP-UV). De plus, une méthode immuno-enzymatique de type ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) a été validée pour la détection de l'AD. L'AD est stable à la chaleur et la cuisson ne détruit pas la toxine (EFSA, 2009a).

1.1.1.2. Le groupe de la saxitoxine

La saxitoxine (STX) et ses dérivés sont les toxines responsables du syndrome d'intoxication paralysante par les fruits de mer (*Paralytic Shellfish Poisoning*, PSP). Elles sont principalement produites par des dinoflagellés appartenant au genre *Alexandrium*, mais également *Pyrodinium* ou *Gymnodinium*, et se répartissent de façon globale dans le monde (FAO/IOC/WHO, 2005). Elles ont été observées chez diverses espèces de mollusques bivalves telles que les huîtres, moules, coquilles Saint-Jacques et palourdes. Les symptômes d'une intoxication humaine par des PSP varient d'une légère sensation de picotement ou d'engourdissement de la zone labiale à une paralysie respiratoire fatale. Cette issue fatale intervient dans les 2 à 12 h suivant la consommation de coquillages contaminés par des toxines du groupe STX (EFSA, 2009c). La STX est connue depuis de nombreuses années pour interférer avec le fonctionnement de canaux sodiques voltage-dépendants, en bloquant la conductance des ions sodium des cellules excitables. La dépolarisation des membranes et donc la transmission d'un potentiel d'action ne peuvent plus avoir lieu, ce qui induit les symptômes observés de paralysie (Hille, 1968).

La STX et ses dérivés appartiennent au groupe des tétrahydropurines (Figure 3). A ce jour, près de 30 analogues des STX ont été identifiés (EFSA, 2009c).



R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Toxine
H	H	H		STX
H	H	OSO ₃ ⁻		GTX2
H	OSO ₃ ⁻	H		GTX3
OH	H	H		NEO
OH	H	OSO ₃ ⁻		GTX1
OH	OSO ₃ ⁻	H		GTX4
H	H	H		GTX5 (B1)
H	H	OSO ₃ ⁻		C1
H	OSO ₃ ⁻	H		C2
OH	H	H		GTX6 (B2)
OH	H	OSO ₃ ⁻		C3
OH	OSO ₃ ⁻	H		C4
H	H	H		dcSTX
H	H	OSO ₃ ⁻		dcGTX2
H	OSO ₃ ⁻	H		dcGTX3
OH	H	H		dcNEO
OH	H	OSO ₃ ⁻		dcGTX1
OH	OSO ₃ ⁻	H		dcGTX4

Figure 3 : Structure chimique de la saxitoxine et de ses dérivés (STX = saxitoxine, NEO = neosaxitoxine, GTX = gonyautoxine, dc = decarbamoyl), d'après EFSA, 2009c.

La LOAEL du groupe des STX est d'environ 1,5 µg d'équivalents STX.kg⁻¹ p.c. et en appliquant un facteur de sureté de 3, l'ARfD a été établie à 0,5 µg d'équivalents STX.kg⁻¹ p.c. Ainsi les STX sont réglementées à hauteur de 800 µg PSP.kg⁻¹ de chair totale pour une quantification par CLHP. Les STX sont thermorésistantes dans les coquillages aux températures habituelles de cuisson (EFSA, 2009c).

1.1.2. Les toxines lipophiles

1.1.2.1. Le groupe de la brevétoxine

Les brevétoxines (BTX) sont principalement produites par le dinoflagellé *Karenia brevis* (Figure 4). Initialement, cet organisme portait le nom de *Ptychodiscus brevis*, d'où l'abréviation souvent retrouvée de « PbTx » pour les brevétoxines. Depuis la découverte de sa dangerosité pour l'homme en 1948,

Karenia brevis a été une des espèces toxiques les plus étudiées, avec des recherches sur sa toxicité, sa physiologie et sa capacité à former des blooms (Brand *et al.*, 2012). D'autres espèces sont également capables de produire des toxines du groupe des BTX, telles que *Chattonella antiqua*, *C. marina*, *Fibrocapsa japonica* ou encore *Heterosigma akashiwo* (FAO/IOC/WHO, 2005).

Les BTX sont des polyéthers cycliques hydrophobes. Deux types de structure de base sont retrouvés : le groupe des brevétoxines-A, qui présentent 10 cycles conjugués, et les brevétoxines-B qui en présentent 11 (Baden, 1989), Figure 5.

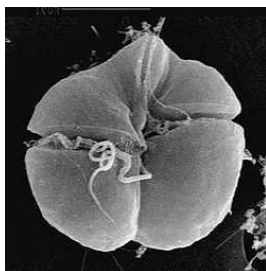
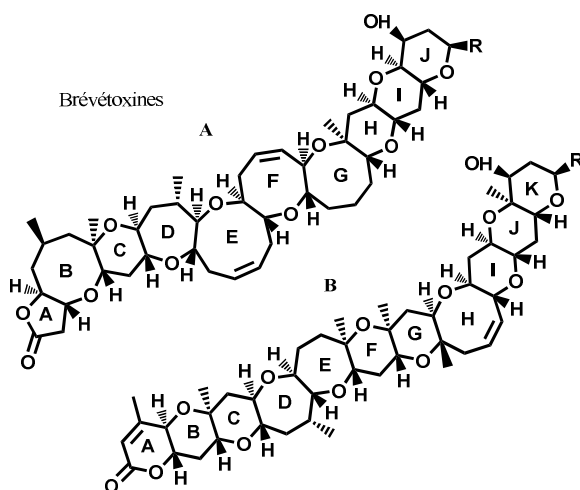


Figure 4 : Photographie prise au microscope électronique à balayage de *Karenia brevis*.



Brevétoxines-A

- Brevétoxine -1, R = $-\text{CH}_2\text{C}(\text{=CH}_2)\text{CHO}$
 Brevétoxine -7, R = $-\text{CH}_2\text{C}(\text{=CH}_2)\text{CH}_2\text{OH}$
 Brevétoxine -10, R = $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{OH}$

Brevétoxines-B

- Brevétoxine -2, R = $-\text{CH}_2\text{C}(\text{=CH}_2)\text{CHO}$
 Brevétoxine -3, R = $-\text{CH}_2\text{C}(\text{=CH}_2)\text{CH}_2\text{OH}$
 Brevétoxine -8, R = $-\text{CH}_2\text{COCH}_2\text{Cl}$
 Brevétoxine -9, R = $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{OH}$

Figure 5 : Structure chimique des brevétoxines et de leurs dérivés (Baden *et al.*, 2005).

Les BTX sont responsables du syndrome d'intoxication neurologique par les fruits de mer (*Neurologic Shellfish Poisoning*, NSP). Elles agissent en provoquant l'ouverture des canaux sodiques voltage-dépendants, induisant un influx de sodium dans la cellule et un blocage complet de l'excitabilité des neurones (Al-Sabi *et al.*, 2006). Les effets observés sont des diarrhées, des vomissements, des crampes, une réduction rapide du rythme respiratoire et des perturbations du fonctionnement cardiaque pouvant conduire à un coma. Les symptômes apparaissent dans les 30 min à 3 h après consommation de coquillages contaminés, et peuvent durer quelques jours. Ni persistance des symptômes ni mortalité n'ont été rapportées (EFSA, 2010b). En plus d'une consommation de coquillages contaminés par les BTX, des intoxications peuvent se produire suite à une inhalation d'aérosols produits par les embruns. Cette inhalation peut entraîner des problèmes respiratoires ainsi qu'une irritation des yeux et de la membrane nasale (Pierce *et al.*, 2005). Jusqu'à présent, les intoxications NSP se sont limitées aux Etats-Unis (Floride), au Golfe du Mexique, à la Nouvelle-Zélande ainsi qu'à l'Afrique du Sud (EFSA, 2010b). Malgré l'observation de quelques blooms d'espèces de *Karenia* en Europe (Brand *et al.*, 2012), aucune intoxication n'y a été rapportée à ce jour à notre connaissance. C'est pourquoi ce groupe de toxines ne sera pas plus étudié.

1.1.2.2. Le groupe de l'acide okadaïque et des dinophysistoxines

➤ Organismes producteurs de toxines et occurrences

Les toxines du groupe de l'acide okadaïque (AO) sont responsables du syndrome d'intoxication diarrhéique par les fruits de mer (*Diarrhetic Shellfish Poisoning*, DSP). L'AO a été isolé pour la première fois dans des éponges hawaïennes *Halichondria okadai* (Tachibana *et al.*, 1981). Ces organismes réellement producteurs de l'AO et de ses analogues ont été ensuite identifiés comme étant des espèces de dinoflagellés appartenant à deux genres : le genre planctonique *Dinophysis* et le genre benthique *Prorocentrum* (Yasumoto *et al.*, 1985), Figure 6.

L'AO et ses dérivés, les dinophysistoxines (DTX), sont des polyéthers lipophiles et stables à la chaleur (EFSA, 2008b), Figure 7. Les toxines de ce groupe sont généralement dites « libres » lorsqu'elles ne sont pas estérifiées, comme l'AO ou les dinophysistoxines-1 et -2 (DTX-1 et DTX-2). Les formes estérifiées peuvent être formées au sein des micro-algues comme pour les DTX-4, -5, -6, ou au sein du coquillage comme pour la DTX-3. Il semble que l'estérification soit un moyen de détoxification pour les organismes producteurs, ainsi que pour les coquillages qui absorbent ou excrètent ces toxines (McNabb, 2008).

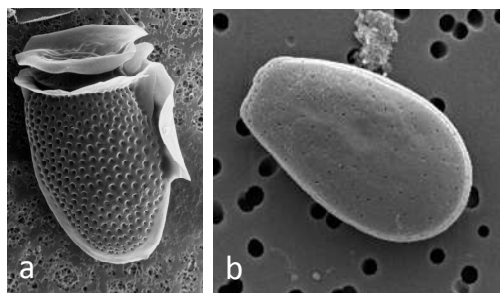
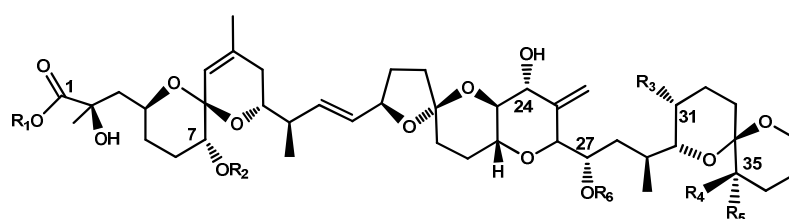


Figure 6 : Photographies prises au microscope électronique à balayage de : *Dinophysis acuminata* (a) et *Prorocentrum lima* (b). (M. Bardouil, Photothèque du Laboratoire Phycotoxines, Ifremer Nantes).



Toxine	R1	R2	R3	R4	R5	R6
OA	H	H	CH ₃	H	H	H
DTX-1	H	H	CH ₃	CH ₃	H	H
DTX-2	H	H	H	H	CH ₃	H
DTX-3	H	acyle	*	*	*	H

Figure 7: Structures chimiques de l'AO et de ses dérivés, les DTX-1, -2 et -3 (Larsen et al., 2007).

Les toxines diarrhéiques peuvent être accumulées par différents organismes bivalves filtreurs, tels que les moules, les coquilles Saint-Jacques, les coques, les palourdes, mais également par des crabes (Vale et Sampayo, 2002a; Vale, 2006). La première intoxication humaine par des toxines DSP a été rapportée aux Pays-Bas dans les années 1960, puis au Japon dans les années 1970 (Aune et Yndestad, 1993). Aujourd'hui, ces toxines sont retrouvées de façon globale dans toutes les zones géographiques du monde. L'Europe et le Japon sont plus particulièrement touchés, mais également l'Amérique du Nord (Canada) et du Sud (Chili), l'Australie, l'Afrique du Nord (Maroc), l'Indonésie et la Nouvelle-Zélande (EFSA, 2008b; Tubaro *et al.*, 2008).

➤ Mécanisme d'action et symptomatologie associée

• Observations chez l'homme

Chez l'homme, la consommation de coquillages contaminés par des toxines du groupe de l'AO entraîne des symptômes d'intoxication aigüe tels que des diarrhées, nausées, douleurs abdominales et vomissements. Ces symptômes apparaissent de 30 min à 4 h après ingestion de coquillages contaminés, et la récupération est totale après 1 à 3 jours sans traitement médical particulier. Aucun décès n'a été rapporté après de telles intoxications alimentaires (EFSA, 2008b).

L'AO et DTX-1 semblent également induire des effets chroniques, en agissant comme promoteurs tumoraux. L'estomac, l'intestin grêle et le colon présentent des sites de liaisons à l'AO et DTX-1, qui pourraient donc être impliqués dans le développement de tumeurs gastro-intestinales (Fujiki *et al.*, 1988; Suganuma *et al.*, 1988).

• Etudes *in vitro*

Un des mécanismes d'action de l'AO et de ses analogues DTX-1 et DTX-2 a été élucidé : ces toxines sont des inhibiteurs spécifiques des sérine/thréonine protéines phosphatases PP1 et PP2A. Ces deux enzymes modulent les niveaux de phosphorylation et déphosphorylation d'un certain nombre de protéines, et sont donc impliquées dans la régulation de nombreux mécanismes cellulaires : croissance et mort cellulaire, différenciation, métabolisme, transduction du signal, etc.. (Bialojan et Takai, 1988; Fernandez *et al.*, 2002). Leur inhibition entraîne entre autres une hyperphosphorylation des protéines impliquées dans la structure du cytosquelette, induisant une augmentation de la perméabilité cellulaire et donc une perte des fluides cellulaires (Honkanen *et al.*, 1994; Fiorentini *et al.*, 1996).

Les effets de l'AO et de ses dérivés ont été étudiés sur de très nombreuses lignées cellulaires différentes (Tableau 1). Ces toxines induisent des phénomènes typiques de l'apoptose, comme revu par Tubaro *et al.* (2008). Les changements observés après exposition de lignées cellulaires sont les suivants : altération de la forme avec des cellules aplaties ou arrondies, détachement du support, perturbation des éléments du cytosquelette et en particulier de l'actine F, fuite du contenu cellulaire par formation de bulles à la surface des cellules, apparition de vacuoles cytoplasmiques, redistribution et compaction des organites cytoplasmiques, condensation de la chromatine, hyperconvolution de la membrane nucléaire ainsi que fragmentation nucléaire. Ces phénomènes apparaissent entre quelques minutes et quelques heures après l'exposition à la toxine, en fonction de sa concentration. Des effets mutagènes, génotoxiques, et l'induction de tumeur sont également régulièrement observés sur différentes lignées avec les toxines du groupe de l'AO.

Tableau 1 : Lignées cellulaires utilisées pour la compréhension du mécanisme d'action de l'AO, DTX-1 et DTX-2.

Type de lignée cellulaire	Identification de la lignée	Toxine	Activités observées
Carcinome pharynx humain	KB	AO	antiprolifératif, altération morphologique
Leucémie murine de souris	P388	AO	cytotoxique
Leucémie lymphocytaire de souris	L1210	AO	cytotoxique
Carcinome larynx humain	Hep-2	AO	cytotoxique
		DTX-1	cytotoxique, altération morphologique caractéristique de
Carcinome colon humain	Caco-2	AO	cytotoxique, mutagène
		DTX-1	cytotoxique, altération morphologique caractéristique de
Neurones isolés de rat	Lignée primaire	AO	neurodégénération
		DTX-2	neurodégénération
Astrocytes	Lignée primaire	DTX-2	cytotoxique
Intestin de rat	IEC-6	AO	désorganisation actine
Hépatocytes isolés de rat	Lignée primaire	AO	altération morphologique caractéristique de l'apoptose
Carcinome mammaire humain	MCF-7	AO	altération morphologique caractéristique de l'apoptose
Neuroblastome humain	SK-N-SH	AO	altération morphologique caractéristique de l'apoptose
	SH-EP	AO	apoptose
	BE(2)-M17	AO	perturbation cytosquelette caractéristique de l'apoptose
Adénome hypophysaire de rat	GH3	AO	altération morphologique caractéristique de l'apoptose
Promyélocytes de rat	IPC-81	AO	altération morphologique caractéristique de l'apoptose
Ovaires hamster	CHO K1	AO	nécrose, génotoxique
Neurones immatures de rats	Lignée primaire	AO	apoptose
Neurones matures de rats	Lignée primaire	AO	apoptose
Rein de rat	ERC-18	AO	apoptose
Fibroblaste de rein de hamster	BHK21 C13	AO	mutagène
Kératinocytes humains	HESV	AO	mutagène
Epithélium de rein de singe	Vero	AO	mutagène

- **Etudes *in vivo***

Les études sur l'évaluation des toxines DSP sur animal ont porté principalement sur l'intoxication aiguë et seulement très peu d'études ont porté sur un effet chronique de l'AO. Les doses létales induisant 50% de mortalité (DL_{50}) sur souris vont de 192 à 225 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pour l'AO et la DTX-1 et 352 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ pour la DTX-2 par voie intra-péritonéale (Tableau 2).

Tableau 2 : Létalité induite par des toxines DSP après injection intra-péritonéale sur souris (DL_{50} = dose létale 50 ; DML = dose minimale létale).

Toxine	Létalité ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	Durée d'observation	Référence
AO	$DL_{50} = 192$	non renseignée	Tachibana <i>et al.</i> , 1981
	$DL_{50} = 210$	non renseignée	Dickey <i>et al.</i> , 1990
	$DL_{50} = 225$	24 h	Tubaro <i>et al.</i> , 2003
	$DL_{50} = 204$	24 h	Aune <i>et al.</i> , 2007
DTX-1	DML = 160	24 h	Tubaro <i>et al.</i> , 2008
DTX-2	$DL_{50} = 352$	24 h	Aune <i>et al.</i> , 2007
DTX-3	DML = 500	24 h	Tubaro <i>et al.</i> , 2008

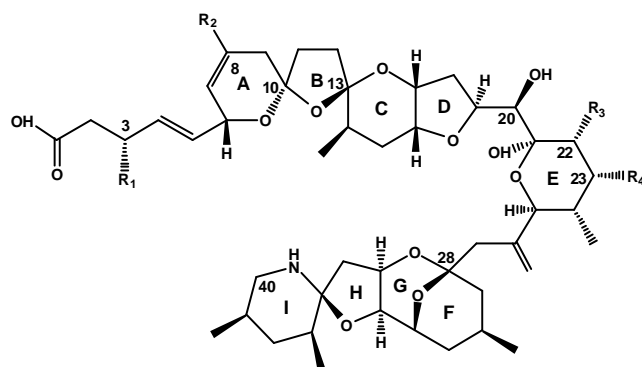
Des études morphologiques et histologiques révèlent l'induction de diverses affections du système digestif des souris par l'injection i.p. d'AO et la DTX-1 à la concentration de 375 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, telles qu'une perturbation des villosités du duodénum ou une desquamation des cellules épithéliales (Terao *et al.*, 1993; Ito et Terao, 1994). L'administration orale d'AO (0,13 – 4 mg.kg^{-1}) ou de DTX-1 (0,75 mg.kg^{-1}) induit des diarrhées chez la souris et le rat, avec accumulation de fluides dans le lumen intestinal (Terao *et al.*, 1993).

1.1.2.3. Le groupe des azaspiracides

➤ Organismes producteurs de toxines et occurrences

En 1995 aux Pays-Bas, plusieurs personnes ont été touchées par une intoxication alimentaire suite à la consommation de moules contaminées en provenance d'Irlande. Bien que les symptômes des intoxications soient de type diarrhéique, les toxines DSP étaient à des concentrations inférieures aux niveaux réglementaires. Une nouvelle toxine, l'azaspiracide, a ainsi été découverte, et le syndrome d'intoxication induit chez l'homme nommé *Azaspiracid Shellfish Poisoning (AZP)* (Satake *et al.*, 1998; Twiner *et al.*, 2008). Les azaspiracides (AZA) sont des polyéthers composés d'un groupement azaspiro, une amine cyclique et un acide carboxylique. A ce jour, une trentaine d'analogues des azaspiracides ont été décrits, avec l'azaspiracide-1 (AZA1), -2 (AZA2) et -3 (AZA3) comme analogues

prédominants (EFSA, 2008a; Twiner *et al.*, 2008; Furey *et al.*, 2010), Figure 8. L'organisme producteur des azaspiracides, *Azadinium spinosum*, a été décrit en 2009 par Tillman *et al.* (Figure 9). Avec une taille de 12 à 16 μm , c'est le plus petit des dinoflagellés producteurs de toxines connus. Les AZA identifiés à ce jour peuvent être produits par *A. spinosum*, par la biotransformation du coquillage ou encore par le stockage en solution méthanolique (Figure 9). Ces toxines ont été détectées en Europe (Irlande, RU, Norvège, France, Portugal), Afrique du Nord (Maroc), Amérique du Sud (Chili) et Amérique du Nord (USA) (James *et al.*, 2004; Amzil *et al.*, 2008; Elgarch *et al.*, 2008; Klontz *et al.*, 2009; Lopez-Rivera *et al.*, 2010).



Abbréviation	Nom	MM	R1 (C3)	R2 (C8)	R3 (C22)	R4 (C23)	R5 (?)
AZA1	Azaspiracide	841,5	H	H	CH ₃	H	
AZA2	8-méthyle-azaspiracide	855,5	H	CH ₃	CH ₃	H	
AZA3	22-desméthyle-azaspiracide	827,5	H	H	H	H	
AZA4	22-desméthyle-3-hydroxy-azaspiracide	843,5	OH	H	H	H	
AZA5	22-desméthyle-23-hydroxy-azaspiracide	843,5	H	H	H	OH	
AZA6	22-desméthyle-8-méthyl-azaspiracide	841,5	H	CH ₃	H	H	
AZA7	3-hydroxy-azaspiracide	857,5	OH	H	CH ₃	H	
AZA8	23-hydroxy-azaspiracide	857,5	H	H	CH ₃	OH	
AZA9	22-desméthyle-3-hydroxy-8méthyle-azaspiracide	857,5	OH	CH ₃	H	H	
AZA10	22-desméthyle-23-hydroxy-8méthyle-azaspiracide	857,5	H	CH ₃	H	OH	
AZA11	3-hydroxy-8-méthyle-azaspiracide	871,5	OH	CH ₃	CH ₃	H	
AZA12	23-hydroxy-8-méthyle-azaspiracide	871,5	H	CH ₃	CH ₃	OH	
AZA13	22-desméthyle-3,23-dihydroxy-azaspiracide	859,5	OH	H	H	OH	
AZA14	3,23-dihydroxy-azaspiracide	873,5	OH	CH ₃	H	OH	
AZA15	22-desméthyle-3,23-dihydroxy-8-méthyle-azaspiracide	873,5	OH	H	CH ₃	OH	
AZA16	3,23-dihydroxy-8-méthyle-azaspiracide	887,5	OH	CH ₃	CH ₃	OH	
AZA17	carboxy-22-desméthyle-azaspiracide	871,5	H	H	H	H	COOH
AZA18	carboxy-azaspiracide	885,5	H	CH ₃	H	H	COOH
AZA19	carboxy-22-desméthyle-8méthyle-azaspiracide	885,5	H	H	CH ₃	H	COOH
AZA20	carboxy-8-méthyle-azaspiracide	899,5	H	CH ₃	CH ₃	H	COOH
AZA21	carboxy-22-desméthyle-3hydroxy-azaspiracide	887,5	OH	H	H	H	COOH
AZA22	carboxy-3-hydroxy-azaspiracide	901,5	OH	CH ₃	H	H	COOH
AZA23	carboxy-22-desméthyle-3-hydroxy-8-méthyle-azaspiracide	901,5	OH	H	CH ₃	H	COOH
AZA24	carboxy-3-hydroxy-8-méthyle-azaspiracide	915,5	OH	CH ₃	CH ₃	H	COOH

Les 4 derniers analogues (méthyle-esters) sont des artefacts de stockage des AZA en solution méthanolique, et n'ont pas été identifiés spécifiquement comme des contaminants des coquillages. AZA18, AZA20, AZA22, n'ont pas été observés expérimentalement mais sont postulés (EFSA, 2008b).

Figure 8 : Structure chimique de l'azaspiracide-1 (AZA1) et de ses 23 premiers analogues (Nicolaou *et al.*, 2006; Rehmann *et al.*, 2008).

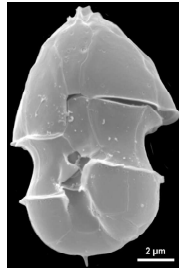


Figure 9: Photographie prise au microscope électronique à balayage de *Azadinium spinosum* (Tillmann et al., 2009).

➤ Mécanisme d'action et symptomatologie associée

• Etudes *in vitro*

Le mécanisme d'action des AZA n'est à ce jour pas élucidé. Différentes études rapportent les effets des AZA1, AZA2 et AZA3 sur un certain nombre de lignées cellulaires (Flanagan *et al.*, 2001; Kulagina *et al.*, 2006; Vilariño *et al.*, 2006; Ronzitti *et al.*, 2007; Vale *et al.*, 2007; Twiner *et al.*, 2012a; Twiner *et al.*, 2012b), Tableau 3. AZA1 semble agir principalement sur la morphologie des cellules, en induisant différents phénomènes tels qu'une réduction de l'intégrité membranaire, un arrondissement des cellules, une rétraction des pseudopodes ou des neurites, une perturbation de l'actine du cytosquelette (Roman *et al.*, 2002; Twiner *et al.*, 2005; Vilariño *et al.*, 2006).

Des études ont suggéré dans un premier temps que AZA1 n'induisait pas de réponse apoptotique, mais plutôt une lyse de type nécrotique, sur la base d'observations morphologiques (Twiner *et al.*, 2005). Par la suite, il a été démontré que AZA1 induisait l'activation de caspases chez des neuroblastomes, résultat caractéristique d'une apoptose (Vilariño *et al.*, 2007). Il semble enfin que AZA1 induise de façon simultanée des mécanismes nécrotiques et apoptotiques (Cao *et al.*, 2010).

Tableau 3 : Lignées cellulaires utilisées pour étudier le caractère cytotoxique et les mécanismes d'action des AZA1, -2 et -3.

Type de lignée	Identification de la lignée	Toxine	Effets observés	Référence
Lymphocyte B humain	Raji	AZA1	Perturbation du cytosquelette, cytotoxicité	Twiner <i>et al.</i> , 2005
Cancer du sein humain	MCF-7	AZA1	Perte des adhésions entre cellules	Ronzitti <i>et al.</i> , 2007
Cellule embryonnaire de rein	HEK-293	AZA1	Cytotoxicité	Twiner <i>et al.</i> , 2005
Cancer hépatique humain	HepG2	AZA1	Cytotoxicité	Flanagan <i>et al.</i> , 2001
Epithélium de poumon humain	A549	AZA1	Cytotoxicité	Twiner <i>et al.</i> , 2005
Monocyte humain	THP-1	AZA1	Cytotoxicité	Twiner <i>et al.</i> , 2005
Neuroblastome humain	BE(2)-M17	AZA1	Modification de la morphologie, cytotoxicité, réduction de la croissance cellulaire, induction de caspases	Vilariño <i>et al.</i> , 2006 ; Twiner <i>et al.</i> , 2012b
Lymphocyte T humain	Jurkat E6-1	AZA1	Inhibition de la biosynthèse de novo du cholestérol, cytotoxicité, lyse cellulaire, perte des pseudopodes, induction de caspases, fragmentation de l'ADN	Twiner <i>et al.</i> , 2008b ; Twiner <i>et al.</i> , 2012a ; Twiner <i>et al.</i> , 2012b
		AZA2	Cytotoxicité, lyse cellulaire, fragmentation de l'ADN	Twiner <i>et al.</i> , 2012a ; Twiner <i>et al.</i> , 2012b
		AZA3	Cytotoxicité, lyse cellulaire, fragmentation de l'ADN	Twiner <i>et al.</i> , 2012a ; Twiner <i>et al.</i> , 2012b
Cancer de la vessie humain	ECV-304	AZA1	Cytotoxicité	Flanagan <i>et al.</i> , 2001
Cervelet de souris	primaire	AZA1	Cytotoxicité, modification de la transduction du signal	Vale <i>et al.</i> , 2007
Neuroblastome de souris	Neuro2A	AZA1	Cytotoxicité	Twiner <i>et al.</i> , 2005
Fibroblaste de peau de souris	primaire	AZA1	Perte des adhésions entre cellules	Ronzitti <i>et al.</i> , 2007
Neurone spinal de souris	primaire	AZA1	Diminution du potentiel d'action	Kulagina <i>et al.</i> , 2006
Epithélium d'hypophyse de rat	GH ₄ C1	AZA1	Cytotoxicité	Twiner <i>et al.</i> , 2005
Cancer de l'intestin humain	Caco-2	AZA1	Induction caspases	Twiner <i>et al.</i> , 2012b

Au niveau de la signalisation cellulaire, AZA1 est responsable d'une augmentation du Ca²⁺ cytosolique et d'adénosine monophosphate cyclique (Roman *et al.*, 2002). Cependant, cette toxine ne semble pas agir au niveau du pH de lymphocytes, du potentiel de membrane mitochondrial de neuroblastomes ou de la PP2A (Flanagan *et al.*, 2001; Roman *et al.*, 2002).

AZA2 et AZA3 agissent également sur le Ca²⁺ cytosolique et l'adénosine monophosphate cyclique en augmentant leur concentration (Roman *et al.*, 2004).

• Etudes *in vivo*

Chez l'homme, la consommation de coquillages contaminés par des azaspiracides entraîne des symptômes tels que nausées, diarrhées, vomissements, crampes d'estomac. Aucune mortalité humaine causée par une intoxication par des AZA n'a cependant été rapportée (Twiner *et al.*, 2008; Twiner *et al.*, 2012b). Il existe assez peu de données disponibles sur des intoxications par AZP, ainsi la plupart des informations concernant la toxicologie des AZA sont obtenues par des expérimentations contrôlées *in vivo* et *in vitro* (Twiner *et al.*, 2008).

Des études sur souris exposées à AZA1 par voie orale révèlent des détériorations sévères du tractus gastro-intestinal et des affectations du foie, de la rate et du thymus, ainsi qu'une faible incidence sur la formation de tumeurs (Ito *et al.*, 2000; Ito *et al.*, 2002). Après injection i.p. d'extraits de coquillage

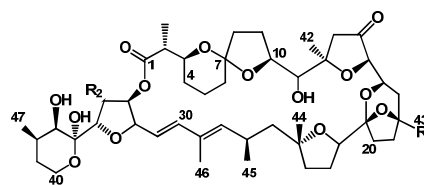
contaminés aux AZA, les souris présentent des symptômes de type neurotoxique caractérisés par une apathie, des difficultés respiratoires, des spasmes, une paralysie progressive et une mort en 20 à 90 minutes (Satake *et al.*, 1998). La dose minimale létale induite par AZA1 sur souris est d'environ 500 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ par voie orale et environ 150 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ par injection i.p. (rapporté par Twiner *et al.*, 2012a).

Les analogues AZA2 et AZA3 présentent des doses minimales létales respectives de 110 et 140 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ par injection i.p. (Ofuji *et al.*, 1999) et les analogues AZA4 et AZA5 des doses minimales létales respectives de 470 et < 1000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (Ofuji *et al.*, 2001). En raison d'une faible disponibilité de standards purs, ces différentes toxines n'ont pas encore pu être évaluées par administration orale sur souris (Twiner *et al.*, 2008).

1.1.2.4. Le groupe de la pecténotoxine

➤ Organismes producteurs de toxines et occurrences

Les pecténotoxines (PTX) sont des polyéthers isolés pour la première fois de coquilles Saint-Jacques *Patinopecten yessoensis* cultivées au Japon (Suzuki, 2008). Elles sont produites par les mêmes espèces de phytoplancton que les toxines du groupe de l'AO, à savoir le genre *Dinophysis* (Draisci *et al.*, 1996; Suzuki, 2008). Environ 15 PTX différentes ont été décrites à ce jour (Miles *et al.*, 2004b; Miles *et al.*, 2006). La pecténotoxine-2 (PTX2), la pecténotoxine-2-seco-acide (PTX2sa) et la 7-*epi*-pecténotoxine-2-seco-acide (7-*epi*-PTX2sa) sont les analogues prédominants dans les coquillages en Europe (Vale et Sampayo, 2002b), Figure 10. Les PTX sont également retrouvées dans des coquillages en Asie et Océanie (Leira *et al.*, 2002b).



Toxine	R (en C43)	C7
PTX1	CH ₂ OH	7R
PTX2	CH ₃	7R
PTX3	CHO	7R
PTX4	CH ₂ OH	7S
PTX6	COOH	7R
PTX7	COOH	7S
PTX2sa	CH ₃	7R
7- <i>epi</i> -PTX2sa	CH ₃	7S

Figure 10 : Structure chimique des PTX.

➤ Mécanisme d'action et symptomatologie associée

• Observations chez l'homme

Les pecténotoxines étaient auparavant classées dans le groupe des DSP. Cependant, de par leur structure chimique différente de celle de l'AO et DTX, et en l'absence de l'induction de diarrhées, les pecténotoxines sont à présent classées dans un groupe à part. Comme elles sont retrouvées de façon conjointe avec d'autres phycotoxines et notamment des DSP, aucun épisode d'intoxication humaine n'a pu être attribué aux pecténotoxines seules (Vilariño et Espiña, 2008).

• Etudes *in vitro*

De nombreuses études rapportent des activités cytotoxiques des pecténotoxines. La PTX-1 et PTX-2 induisent des changements morphologiques ainsi qu'une apoptose sur des hépatocytes de saumon et de rat à une concentration de l'ordre du micromolaire ainsi que sur cellules de foie (Fladmark *et al.*, 1998; Vilariño et Espiña, 2008). La PTX-6 induit une dépolymérisation de l'actine F de neuroblastomes de lapin (BE[2]-M17) (Leira *et al.*, 2002b) et une perturbation de ces fibres d'actine sur des entérocytes de lapin isolés (Ares *et al.*, 2005) ou sur cellules d'épithélium de rein de rat (NRK-52E) (Spector *et al.*, 1999).

L'activité cytotoxique de la PTX-2 a été également évaluée sur un grand nombre de lignées cellulaires du National Cancer Institute (Jung *et al.*, 1995; Chae *et al.*, 2005), Tableau 4. La PTX-2 est également toxique sur cellules KB à la concentration de 58 nM, alors que la PTX2sa et la 7-*epi*-PTX2sa ne le sont pas à 2 µM (Daiguji *et al.*, 1998).

Tableau 4 : CI₅₀ des PTX sur différentes lignées cellulaires (Jung *et al.*, 1995; Chae *et al.*, 2005).

Type de lignée cellulaire	Identification de la lignée	CI ₅₀ (nM)
Cancer poumon humain	EKVX	62
	HOP-62	25,1
	HOP-92	807
Cancer colon humain	COLO 205	7,8
	HCT-116	73,3
		20
Cancer système nerveux central humain	SF-268	154
	SF-295	77,7
Mélanome humain	MALME-3M	123
	M14	4700
	SK-MEL-28	42,3
	SK-MEL-5	55,2
Cancer ovarien humain	IGROV1	67,3
	OVCAR-3	61,6
Cancer rein humain	A498	34,1
	CAKI-1	19,1
	RXF-393	30
	TK-10	72,5
	UO-31	56,3
Cancer sein humain	HS 578T	77,9
	BT-549	62,7

- **Etudes *in vivo***

L'injection i.p. des pecténotoxines chez la souris entraîne une toxicité aigüe importante. Les DL rapportées pour la PTX-1, PTX-2, PTX-3 et PTX-11 sont comprises entre 219 et 411 µg kg⁻¹. Les PTX-4 et PTX-6 sont moins toxiques avec respectivement des doses minimales létales de 770 et 500 µg.kg⁻¹. Les symptômes d'une intoxication apparaissent quelques minutes après injection d'une dose létale, et la mort survient à partir de 4 h par arrêt respiratoire. L'injection de PTX-2 n'induit pas de diarrhées chez l'animal (Miles *et al.*, 2004a), et la toxicité par voie orale est beaucoup moins importante que par injection i.p. (FAO/IOC/WHO, 2005).

1.1.2.5. Le groupe de la yessotoxine

➤ **Organismes producteurs de toxines et occurrences**

Les yessotoxines (YTX) sont principalement produites par le dinoflagellé *Protoceratium reticulatum*. Ces toxines ont été détectées dans des micro-algues ou mollusques bivalves en Australie, Canada, Italie, Japon, Nouvelle-Zélande, Norvège et Royaume-Uni (FAO/IOC/WHO, 2005), Figure 11. Les YTX sont des polyéthers cycliques : elles sont composées de 11 cycles, une chaîne insaturée et deux fonctions sulfate (Figure 12). La structure rigide de la chaîne cyclique présente un caractère apolaire, contrebalancé par les groupements sulfates polaires, l'ensemble de la structure conférant une

lipophilicité intermédiaire aux YTX (Hess et Aasen, 2007). Des isolats de *P. reticulatum* ont révélé un fort degré de flexibilité dans les voies de biosynthèse des YTX. Ainsi à ce jour, plus de 90 analogues de la YTX ont été identifiés dans un seul isolat de *P. reticulatum* (Miles *et al.*, 2005). Les toxines trouvées de façon la plus abondante dans les coquillages sont la YTX et les métabolites 45-hydroxy-YTX et la carboxy-YTX (FAO/IOC/WHO, 2005).



Figure 11 : Photographie prise au microscope électronique à balayage du dinoflagellé *Protoceratium reticulatum*.

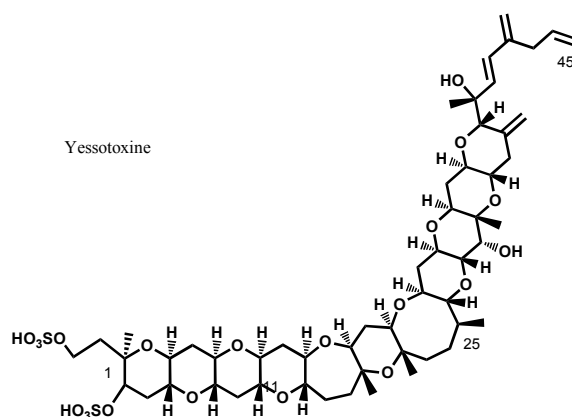


Figure 12 : Structure chimique de la yessotoxine (Murata *et al.*, 1987).

➤ Mécanisme d'action et symptomatologie associée

• Observations chez l'homme

De même que pour les PTX, les YTX étaient initialement incluses dans le groupe des toxines diarrhéiques, notamment parce qu'elles étaient co-extraites avec les toxines DSP (AO et DTX) lors de co-contaminations. Cependant, les YTX ont été démontrées comme étant non diarrhéiques (Ogino *et al.*, 1997), et aucune intoxication humaine n'a pu être reliée à la présence de YTX (FAO/IOC/WHO, 2005).

- **Etudes *in vitro***

Ces toxines ont fait l'objet d'un certain nombre d'études *in vitro*, et plusieurs types d'effets ont pu être mis en évidence (Tableau 5). Cependant le mécanisme d'action des YTX reste à ce jour inconnu. Les YTX présentent une activité inhibitrice de la PP2A quatre fois moins importante que l'AO (Ogino *et al.*, 1997).

Tableau 5 : Lignées cellulaires utilisées et effets des YTX observés.

Type de lignée cellulaire	Identification de la lignée	Type d'effet	Référence
Cancer de sein humain	MCF-7	accumulation de fragments des cadhérines E	Pierotti <i>et al.</i> , 2003
Cancer colorectal	Caco-2	accumulation de fragments des cadhérines E	Ronzitti <i>et al.</i> , 2007
Neuroblastome humain	BE(2)-M17	phénomènes apoptotiques	Leira <i>et al.</i> , 2002
Cancer du col de l'utérus humain	HeLa-S ₃	phénomènes apoptotiques	Malaguti <i>et al.</i> , 2002
Lymphocyte humain	lignée fraîche	modulation de l'homéostasie du Ca ²⁺	de la Rosa <i>et al.</i> , 2001
Myoblaste de rat	L6	phénomènes apoptotiques	Kornes <i>et al.</i> , 2006
Fibroblaste de souris	NIHT3T3	dommages sur lysosomes, dépolymérisation des filaments d'actine	Malagoli <i>et al.</i> , 2006
Myoblaste de souris	DC3H1	phénomènes apoptotiques	Kornes <i>et al.</i> , 2007
Corps gras d'insecte	IPLB-LdFB	dommages sur lysosomes, dépolymérisation des filaments d'actine	Malagoli <i>et al.</i> , 2006

- **Etudes *in vivo***

L'injection i.p. de la YTX induit une toxicité relativement importante, avec une DL₅₀ variant de 80 à 750 µg.kg⁻¹ selon la souche de souris utilisée (Ogino *et al.*, 1997; Aune *et al.*, 2002). A l'inverse, une administration orale de concentrations importantes en YTX (7,5 et 10 mg.kg⁻¹) a très peu d'effet sur les souris : seul un grossissement des cellules de muscle cardiaque ou une légère affection du thymus sont observés (Aune *et al.*, 2002; Franchinia *et al.*, 2005).

1.2. Les phycotoxines émergentes

1.2.1. Définition

La notion d'émergence est déjà ancienne et a été évoquée pour la première fois par Charles Nicolle en 1933 dans son livre « Naissance, vie et mort des maladies infectieuses ». Ce concept, dans son sens premier, peut être défini pour une « maladie dont l'incidence réelle augmente de manière significative dans une population donnée, une région donnée et durant une période donnée, par rapport à la situation épidémiologique habituelle de cette maladie » (Toma et Thiry, 2003). Il est ainsi couramment utilisé pour des maladies humaines et animales, principalement causées par des zoonoses (maladies et infections qui se transmettent naturellement des animaux vertébrés à l'homme

et réciproquement) (Wolfe *et al.*, 2005; Fagherazzi-Pagel, 2012). Cependant, ce terme peut être retrouvé dans d'autres domaines que celui des maladies infectieuses. Par exemple en écotoxicologie, le terme de contaminants émergents peut être appliqué à des polluants chimiques récemment identifiés dans l'eau tels que des résidus médicamenteux, des hormones, des filtres UV, des perturbateurs endocriniens (Petrović *et al.*, 2003; Farré *et al.*, 2008), à des nanoparticules présentes dans l'environnement (Klaine *et al.*, 2008), ou encore à des gènes végétaux de résistance aux antibiotiques (Pruden *et al.*, 2006).

Concernant les biotoxines marines, le terme de « toxine émergente » est régulièrement retrouvé dans la bibliographie, sans qu'une définition précise n'ait été donnée. Ce terme peut ainsi être appliqué à différents cas de figure, à savoir :

- 1- une toxine récemment découverte, dont les effets sur la santé humaine sont incertains ou inconnus,
- 2- une toxine connue dans une certaine zone géographique, et nouvellement détectée dans une autre zone,
- 3- un nouvel analogue d'une toxine connue, dont les effets sur la santé humaine sont incertains ou inconnus

Les toxines appartenant au groupe des imines cycliques et de la palytoxine font partie du cas 1 et 2, et sont détaillées plus loin.

Les toxines appartenant au groupe des ciguatoxines sont produites principalement par le dinoflagellé *Gambierdiscus toxicus* (Bagnis *et al.*, 1980). Ces toxines sont endémiques dans certaines régions tropicales et subtropicales, mais leur détection a été rapportée aux Iles Canaries récemment, et elles sont donc considérées comme émergentes dans cette zone géographique (Boada *et al.*, 2010). Cette classe de toxines ne sera pas abordée dans cette étude car elle est détectée uniquement dans des poissons et ne présente actuellement pas de menace pour les consommateurs de coquillages.

1.2.2. Les imines cycliques

Les imines cycliques ont été détectées de façon relativement récente, à savoir au cours des 20 dernières années, et l'identification d'un pharmacophore commun à ces toxines s'est faite tardivement. Dans le cas des imines cycliques, l'identification structurale des toxines et la détermination de leur mécanisme d'action n'a pas conduit à de larges études toxicologiques, sûrement dû au manque de standards, de matériel de référence pour l'analyse de ces imines ou encore au manque de matériel purifié pour la réalisation de ces essais toxicologiques. La réticence des autorités réglementaires à s'engager dans des études complexes sur la toxicité aiguë et chronique de nouvelles toxines en l'absence de preuves d'intoxications humaines est un facteur freinant les connaissances sur un potentiel risque pour la santé humaine (Cembella et Krock, 2008).

Les imines cycliques regroupent les toxines possédant une structure macrocyclique avec une fonction imine et incluent entre autres les pinnatoxines, gymnodimines, prococontrolides, spirolides, ptériatoxines (Otero *et al.*, 2011).

1.2.2.1. Les pinnatoxines

➤ Organisme producteur de toxines et occurrences

Les pinnatoxines (PnTX) auraient été identifiées pour la première fois en Chine en 1990, dans des coquillages du genre *Pinna* (Zheng *et al.*, 1990). La pinnatoxine A (PnTX-A) est le premier analogue à avoir été décrit (Uemura *et al.*, 1995), suivie des PnTX-B, -C et -D, toutes isolées de viscères de *Pinna muricata* provenant d'Okinawa au Japon (Chou *et al.*, 1996; Takada *et al.*, 2001a). Les PnTX-E, -F et -G ont été découvertes dans des huîtres provenant d'Australie et de Nouvelle-Zélande, et les PnTX-F et -G ont été proposées comme étant les métaboliques algaux précurseurs de toutes les pinnatoxines connues (Selwood *et al.*, 2010). En Europe, les PnTX ont été identifiées pour la première fois en Norvège en 2011, dans des moules et de l'eau de mer (Rundberget *et al.*, 2011). La structure chimique des pinnatoxines est donné Figure 13.

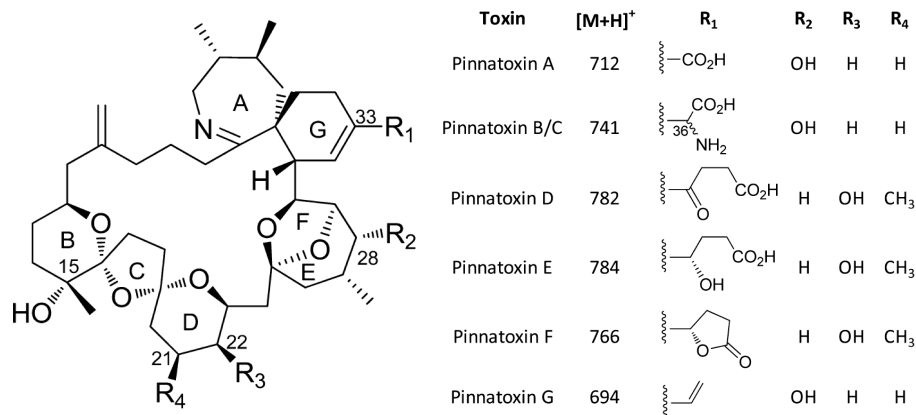


Figure 13: Structure des principales pinnatoxines connues (McCarron *et al.*, 2012).

Dans les zones touchées par ces contaminations, différents dinoflagellés non identifiés producteurs de pinnatoxines ont été isolés, en Nouvelle-Zélande (Rhodes *et al.*, 2010), au Japon (Smith *et al.*, 2011), en Australie (Rhodes *et al.*, 2011a) ainsi qu'en Mer Méditerranée (Nézan et Chomerat, 2011). C'est ce dernier isolat qui a permis de décrire une nouvelle espèce et un nouveau genre de dinoflagellé benthique : *Vulcanodinium rugosum* gen. nov, sp. nov (Nézan et Chomerat, 2011), Figure 14. Par comparaison morphologique avec les isolats des autres zones géographiques, *V. rugosum* a été identifié comme responsable de la production de pinnatoxines dans ces zones (Rhodes *et al.*, 2011b). Plus récemment, des PnTX-A et -G ont été identifiées dans des moules à l'est

du Canada, et ce de façon conjointe avec la première découverte d'esters d'acides gras de la PnTX-G (McCarron *et al.*, 2012).

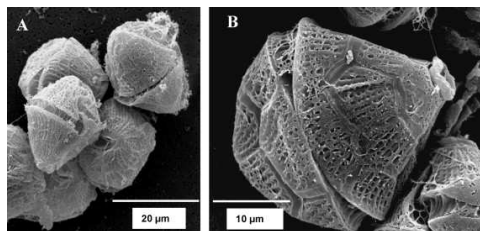


Figure 14 : Observation de *Vulcanodinium rugosum* par microscopie électronique à transmission (Rhodes *et al.*, 2010).

➤ Mécanisme d'action et symptomatologie associée

Même si les pinnatoxines sont connues depuis une quinzaine d'années, relativement peu de données sont disponibles sur leur toxicité, sûrement dû au fait que l'organisme producteur n'a été isolé puis identifié et nommé que très récemment (Rhodes *et al.*, 2010; Nézan et Chomerat, 2011). Cependant, certains analogues comme les PnTX-A et -G ont été synthétisés (McCauley *et al.*, 1998; Suthers *et al.*, 1998; Nagasawa, 2000; Nakamura *et al.*, 2002; Sakamoto *et al.*, 2004; Stivala et Zakarian, 2008; Araoz *et al.*, 2011), ce qui constitue une source alternative de toxines pour des études biologiques et toxicologiques.

• Etudes *in vitro*

Kuramoto *et al.* (2004) rapportent que la PnTX-D présenterait une activité cytotoxique sur lignée cellulaire P388 (leucémie murine), avec une CI_{50} de $2,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A notre connaissance aucune autre activité cytotoxique des PnTX n'a été décrite.

Initialement, il a été suggéré que le mécanisme d'action des PnTX implique une activation des canaux calciques (Zheng *et al.*, 1990). Cette hypothèse n'a pas été confirmée, et il semble qu'un mécanisme d'action différent soit impliqué dans l'activité des pinnatoxines. Ainsi Araoz *et al.* (2011) ont démontré que les PnTX-A et -G induisent un blocage des récepteurs nicotiques à acétylcholine (RnACh), avec des CI_{50} respectives de $0,107 \text{ nM}$ et $5,06 \text{ nM}$. De plus la PnTX-A semble se lier de façon irréversible à ces récepteurs RnACh, ce qui peut renforcer son potentiel toxique, la sous-unité spiro-imine de ces toxines semblant jouer un rôle majeur dans le blocage de ces récepteurs (Araoz *et al.*, 2011). La PnTX-E et -F inhibent également la transmission neuromusculaire, mais avec une affinité pour des sous-types de récepteurs RnACh différents de ceux de la PnTX-A (Hellyer *et al.*, 2011).

- **Etudes *in vivo***

A ce jour, aucune intoxication humaine par consommation de coquillages contaminés par des pinnatoxines n'a été rapportée (EFSA, 2010a). Cependant, les pinnatoxines, et d'une façon générale les imines cycliques, ont été démontrées comme étant des toxines à action rapide sur modèle animal où elles présentent un seuil de toxicité aiguë, et induisent des symptômes neurologiques avec une réponse du type « tout ou rien » (Cembella et Krock, 2008). Par injection i.p. sur souris, la PnTX-E présente une DL₅₀ de 16 à 57 µg.kg⁻¹, la PnTX-F de 12,7 à 45 µg.kg⁻¹ et la PnTX-G de 48 à 50 µg.kg⁻¹ (Selwood *et al.*, 2010; Munday *et al.*, 2012). A doses létales, ces trois analogues induisent une hyperactivité chez la souris pendant les 10 premières minutes suivant l'injection, puis une diminution importante du rythme respiratoire entraînant la mort de l'animal entre 30 et 50 min (Selwood *et al.*, 2010; Munday *et al.*, 2012). En comparaison avec les autres imines cycliques, les PnTX-F et -G présentent une toxicité orale par gavage de souris relativement importante (DL₅₀ respectives de 25 et 150 µg.kg⁻¹). Ceci suggère que chez la souris, ces toxines sont absorbées de façon efficace par le tractus gastro-intestinal (Munday *et al.*, 2012).

1.2.2.2. Les spiroïdes, gymnodimines, ptériatoxines et prorocontrolides

➤ Organismes producteurs de toxines et occurrences

Les origines et occurrences des spiroïdes, gymnodimines, ptériatoxines et prorocontrolides sont regroupées Tableau 6, et leur structure générale Figure 15. Les spiroïdes, gymnodimines et prorocontrolides sont principalement produites par des dinoflagellés (Torigoe *et al.*, 1988; Seki *et al.*, 1995; Cembella *et al.*, 2000). Concernant les ptériatoxines, l'origine micro-algale est assez floue, ces toxines semblent avoir la pinnatoxine-G comme précurseur (Selwood *et al.*, 2010). Des spiroïdes ont été retrouvés dans des algues et coquillages en Norvège, Canada, Danemark, Espagne, Chili, et des gymnodimines n'ont été détectées dans des algues et coquillages qu'en Nouvelle-Zélande.

Tableau 6 : Origine et occurrences de toxines appartenant au groupe des imines cycliques.

Imine cyclique	Origine	Occurrences
Spiroïdes	<i>Alexandrium ostenfeldii</i>	Canada, Norvège, Danemark, Italie, USA, Nouvelle-Zélande, Ecosse, Espagne
Gymnodimines	<i>Karenia selliformis</i>	Nouvelle-Zélande, Tunisie, Canada
Ptériatoxines	Pinnatoxine-G	Japon
Prorocontrolides	<i>Prorocentrum lima</i>	Japon, Taiwan

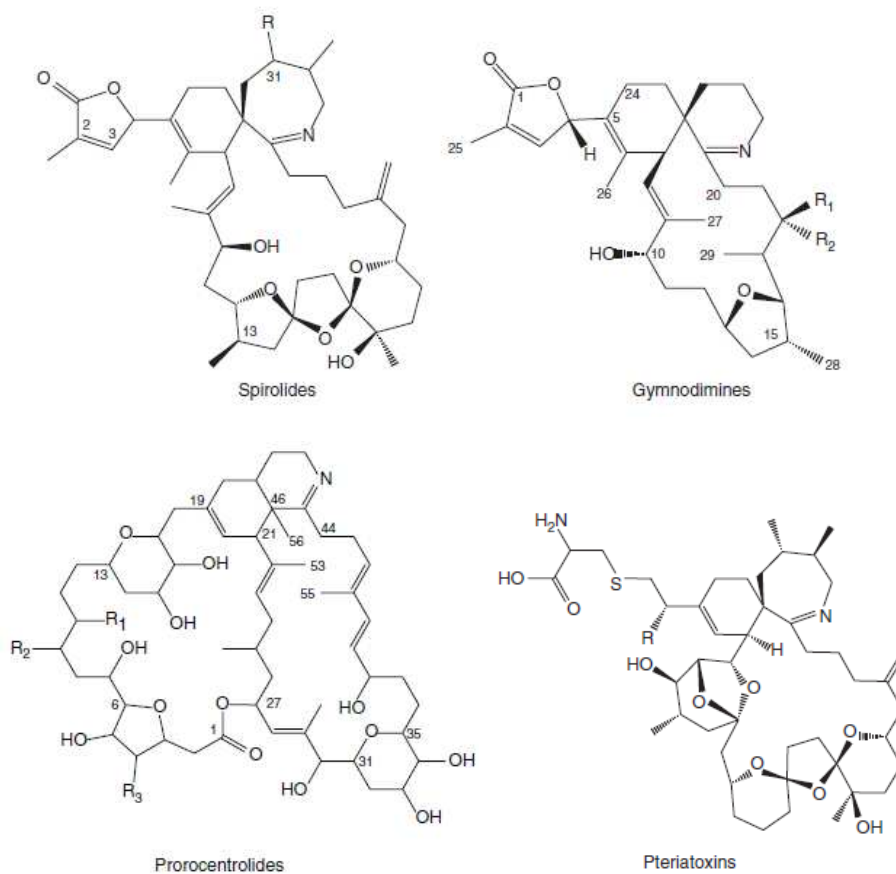


Figure 15 : Structure de base des imines cycliques.

➤ Mécanisme d'action et symptomatologie associée

• Observations chez l'homme

Aucune intoxication humaine par des imines cycliques n'a été rapportée à ce jour.

• Etudes *in vitro*

Les gymnodimines, spirolides et ptériatoxines ne présentent aucune activité *in vitro* particulière. En revanche, les procentrolides induisent une cytotoxicité sur lignée LC-1210 de leucémie murine à des concentrations de l'ordre du micromolaire (Torigoe *et al.*, 1988).

- **Etudes *in vivo***

Les différentes imines cycliques ont été découvertes lors de bio-essais de routine pour la détection de toxines lipophiles, car elles induisaient une toxicité aiguë importante avec une mort rapide de souris en quelques minutes (Cembella et Krock, 2008). Le mécanisme d'action n'est pas encore complètement élucidé, mais l'injection i.p. d'extraits de coquillages contaminés par des spirolides, gymnodimines ou PnTX induisent une mort rapide des souris en quelques minutes. Pour cette raison, ces toxines ont été classifiées comme des toxines à action rapide (*fast-acting toxins*, FAT).

Les gymnodimines présentent une DL₅₀ sur souris de 96 µg.kg⁻¹ après injection i.p., avec une symptomatologie identique à celle induite par les PnTX. La toxicité par voie orale est moins importante, avec une dose minimale létale > 7500 µg.kg⁻¹ (Munday *et al.*, 2004).

La desméthyl-spirolide C est un des analogues des spirolides présentant la plus forte toxicité sur souris, avec une toxicité aiguë autour de 7 µg.kg⁻¹ après injection i.p. Par voie orale cette toxine est également moins active, avec une DL₅₀ de 157 µg.kg⁻¹ (Munday, 2008).

La ptériatoxine A induit une DL₉₉ de 100 µg.kg⁻¹ par injection i.p. sur souris, et une mixture des ptériatoxines B et C présente une toxicité plus importante avec une DL₉₉ de 8 µg.kg⁻¹ (Takada *et al.*, 2001b). Aucune toxicité aiguë par administration orale de ptériatoxines n'a été rapportée, de même pour les prorocontrolides.

1.2.3. Le groupe de la palytoxine

La palytoxine et ses analogues sont également considérés comme des toxines émergentes car découvertes de façon récente dans certaines zones du monde présentant un climat tempéré. Ces toxines ont été détectées en Méditerranée (Mangialajo *et al.*, 2011), et il semble que les efflorescences d'*Ostreopsis* responsables en partie de leur production soit fortement influencée par l'augmentation de la température de la surface de la mer (Granéli *et al.*, 2011). Cette toxine n'est pas réglementée en Europe, mais son émergence en Méditerranée devrait faire évoluer cette réglementation (Trotter, 2012).

➤ Organismes producteurs de toxines et occurrences

Les toxines du groupe de la palytoxine (PITX) ont été initialement détectées dans des cnidaires du genre *Palythoa* : *P. toxica* et *P. tuberculosa* (Moore et Scheuer, 1971; Kimura *et al.*, 1972), mais les organismes réellement producteurs des PITX ont été identifiés comme des dinoflagellés benthiques du genre *Ostreopsis* : *O. mascarenensis*, *O. siamensis* et *O. ovata* (Onuma *et al.*, 1999; Lenoir *et al.*, 2004; Penna *et al.*, 2005). Ces toxines ont été retrouvées à Hawaï et au Japon dans un premier temps, et sont distribuées de façon mondiale à ce jour (Moore et Bartolini, 1981; Deeds et Schwartz, 2010). Les PITX sont capables de s'accumuler dans divers organismes marins, tels que des éponges

et des coraux, des échinodermes, des polychètes, des crustacés, des mollusques et des poissons. Ces toxines ayant été retrouvées dans des poissons carnivores, il semble qu'elles soient capables de s'accumuler au sein des chaînes trophiques à des concentrations relativement importantes (Deeds et Schwartz, 2010). Concernant les mollusques bivalves, des toxines du groupe de la PITX auraient été détectées dans des moules et des palourdes, dans des zones où des espèces toxiques d'*Ostreopsis* sont retrouvées (Gleibs et Mebs, 1999; Aligizaki *et al.*, 2008). Cependant, aucune intoxication humaine par consommation de coquillages contaminés par des PITX n'a été rapportée, et le risque d'une exposition aux palytoxines par ce biais reste inconnu.

Les PITX sont des composés polyhydroxylés présentant une longue chaîne carbonée hydrophobe, et des groupements hydroxyles, amides et amines hydrophiles (Figure 16), l'ensemble conférant un caractère amphiphile aux molécules.

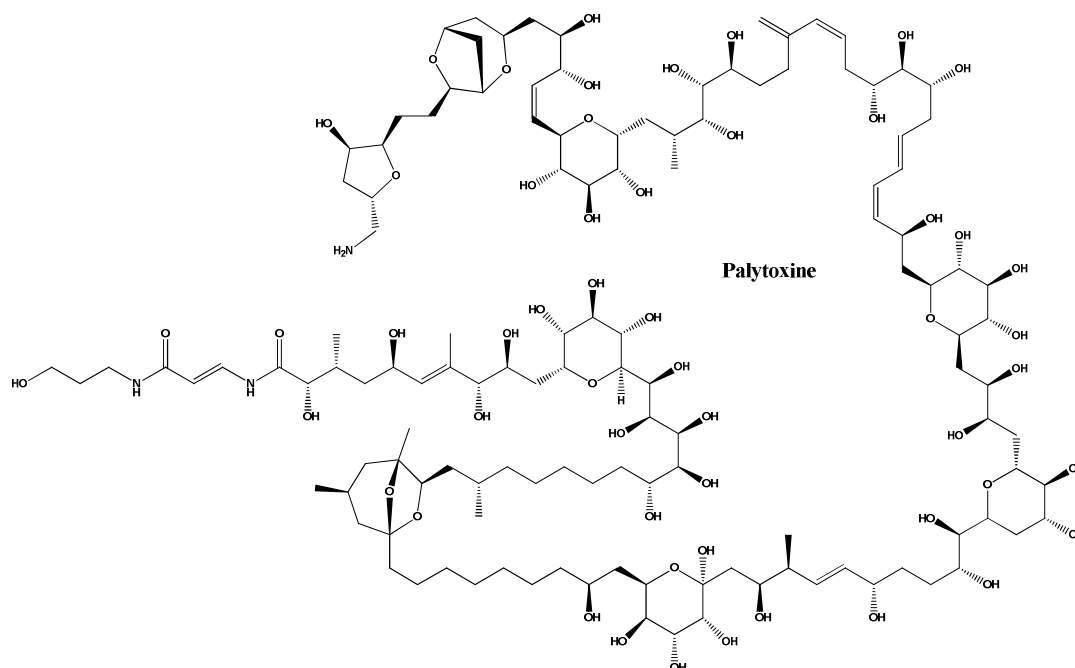


Figure 16 : Structure chimique de la palytoxine (EFSA, 2009b).

➤ Mécanisme d'action et symptomatologie associée

• Observations chez l'homme

Les voies d'exposition aux PITX peuvent se faire *via* la consommation de produits marins contaminés, par inhalation d'aérosols marins lors d'efflorescences algales ou par contact avec la peau et les yeux. La symptomatologie observée chez l'homme est différente en fonction de cette voie d'exposition. Par ingestion de produits contaminés, les symptômes décrits sont assez larges : malaises, vomissements,

diarrhées, picotements dans les extrémités, crampes musculaires, troubles du rythme cardiaque ou encore difficultés respiratoires (Deeds et Schwartz, 2010). Des cas mortels ont été rapportés après consommation de sardines et de crabes contaminés (Yasumoto *et al.*, 1976; Onuma *et al.*, 1999). L'inhalation d'aérosols induit rhinites, toux et bronchoconstriction (Ciminiello *et al.*, 2006).

- **Etudes *in vitro***

Le mécanisme d'action des PITX a été élucidé : ces toxines agissent sur les pompes Na^+/K^+ -ATPase, principalement en les convertissant en pores cationiques non sélectifs (Artigas et Gadsby, 2003; Hilgemann, 2003).

- **Etudes *in vivo***

Par injection i.p. sur souris, la PITX présente une toxicité très importante, avec une DL_{50} comprise entre 0,45 et 0,72 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. A ces concentrations, les souris présentent rapidement une ataxie et une paralysie après injection, puis une dyspnée et cyanose suivi de la mort dans les 48 h. Ces toxines sont moins actives par administration orale, avec par exemple une étude rapportant une DL_{50} sur souris de 510 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (Munday, 2008).

1.3. Les toxicités atypiques

En 2005, dans le Bassin d'Arcachon, l'huître creuse *Crassostrea gigas* a été interdite à la vente pour la première fois depuis son introduction dans cette zone, sur la base du test de toxicité aiguë sur souris qui s'était révélé positif. Le début de l'épisode de toxicité a été relié à la présence de dinoflagellés du genre *Dinophysis* dans l'eau, et d'acide okadaïque dans les hépatopancreas d'huîtres. En revanche, la fin de l'épisode fut qualifiée d'épisode de « toxicité atypique », ou de « toxicité d'origine inconnue », c'est-à-dire « un épisode de contamination des coquillages, révélé à travers une réponse toxique chez la souris en injection intra-péritonéale, dont l'origine ne peut pas être expliquée par la présence de toxines connues habituellement recherchées » (rapporté par Maurer *et al.*, 2010). Ces phénomènes se sont ensuite reproduits régulièrement les années suivantes dans le Bassin d'Arcachon : la moitié des bio-essais positifs n'était pas expliquée par la présence de toxines connues dépassant le seuil réglementaire, et dans deux cas sur trois, ces désaccords provenaient de résultats d'analyse chimique largement inférieurs aux seuils réglementaires, voire même négatifs. Ainsi, une diminution du seuil de détection de l'analyse chimique n'aurait permis d'expliquer qu'une partie des toxicités atypiques (Belin *et al.*, 2009). D'autres zones géographiques en France sont touchées par ces épisodes de toxicité atypique, comme en Pays de Loire (Le Croisic) ou en Méditerranée (Salses-Leucate), (Belin *et al.*, 2009) mais également en Espagne (Chapela *et al.*, 2008), en Irlande ou en Norvège (Hess *et al.*, 2009), même si ces événements n'ont pas forcément tous la même origine.

En l'absence de lien avec la présence de micro-algues toxiques ou de toxines connues, différentes hypothèses ont été proposées pour expliquer la toxicité des coquillages, plus particulièrement dans le Bassin d'Arcachon qui est fortement touché par ces phénomènes. Les diatomées sont consommées par les mollusques bivalves filtreurs, et sont particulièrement riches en acides gras libres, or ces acides gras peuvent présenter une toxicité pour la souris par injection intra-péritonéale (Suzuki *et al.*, 1996). Cependant aucun pic de diatomées n'a pu être mis en relation avec les différentes périodes de toxicité (Maurer *et al.*, 2010). La dangerosité pour l'homme du dinoflagellé *Prorocentrum minimum* n'a pas été clairement établie, cependant il semble que cet organisme soit capable d'induire une toxicité chez la souris (Grzebyk *et al.*, 1997). Ainsi, les concentrations cellulaires de *P. minimum* ont été recensées régulièrement dans le Bassin d'Arcachon, mais les périodes de développement de cette espèce n'ont pu être systématiquement reliées aux périodes de toxicités atypiques (Maurer *et al.*, 2010). De même, ni les populations de Gymnodiniaceae (regroupant des formes de dinoflagellés de taille inférieure à 20 µm), ni la présence du genre mixotrophe *Gyrodinium* ou du genre hétérotrophe *Protoperdinium*, capables de consommer des dinoflagellés toxiques, n'ont pu être mises en relation avec les toxicités inconnues. Les toxicités atypiques surviennent toujours pendant la saison chaude, mais aucune population planctonique ou assemblage de populations phytoplanctoniques spécifique à ces épisodes n'ont pu être mis en évidence (Maurer *et al.*, 2010). La toxicité de formes estérifiées de spirolides et de pecténotoxines a également été investiguée, tout comme l'effet synergique entre différentes toxines, mais une fois encore ces hypothèses sur l'origine des toxicités atypiques n'ont pas été confirmées (Dubois et Amzil, 2009).

Concernant l'étang de Salses-Leucates (Languedoc-Roussillon), certains phénomènes de toxicités atypiques ont été élucidés : la toxicité des échantillons avait pour origine la présence de pinnatoxines (Hess *et al.*, 2013), qui sont connues pour induire des phénomènes neurologiques importants chez la souris, et à ce titre ont été classées dans la catégorie des toxines à action rapide (Cembella et Krock, 2008).

Différentes pistes ont donc été proposées pour poursuivre les investigations sur les toxicités atypiques, comme se focaliser sur le nanoplancton, le picoplancton, ou encore sur les micromycètes marins (Maurer *et al.*, 2010). Cette dernière hypothèse est développée dans le paragraphe suivant.

1.4. Les champignons isolés du milieu marin

Les champignons sont retrouvés de façon ubiquitaire dans les océans, et peuvent être définis comme marins obligatoires ou marins facultatifs. Les premiers se développent et sporulent uniquement en milieu marin ou estuarien, alors que les seconds sont issus du milieu terrestre ou d'eau douce et sont capables de se développer et de sporuler en milieu marin (Kohlmeyer et Kohlmeyer, 1979). De prime abord, il est difficile de définir si une souche est marine obligatoire, marine facultative ou juste dormante en milieu marin : il est nécessaire de voir ses capacités de germination en conditions naturelles (Kohlmeyer et Kohlmeyer, 1979). Ainsi le terme de champignons « issus du milieu marin » sera employé par la suite.

En milieu marin, les champignons sont connus pour remplir plusieurs fonctions écologiques, plus ou moins identiques qu'en milieu terrestre. Ils jouent un rôle dans la dégradation de la lignocellulose du

bois, de la décomposition de substrats herbacés ou de restes d'animaux. Ils sont impliqués dans des symbioses avec des micro-algues pour former des lichens, avec des macro-algues pour former des mycophycobioses, ou encore avec des plantes pour former des mycorhizes. Ils peuvent présenter un caractère pathogène envers des poissons, des mollusques bivalves, des crustacés, des plantes ou des algues (revu par Hyde *et al.*, 1998) .

Les champignons isolés du milieu marin ont également été beaucoup étudiés sur le plan chimique, pour leur capacité à produire des métabolites d'intérêt. Ainsi, des composés présentant des activités sur le système immunitaire, sur le système nerveux, ou encore cytotoxiques, antibactériennes, antiplasmodiques, antimalariales ou neuritogènes, ont été isolés à partir de souches d'origine marine (Mayer *et al.*, 2009; Ebel, 2010; Schumacher *et al.*, 2011; Blunt *et al.*, 2013).

Dans certaines zones conchylicoles, de nombreuses espèces de champignons sont retrouvées, appartenant principalement aux genres *Penicillium*, *Trichoderma*, *Aspergillus* ou *Cladosporium* (Sallenave-Namont *et al.*, 2000; Matallah-Boutiba *et al.*, 2012). Il a été démontré que ces souches pouvaient présenter un potentiel toxigène important, par utilisation de tests biologiques comme le test sur larves d'*Artemia salina* (Sallenave-Namont *et al.*, 2000; Matallah-Boutiba *et al.*, 2012), et que les métabolites responsables de cette activité pouvaient s'accumuler dans les coquillages et notamment dans les moules (Sallenave *et al.*, 1999; Grovel *et al.*, 2003). Plus particulièrement, la gliotoxine a été identifiée comme étant responsable de l'activité cytotoxique d'une souche marine d'*Aspergillus fumigatus* (Grovel *et al.*, 2002), ou encore les peptaïbols ont été identifiés comme étant les composés responsables de l'activité sur larves de diptères d'extrait de *Trichoderma* sp (Landreau *et al.*, 2000; Ruiz *et al.*, 2007). Des peptaïbols ont par la suite été identifiés dans des échantillons de moules et de sédiments, montrant que des composés toxiques produits par des champignons isolés de zones conchylicoles peuvent s'accumuler dans l'environnement marin (Poirier *et al.*, 2007a; Poirier *et al.*, 2007b).

2. Protection du consommateur de coquillages

Au niveau européen, la mise en place d'une protection des consommateurs de mollusques bivalves est définie d'après les étapes suivantes :

- une étape d'**évaluation des risques**, avec pour objectifs de fixer les seuils sanitaires et de proposer des méthodes de détection et d'analyse. Cette étape est gérée par l'EFSA (*European Food Safety Authority*).
- une étape de **gestion des risques**, avec pour objectif d'établir une réglementation sur la base de critères politiques, socio-économiques et sanitaires. Cette étape est gérée par la Direction Générale de la Santé et des Consommateurs (DG Sanco),
- une étape de **surveillance de la réglementation**, gérée par les Laboratoires de Référence (Hossen, 2012).

En France, le Réseau de Surveillance du Phytoplancton et des Phycotoxines (REPHY) de l'Ifremer a été créé en 1984, suite à la survenue en 1983 de plusieurs milliers d'intoxications de type diarrhéique dans la Baie de Vilaine après consommation de coquillages contaminés par des *Dinophysis*. Ce réseau présente un double objectif à la fois environnemental et sanitaire, et vise notamment à la détection et au suivi des espèces phytoplanctoniques productrices de toxines susceptibles de s'accumuler dans les produits marins consommés, ainsi qu'à la recherche de ces toxines dans les coquillages. Le plan de surveillance se fait dans le cadre de la réglementation européenne, et est complémentaire du plan de surveillance de la Direction Générale de l'Alimentation (DGAI). La stratégie du système de surveillance consiste à échantillonner de l'eau de mer et des coquillages afin de suivre les toxines lipophiles, et ce dans les zones à risque et pendant les périodes à risque (Belin, 2011). A côté de son rôle de surveillance des toxines connues, le REPHY assure un rôle de vigilance qui a pour objectif de détecter l'apparition de phycotoxines lipophiles connues non réglementées, de nouveaux analogues de toxines connues ainsi que de phycotoxines émergentes, et d'opérer un suivi régulier en dehors des périodes à risque et/ou en l'absence de phytoplancton toxique (AFSSA, 2009).

2.1. Les seuils réglementaires des toxines lipophiles

Au sein de l'UE, la DG Sanco a saisi l'EFSA en 2006 pour rassembler les informations disponibles sur les différentes biotoxines marines, et donner un avis quant à leur réglementation et les méthodes de détection à appliquer afin d'assurer la protection des consommateurs. Ainsi les concentrations dangereuses pour la santé humaine, ainsi que les seuils réglementaires de toxines dans les mollusques bivalves sont donnés Tableau 7.

Les seuils réglementaires ont été définis sur la base d'une consommation potentielle d'une portion de 100 g de chair de coquillage. Cependant, le panel de scientifiques de l'EFSA a considéré que les gros consommateurs n'étaient pas bien protégés contre le risque toxinique avec une réglementation basée sur une portion de seulement 100 g. Il a donc été suggéré que ces concentrations soient revues à la baisse, avec la prise en compte d'une consommation potentielle de 400 g de chair de coquillage (EFSA, 2008b).

Tableau 7 : Seuils réglementaires, ARfD et LOAEL fixés par l'EFSA (2009 et 2010).

Toxines	Concentrations limites dans la chair de coquillage fixées par l'UE	Concentration minimale induisant une toxicité aigüe chez l'homme (Acute Reference Dose, ARfD)	Concentration minimale induisant un effet chez l'homme (Lowest Observed Adverse Effect Level, LOAEL)
AO et DTXs	160 µg éq AO.kg ⁻¹ c. t.	0,3 µg éq AO.kg ⁻¹ p.h.	0,8 µg éq AO.kg ⁻¹ p.h.
AZAs	160 µg éq AZA1.kg ⁻¹ c. t.	0,2 µg éq AZA1.kg ⁻¹ p.h.	1,9 µg éq AZA1.kg ⁻¹ p.h.
PTXs	160 µg éq AO.kg ⁻¹ c. t.	0,8 µg éq PTX2.kg ⁻¹ p.h.	250 µg éq PTX2.kg ⁻¹ p.h.
YTXs	1 mg éq YTX.kg ⁻¹ c. t.	25 µg éq YTX.kg ⁻¹ p.h.	5 mg éq YTX.kg ⁻¹ p.h.*
BTXs	toxine non réglementée en Europe	concentration non définie	concentration non définie

2.2. Les méthodes de détection des toxines lipophiles

2.2.1. La controverse du « test souris »

C'est au Japon, en 1981, que Yasumoto décrit le test de toxicité aigüe sur souris (TS) comme test de détection des toxines DSP (rapporté par Suzuki et Watanabe, 2012) . Depuis, le TS a été largement utilisé dans de nombreux pays, avec quelques modifications de la méthode initiale (FAO/IOC/WHO, 2005). Ce test avait été choisi comme méthode de référence en Europe car il était sensible à un large spectre d'activités, il peut détecter des toxines inconnues, il rend compte d'une toxicité générale, il se déroule sur un temps relativement rapide de 24 h et il présente un coût moins élevé que des méthodes analytiques (Combes, 2003; Hess *et al.*, 2006). Cependant, cette méthode avait été développée à la base comme outil de recherche en toxicologie pour détecter l'AO et les DTX, et non comme un outil de surveillance de routine. Ce test n'a ainsi jamais fait l'objet d'une validation, et n'a jamais été accepté par la communauté scientifique pour diverses raisons. Le protocole de ce test est présenté en Annexe 1.

- le protocole d'extraction n'est pas standardisé

Le TS est généralement conduit selon le protocole développé par Yasumoto *et al.* (1984), avec quelques modifications. Les souris peuvent recevoir par injection i.p. un extrait correspondant à 5 g de glande digestive ou 25 g de chair totale. Les solvants d'extraction ne sont pas imposés, et des étapes de purification peuvent être appliquées si cela est jugé nécessaire pour éliminer des interférences. Une extraction simple à l'acétone peut être utilisée pour détecter l'AO, DTX, AZA, PTX et YTX. Pour éliminer des effets de matrices, il est possible de réaliser des étapes de purification par partage liquide/liquide, avec un mélange diéthyl-éther / eau ou dichlorométhane / eau. L'extraction à l'acétone suivie d'un partage liquide/liquide avec du diéthyl-éther, ne permet pas la détection des YTX car des pertes de ces toxines s'observent au cours de la purification (Directive-86/609/CEE, 1991). Trois animaux doivent recevoir une injection, et il est considéré que la mort de deux ou trois souris au bout de 24 h d'exposition indique un résultat positif, avec présence de toxines de type AO, DTX, AZA, PTX, YTX. La sensibilité et la sélectivité du test vis-à-vis des toxines étant fortement dépendantes du choix des solvants et des étapes de purification (European.Commission, 2011), le manque d'harmonisation des protocoles du TS pose un vrai problème d'interprétation.

- le protocole n'a pas été validé

La validation d'une méthode repose sur les procédés par lesquels la fiabilité et la pertinence de cette méthode sont évaluées et ce pour un but précis. Ainsi, une validation doit évaluer si les données fournies par la méthode sont suffisantes pour prédire une toxicité, si les informations obtenues sont

identiques au cours du temps et en fonction du lieu où le test est conduit, si les équipements et matériels utilisés sont appropriés, et si le personnel possède une formation et une expertise pertinentes (Combes, 2003). Aucun des protocoles du TS n'a formellement fait l'objet d'études inter-laboratoires (FAO/IOC/WHO, 2005; Hess *et al.*, 2006).

- **l'utilisation de témoins positifs et négatifs est floue**

Il est en effet primordial dans l'utilisation d'un bio-essai de mettre en place des contrôles positifs et négatifs, de façon routinière ou à intervalles réguliers. Des témoins positifs et négatifs sont utilisés, mais leur définition n'est pas entièrement satisfaisante : un témoin positif est un bio-essai pratiqué à partir de coquillages provenant d'une zone contaminée, et un témoin négatif est un bio-essai pratiqué à partir de coquillages provenant de marchés (AFSSA, 2006). Ainsi, l'utilisation de coquillages contaminés à des doses connues pour évaluer le processus d'extraction, l'injection i.p. d'extraits de coquillages dopés avec des toxines connues à différentes concentrations, constituent de contrôles positifs importants. Des contrôles négatifs devraient également être utilisés tels qu'un contrôle matrice avec l'injection d'extraits de coquillages non contaminés ou encore un contrôle des solvants avec l'injection de Tween 80 seul (Combes, 2003).

- **le test ne peut différencier les toxines réglementées de toxines non réglementées**

Les imines cycliques, non réglementées dans l'UE, sont co-extraites avec l'AO, DTX et AZA. Elles peuvent donc interférer avec le test et entraîner une surestimation de la toxicité de l'échantillon. De plus, d'éventuels effets de synergies entre toxines sont aussi possibles (Hess *et al.*, 2006).

- **les résultats varient selon la souche de souris utilisée**

Dans la méthode officielle japonaise, il est spécifié que les animaux utilisés, de l'espèce *Mus musculus*, doivent être des souris mâles de souche ddY ou ICR, pesant entre 16 et 20 g, comme rapporté par Suzuki (2012). Le laboratoire communautaire de référence pour les toxines marines (CRLMB, 2009) préconise l'utilisation de souris mâle de souche CD1, pesant entre 17 et 22 g. Ce manque d'harmonisation pose un problème dans le sens où Suzuki (2012) a démontré une différence de sensibilité à l'AO de plusieurs souches de souris.

- **des faux-positifs peuvent être observés**

L'ANSES - anciennement AFSSA - a défini le terme de faux-positif comme étant un « échantillon non conforme dont le danger n'a pas été identifié, correspondant à une situation où l'échantillon a donné un résultat positif dans le bio-essai sur souris et pour lequel par analyse chimique, la teneur en toxines

réglementées est inférieure au seuil réglementaire. La présence d'autres facteurs toxiques peut avoir entraîné la positivité du test. Ceci peut correspondre soit à un danger non identifié, soit à un danger non quantifié. Deux origines sont possibles : soit une toxicité atypique, soit des interférences » (AFSSA, 2006).

Ainsi dans des extraits de coquillages, la présence de substances qui sont toxiques chez la souris par voie i.p., mais qui ne provoquent pas de toxicité aigüe chez l'homme, peuvent induire des résultats faux-positifs avec le test souris. C'est par exemple le cas des acides gras libres, qui peuvent avoir pour origine des efflorescences de diatomées (Takagi *et al.*, 1984; Kogawa *et al.*, 1989; Suzuki *et al.*, 1996).

- des faux-négatifs peuvent être observés

L'AFSSA avait également défini le terme de faux-négatif, comme étant un « échantillon conforme par bio-essai (0 ou 1 souris morte avec symptômes toxiques) pour lequel l'analyse chimique révèle une teneur totale (somme des quantités de toxines connues) supérieure au seuil de salubrité. Ceci peut s'expliquer par la méconnaissance des facteurs de toxicité relative des différentes toxines par rapport à la toxine de référence (AO) » (AFSSA, 2006).

- la voie d'exposition n'est pas la plus pertinente

La voie d'exposition choisie est l'injection i.p. en dépit du fait que l'exposition humaine se fait par voie orale. Il est donc difficile de tirer des conclusions sur une potentielle toxicité sur l'homme sur la base du test souris (AFSSA, 2006). Cette voie i.p. est habituellement utilisée lorsqu'il s'agit d'étudier des concentrations importantes de substances auxquelles le corps humain peut être exposé. Mais un dosage *via* cette voie peut résulter en une surestimation de la toxicité. De plus, le critère déterminant de la positivité du test, la mort d'au moins deux souris sur trois, n'est pas pertinent par rapport à la santé humaine (Combes, 2003).

- la méthode pose des problèmes d'éthique

Il est communément accepté que la règle des trois R doit être appliquée pour le test souris : *reduce*, *refine*, *replace* (réduire, améliorer, remplacer). Ce concept a été proposé pour la première fois par Russell & Burch, dans un traité intitulé « The principles of humane experimental technique », publié en 1959 (rapporté par Balls *et al.*, 1995). L'objectif était d'encadrer les expérimentations animales en laboratoire, en proposant de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés, et de redéfinir les techniques expérimentales pour minimiser la douleur, la souffrance et le stress infligés aux animaux.

Le concept des trois R n'a jamais été appliqué au développement et à l'utilisation du TS. Ce test pose des problèmes d'éthique car la mort des souris constitue le critère déterminant d'une contamination de

l'échantillon testé, sans qu'il y ait possibilité d'introduire d'autres critères plus humains dans le test. Le test induit souvent une souffrance importante des animaux, sans qu'une anesthésie soit utilisable (Combes, 2003).

- **il existe un conflit réglementaire entre deux directives européennes**

Il est en effet important de rappeler qu'au niveau réglementaire, il existe un conflit d'intérêt entre deux directives du Conseil de l'Union Européenne. D'une part, la Directive 91/492/CEE (1991) fixe les règles sanitaires régissant la production et la mise sur le marché de mollusques bivalves vivants. Entre autres, le chapitre VI stipule qu'un système de contrôle de la santé publique doit être établi, et que ce système doit comprendre « une surveillance périodique des zones de production et de reparcage des mollusques bivalves vivants, destinée à contrôler la présence possible de (...) biotoxines dans les mollusques bivalves vivants (...) ». La méthode de référence en vigueur pour assurer cette surveillance était le TS. Or, une autre directive du Conseil Européen, la Directive 86/609/CEE (1991), porte sur la protection des animaux utilisés à des fins expérimentales et d'autres fins scientifiques. Cette directive prône entre autres une réduction au minimum du nombre d'animaux utilisés à ces fins. L'utilisation du TS pour évaluer la salubrité des mollusques bivalves rentre en conflit avec l'article 3 de cette directive, qui concerne l'utilisation d'animaux lors d'expériences pratiquées à la fin suivante : « (...) les essais de qualité (...) de denrées alimentaires, en vue (...) de leurs effets chez l'homme (...) ». Cette directive stipule, dans son article 7, qu'« Il ne sera pas effectué d'expérience s'il existe une possibilité raisonnable et pratique d'avoir recours à une autre méthode scientifiquement acceptable et n'impliquant pas l'utilisation d'un animal pour obtenir le résultat recherché ». De plus l'article 23 « (...) encourage la recherche visant à mettre au point et à éprouver d'autres techniques susceptibles de fournir le même niveau d'information que celui obtenu par des expériences sur animaux mais qui utilisent moins d'animaux (...) ». Le cadre réglementaire de la mise en place du test souris est donc relativement flou.

Le TS présente en revanche certains avantages. Tout d'abord il permet d'avoir une information sur la toxicité globale, systémique, d'un échantillon, sur un modèle mammifère donc plutôt proche de l'homme, et donne une indication sur la symptomatologie induite par cette toxicité. Il permet également de détecter en routine des toxicités émergentes. Enfin, ce test a jusque-là prouvé son efficacité en termes de protection du consommateur (AFSSA, 2006; Belin *et al.*, 2009).

2.2.2. Les méthodes alternatives au bio-essai sur souris

2.2.2.1. Les méthodes *in vivo*

Le bio-essai sur rat est la principale méthode *in vivo*, en parallèle du test souris, a avoir été développée pour la détection de toxines lipophiles. Le protocole consiste à nourrir des animaux à jeun depuis 24 h avec de la chair ou des hépatopancréas de coquillages et d'observer, 16 h après consommation, la consistance des déjections des rats (EFSA, 2008b).

Ce test présente l'avantage d'être moins invasif que le TS, mais peut uniquement être utilisé pour la détection de toxines induisant des symptômes diarrhéiques, et les résultats présentent une grande variabilité inter-individuelle (EFSA, 2008b). Ce test n'a jamais été communément utilisé, et n'a jamais fait l'objet d'une validation (Hess *et al.*, 2006).

2.2.2.2. Les méthodes *in vitro*

➤ Tests fonctionnels

Les bio-essais *in vitro* ont été proposés comme approche potentielle pour remplacer les tests de toxicité sur animaux vivants. Depuis un certain nombre d'années, des tests fonctionnels basés sur des lignées cellulaires sont utilisés pour l'identification de composés bioactifs issus d'organismes marins, qui peuvent avoir un potentiel thérapeutique ou au contraire, des effets délétères, selon le contexte (Mayer et Gustafson, 2003). L'application de ces tests cellulaires a été étendue à la détection, l'évaluation de la toxicité et l'étude du mécanisme d'action de diverses toxines marines (Rossini, 2005).

Les phycotoxines, et les métabolites bio-actifs en général, exercent leur activité en se liant à un ou plusieurs récepteurs cellulaires qui reconnaissent leur structure de façon spécifique, entraînant ainsi une cascade de réactions cellulaires définies. Les tests fonctionnels exploitent donc cette capacité de reconnaissance très sélective des récepteurs envers les propriétés structurales de leurs ligands. Les tests fonctionnels peuvent se baser sur un récepteur seul, ou sur une lignée cellulaire connue pour exprimer ce récepteur. L'intensité de la réponse sera en lien avec la quantité de composés bio-actifs interagissant avec le récepteur, interaction qui sera dépendante de l'affinité relative des différents analogues pour le récepteur, ainsi que de leur concentration molaire. Ainsi, au sein d'un groupe de composés partageant des caractéristiques chimiques, certaines molécules pourront ne pas réagir avec le récepteur s'ils ne possèdent pas les déterminants structuraux permettant cette reconnaissance (Rossini, 2005).

Utilisation de tests de cytotoxicité

De nombreuses lignées cellulaires ont donc été utilisées depuis le milieu des années 80 pour essayer de détecter des phycotoxines par le biais de leurs effets sur la croissance et la survie des cellules *in vitro*, telles que : des cellules du cilié *Tetrahymena pyriformis* (Shiraki *et al.*, 1985), des cellules de neuroblastome de souris de type Neuro2A (Kogure *et al.*, 1988; Jellett *et al.*, 1992; Jellett *et al.*, 1995; Cañete et Diogène, 2008; Caillaud *et al.*, 2012; Ledreux *et al.*, 2012; Sérandour *et al.*, 2012), de type NG105-15 (Cañete et Diogène, 2008; Cañete *et al.*, 2010; Cañete et Diogène, 2010) ou encore de type Be(2)-M17 (Leira *et al.*, 2001), des cellules fraîches d'hépatocytes de rat (Aune, 1989; Aune *et al.*, 1991), des cellules tumorales humaines KB (Amzil *et al.*, 1992; Tubaro *et al.*, 1996b), des fibroblastes de mammifères (Fessard *et al.*, 1994), des cellules de rein de singe (Crocì *et al.*, 1997), des neurones de cervelet (García-Rodríguez *et al.*, 1998), des cellules de cancer colorectal Caco-2 ou de cancer hépatique HepG2 humains (Flanagan *et al.*, 2001; Ledreux *et al.*, 2012; Sérandour *et al.*, 2012).

L'évaluation de la viabilité cellulaire est un des principaux paramètres utilisés pour la détection des toxines (Rossini, 2005). Différentes méthodes de coloration peuvent être utilisées, tel que le test MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium) ou le test de fixation du rouge neutre pour quantifier la viabilité cellulaire (Borenfreund et Puerner, 1985; Manger *et al.*, 1993; Tubaro *et al.*, 1996b). Cette viabilité cellulaire a pu également être appréciée au travers d'altérations morphologiques des cellules (Amzil *et al.*, 1992; Diogène *et al.*, 1995).

Utilisation de l'inhibition de protéines phosphatases

L'acide okadaïque, ainsi que des toxines de structure proche telles que les dinophysistoxins, sont des inhibiteurs spécifiques des PP1 et PP2A (Bialojan et Takai, 1988; Nishiwaki *et al.*, 1990). Un test fonctionnel fonctionnel, basé sur l'inhibition de l'activité de protéines phosphatases, a donc été développé par Holmes en 1991, puis le protocole a été modifié et adapté par la suite (Tubaro *et al.*, 1996a; Vieytes *et al.*, 1997; Cañete *et al.*, 2010).

Utilisation de marqueurs de toxicité

Certains tests cellulaires ont été développés pour détecter des toxines au travers de la mesure d'un paramètre spécifique qui sera fonction de l'effet toxique, et différent d'une unique évaluation de survie ou de mortalité cellulaire.

Ainsi, un test sur neuroblastomes Neuro2A a été développé pour la détection de neurotoxines, connues pour être des antagonistes des canaux sodiques (saxitoxines et tétrodotoxines), ou des agonistes de ces canaux (brevétoxines et ciguatoxines). Le test consiste en un pré-traitement des

cellules avec de la vératridine, parfois additionnée d'ouabaïne, qui provoquent l'ouverture des canaux sodiques ainsi que l'inhibition de pompes Na^+, K^+ -ATPase responsables de la sortie des ions sodium depuis l'intérieur des cellules. Les cellules n'étant ainsi plus capables de maintenir l'équilibre des ions sodium, l'ajout d'une neurotoxine antagoniste des canaux sodiques va inverser l'effet de la vératridine et favoriser la survie cellulaire. A l'inverse, l'ajout de neurotoxines agonistes des canaux sodiques va renforcer l'effet de la vératridine et entraîner une mortalité cellulaire (Kogure *et al.*, 1988; Rossini, 2005; Caillaud *et al.*, 2012).

Toujours sur le modèle Neuro2A, un autre bio-essai a été développé pour la détection de neurotoxines. Les cellules ont été transfectées avec un gène luciférase sous le contrôle d'un promoteur spécifique. L'induction de ce gène par les brévéttoxines par exemple induisait une activité luciférase d'une façon dose-dépendante, activité détectée à l'aide d'un luminomètre (Fairey *et al.*, 1997).

Concernant les toxines lipophiles, un test fonctionnel a été développé pour leur détection, basé sur la constatation que l'acide okadaïque et ses dérivés, ainsi que la yessotoxine, induisaient un détachement des cellules depuis leur support de culture, par perturbation des interactions cellules-cellules et cellules-support. La E-cadhérine est la protéine responsable de l'adhésion entre des cellules épithéliales, et le traitement de cellules de type MCF-7 (cancer du sein humain) avec de l'acide okadaïque ou de la yessotoxine induisait respectivement l'accumulation de composés de 135 kDa ou de 100 kDa, pouvant être détectés à l'aide d'un anticorps anti-E-cadhérine (Rossini, 2005).

La yessotoxine induit également, sur des lymphocytes, une diminution des niveaux d'AMP cyclique intracellulaires ainsi qu'une augmentation de l'activité phosphodiesterase (Alfonso *et al.*, 2003). Un test fonctionnel de détection de la yessotoxine, basé sur un dérivé fluorescent de l'AMP cyclique, a donc été développé. L'activité phosphodiesterase est mesurée par une diminution de la fluorescence en fonction du temps, conséquence de l'hydrolyse de l'AMP cyclique induite par la yessotoxine (Alfonso *et al.*, 2004).

➤ Les tests immunologiques

Les tests immunologiques pour la détection de toxines exploitent la capacité d'un anticorps spécifique à distinguer la structure tridimensionnelle d'une toxine spécifique. Les plus couramment rencontrés sont les tests ELISA, dont certains ont été proposés pour détecter différents types de toxines : l'acide okadaïque (Kreuzer *et al.*, 1999), les ciguatoxines (Tsumuraya *et al.*, 2012) ou encore l'acide domoïque (Smith et Kitts, 1995). Pour cette dernière toxine, le test ELISA a été développé et validé conformément à l'AOAC (*Association of Analytical Communities*) (EFSA, 2009a).

2.2.2.3. Mise en place de l'analyse chimique pour la surveillance des toxines lipophiles

Depuis le 1^{er} janvier 2010, l'analyse des toxines lipophiles est réalisée par la méthode CL-SM/SM (chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse), qui est devenue la méthode de référence pour la surveillance de ces toxines dans les coquillages. Cette méthode est applicable à la chair totale (analysée dans le plan de surveillance) aussi bien qu'à la glande digestive (analysées dans le plan de vigilance, car elle concentre davantage les composés à l'état de traces et permet donc de mieux détecter d'éventuels analogues émergents) des mollusques bivalves. Les moules sont utilisées comme espèce sentinelle pour la surveillance de ces toxines, et tant qu'elles ne sont pas toxiques, les autres coquillages peuvent être considérés comme non toxiques. Dans les zones à risque, un ou plusieurs lieux représentatifs sont choisis, et un échantillonnage hebdomadaire est réalisé tout au long de l'année. Des lieux de référence sont également choisis pour la vigilance, échantillonnés une fois par mois (REPHY, 2012).

Cette méthode a donc été retenue au niveau européen pour la quantification des quatre groupes de phycotoxines lipophiles réglementées ainsi que les deux groupes de phycotoxines lipophiles non réglementées, répertoriées pour leur action neurotoxique rapide sur souris (gymnodimines et spiroïdes), Tableau 8.

Tableau 8 : Groupes de phycotoxines recherchées par analyse chimique en CL-SM/SM.

Groupes de phycotoxines	Phycotoxines lipophiles recherchées
Toxines lipophiles réglementées	
Acide okadaïque (AO) et Dinophysistoxines (DTX)	AO, DTX-1, DTX-2, DTX-3 (acyles esters d'AO et/ou de DTX-1 et/ou de DTX-2)
Pectenotoxines (PTX)	PTX-1, PTX-2
Yessotoxines (YTX)	YTX, 45-OH-YTX, Homo-YTX, Homo-45-OH-YTX
azaspiracides (AZA)	AZA-1, AZA-2, AZA-3
Toxines lipophiles non réglementées	
Gymnodimines (GYMs)	GYM-A, GYM-B
Spiroïdes (SPXs)	SPX-13-desmethyl-C (SPX 1), SPX-A, SPX-B, SPX-C, SPX-D
Pectenotoxines (PTX)	PTX2sa, PTX2sa épi, PTX-6
Yessotoxines (YTX)	COOH-YTX, Homo-COOH YTX

Question : Pourquoi le test souris, avec tous les inconvénients qu'il comporte, est-il resté pendant des années la méthode de référence pour la détection des toxines lipophiles, sans émergence d'une méthode alternative fiable ?

1- Une des principales limitations au développement de méthodes alternatives a été la faible disponibilité commerciale de standards de toxines. Ces standards sont généralement obtenus par extraction et purification de cultures à grande échelle de micro-algues toxiques, ou de coquillages contaminés (Hess *et al.*, 2007). Les laboratoires possédant ces compétences sont rares dans le monde, car cette activité est très coûteuse à développer et maintenir. Ainsi, à ce jour la source unique de matériels et de standards de référence certifiés est l'*Institute for Marine Biosciences, National Research Council of Canada* (NRCC). Certains groupes de recherche ont travaillé à synthétiser des toxines, de structure généralement très complexe (Armstrong *et al.*, 1989; Ley *et al.*, 1998; Nicolaou *et al.*, 2003; Fleming et Du Bois, 2006; Nicolaou *et al.*, 2006; Kong *et al.*, 2009), mais de très faibles quantités ont pu être obtenues, cette approche étant également laborieuse et coûteuse. Ainsi, la mise en place de méthodes alternatives, nécessitant une consommation d'échantillons précieux, est restée limitée. Une autre limitation émane de la Convention sur l'interdiction des armes chimiques, qui limite l'accès des laboratoires à certaines toxines, notamment les PSP (Hooijschuur *et al.*, 2002).

2- La découverte des toxines marines est un domaine d'une très grande dynamique, ce qui représente un challenge pour les pharmacologistes, toxicologues et biochimistes intéressés par les mécanismes moléculaires par lesquels ces composés affectent les systèmes biologiques. Ainsi, l'enrichissement régulier des panels de toxines par de nouveaux analogues ou de nouvelles toxines, détectés dans différents types de coquillages et dans différentes zones géographiques, implique de comprendre dans un premier temps leur toxicité propre, puis d'évaluer leur risque et enfin de développer des outils additionnels pour leur détection (Rossini, 2005).

3- Malgré les inconvénients qu'il présente, le test de toxicité aigüe sur souris fournit une information sur la toxicité globale d'un échantillon, sur un organisme mammifère entier.

4- Les matrices de coquillages représentent une limitation au développement de méthodes alternatives au test souris, leur complexité entraînant de nombreuses interférences avec les tests (Malaguti *et al.*, 2002b; Rossini, 2005).

3. Conclusion

L'étude des populations de phytoplancton et des phycotoxines qu'elles peuvent produire est un secteur en perpétuelle évolution. La compréhension des effets induits chez l'homme par ces molécules, de leurs mécanismes d'action, de leur toxicité aigüe ou chronique, et ce à l'aide de modèles *in vitro* ou *in vivo*, de type biochimique, cellulaire ou sur organismes entiers, progresse continuellement. De nouveaux analogues des différentes toxines sont découverts régulièrement, dont la toxicité pour l'homme est inconnue. Certaines toxines, retrouvées de façon habituelle dans des zones géographiques définies, sont détectées dans de nouvelles régions du monde.

Jusqu'en 2010, la méthode officielle de surveillance des toxines lipophiles dans les mollusques bivalves était le test de toxicité aiguë sur souris, remplacé par l'analyse chimique par CL-SM/SM. Cependant les plans de vigilance font toujours appel à ce bio-essai sur souris pour la détection de toxines émergentes.

Pour diverses raisons, notamment éthiques et méthodologiques, le test de toxicité aiguë sur souris est largement décrié. Cependant, à ce jour aucune méthode alternative de détection de toxines émergentes n'a été validée, qu'elle soit sur d'autres modèles *in vivo* ou sur des modèles *in vitro*. Pour assurer la sécurité des consommateurs de coquillages, tout en faisant appel à des méthodes acceptables sur le plan éthique et solides sur le plan méthodologique, la nécessité de développer de nouveaux moyens de détection des toxines émergentes s'impose. Ce travail de thèse se place donc dans ce contexte, avec pour objectif principal le développement de différents types de bio-essais pour la détection de composés lipophiles issus de micro-organismes marins. Un unique test biologique apparaissant trop restreint pour pouvoir détecter des mécanismes d'action potentiellement très divers, une suite de 3 bio-essais a donc été préférée : un test de cytotoxicité sur cellules tumorales KB, un test d'activité aiguë sur larves de diptères, et des tests d'activités antibactériennes, essentiellement sur bactéries marines.

Au cours de cette étude, les travaux se sont focalisés plus particulièrement sur certaines micro-algues toxiques, et les motivations pour leur sélection sont récapitulées ci-dessous.

Motivations pour le choix de l'étude de l'AO, produit par *Prorocentrum lima*

Cette toxine est retrouvée de façon globale dans le monde et est régulièrement responsable d'intoxications alimentaires. Elle représente une toxine de référence, il est donc important d'évaluer la capacité de la suite d'essais à la détecter. Au moins un mécanisme d'action de l'AO est bien connu – l'inhibition de protéines phosphatases, impliquées dans de très nombreux mécanismes cellulaires – donc il est intéressant de voir la capacité de tests à détecter ce type de mécanisme d'action. Cette toxine a été testée sur de nombreuses lignées cellulaires différentes, ce qui constitue une base de données de référence. Enfin des étalons de l'AO peuvent s'obtenir auprès de fournisseurs habilités.

Motivations pour le choix de l'étude de l'AZA1, produit par *Azadinium spinosum*

Ces toxines ont été détectées récemment sur les côtes européennes, et sont régulièrement retrouvées dans des mollusques bivalves, notamment des moules. La symptomatologie induite par des intoxications aux AZA est particulière, avec des manifestations à la fois neurologiques et digestives. Plusieurs études rapportent les effets cytotoxiques d'AZA1 notamment, donc un référentiel intéressant commence à être constitué. Le ou les mécanismes d'action des AZA ne sont pas encore élucidés, donc il est intéressant de voir si les bio-essais mis en place peuvent orienter vers un mécanisme d'action particulier. Les étalons d'AZA1, AZA2 et AZA3 sont maintenant disponibles à de faibles quantités, ce qui favorise le développement d'études sur des modèles *in vitro*.

Motivations pour le choix de l'étude de la PnTX-G, produite par *Vulcanodinium rugosum*

Le profil de toxicité des pinnatoxines est intrigant, avec une toxicité sur souris importante à la fois par voie *i.p.* et par voie orale, sans pour autant que d'intoxication humaine soit mise en évidence. Au cours du travail de thèse, une équipe de l'Ifremer de Concarneau a identifié l'organisme producteur en Méditerranée et l'a nommé *V. rugosum* (Nézan et Chomérat, 2011). Cet organisme, producteur spécifiquement de PnTX-G, a donc rapidement été mis en culture au laboratoire, ce qui a permis d'accéder à une biomasse suffisante pour des tests biologiques et des protocoles de purification. Cette toxine est considérée comme émergente sur les côtes françaises, et peu - voire pas - de données d'activité sont disponibles sur des modèles biologiques autres que le modèle souris. Enfin, le mécanisme d'action de certaines PnTX étant élucidé, il est intéressant de regarder si la suite de bio-essais mise en place est capable de détecter ce mécanisme d'action particulier.

Chapitre 2 – *Méthodologie* : Adaptation de tests
biologiques à l'étude de micro-organismes issus du
milieu marin

1. Introduction

Le milieu marin est connu pour renfermer une très grande diversité à la fois biologique et chimique, qui, du point de vue de pharmacologues ou de toxicologues, se traduit par la production de molécules présentant une très grande diversité de mécanismes d'action (Blunt *et al.*, 2013). Comme il a été vu dans le chapitre précédent, les toxines marines reflètent bien ce large panel d'activités : les toxines lipophiles issues de micro-organismes marins présentent des mécanismes d'action qui peuvent être très différents et dont certains ne sont que partiellement connus. L'AO et les DTX agissent sur les PP1 et PP2A (Flanagan *et al.*, 2001; Larsen *et al.*, 2007), les AZA agiraient en partie sur des protéines du cytosquelette (Twiner *et al.*, 2005), les imines cycliques et notamment les PnTX agissent sur les récepteurs nicotiniques à acétylcholine (Araoz *et al.*, 2011), les PTX agiraient sur les fibres d'actine du cytosquelette (Ares *et al.*, 2007) et les YTX ont un mécanisme d'action encore inconnu (Rossini et Hess, 2010).

Les principales études visant au développement de tests alternatifs au bio-essai sur souris pour la détection de toxines émergentes sont de type fonctionnel, cellulaire ou immunologique. Il est important de rappeler que toutes ces études proposent le développement d'un test unique de détection, et ce pour une catégorie précise de toxines. Or il semble peu probable qu'un seul et unique test, qu'il soit *in vivo* ou *in vitro*, fonctionnel, cellulaire ou immunologique, soit capable de détecter la grande variété de mécanismes d'action que peuvent présenter les biotoxines marines.

L'objectif de ce travail de thèse étant de développer une méthode alternative de détection de toxines marines connues ou inconnues, le choix a été fait de se focaliser non pas sur un test unique, mais sur une suite de tests qui présenteraient une certaine complémentarité, et ce afin d'élargir le champ de détection de la méthode.

La majorité des phycotoxines connues présentent une activité cytotoxique ou neurotoxique. Des tests généraux pour détecter de telles activités semblaient donc intéressants pour composer un panel. Ainsi, deux types de bio-essais ont été choisis : un test de cytotoxicité sur lignée de cellules tumorales KB, et un test d'activité aigüe sur larves du diptère *Calliphora vomitoria*. Cette étude s'étant également intéressée à la présence de micromycètes en zones conchylicoles, un test pharmacologique supplémentaire a été ajouté aux deux autres. Les champignons marins ayant été régulièrement rapportés pour présenter des activités antibactériennes notoires (Mayer *et al.*, 2007; Mayer *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009), un test d'inhibition de la croissance bactérienne pour étudier ces souches fongiques marines a donc été sélectionné, avec un focalisation plus particulièrement sur des bactéries d'origine marine.

Ce chapitre présente les modifications des protocoles du test de cytotoxicité et du test sur larves de diptères, réalisés en routine au laboratoire MMS, pour les adapter aux objectifs de la thèse. Les tests antibactériens ont été mis en place au laboratoire Phycotoxines, qui ne disposait pas de la compétence en routine pour la réalisation de ces tests. Ces derniers ont donc du être développés dans leur intégralité.

2. Test de cytotoxicité sur cellules KB

2.1. Historique

La lignée KB, référencée à l'ATCC (*American Type Culture Collection*) sous le code CCL-17TM, a été isolée pour la première fois en 1954 par H. Eagle, d'un cancer du nasopharynx d'un adulte (Eagle, 1955). *In vitro*, ces cellules sont adhérentes et forment une couche monocellulaire, cette lignée est donc définie comme épidermoïde. Les cellules ont une forme polygonale et sont réfringentes (Figure 17).

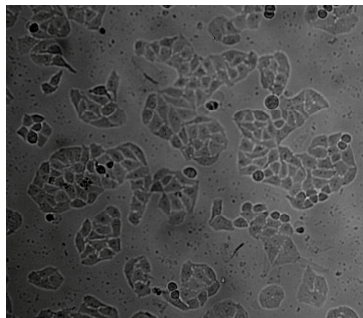


Figure 17 : Photographie des cellules KB prise au microscope électronique à transmission.

Cette lignée est utilisée depuis les années 1960 dans les programmes du *National Cancer Institute* (NCI) en tant que bio-essai pour le criblage d'activités anti-tumorales dans des extraits de plantes. A l'origine, le test sur cellules KB a été développé comme outil de criblage en parallèle d'études *in vivo* : l'activité d'extraits de plantes était évaluée *in vivo* et le fractionnement bio-guidé était réalisé avec les cellules KB. A l'époque, il avait été démontré que la grande majorité des anticancéreux présents sur le marché ou en cours d'évaluation préclinique étaient actifs sur les cellules KB (Perdue, 1982).

La stabilité de ces cellules au cours des repiquages confère une bonne reproductibilité aux résultats. Cette lignée présente une facilité d'entretien, nécessite peu d'équipement et est donc au final peu coûteuse.

2.2. Motivations pour le choix de ce test

Le choix d'intégrer un test de cytotoxicité sur lignée cellulaire dans un panel d'essais pour la détection de toxines vient d'une part du contexte bibliographique. En effet, il a été rappelé dans le Chapitre 1, que l'activité de plusieurs toxines a été évaluée sur de nombreuses lignées de cellules, tumorales ou saines. L'AO, DTX, AZA, PTX, YTX présentent divers niveaux d'activités sur des lignées saines ou tumorales (Jung *et al.*, 1995;

Twiner *et al.*, 2005; Malagoli *et al.*, 2006; Tubaro *et al.*, 2008). La probabilité de pouvoir détecter un certain nombre de toxines avec un test cellulaire étant très élevée, il était donc pertinent de se focaliser sur ce type de test. De plus, un test basé sur des modifications de la morphologie des cellules KB a été développé pour la détection de l'AO (Amzil *et al.*, 1992). Il avait été démontré par la suite que ces modifications morphologiques étaient liées aux effets apoptotiques induits par l'AO, et spécifiques des toxines du groupe de l'AO (Pouchus *et al.*, 1997).

De plus, dans ce travail de thèse, la recherche de composés lipophiles bio-actifs s'est faite dans un but sanitaire, pour contribuer à l'évaluation de la salubrité des mollusques bivalves, mais également dans un but pharmacologique, pour la découverte de molécules potentiellement valorisables. Les cellules KB faisant partie du panel de lignées cellulaires du NCI pour le criblage de molécules anticancéreuses, le laboratoire MMS avait sélectionné ce modèle pour ses propres recherches d'activité dans les champignons marins. Cette lignée présente également le grand avantage d'être robuste, peu sensible à des variations des conditions de culture et peu sensible à l'ajout d'antibiotiques dans le milieu de culture pour assurer sa stérilité.

2.3. Connaissances méthodologiques sur le test

Le test de cytotoxicité sur cellules KB est utilisé en routine au laboratoire MMS pour la recherche d'activités d'extraits et de molécules issus de champignons marins. Ces protocoles classiques sont détaillés par la suite.

2.3.1. Entretien et repiquage

Les cellules KB sont maintenues à 37°C, dans une atmosphère enrichie à 5% de CO₂. Elles sont cultivées dans du milieu Basal Medium Eagle (BME, Sigma-Aldrich), enrichi en sérum de veau fœtal à 5% (v/v) ainsi qu'en L-glutamine, pénicilline G et streptomycine (Sigma-Aldrich) de façon à atteindre des concentrations finales respectives de 400 nM, 20 U.mL⁻¹ et 100 µg.mL⁻¹. La culture est réalisée dans des flasques (Dutscher), les cellules présentent un temps de doublement de 48 h et sont donc entretenues par des repiquages toutes les 48 h ou 72 h, lorsqu'elles arrivent à confluence. Le repiquage est réalisé selon le protocole suivant : le milieu de culture contenu dans les flasques est jeté, puis les cellules sont rincées trois fois avec du PBS (Phosphate Buffered Saline, Sigma-Aldrich). Selon la taille de la flasque, de 1 à 3 mL d'une solution de trypsine à 0,25% (Sigma-Aldrich) sont ajoutés. L'enzyme est laissée au contact des cellules pendant 1 min afin de digérer les protéines membranaires permettant l'adhésion des cellules entre elles et sur le support et, puis l'excès de trypsine est jeté et l'enzyme est de nouveau laissée au contact des cellules pendant 10 min. Lorsque les cellules sont devenues rondes (observation au microscope), l'action de la trypsine est arrêtée par ajout de 10 mL de milieu de culture. Les cellules sont ensuite décollées par aspirations et refoulements successifs à l'aide d'une pipette. Pour un repiquage simple, un aliquot de solution cellulaire est dilué dans du milieu neuf. Par exemple, pour une flasque de 75 cm², 5 mL de solution cellulaire sont dilués dans 20 mL de milieu neuf.

2.3.2. Préparation des extraits

Les extraits ou composés à tester sont initialement solubilisés dans du méthanol (MeOH, Sigma-Aldrich) puis dilués dans du milieu de culture de façon à atteindre une concentration finale en MeOH de 5% dans le puits. Il a été démontré préalablement au laboratoire que ce solvant était le mieux toléré par les cellules KB, et que cette concentration de 5% n'interférait pas avec le test.

2.3.3. Déroulement du test

Les tests de cytotoxicité sont réalisés dans des microplaques 96 puits (Dutscher), sans inoculation des puits périphériques pour limiter les phénomènes d'évaporation. Le déroulement du test se fait de la façon suivante : les microplaques sont tout d'abordensemencées avec un nombre défini de cellules. Pour réaliser un dénombrement des cellules, les étapes identiques au repiquage sont réalisées, jusqu'à reprise des cellules décollées dans du milieu de culture. Un aliquot de la solution cellulaire est ensuite déposé sur cellule de Malassez et le dénombrement est réalisé sous microscope. La solution cellulaire est ensuite diluée dans du milieu de culture de façon à obtenir une solution à 2×10^5 cell.mL⁻¹. Cinquante μ L de cette solution sont déposés par puits, ce qui correspond à une quantité finale de 10 000 cellules par puits.

Les microplaques inoculées sont mises à incuber pendant 48 h afin que les cellules arrivent quasiment à confluence et les solutions à tester sont déposées sur les cellules. La plus forte concentration en extraits évaluée est de 100 μ g.mL⁻¹, puis des dilutions par 2 sont réalisées dans du milieu de culture contenant du MeOH 5%. Les microplaques traitées sont ensuite mises à incuber pendant 72 h. Un contrôle solvant est réalisé afin de vérifier l'innocuité des 5% de MeOH sur les cellules KB. Les extraits sont déposés dans les puits en duplicata ou triplicata, et les essais sont réalisés deux fois.

2.3.4. Evaluation de la cytotoxicité par le MTT

Le MTT est du bromure de 3-(4,5-diméthyl-2-thiazolyl)-2,5-diphényl-2H-tétrazolium. Le test MTT se base sur le protocole établi par Mosmann en 1983 et revu par Denizot et Lang en 1986. Le principe de ce test est basé sur l'activité enzymatique mitochondriale : les déshydrogénases des mitochondries des cellules KB coupent le noyau tétrazolium et métabolisent le MTT, de couleur jaune, en formazan violet qui cristallise. En présence de composés toxiques, un certain nombre de cellules meurent et ne présentent donc plus d'activité enzymatique mitochondriale. Le MTT n'est donc plus métabolisé en cristaux de formazan.

Au bout des 72 h d'incubation, 50 μ L de réactif MTT (Sigma-Aldrich) préparé à 5 mg.mL⁻¹ dans du

PBS sont déposés dans chaque puits, et les microplaques sont remises à incuber pendant 3 h à 37°C, sous atmosphère enrichie à 5% de CO₂. Après ce délai, le surnageant de chaque puits est éliminé et 100 µL de tampon de lyse préparé extemporanément (isopropanol / 0,04% HCl 1N) sont ajoutés dans chaque puits afin de solubiliser les cristaux de formazan formés. Après homogénéisation, les absorbances à 570 nm (longueur d'onde d'absorbance de la solution de formazan) et à 630 nm (mesure du bruit de fond) sont lues avec un spectrophotomètre (Lecteur de microplaques ELx800™, Universal Microplate Reader, Bio-Teck® Instruments, INC).

2.3.5. Interprétation des résultats

L'absorbance relative étant proportionnelle au nombre de cellules vivantes dans le puits, la courbe représentant le pourcentage d'inhibition de la viabilité en fonction de la concentration par rapport au témoin solvant est tracée à l'aide du logiciel Excel (Microsoft Office Excel 2007), ou modélisée à l'aide du logiciel GraphPad Prism (GraphPad Prism, version 5.0c, San Diego, USA).

2.4. Adaptations de protocoles mises en place

2.4.1. Adaptation pour une étude avec différentes durées d'incubation

Les tests de cytotoxicité sur cellules KB faisant appel à des réactifs de type MTT, sont généralement réalisés sur une durée totale de 72 h (Halle, 2003). En effet, les cellules KB présentent un temps de doublement cellulaire de 48 h, donc une durée d'incubation de 72 h permet d'augmenter les chances de détecter un composé actif sur leur croissance. Le délai d'apparition d'une activité sur cellules peut renseigner de façon très préliminaire sur ce type d'activité. Un composé cytostatique agira plutôt sur le cycle cellulaire, et dans le cas des cellules KB, cette activité sera donc détectable après 48 h d'incubation. A l'inverse, un composé cytotoxique au sens strict agira plus rapidement sur les cellules et l'activité devrait être détectable sans qu'il y ait eu de division cellulaire. A noter que d'une façon générale, le terme de cytotoxicité est employé pour parler d'une activité sur lignée cellulaire, sachant que cette activité peut être de type cytostatique. Dans le cas présent, le terme de cytotoxicité stricte sera donc employé pour faire référence à un composé dont l'activité est détectable en moins de 48 h.

Le test de cytotoxicité sur cellules KB est donc réalisé en routine avec une durée totale d'incubation de 72 h. Or, pour le développement d'un test destiné à évaluer la salubrité des coquillages, ce temps peut sembler relativement long. Il a donc été décidé d'évaluer trois temps d'incubation : 24, 48 et 72 h. Le protocole d'ensemencement des plaques a donc du être modifié, d'une part pour obtenir une confluence cellulaire correcte et d'autre part pour s'adapter aux jours ouvrés de la semaine, puisque le test doit pouvoir éventuellement être adapté en routine dans des laboratoires de surveillance. Initialement, les tests étaient donc réalisés selon le déroulement décrit Tableau 9. Le délai entre l'ensemencement des plaques et le dépôt des extraits était de 48 h. Ce temps a du être rallongé à 72 h pour le nouveau protocole mis en place.

Tableau 9 : Modifications du déroulement du test de cytotoxicité sur cellules KB afin de l'adapter à un protocole impliquant différents temps d'incubation.

Protocole initial	J0 (mercredi)	J+2 (vendredi)	J+5 (lundi)		
	Ensemencement des plaques	Dépôt des extraits	Révélation des plaques		
Protocole mis en place	J0 (vendredi)	J+3 (lundi)	J+4 (mardi)	J+5 (mercredi)	J+6 (jeudi)
	Ensemencement des plaques	Dépôt des extraits	Révélation de la plaque T24h	Révélation de la plaque T48h	Révélation de la plaque T72h

Les puits des microplaques ont été chargés avec 100 μL de solution cellulaire au lieu de 50, afin que les cellules ne soient pas carencées au bout de 72 h d'incubation. Le nombre de cellules déposées par puits a été diminué, afin de limiter la confluence du tapis cellulaire, ce qui risquerait de diminuer la sensibilité du test. Les puits ont donc été chargés avec une solution de $7 \times 10^4 \text{ cell.mL}^{-1}$. Afin de vérifier que le protocole initial et le nouveau protocole développé conduisaient au même résultat, des extraits bruts de champignons présentant des activités importantes, moyennes et nulles sur cellules KB ont été testés avec les deux protocoles. Les activités observées étant identiques, le nouveau protocole a donc été retenu.

2.4.2. Remplacement du MTT par du XTT

Le XTT est du 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium et a été utilisé en remplacement du réactif MTT. A l'origine, le développement du test XTT a été fait dans le but de simplifier la procédure MTT en supprimant l'étape d'élimination du colorant et d'ajout de l'isopropanol / 0,04% HCl 1N. En effet, le XTT est métabolisé par les cellules viables en cristaux de formazan qui sont directement solubles dans le milieu de culture. Ceci permet une lecture de la densité optique immédiatement après les 4 h d'incubation avec le XTT, sans étape de solubilisation (Scudiero *et al.*, 1988). Ce changement de réactif procure certains avantages, comme :

- La suppression de deux étapes permet un gain de temps ainsi qu'une diminution de la variabilité des résultats due à l'expérimentation.
- L'abandon de l'isopropanol pour solubiliser les cristaux de formazan est particulièrement intéressant car ce solvant est d'une très grande volatilité ce qui peut entraîner une évaporation différentielle dans les puits, rendre son pipetage imprécis et produire des vapeurs nocives pour l'expérimentateur.

Comme précédemment, des extraits bruts de champignons présentant différentes activités ont été évalués avec les deux réactifs, MTT et XTT, et les mêmes niveaux d'activité ont été retrouvés.

2.4.3. Choix d'un témoin positif

L'utilisation d'un témoin positif est indispensable dans le développement d'un test. Le témoin positif choisi pour le test KB est un composé fongique, l'acide pénicillique (AP). Cette molécule avait été identifiée au préalable au laboratoire dans la souche MMS351, et plusieurs mg de ce composé avaient pu être cristallisés. L'AP est également disponible chez des fournisseurs tels que Sigma-Aldrich. La CI_{50} de l'AP est de $8,3 \pm 1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, et le test était donc considéré comme correct si cette CI_{50} était comprise entre 7,3 et $9,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

2.4.4. Augmentation de la quantité de sérum de veau fœtal

La culture des cellules KB est réalisée dans du BME supplémenté en SVF à 5%, qui procure des facteurs de croissance indispensables aux cellules. Cependant, l'ATCC recommande l'utilisation de 10% de SVF pour l'entretien de ces cellules. Afin de voir si cette quantité de SVF avait un effet sur le test, des concentrations de 10% et 20% ont été évaluées. La toxine AZA1 a été testée sur des cellules cultivées dans du milieu supplémenté à 5, 10 ou 20% de SVF, avec des révélations à 24, 48 et 72 h. Il ressort de cet essai que la sensibilité des cellules a été réduite avec l'augmentation des facteurs de croissance, c'est-à-dire avec 10 et 20% de SVF. La concentration de 5% a donc été conservée pour le déroulement du test.

2.5. Conclusion sur le développement du test de cytotoxicité sur cellules KB

Le test KB était utilisé en routine au laboratoire MMS pour le screening d'extraits fongiques. Les travaux de cette partie ont donc consisté à adapter les différents protocoles de culture, de déroulement du test et d'évaluation de la viabilité cellulaire pour un objectif de détection de toxines de micro-organismes marins dans le cadre d'un plan de vigilance. Ainsi différents temps d'incubation (24, 48 et 72 h) ont été étudiés, d'une part pour tenter de réduire la durée du test, initialement de 72 h, et d'autre part pour développer un protocole permettant éventuellement de discriminer une activité cytotoxique d'une activité cytotatique. Il sera ainsi intéressant, par la suite, de tester des molécules pures connues pour présenter une activité plutôt cytotatique ou plutôt cytotoxique, et de comparer les délais d'apparition d'un effet sur les cellules KB. Le protocole de révélation de la viabilité cellulaire a été simplifié par remplacement du MTT par du XTT. Cependant, cette modification de protocole entraîne un coût supplémentaire de la manipulation, le XTT étant un réactif plus cher que le MTT.

Les protocoles faisant appel au XTT ou au MTT sont détaillés en Annexe 2.

3. Test sur larves de diptères

3.1. Historique et motivations pour le choix de ce test

Un test de toxicité aiguë sur larves de diptères a été initialement développé par Zlotkin *et al.* en 1971 dans le but d'évaluer le potentiel neurotoxique de venins de scorpions. D'autres études rapportent l'utilisation de ces organismes pour évaluer la neurotoxicité de divers composés par injection dans les larves (Zdarek et Fraenkel, 1987; Ruiz *et al.*, 2010) ou par consommation de produits contaminés par des toxines par les larves (Labrousse *et al.*, 1992). Cependant, ce protocole d'ingestion de matières toxiques est long et lourd à mettre en place : il implique de déposer les larves au contact des substances toxiques pendant près de 24 h, puis la toxicité de l'échantillon peut être évaluée par la mort ou la survie de la larve, voire par une inhibition de la croissance mesurée par la perte de poids (Labrousse *et al.*, 1992). A l'opposé, l'injection de substances neuro-actives à des larves de diptères donne un résultat visible presque immédiat, et est relativement simple à mettre en œuvre. C'est donc ce test par injection qui a été développé au laboratoire, afin d'étudier le potentiel neuro-actif de phycotoxines et de mycotoxines. Ainsi, au cours d'un précédent travail de thèse réalisé au laboratoire, il avait été démontré que des phycotoxines telles que la saxitoxine, la tétrodotoxine, la brevétoxine, l'acide domoïque ou encore l'acide okadaïque et des mycotoxines telles que la patuline ou l'ochratoxine A, induisaient une paralysie des larves, démontrant un potentiel de ce test pour la détection de toxines (Denardou, 1998). Depuis, l'utilisation de ce test a permis de démontrer que l'activité neurotoxique de l'acide domoïque pouvait être potentialisée par les peptaïbols, qui sont des peptides fongiques produits par des champignons du genre *Trichoderma* en milieu marin (Ruiz *et al.*, 2010). Enfin, ce test a également permis au laboratoire d'isoler par bioguidage l'acétate de fulvol, molécule originale neuroactive extraite du corail tropical *Rhytisma fulvum*, ayant fait l'objet d'un brevet en 2004 (Petit *et al.*, 2010).

L'utilisation de ce test est donc tout à fait pertinente dans le contexte de cette étude. Le test est simple à mettre en œuvre et peu onéreux car ne faisant pas appel à des équipements ou techniques particulières. Il utilise un organisme entier qui est un invertébré, mais qui n'appartient pas à la catégorie des animaux selon la directive 86/609/CEE qui définit un animal comme un « vertébré non humain ». Il n'y a donc pas de conflit réglementaire induit par l'utilisation potentielle des larves pour un test de vigilance, et le problème éthique, inhérent au test souris, n'a ici plus – ou moins – lieu d'être. Il présente un caractère de miniaturisation car il nécessite beaucoup moins d'extrait que le test souris. De plus, il a été démontré que les résultats du test larve obtenus avec différents types de toxines étaient du même ordre de grandeur que des doses létales (DL₅₀) obtenues avec le test souris (Denardou, 1998).

3.2. Modèle d'étude

Les organismes utilisés sont des larves de la mouche *Calliphora vomitoria* au stade larvaire III, précédant la nymphose en pupes qui donnera le stade imago, forme définitive d'un insecte. Le genre *Calliphora* appartient à l'embranchement des Arthropodes, la classe des Insectes et l'ordre des Diptères. D'une façon générale, les Diptères comprennent les Insectes possédant 2 ailes membraneuses (ailes 1), 2 balanciers (homologues des ailes postérieures), un appareil buccal adapté à la succion ou à la piqûre, des tarses composés de 5 articles. Ce dernier caractère, ainsi que la morphologie du thorax et des pièces buccales, permettent de caractériser un Insecte Diptère. Le genre *Calliphora* pourra être identifié plus particulièrement par la morphologie des balanciers ou encore des organes reproducteurs (Séguy, 1951). L'espèce *C. vomitoria* est très proche de *C. erythrocephala*, ces 2 espèces ne différant que par la couleur de la basicosta (structure à la base de l'aile), noire chez *vomitoria* et jaune chez *erythrocephala* (Séguy, 1951).

Les larves de *Calliphora* spp. représentent un modèle bien connu depuis de nombreuses années : ces organismes ont été régulièrement utilisés pour la compréhension de divers mécanismes physiologiques chez les insectes. Ces larves ont fait l'objet d'études portant sur les hormones contrôlant la pupaison et la mue, sur les phénomènes morphologiques de la métamorphose ou encore sur la composition de l'hémolymphe (Séguy, 1951; Chauvin, 1956; Raccaud-Schoeller, 1980).

Comme chez les autres mouches, les larves de *Calliphora* présentent notamment les différents éléments anatomiques suivants (Figure 18) : une tête extrêmement réduite constituée uniquement d'une capsule mandibulaire (bouche et crochets buccaux) ; un corps apode constitué de 11 à 15 segments ; un système respiratoire constitué de deux troncs trachéens s'ouvrant par les deux stigmates postérieurs ; un système digestif constitué de l'intestin, de caeca digestifs, des glandes salivaires et du jabot ; un tissu adipeux ; des tubes de Malpighi ; un système nerveux ventral. Tous ces organes baignent dans un seul compartiment d'hémolymphe.

Le système nerveux des larves est plus primitif que celui de l'imago. Il est constitué d'une chaîne ganglionnaire composée de 3 ganglions thoraciques (ganglions cérébroïdes, ganglion proventriculaire) et d'une paire de ganglions par segment abdominal. Les nerfs irradient de cette chaîne ganglionnaire (Figure 19). Les disques imaginaires céphaliques antennaire et oculaire constituent les formes embryonnaires de ces futurs organes. L'anneau de Weismann représente la forme condensée du système endocriné de l'insecte adulte (Grassé, 1951; Raccaud-Schoeller, 1980).

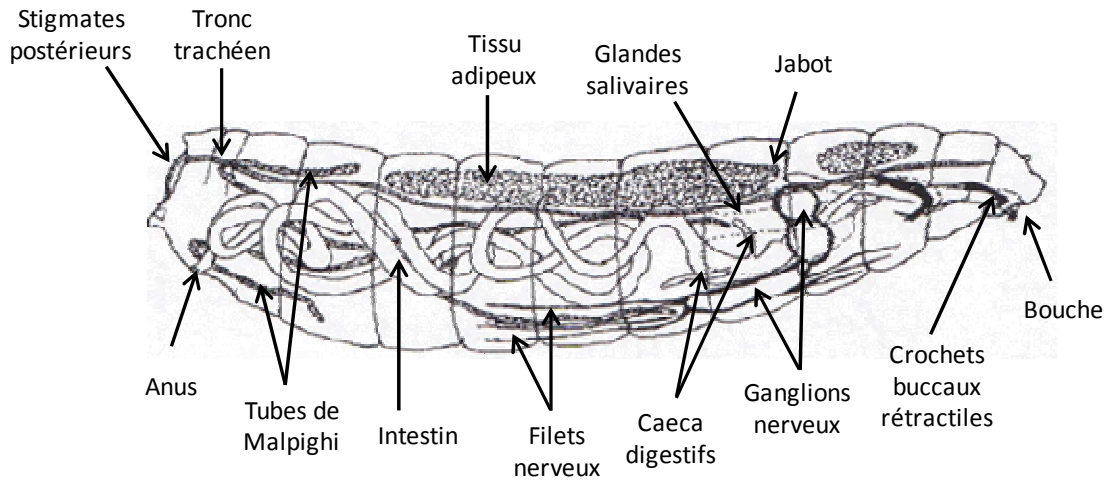


Figure 18 : Schéma de la morphologie interne d'une larve de *Calliphora* (d'après Grassé, 1951 et Séguy, 1951).

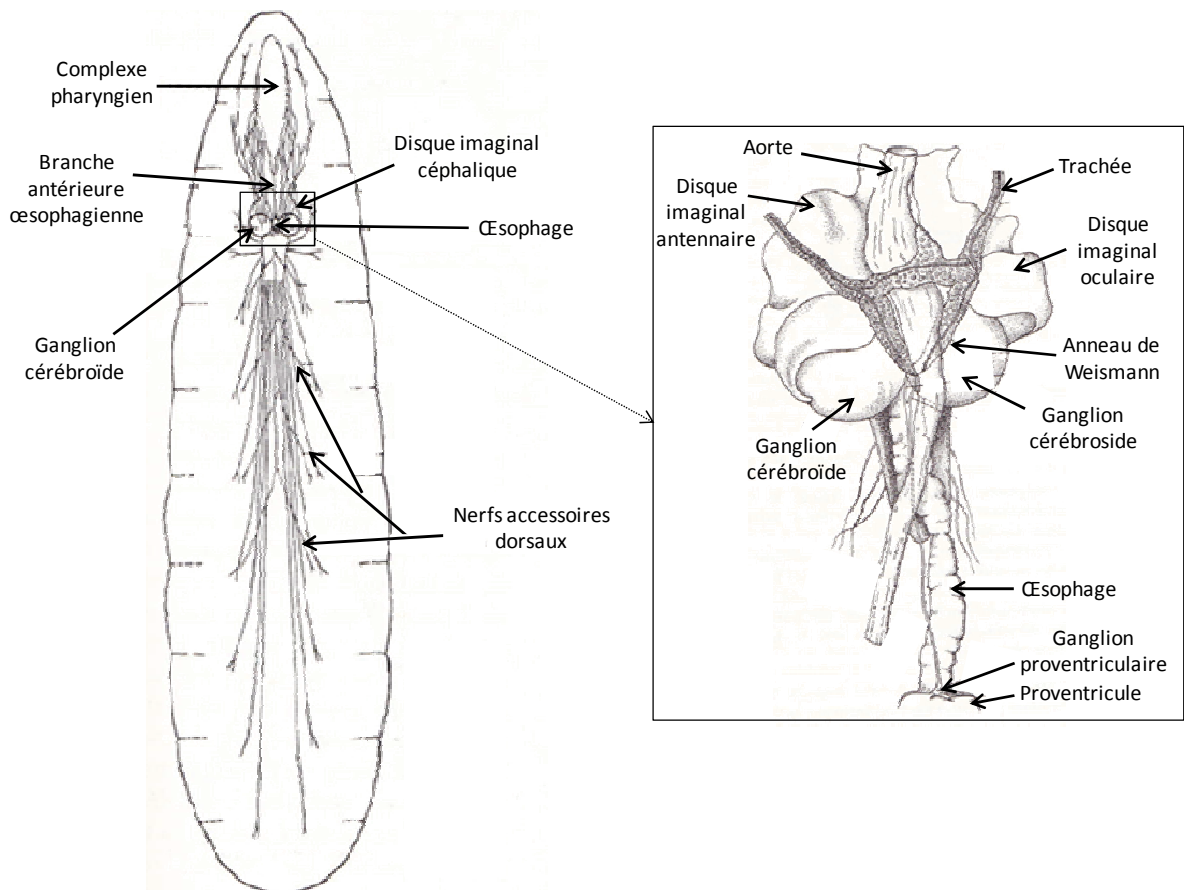


Figure 19 : Schéma du système nerveux d'une larve de *Calliphora* sp. (d'après Grassé, 1951).

3.3. Connaissances méthodologiques du test de toxicité sur larves de diptères par injection

3.3.1. Obtention des larves

Les larves sont produites par la Verminière de l'Ouest qui commercialise divers appâts vivants pour la pêche. Elles peuvent donc être obtenues dans des magasins de vente d'articles de pêche sous le nom d' « asticots blancs ». Les mouches adultes sont nourries avec de l'eau et du sucre, et les larves avec coproduits de l'industrie alimentaire humaine. Les larves ne reçoivent aucun type de traitement particulier. Elles sont stockées à 4°C en boîtes contenant de la sciure, et sont remises à température ambiante au moins 30 min avant les tests.

3.3.2. Mode opératoire

Les larves reçoivent 1 μL de solution pour 10 mg de poids corporel. Le poids moyen d'une larve est défini pour chaque nouveau lot, ou lorsqu'un lot n'a pas été utilisé pendant un certain temps. Pour cela, 10 larves sont pesées ensemble et le poids moyen est calculé. L'opération est répétée avec 10 autres larves et le poids moyen des 2 pesées est calculé. Le poids moyen d'une larve étant généralement compris entre 70 et 85 mg, le volume d'injection par larve est de 7 à 8,5 μL selon le lot. L'injection est réalisée à l'aide d'une microseringue de précision de 10 μL munie d'une aiguille hypodermique. L'aiguille est insérée face ventrale, au niveau du renflement situé à l'arrière de l'anus de la larve (Figure 20). L'échantillon est alors injecté lentement et dès la fin de l'injection, le chronomètre est déclenché. La larve est ensuite placée dans une boîte de Pétri pour l'observation des effets induits par l'échantillon pendant 10 min. Au moins 3 larves sont injectées, idéalement 5 lorsque l'échantillon est disponible en suffisamment grande quantité.



Figure 20 : Photographie de l'injection d'un extrait dans la partie postérieure d'une larve.

3.3.3. Définition des symptômes

Le test était considéré comme positif si une immobilisation partielle ou totale de la larve, pendant au moins 5 s, était observée au cours des 10 min. Cette immobilisation peut être de type contractile, lorsque la larve est ramassée sur elle-même, ou flasque lorsqu'elle est complètement relâchée.

3.3.4. Influence du solvant

Les concentrations maximales de différents solvants avaient été évaluées au laboratoire au préalable. Tous les solvants purs, hormis l'eau, sont à proscrire car ils induisent une mort immédiate de l'organisme. A la concentration de 2,5%, l'acétate d'éthyle, l'éthanol, l'acétonitrile et le dichlorométhane induisent une paralysie de larves et interfèrent donc avec le test. Le méthanol et le DMSO sont les deux solvants les plus appropriés pour ce test : le méthanol doit être utilisé à une concentration dans l'eau inférieure à 10% alors que le DMSO peut être utilisé jusqu'à 15%. Les extraits ou composés purs, repris le plus souvent dans du méthanol 100%, étaient classiquement préparés de la façon suivante : la quantité désirée était évaporée dans un tube à hémolyse en verre, puis le DMSO pur était ajouté. Dans le cas d'un extrait brut, le DMSO était laissé au contact de l'extrait pendant une dizaine de minutes. Puis la quantité d'eau distillée nécessaire pour se trouver à 15% de DMSO était ajoutée, et le tube vortexé.

Le DMSO à 15% ne présente pas de toxicité immédiate pour la larve, ni pendant les heures qui suivent. Cependant, des larves injectées avec une solution eau + DMSO 15% ne survivent pas plus de 24 h.

3.4. Adaptations de protocoles mises en place

Lors de l'évaluation de la pertinence de ce test pour la suite de bio-essais, une question a émergé : ***lors de l'injection d'un composé pur, serait-il possible de relier la symptomatologie observée sur larves, à un mécanisme d'action particulier ?*** Cette question prend son sens dans le contexte de cette étude, à savoir définir le périmètre de détection de chacun des tests.

Pour répondre à cette question, un certain nombre de molécules pures dont le mécanisme d'action est connu, ont été testées sur le modèle larve. Cette étude a permis de définir précisément différents types de symptômes, et ce de façon plus détaillée qu'auparavant afin de diminuer la subjectivité due à l'observation par l'expérimentateur. Le périmètre de détection du test larve a également pu être précisé : certains mécanismes d'actions ne sont pas détectés par le test, alors que d'autres induisent une symptomatologie retrouvée dans un cas unique. Cependant un certain nombre de molécules témoins n'a pu être testé, ou à des concentrations relativement peu élevées, car elles présentaient des problèmes de solubilisation dans les solvants tolérés par les larves. Ainsi la tolérance des larves à d'autres systèmes de solvants a été évaluée. Cependant ces systèmes n'ont pas permis d'améliorer la solubilité des composés réfractaires.

3.4.1. Tolérance aux solvants

D'autres systèmes de solvants ont été ajoutés à ceux déjà étudiés, car dans cette étude de nombreux composés ne pouvaient être testés à cause de problèmes de solubilité en utilisant soit de l'eau additionnée de DMSO 15%, soit du MeOH à 9% (Tableau 10). Afin d'améliorer la solubilisation de molécules ionisables, ces deux systèmes de solvants ont été testés avec l'addition d'acide chlorhydrique HCl. La concentration en HCl à 0,075N s'est révélé être bien tolérée par les larves. A l'inverse, l'alcalinisation des solutions injectées avec de la soude NaOH n'était pas envisageable, quelle que soit la concentration utilisée.

Un autre système, mélange de 3 solvants, le MDM (MeOH, 1,4-dioxane et MeCN, 1:1:1, v/v/v) développé pour solubiliser des composés à visée pharmaceutique peu solubles (Box *et al.*, 2007), a également été évalué. La concentration maximale utilisable de ce système dans l'eau a été définie à 8%, seuil au-delà duquel une toxicité apparaissait sur les larves. Malheureusement, une proportion aussi faible n'a pas permis d'améliorer la solubilisation de composés insolubles dans les autres solvants.

Tableau 10 : Evaluation de la compatibilité de différents solvants avec le test larve.

Concentration ou % du solvant dans l'eau distillée	Utilisable
DMSO 15 %	OUI
DMSO 25%	Non
MeOH 10%	OUI
DMSO 15% + MeOH 9%	OUI
HCl 0,075N	OUI
HCl 0,1N	Non
HCl 0,075N + DMSO 15%	OUI
HCl 0,075N + MeOH 9%	OUI
MDM* 8%	OUI
MDM 9%	Non

* MDM = MeOH + 1,4-dioxane + MeCN

3.4.2. Définition des symptômes

Au cours de cette étude, il est apparu que les effets observés pouvaient être interprétés de façon très variable selon l'opérateur. Ainsi, une liste de symptômes définis aussi précisément que possible a été établie, afin de permettre une reproductibilité de l'interprétation des résultats.

Ces symptômes ont été divisés en deux types complémentaires et cumulables, selon l'effet observé sur la mobilité ou la contractilité des larves.

3.4.2.1. Symptômes définissant un effet sur la mobilité

Paralysie : une paralysie est définie au sens médical comme à une diminution ou une abolition de la motricité (Garnier *et al.*, 2004). Ici, une paralysie correspond donc à l'absence complète de mouvement de un ou plusieurs segments de la larve, sans réaction lorsque la partie concernée est touchée, sur une durée de 30 s au minimum.

Paralysie totale : paralysie de l'ensemble du corps et de la tête de la larve.

Paralysie partielle : paralysie d'une partie du corps de la larve.

Immobilisation : absence complète de mouvement de un ou plusieurs segments de la larve, sur une durée de 30 s au minimum, avec réaction de la larve lorsque la partie immobilisée est touchée.

Immobilisation totale : l'ensemble du corps et de la tête de la larve est concerné.

Immobilisation partielle : une partie du corps de la larve est concerné.

État amorphe : état pendant lequel un ou plusieurs segments sont très peu mobiles. Les mouvements sont très lents et la larve présente des phases d'immobilité de moins de 30 s.

3.4.2.2. Symptômes définissant un effet sur la contractilité

Convulsions : séries de contractions suivies de relâchements de l'ensemble du corps de la larve, sans déplacement de celle-ci. Ces contractions-relâchements peuvent se succéder de façon rapide ou lente.

Déplacement décomposé : déplacement de la larve avec présence d'ondes de contraction cheminant le long du corps. Ces ondes correspondent à des contractions lentes et fortes des segments les uns après les autres.

État contractile : contraction de la larve ou de certains segments, caractérisée par une rétraction longitudinale, une diminution de la taille et une dureté au toucher. Ainsi une paralysie totale contractile peut être définie lorsque l'ensemble des segments sont totalement immobiles et contractés (Figure 21).

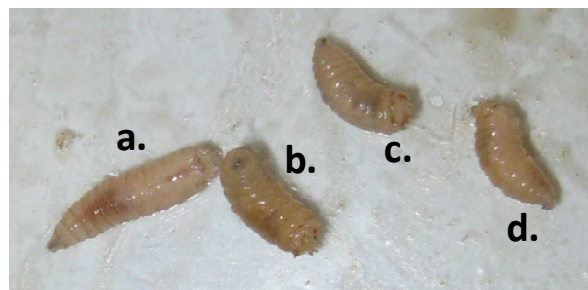


Figure 21: Photographie montrant une larve témoin (a) et une paralysie totale contractile (b,c et d) provoquée par l'acide kainique à la concentration de 18,2 mM.

État flasque : allongement du corps de la larve caractérisé par une augmentation de sa taille et un toucher mou.

État intermédiaire : pas de modification de la taille ni de la dureté de la larve. Par exemple une immobilisation pourra être définie comme intermédiaire si elle n'est ni contractile ni flasque.

Contraction en U : contraction des segments de façon à donner au corps une forme de U. Cette forme peut se faire dans le plan vertical ou horizontal (Figure 22)



Figure 22 : Photographie montrant une contraction en U provoquée par l'acide L-glutamique à la concentration de 5 mg.mL⁻¹.

Etat initial, intermédiaire et final : ils définissent dans le temps, et de façon relative, la survenue des symptômes précédemment décrits. Ainsi par exemple, l'état initial peut être un état amorphe, suivi d'un état intermédiaire correspondant à une paralysie partielle, puis un état final avec une paralysie totale. A l'inverse, il peut n'y avoir qu'un seul état du début à la fin de l'observation. La durée de ces états n'est pas définie, car il semble que ce soit l'enchaînement des symptômes qui définissent le mieux une activité, plutôt que la durée de ces symptômes.

3.4.3. Résultats : évaluation du périmètre de détection du test

Afin d'évaluer le périmètre de détection du test larve, 29 composés purs ont été sélectionnés en fonction de leur(s) mécanisme(s) d'action. Les composés ont été choisis pour leur activité agoniste ou antagoniste sur différents canaux calciques, sodiques ou potassiques, sur différents récepteurs au glutamate, au GABA, au kaïnate, adrénergiques, nicotiques ou muscariniques (Tableau 11). Ils ont tous été obtenus chez le fournisseur Sigma-Aldrich. Sur ces 29 composés, 8 ont présenté des problèmes de solubilité quel que soit les systèmes de solvants utilisés, et n'ont donc pu être testés. Le Tableau 11 reprend les concentrations minimales actives (CMA) des molécules, ainsi que les principaux symptômes observés chez les larves. Le détail des symptômes pour chaque concentration testée est donné en Annexe 3. Dans le Tableau 11, les symptômes discriminants apparaissent en rouge. Ce sont les symptômes qui n'ont été obtenus qu'avec une seule molécule sur les 21 testées.

Généralités sur les récepteurs des neurotransmetteurs

Chez les mammifères, les récepteurs des neurotransmetteurs peuvent être classés en deux grands groupes selon leur mode d'action. **Les récepteurs ionotropes** sont des canaux ioniques activés par un ligand (Figure 23). Des signaux excitateurs ou agonistes vont induire un influx de cations dans la cellule, le plus souvent de Na^+ , qui va provoquer une dépolarisation locale de la membrane post-synaptique globalement chargée négativement. Des neurotransmetteurs inhibiteurs ou antagonistes vont à l'inverse permettre l'entrée d'anions, le plus souvent de Cl^- , qui va renforcer le potentiel négatif de la membrane. Cette hyperpolarisation de la membrane va rendre plus difficile l'action d'un neurotransmetteur excitateur. La transduction du signal au niveau d'un récepteur ionotrope se fait de façon rapide. **Les récepteurs métabotropes** fonctionnent de façon plus lente. Ils sont couplés à des protéines G, et modulent par leur intermédiaire la production de seconds messagers (Figure 23). Ainsi des agonistes ou antagonistes vont agir par exemple sur les concentrations intracellulaires en AMP cyclique ou en Ca^{2+} . Les principaux neurotransmetteurs que sont le glutamate, le GABA, l'acétylcholine, la sérotonine ou encore l'ATP, peuvent activer aussi bien des récepteurs ionotropes que métabotropes. Pour la plupart des neurotransmetteurs il existe plusieurs sous-types de récepteurs, qui peuvent être nommés en fonction d'un de leurs agonistes (cf plus loin pour l'acétylcholine et le glutamate).

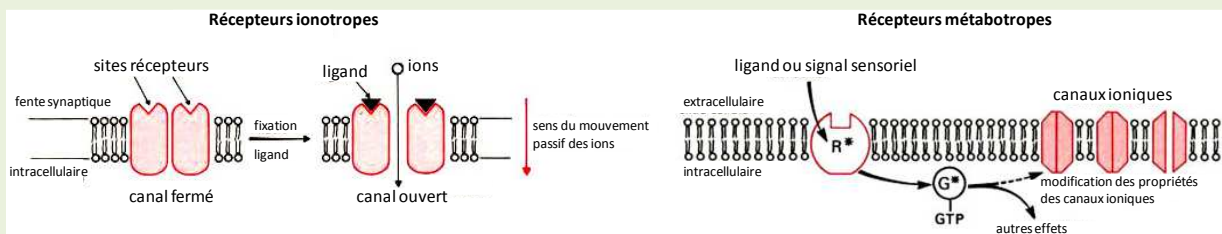


Figure 23 : Schéma de fonctionnement de récepteurs ionotropes et métabotropes.

Tableau 11 : Principaux effets observés lors de l'injection de composés neuro-actifs purs.

Substance neuro-active	Cible	Mécanisme d'action	Solvants	CMA (mM)	Principaux effets observés à la concentration maximale	Délat d'apparition des symptômes à la concentration maximale
pénitrem A	Canaux Ca ²⁺ et K ⁺	antagoniste	Insoluble dans Eau, MeOH, DMSO, EtOH, Acétone, DMF, MDM	-	-	-
	Récepteurs GABA	antagoniste				
nifédipine	Canaux Ca ²⁺ type L	antagoniste	Insoluble dans Eau, DMSO, MDM	-	-	-
+/- Bay K8644	Canaux Ca ²⁺ type L	agoniste	Insoluble dans Eau, MeOH, DMSO, EtOH	-	-	-
ω-conotoxine GVIA	Canaux Ca ²⁺ type N	antagoniste	Eau	CMA > 3,3 mM	Pas d'effets aux concentrations testées	-
hydrate de chlorure d'amiloride	Canaux Na ⁺	antagoniste	Eau	CMA = 32,7 mM	Paralysie partielle évoluant en état amorphe	15 sec à 43,6 mM
4-aminopyridine	Canaux K ⁺ activés par le sodium (+agoniste GABA et induit décharge ACh)	antagoniste	Eau	CMA = 8 mM	Très variable - paralysie partielle contractile, convulsions, état amorphe, contractions en U	3 sec à 106 mM
hydrate de chlorure de déqualinium	Canaux K ⁺ sensibles à l'apamine	antagoniste	Partiellement soluble dans Eau/DMSO 25%	CMA > 9,5 mM	Pas d'effets aux concentrations testées	-
	Canaux Ca ²⁺	agoniste				
glibenclamide	Canaux K ⁺ sensibles à ATP	antagoniste	Insoluble dans Eau, DMSO, EtOH	-	-	-
diazoxide	Canaux K ⁺ sensibles à ATP	agoniste	Insoluble dans Eau, DMSO	-	-	-

Tableau 11 : suite

Substance neuro-active	Cible	Mécanisme d'action	Solvants	CMA (mM)	Principaux effets observés à la concentration maximale	Délat d'apparition des symptômes à la concentration maximale
acide L-glutamique	Récepteurs au glutamate ionotropes et métabotropes	agoniste	Eau	CMA = 11,9 mM	Paralysie partielle évoluant en paralysie totale contractile entre 68 et 34 mM, paralysie	19 sec à 68 mM
acide L-aspartique	Récepteurs au glutamate NMDA	agoniste	Eau	CMA > 28,6 mM	Pas d'effets aux concentrations testées	-
glycine	Récepteurs au glutamate ionotropes NMDA / Récepteurs à la glycine	modulateur/agoniste	Eau	CMA > 133 mM	Pas d'effets aux concentrations testées	-
monohydrate d'acide 5,7-dichlorokynurenique	Récepteurs au glutamate ionotropes NMDA/AMPA/kainate	antagoniste	Partiellement soluble dans Eau/DMSO 25%	CMA > 18,1 mM	Pas d'effets aux concentrations testées	-
blue Evans (> 75%)	Récepteurs au glutamate AMPA	antagoniste	Eau	CMA > 3 mM	Pas d'effets aux concentrations testées	-
monohydrate d'acide kainique	Récepteurs au kainate	agoniste	Eau	CMA = 4,7 mM	Paralysie totale contractile	0 sec à 46,9 mM
picrotoxine	Récepteurs GABA-A	antagoniste	Eau	CMA = 0,2 mM	Convulsions	15 sec à 16,6 mM
GABA	Récepteurs GABA	agoniste	Eau	CMA > 97,2 mM	Pas d'effets aux concentrations testées	-
nicergoline	Récepteurs adrénergiques non sélectifs $\alpha 1/ \alpha 2$	antagoniste	Eau/DMSO15%/HCl 0,075N	CMA = 5,1 mM	Paralysie partielle évoluant en paralysie totale	5 sec à 20,6 mM
chlorure de yohimbine	Récepteurs adrénergiques $\alpha 2$	antagoniste	Partiellement soluble dans Eau 100%	CMA = 2,6 mM	Etat amorphe évoluant en paralysie partielle contractile	5 sec à 12,8 mM
chlorure de clonidine	Récepteurs adrénergiques $\alpha 2$	agoniste	Soluble dans Eau 100%	CMA = 18,8 mM	Paralysie partielle évoluant en état amorphe	60 sec à 37,5 mM
chlorure de prazosine	Récepteurs adrénergiques $\alpha 1$	antagoniste	Insoluble dans Eau, DMSO, MDM	-	-	-

Tableau 11: fin

Substance neuro-active	Cible	Mécanisme d'action	Solvants	CMA (mM)	Principaux effets observés à la concentration maximale	Délai d'apparition des symptômes à la concentration maximale
cytisine	Récepteurs nicotiniques à acétylcholine	agoniste	Eau	CMA = 1,43 mM	Paralysie totale évoluant en convulsions	20 sec à 57,4 mM
bromure de pancuronium	Récepteurs nicotiniques à acétylcholine	antagoniste	Eau	CMA ~ 17,5 mM	Peu d'effets aux concentrations testées	10 sec à 17,5 mM
bromure de rocuronium	Récepteurs nicotiniques à acétylcholine	antagoniste	Eau	CMA ~ 18,9 mM	Peu d'effets aux concentrations testées	10 sec à 18,9 mM
hydrate de chlorure de scopolamine	Récepteurs muscariniques à acétylcholine	antagoniste	Eau	CMA = 16,5 mM	Etat amorphe ou paralysie partielle	0 sec à 33 mM
hydrate de chlorure de pilocarpine	Récepteurs muscariniques à acétylcholine	agoniste	Eau	CMA = 24 mM	Etat amorphe accompagné de sécrétions	60 sec à 48 mM
caféine	Large spectre d'action		Eau chaude	CMA = 12,9 mM	Symptômes très variés	10 sec à 51,5 mM

*CMA = concentration minimale active

3.4.3.1. Molécules agissant sur les canaux calciques

Il existe une très grande diversité de canaux calciques, qui peuvent être de type métabotrope ou ionotrope. Des molécules agissant plus particulièrement sur des canaux calciques ionotropes ont été sélectionnées dans cette étude. Ce type de canal peut être divisé en deux grandes catégories : la première est constituée de canaux qui s'activent à des potentiels relativement négatifs et qui s'inactivent rapidement de façon voltage-dépendante. Ce sont les canaux à bas seuil (LVA pour « *low voltage-activated* » ou T). La seconde catégorie est constituée de canaux s'activant à des potentiels moins négatifs, et qui s'inactivent lentement. Ce sont les canaux à haut seuil (HVA pour « *high voltage-activated* »). Parmi les canaux HVA, différents types sont retrouvés tels que le type L, N, P/Q ou encore R (Dubois, 1999).

Les molécules agonistes ou antagonistes des canaux calciques de type L n'ont pu être testées car elles posaient des problèmes de solubilité.

L' ω -conotoxine **GVIA**, antagoniste des canaux calciques de type N, n'a pas été détectée par le test. Ce résultat est concordant avec les données de la littérature rapportant que cette toxine est inactive sur la plupart des neurones d'invertébrés, ou encore sur les flux de calcium dans des muscles squelettiques de la chenille *Heliothis virescens* (Bradfish et Harmer, 1990). Cependant, il a également été rapporté que certains courants ioniques, induits par les ions Ca^{2+} dans des neurones DUM (*dorsal unpaired median*) de ganglion de la blatte *Periplaneta americana*, étaient sensibles à la présence d' ω -conotoxine **GVIA** (Wicher et Penzlin, 1997). De plus, un agoniste des canaux calciques de type T, l'acétate de fulvol, a été décrit comme induisant une paralysie des larves de *C. vomitoria* (Petit *et al.*, 2010). Il sera donc nécessaire de tester un large panel de molécules agonistes et antagonistes des différents types de canaux calciques, afin de pouvoir conclure sur le potentiel de détection de composés actifs sur ces canaux. Cependant, l'interprétation des résultats risque d'être complexe, car il semble que les insectes présentent une gamme de canaux calciques beaucoup moins importante que les vertébrés, et que leur pharmacologie soit très différente de celle des canaux présents chez les vertébrés (King, 2007).

Au vu des différences importantes existant entre les canaux calciques des vertébrés et invertébrés, ce test ne semble pas adapté à la détection de molécules dont la toxicité pour l'homme impliquerait ce mécanisme d'action.

3.4.3.2. Molécules agissant sur les canaux sodiques

Peu de molécules présentant ce mécanisme d'action ont été sélectionnées dans cette étude, car certaines avaient déjà été testées dans de précédents travaux au laboratoire (Denardou, 1998; Ruiz *et al.*, 2010). Il avait ainsi été montré que, l'injection d'agonistes (brévétotoxines et ciguatoxines) autant que d'antagonistes (saxitoxines et tétrodontoxines) des canaux sodiques induisaient une paralysie totale immédiate des larves. Dans la présente étude, l'**amiloride**, un antagoniste des canaux sodiques, a également induit divers degrés de paralysie, de façon dose-dépendante mais sans jamais

permettre d'observer une paralysie totale immédiate.

Ce test permet de détecter des molécules agonistes ou antagonistes des canaux sodiques, mais la symptomatologie n'est pas discriminante.

3.4.3.3. Molécules agissant sur les canaux potassiques

De même que pour les précédents canaux, il existe une très grande variété de canaux potassiques, différant par leurs propriétés pharmacologiques et leur structure moléculaire. L'activité de ces canaux peut être modulée par une dépolarisation, ou encore par des ions intracellulaires. Ainsi certains canaux sont activés par le calcium, d'autres par le sodium, ou d'autres encore sont inhibés par l'ATP (Dubois, 1999).

Les agonistes et antagonistes des canaux potassiques sensibles à l'ATP ont présenté des problèmes de solubilité, il n'a donc pas été possible de les tester.

Concernant les autres types de canaux potassiques, la symptomatologie observée était très variable. En effet, d'une part le **déqualinium** s'est révélé inactif, et d'autre part la **4-aminopyridine**, choisie du fait de son activité sur différents types de canaux potassiques (Dubois, 1999) a induit un large panel de symptômes évoluant avec le temps et la concentration. Il peut donc être supposé que de nombreux sous-types de canaux potassiques soient présents chez les insectes, comme c'est le cas chez les mammifères, et que leur activation ou inhibition entraîne divers types de symptômes. Les principaux symptômes induits par la **4-aminopyridine** indiquent un effet net d'augmentation de la contractilité des larves (paralysie partielle contractile, convulsions), et chez les vertébrés, cette molécule est connue pour bloquer les canaux potassiques voltage-dépendants présents sur les membranes excitables, ce qui induit une prolongation du potentiel d'action (Rang *et al.*, 1995). Toutefois, il peut également être avancé que ce type de canal est peu ou pas présent chez les larves de *C. vomitoria*. En effet, il a déjà été rapporté que des molécules actives sur les canaux potassiques n'induisaient aucune activité chez *Sarcophaga falculata*, une autre espèce de mouche bleue (Wudayagiri *et al.*, 2001). L'activité observée pour la **4-aminopyridine** pourrait ainsi provenir d'autres cibles moléculaires de ce composé. En effet, elle peut également induire des décharges d'acétylcholine ou inhiber des récepteurs au GABA, et les symptômes d'état amorphe et de convulsions seraient en cohérence avec ceux observés pour les molécules agissant sur les récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine ou encore sur les récepteurs au GABA (voir plus loin).

Dans l'état d'avancement actuel des travaux effectués, il semble difficile de conclure sur le potentiel de détection par ce test de molécules agissant sur les canaux potassiques.

3.4.3.4. Molécules agissant sur les récepteurs à l'acétylcholine

L'acétylcholine (ACh) est un des principaux neurotransmetteurs chez l'homme. Il agit sur deux grands types de récepteurs : les récepteurs nicotiques à l'ACh (RnACh) et les récepteurs muscariniques à l'ACh (RmACh). Les RnACh sont couplés à des canaux cationiques et sont responsables de la transmission du potentiel d'action au niveau des synapses neuromusculaires (plaque motrice), mais également au niveau de ganglions du système nerveux autonome et en divers endroits du système nerveux central (SNC). Cependant, les RnACh présents au niveau musculaire ou neuronal diffèrent dans leur structure et leur pharmacologie. Les RmACh sont couplés à une protéine G, et sont retrouvés au niveau de synapses post-ganglionnaires du système nerveux parasympathique, principalement dans le cœur, les muscles lisses et les glandes. L'ACh agit *via* ces récepteurs comme un excitateur ganglionnaire. Ces récepteurs sont également retrouvés au niveau du SNC. Ainsi trois grands types de RmACh sont retrouvés : les récepteurs M₁, qui produisent une excitation lente des ganglions au niveau neural ; les récepteurs M₂, qui provoquent une diminution du rythme cardiaque et de la puissance de contraction cardiaque ; les récepteurs M₃ qui induisent au niveau glandulaire une sécrétion, une contraction des muscles lisses des viscères et une relaxation vasculaire.

Ainsi, chez l'homme des agonistes des RnACh produiront une augmentation des contractions musculaires, alors que des antagonistes induiront à l'inverse une relaxation musculaire. Des agonistes des RmACh induiront un ralentissement du rythme cardiaque et une vasodilatation, une augmentation de la contraction des muscles lisses autres que vasculaires et une stimulation des glandes exocrines ; les antagonistes produisent une inhibition des sécrétions, de la tachycardie, une relaxation des muscles lisses (Rang *et al.*, 1995).

Les molécules agonistes et antagonistes de ces récepteurs à l'ACh ont été sélectionnées pour cette étude en fonction de leurs effets induits chez les vertébrés, bien que le fonctionnement de ces récepteurs chez les vertébrés ne puisse être *a priori* transposé directement aux invertébrés.

Il a par exemple été démontré chez les mouches *Drosophila* et *Musca* que des canaux activés par l'ACh présentaient des caractéristiques pharmacologiques et physico-chimiques différentes de celles de récepteurs de mammifères (Albert et Lingle, 1993). Ainsi, si chez les vertébrés l'action de l'ACh au niveau du SNC se fait principalement *via* les récepteurs RmACh, chez les insectes, il semble plutôt que ce soit *via* les récepteurs RnACh. Chez ces derniers, les RnACh sont retrouvés au niveau central et périphérique, et différents sous-types de RnACh ont été définis en fonction de leur affinité pour l' α -bungarotoxine (une toxine produite par des serpents du genre *Bungarus*). Différentes études réalisées sur le muscle viscéral d'insectes ont montré que l'ACh induisait une augmentation du tonus, du taux et de l'amplitude de ses contractions (Osborne, 1996). Ainsi, l'observation d'une paralysie totale évoluant en convulsions avec la **cytisine**, un agoniste des RnACh, est donc cohérente avec l'effet de l'activation de ces récepteurs, autant chez les insectes que chez les mammifères. Les deux antagonistes nicotiques testés, le **pancuronium** et le **rocuronium**, n'ont entraîné qu'une très faible activité visible (déplacement décomposé avec une diminution de la mobilité), alors que ces pachycurares sont connus pour induire une paralysie quasi immédiate chez les vertébrés. Ceci n'est pas en contradiction avec la littérature, car ces molécules ont déjà été décrites comme étant des

agonistes « faibles » chez les insectes, en comparaison avec l' α -bungarotoxine (Osborne, 1996)

Concernant les récepteurs RmACh, il semble qu'aucun effet clair d'agonistes ou d'antagonistes n'ait été rapporté chez les insectes (Osborne, 1996). Les résultats obtenus ici avec la **pilocarpine**, un agoniste des RmACh, sont cohérents avec ses effets chez les mammifères. En effet, il a été observé qu'après injection, une sécrétion de liquide au niveau de la partie postérieure de la larve apparaissait, symptôme retrouvé uniquement avec cette molécule. L'antagoniste muscarinique testé, la **scopolamine**, a également induit un effet sur les larves mais avec des symptômes peu spécifiques et non discriminants.

Ce test permet de détecter des molécules agonistes des récepteurs nicotiques à l'acétylcholine, avec une symptomatologie discriminante : « paralysie totale évoluant en convulsions ».

Ce test permet de détecter des molécules actives sur les récepteurs muscariniques à l'acétylcholine, avec une symptomatologie discriminante pour les agonistes : « état amorphe avec sécrétions ».

3.4.3.5. Molécules agissant sur les récepteurs au glutamate et au GABA

Le glutamate, l'aspartate, le GABA et la glycine sont des acides aminés jouant un rôle majeur de neurotransmetteurs dans le système nerveux central des vertébrés. Le glutamate et l'aspartate sont responsables de la transmission de réponses synaptiques de type exciteur, et le GABA et la glycine plutôt de type inhibiteur.

Trois grands types de récepteurs des acides aminés excitateurs (appelés récepteurs au glutamate) peuvent être distingués : deux types de récepteurs ionotropes couplés à des canaux cationiques, à savoir les récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate) et les récepteurs non-NMDA : AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-isoxazole) et kaïnate ; et un type de récepteurs métabotropes couplés à une protéine G. Les récepteurs NMDA sont responsables de la transmission de signaux excitateurs lents et les récepteurs AMPA/kaïnate sont plutôt impliqués dans la transmission de signaux excitateurs rapides.

Les récepteurs au GABA sont de deux types : GABA_A et GABA_B. Les premiers sont responsables d'une inhibition post-synaptique *via* un couplage avec des canaux ioniques perméables au Cl⁻, et les seconds d'une inhibition pré-synaptique *via* un couplage avec une protéine G. La glycine agit à la fois sur ses propres récepteurs, dont l'activation a un effet de type inhibiteur sur le SNC, et agit également en facilitant l'activité excitatrice induite par les récepteurs NMDA (Rang *et al.*, 1995).

Chez les insectes, le **glutamate** est un neurotransmetteur exciteur au niveau du système nerveux central et périphérique. Il semble également jouer le même rôle que celui de l'ACh chez les mammifères : c'est en effet le principal exciteur des jonctions neuromusculaires. Les canaux ioniques associés aux récepteurs au glutamate des insectes sont comparables à ceux des récepteurs

AMPA des vertébrés, mais pas à ceux des récepteurs NMDA. Néanmoins, des récepteurs NMDA ont été identifiés chez des insectes, et semblent impliqués dans la biosynthèse d'hormones chez des juvéniles, ou encore dans les mécanismes de mémorisation chez l'abeille ou le criquet (Jaffe et Blanco, 1994; Chiang *et al.*, 2002; Si *et al.*, 2004). Une seule étude rapporte une potentielle implication de récepteurs NMDA dans la locomotion de larves, par utilisation d'un inhibiteur non-compétitif de ces récepteurs, la phencyclidine (Cattaert et Birman, 2001). Ainsi, si aucun récepteur NMDA n'a été clairement décrit au niveau des plaques motrices des insectes, il peut sembler logique qu'aucun effet sur la motricité ou la contractilité n'ait été observé chez les larves avec un agoniste, l'**acide L-aspartique**, un antagoniste, l'**acide 5,7-dichlorokynurénique**, ou un modulateur, la **glycine**, des récepteurs NMDA de vertébrés. En revanche, comme il a été rapporté que certains récepteurs au glutamate chez les insectes présentaient une homologie importante avec des récepteurs de type AMPA de vertébrés (Fedorova *et al.*, 2008), il était attendu que le **blue Evans** (>75%) en tant qu'antagoniste de ces récepteurs, diminue la motricité ou la contractilité des larves, ce qui n'a pas été le cas. Pour confirmer cette absence de réponse sur les récepteurs de type AMPA, ce dernier, l' α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-isoxazole, serait intéressant à tester pour évaluer l'effet direct du ligand physiologique sur les larves. Cependant, l'absence d'effets de l'**acide L-aspartique** semble confirmer que ce test ne permet pas de détecter les molécules agissant sur les récepteurs AMPA.

L'**acide L-glutamique**, en tant que ligand physiologique des récepteurs ionotropes et métabotropes, a logiquement induit des phénomènes de paralysies totales et partielles, ce qui montre la présence de récepteurs au glutamate chez les larves, et qu'ils peuvent être activés *via* ce test.

Au vu de ces résultats, il pourrait être déduit que l'effet du glutamate interviendrait *via* l'activation soit des récepteurs au kaïnate, soit des récepteurs métabotropes au glutamate. La détection de l'effet d'agonistes des récepteurs au kaïnate a été confirmée dans cette étude par l'observation d'une paralysie totale contractile immédiate après l'injection d'acide kaïnique. Cet effet est cohérent avec les résultats obtenus avec les molécules agissant sur les canaux sodiques. En effet, les récepteurs au kaïnate sont des récepteurs-canaux dont l'activation entraîne une dépolarisation par ouverture du canal et entrée de cations dont majoritairement des ions sodium.

Concernant les récepteurs au GABA, des similarités dans l'activité d'agonistes de récepteurs au GABA du SNC d'insectes et de récepteurs GABA_A de mammifères ont été décrites : le GABA semble également être un neurotransmetteur important au niveau des jonctions neuromusculaires d'insectes (Osborne, 1996). La **picROTOXINE** est un antagoniste de ces récepteurs au GABA, et les effets observés ici sur les larves sont identiques à ceux décrits chez les vertébrés : cette molécule induit des convulsions par blocage des canaux chlorures associés au récepteur, supprimant ainsi l'effet d'inhibition post-synaptique du GABA. Ce mécanisme d'action pourrait expliquer l'observation de ce symptôme assez spécifique, lors de l'administration de la 4-aminopyridine qui présente une activité sur le système GABAergique.

Ce test permet de détecter des molécules antagonistes des récepteurs au GABA, avec une symptomatologie discriminante : « convulsions ».

3.4.3.6. Molécules agissant sur les récepteurs adrénérgiques

Chez les vertébrés, les principaux neurotransmetteurs du système adrénérgique sont la noradrénaline, l'adrénaline ou la dopamine (Rang *et al.*, 1995). Chez les insectes c'est l'octopamine qui est l'amine la plus importante, avec une localisation notamment au niveau des plaques motrices ainsi que dans le SNC. Cette amine semble également impliquée dans des phénomènes de mémorisation et d'apprentissage chez *Drosophila* ou *Apis mellifera* (Osborne, 1996). L'octopamine agit principalement par le biais de récepteurs couplés à des protéines G, qui peuvent être classés en trois types : le type α -adrénérgique, le type β -adrénérgique et le type octopamine/tyramine, sur la base de similarités de la structure et des propriétés signalétiques avec des récepteurs adrénérgiques de vertébrés (Evans et Maqueira, 2005). Cependant, avant cette classification, les récepteurs à l'octopamine des insectes étaient classés en type 1, induisant une augmentation de la fréquence du rythme des contractions musculaires, et type 2, induisant à l'inverse une relaxation. Ainsi, la **clonidine** qui est un agoniste de ces deux types de récepteurs, a induit une paralysie partielle évoluant en état amorphe. Il est donc envisageable que la **clonidine** active dans un premier temps les récepteurs de type 1, en induisant plutôt une contraction des larves, puis les récepteurs de type 2, en induisant plutôt une relaxation. A l'inverse, la **yohimbine** qui est un antagoniste de ces deux types de récepteurs, a induit un état amorphe évoluant en paralysie partielle contractile. Il semble donc que la **yohimbine** agisse elle aussi en deux phases différées dans le temps sur les récepteurs de type 1 puis sur les récepteurs de type 2, mais avec des effets inversés par rapport à la **clonidine**, du fait de son activité antagoniste et non agoniste de ces récepteurs.

Ces effets produits par les antagonistes α -adrénérgiques sont très rapides à intervenir, comme cela a été observé à la fois pour la **yohimbine** et la **nicergoline**.

Ce test permet de détecter des molécules agissant sur les récepteurs adrénérgiques, avec une symptomatologie discriminante pour les antagonistes $\alpha 2$: « état amorphe évoluant en paralysie partielle contractile ».

3.5. Conclusion et perspectives sur le développement du bio-essai sur larves de diptères

3.5.1. Développements méthodologiques

Dans un premier temps, ces résultats ont permis de définir un plus large panel de solvants compatibles avec ce bio-essai sur larves de diptères, et donc d'augmenter la solubilisation de composés réfractaires. Cependant, un certain nombre de molécules pures n'ont pas pu être testées car elles sont restées insolubles dans ces systèmes de solvants tolérés par les larves. Ainsi, des essais ont été initiés au laboratoire pour utiliser d'autres systèmes de solvants tels que les NADES

(*natural deep eutectic solvents*), qui font appel à de petites molécules présentes en très grande quantité dans tous les organismes vivants : sucres, acides aminés, acide lactique, malique, maléique ou citrique, et interférant donc potentiellement très peu avec les bio-essais (Choi *et al.*, 2011).

Au sein d'un même lot de larves, l'enchaînement des symptômes sans tenir compte de leur délai d'apparition est apparu très reproductible entre les trois à cinq larves testées. Cependant, une variabilité inter-individuelle a été observée concernant les délais d'apparition des symptômes. Une variabilité des résultats du témoin positif, l'acide L-glutamique, a également été occasionnellement observée entre différents lots de larves. L'observation des mouches issues de ces larves n'a pas permis de conclure sur la présence de l'espèce *C. vomitoria*, ce qui conduit à écarter certains lots. Ainsi, pour un test à vocation sanitaire, il semble impératif d'avoir l'assurance de travailler sur une souche de *C. vomitoria* pure. Il serait donc envisageable de mettre en place un élevage de mouches au laboratoire, ce qui représente un certain nombre de contraintes : les larves doivent être nourries avec des produits carnés en décomposition, ce qui implique de placer l'élevage en extérieur pour une notion de confort ; cet équipement en extérieur doit être tel qu'aucune autre espèce de mouche ne puisse s'introduire dans l'élevage ; l'élevage doit être régulièrement approvisionné en mouches de type sauvage afin d'éviter sa dégénérescence, ce qui implique une expertise en entomologie.

3.5.2. Périmètre de détection du test

Les résultats concernant les molécules pures sont préliminaires et assez difficiles d'interprétation, et ce pour plusieurs raisons. Tout d'abord il sera bien sûr nécessaire de tester un plus grand nombre de molécules pures sur les larves, en ayant pour chaque récepteur ou canal étudié, plusieurs agonistes et antagonistes, afin de pouvoir confirmer ou non les résultats précédemment décrits. Ensuite, une difficulté dans l'interprétation de ce test vient du fait qu'aux symptômes induits par le mécanisme d'action d'une molécule particulière, vient s'ajouter un effet dose. Par exemple, l'acide L-glutamique induit une paralysie totale des larves pour les concentrations les plus fortes et une paralysie partielle pour les concentrations les plus faibles. L'acide kaïnique induit une réponse de type tout ou rien : aux concentrations actives il induit systématiquement une paralysie totale, et aucun effet n'est observé pour les concentrations les plus faibles. Cette réflexion est schématisée Figure 24. C'est pour cette raison que l'interprétation des résultats s'est focalisée uniquement sur le symptôme ou l'enchaînement de symptômes observés à la concentration maximale testée. Les résultats qui seront obtenus ultérieurement avec un plus large panel de molécules permettront peut-être de mettre en évidence une symptomatologie particulière sur l'ensemble de la gamme de concentration d'un composé. Enfin, des notions d'agonistes et d'antagonistes compétitifs ou non compétitifs, les effets inverses d'une molécule selon son action au niveau central ou périphérique, viennent grandement complexifier l'interprétation de l'ensemble de ces résultats.

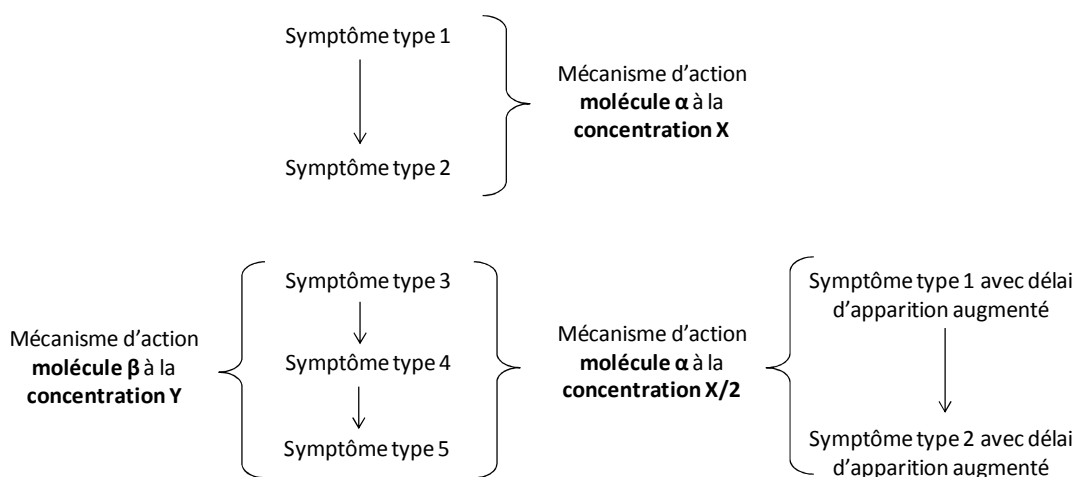


Figure 24 : Schématisation de la complexité d'interprétation de la diversité des symptômes observés sur larves, de leur enchaînement et de leur apparition dans le temps en fonction de la concentration d'une molécule testée.

Cependant, malgré cette complexité d'interprétation, un certain nombre de symptômes ou d'enchaînement de symptômes se sont bien révélés être discriminants d'un mécanisme d'action particulier, ce qui encourage à persévérer pour affiner les connaissances sur les capacités de détection de ce test. Ainsi, un arbre décisionnel a pu être construit, récapitulant le périmètre de détection de ce bio-essai sur larves de diptères (Figure 25).

L'ensemble de ces résultats a été obtenu après injection de composés purs à des larves. Par la suite, il sera donc nécessaire de tester des combinaisons de composés, afin de mettre en évidence d'éventuels effets additifs ou synergiques, et de voir si tous les mécanismes d'action des molécules présentes peuvent être détectés. Il sera également nécessaire de tester ces composés dans des matrices biologiques, en évaluant par exemple des extraits bruts de micro-algues ou de micro-mycètes connus pour produire des molécules avec un mécanisme d'action particulier, afin d'évaluer si la réponse du test est identique à celle obtenue avec les molécules pures.

Enfin, ce test était au préalable défini comme étant un test de neuro-activité, capable donc de détecter des molécules actives et/ou toxiques sur le système nerveux des larves. Or, les résultats de ce travail ont montré que d'une part, toutes les molécules connues pour être neuro-actives n'était pas forcément actives sur ce test, et que d'autre part, certaines molécules n'agissant pas sur la transmission nerveuse pouvaient induire des effets importantes sur les larves, comme cela a été le cas pour l'acide okadaïque (voir chapitre suivant). Ainsi, ce test défini précédemment comme le « test de neuro-activité sur larves de diptères », a été redéfini plus généralement comme le « bio-essai sur larves de diptères ». Un protocole final est donné en Annexe 4.

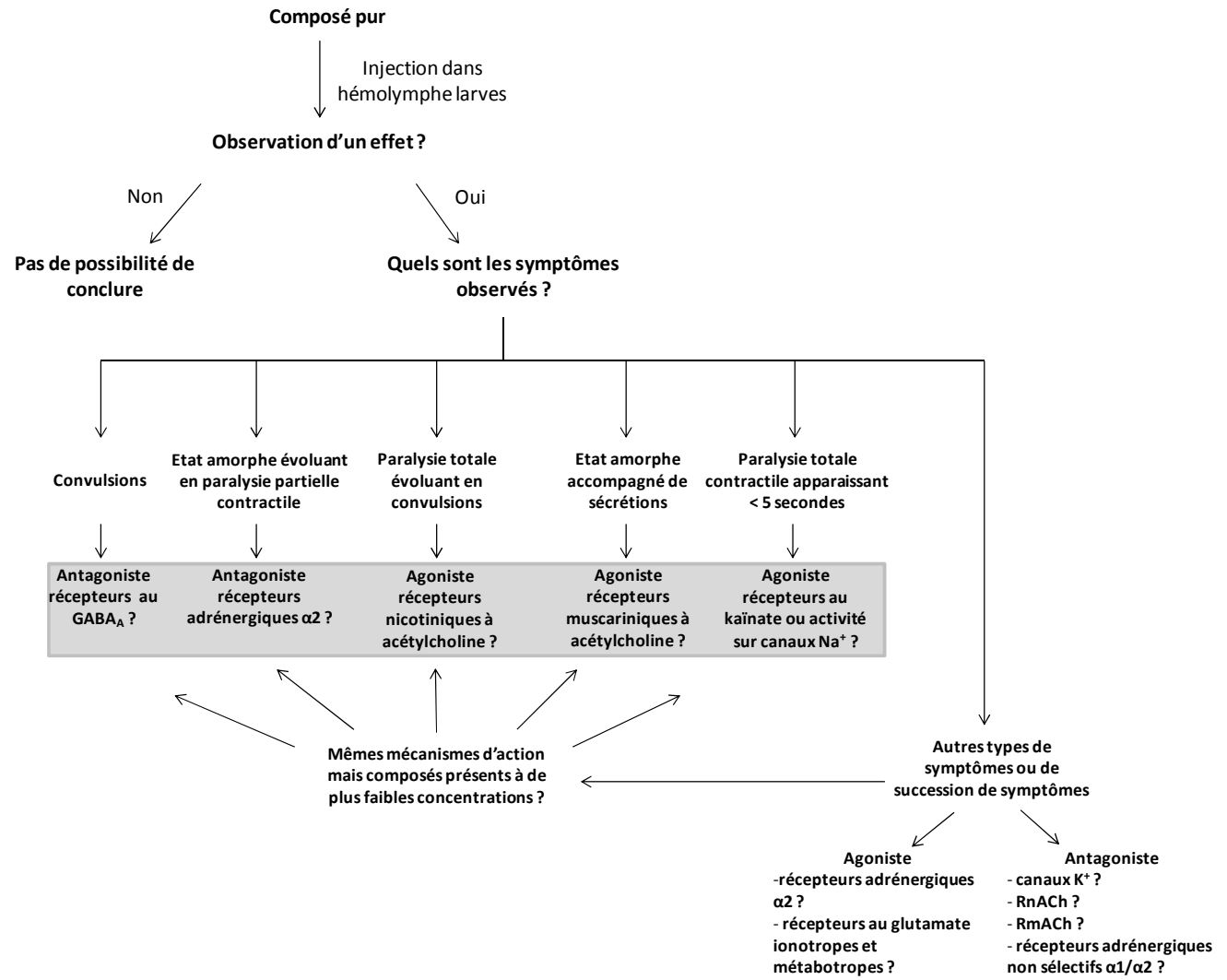


Figure 25 : Arbre décisionnel pour une conclusion potentielle sur un mécanisme d'action particulier après injection d'un composé pur à des larves de diptères.

4. Tests d'activité antibactérienne

4.1. Motivations pour le choix de ces tests

La mise en place et le développement des tests antibactériens visaient d'une part à étudier les éventuelles activités antibactériennes des phycotoxines lipophiles envers des bactéries marines. En effet, la raison écologique de la production de toxines par les micro-algues est à ce jour inconnue, et il a été émis l'hypothèse qu'une compétition pour l'espace ou les nutriments, entre bactéries et micro-algues, pouvait entraîner la production de métabolites antibactériens chez ces dernières. D'autre part, ce screening visait également à détecter des molécules potentiellement valorisables sur le plan pharmacologique dans les champignons issus de zones conchylicoles.

4.2. Développement des tests antibactériens sur bactéries marines

4.2.1. Choix des bactéries

Afin de réaliser ces tests, 6 souches de bactéries isolées du milieu marin ont été sélectionnées, ainsi que la souche modèle *Escherichia coli*. La liste de ces souches est donnée (Tableau 12). Ces bactéries ont également été choisies afin de représenter un panel diversifié, elles peuvent donc être des bacilles ou des coques, Gram-positif ou Gram-négatif, pathogènes de l'homme, de mollusques bivalves ou de poisson, ou des souches de l'environnement.

Tableau 12 : Description des souches bactériennes retenues pour le développement des tests antibactériens.

Souche bactérienne	Paroi	Forme	Ecologie	Référence (Collection Institut Pasteur, CIP)
<i>Vibrio crassostreae</i>	Gram -	Bacille	Associée aux phénomènes de mortalité du naissain d'huîtres	CIP T 108327
<i>Vibrio gigantis</i>	Gram -	Bacille	Associée aux phénomènes de mortalité du naissain d'huîtres	CIP T 108656
<i>Vibrio mytili</i>	Gram -	Bacille	Associée aux phénomènes de mortalité du naissain d'huîtres	CIP T 103929
<i>Vibrio rotiferianus</i>	Gram -	Bacille	Associée aux phénomènes de mortalité du naissain d'huîtres	CIP T 107930
<i>Carnobacterium piscicola</i>	Gram +	Bacille	Bactérie de l'environnement / Pathogène du poisson (Salmonidés)	CIP T 103135 (sous le nom de <i>C. maltaromaticum</i>)
<i>Lactococcus garvieae</i>	Gram +	Coque	Bactérie de l'environnement / Pathogène du poisson (Salmonidés)	CIP T 102507
<i>Escherichia coli</i>	Gram -	Bacille	Pathogène de l'homme	CIP T 54.8

Vibrio - Le genre *Vibrio* est bien connu pour renfermer l'agent responsable du choléra, *V. cholerae* (Cash *et al.*, 1974). Les vibrios sont ubiquitaires dans les environnements aquatiques, tels que les estuaires, eaux marines côtières, sédiments marins ou encore zones d'aquaculture. Ce genre est également retrouvé en association étroite avec des organismes marins tels que des coraux, poissons, éponges, macro-algues, crevettes, ou encore zooplancton (revu par Thompson *et al.*, 2004). Les mollusques bivalves sont également largement colonisés par des vibrios, plus particulièrement au niveau de l'hémolymphe : les vibrios peuvent représenter jusqu'à 40% de la microflore cultivable identifiée dans des huîtres en culture (Thompson *et al.*, 2004; Pruzzo *et al.*, 2005). Depuis de nombreuses années, la filière ostréicole souffre d'un phénomène de mortalité du naissain d'huîtres. Il semble que l'origine de ce phénomène soit multifactorielle, avec une implication de la température et du pH de l'eau, d'un norovirus ou de bactéries. Plus particulièrement, l'espèce *V. splendidus* est régulièrement retrouvée associée à ces phénomènes de mortalité (Lacoste A. *et al.*, 2001). Les souches *V. crassostreae* et *V. gigantis*, appartenant au groupe polyphylétique de *V. splendidus*, ont

été isolées et identifiées à partir d'hémolymphe d'huîtres affectées par ce phénomène (Faury *et al.*, 2004; Le Roux *et al.*, 2005). Ce sont des souches types qui ont été obtenues par le Laboratoire de Génétique et Pathologie de l'Ifremer de la Tremblade. *V. mytili*, décrite à partir de moules (Pujalte *et al.*, 1993) et *V. rotiferianus*, décrite à partir de rotifères (Gomez-Gil *et al.*, 2003), ont également été retrouvées associées à ces phénomènes de mortalité et à ce titre ces souches types isolées par le Laboratoire de La Tremblade ont également été sélectionnées dans le panel de bactéries utilisées pour ce travail.

Lactococcus garvieae - Egalement connue sous le nom de *Enterococcus seriolicida*, c'est l'agent étiologique de la lactococcose, une maladie considérée comme émergente et affectant de nombreuses espèces de poissons. Le signe clinique principal est une septicémie hémorragique aiguë. La truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) est l'espèce la plus sensible aux lactococcoses, qui touchent également l'anguille japonaise (*Anguilla japonica*), certaines carpes (*Oreochromis* sp.), ou encore des mulets ou des poissons-chats. Les pertes économiques dues à cette bactérie sont très importantes car les mortalités peuvent atteindre 50%. En pisciculture, la vaccination des populations sensibles a été la meilleure solution trouvée pour lutter contre la lactococcose, mais des souches de bactéries résistantes apparaissent régulièrement (Vendrell *et al.*, 2006; Austin et Austin, 2007).

Carnobacterium piscicola - Cette espèce de bactérie lactique est également connue sous le nom de *Carnobacterium maltaromaticum* ou encore *Lactobacillus piscicola*. Le genre *Carnobacterium* est retrouvé de façon ubiquitaire dans des environnements très différents, à la fois marins et terrestres : sol cultivé, sol glacé, eau de mer, mais également tractus digestif de certains poissons comme des salmonidés. La colonisation de ce tractus peut être bénéfique pour le poisson, car il semble que *C. piscicola* confère une résistance à l'invasion de bactéries pathogènes (Ringø, 2008). En effet, cette espèce est connue pour produire des bactériocines, et est utilisée en pisciculture comme probiotique. Cependant elle peut prendre un caractère pathogène dans certains cas, et entraîner des maladies telles que des lactobacillooses (Austin et Austin, 2007; Leisner *et al.*, 2007).

Escherichia coli - Cette bactérie, classiquement non pathogène, constitue la principale microflore du tractus intestinal de l'homme. Cependant, lorsqu'elle n'est plus confinée au système digestif mais colonise d'autres organes, elle peut s'avérer pathogène. De plus, certaines souches sont douées d'un caractère virulent et peuvent entraîner des infections résultant entre autres en des septicémies, méningites, infections urinaires ou maladies diarrhéiques (revu par Nataro et Kaper, 1998). *E. coli* est une espèce modèle et son utilisation dans un panel de souches pour un criblage ou de la détection est quasiment incontournable.

4.2.2. Choix du type de test

L'activité antibactérienne d'extraits ou de composés purs peut être évaluée en observant la réponse de la croissance des micro-organismes au contact des échantillons. Différentes méthodes pour détecter cette activité sont utilisables, mais toutes ne présentent pas une sensibilité équivalente ou ne sont pas basées sur le même principe, ainsi les résultats sont fortement influencés par la méthode. Le EUCAST (*European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing*) en Europe, ou le CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) aux Etats-Unis, publient des protocoles de référence pour les expérimentations en microbiologie, ainsi que des méthodes d'interprétation des tests (Wiegand *et al.*, 2008). De nombreuses publications, portant d'une façon générale sur l'évaluation d'activités antibactériennes, suivent les recommandations de ces organismes. Cependant, ces protocoles sont particulièrement adaptés à des pratiques cliniques. Pour le criblage d'activités antibactériennes, il semble exister autant de protocoles que de laboratoires les mettant en place. Ainsi aucun protocole réellement standardisé n'a pu être trouvé.

Les méthodes pour les tests antibactériens peuvent être séparées en deux grands principes : la diffusion et la dilution, comme revu par Cos *et al.* (2006).

Les méthodes de diffusion sur agar

Dans la technique de diffusion, un réservoir (disque en papier filtre ou puits creusé dans l'agar) contient une quantité définie du composé ou extrait à tester. L'agar est inoculé avec la souche bactérienne cible et le diamètre de la zone claire autour du réservoir, qui représente la zone d'inhibition de la croissance bactérienne, est mesurée à la fin de la période d'incubation. La surface de cette zone d'inhibition est supposée être proportionnelle à l'activité du composé testé. Cette méthode est couramment retrouvée dans la bibliographie, par exemple pour le criblage d'extraits de plantes ou d'algues (Aureli *et al.*, 1992; Perumal Samy *et al.*, 1999; Das *et al.*, 2005). Elle semble surtout adaptée à des composés polaires et de petite taille, ou pour déterminer des antibiogrammes (Ríos et Recio, 2005). Cependant cette méthode présente de nombreux inconvénients. Tout d'abord, les activités de différents composés ne peuvent être comparées car la diffusion dans l'agar va dépendre des caractéristiques propres à chaque échantillon. De plus, cette méthode est lourde à mettre en place, très consommatrice de temps pour la préparation des boîtes de Pétri et la mesure manuelle des zones d'inhibition, et peut donc difficilement être adaptée à un protocole de routine (Turcotte *et al.*, 2004; Cos *et al.*, 2006).

Les méthodes de dilution de milieu

Classiquement, cette méthode utilise un milieu de culture solide (agar sur boîte de Pétri) ou liquide (microplaque) contenant des concentrations géométriquement décroissantes des composés à tester, généralement des dilutions au 1/2 en série. Le milieu est ensuite inoculé avec un nombre défini de

bactéries. Après incubation, la présence d'un tapis bactérien, d'une turbidité ou d'un sédiment indiquent une croissance de l'organisme, qui peut également être révélée par l'utilisation d'indicateurs d'une oxydo-réduction. La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme étant la plus faible concentration de l'extrait ou du composé n'entraînant aucune croissance visible du microorganisme dans les conditions définies. La méthode de dilution d'agar présente les mêmes inconvénients que ceux décrits pour la méthode de diffusion sur agar, notamment des manipulations fastidieuses et peu adaptable à de la routine. La méthode semblant présenter le plus d'avantages est l'utilisation de microplaques pour la croissance des bactéries au contact des échantillons à tester, et une évaluation de l'activité par mesure de la densité optique (Cos *et al.*, 2006). Cette méthode permet de tester plusieurs bactéries et plusieurs échantillons par microplaque, et de réaliser une cinétique de croissance bactérienne. L'automatisation permet une plus grande reproductibilité par la réduction des manipulations et une suppression de la subjectivité de lecture de zones d'inhibition ou de culot de bactéries. L'obtention d'une courbe de croissance bactérienne peut permettre de définir les différents paramètres de croissance tels que le temps de latence, le taux de croissance et le plateau (*cf* paragraphe Courbes de croissance en Bioscreen). De plus, cette méthode permet non seulement d'évaluer une inhibition de la croissance, mais également une détection et quantification d'une éventuelle stimulation de croissance (Patton *et al.*, 2006).

La méthode de dilution sur microplaques a donc été choisie, avec utilisation d'un appareil Bioscreen C (Labsystems Corporation, Helsinki, Finlande). Le Bioscreen compile les fonctions d'incubateur et de spectrophotomètre, et peut mesurer jusqu'à 200 DO (2 microplaques de 100 puits en nid d'abeilles) à un temps donné. La fréquence de ces mesures de DO est paramétrable et peut descendre jusqu'à la minute. Le Bioscreen délivre les données sous forme d'un tableau de valeurs de DO exportable, ou sous forme de courbes de croissance correspondant à chaque puits. Les puits ont une contenance totale de 400 µL et les cultures se font dans un volume total de 200 µL. Les DO mesurées à la longueur d'onde de 600 nm traduisent la turbidité du milieu et donc le développement bactérien.

4.2.3. Définition des conditions de culture

Comme il a déjà été mentionné, la bibliographie fait état de l'utilisation de conditions de culture très différentes pour une même souche. Un système de cinq milieux et trois températures d'incubation a donc été testé afin de définir les meilleures conditions de croissance pour chaque souche étudiée (Tableau 13). La mise au point de ces conditions de culture a été réalisée sur boîtes de Pétri. Les boîtes contenant les milieux gélosés ont été inoculées avec les différentes souches et placées dans des étuves aux différentes températures. Le Tableau 13 spécifie les milieux et les températures testées, et celles retenues pour chacune des 7 souches. La composition des milieux de culture et des solutions utilisés est détaillée ci-dessous :

Marine Agar (Difco™), quantités pour 1 L : agar 15 g ; citrate de fer 0,1 g ; extrait de levure 1,0 g ; phosphate disodium 8,0 mg ; sulfate de sodium 3,24 g ; peptone 5,0 g ; chlorure de sodium 19,45 g ; bicarbonate de sodium 0,16 g ; bromure de potassium 0,08 g ; chlorure de strontium 34,0 mg ; acide borique 22,0 mg ; silicate de sodium 4,0 mg ; fluorure de sodium 2,4 mg ; nitrate d'ammonium

1,6 mg ; chlorure de magnésium 8,8 g ; chlorure de calcium 1,8 g ; chlorure de potassium 0,55 g.

Brain Heart Infusion (BHI) Agar (Sigma-Aldrich), quantités en g.L⁻¹ : agar 15,0 ; extrait de cerveau 7,8 ; dextrose 20,0 ; phosphate disodium 2,5 ; extrait de cœur 9,7 ; proteose peptone 10,0 ; chlorure de sodium 5,0.

Mueller-Hinton (MH) Agar (Sigma-Aldrich), quantités en g.L⁻¹ : agar 17,0 ; infusion de cœur de bœuf 2,0 ; hydrolysate acide de caséine 17,5 ; amidon 1,5.

Eau physiologique tamponnée (EPHT, AES Chemunex), quantités en g.L⁻¹ : phosphate de sodium dibasique 4,52 ; phosphate de potassium 0,4 ; chlorure de sodium 7,2 ; eau distillée qsp 1 L.

Tableau 13 : Définition du milieu de culture et de la température d'incubation optimaux des différentes souches bactériennes.

		<i>Vibrio crassostreae</i>	<i>Vibrio gigantis</i>	<i>Vibrio mytili</i>	<i>Vibrio rotiferianus</i>	<i>Lactococcus garvieae</i>	<i>Carnobacterium piscicola</i>	<i>Escherichia coli</i>
Marine Agar	20°C	+-	+-	+-	+-	-	-	-
	30°C	+-	+-	+-	+-	+	+	+
	37°C	+-	+-	+-	+-	+	+	+
BHI Agar	20°C	+-	+-	+-	+-	+	++	+
	30°C	+-	+-	+-	+-	++	+	++
	37°C	+-	+-	+-	+-	+	+	++
BHI Agar + NaCl2%	20°C	++	++	++	++	+-	+-	+
	30°C	+	+	+	+	+-	+-	+
	37°C	+	+	+	+	+-	+-	+
Mueller-Hinton Agar	20°C	+	+	+	+	+	+	+
	30°C	+	+	+	+	+	+	+
	37°C	+	+	+	+	+	+	+
Mueller-Hinton Agar + NaCl2%	20°C	+	+	+	+	+-	+-	+
	30°C	+	+	+	+	+-	+-	+
	37°C	+	+	+	+	+-	+-	+

++ : conditions de culture retenues

Malgré le fait que le milieu MH constitue le milieu de référence pour le CLSI (Cos *et al.*, 2006), il n'a pas été retenu car les souches ne poussaient pas de façon optimale sur ce milieu. Le milieu BHI, ajusté ou non à 2% de NaCl, a donc été retenu pour toutes les bactéries du panel.

Initialement, deux autres souches bactériennes supplémentaires faisaient partie de ce panel. Il s'agissait de *Vagococcus salmoninarum*, une bactérie coque gram-positif, connue pour être un pathogène de salmonidés en induisant notamment des lactobacillooses, péritonites et septicémies (Austin et Austin, 2007), ainsi que *Photobacterium phophoreum*, un bacille gram-négatif, présent de façon ubiquitaire en milieu marin. Les études ne se sont pas poursuivies sur ces deux souches, car la première, cultivée dans du BHI à 30°C, a présenté des courbes de croissance très peu reproductibles entre différentes expérimentations en Bioscreen (Figure 26). La seconde souche nécessitait des températures d'incubation inférieures à 16°C, conditions incompatibles avec l'équipement disponible.

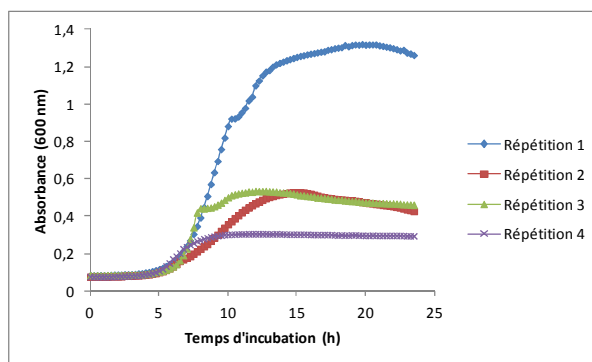


Figure 26 : Différentes courbes de croissance de *Vagococcus salmoninarum*.

4.2.4. Préparation d'un inoculum

La concentration de l'inoculum peut avoir une influence très importante sur la sensibilité du test, ce qui implique la nécessité de standardiser leur préparation. Pour des tests antibactériens en milieu liquide, un inoculum d'une taille de 10^5 ou 10^6 unités formant colonie (UFC).mL⁻¹ est correct (Alderman et Smith, 2001; Cos *et al.*, 2006). Un inoculum d'une taille trop faible, comme 10^2 UFC.mL⁻¹, peut créer de nombreux faux-positifs alors qu'une taille d'inoculum trop importante, comme 10^7 UFC.mL⁻¹, entraînera un risque de faux-négatifs (Cos *et al.*, 2006).

La préparation des inocula a fait appel à une solution 0,5 McFarland, qui correspond à une concentration bactérienne d'environ 10^8 cell.mL⁻¹ (Forbes *et al.*, 1998), selon le protocole suivant. Les différentes souches étaient stockées sur microbilles à -80°C. A J-1, une microbille est prélevée et roulée sur une boîte de Pétri, et la boîte est mise à incuber. A J0, plusieurs colonies se sont formées, et quelques colonies sont touchées avec une œse de 1 µL. Il est préférable de prélever plusieurs colonies afin d'éviter la sélection de variants. L'œse est agitée dans une solution d'EPHT, dont la DO est mesurée à l'aide d'un néphélomètre calibré à 0,5 McFarland. Si la solution est trop peu concentrée, quelques colonies sont rajoutées, si elle est trop concentrée de l'EPHT est rajoutée. L'inoculum n'est jamais vortexé mais agité à la main pour homogénéisation, afin de préserver les bactéries. L'inoculum est ensuite dilué au 1/100^{ème} dans un tube de 10 mL contenant du milieu de culture, puis 100 µL sont déposés dans les puits de la microplaque contenant déjà 100 µL de milieu et l'échantillon. La concentration finale en bactéries par puits est donc de $5 \cdot 10^5$ cell.mL⁻¹.

4.2.5. Courbes de croissance en Bioscreen et différentes interprétations

D'une façon générale, la croissance de divers types de micro-organismes suit une courbe en forme de sigmoïde, qui peut être appréhendée par la définition de différents paramètres. Ces principaux paramètres sont le temps de latence λ , exprimé en heure, le taux de croissance maximal ou spécifique μ_m , exprimé en h⁻¹, et la valeur maximale atteinte au plateau A, exprimée en logarithme de

la concentration du micro-organisme (Zwietering *et al.*, 1990; Dalgaard et Koutsoumanis, 2001). Ces paramètres doivent être calculés à l'aide d'un modèle mathématique appliqué aux valeurs d'absorbance transformées au préalable en logarithme des valeurs de concentrations cellulaires (Figure 27).

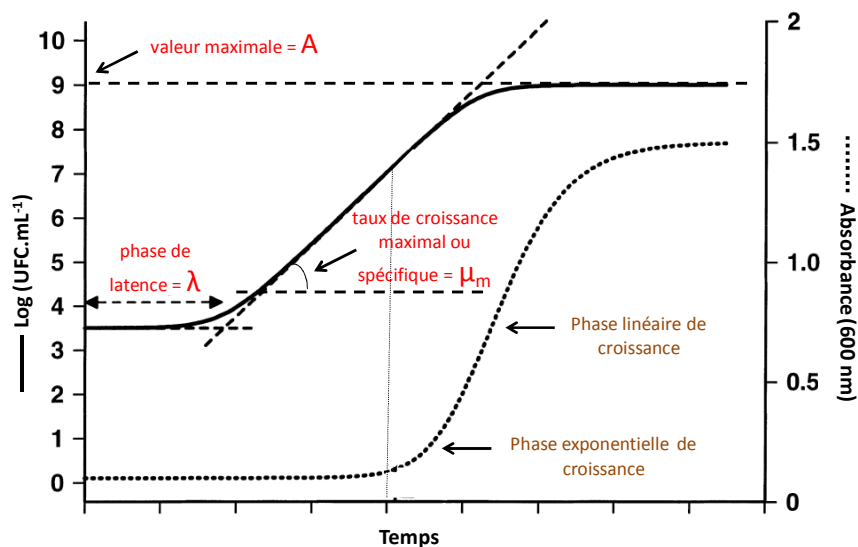


Figure 27 : Schéma des différents paramètres théoriques définissable sur une courbe de croissance bactérienne (d'après Zwietering *et al.*, 1990; Dalgaard et Koutsoumanis, 2001).

Au laboratoire, le modèle de Gompertz est habituellement utilisé pour définir les paramètres de croissance des micro-algues. Ce modèle est également couramment retrouvé dans la bibliographie pour l'étude de cinétiques bactériennes. Il a donc été choisi pour l'interprétation des courbes de croissance des bactéries en Bioscreen.

La démarche mise en place a donc été la suivante. Dans un premier temps, il a fallu définir si le modèle de Gompertz pouvait s'ajuster aux courbes de croissance des bactéries cultivées en Bioscreen. Il a donc été nécessaire de définir la relation entre la DO et la concentration cellulaire, exprimée en UFC.mL^{-1} . Ce travail a été réalisé pour les quatre souches de *Vibrio*. Chacune des souches a été inoculée sur microplaque, dans des puits contenant 300 μL de milieu de culture, et incubées dans le Bioscreen. Après 24 h d'incubation, lorsque les cultures ont atteint leur concentration maximale, des dilutions au demi ont été réalisées sur la microplaque à partir des puits contenant les cultures. Ces dilutions au demi ont fait l'objet d'une part d'une mesure de DO, et d'autre part 100 μL ont été prélevés et déposés sur boîtes de Petri. Les boîtes de Petri ont ensuite été mises à incuber, puis les colonies ayant poussé ont été dénombrées. Les relations DO-UFC ont ainsi été définies à l'aide du logiciel Matlab (Figure 28).

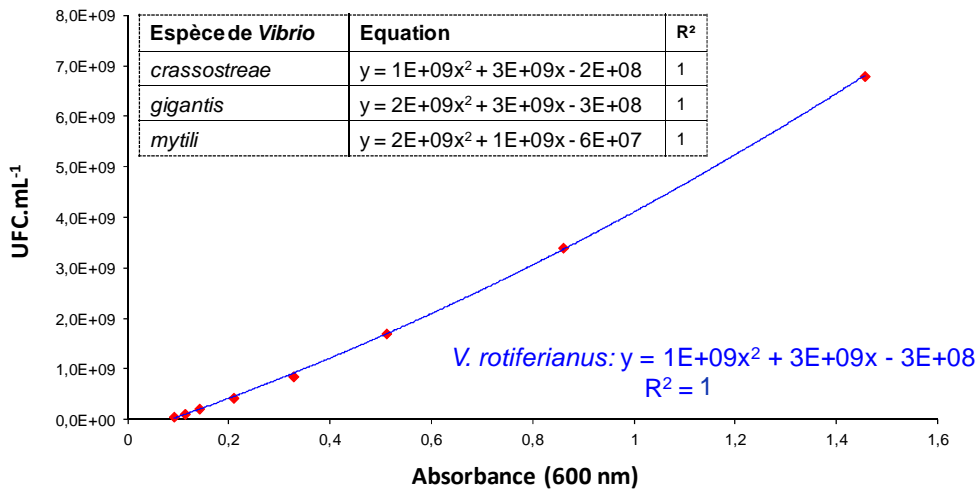


Figure 28 : Définition des équations établissant la relation entre la DO à 600 nm et le nombre d'UFC.mL⁻¹ pour les différentes souches de *Vibrio*, à l'aide du logiciel Matlab.

Par la suite, ces équations ont été appliquées à la transformation des valeurs de DO en valeurs de concentrations bactériennes en UFC.mL⁻¹, et le modèle de Gompertz a été appliqué. Dans un premier temps, le modèle s'est bien ajusté aux cinétiques de croissance des quatre souches de *Vibrio* (Figure 29).

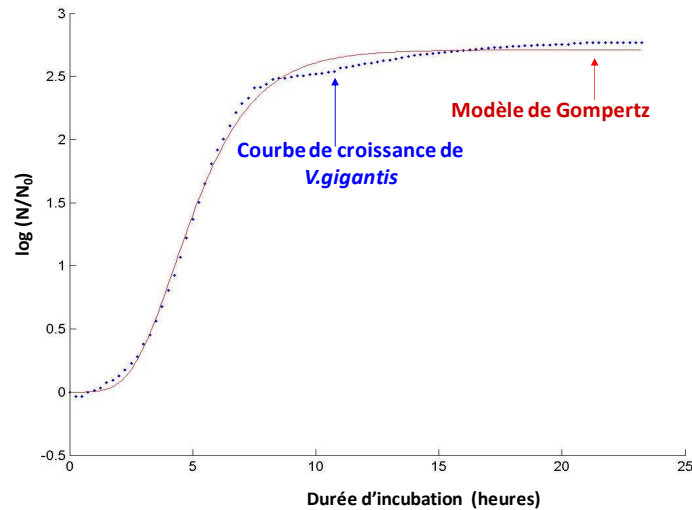


Figure 29 : Ajustement du modèle de Gompertz à la courbe de croissance de *V. gigantis*. N et N₀ sont exprimés en UFC.mL⁻¹.

Cependant, dans la suite de la mise au point des protocoles, il s'est avéré que certains composés induisaient une inhibition de la croissance bactérienne de sorte que celle-ci ne soit plus de type sigmoïde. Dans ces conditions, le modèle de Gompertz ne pouvait plus s'ajuster aux données expérimentales. Cela a été le cas par exemple pour un extrait brut de micro-mycète testé sur *V. gigantis* (Figure 30).

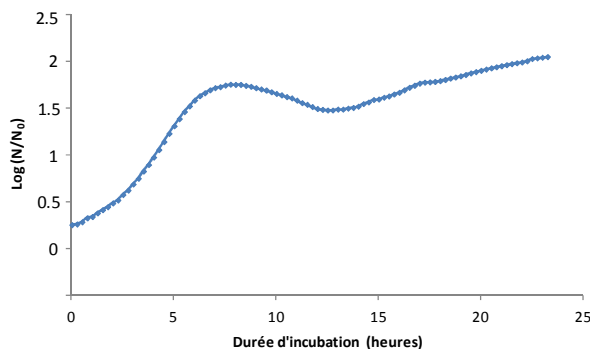


Figure 30: Exemple d'une courbe de croissance bactérienne non modélisable par le modèle de Gompertz : extrait brut de champignon marin testé sur *V. gigante* à la concentration de 50 µg.mL⁻¹.

Il n'était donc plus possible de faire appel à un modèle ne pouvant s'ajuster à toutes les courbes de croissance bactériennes générées. Les résultats ont donc été interprétés différemment par la suite. Ainsi, afin de tenir compte des données observables sur les courbes et de travailler en relatif par comparaison entre les échantillons traités et la culture témoin, différents paramètres ont été définis à partir des courbes de croissance (Figure 31a et 31b). Chaque point de la courbe correspond à la valeur moyenne de 3 cultures, cependant les écarts-types observés étaient très minimes et n'ont pas été représentés sur les courbes. En effet, les lectures de DO ont été programmées tous les quarts d'heures de culture, ainsi les courbes générées sont constituées de très nombreux points et les barres d'erreurs les rendaient peu lisibles.

Afin de déterminer le délai de développement maximal et la vitesse de développement maximal, les courbes représentant les vitesses ont été calculées, selon la formule suivante : $(DO_t - DO_{t-1}) / DO_{t-1}$. Pour chaque valeur, la moyenne de 3 valeurs consécutives a été considérée (Figure 31b).

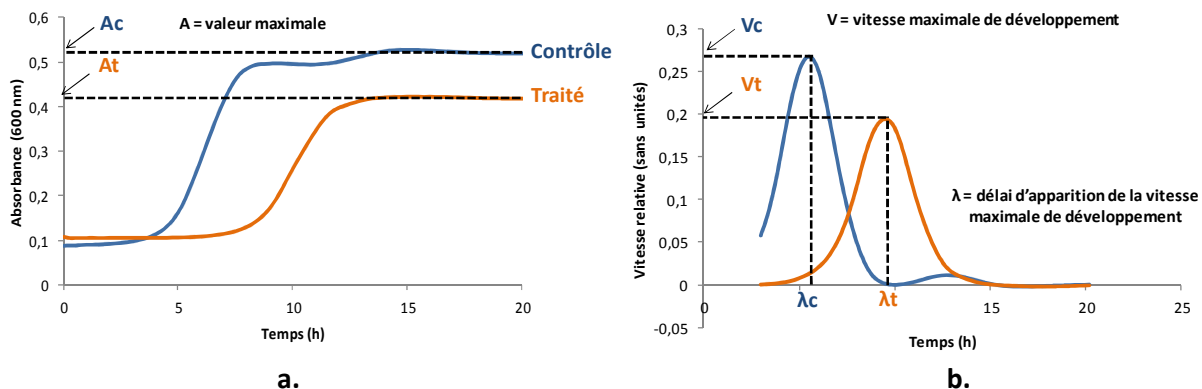


Figure 31 : Paramètres pris en compte pour l'interprétation des courbes de croissance bactériennes, avec détermination de la valeur maximale de croissance (a.) et de la vitesse maximale de délai et son délai d'apparition (b.).

Enfin, les courbes d'inhibition de croissance, de retard de développement maximal et de ralentissement de la croissance, toutes exprimées en pourcentage par rapport au témoin, ont été définies :

- Inhibition (%) à la concentration c

$$I_c = (A_c - A_{tc}) / A_c * 100$$

Les valeurs A_c et A_{tc} sont les moyennes des 20 dernières valeurs du plateau

- Ralentissement (%) à la concentration c

$$Ral_c = (V_c - V_{tc}) / V_c * 100$$

- Retard (%) à la concentration c

$$Retc. = (\lambda_c - \lambda_{tc}) / \lambda_c * 100$$

Avec ces 3 valeurs calculées pour chacune des concentrations testées, il est possible d'établir des graphiques comportant une courbe pour chaque paramètre (Figure 32).

Au cours des tests, les activités ont été considérées comme intéressantes si les différences avec le témoin dépassaient les 20%. Pour chacun des 3 critères, lorsque les courbes le permettent, il est possible de calculer une CE_{50} (concentration efficace 50%) correspondant à la concentration produisant une inhibition de 50%, un ralentissement de 50% ou encore un retard de 50%. Lorsqu'une inhibition totale (100%) a été observée à une des concentrations testées, celle-ci a été précisée dans les résultats.

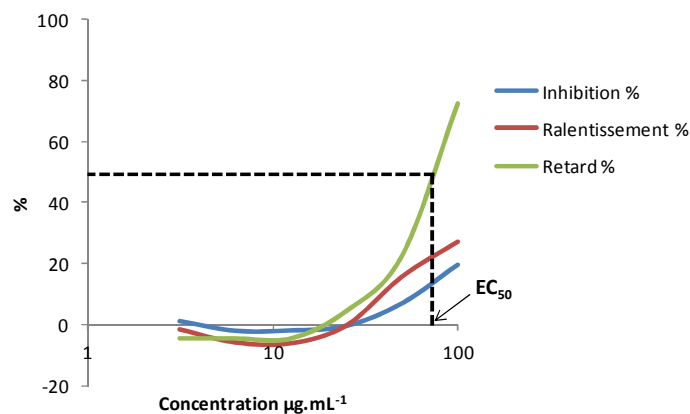


Figure 32 : Paramètres définis pour l'interprétation des courbes de croissance bactérienne.

4.2.6. Evaluation de la tolérance à différents solvants et agents de solubilisation

4.2.6.1. Solvants

Les milieux de culture bactériens sont des milieux aqueux, et les échantillons à tester sont généralement repris dans différents types de solvants organiques. Il était donc nécessaire, dans un premier temps, d'évaluer la tolérance des bactéries à ces solvants afin de les utiliser à une concentration n'interférant pas avec le test. Ainsi, les trois solvants les plus couramment utilisés pour des tests biologiques ont été testés : le méthanol (MeOH), l'éthanol (EtOH) et le DMSO. La souche *V. crassostreae* a été utilisée pour cette mise au point, et des gammes de concentrations en solvants de 1 à 5% dans le milieu de culture ont été évaluées (Figure 33 et Annexe 5).

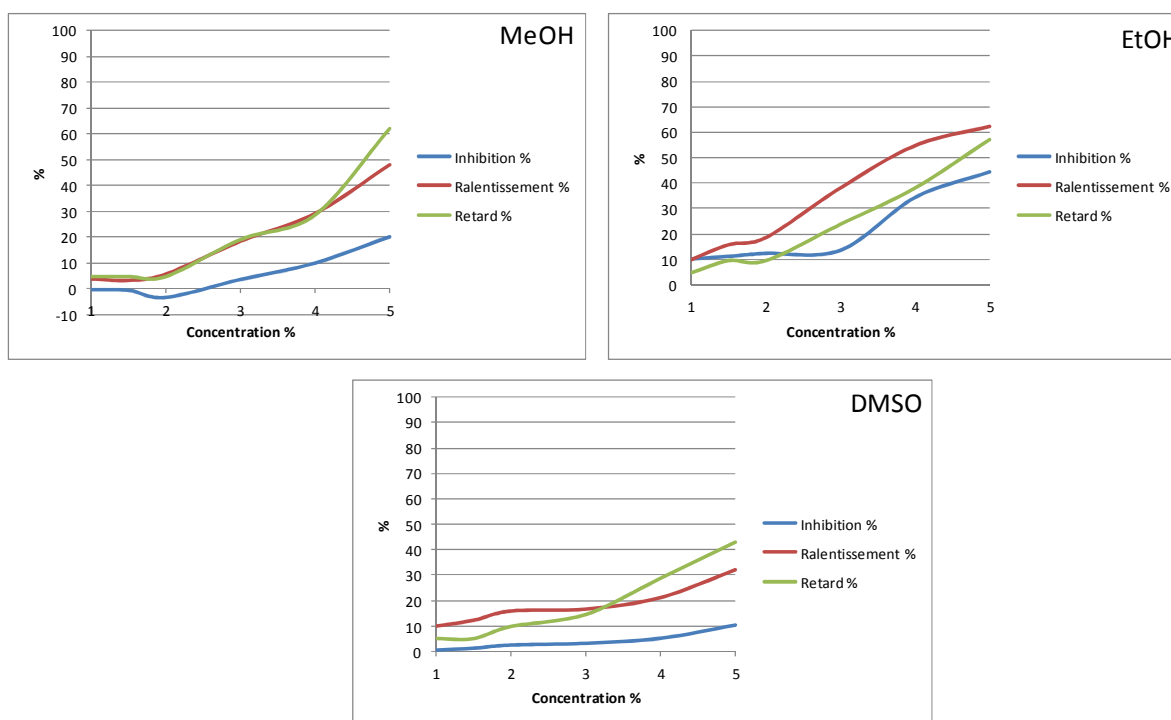


Figure 33 : Evaluation de la tolérance à différents solvants de la souche *V. crassostreae*.

Les concentrations en solvants supérieures à 2% ont présenté une toxicité pour *V. crassostreae*, dont la croissance a été fortement affectée par les trois solvants (Figure 33). Cependant, aux concentrations les plus faibles le MeOH s'est révélé être le mieux toléré par la bactérie, avec moins de 5% de variation des différents paramètres de croissance évalués à la concentration de 1,5% (Figure 33 et Tableau 14).

La concentration de 1,5% de MeOH a donc par la suite été testée sur chacune des souches, afin de vérifier son effet sur la croissance bactérienne. De même que pour *V. crassostreae*, cette concentration a induit moins de 5% de variation des différents paramètres de croissance (Tableau 14).

Ce solvant a donc été défini comme le solvant de reprise des échantillons, à la concentration maximale de 1,5% dans le milieu de culture.

Tableau 14 : Evaluation de l'effet du MeOH à 1,5% sur la croissance des différentes souches bactériennes.

	% d'inhibition	% ralentissement	% retard
<i>V. crassostreae</i>	0,4	4,3	4
<i>V. gigantis</i>	4,8	3,3	4,2
<i>V. mytili</i>	2,9	3,9	4,2
<i>V. rotiferianus</i>	2,9	-6,4	0,2
<i>E. coli</i>	-0,7	4,9	4,3
<i>C. piscicola</i>	4,9	0,9	3,5
<i>L. garvieae</i>	0,8	-5,1	-4

Cette concentration finale de 1,5% de MeOH est relativement peu élevée, et cette étude étant focalisée sur des extraits plutôt de type lipophiles, une précipitation des extraits dans le milieu de culture des bactéries est donc à craindre pour les plus fortes concentrations. Ainsi, pour palier ce problème de solubilisation, des agents de solubilisation peuvent être utilisés, tels que le Tween 80 ou les β -cyclodextrines.

4.2.6.2. Tween 80

Le Tween 80 (T80) est un agent tensioactif couramment utilisé pour améliorer la solubilité d'échantillons pour des tests biologiques *in vivo* ou *in vitro* (Kim *et al.*, 2001; Hammer *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2007). La tolérance du T80 a donc été évaluée en vue d'une potentielle addition aux milieux de culture, et les essais ont été réalisés sur les souches *V. crassostreae* et *V. gigantis* (Figure 34 et Annexe 6).

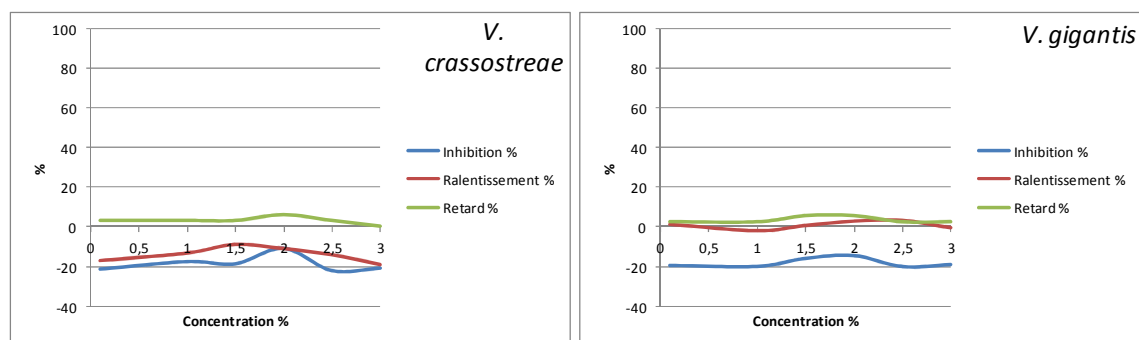


Figure 34 : Evaluation de la tolérance au Tween 80 des souches *V. crassostreae* et *V. gigantis*.

Le T80 est apparu avoir un léger effet stimulateur de la croissance des bactéries à toutes les concentrations testées, soit de 0,1 à 3% dans le milieu de culture. Il semblerait donc que ces deux souches de *Vibrio* soient capables de dégrader le T80. Ce phénomène d'utilisation du T80 comme source de carbone par des bactéries a déjà été rapporté dans la bibliographie (Goodfellow, 1971; Howe et WARD, 1976; Slijkhuis *et al.*, 1984). Le T80 semblant modifier le métabolisme des bactéries, son utilisation a été abandonnée.

4.2.6.3. β -cyclodextrines

Les β -cyclodextrines (β -CD) sont des oligosaccharides cycliques produits par des enzymes microbiennes à partir d'un certain nombre d'unités glucose. Leur structure forme une cavité dans laquelle diverses molécules peuvent venir se loger, ce qui permet d'augmenter leur solubilité. Les β -CD sont donc couramment utilisées pour améliorer la biodisponibilité de médicaments (Brewster *et al.*, 1991; Challa *et al.*, 2005), d'extraits pour des tests biologiques (Angelova et Schmauder, 1999), ou encore d'hydrocarbures présents dans l'environnement, afin de permettre leur dégradation par des micro-organismes (Bardi *et al.*, 2000). La même démarche que pour le T80 a ainsi été mise en place, et des gammes entre 5 à 100 mM de β -CD ont été testées sur différentes souches (Figure 35 et Annexe 6).

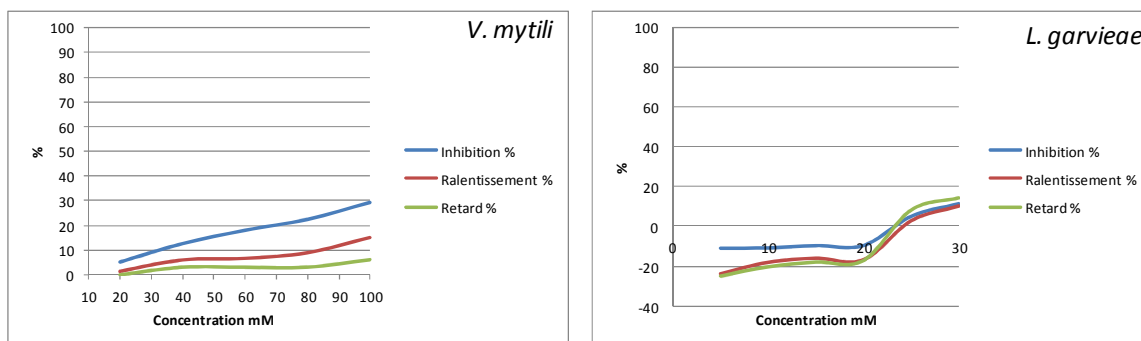


Figure 35 : Evaluation de la tolérance aux β -cyclodextrines des souches *V. mytili* et *L. garvieae*.

De 30 à 100 mM, les β -CD ont un effet négatif apparent sur la souche *V. mytili*, avec notamment une inhibition de sa croissance de 10% ou plus par rapport au témoin. La concentration de 20 mM est apparue comme la plus acceptable, avec une inhibition de la croissance de 4,7%, un ralentissement de 1,6% et un retard de 2,7% pour *V. mytili*. Cependant, cette concentration de 20 mM a semblé induire une stimulation de la souche *L. garvieae*, avec une activation de 9,5%, une accélération de la croissance de 16,8% et une avance de 17,2% (Figure 35).

De même que pour le T80, les β -CD sont connues pour pouvoir être dégradées et métabolisées par certaines espèces de bactéries (Antenucci et Palmer, 1984; Oros *et al.*, 1990), ce qui doit être le cas pour *L. garvieae*. Cette dégradation des β -CD par les bactéries est intéressante pour certaines applications, comme pour de la bioremédiation, car cela implique que la bactérie puisse avoir accès à la molécule retenue dans les β -CD. Cependant, si cette molécule encapsulée présente une activité antibactérienne, et que les β -CD ont au préalable stimulé la croissance des bactéries, le résultat final pourra se voir modifié. Les β -CD n'ayant pas induit de stimulation de la croissance des *Vibrio* testés, mais plutôt une inhibition, il semblerait que ces souches ne soient pas capables de les dégrader. Enfin, il a également été rapporté que les β -CD pouvaient à l'inverse réduire la toxicité de certains composés envers des micro-organismes, de par ce pouvoir d'encapsulation (Fai *et al.*, 2009).

Au vu de ces considérations, l'utilisation des β -CD comme agent de solubilisation a donc été abandonnée.

4.2.7. Choix de témoins positifs

Afin d'évaluer la reproductibilité des tests antibactériens, il était nécessaire d'utiliser des gammes d'antibiotiques jouant le rôle de témoins positifs. Ainsi, pour *E. coli* et les quatre souches de *Vibrio*, une gamme d'érythromycine de 10 à 0,02 μ M a été utilisée. Cette gamme couvrait des activités allant d'une inhibition totale de la croissance bactérienne, à une inhibition nulle (Figure 36 a et b et Annexe 7). Concernant les bactéries Gram-positif, *C. piscicola* et *L. garvieae*, c'est l'antibiotique carbénicilline qui a été utilisée, avec respectivement des gammes de 20 à 0,1 μ M et de 100 à 0,02 μ M (Figure 37 a et b et Annexe 8).

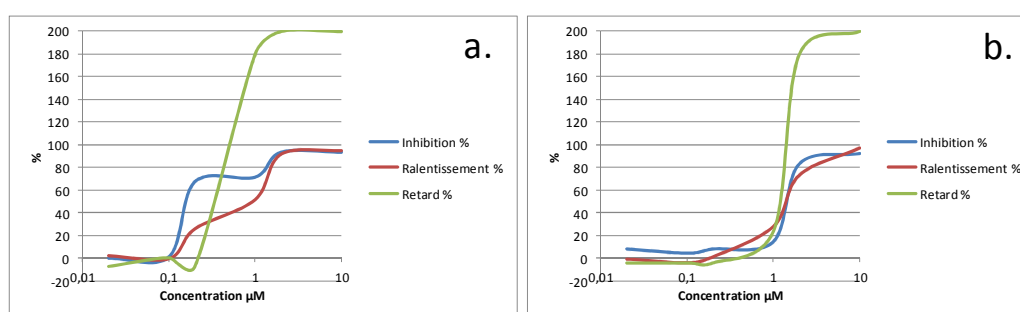


Figure 36 : Evaluation de l'effet d'une gamme d'érythromycine sur la croissance de *E. coli* (a.) et de *V. mytili* (b.).

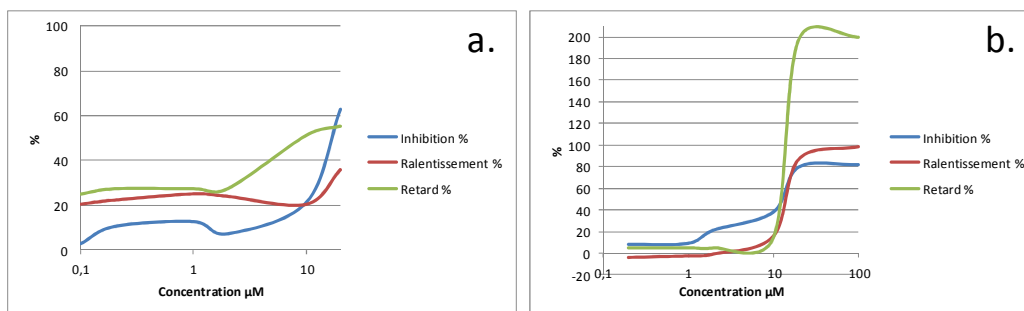


Figure 37 : Evaluation de l'effet d'une gamme de carbénicilline sur la croissance de *C. piscicola* (a.) et de *L. garvieae* (b.).

4.3. Conclusion et perspectives sur le développement des tests antibactériens

Cette démarche a permis de développer une nouvelle thématique au laboratoire, à savoir la mise en place de tests antibactériens miniaturisés, en milieu liquide sur microplaques, avec utilisation d'un appareil Bioscreen. Les différentes souches bactériennes sélectionnées se sont révélées être tout à fait cultivables en microplaques, excepté la bactérie Gram-positif *Vagococcus salmoninarum* qui a donc été écartée de cette étude. Ces tests peuvent donc permettre de travailler à un plus haut débit qu'avec des protocoles classiques faisant appel à des boîtes de Pétri, car plusieurs extraits et plusieurs bactéries peuvent être testés de façon simultanée sur une seule plaque. Cette miniaturisation permet également une consommation plus faible d'extraits.

Le MeOH s'est trouvé être le solvant induisant le moins d'effets sur les différentes souches aux plus faibles concentrations, et il a été retenu à la concentration finale de 1,5%. L'utilisation d'agents de solubilisation, comme le Tween 80 et les β -cyclodextrines, a d'une part induit une inhibition de la croissance de certaines souches aux plus fortes concentrations, et a plutôt induit une stimulation d'autres souches aux concentrations les plus faibles. Ceci démontrant une potentielle capacité des ces souches à les dégrader et à les utiliser comme source alternative de carbone. Ces agents semblant donc modifier le métabolisme et donc éventuellement la physiologie des bactéries, leur utilisation dans ces tests n'a pas été retenue.

Cependant, au vu des faibles concentrations en MeOH utilisables dans le milieu de culture bactérien, et l'impossibilité d'utiliser des agents permettant d'augmenter la solubilisation d'extraits, des phénomènes de précipitation des extraits bruts aux plus fortes concentrations testées seront à craindre. Ceci représente donc une limite à ces tests, et il serait intéressant d'évaluer la tolérance de cultures de bactéries à d'autres systèmes de solvant.

A partir de ces observations et mises au point, un protocole final a donc été développé pour la réalisation de tests antibactériens en milieu liquide (Annexe 9).

5. Conclusion

Ces travaux ont donc permis de développer ou d'adapter des protocoles dans un objectif de détection en routine de toxines de micro-algues. Ainsi d'un point de vue purement pratique, méthodologique, ces différents bio-essais semblent tout à fait adaptés pour une application dans le cadre d'un plan de vigilance : ils sont aisés à mettre en œuvre, ne requièrent pas d'équipement particulièrement coûteux, sont moins consommateurs d'extraits que des bio-essais sur mammifères vivants, et permettent de travailler à du plus haut débit. La définition précise des différents symptômes rencontrés avec le test larves permet de diminuer la subjectivité liée à l'interprétation des effets sur larves par l'expérimentateur.

Chapitre 3 – *Application* : Utilisation des bio-essais pour
la détection et l'étude de phycotoxines lipophiles

1. Introduction

L'apparition de toxines émergentes - toxines inconnues ou toxines connues détectées dans de nouvelles zones géographiques – est surveillée avec le test de toxicité aigüe sur souris (TS) (Anonymous, 2011). Cependant, ce test est largement critiqué pour les nombreux inconvénients qu'il présente (Hess *et al.*, 2006). Afin de protéger les consommateurs contre l'apparition de nouvelles toxines, il est important de développer des méthodes alternatives.

Ainsi, ce chapitre présente l'évaluation de chacun des trois essais mis en place pour la détection de phycotoxines lipophiles. Dans un premier temps, il était important de vérifier la capacité des bio-essais à détecter des toxines connues, ainsi un focus particulier a été placé sur l'AO, produit par *Prorocentrum lima*, et AZA1, produit par *Azadinium spinosum*. Ce travail a été réalisé à différentes échelles : échelle du micro-organisme producteur de toxines, échelle de la toxine pure, et échelle de matrices de moules dopées avec des gammes d'extraits bruts de micro-algues toxiques, ou de gammes de toxines pures.

2. Matériel et méthodes

2.1. Culture des micro-algues et obtention d'extraits bruts

2.1.1. Choix des micro-algues

Douze souches de micro-algues, connues pour produire ou non des toxines lipophiles, ont été choisies dans la banque de souches du Laboratoire Phycotoxines. Les organismes toxiques sélectionnés sont les suivants : *Alexandrium ostenfeldii*, producteur des saxitoxines, *Azadinium spinosum*, producteur des azaspiracides, *Prorocentrum lima*, producteur de l'acide okadaïque et dinophysistoxines, et *Vulcanodinium rugosum*, producteur des pinnatoxines. Ces différentes espèces ont été décrites dans le Chapitre 1, et appartiennent toutes à la classe des *Dinophyceae*.

Les organismes non toxiques ont été choisis de façon à couvrir différentes classes. Ainsi, *Ostreococcus tauri* appartient à la classe des *Prasinophyceae*. Cet organisme, d'une taille d'environ 1 µm, est classé dans la catégorie du picoplancton renfermant des organismes eucaryotes unicellulaires dont la taille est comprise entre 0,2 et 3 µm (rapporté par Cardol *et al.*, 2008). *O. tauri* est le plus petit eucaryote connu vivant de façon libre dans la colonne d'eau (Courties *et al.*, 1994) et sa relative simplicité en a fait un organisme modèle (Chrétiennot-Dinet *et al.*, 1995). Son génome a été séquencé en 2006 (Derelle *et al.*, 2006). *Heterocapsa triquetra* est un dinoflagellé non toxique capable de former des efflorescences (Lindholm et Nummelin, 1999). C'est un organisme mixotrophe, capable d'assimiler du carbone par photosynthèse ou par phagocytose de diatomées ou de flagellés (Legrand *et al.*, 1998). *Isochrysis galbana*, relié à la classe des Prymnésiophytes, est couramment utilisé en aquaculture comme algue fourrage. Cet organisme produit des acides gras présentant un

intérêt en diététique, cosmétique ou pour la production de biofuel. Le genre *Rhodomas* est relié au groupe des cryptophytes. La phylogénie moléculaire semble indiquer que ce groupe est une des lignées eucaryotiques ayant divergé très tôt et évolué très lentement (Hauth *et al.*, 2005).

2.1.2. Mise en culture et extraction

Les conditions de culture des différentes micro-algues sont détaillées Tableau 15.

Toutes les souches ont été cultivées à 18°C, avec un flux de photons d'une densité de 200 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ et une photopériode alternant 16 h de lumière et 8 h d'obscurité. Les milieux de culture ont été réalisés à partir d'eau de mer provenant de la Manche, excepté pour l'organisme *V. rugosum* dont l'eau venait de la Méditerranée.

Tableau 15 : Détail des conditions de culture des différentes souches de micro-algues sélectionnées pour un criblage.

Classe	Espèce étudiée	Souche	Production de toxines	Milieu de culture	Temps de culture	Type de culture
Peridineae	<i>Alexandrium ostenfeldii</i>	CCPM1773	Spirolides	milieu L1 + extrait de terre (Medhioub <i>et al.</i> , 2011)	Récolte quand stabilité atteinte	continu, photobioréacteur de 100 L
	<i>Azadinium spinosum</i>	3D9	Azaspiracides	milieu K modifié	Récolte quand stabilité atteinte	continu, photobioréacteur de 100 L
	<i>Prorocentrum lima</i>	PL4V	Acide okadaïque	milieu L1	35 jours	batch, ballon de culture 10 L
	<i>Vulcanodinium rugosum</i>	IFR-VRU-011	Pinnatoxines	milieu L1	83 jours	batch, ballon de culture 10 L
Peridineae	<i>Azadinium obesum</i>	2E10	non toxique	milieu K modifié (Keller <i>et al.</i> , 1987)	Récolte quand stabilité atteinte	continu, photobioréacteur de 100 L
Cryptophyceae	non identifiée	AC162	non toxique	milieu f/2	22 jours	batch, ballon de culture 10 L
Cryptophyceae	non identifiée	VFC1	non toxique	milieu f/2	22 jours	batch, ballon de culture 10 L
Peridineae	<i>Heterocapsa triquetra</i>	HPT99PZ	non toxique	milieu f/2	Récolte quand stabilité atteinte	continu, photobioréacteur de 100 L
Prymnesiophyceae	<i>Isochrysis affinis cf. galbana</i>	T-iso	non toxique	milieu f/2	7 jours	batch, photobioréacteur de 100 L
Prasinophyceae	<i>Ostreococcus tauri</i>	H95	non toxique	milieu L1 (Guillard and Hargraves, 1993)	40 jours	batch, ballon de culture 10 L
Cryptophyceae	<i>Rhodomonas baltica</i>	RCC350	non toxique	milieu f/2 (Guillard, 1975)	22 jours	batch, ballon de culture 10 L
Cryptophyceae	<i>Rhodomonas salina</i>	RCC1506	non toxique	milieu f/2	22 jours	batch, ballon de culture 10 L

Les micro-algues ont été collectées par centrifugation (3500 g, 4°C, 20 min) pour les souches cultivées en ballons, et par filtration tangentielle pour celles cultivées en photobioréacteurs.

Trois extractions successives avec 5 mL de MeOH 100% ont été réalisées sur un culot humide de 2 g. Chaque extraction a été suivie d'une ultra-sonication (Vibra Cell® 75115) pendant 10 min et d'une centrifugation (3000 g, 4°C, 8 min). Les trois surnageants ont été regroupés et évaporés à sec, permettant l'obtention d'un extrait brut.

2.2. Obtention d'extraits de moules partiellement purifiés pour les essais de dopage

Les moules étant typiquement les espèces les plus concernées par l'accumulation de toxines lipophiles (Hess *et al.*, 2003), elles ont été sélectionnées comme matrices les plus pertinentes. Des moules (*Mytilus edulis*) ont ainsi été obtenues sur un marché, en provenance de Blainville-sur-Mer (Normandie). Les procédures de dissection, extraction et purification des tissus de moules sont détaillées Figure 38. Les hépatopancreas (HP) de 1 kg de moules ont été prélevés et broyés (Polytron PT1200C). Trois extractions successives des HP humides ont été réalisées dans 300 mL de MeOH. Chaque extraction a été suivie d'une ultra-sonication (Vibra Cell® 75115) pendant 10 min et d'une centrifugation (3000 g, 4°C, 8 min). Les trois surnageants ont été regroupés et le solvant évaporé à sec, permettant l'obtention d'un extrait brut (EB).

Les matrices de coquillages étant connues pour interférer avec les tests biologiques, des étapes de purification ont été réalisées afin de pouvoir étudier ces interférences, et potentiellement les diminuer. Une première étape de purification a été réalisée sur l'EB par partition liquide-liquide avec du DCM et de l'eau distillée en proportion 2:1, v/v. La phase organique (300 mL) a été rincée deux fois avec l'eau distillée (75 mL) afin d'éliminer les sels, puis évaporée à sec pour donner l'extrait purifié 1 (EP1). Une seconde étape de purification a été réalisée sur EP1 par partage liquide-liquide avec du MeOH aqueux (80:20, v/v) et de l'hexane en proportion 2/1. La phase aqueuse (100 mL) a été rincée deux fois avec l'hexane (25 mL) afin d'éliminer les composés fortement lipophiles, puis évaporée à sec pour donner l'extrait purifié (EP2). Les extraits EB, EP1 et EP2 ont été utilisés par la suite pour les essais de dopages par des gammes d'extraits de micro-algues ou de toxines pures.

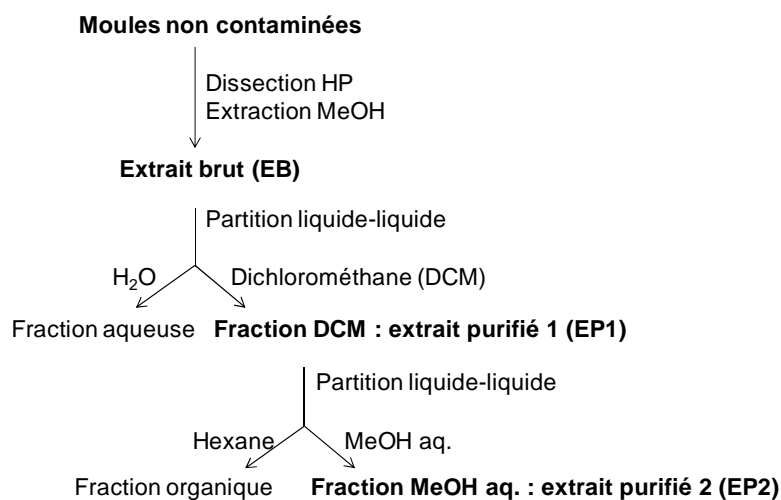


Figure 38 : Description de la procédure de préparation des extraits de moules utilisées pour les essais de dopage.

2.3. Déroulement des tests

Les protocoles des tests de cytotoxicité sur cellules KB avec utilisation du XTT, d'activité sur larves de diptères et d'activité sur bactéries marines sont donnés respectivement en Annexes 2, 4 et 9.

2.4. Analyse des données

Le logiciel GraphPad (GraphPad Prism, version 5.0c, San Diego, USA) a été utilisé pour l'analyse des données obtenues pour le test de cytotoxicité et le test d'activité sur larves. Les courbes d'inhibition de croissance par rapport au témoin ont été modélisées en appliquant la régression non linéaire à quatre paramètres de type « HillSlope ». L'équation en est la suivante :

$$Y = Bottom + (Top - Bottom) / (1 + 10^{((LogIC50 - X) * HillSlope)})$$

Les CI_{50} sont également donnés par le modèle.

3. Résultats : Déteabilité de phycotoxines lipophiles par le test de cytotoxicité sur cellules KB

3.1. Screening de différentes familles de micro-algues

L'objectif de cette première étape était d'évaluer la capacité du test de cytotoxicité à discriminer les organismes toxiques et non toxiques. Les extraits bruts des 12 micro-algues ont donc été incubés pendant 72 h avec les cellules KB. Les révélations au XTT ont montré que, seuls les extraits de micro-algues connues pour produire des toxines ont induit une diminution de la viabilité cellulaire (Figure 39), permettant le calcul de CI_{50} au bout de 72 h d'incubation.

Ainsi l'extrait brut d'*A. spinosum* a induit une CI_{50} de 384 ng.mL⁻¹ (avec un intervalle de confiance à 95% IC 95% de 295-584 ng.mL⁻¹). L'extrait brut de *P. lima* a induit une CI_{50} de 241,3 ng.mL⁻¹ (IC 95% = 224,5-259,3 ng.mL⁻¹). *V. rugosum* et *A. ostenfeldii*, ont également affecté la viabilité des cellules KB avec des CI_{50} de 9 µg.mL⁻¹ (IC 95% = 7,1-10,5 µg.mL⁻¹) et de 60 µg.mL⁻¹ (IC 95% = 30-85 µg.mL⁻¹).

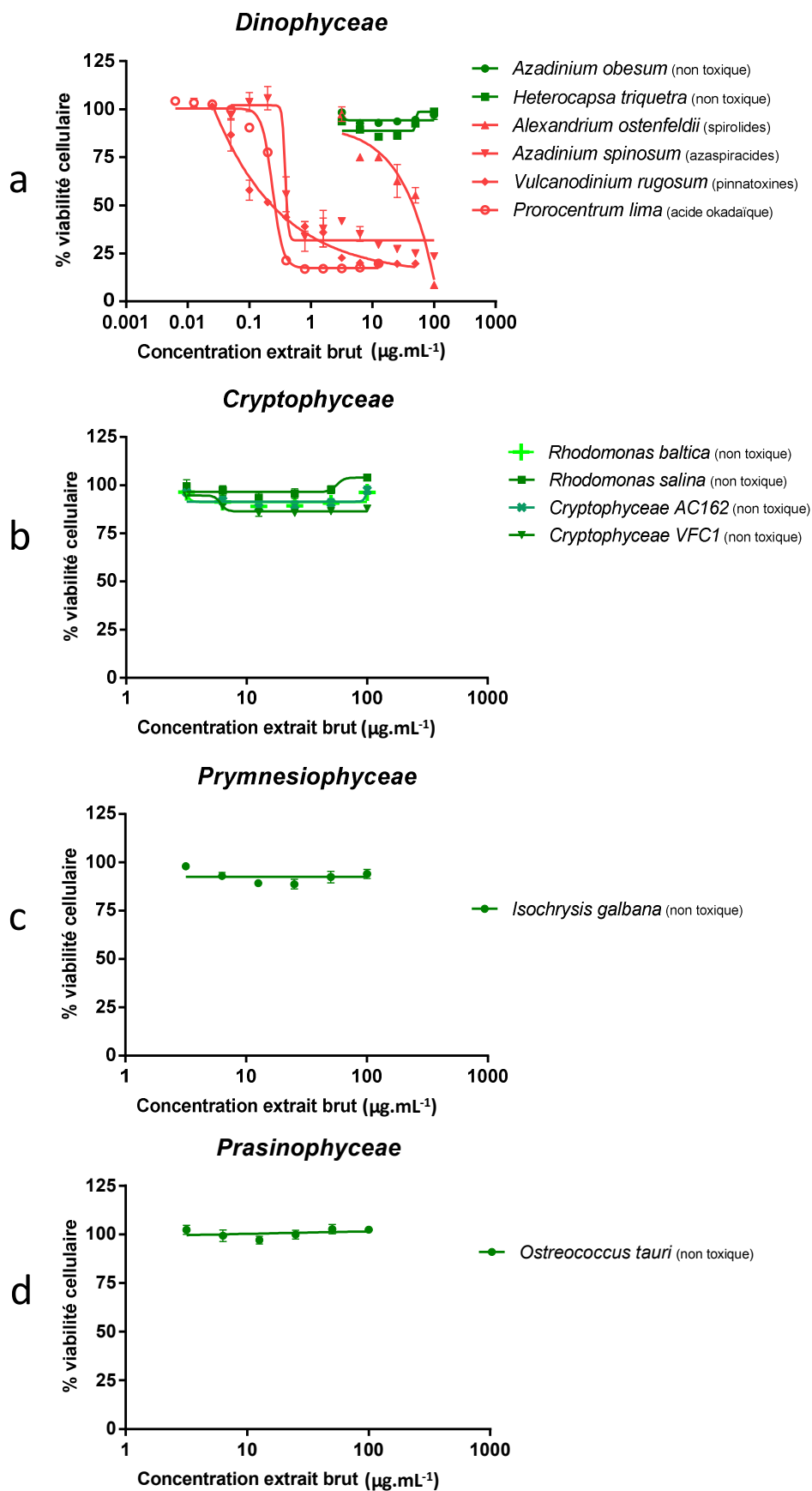


Figure 39 : Screening sur cellules KB d'extraits bruts de 12 micro-algues. Ces micro-algues se répartissent sur quatre familles : a- *Dinophyceae*, b- *Cryptophyceae*, c- *Prymnesiophyceae* et d- *Prasinophyceae*. Pour chaque espèce la toxicité communément admise est précisée (toxique/non toxique).

3.2. Etude des seuils de détection d'extraits de micro-algues toxiques et de toxines pures

Le test de cytotoxicité sur cellules KB était classiquement réalisé au laboratoire avec un temps d'incubation des extraits au contact des cellules de 72 h, le temps de doublement cellulaire étant de 48 h pour cette lignée. Cependant, dans l'objectif du développement d'un test pour de la vigilance, ce temps d'incubation peut sembler long. Ainsi, une étude a été réalisée afin de voir si une activité pouvait être observée avec des durées d'incubation plus courtes (24 h et 48 h). Les expérimentations ont donc été poursuivies avec les deux micro-organismes producteurs de toxines réglementées : *P. lima* et *A. spinosum*.

3.2.1. *Prorocentrum lima* et acide okadaïque

Dans la bibliographie, plusieurs études rapportent des activités cytotoxiques de *P. lima* et de l'AO sur divers modèles cellulaires, notamment sur les cellules KB. Ces activités sur cellules KB ont été évaluées de différentes façons, telles que l'observation de la morphologie (Amzil *et al.*, 1996), ou encore révélation au MTT (Tubaro *et al.*, 1996b). Cependant, à notre connaissance aucune étude sur cellules KB n'a été rapportée avec l'utilisation de XTT pour révéler la viabilité cellulaire. Il était donc important de vérifier les niveaux de détection de *P. lima* et de l'AO dans les conditions mises en place dans cette étude.

Un extrait brut de *P. lima* a donc été incubé pendant 24, 48 et 72 h au contact des cellules KB. Pour ces trois durées d'incubation, l'extrait a induit une cytotoxicité dépendante de la concentration et du temps (Figure 40 a). Cependant, dès 24 h l'extrait de *P. lima* a quasiment induit sa cytotoxicité maximale : la CI_{50} à 24 h n'est environ que deux fois plus élevée qu'à 72 h, 468 $ng.mL^{-1}$ vs 241 $ng.mL^{-1}$ (Tableau 16).

Concernant la durée d'exposition, l'AO a présenté le même profil d'inhibition de la viabilité cellulaire que l'extrait brut de *P. lima*, avec une cytotoxicité détectée dès 24 h (Figure 40 b). A 24 h, la CI_{50} était de 53 $ng.mL^{-1}$, soit environ 3,3 fois plus élevée qu'à 72 h ($CI_{50} = 16,3 ng.mL^{-1}$), Tableau 16.

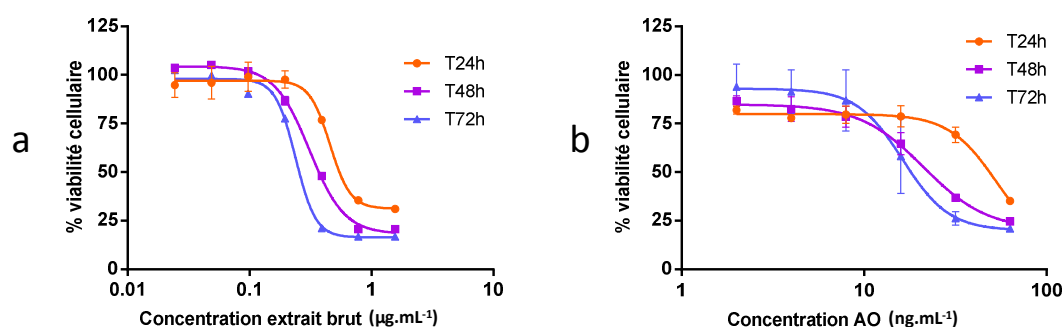


Figure 40 : Evaluation de la cytotoxicité d'un extrait brut de *P. lima* (a) et de l'AO (b) sur cellules KB à différents temps d'exposition : 24, 48 et 72 h.

3.2.3. *Azadinium spinosum* et AZA1

Les toxines produites par *A. spinosum* ont fait l'objet de plusieurs études d'activité sur lignées cellulaires (Twiner *et al.*, 2005; Cañete et Diogene, 2010; Twiner *et al.*, 2012a; Twiner *et al.*, 2012b), mais à notre connaissance, aucune activité d'extraits d'*A. spinosum* n'a été rapportée.

De la même façon que *P. lima*, l'extrait brut d'*A. spinosum* a induit une réduction de la viabilité cellulaire dépendante du temps d'incubation et de la concentration de l'extrait (Figure 41 a). Cependant à 24 h la CI_{50} n'était pas encore atteinte, même à la concentration maximale de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Ainsi, 48 h d'incubation ont été nécessaires pour obtenir une réduction quasi maximale de la viabilité cellulaire, la CI_{50} à 48 h n'étant pas différente de la CI_{50} à 72 h (Tableau 16).

Après 24 h d'incubation avec AZA1, les cellules KB n'ont présenté qu'une faible réduction de leur viabilité (Figure 41 b). Il a donc fallu attendre au moins 48 h pour que la CI_{50} soit atteinte. De même que pour l'extrait brut d'*A. spinosum*, la CI_{50} à 48 h n'était pas différente de celle obtenue à 72 h (Tableau 16).

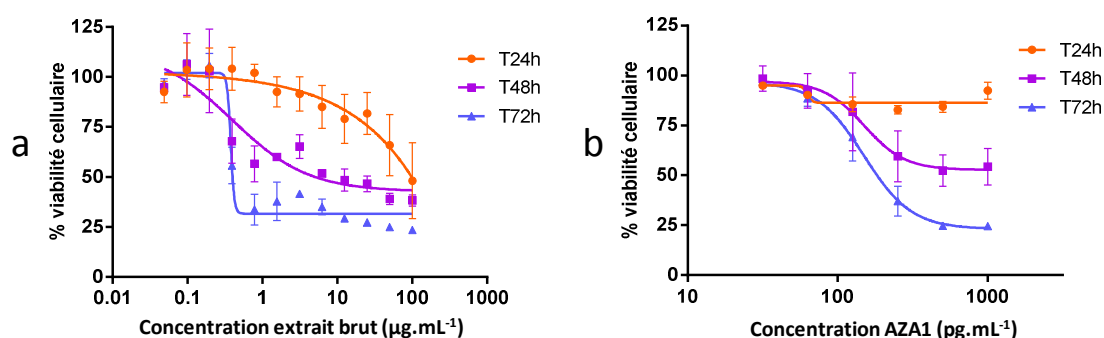


Figure 41: Evaluation de la cytotoxicité d'un extrait brut d'*A. spinosum* (a) et d'AZA1 (b) sur cellules KB à différents temps d'exposition : 24, 48 et 72 h.

Tableau 16: Valeurs de CI_{50} et intervalles de confiance à 95% (IC 95%) obtenues pour les extraits bruts de *P. lima* et *A. spinosum* ainsi que pour AO et AZA1 à différents temps d'incubation.

		24 h		48 h		72 h	
		CI_{50}	IC 95%	CI_{50}	IC 95%	CI_{50}	IC 95%
Extrait brut	<i>P. lima</i> (ng.mL ⁻¹)	468	405-541	324	305-343	241	225-259
	<i>A. spinosum</i> (ng.mL ⁻¹)	> 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	-	400,8	129-1250	384,3	245-784
Toxine	AO (ng.mL ⁻¹)	53	12,9-221	21,2	18,4-24,3	16,3	13,4-19,7
	AZA1 (pg.mL ⁻¹)	> 1 ng.mL ⁻¹	-	150	180-208	149,5	117-190

3.2.5. Discussion sur la réponse des cellules KB à une exposition à des extraits bruts toxiques ou non toxiques, et à des toxines pures

Dans un premier temps, il est intéressant de constater que le test sur cellules KB permet une discrimination très satisfaisante des organismes toxiques et non toxiques. Les micro-algues non toxiques n'ayant pas induit de réduction de la viabilité cellulaire, le risque d'observer des faux-positifs causés par la matrice algale semble donc réduit.

L'extrait brut de *P. lima*, et plus particulièrement l'AO, présentent une activité significative détectable et quasiment maximale dès 24 h d'incubation par révélation au XTT. Cette rapidité d'action de l'AO a déjà été rapportée, sur des cellules KB ou d'autres modèles cellulaires. Ainsi, au bout de 4 h d'incubation avec l'AO, des changements morphologiques des cellules KB ont pu être observés (Amzil *et al.*, 1992). Cañete et Diogène (2010) rapportent que la littérature ne fait état d'aucune étude présentant un différentiel clair d'activité entre 24 et 48 h pour l'AO, DTX-1 ou DTX-2, sur des lignées tumorales. Seules des études basées sur des culture fraîches de neurones de rat rapportent des différences nettes d'activité entre 24 et 48 h d'exposition à l'AO (Fernandez *et al.*, 1991; Fernandez *et al.*, 1993). Ces résultats de cytotoxicité sur cellules KB sont donc cohérents avec le fait que l'AO et dérivés induisent des mécanismes apoptotiques quelques minutes à quelques heures après mise en contact des toxines et des cellules, *via* une inhibition des PP1 et PP2A (revu par Tubaro *et al.*, 2008).

L'extrait brut d' *A. spinosum* et AZA1 ont présenté le même profil d'inhibition en fonction du temps, à savoir une augmentation importante de l'activité sur cellules entre 24 et 48 h d'incubation. Ce type de résultat a déjà été rapporté dans la bibliographie pour d'autres lignées cellulaires tumorales : lignée Jurkat de lymphocytes T (Twiner *et al.*, 2012a), lignée BE(2)-M17 de neurones et lignée Caco-2 d'intestin (Twiner *et al.*, 2012b). A ce jour, le ou les mécanismes d'action des AZA restent inconnus, même si la perturbation de certaines fonctions cellulaires causée par ces toxines est partiellement caractérisée, notamment au niveau du cytosquelette (Tubaro *et al.*, 2008) et des canaux potassiques (Twiner *et al.*, 2012b). L'AZA1 nécessitant au moins 48 h pour agir, qui est le temps de doublement des cellules KB, ce résultat semble cohérent avec une action potentielle sur le cytosquelette, dépendante du cycle cellulaire. Au cours de discussions autour des mécanismes des activités sur cellules, il est courant de retrouver le raisonnement suivant : un composé est supposé avoir une activité cytotoxique au sens propre du terme si cette activité survient de façon rapide (comme c'est le cas pour l'acide okadaïque), ou bien une activité de type cytotatique si cette activité ne s'observe qu'après le temps de division des cellules, (comme pour AZA1). Cette notion est notamment retrouvée en microbiologie pour caractériser l'activité de composés bactéricides ou bactériostatiques. Cependant, cette notion est à utiliser avec prudence, et reste relativement peu informative concernant le mécanisme d'action des toxines, car il a été rapporté qu'AZA1 induisait des mécanismes à la fois nécrotiques et apoptotiques (Roman *et al.*, 2002; Twiner *et al.*, 2005; Vilariño *et al.*, 2007; Cao *et al.*, 2010). Dans le cas présent, afin d'étudier l'activité d'AZA1 sur le cycle cellulaire des KB, une expérimentation de cytométrie en flux a été initiée (protocole donné en Annexe 10). Cependant, les protocoles de cytométrie en flux sont souvent spécifiques à un modèle cellulaire et aux conditions de manipulations, il est relativement difficile de les appliquer d'une façon générale à d'autres modèles. Ainsi, le protocole théorique mis en place n'était pas satisfaisant pour les cellules KB, et différentes améliorations étaient encore nécessaires. Ce protocole n'a ainsi pu être développé complètement, et l'effet de l'AZA1 sur le cycle des cellules KB n'a pu être étudié plus

en profondeur.

Le seuil de sensibilité des cellules KB à l'AO et AZA1 est également intéressant en comparaison avec d'autres lignées cellulaires à l'étude pour la détection de toxines lipophiles. Ainsi, la CI_{50} induite par l'AO sur cellules KB dans cette étude est de 26,3 nM, valeur qui est du même ordre de grandeur que les CI_{50} retrouvées dans la bibliographie pour les lignées tumorales Caco-2, HepG2, Neuro2A ou encore NG108-15 (Tableau 17). Concernant AZA1, les cellules KB présentent une sensibilité plus importante, et donc plus intéressante, que les autres lignées précédemment citées. Enfin, même si AZA1 induit une toxicité détectable plus tardivement que l'AO avec les cellules KB, cette détection se fait à des concentrations plus faibles que l'AO, démontrant une plus grande sensibilité du test sur KB envers la toxine AZA1.

Tableau 17 : Comparaison des CI_{50} obtenues dans cette étude pour les toxines pures AO et AZA1 et comparaison avec des données de la littérature.

	cellules KB (présente étude)	cellules Caco2 (1)	cellules HepG2 (1)	cellules Neuro2a (1)	cellules NG108-15 (2)
CI_{50} AO	26,3 nM (IC 95% 22,9-30,2) (48 h)	48,8 ± 22,3 nM (48 h)	30,2 ± 14,7 nM (48 h)	41,2 ± 5,7 nM (24 h)	~19,3 nM (48 h)
CI_{50} AZA1	0,18 nM (IC 95% 0,13-0,25) (48 h)	> 73 nM (48 h)	4,3 ± 3 nM (48 h)	6,8 ± 4,2 nM (48 h)	~2,1 nM (48 h)

(1 : Sérandour et al., 2012 ; 2 : Cañete et Diogène, 2010)

Il est important de noter que les activités obtenues sur différentes lignées cellulaires devraient être comparées en ayant connaissance de chaque étape du protocole mis en place. En effet, Tubaro *et al.* (1996) rapportait que l'AO induisait sur cellules KB des CI_{50} de 7,8 ; 3,2 et 0,9 nM après 24, 48 et 72 h d'incubation. Ces seuils de sensibilité sont plus faibles que ceux retrouvés dans notre étude, cependant les protocoles ne sont pas totalement comparables. En effet dans cette étude le solvant vecteur est l'éthanol et non le méthanol, les quantités de cellules déposées par puit sont différentes de même que le milieu de culture. Ceci confirme l'importance du contrôle de chaque point de protocole qui a été détaillé dans le Chapitre 2, pour des bio-essais développé avec une vocation sanitaire.

La durée minimale d'incubation des cellules KB avec des toxines devrait donc être de 48 h minimum, 72 h idéalement, pour détecter une activité maximale. Cet impératif imposé par la toxine AZA1 fait que ce test sur cellules KB ne pourra être un test de détection rapide, ce qui peut présenter un inconvénient, car il est important de détecter rapidement une contamination afin d'éviter la mise sur le marché de mollusques bivalves toxiques. Cependant, ce test n'est pas développé dans un objectif de surveillance hebdomadaire mais de vigilance mensuelle. Dans ce cas, les délais imposés sont moins contraignants.

3.3. Etude des effets d'extraits de moules dopés

Dans le but d'étudier la possibilité d'utiliser le test de cytotoxicité pour détecter des moules contaminées, des essais de dopage d'extraits de moules par des extraits d'algues toxiques ou des toxines pures ont été réalisés.

3.3.1. Evaluation des effets de matrices induits par des extraits d'hépatopancreas de moules non contaminées

3.3.1.1. Obtention d'extraits bruts et d'extraits purifiés

Les HP de moules non contaminées ont donc été disséqués et extraits au MeOH, puis deux partitions liquide-liquide ont été réalisées sur cet extrait brut (EB). La première partition, réalisée sur l'EB à sec avec du dichlorométhane (DCM) et de l'eau, a permis de laver la phase organique en éliminant notamment les sels, ce qui a donné l'extrait purifié 1 (EP1). La deuxième partition liquide-liquide, réalisée sur EP1 à sec avec du MeOH aqueux et de l'hexane, a permis de rincer la phase méthanolique en éliminant notamment les cires. Au final, 1 g de HP a donné 175,7 mg d'EB, 16,7 mg de EP1 et 3,51 mg de EP2. Les partitions liquide-liquide ont donc permis une purification d'un facteur 10,5 entre EB et EP1, et une purification d'un facteur 50 entre EB et EP2 et 4,8 entre EP1 et EP2.

3.3.1.2. Evaluation biologique des extraits bruts et purifiés

Dans un premier temps, il était important d'évaluer la sensibilité du test de cytotoxicité à ces matrices de moules. Ainsi, des gammes d'EB, EP1 et EP2, ont été testés sur cellules KB. Les courbes dose-réponse pour EP1 et EP2 sont exprimées en équivalent extrait brut (éq._{EB}), Figure 42.

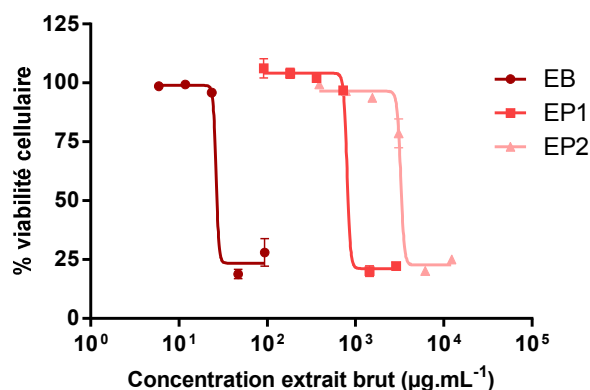


Figure 42: Evaluation de l'activité cytotoxique d'un extrait brut (EB) d'HP de moules et de deux extraits partiellement purifiés, EP1 et EP2. Les concentrations de EP1 et EP2 sont exprimées en équivalent extrait brut.

Selon le degré de purification, les activités induites par les extraits ont présenté des différences significatives. Ainsi, plus l'extrait était purifié, moins il induisait de cytotoxicité. Cette observation est intéressante car la purification des extraits induisant moins d'effets de matrices, elle permet d'appliquer une plus grande quantité de ces matrices sur cellules et donc de potentiellement détecter de plus faibles concentrations en toxines. Les concentrations maximales en EP1 et EP2 tolérées par les cellules ont été définies, c'est-à-dire les concentrations induisant moins de 10% d'inhibition de la croissance cellulaire. Ainsi, les concentrations appliquées sur cellules ne doivent pas excéder $11 \mu\text{g.mL}^{-1}$ pour EB, $715 \mu\text{g.mL}^{-1}$ en équivalent extrait brut (éq_{EB}) pour EP1 et $1,54 \mu\text{g.mL}^{-1} \text{éq}_{\text{EB}}$ pour EP2. En tenant compte des facteurs d'extraction et de purification, la conversion de ces concentrations expérimentalement testées en équivalent hépatopancréas a donné les valeurs maximale à ne pas dépasser de 4mg.mL^{-1} pour EP1 et 8mg.mL^{-1} pour EP2. Ainsi, les matrices EP1 et EP2 ont été utilisées pour les expérimentations suivantes de dopage. Il est à noter que les concentrations en matrices induisant près de 80% d'inhibition de croissance des cellules ne formaient plus une solution mais une émulsion, car la limite de solubilité dans le milieu de culture contenant 5% de méthanol était atteinte. Cette émulsion appliquée sur les cellules ne constituait plus un milieu viable. C'est donc cette limite de solubilité, plus que la réelle sensibilité des cellules KB, qui a semblé empêcher d'appliquer de plus grandes concentrations en matrices.

3.3.2. Evaluation de la cytotoxicité de matrices de moules dopées

Les concentrations de $715 \mu\text{g.mL}^{-1} \text{éq}_{\text{EB}}$ pour EP1 et $1,54 \mu\text{g.mL}^{-1} \text{éq}_{\text{EB}}$ pour EP2 ont donc été dopées avec une gamme d'extrait brut de *P. lima* et d'*A. spinosum*, et des toxines pures AO et AZA1. Après 72 h d'incubation, la matrice EP1 n'a pas interféré de façon significative avec la détection de l'extrait brut d'*A. spinosum* (Figure 41c et Tableau 18). Cependant, les matrices EP1 et EP2 ont induit une sensibilité du test plus grande pour les dopages avec l'extrait brut de *P. lima*, AO et AZA1 (Figure 41a, b, d et Tableau 18). La détection des toxines est restée malgré tout dose-dépendante. Cette augmentation de la sensibilité du test par la matrice peut présenter l'avantage de détecter des seuils plus faibles en toxines, mais le risque d'observer des faux-positifs est accru.

Afin de vérifier si des faux-positifs pouvaient être observés, les extraits EP1 et EP2 ont été dopés avec des extraits bruts de micro-algues non toxiques appartenant aux 4 classes précédemment décrites : *Azadinium obesum* (Dinophyceae), *Ostreoscooccus tauri* (Mamiellophyceae), *Isochrysis galbana* (Prymnesiophyceae) et *Rhodomonas baltica* (Cryptophyceae). Les résultats obtenus étaient strictement identiques à ceux présentés Figure 39 : la viabilité cellulaire n'a pas été affectée par la présence de matrice, il n'y a donc pas eu d'interférence entre la matrice moule et des extraits d'algues non toxiques.

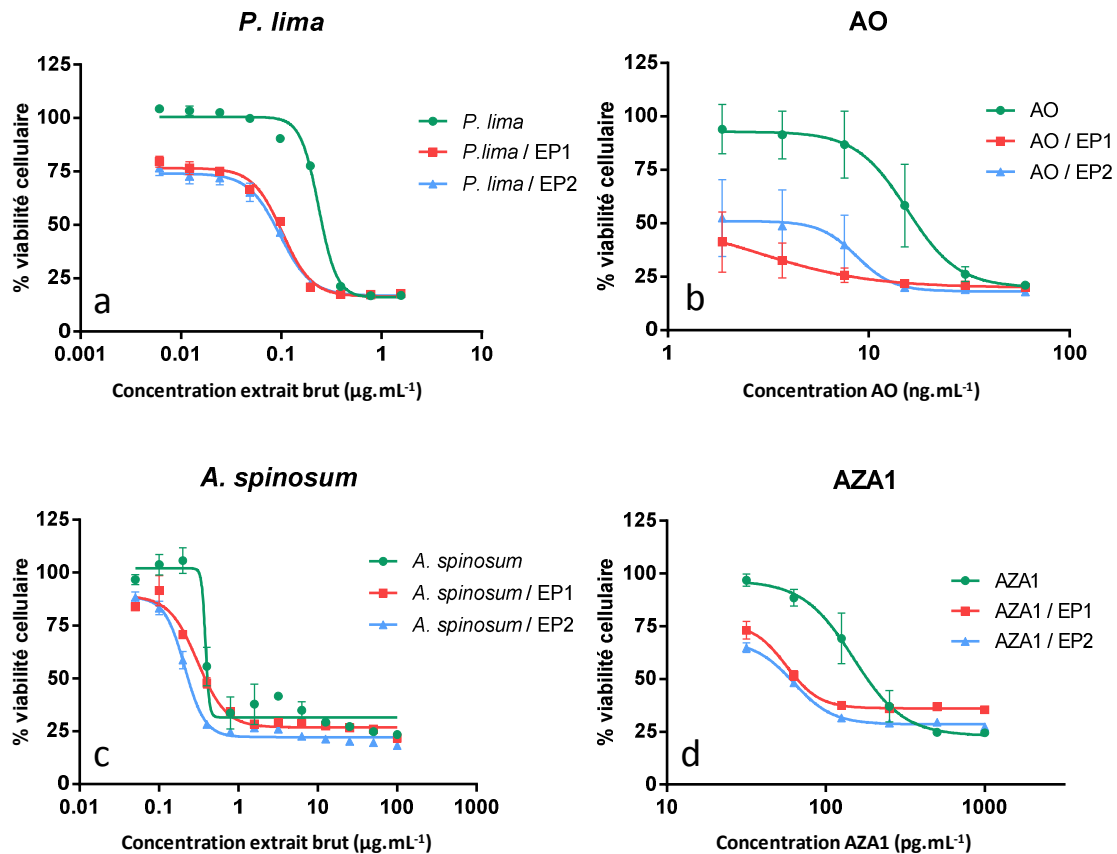


Figure 43 : Evaluation des effets de matrices moules partiellement purifiées, par dopage de ces matrices avec une gamme d'extrait brut de *P. lima* (a) et *A. spinosum* (c) et une gamme de toxine pure AO (b) et AZA1 (d).

Tableau 18: Valeurs de Cl_{50} et intervalles de confiance à 95% (IC 95%) obtenues pour les extraits bruts de *P. lima* et *A. spinosum* ainsi que pour AO et AZA1 en dopage des matrices EP1 et EP2.

		Dopage EP1		Dopage EP2	
		Cl_{50}	IC 95%	Cl_{50}	IC 95%
Extrait brut	<i>P. lima</i> (ng.mL^{-1})	100,7	95,4-106,2	95,5	90,8-100,4
	<i>A. spinosum</i> (ng.mL^{-1})	305,1	279,2-333,3	210,2	200,4-220,6
Toxine pure	OA (ng.mL^{-1})	2,8	0,2-39	8,7	3,7-20,5
	AZA-1 (pg.mL^{-1})	56,5	49,8-64,2	62,7	59,1-66,5

3.3.3. Rendements d'extraction d'AZA1 après dopage et purification de matrices de moules

Afin de vérifier les rendements d'extractions d'AZA1 le long du processus de purification, la matrice EB a été dopée avec un extrait brut d'*A. spinosum* à trois concentrations différentes (élevée, intermédiaire et faible). Les quantités d'AZA1 ont été suivies au cours des différentes étapes (Tableau 19). La première étape de purification permet la récupération en moyenne de 92,2% d'AZA1, et la seconde la récupération de 68,4% par rapport à l'EB, ou de 73,9% par rapport à EP1. Cette seconde étape de purification induit donc une perte d'environ ¼ de la quantité de toxine présente dans EP1.

Tableau 19 : Evaluation des rendements d'extraction d'AZA1 après dopage de matrices de moules EB avec un extrait brut d'*A. spinosum* à différentes concentrations.

Dopages	EB	EP1		EP2		
	Quantité totale d'AZA1 (µg)	Quantité totale d'AZA1 (µg)	Rendement d'extraction d'AZA1 % d'EB	Quantité totale d'AZA1 (µg)	Rendement d'extraction d'AZA1 % d'EB	Rendement d'extraction d'AZA1 % d'EP1
Dopage 1 Forte concentration	2,8 ± 0,2	2,8 ± 0,1	98,1 ± 6,9	2,2 ± 0,2	77,1 ± 12,5	78,3 ± 8,1
Dopage 2 Concentration intermédiaire	2,3 ± 0,1	2,2 ± 0,1	93,8 ± 1,4	1,5 ± 0,0	63,8 ± 3,3	68,1 ± 3,8
Dopage 3 Faible concentration	1,1 ± 0,3	0,9 ± 0,1	84,7 ± 13	0,7 ± 0,0	64,3 ± 16,2	75,4 ± 7,6

3.4. Etude d'autres toxines

La yessotoxine et pecténotoxine-2 ont également été testées de façon préliminaire sur cellules KB, aux concentrations de 10, 100 et 1000 ng.mL⁻¹ (Figure 44). La PTX-2 a présenté une activité plus importante que la YTX, avec une inhibition de la viabilité cellulaire autour de 60% aux trois concentrations, contre 30% pour la YTX. Le test sur cellules KB semble donc capable de détecter ces deux toxines, cependant les gammes de concentrations n'ont pu être élargies en raison d'une trop faible quantité de toxines disponible.

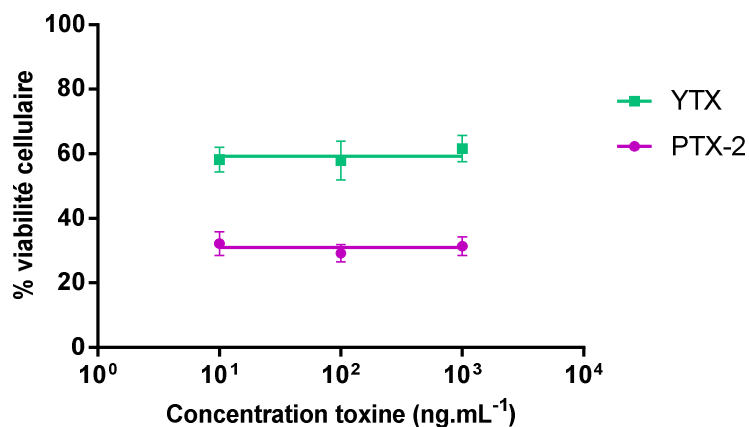


Figure 44 : Evaluation de l'activité cytotoxique de la yessotoxine (YTX) et de la pecténotoxine-2 (PTX-2) sur cellules KB après 72 h d'incubation.

3.5. Toxicités atypiques

Des glandes digestives lyophilisées de moules provenant du Bassin d'Arcachon et ayant montré une toxicité atypique en 2009 et 2010 ont été extraites, purifiées au stade EP1 et EP2 et testées sur les cellules KB, aux concentrations maximales tolérées de 715 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ eq_{EB} pour EP1 et 1,54 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ eq_{EB} pour EP2. Ces extraits n'ont induit aucune réduction de la viabilité cellulaire. Ces extraits avaient au préalable été re-testés sur souris, afin de vérifier que le caractère toxique était toujours présent.

3.6. Conclusion sur le test de cytotoxicité sur cellules KB

Les cellules KB ont présenté une tolérance intéressante aux matrices représentées par des glandes digestives de moules. Une légère interférence de cette matrice avec le test a été observée, avec une plus grande sensibilité du test envers les extraits bruts de micro-algues et les toxines en présence de matrice.

En effet, pour les deux extraits bruts et les deux toxines pures, le facteur d'augmentation de la sensibilité des cellules avec le dopage EP1 ou EP2 est resté inférieur à un facteur 3 (sauf pour l'AO en dopage de EP1, dont la Cl_{50} a été diminué d'un facteur 5,8). Ce facteur peut donc être considéré comme acceptable. Dans ces conditions de dopage, sur la base des Cl_{50} , la limite de détection (*limit of detection*, LOD) de l'AZA1 en EP1 était de 2,9 $\mu\text{g}_{\text{AZA1}}.\text{kg}^{-1}$ chair totale , et de 1,6 $\mu\text{g}_{\text{AZA1}}.\text{kg}^{-1}$ chair totale en EP2. Le test sur cellules KB présentait donc une plus faible sensibilité envers l'AO, dont la LOD était de 218 $\mu\text{g}_{\text{AO}}.\text{kg}^{-1}$ chair totale en EP2. Ce test de cytotoxicité sur cellules KB avec utilisation du XTT pour révéler la viabilité permet donc de détecter l'AZA1 en matrice EP2 à une concentration 100 fois inférieure au seuil de réglementation fixé à 160 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, ce qui représente un résultat particulièrement intéressant. Concernant l'AO, le test permet une détection à une concentration du même ordre de grandeur que le seuil de réglementation également fixé à 160 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. Le test sur cellules KB semble ainsi plus adapté à la détection de l'AZA1 qu'à la détection de l'AO.

Concernant les toxines deux autres toxines pures testées, la YTX et la PTX-2, une réduction de la viabilité cellulaire a pu être observée, mais dans une moindre mesure que l'AO ou l'AZA1 et pour des concentrations beaucoup plus élevées. Ces résultats peuvent être interprétés de deux façons différentes : la méthode peut être considérée comme peu fiable si elle n'est pas capable de détecter correctement deux types de toxines, cependant ces toxines sont non réglementées en Europe et leur interférence avec le test peut être considérée comme un faux-positif. C'était ainsi le cas pour le test souris : la yessotoxine étant toxique pour les souris par injection intra-péritonéale, sa co-extraction avec les toxines DSP induisait parfois des résultats faux-positifs.

Il sera donc nécessaire, par la suite, de confirmer les effets de la YTX et de la PTX-2 sur les cellules KB, et d'évaluer ceux d'un plus large panel de toxines.

L'étape de purification EP2 semble importante à mettre en place. En effet, cette matrice purifiée peut être appliquée sur les cellules KB à une concentration deux fois plus importante que la matrice EP1. Il existe certes une perte des toxines au cours de ces étapes de purification, mais cette perte peut être contrebalancée par le fait que la matrice augmente la sensibilité du test. Le protocole de purification sera cependant à optimiser pour augmenter le rendement de récupération des toxines lipophiles, ce qui permettrait éventuellement de diminuer la concentration en matrice EP2 et donc de diminuer le risque d'observer des faux-positifs.

Ce test sur cellules KB n'a cependant détecté aucune activité dans des extraits bruts d'hépatopancréas de moules provenant du Bassin d'Arcachon et ayant présenté une toxicité atypique sur souris en 2009 et 2010. L'analyse chimique de ces extraits avait montré l'absence de toxines connues, dont entre autres l'AO, l'AZA1, la YTX ou la PTX-2, qui auraient pu être responsables de leur toxicité. L'absence d'activité sur le test cellulaire confirme donc bien l'absence de ces toxines, et il semble que la toxicité de ces extraits soit causée par un ou plusieurs composés dont le mécanisme d'action ne peut être détectable par le test de cytotoxicité sur cellules KB.

4. Résultats : Déteçtabilité de phycotoxines lipophiles par le bio-essai sur larves de diptères

4.1. Screening de différentes familles de micro-algues

La démarche mise en place pour le test sur cellules KB a été appliquée au test sur larves de diptères. Dans un premier temps, l'objectif était donc d'évaluer la capacité du test larve à discriminer des organismes toxiques d'organismes non toxiques. Dans un premier temps, afin d'observer une éventuelle activité maximale, les extraits bruts de 13 micro-algues ont été testés à la concentration de 100 mg.mL⁻¹ (Figure 45). De la même façon que le test de cytotoxicité, seules les micro-algues connues pour produire des toxines ont induit un effet sur les larves. Les extraits bruts d'*A. spinosum*, *A. ostenfeldii*, *P. lima* et *V. rugosum* ont ainsi induit une paralysie partielle immédiate suivie d'une paralysie totale (Figure 45 a).

Dans ce screening, afin d'évaluer l'activité d'une toxine non lipophile au sein de la matrice algale, l'organisme *Alexandrium minutum* a été ajouté. *A. minutum* est en effet connu pour produire notamment les saxitoxines, responsables du syndrome d'intoxication paralysante par les fruits de mer, et donnant des résultats positifs sur ce test (Denardou, 1998; Ruiz *et al.*, 2010). L'extrait brut d'*A. minutum* a donc bien entraîné une paralysie partielle immédiate, rapidement suivie d'une paralysie totale.

Le test larve, de même que le test de cytotoxicité, semble bien répondre à la présence de toxines et non à des composants de la matrice algale puisque les algues non toxique n'induisent aucun effet chez les larves, même à la concentration importante de 100 mg.mL⁻¹.

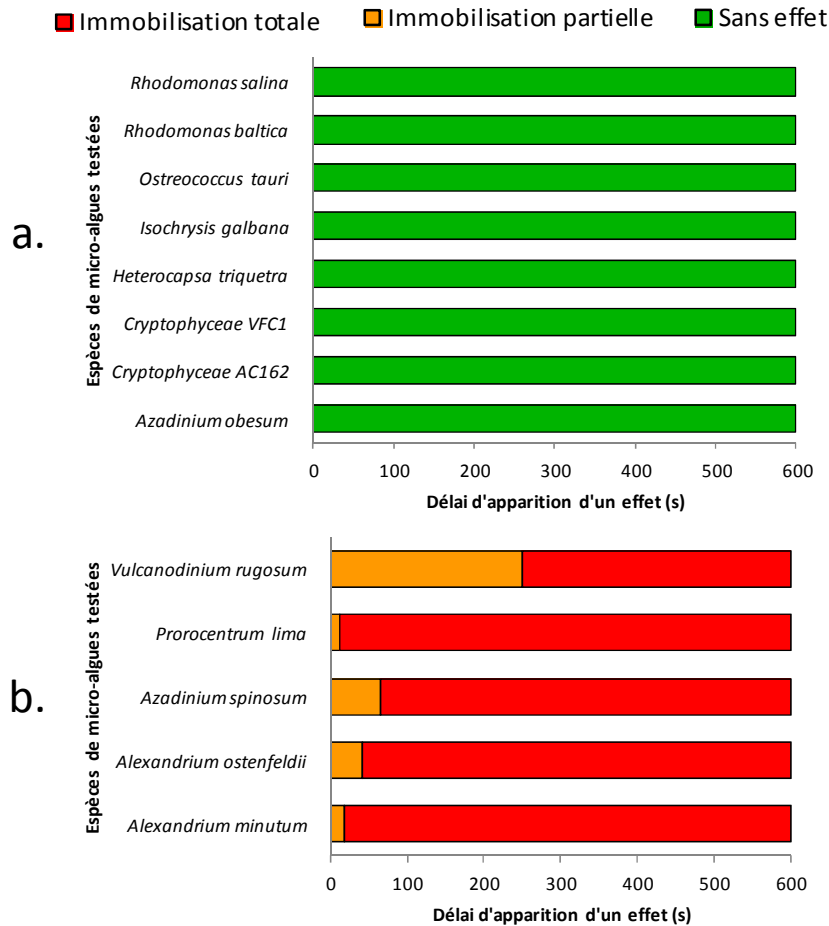


Figure 45 : Screening d'extraits bruts de 13 micro-algues pour la recherche d'une neuro-activité. a. micro-algues non toxiques et b. micro-algues toxiques.

4.2. Etude des seuils de détection d'extraits de micro-algues toxiques et de toxines pures

Les extraits bruts de *P. lima* et *A. spinosum* ont été retenus pour la suite de l'étude. Une gamme de concentration a été réalisée pour chaque extrait, avec des dilutions au demi partant de 100 mg.mL^{-1} et jusqu'à disparition de l'activité. Ainsi *P. lima* a présenté une concentration minimale active de $0,4 \text{ mg.mL}^{-1}$ contre $12,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ pour *A. spinosum*, soit une activité environ 30 fois plus importante (Figure 46 a).

Une gamme d'AO et AZA1 a été évaluée sur larves. L'AO a présenté une CMA de $1 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$, avec observation d'une courbe dose-réponse, contre une absence d'activité observée pour AZA1 jusqu'à la concentration de $50 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figure 46 b). La paralysie induite par l'AO était de type partiel, rapidement suivi par une paralysie totale de la larve.

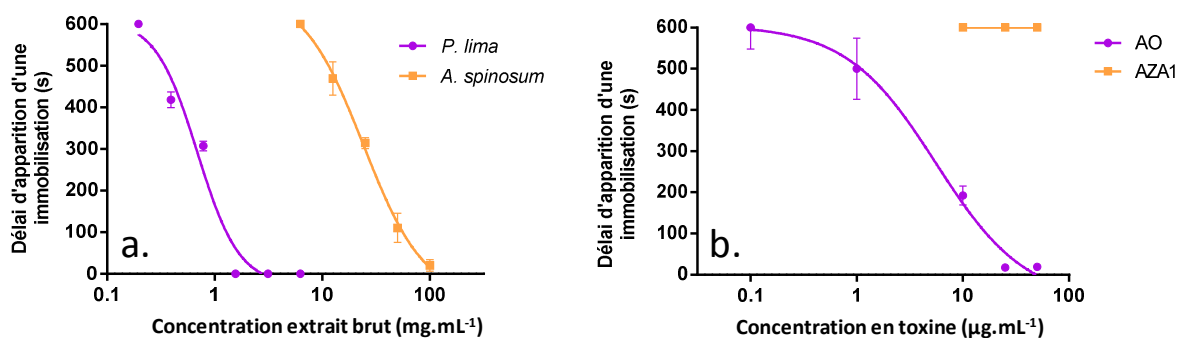


Figure 46 : Evaluation de l'effet d'une gamme d'extrait brut de *P. lima* et d'*A. spinosum*, et des toxines AO et AZA1 sur le délai d'apparition d'une immobilisation sur le test larve.

Ces résultats obtenus pour l'extrait brut de *P. lima* et pour l'AO sont en cohérence. En effet, la CMA de *P. lima* est de 0,4 mg.mL⁻¹, et si l'on suppose que l'AO était majoritairement responsable de cette activité, et que l'on extrapole la concentration de l'extrait brut en concentration en toxine, cela équivaldrait à une CMA de 0,8 µg.mL⁻¹ environ d'AO. Or, cette toxine a bien présenté une CMA de 1 µg.mL⁻¹, démontrant qu'elle était bien l'agent principalement responsable de l'activité dans l'extrait de *P. lima*.

Cette induction d'une immobilisation sur modèle larve est intéressante car en cohérence avec certaines données bibliographiques. En effet, il a déjà été rapporté que l'AO induisait l'augmentation de la contraction de fibres de muscles lisses, ainsi que la contraction durable de muscles lisses isolés d'artères (Shibata *et al.*, 1982). La contraction musculaire est provoquée par la phosphorylation des chaînes légères de myosine, et la relaxation intervient lorsque cette protéine est déphosphorylée par une phosphatase, notamment la PP1. C'est pourquoi l'AO, en inhibant la déphosphorylation des chaînes légères de myosine, empêcherait le relâchement musculaire de la larve (Takai *et al.*, 1987; Fernandez *et al.*, 2002).

Le mécanisme d'action de l'AZA1, toujours inconnu à ce jour, ne semble pas être détecté par le test larve. Cependant, l'extrait brut d'*A. spinosum* a tout de même présenté une activité intéressante sur larves, il semble donc que cet extrait renferme d'autres composés responsables de cette activité. Cette activité pourrait ainsi être due à la présence d'autres azaspiracides, de composés inconnus, ou encore à des synergies existantes entre différents composés de l'extrait. Des études ultérieures de fractionnement bio-guidé des extraits d'*A. spinosum* pourraient permettre d'expliquer ces résultats.

4.3. Etude des effets d'extraits de moules dopés

4.3.1. Evaluation des effets de matrices induits par des extraits d'hépatopancreas de moules non contaminées

L'extrait EB de glandes digestives de moules a présenté des effets de matrices sur le test larves aux concentrations de 100 et 50 mg.mL⁻¹, en induisant des phases d'état amorphe et des phases d'immobilisation chez les larves (Figure 47). Par contre, les extraits partiellement purifiés EP1 et EP2 n'ont présenté aucun

effet à la concentration de 100 mg.mL^{-1} en équivalent extrait brut. Il aurait été intéressant de déterminer la concentration maximale réelle de EP1 et EP2 tolérée par les larves mais cela n'a pas été possible car au-delà de $100 \text{ mg.mL}^{-1} \text{ éq}_{\text{EB}}$, l'extrait n'était que très partiellement soluble dans les différents systèmes de solvants utilisés. Il apparaît donc que les larves sont des organismes très tolérants envers les matrices de moules.

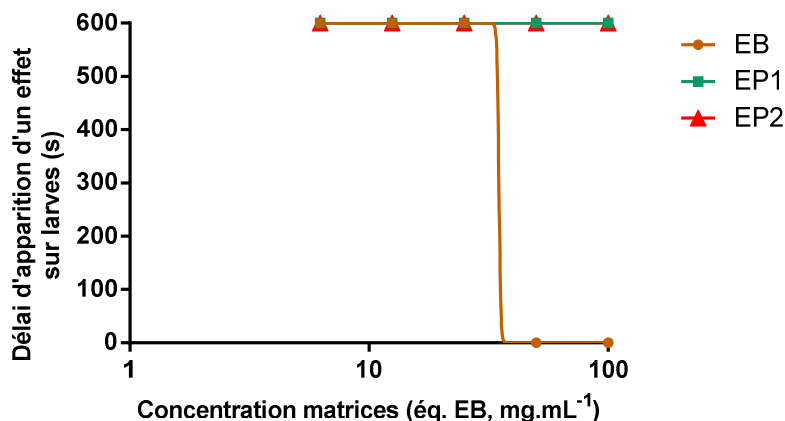


Figure 47 : Evaluation de l'activité sur larves d'insectes d'un extrait brut (EB) d'HP de moules et de deux extraits partiellement purifiés, EP1 et EP2. Les concentrations EP1 et EP2 sont exprimées en équivalent extrait brut.

4.3.2. Evaluation de l'activité sur larves de matrices de moules dopées

De même que pour le test de cytotoxicité sur cellules KB, d'éventuelles interférences de la matrice moule avec la détection des extraits bruts de micro-algues ont été étudiées.

Les concentrations en matrice EP1 et EP2 ont donc été fixées à $100 \text{ mg.mL}^{-1} \text{ éq}_{\text{EB}}$, et dopées avec une gamme d'extrait brut de *P. lima* et d'*A. spinosum* (Figure 48). Pour les deux extraits bruts et les deux matrices partiellement purifiées, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence. Ceci confirme le fait que la matrice interfère très peu avec le test larve dans la détection d'extraits bruts de micro-algues.

Du fait de ce résultat montrant l'absence d'effets de matrices avec les extraits EP1 et EP2, les toxines pures n'ont pas été testées en dopage de ces matrices.

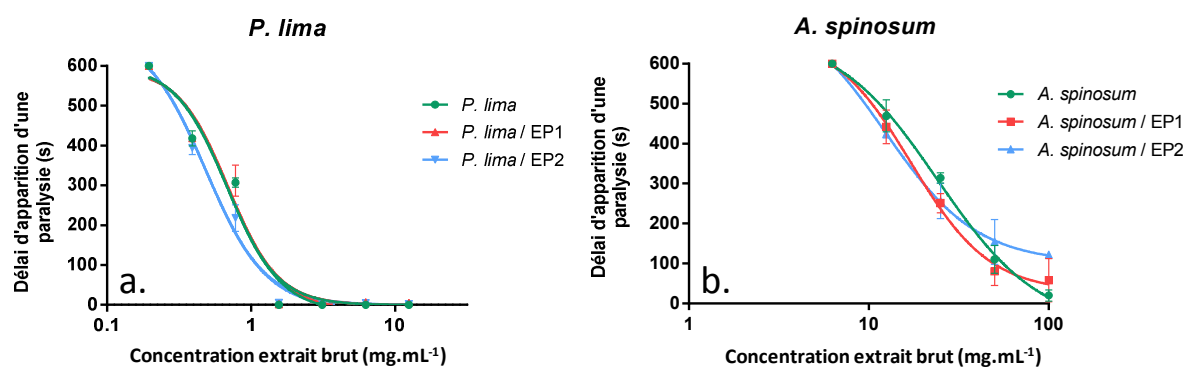


Figure 48 : Evaluation des effets de matrices moules partiellement purifiées, par dopage de ces matrices avec une gamme d'extrait brut de *P. lima* (a.) et *A. spinosum* (b.)

4.4. Toxicités atypiques

Des glandes digestives lyophilisées de moules provenant du Bassin d'Arcachon et ayant montré une toxicité atypique avec le test de toxicité aiguë sur souris (TS) en 2009 et 2010, ont été extraites, purifiées au stade EP2 et testées sur larves, à la concentration de 100 mg.mL⁻¹ éq_{EB}. De même qu'avec le test de cytotoxicité sur cellules KB, ces extraits n'ont induit aucune toxicité sur larves, confirmant de ce fait l'absence de contamination par les micro-algues toxiques du panel testé.

4.5. Conclusion sur le bio-essai sur larves de diptères

Le dopage des matrices avec les extraits bruts de micro-algues toxiques a montré une faible interférence de ces matrices avec le test. En toxine pure, l'AO était détecté à la CMA de 1 µg.mL⁻¹. Si l'on suppose qu'en matrice EP1 ou EP2 cette CMA reste identique, l'AO serait potentiellement détecté à une concentration de 133,6 µg.kg⁻¹ chair totale en matrice EP1, ce qui correspond environ à un seuil 1,2 fois inférieur au seuil réglementaire de 160 µg.kg⁻¹ chair totale. En matrice EP2, l'AO serait potentiellement détecté à une concentration de 28,1 µg.kg⁻¹ chair totale, soit environ à un seuil 5,7 fois inférieur à ce seuil réglementaire.

De même que pour le test de cytotoxicité, il semble donc important de pousser la purification de la matrice jusqu'à l'étape EP2, qui permet de détecter l'AO à un seuil intéressant.

Concernant les extraits de toxicités atypiques, de même que le test de cytotoxicité sur cellules KB, aucune activité n'a été détectée dans ces extraits avec le bio-essai sur larves. Ceci indiquerait que les composés toxiques détectés par le TS auraient un mécanisme d'action original non détectable par ce test. Il existe en effet, comme il a été décrit dans le Chapitre 2 (Tableau 11), des composés neuro-actifs non détectables avec le test sur larves de diptères, tels que des antagonistes des récepteurs nicotiques à l'acétylcholine ou des canaux calciques, qui pourraient cependant induire une toxicité par injection i.p. à des souris.

Tous les extraits bruts toxiques testés sur les larves ont induit une paralysie partielle immédiate, suivie à plus ou moins long terme d'une paralysie totale. Ce type d'enchaînement de symptôme a déjà été retrouvée pour certains composés, comme l'acide L-glutamique à la concentration de 34 mM, ou la nicergoline à 10,3 mM, ce qui confirme que ces symptômes ne sont donc pas du tout discriminants d'un mécanisme d'action particulier. Cependant, l'arbre décisionnel donné Figure 25 pourrait être complété avec les résultats de cette partie : le bio-essai sur larves de diptères est capable de détecter un antagoniste des protéines phosphatases 1 et 2A, avec une symptomatologie non discriminante.

Enfin, il est intéressant de noter que l'AZA1 n'a induit aucun effet sur les larves, alors que l'extrait brut d'*A. spinosum* a bien induit une paralysie. La CMA de l'extrait brut était de $12,5 \text{ mg.mL}^{-1}$, et si l'on suppose que l'AZA1 était majoritairement responsable de cette activité, et que l'on extrapole la concentration de l'extrait brut en concentration en toxine, cela équivaldrait à une CMA de 14 pg.mL^{-1} environ d'AZA1. Or, cette toxine a été testée à des concentrations bien supérieures, comprises entre 10 et $50 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$. Il semble donc bien que celle-ci ne soit pas responsable de l'activité de l'extrait brut. Cette activité pourrait ainsi être due à la présence d'autres azaspiracides, agissant seuls ou en synergie avec d'autres molécules, ou que d'autres types de molécules présentent une bio-activité. Il sera donc intéressant de réaliser un fractionnement bio-guidé avec le bio-essai sur larves, afin d'essayer de déterminer la nature de ce ou ces composés.

5. Résultats : Production de toxines par des micro-algues, une raison d'être écologique ?

L'écologie chimique est un domaine interdisciplinaire visant à comprendre les fonctions écologiques et l'importance évolutive des métabolites secondaires produits par les animaux, les plantes et les micro-organismes. D'une façon générale, les métabolites secondaires sont connus pour augmenter la fitness des espèces les produisant. De très nombreuses études dans ce domaine en milieu marin ont permis une compréhension assez solide de la façon dont certains métabolites secondaires produits par une espèce animale ou végétale pouvaient affecter d'autres espèces. Ces études renforcent la théorie quasi unanimement acceptée que les métabolites secondaires fournissent une défense importante contre des prédateurs ou compétiteurs (Engel *et al.*, 2002).

Concernant plus particulièrement le phytoplancton, les fonctions écologiques de certains métabolites ont également pu être appréhendées et sont rapportés dans diverses études. Par exemple, les aldéhydes poly-insaturés (APIs) sont des composés dérivés de l'oxydation des acides gras, et ont été découverts en milieu marin chez des diatomées (Miralto *et al.*, 1999). Les APIs présentent un grand intérêt au niveau écologique car ils induisent une forte activité tératogénique chez les organismes qui y sont exposés (Ianora *et al.*, 2004; Caldwell, 2009). Bien que ces effets soient moins marqués que ceux induits par des empoisonnements aigus, comme pour des neurotoxines par exemple, ils sont tout de même insidieux et peuvent réduire la compétitivité générale ces prédateurs. Ainsi, les efflorescences de diatomées subissent moins de pression de la part de leurs prédateurs. Les API ont également été rapportés pour présenter des activités allélopathiques, antibactériennes ou encore de signalisation cellulaire (Ianora *et al.*, 2011), et certaines toxines paralysantes, telles que la saxitoxine produite par *Alexandrium minutum*, offrent une protection contre les brouteurs tels que des copépodes, qui évitent de se nourrir de micro-algues les produisant (Cembella, 2003). De plus, *A. minutum* semble capable de répondre à la présence de brouteurs, et d'augmenter en conséquence la production de toxines paralysantes (Selander *et al.*, 2006). Différentes espèces formant des blooms et/ou produisant des toxines paralysantes, produisent également des composés allélopathiques leur permettant d'affaiblir la croissance ou la photosynthèse d'autres espèces, afin de les surpasser ou au moins de co-exister (Legrand *et al.*, 2003).

En dépit de ces quelques exemples précis en milieu marin, les effets des métabolites secondaires sur des organismes potentiellement en compétition pour l'espace ou les ressources restent largement inconnus.

Dans ce contexte, les raisons écologiques pour le développement et le maintien de défenses chimiques antimicrobiennes par des espèces marines sont pertinentes. En effet, le milieu marin renferme typiquement 10^7 virus, 10^6 bactéries, 10^3 champignons et 10^3 microalgues par mL d'eau de mer. Les plantes, invertébrés, organismes unicellulaires eucaryotes ou procaryotes marins, ne possèdent pas de système immunitaire et sont donc continuellement exposés à des micro-organismes potentiellement délétères. La production de métabolites secondaires bio-actifs peuvent donc pertinemment remplir ce rôle de défense antimicrobienne (Engel *et al.*, 2002). Sur la base de ces considérations, des tests antibactériens ont donc été choisis comme

pour compléter la suite de bio-essais et étudier le potentiel d'activité antimicrobien des microalgues toxiques étudiées.

5.1. Evaluation du potentiel antibactérien de micro-algues toxiques

Des extraits bruts des quatre micro-algues toxiques précédemment étudiées ont donc été testées sur 6 bactéries. Les concentrations efficaces 50 (CE₅₀) pour induire une inhibition, un ralentissement ou un retard ont été définies (Tableau 20 et Annexe 11).

Seule la micro-algue *A. spinosum* a présenté une activité sur la bactérie gram-positif *C. piscicola*. A la concentration de 100 µg.mL⁻¹, l'inhibition de la croissance bactérienne était totale, avec une CE₅₀ de 52,9 µg.mL⁻¹. Un ralentissement et un retard de la croissance de cette souche bactérienne ont également pu être définis. Cette activité d'*A. spinosum* semble donc très ciblée, car observable sur une seule bactérie. A notre connaissance, aucune activité de ce type ne semble avoir été rapportée à ce jour, ni pour *A. spinosum* ni pour les AZA. Le mécanisme d'action d'AZA1 reste à ce jour inconnu, mais il semble cependant que cette toxine présente des caractéristiques ionophorétiques (capacité à former des pores dans les membranes), ce qui pourrait se traduire par une activité antibactérienne et expliquer l'activité d'*A. spinosum* sur *C. piscicola* (Rasky *et al.*, 2012). Enfin, l'activité observée pourrait également être due à d'autres composés qu'AZA1, comme cela semble déjà être le cas avec le test larve, l'extrait brut d'*A. spinosum* ayant présenté une activité sur larves de diptères alors qu'AZA1 était inactif.

Les résultats obtenus pour les micro-algues *P. lima*, *V. rugosum* et *A. ostenfeldii* étaient attendus. D'une part, il a déjà été rapporté qu'avec la méthode de diffusion de disque, l'AO et la DTX-1 n'ont pas présenté d'activité sur les bactéries *Bacillus megaterium*, *E. coli* et *Staphylococcus aureus* (Nagai *et al.*, 1990). De plus, l'AO et ses dérivés sont connus pour inhiber les protéines phosphatases sérine/thréonine 1 et 2A, or ces protéines spécifiques n'ont jamais été rapportées dans la littérature comme étant produites par des organismes procaryotes. En revanche, d'autres types de protéines phosphatases existent bien chez les bactéries (Shi *et al.*, 1998; Kennelly, 2002), et il était intéressant de voir si un extrait de *P. lima* pouvait induire une activité en agissant potentiellement sur ces protéines. Il semble donc que *P. lima* n'induit pas d'inhibition de ces protéines. Concernant *V. rugosum* et *A. ostenfeldii*, le même type de raisonnement peut être tenu. En effet, les pinnatoxines, les spirolides et les imines cycliques en général, sont des inhibiteurs des récepteurs nicotiniques à acétylcholine (Araoz *et al.*, 2011; Hellyer *et al.*, 2011), et il a été rapporté que des canaux ioniques d'organismes procaryotes appartenaient à la même grande famille que des récepteurs nicotiniques à acétylcholine d'eucaryotes (Bocquet *et al.*, 2007). Des extraits bruts de *V. rugosum* ou de *A. ostenfeldii* aurait donc éventuellement pu induire une activité sur certaines souches bactériennes, ce qui n'a pas été le cas. Enfin, il semble que ces micro-algues toxiques ne produisent pas de composés, autres que les toxines connues, qui induisent une activité antibactérienne.

Tableau 20 : Evaluation de l'activité antibactérienne d'extraits bruts de micro-algues toxiques.

Micro-algue		<i>V. crassostreae</i>	<i>V. gigantis</i>	<i>V. mytili</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. piscicola</i>	<i>L. garvieae</i>
<i>Alexandrium ostenfeldii</i>	Inhibition CE ₅₀ (µg.mL ⁻¹)	>100	>100	>100	>100	>100	>100
	Ralentissement CE ₅₀ (µg.mL ⁻¹)	>100	>100	>100	>100	>100	>100
	Retard CE ₅₀ (µg.mL ⁻¹)	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Azadinium spinosum</i>	Inhibition CE ₅₀	>100	>100	>100	>100	52,9	>100
	Ralentissement CE ₅₀	>100	>100	>100	>100	56,1	>100
	Retard CE ₅₀	>100	>100	>100	>100	60,8	>100
<i>Prorocentrum lima</i>	Inhibition CE ₅₀	>100	>100	>100	>100	-	-
	Ralentissement CE ₅₀	>100	>100	>100	>100	-	-
	Retard CE ₅₀	>100	>100	>100	>100	-	-
<i>Vulcanodinium rugosum</i>	Inhibition CE ₅₀	>100	>100	>100	>100	>100	>100
	Ralentissement CE ₅₀	>100	>100	>100	>100	>100	>100
	Retard CE ₅₀	>100	>100	>100	>100	>100	>100

5.2. Evaluation d'extraits d'hépatopancreas de moules ayant montré une toxicité atypique

Les extraits de moules ayant présenté une toxicité atypique sur souris n'ont pas induit d'activité sur les deux tests d'activité précédents (test de cytotoxicité et test de sur larves de diptère). Ces résultats ont donc démontré la présence de molécules présentant d'autres propriétés bioactives que celles des toxines connues et évaluées. Il était donc intéressant de tester ces extraits avec les tests antibactériens, afin de voir si des molécules possédant d'autres types de mécanismes d'action pouvaient être détectées, et qui seraient potentiellement responsables de ces toxicité atypiques.

Ainsi, dans un premier temps les matrices non contaminées EB, EP1 et EP2 ont été testées, à la concentration de 100 µg.mL⁻¹ pour EB et de 1,1 mg.mL⁻¹ éq_{EB} pour EP1 et de 5,5 mg.mL⁻¹ éq_{EB} pour EP2. Aucune inhibition, retard ou ralentissement de croissance n'a été observée sur les différentes souches testées (Tableau 21 et Annexe 12). Le seul effet observé a été à l'inverse une stimulation importante de la croissance de *C. piscicola* avec EB, EP1 et EP2. Ces souches bactériennes présentent donc une tolérance assez importante envers les matrices de moules. Enfin, les extraits de moules provenant du Bassin d'Arcachon et ayant induit une toxicité sur souris n'ont induit aucun effet sur la croissance des bactéries testées.

Tableau 21 : Evaluation des effets des matrices de moules EB, EP1 et EP2 sur la croissance de différentes souches bactériennes.

			<i>V. crassostreae</i>	<i>V. gigantis</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. piscicola</i>	<i>L. garvieae</i>
Matrices non contaminées	EB	Inhibition CE ₅₀ (mg.mL ⁻¹)	> 0,1	> 0,1	> 0,1	> 0,1	> 0,1
		Ralentissement CE ₅₀ (mg.mL ⁻¹)	> 0,1	> 0,1	> 0,1	> 0,1	> 0,1
		Retard CE ₅₀ (mg.mL ⁻¹)	> 0,1	> 0,1	> 0,1	> 0,1	> 0,1
	EP1	Inhibition CE ₅₀ (mg.mL ⁻¹ éq _{EB})	> 1,1	> 1,1	> 1,1	> 1,1	-
		Ralentissement CE ₅₀ (mg.mL ⁻¹ éq _{EB})	> 1,1	> 1,1	> 1,1	> 1,1	-
		Retard CE ₅₀ (mg.mL ⁻¹ éq _{EB})	> 1,1	> 1,1	> 1,1	> 1,1	-
	EP2	Inhibition CE ₅₀ (mg.mL ⁻¹ éq _{EB})	> 5,5	> 5,5	> 5,5	> 5,5	-
		Ralentissement CE ₅₀ (mg.mL ⁻¹ éq _{EB})	> 5,5	> 5,5	> 5,5	> 5,5	-
		Retard CE ₅₀ (mg.mL ⁻¹ éq _{EB})	> 5,5	> 5,5	> 5,5	> 5,5	-
Matrices toxicité atypique	EB	Inhibition CE ₅₀ (mg.mL ⁻¹)	> 0,1	> 0,1	> 0,1	> 0,1	> 0,1
		Ralentissement CE ₅₀ (mg.mL ⁻¹)	> 0,1	> 0,1	> 0,1	> 0,1	> 0,1
		Retard CE ₅₀ (mg.mL ⁻¹)	> 0,1	> 0,1	> 0,1	> 0,1	> 0,1
	EP1	Inhibition CE ₅₀ (mg.mL ⁻¹ éq _{EB})	> 1,1	> 1,1	> 1,1	> 1,1	-
		Ralentissement CE ₅₀ (mg.mL ⁻¹ éq _{EB})	> 1,1	> 1,1	> 1,1	> 1,1	-
		Retard CE ₅₀ (mg.mL ⁻¹ éq _{EB})	> 1,1	> 1,1	> 1,1	> 1,1	-
	EP2	Inhibition CE ₅₀ (mg.mL ⁻¹ éq _{EB})	> 5,5	> 5,5	> 5,5	> 5,5	-
		Ralentissement CE ₅₀ (mg.mL ⁻¹ éq _{EB})	> 5,5	> 5,5	> 5,5	> 5,5	-
		Retard CE ₅₀ (mg.mL ⁻¹ éq _{EB})	> 5,5	> 5,5	> 5,5	> 5,5	-

5.3. Conclusion sur les tests antibactériens

D'après les résultats des tests antibactériens, il semblerait que d'une façon générale, les toxines de micro-algues ne soient pas produites dans un but de compétition avec les bactéries du panel testé. Un seul résultat positif a en effet été obtenu dans ce screening, un extrait brut d'*A. spinosum* ayant impacté la croissance de la bactérie Gram-positif *C. piscicola*, mais à des concentrations relativement élevées de l'ordre de 50 à 60 µg.mL⁻¹. Cependant, une activité antibactérienne peut également se traduire par des mécanismes autres qu'une inhibition de croissance de la bactérie cible. Ainsi des métabolites secondaires antibactériens peuvent agir sur le comportement des bactéries dans l'environnement, tel que leur chimiotactisme, leur capacité à se

déplacer, à s'attacher ou à coloniser une surface (Engel *et al.*, 2002).

Au vu de ces résultats, les tests antibactériens tels qu'ils ont été développés dans cette étude ne semblent donc pas adaptés à la détection de composés bio-actifs lipophiles issus de micro-algues marines.

Les extraits partiellement purifiés de matrices de moules d'Arcachon ayant induit une toxicité atypique avec le bio-essais sur souris n'ont pas non plus présenté d'effet sur la croissance des différentes bactéries testées. Il semble donc que les molécules contaminant ces extraits de toxicité atypique présentent un mécanisme d'action différents de ceux classiquement retrouvés dans des activités antibactériennes. En effet, les molécules possédant des propriétés antibactériennes ont généralement des mécanismes d'action appartenant à une des grandes catégories suivantes : activité sur la biosynthèse de la paroi bactérienne, sur la structure de l'ADN, sur la biosynthèse des acides gras, sur la biosynthèse de l'acide folique, sur la membrane avec propriétés ionophorétiques, ou encore sur la biosynthèse de protéines (Hutter *et al.*, 2004).

6. Conclusion et perspectives sur l'utilisation de la suite d'essais pour détecter des toxines lipophiles dans des matrices de coquillages

Dans ce chapitre, la capacité des différents bio-essais à détecter une activité dans des extraits bruts de micro-organisme toxiques a été évaluée. Les résultats globaux de ces bio-essais sont rappelés Tableau 22.

Dans un premier temps, le test de cytotoxicité et le test de neuro-activité se sont révélés capables de discriminer des micro-algues toxiques de micro-algues non toxiques. Le test de cytotoxicité sur cellules KB a présenté une détectabilité particulièrement intéressante de AZA1, à une concentration près de 100 fois inférieure au seuil de salubrité. Le test de neuro-activité a présenté quant à lui une détectabilité intéressante de l'AO, à une concentration près de 7 fois inférieure au seuil réglementaire.

Tableau 22 : Récapitulatif des différents types d'extraits détectables par les trois bio-essais utilisés.

Type de test	Extraits bruts de micro-algues non toxiques	Extraits bruts de micro-algues toxiques				Toxines réglementées		Extraits de moules toxicité atypique
		<i>P. lima</i>	<i>A. spinosum</i>	<i>V. rugosum</i>	<i>A. ostenfeldii</i>	AO	AZA1	
Bio-essai sur souris	-	+	+	+	+	+	+	+
Test de cytotoxicité sur cellules KB	-	+	++	+	+	+	++	-
Bio-essai sur larves de diptères	-	+	+	+	+	++	-	-
Test d'activités antibactériennes	-	-	(+)	-	-	nt	nt	-

Considérés individuellement, ces tests ne pourraient être appliqués dans un objectif de vigilance, mais la force de ces modèles biologiques réside dans la complémentarité de leur potentiel de détection, qui est également plus globale que celui des tests immunochimiques ou fonctionnels adaptés spécifiquement à un type de toxine.

Pour rappel, les méthodes immunologiques pour la détection de toxines exploitent le principe de l'affinité d'un anticorps pour ses antigènes. Les méthodes basées sur des anticorps permettent ainsi de détecter les composés possédant la structure chimique spécifiquement reconnue par l'anticorps (EFSA, 2008b). Différents tests ELISA ont été proposés pour détecter des toxines comme l'AO (Kreuzer *et al.*, 1999), des ciguatoxines (Tsumuraya *et al.*, 2012) ou encore l'acide domoïque (Smith et Kitts, 1995). Les tests fonctionnels sont basés sur la capacité d'agents bioactifs, comme les phycotoxines, à se lier à une structure moléculaire qui reconnaît de façon sélective la structure de l'agent. L'interaction entre le composé et le récepteur enclenche une série d'événements qui conduisent à une réponse finale dans le système (Rossini,

2005). Un test fonctionnel fait donc appel de façon spécifique à la cible moléculaire de la toxine. Ainsi, l'AO est connu pour inhiber de façon spécifique PP1 et PP2A (Bialojan et Takai, 1988), et des tests fonctionnels basés sur l'inhibition de protéines phosphatases ont été développés pour leur détection (Tubaro *et al.*, 1996a; Vieytes *et al.*, 1997; Cañete *et al.*, 2010). Les tests fonctionnels peuvent également être basés sur des lignées cellulaires exprimant la cible de la toxine. Par exemple, Dickey *et al.* (1999) ont utilisé un test de cytotoxicité basé spécifiquement sur des canaux sodiques pour détecter les brevétoxines, Cañete *et al.* (2010) ont proposé un test basé sur des cellules hybrides NG108-15 pour détecter l'AO, Caillaud *et al.* (2012) ont proposé un test cellulaire basé sur des neuroblastomes pour détecter des ciguatoxines, ou encore Amzil *et al.* (1992) ont proposé un test basé sur des modifications morphologiques des cellules KB pour détecter l'AO.

Cependant, en raison de la nécessité de connaître *a priori* la structure chimique ou le mécanisme d'action des toxines à détecter, les tests immunologiques et fonctionnels ne semblent pas applicables à la détection de toxines inconnues si celles-ci ne présentent un mécanisme d'action original. Ainsi, les tests biologiques sans fonctionnalité spécifique pourraient apparaître comme les plus appropriés pour l'étude de nouveaux composés. Cependant, les tests proposés dans cette étude n'ont pas détecté d'activité dans des extraits de moules présentant une toxicité atypique sur souris, montrant que ce panel, s'il est capable de détecter un certain nombre de mécanismes d'action, devrait être complété par d'autres types de tests afin d'élargir ce panel de détection.

Les différentes expérimentations de dopage ont présenté des résultats intéressants en termes de détection, malgré une légère interférence de la matrice avec le test de cytotoxicité. Cependant, le dopage s'est basé sur un lot unique de moules, en provenance de Blainville-sur-Mer (Normandie), et achetées au mois de février 2010. Pour des raisons pratiques, il n'a pas été possible de disséquer et tester des glandes digestives de moules provenant d'autres régions géographiques et récoltées à d'autres périodes de l'année. Pourtant, il sera important par la suite de réaliser ce travail et de vérifier la reproductibilité des résultats avec d'autres lots de moules. En effet, au cours de l'année la chair de moules ne présente pas la même composition. Par exemple, la composition nutritionnelle de l'alimentation des moules varie en fonction de la période de l'année, et a une profonde influence sur la composition en lipides neutres et phospholipides de l'hépatopancréas (Cahu *et al.*, 1994). Des variations sont également retrouvées au niveau de la composition en acides gras (Surh *et al.*, 2003), or ces acides gras peuvent interférer avec les tests biologiques comme il a été rapporté pour le test souris (Suzuki *et al.*, 1996). Il pourrait donc y avoir des interférences différentielles de la matrice moule avec le test en fonction de la période de l'année et de l'origine géographique. De plus les moules et les coquillages en général sont soumis à de cycles de reproduction qui influencent fortement leur physiologie et donc leur composition (Gosling, 2003).

La matrice EP2 a présenté les résultats les plus intéressants car très bien tolérée par les différents modèles. Exprimée en concentration « équivalent extrait brut », elle peut donc être testée à des concentrations importantes et donc augmenter les chances de détection de composés potentiellement présents en faible quantité dans l'extrait. Cependant, une perte d'une partie des toxines présentes initialement dans les tissus de coquillage est à prendre en compte. Il sera donc nécessaire, par la suite, d'optimiser ce protocole afin de tenter de réduire ces pertes.

Cette suite d'essais n'en est donc qu'à une étape très préliminaire de développement, et les processus de validation de méthodes alternatives sont très longs et laborieux. Les protocoles doivent en effet répondre à un certain nombre de critères tels que la pertinence, la fiabilité ou la validité, et passer par des étapes rigoureuses de standardisation ou encore d'évaluation. Ces différents termes sont définis Tableau 23. Les notions de pertinence et de fiabilité sont étroitement liées. Une méthode est dite fiable si elle détecte de façon reproductible la catégorie de toxines ciblée, et ce à une concentration biologiquement pertinente. Dans le cas présent, la combinaison du test de cytotoxicité sur cellules KB et le bio-essais sur larves de diptères permet une détection de l'AO et AZA1 à des concentrations pertinentes car inférieures à la limite réglementaire. Cette combinaison présente également un potentiel de fiabilité, car l'utilisation de témoins positifs (acide pénicillique pour la cytotoxicité et acide L-glutamique pour la neuro-activité) a montré une bonne reproductibilité. Cependant, un plus grand nombre d'essais avec différents types de standards et de toxines seront bien sur nécessaires pour standardiser et valider cette méthode.

Il sera également nécessaire d'élargir le panel de toxines en évaluant le potentiel de détection de l'ensemble des toxines lipophiles, à la fois réglementées et non réglementées. Ces toxines devront être testées seules et en association, afin de voir si des phénomènes additifs ou synergiques sont observés. Les avantages et inconvénients de chacun des tests sont repris Tableau 24.

Tableau 23: Définition des termes fondamentaux appliqués à un processus de validation de méthode (d'après Barile, 2008).

Terme	Définition
<i>Validation</i>	Processus pour la détermination de la pertinence et de la fiabilité d'un test dans un objectif spécifique
<i>Fiabilité</i>	Détermination de la reproductibilité d'un test en intra- et inter-laboratoire
<i>Pertinence</i>	Démonstration de la capacité de prédiction et d'application de la méthode
<i>Normalisation</i>	Analyse de la fiabilité de la procédure testée en comparaison avec des standards externes et internes
<i>Validité</i>	Définition de standards pour une utilisation en routine en intra- et inter-laboratoire
<i>Caractérisation</i>	Procédure d'acceptation de la méthode par la communauté scientifique

Tableau 24 : Avantages et inconvénients de la suite de bio-essais.

	Avantages	Inconvénients
Test de cytotoxicité sur cellules KB, révélation au XTT	Ne pose pas de problèmes d'éthique	Repiquage des cellules toutes les 48 h
	Nécessite peu de quantité d'extrait	Nécessité d'avoir un équipement spécifique pour la culture cellulaire
	Possibilité d'envisager du haut débit	Nécessite au moins 48 h d'expérimentation
	Cellules robustes, manipulables sans précaution particulière donc bien adaptées à un test de routine	Détection de l'AO un peu trop faible par rapport au seuil réglementaire de $160 \mu\text{g.kg}^{-1}$ chair totale : risque d'observation de faux-négatifs
	Sensibilité à l'AO du même ordre de grandeur que d'autres lignées cellulaires décrites dans la bibliographie	Pas de détection d'activité dans les extraits de moules ayant présenté une toxicité atypique sur souris
	Sensibilité à l'AZA1 meilleure que d'autres lignées cellulaires décrites dans la bibliographie	
	Sensibilité à la matrice permettant une détection de l'AZA1 à une concentration près de 100 fois inférieure au seuil réglementaire de $160 \mu\text{g.kg}^{-1}$ chair totale	
Bio-essais sur larves de diptères	Ne pose pas de problèmes d'éthique	Pour un test de routine, nécessité de travailler sur une souche pure
	Rapidité du test, 10 min d'observation	Pas de sensibilité à l'AZA1
	Détection de l'AO à une concentration potentiellement 7 fois inférieure au seuil réglementaire de $160 \mu\text{g.kg}^{-1}$ chair totale	Pas de détection d'activité dans les extraits de moules ayant présenté une toxicité atypique sur souris
	Tolérance importante aux matrices de moules	
	Consommation d'extraits plus faible que le TS	
	Coût du test très réduit	

Chapitre 4 – *Application* : Evaluation par bio-essais du
potentiel toxique de *Penicillium* issus de mollusques
bivalves

1. Introduction

Les zones conchylicoles ont été démontrées comme étant riches en diverses souches de champignons, et plus particulièrement en espèces appartenant au genre *Penicillium* (Sallenave-Namont *et al.*, 2000; Matallah-Boutiba *et al.*, 2012). Une des hypothèses avancées pour tenter d'expliquer certains phénomènes de toxicité atypique repose sur la contamination potentielle de mollusques bivalves par des composés toxiques produits par certaines de ces souches, hypothèse déjà étayée par un certain nombre d'études (Sallenave *et al.*, 1999; Grovel *et al.*, 2003; Poirier *et al.*, 2007b; Ruiz *et al.*, 2010; Matallah-Boutiba *et al.*, 2012). Afin d'avancer dans la connaissance des métabolites bio-actifs pouvant être produits par des champignons en milieu marin, la suite de bio-essais ont été appliquée à l'évaluation du potentiel toxique de souches de *Penicillium* isolées du milieu marin, et plus particulièrement de mollusques bivalves.

Le genre *Penicillium* appartient à la grande famille des *Trichocomaceae*, renfermant également les genres *Aspergillus* et *Paecilomyces*. Les espèces appartenant à cette famille sont majoritairement saprotrophes, *i.e.* se nourrissant de matières organiques en décomposition. Ainsi ces organismes sont connus pour produire des acides organiques et diverses enzymes capables de dégrader une grande variété de substrats. De nombreuses espèces appartenant à ces différents genres sont très connues pour leur impact, positif ou négatif, sur la santé ou les activités humaines. En effet, les *Trichocomaceae* peuvent sécréter des métabolites secondaires représentant une menace pour la santé humaine et classés à ce titre comme mycotoxines : ochratoxine, aflatoxine, patuline, etc.. D'autres extrolites sont à l'inverse bénéfiques pour la santé humaine, en produisant des molécules d'intérêt pharmaceutique telles qu'un antibiotique, la pénicilline, ou encore la lovastatine, un anticholestérolémiant (Geiser *et al.*, 2006; Houbraeken *et al.*, 2011).

Le terme *Penicillium*, créé en 1809 par Link dérive du latin *penicillus*, qui veut dire « pinceau », en référence à la manière dont s'organisent les structures végétatives. Le genre *Penicillium* regroupe en effet les champignons dont les thalles sont laineux et cespiteux, septés, simples ou ramifiés, avec des terminaisons fertiles dressées en forme de pinceau, et des spores produites au niveau de ces pénicilles (Pitt, 1979). Les hyphes du mycélium sont généralement hyalin ou faiblement coloré, et portent les conidiophores qui se développent de façon perpendiculaire. A leur extrémité se forment les phialides, cellules productrices des conidies responsables de la multiplication végétative (Figure 49). Les espèces appartenant au genre *Penicillium* sont les anamorphes d'espèces appartenant à deux genres téléomorphes, *Talaromyces* et *Eupenicillium* (Pitt, 1979).

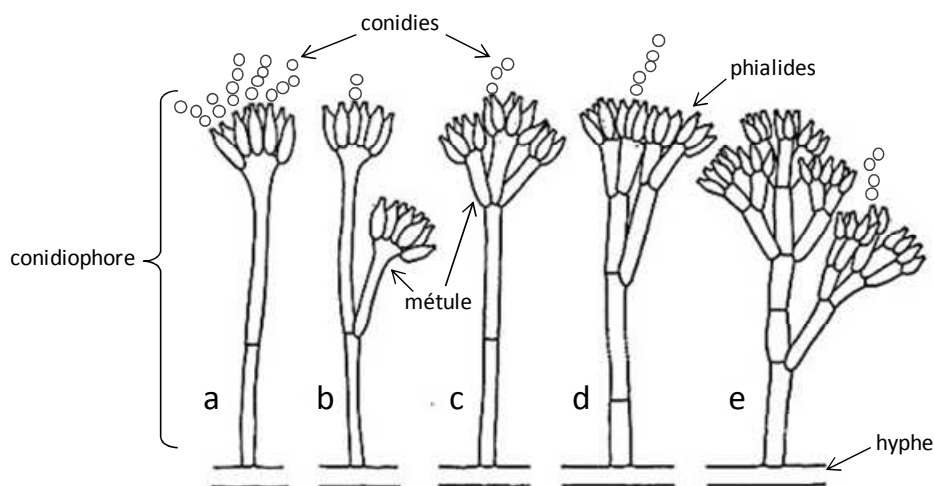


Figure 49 : Structure des conidiophores de *Penicillium*, a :conidiophore monoverticillé, b : biverticillé, c : triverticillé et d : quadriverticillé (d’après Samson *et al.*, 2004).

La classification des *Penicillium* a été plusieurs fois remaniée (Thom, 1930; Pitt, 1979; Stolk et Samson, 1985; Frisvad et Samson, 2004). La présente étude se base sur la classification de Houbraken et Samson (2011), qui propose de diviser le genre *Penicillium* en deux sous-genres : le sous-genre *Penicillium* et le sous-genre *Aspergilloïdes*, eux-mêmes subdivisés en sections (Tableau 25).

Tableau 25 : Classification des sections reliées au genre *Penicillium* (d’après Houbraken *et al.*, 2011).

Sections	
Sous-genre <i>Penicillium</i>	Sous-genre <i>Aspergilloïdes</i>
<i>Brevicompacta</i>	<i>Aspergilloïdes</i>
<i>Canescentia</i>	<i>Charlesii</i>
<i>Chrysogena</i>	<i>Cinnamopurpurea</i>
<i>Digitata</i>	<i>Citrina</i>
<i>Eladia</i>	<i>Exilicaulis</i>
<i>Fasciculata</i>	<i>Fracta</i>
<i>Paradoxa</i>	<i>Gracilentia</i>
<i>Penicillium</i>	<i>Lanata-divaricata</i>
<i>Ramosa</i>	<i>Ochrosalmonea</i>
<i>Roquefortorum</i>	<i>Ramigena</i>
<i>Turbata</i>	<i>Sclerotiora</i>
	<i>Stolkia</i>
	<i>Thysanophora</i>
	<i>Torulomyces</i>

2. Matériel et méthodes

2.1. Souches de champignons étudiées

Afin d'étudier le potentiel toxique de *Penicillium* issus de bivalves, 14 souches isolées de moules *Mytilus edulis* et de coques *Cerastoderma* sp. ont été sélectionnées dans la mycothèque du laboratoire. Afin de pouvoir comparer leurs activités, 10 souches isolées de l'environnement immédiat (sédiment et eau de mer) de ces bivalves ont été également sélectionnées. La liste de ces souches est donnée Tableau 26.

Ces souches ont été identifiées en utilisant différentes techniques : observation phénotypique macroscopique et microscopique (Tableau 27), biologie moléculaire (séquençage des régions ITS-1, ITS-2 et β -tubuline) ou encore détermination des profils métaboliques. Ces étapes de caractérisation ont été effectuées en relation avec le DTU à Lyngby (Danmarks Tekniske Universitet, Pr. J.C. Frisvad).

Parmi les souches étudiées, trois d'entre elles (MMS351, MMS388 et MMS399) appartiennent à une nouvelle espèce en cours de description : *Penicillium ligerum*. Trois souches n'ont pu être identifiées (MMS393, MMS967 et MMS976), du fait de difficultés pour leur remise en culture lors l'étude en biologie moléculaire.

Tableau 26 : Détails de l'identification et de l'origine des souches étudiées.

Numéro de souche	Espèce	Type d'échantillon	Localisation	Identification		
				Biologie moléculaire	Caractéristiques phénotypiques	Profilage métabolique
MMS50	<i>P. venetum</i>	moules	Estuaire de la Loire (La Tara)		x	x
MMS163	<i>P. antarcticum</i>	moules	Estuaire de la Loire (Tharon)	x		x
MMS231	<i>P. polonicum</i>	moules	Côte Atlantique (La Baule)	x		
MMS266	<i>P. marinum</i>	moules	Côte Atlantique (La Baule)		x	x
MMS330	<i>P. ubiquetum</i>	moules	Estuaire de la Loire (Port Giraud)		x	x
MMS388	<i>P. ligerum</i>	moules	Estuaire de la Loire (La Prée)	x		x
MMS393	<i>P. sp.</i>	moules	Estuaire de la Loire (La Prée)			
MMS399	<i>P. ligerum</i>	moules	Estuaire de la Loire (La Prée)	x		x
MMS5	<i>P. chrysogenum</i>	coques	Côte Atlantique (Le Croisic)	x	x	
MMS14	<i>P. antarcticum</i>	coques	Côte Atlantique (Le Croisic)	x	x	x
MMS15	<i>P. antarcticum</i>	coques	Côte Atlantique (Le Croisic)	x	x	x
MMS270	<i>P. bialowiezense</i>	coques	Côte Atlantique (La Baule)		x	x
MMS404	<i>P. brevicompactum</i>	coques	Côte Atlantique (Le Croisic)		x	x
MMS417	<i>P. restrictum</i>	coques	Côte Atlantique (Le Croisic)	x		
MMS194	<i>P. canescens</i>	eau de mer	Côte Atlantique (La Baule)		x	x
MMS351	<i>P. ligerum</i>	eau de mer	Estuaire de la Loire (La Prée)	x		x
MMS29	<i>P. citreonigrum</i>	sédiment	Côte Atlantique (Le Croisic)		x	
MMS42	<i>P. expansum</i>	sédiment	Côte Atlantique (Le Croisic)	x		x
MMS460	<i>P. canescens</i>	sédiment	Côte Atlantique (Le Croisic)		x	x
MMS556	<i>P. atramentosum</i>	sédiment	Baie de Bourgneuf		x	x
MMS747	<i>P. ligerum</i>	sédiment	Baie de Bourgneuf	x		x
MMS906	<i>P. radicum</i>	sédiment	Estuaire de la Loire		x	
MMS967	<i>P. sp.</i>	sédiment	Estuaire de la Loire		x	
MMS976	<i>P. sp.</i>	sédiment	Estuaire de la Loire		x	

Tableau 27 : Observation morphologique macroscopique (milieu DCA) des 24 souches de *Penicillium* étudiées.

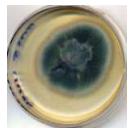
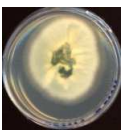


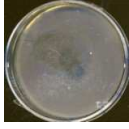



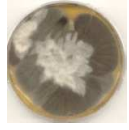









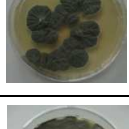



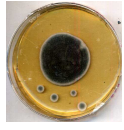
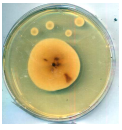




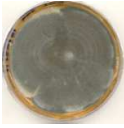
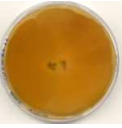





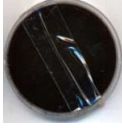





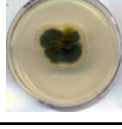
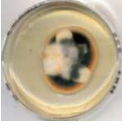
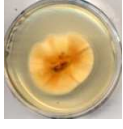
Numéro de souche	Observation macroscopique (recto)	Observation macroscopique (verso)	Description sur milieu DCA/Eau de mer
MMS5			Thalle de couleur vert-blanc, avec présence d'un liséré blanc. Aspect velouté, présence de stries radiales sur le recto et le verso. Verso de la souche non coloré, et pas d'observation de coloration du milieu.
MMS14			Thalle de couleur vert foncé au centre, vert clair en périphérie et présence d'un liséré blanc. Aspect poudreux, bords lisses, recto et verso plissés. Verso de la souche non coloré, et pas d'observation de coloration du milieu.
MMS15			Thalle de couleur vert-gris, sporulation très importante. Aspect poudreux, lisse, bords réguliers. Présence de cercles concentriques sur le verso de la souche qui présente une absence de coloration, de même que le milieu.
MMS29 (AF029)	non disponible	non disponible	non disponible
MMS42			Thalle épais, de couleur verte au centre et blanche en périphérie, à bords irréguliers. Sporulation verte très importante. Présence de stries radiales et de cercles concentriques. Verso de la souche plissé, avec stries radiales et cercles concentriques, et coloration brunâtre au centre.
MMS50			Thalle de couleur grisâtre, se colorant de blanc en son centre, d'aspect poudreux. Présence de sillons et de bords irréguliers. Verso de la souche plissé, jaune pâle, prenant une couleur verte par endroits. Pas d'observation de coloration du milieu.
MMS163			Thalle de couleur gris-vert, d'aspect poudreux, à bords lisses. Sporulation très importante. Verso de la souche lisse et non coloré. Pas d'observation de coloration du milieu.
MMS194			Thalle d'aspect granuleux, coloration vert-gris du centre vers la périphérie. Bords irréguliers, présence de stries radiales. Verso de la souche plissé, coloré en brun-rouge. Forte coloration du milieu de culture en brun-rouge.
MMS231			Thalle de couleur vert foncé à noir, coloration vert plus clair au niveau des zones de contact entre colonies. Aspect granuleux, présence de sillons, de bords irréguliers et de cercles concentriques. Verso de la souche plissé, jaune foncé. Pas d'observation de coloration du milieu.
MMS266			Thalle de couleur gris-marron, coloration grise plus intense au centre. Aspect cotonneux, présence de sillons, de bords réguliers et de cercles concentriques. Verso de la souche plissé, de couleur marron. Coloration brune du milieu.
MMS270			Thalle de couleur vert foncé, légèrement plus clair au centre. Aspect granuleux, présence de sillons, de bords irréguliers avec un liséré blanc. Verso de la souche plissé, de couleur jaune. Pas d'observation de coloration du milieu.
MMS330			Thalle de couleur vert-gris, blanchâtre par endroits. Aspect granuleux, bords réguliers, sporulation très importante. Verso de la souche légèrement plissé, de couleur jaune ou marron foncé par endroits. Pas d'observation de coloration du milieu.

Tableau 27 : suite et fin.

Numéro de souche	Observation macroscopique (recto)	Observation macroscopique (verso)	Description sur milieu DCA/Eau de mer
MMS351			Thalle de couleur vert-foncé, sporulation importante de couleur vert-gris. Présence de cercles concentriques et d'un liséré blanc. Aspect granuleux, bords réguliers. Verso de la souche lisse, légèrement coloré au centre. Pas d'observation de coloration du milieu.
MMS388			Thalle de couleur blanchâtre, prenant une teinte gris-vert au niveau des cercles concentriques les plus extérieurs. Aspect granuleux, velouté, présence de sillons, de bords irréguliers et d'un liséré blanc. Verso de la souche fortement coloré en marron-noir, avec un liséré gris-rouge. Coloration du milieu en marron
MMS393			Thalle de couleur jaune pâle. Aspect poudreux, velouté, présence de sillons, de bords irréguliers et d'un liséré blanc. Verso de la souche plissé, de couleur rouge foncé avec un liséré jaune. Coloration du milieu en rouge-marron.
MMS399			Thalle de couleur grisâtre, sporulation blanchâtre très importante. Aspect poudreux, présence de cercles concentriques et de bords réguliers. Verso de la souche lisse, de couleur jaune foncé-marron avec un liséré vert. Pas d'observation de coloration du milieu.
MMS404			Thalle de couleur vert-gris, sporulation très importante. Aspect granuleux, poudreux, présence de sillons et de bords réguliers. Verso de la souche plissé, de couleur jaune pâle. Pas d'observation de coloration du milieu.
MMS417			Thalle présentant des cercles concentriques dans différents tons de gris. Aspect poudreux, velouté, présence de sillons et d'un liséré blanc. Verso de la souche légèrement plissé, de couleur jaune pâle. La structure particulière du centre de la souche est causée par la présence de gouttes de paraffine liquide lors de l'ensemencement.
MMS460			Thalle d'aspect granuleux, coloration vert-gris du centre vers la périphérie. Bords irréguliers, présence de stries radiales. Verso de la souche plissé, coloré en brun-rouge. Forte coloration du milieu de culture en brun-rouge foncé.
MMS556			Thalle de couleur verte, aspect poudreux, très plissé. Présence de stries radiales. Verso de la souche plissé, colorant fortement le milieu de culture en rouge.
MMS747			Thalle de couleur vert foncé au centre, blanc à la périphérie. Présence de bords réguliers et de stries radiales. Verso de la souche légèrement plissé, prenant une coloration brune au centre de la souche. Pas d'observation de coloration du milieu.
MMS906			Thalle de couleur vert foncé, aspect poudreux, sporulation importante. Présence d'un liséré blanc et de stries radiales, bords irréguliers. Verso de la souche prenant une coloration verte, présence également de stries radiales.
MMS967	non disponible	non disponible	non disponible
MMS976			Thalle de couleur vert foncé, aspect poudreux, sporulation importante. Présence d'un liséré blanc et de stries radiales, bords irréguliers. Verso de la souche plissé, prenant une coloration brune au centre. Pas d'observation de coloration du milieu.

2.2. Milieux de culture et extraction

Pour les études d'activité, les souches ont toutes été cultivées sur milieux solides : cinq milieux classiques et un nouveau milieu développé pour cette étude. Dans tous les cas il s'agit de milieux à base d'agar dissout dans de l'eau de mer reconstituée afin d'obtenir une salinité proche de celle rencontrée en milieu marin. Le Tableau 28 donne la composition des différents milieux utilisés.

Tableau 28 : Détail de la composition des milieux de culture classiques utilisés pour la croissance des souches fongiques.

		DCA	MEA	PDA	CYA	YES	MES
		<i>Dextrose</i>	<i>Malt</i>	<i>Potato</i>	<i>Czapek</i>	<i>Yeast Extract</i>	<i>Mussel Extract</i>
		<i>Casein Agar</i>	<i>Extract Agar</i>	<i>Dextrose Agar</i>	<i>Yeast Agar</i>	<i>Saccharose</i>	<i>Saccharose</i>
sources minéraux (g.L⁻¹)	CuSO ₄ , 5H ₂ O	0	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005
	FeSO ₄ , 7H ₂ O	0	0	0	0,01	0	0
	K ₂ HPO ₄	0	0	0	1	0	0
	KCl	0	0	0	0,5	0	0
	MgSO ₄ , 7H ₂ O	0	0	0	0,5	0,5	0,5
	NaNO ₃	0	0	0	3	0	0
	NH ₄ NO ₃	0	0	0	0	0	0
	ZnSO ₄ , 7H ₂ O	0	0,01	0,01	0,1	0,01	0,01
sources carbone (g.L⁻¹)	Glucose (=dextrose)	40	20	20	0	0	0
	Saccharose (= sucrose)	0	0	0	30	150	150
sources azote - protéines (g.L⁻¹)	Peptone	0	1	0	0	0	0
	Digestion enzymatique de caséine	10	0	0	0	0	0
	Extrait de levure	0	0	0	5	20	0
	Extrait de malt	0	20	0	0	0	0
	Extrait de pomme de terre	0	0	4	0	0	0
	Extrait de moule	0	0	0	0	0	20
	Agar	15	20	15	15	20	20
(g.L⁻¹)	Mélange pour reconstitution eau de mer (Coral Reef)	33	33	33	33	33	
(L)	Eau distillée	1	1	1	1	1	1

Afin d'étudier plus particulièrement l'influence de métabolites de moules sur l'activité des extraits de souches isolées de coquillages, un nouveau milieu a été créé, par remplacement de l'extrait de levure du milieu YES par un extrait de chair de moule. Par analogie avec le milieu YES, ce milieu a ainsi été nommé *Mussel Extract Sucrose* (MES). Cet extrait a été réalisé à partir de 65 kg moules *Mytilus edulis* provenant de Normandie, achetées au mois de février et dans lesquelles l'absence de toxines connues a été vérifiée par analyse chimique. Les moules ont été écoquillées, puis la chair a été broyée et centrifugée pendant 30 min à 6000 g à 5°C. Le culot constitué de fibres a été éliminé, et le surnageant a été filtré sur de la gaze de 50 puis de 5 µm avant d'être lyophilisé. Le lyophilisat a finalement été broyé afin d'obtenir une poudre homogène.

Les cultures de champignons ont été réalisées en triplicata dans des Erlenmeyers contenant 50 mL de milieu de culture solide. Les milieux ont été inoculés en trois points. Les cultures ont été incubées à 27°C pendant 12 j à la lumière naturelle. Le milieu de culture a été co-extrait avec le mycélium afin d'inclure dans l'extrait les composés excrétés. Les extractions ont été réalisées avec 100 mL d'un mélange dichlorométhane/acétate d'éthyle 1:1 (v/v). Le contenu de chaque Erlenmeyer a été broyé et mélangé une première fois avec le solvant d'extraction. Après 30 min de sonication le surnageant a été récupéré, et l'ensemble des résidus obtenus pour une même souche ont alors été réunis, mélangés une seconde fois avec le solvant d'extraction et l'extraction s'est faite par macération pendant une nuit. Le surnageant a été récupéré par filtration sur Büchner et regroupé avec les précédents. L'ensemble a été déshydraté avec du Na₂SO₄ anhydre, les spores ont été éliminées de la solution à l'aide de filtres de cellulose régénérée de 0,45 µm (Sartorius, Göttingen, Germany) puis évaporé à sec pour donner un extrait brut.

2.3. Tests biologiques

Les protocoles des tests de cytotoxicité sur cellules KB, sur larves de diptères et sur bactéries sont décrits respectivement en Annexes 2, 4 et 9. Pour les tests de cytotoxicité, le MTT a été utilisé pour révéler la viabilité cellulaire. Comme il s'agissait d'un screening préliminaire d'activité, et afin d'économiser les quantités d'extraits utilisées, les tests ont été réalisés en duplicata, c'est pourquoi il n'a pas été déterminé d'erreur standard sur les valeurs de CI₅₀ obtenues. Les gammes de concentrations ont été réalisées par dilutions en série au demi à partir de 100 µg.mL⁻¹. Les CI₅₀ ont été calculées selon la démarche suivante :

$$\% \text{ de mortalité cellulaire} = 100 - (DO \text{ échantillon} / DO \text{ moyenne témoin} * 100) ;$$

soit X1 la concentration d'un échantillon induisant un % de mortalité cellulaire Y1 inférieur à 50

et X2 la concentration d'un échantillon induisant un % de mortalité cellulaire Y2 supérieur à 50 ;

$$a = (Y1 - Y2) / (\log X1 - \log X2) ; b = Y2 - (a * \log X2) ;$$

$$CI_{50} = 10^{(50 - b) / a}$$

Les extraits de champignons ont été considérés comme très actifs si la CI₅₀ était inférieure à 10 µg.mL⁻¹, moyennement actifs si elle était comprise entre 10 et 30 µg.mL⁻¹, et inactifs si elle était supérieure à 30 µg.mL⁻¹.

Les tests de neuro-activité ont été réalisés sur trois larves par concentration, avec des gammes de concentrations correspondant à des dilutions au demi et débutant à 100 mg.mL⁻¹.

Les tests antibactériens ont été réalisés en triplicat, avec des gammes de concentrations correspondant à des dilutions au demi et débutant à 100 µg.mL⁻¹.

L'inocuité des milieux de culture nonensemencés a été vérifiée, notamment celle du milieu de culture créé à base de chair de moules.

2.4. Analyses en spectrométrie de masse et déréplication

La déréplication des extraits bruts a été réalisée par analyses HPLC-DAD/ESI-IT-TOF-MSⁿ, avec utilisation d'un instrument Shimadzu LCMS-IT-TOF composé de deux pompes LC-20ADxr, un autoéchantillonneur SIL-20ACxr, un four CTO-20AC, un détecteur SPD-M20A PDA et un système contrôleur CBM-20A, couplé à un spectromètre de masse avec une source ESI et un analyseur de masse hybride Ion Trap-Time-Of-Flight (Shimadzu, Kyoto, Japon). Les analyses HPLC et SM-EI-IT ont été réalisées avec des aliquots de 5 µL de chaque échantillon séparés sur une colonne C18 100 Å Kinetex (2,6 µm, 150 x 2,1 mm, Phenomenex) maintenue à 25 °C, avec un gradient de phase mobile (0,3 mL.min⁻¹) comprenant de l'acide formique aqueux 0,1% (A) et de l'acétonitrile contenant 0,1% d'acide formique (B). Le gradient a été réalisé de la façon suivante : 15% de B de 0 à 2 min, puis montée jusqu'à 100% de B entre 2 et 25 min, avec maintien jusqu'à 30 min, puis diminution à 15% de B jusqu'à 31 min et maintien à 15% de B jusqu'à 35 min. L'éluant a été introduit directement dans le spectromètre de masse par électrospray. Les conditions de ESI-IT-TOF-MSⁿ analyse ont été les suivants: (1) Débit: 0,3000 mL.min⁻¹, (2) le mode de détection: alternance automatique des modes positif et négatif, (3) gamme de masse: MS, *m/z* 100-1000; MS2, *m/z* 50-1000; (4) le bloc de chaleur (HB) et la température de la ligne de désolvatation courbe (CDL): 200 ° C; flux d'azote de nébulisation: 1,5 L.min⁻¹; voltage de l'interface: (+), 4,0 kV; (-), -3.5 kV; tension du détecteur : 1,61 kV; pour le MS, le temps de l'accumulation d'ions: 30 ms (5); pour la fragmentation, les MS2 ont été réalisées en mode automatique, le temps d'accumulation dans la trappe: 40 ms, énergie de collision: 100% avec 50% de gaz de collision; le gaz de collision utilisé est de l'argon (6) Toutes les données ont été enregistrées et analysées par le logiciel Shimadzu: solution LCMS Version 3.60, Formule Predictor Version 1.2, et la calculatrice de masse précise (Shimadzu, Kyoto, Japon), (7), une solution de sodium trifluoroacétate (2,5 mM) a été utilisée pour calibrer l'appareil dans le domaine de masse de 50 à 1000 Da. Les spectres UV ont également été enregistrés entre 190 nm et 800 nm.

3. Résultats : Etude de la cytotoxicité des *Penicillium* sur cellules KB

3.1. Influence du milieu de culture sur la croissance et l'aspect des souches

Il est bien connu au laboratoire que le phénotype des souches fongiques peut varier en fonction du milieu de culture utilisé, ce qui laisse supposer une production de métabolites secondaires différents. Des exemples de ces variations phénotypiques sont présentés Figure 50. Du fait des grandes différences morphologiques visibles sur les différents milieux, il est logique de penser que des différences existent sur la production de métabolites par certaines souches. Cette hypothèse est développée dans l'approche OSMAC (*One Strain*

Many Compounds), qui propose de cultiver une souche sur plusieurs milieux différents, plutôt que plusieurs souches sur un même milieu pour la recherche de métabolites d'intérêt (Bode *et al.*, 2002). C'est cette approche qui a été mise en place dans cette étude, avec la culture des souches sur 6 milieux différents.

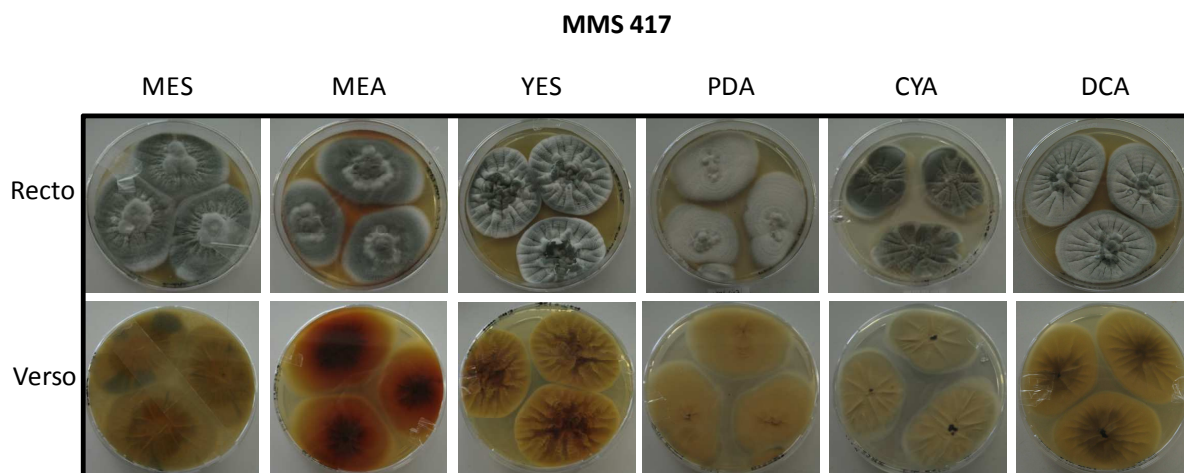


Figure 50: Exemple de variations phénotypiques de la souche MMS417 cultivée en boîtes de Pétri sur 6 milieux différents. Observations macroscopiques du recto et du verso de chaque culture.

Le milieu MES est un nouveau milieu, créé pour la présente étude. Il est principalement constitué d'un extrait de moules destiné à apporter aux champignons des métabolites de ces bivalves qui seraient susceptibles de stimuler son développement ou son activité. Il est intéressant de constater que toutes les souches ont poussé de façon très satisfaisante sur ce milieu MES. Il dérive du milieu YES qui est un milieu riche et propice à une production de biomasse. A l'inverse, le milieu PDA, qui est considéré comme un milieu pauvre, permet moins facilement l'obtention d'une biomasse importante. Ainsi, dans la plupart des cultures, par observation macroscopique, la taille des mycéliums obtenus sur MES était identique à celle des mycéliums cultivés sur YES, et supérieure à celle des mycéliums cultivés sur PDA (Figure 51). Le milieu MES peut donc être considéré comme un milieu propice à la croissance de *Penicillium* marins isolés de bivalves.

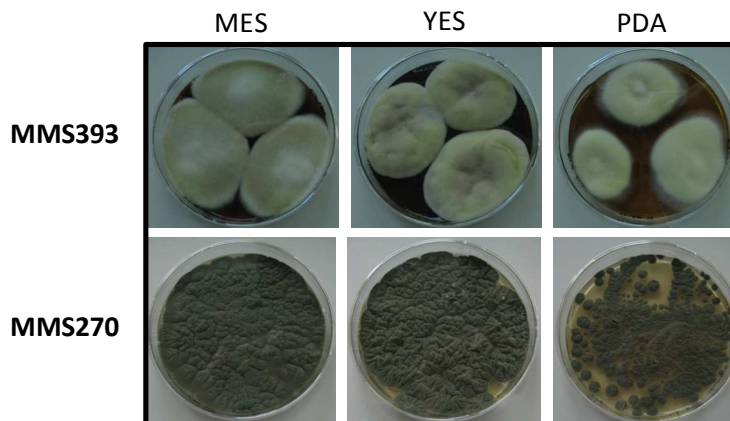


Figure 51 : Observation macroscopique des souches MMS393 et MMS270 cultivées sur les milieux MES, YES et PDA.

3.2. Influence de l'origine des souches

Les 24 souches de *Penicillium* sélectionnées pour cette étude ont été mises en culture sur le milieu MEA, et les extraits bruts de ces cultures ont été testés sur cellules KB.

Les niveaux d'activité obtenus en fonction de l'origine des souches (bivalves ou environnement), ont été comparés (Figure 52).

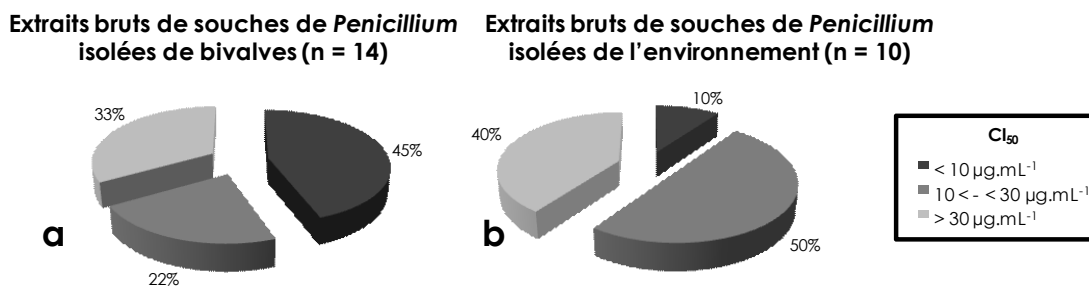


Figure 52 : Répartition du niveau d'activité cytotoxique d'extraits bruts de souches de *Penicillium* isolées du milieu marin.

Le nombre d'extraits considérés comme inactifs ($Cl_{50} > 30 \mu\text{g.mL}^{-1}$) s'est montré similaire entre les deux groupes. Par contre, parmi les extraits considérés comme actifs, les activités cytotoxiques les plus importantes ont été retrouvées dans le groupe de souches isolées de bivalves, avec 45% des souches présentant une $Cl_{50} < 10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, contre seulement 10% pour les extraits de souches isolées de l'environnement.

Il semblerait donc qu'il y ait un phénomène de sélection ou de stimulation des souches cytotoxiques par les bivalves. Pour étudier ces phénomènes avec la démarche OSMAC définie plus haut, 10 souches du précédent panel ont été sélectionnées, toutes issues de bivalves (moules ou coques) et représentant les différentes espèces de *Penicillium* présentes, et cultivées sur 6 milieux différents.

3.3. Influence du milieu de culture sur l'activité cytotoxique de souches isolées de mollusques bivalves

Dix souches représentatives des différentes espèces présentes, ont donc été sélectionnées et mises en culture sur les 6 milieux MES, YES, CYA, MEA, DCA, PDA.

Les extraits obtenus à partir de ces différentes cultures ont été testés sur cellules KB, et les CI_{50} sont données Tableau 29. Parmi les 60 extraits testés, 33 n'ont pas présenté d'activité intéressante ($CI_{50} > 30 \mu\text{g.mL}^{-1}$), 22 une activité moyenne et 5 étaient très cytotoxiques ($CI_{50} < 5 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Cette étude confirme l'intérêt de l'approche OSMAC pour certaines souches comme MMS163, MMS231 ou MMS417, dont les extraits bruts se sont révélés fortement, moyennement ou non cytotoxiques en fonction du milieu de culture. En revanche, les extraits des souches MMS404 et MMS393 sont restés inactifs sur cellules KB quel que soit le milieu de culture.

Sur les milieux MES et CYA, les extraits de 6 souches sur 10 ont présenté une activité. Le milieu CYA a déjà été rapporté comme un des milieux les plus favorables à la production de métabolites secondaires (Frisvad *et al.*, 2004), ainsi le milieu MES semble également être favorable à cette production, et ce de façon complémentaire du milieu CYA. Le milieu YES est également couramment utilisé pour la recherche de composés d'intérêt, cependant dans cette étude, les extraits obtenus sur ce milieu se sont révélés les moins actifs. Pour 5 souches (MMS163, MMS231, MMS266, MMS399 et MMS417), les extraits obtenus sur milieu MES se sont révélés plus actifs que sur le milieu YES. Ceci démontre que les activités observées sur milieu MES sont bien dues à l'effet sur le métabolisme fongique de l'extrait de moules.

Tableau 29 : Cytotoxicité d'extraits de souches de *Penicillium* isolées de coquillages et cultivées sur 6 milieux différents (valeurs de CI_{50} en $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Numéro de souche	Espèce	Activité sur cellules KB (CI_{50} en $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)					
		MES	YES	CYA	MEA	DCA	PDA
MMS50	<i>P. venetum</i>	>30,0	>30,0	12,5	>30,0	>30,0	25,0
MMS163	<i>P. antarcticum</i>	5,0	16,9	>30,0	8,8	>30,0	>30,0
MMS231	<i>P. polonicum</i>	21,6	>30,0	6,3	>30,0	24,1	20,9
MMS266	<i>P. marinum</i>	15,7	>30,0	>30,0	15,0	20,5	26,6
MMS270	<i>P. bialowienzense</i>	>30,0	>30,0	25,0	>30,0	>30,0	>30,0
MMS330	<i>P. ubiquetum</i>	26,9	11,1	19,1	13,9	16,8	18,7
MMS393	<i>P. sp.</i>	>30,0	>30,0	>30,0	>30,0	>30,0	>30,0
MMS399	<i>P. ligerum</i>	14,4	25,7	16,5	>30,0	21,4	>30,0
MMS404	<i>P. brevicompactum</i>	>30,0	>30,0	>30,0	>30,0	>30,0	>30,0
MMS417	<i>P. restrictum</i>	4,9	>30,0	6,3	12,5	>30,0	12,5

Forte activité Activité moyenne

La souche MMS330, identifiée comme *P. ubiquetum*, est la seule souche à avoir présenté une activité, quel que soit le milieu de culture. Néanmoins, cette activité est toujours restée modérée. *P. ubiquetum* appartient à la section *Citrina* du genre *Penicillium* (Houbraken *et al.*, 2011). Très peu de données sont disponibles sur cette espèce, et une étude bibliographique sur les composés cytotoxiques de *Penicillium* (Vansteelandt, 2011) n'a pas fait état de métabolites cytotoxique dans cette espèce. Il semblerait donc que le ou les composés responsables de cette activité n'aient pas encore été décrit dans cette espèce, et il serait intéressant de pousser les investigations afin de les isoler.

3.4. Déréplication d'extraits bruts bio-actifs

Afin de comprendre l'influence des composants de l'extrait de moules sur la toxicité des extraits, des analyses déréplicatives ont été réalisées sur les deux souches ayant présenté une cytotoxicité importante sur le milieu MES (MMS163 et MMS417), ainsi que sur la souche MMS266 pour laquelle l'écart de toxicité entre MES et YES était important.

3.4.1. Déréplication de la souche MMS266

La souche MMS266 a été identifiée comme *P. marinum*. Cette espèce proche de *P. expansum* a été décrite en 2004 par Frisvad et Samson (Frisvad et Samson, 2004), et classée dans la série *Expansa* de la section *Penicillium* du sous-genre *Penicillium*. C'est une espèce typiquement marine, poussant plus rapidement à une température d'incubation de 15°C que de 25°C, et sur un milieu enrichi en

NaCl 5% plutôt que sans NaCl. Elle a été isolée à l'origine d'échantillons de sable de zones côtières, et il semble qu'elle soit trouvée également en association avec des macro-algues marines. Cette espèce est connue pour produire un certain nombre de métabolites secondaires et de mycotoxines pouvant présenter diverses activités biologiques telles que cytotoxiques ou neurotoxiques.

Les extraits de MMS266 obtenus sur les milieux MES et YES, et qui présentaient des activités cytotoxiques différentes, ont été analysés par CLHP-UV/DAD-HRSM/SM, et ont présenté des profils chromatographiques assez différents (Figure 53). Les pics les plus abondants observés dans l'extrait YES ne sont pas retrouvés dans l'extrait MES, et inversement. Aucun pic observé sur le milieu YES n'a pu être annoté alors que plusieurs pics observés sur le milieu MES ont pu être identifiés (Figure 53 et Tableau 30). Curieusement, aucun des alcaloïdes indoliques cytotoxiques caractéristiques de cette espèce, tels que les communésines ou les chaetoglobosines (Tableau 30), n'ont pu être identifiés.

Quatre des pics les plus abondants de l'extrait MES (A, B, C, E) ont pu être annotés comme des dérivés des pénostatines, des composés déjà décrits chez *P. marinum* et présentant une activité cytotoxique sur diverses lignées cellulaires (Takahashi *et al.*, 1996; Iwamoto *et al.*, 1999). Le cinquième composé identifié est la fusoxysporone, également spécifiquement du milieu MES. Cette molécule est un diterpène isolé pour la première fois de *Fusarium oxysporum* (Abraham et Hanssen, 1992). Aucune activité biologique de la fusoxysporone n'a été rapportée, ainsi il semblerait que l'augmentation de l'activité cytotoxique entre l'extrait YES et MES soit due à la présence de dérivés de pénostatines dans ce dernier.

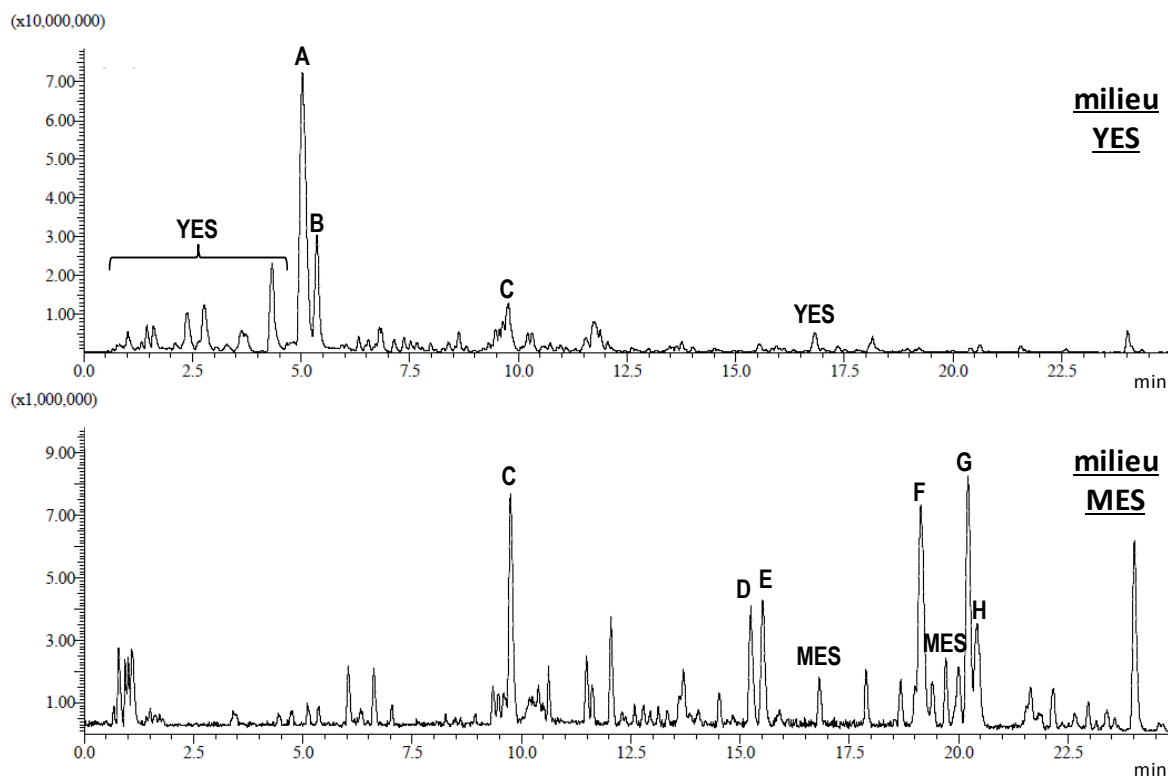


Figure 53 : Profils métaboliques obtenus en CLHP-SM/SM (base peak) en mode positif de la souche MMS266 cultivée sur milieux YES et MES. Les pics provenant de constituants des milieux sont notés respectivement YES et MES.

Tableau 30 : Annotation des pics de la Figure 53, pour la souche MMS266 cultivée sur milieu MES.

Pic	Abondance du pic		m/z experimental [M+H] ⁺	Formule brute putative	m/z théorique [M+H] ⁺	Différence de ppm	Paramètres			Identification putative
	YES	MES					SM	SM/SM	UV	
A	7,3	0	188,1631	C ₁₀ H ₂₁ NO ₂	188,1640	4,78	x	0	0	Esters d'acides aminés
B	3	0	222,1451	mélange de composés	-	-	-	-	-	inconnu
C	1,5	0,7	274,1624	C ₈ H ₂₃ N ₃ O ₇	274,1609	5,47	x	0	0	inconnu
D, E	traces	0,3	345,2418	C ₂₂ H ₃₂ O ₃	345,2424	1,74	x	x	x	Dérivés de pénostatines
F	traces	0,8	327,2300	C ₂₂ H ₃₀ O ₂	327,2319	5,81	x	x	x	Dérivés de pénostatines
G	traces	0,9	287,2356	C ₂₀ H ₃₀ O	287,2369	4,53	x	x	x	Fusoxysporone
H	traces	0,3	327,2283	C ₂₂ H ₃₀ O ₂	327,2319	8,86	x	x	nc	Dérivés de pénostatines

0: pas d'informations présentes dans la littérature

nc : données non cohérentes avec celles de la littérature

3.4.2. Déréplication de la souche MMS417

La souche MMS417 a été identifiée comme *P. restrictum* et appartient au sous-genre *Aspergilloides* du genre *Penicillium*. Assez peu de données concernant sa description ou sa production de métabolites sont disponibles dans la bibliographie.

Contrairement aux observations de la souche précédente, par analyse CLHP-UV/DAD-HRSM/SM, les extraits de MMS417 obtenus sur YES et MES ont présenté des profils métaboliques assez similaires (Figure 54). La principale différence est représentée par l'abondance relative du pic C, qui représente 4,8% de l'aire totale des pics du chromatogramme obtenu sur YES, contre 14,1% pour le milieu MES. Ce pic a pu être annoté comme la pestalotine (Tableau 31), un métabolite déjà isolé de *Penicillium* sp., ou encore comme la pestalrone B, isolée initialement de *Pestalotiopsis karstenii* (Kimura *et al.*, 1986; Luo *et al.*, 2012). Cependant, d'une part la différence avec le m/z théorique était tout de même notable, avec un décalage de 7,4 ppm pour ces deux molécules et d'autre part le spectre UV n'était pas concordant avec la littérature. De même que pour le pic C, le pic B a été annoté de façon la plus probable comme de l'hydroxypestalotine plutôt que la pestalrone A, car l'hydroxypestalotine a déjà été rapportée dans des souches de *Penicillium*. Néanmoins, du fait de l'écart de plus de 5 ppm des m/z et de l'absence de données UV, cette identification doit être considérée avec beaucoup de précautions. Les pics A et D ont été annotés respectivement comme LLP880 γ et une pyran-2-one (Tableau 31), qui sont des dérivés de l'hydroxypestalotine (Venkatasubbaiah *et al.*, 1991; Kirihata *et al.*, 1992). Les dérivés de la pestalotine ont été décrits comme induisant une faible cytotoxicité contre la lignée tumorale humaine U-251 (Luo *et al.*, 2012). Ainsi, l'activité plus importante retrouvée dans l'extrait MES, de même que l'activité de l'extrait YES, pourrait être attribuée à des pics moins abondants qui n'ont pu être identifiés. Il sera donc nécessaire, par la suite, soit de se procurer un étalon caractérisé des molécules candidates et de vérifier leur spectre de masse ainsi que leur temps de rétention, soit d'isoler le composé et d'en effectuer une analyse RMN.

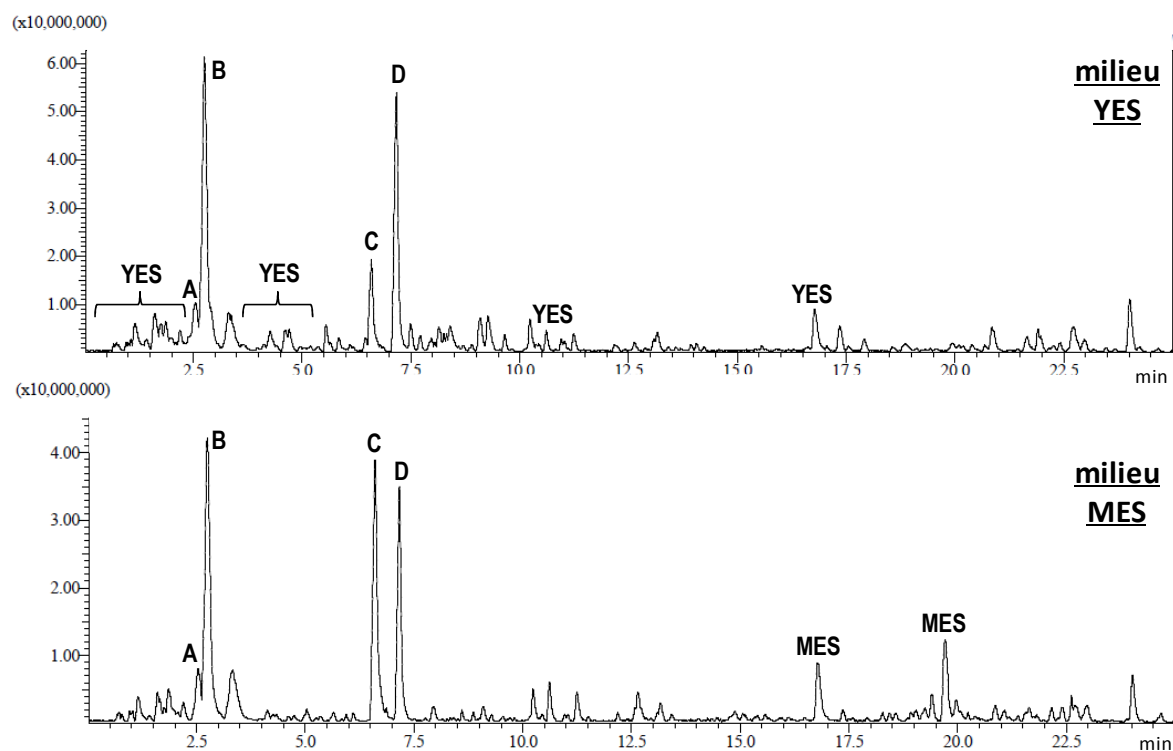


Figure 54 : Profils métaboliques obtenus en CLHP-SM/SM (base peak) en mode positif de la souche MMS417 cultivée sur milieux YES et MES.

Tableau 31 : Annotation des pics de la Figure 54, pour la souche MMS417 cultivée sur milieu YES et MES.

Pic	m/z e xperimental [M+H] ⁺	Formule brute	m/z théorique [M+H] ⁺	Différence de ppm	Paramètres d'identification			Identification
					SM	SM/SM	UV	
A	229,1064	C ₁₁ H ₁₆ O ₅	229,1071	3,06	x	x	x	LLP880-gamma
B	231,1214	C ₁₁ H ₁₈ O ₅	231,1227	5,62	x	x	0	Hydroxypestalotine ou pestalrone A
C	215,1262	C ₁₁ H ₁₈ O ₄	215,1278	7,44	x	x	nc	Pestalotine ou pestalrone B
D	213,1112	C ₁₁ H ₁₆ O ₄	213,1121	4,22	x	0	0	5,6-dihydro-4-methoxy-6-(1-oxopentyl)-2H-pyran-2-one

0 : pas d'information dans la littérature

nc : données non cohérentes avec celles de la littérature

3.4.3. Déréplication de la souche MMS163

La souche MMS163 a été identifiée comme *P. antarcticum*, et reliée à la série *Citrina*, dans le sous-genre *Furcatum* du genre *Penicillium*. Cette espèce a été isolée initialement du milieu terrestre, mais semble couramment retrouvée en milieu marin. En outre, les souches marines appartenant à cette espèce sont connues pour être productrices de patuline (Vansteelandt *et al.*, 2012), une mycotoxine réglementée décrite pour être notamment cytotoxique (Iwamoto *et al.*, 1999; Heussner *et al.*, 2006). La présence putative d'une mycotoxine réglementée a donc justifié d'élargir l'étude de déréplication sur les 6 extraits disponibles (Figure 55 et Tableau 32). Cependant, la patuline est peu détectable par spectrométrie de masse du fait de sa mauvaise ionisation. Son spectre UV caractéristique est alors une donnée importante pour son identification.

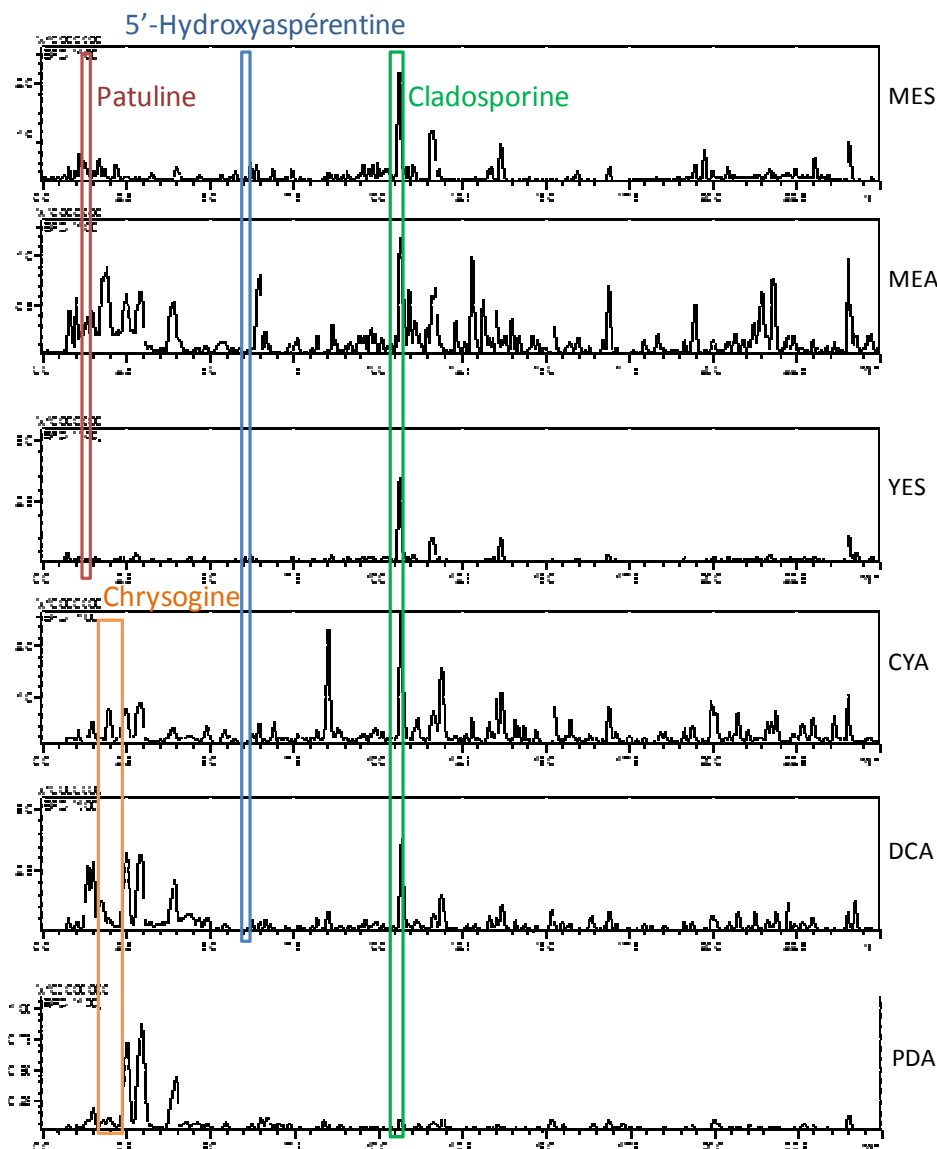


Figure 55 : Profils métaboliques obtenus en CLHP-SM/SM (base peak) pour la souche MMS163 cultivée sur 6 milieux différents (MES, MEA, YES, CYA, DCA, PDA) et indication des composés connus détectés.

Tableau 32 : Annotation des pics observés dans l'extrait MMS163.

Milieu	CI ₅₀ (µg.mL ⁻¹)	Composés annotés				
		patuline	chrysogine	cladosporine	5'-hydroxy-asperentine	acide terrestre
MES	5,0	X	-	X	X	-
YES	16,9	X	-	X	X	X
MEA	8,8	X	-	X	X	-
CYA	> 100,0	-	X	X	X	X
DCA	> 100,0	-	X	X	X	-
PDA	> 100,0	-	X	X	-	-

Il est intéressant de noter que la patuline a été détectée uniquement dans les trois extraits cytotoxiques de MMS163, à l'inverse de la chrysogine, un alcaloïde qui est présent uniquement dans les extraits non actifs (Figure 56). Il semble ainsi que la cytotoxicité des extraits soit fortement liée à la présence de patuline.

La cladosporine et la 5'-hydroxyaspérentine ont été identifiées respectivement dans 6 et 5 extraits. La cladosporine est un métabolite secondaire isolé initialement de *Cladosporium cladosporioides* (Scott et Van, 1971). Il a été rapporté que ce composé présentait des activités antifongiques, antimicrobiennes et antimalariales (Scott et Van, 1971; Anke *et al.*, 1978; Hoepfner *et al.*, 2012). Cependant, à notre connaissance aucune activité de la 5'-hydroxyaspérentine, qui est un dérivé de la cladosporine, n'a été rapportée.

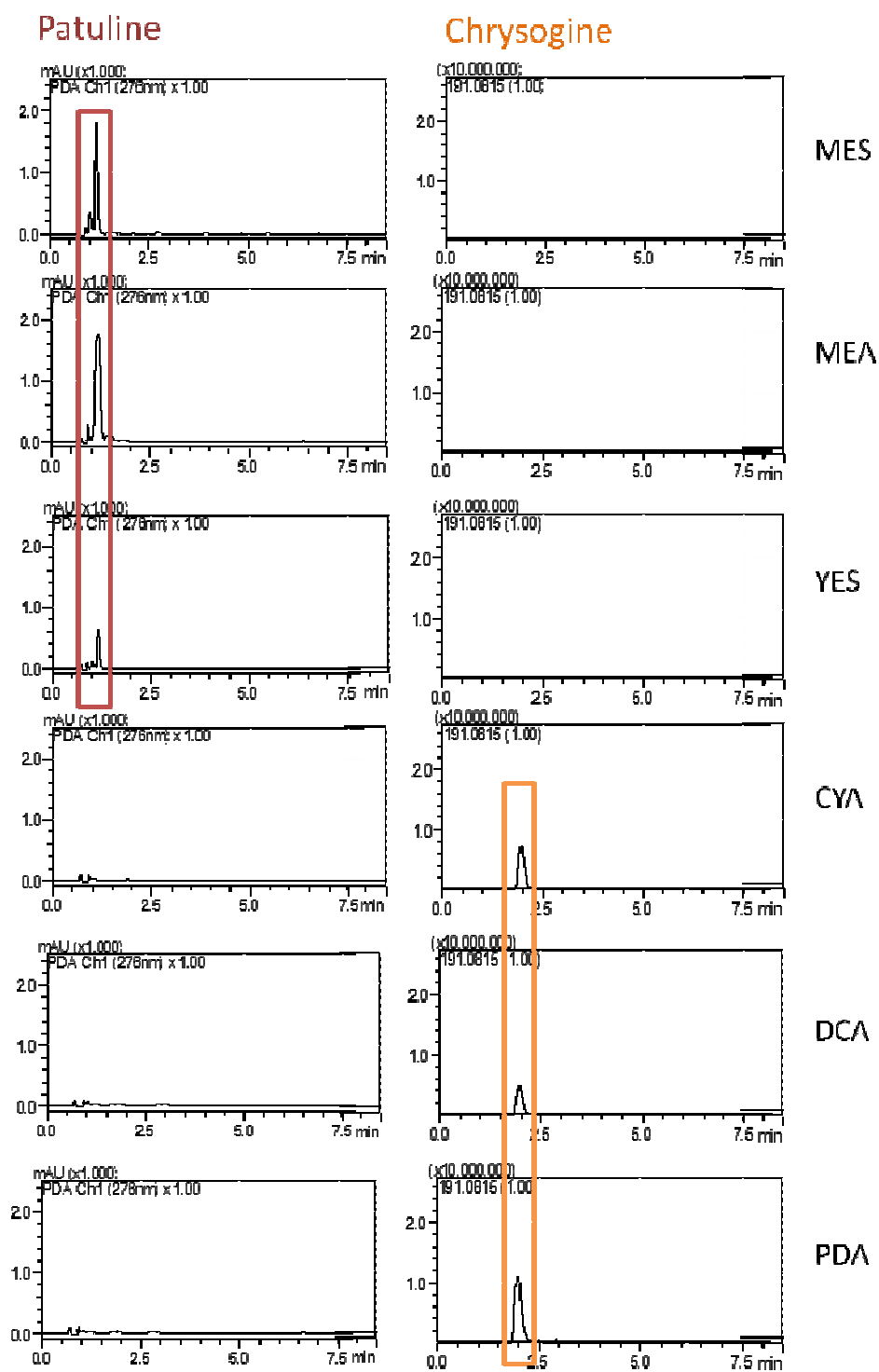


Figure 56 : Profils métaboliques obtenus en CLHP-UV (276 nm) pour la souche MMS163 cultivée sur 6 milieux différents (MES, MEA, YES, CYA, DCA, PDA) et indication de l'observation de patuline ou de chrysozine.

3.5. Discussion sur l'activité cytotoxique d'extraits fongiques isolés de mollusques bivalves

Effet de l'origine de l'échantillon

Tout d'abord, il a été observé que les extraits de souches isolées de mollusques bivalves (moules et coques) présentaient globalement une activité cytotoxique plus importante que ceux de souches isolées de l'environnement (sédiment et eau de mer). Les échantillons de coquillages, de sédiment et d'eau de mer ayant tous été collectés au même moment, il semble que l'origine de l'échantillon ait bien une influence sur le profil de cytotoxicité des extraits et qu'il pourrait donc exister un « effet hôte ». Ce type de résultat a déjà été rapporté précédemment, avec utilisation du test de toxicité générale sur *Artemia salina* : les extraits de *Penicillium* isolés de mollusques bivalves étaient plus toxiques sur ce modèle que ceux de *Penicillium* isolés de l'environnement (Sallenave-Namont *et al.*, 2000; Matallah-Boutiba *et al.*, 2012). D'autres études sur des souches de champignons isolées d'éponges marines ont également présenté des profils d'activité différents en fonction de l'espèce d'éponge à partir de laquelle elles étaient isolées (Holler *et al.*, 2000; Thirunavukkarasu *et al.*, 2011). Cet « effet hôte » devra être confirmé par l'étude de l'activité d'un plus grand nombre de souches, mais des hypothèses peuvent déjà être posées quant à l'origine de cet effet.

Existe-t-il une relation particulière entre champignon et coquillages ?

D'une façon générale, les différents rôles écologique que peuvent remplir les micromycètes issus du milieu marin sont peu connus. Le rôle de décomposeur a été démontré pour les champignons strictement marins : ils jouent un rôle de saprotrophes, en dégradant la lignocellulose du bois ou encore la matière organique des strates herbacées (Hyde *et al.*, 1998). Mais les champignons peuvent développer des associations fines avec d'autres organismes. Certaines espèces vivent en symbiose avec des macro-algues, sur lesquelles elles se développent (Zuccaro *et al.*, 2008), ou d'autres peuvent parasiter des macro-organismes tels que des coraux (Kim et Harvell, 2004). Les associations des champignons avec des bivalves ont été peu étudiées, et principalement au travers du caractère pathogène de certaines souches envers des mollusques (moules, huître, ormeaux), par infection de la coquille ou de la chair (Alderman et Jones, 1971; Grindley *et al.*, 1998; Van Dover *et al.*, 2007). Ce sont également des pathogènes reconnus en aquaculture ou pour des crustacés (Holler *et al.*, 2000).

Les associations entre champignons et macro-organismes marins ont été principalement étudiées au travers de la biodiversité et chimiodiversité de champignons isolés d'éponges. Les éponges sont le plus souvent associées à des micro-organismes, qui peuvent avoir un impact important sur leur biologie (Wilkinson, 1983). Certains champignons dérivés d'éponges peuvent être opportunistes et contribuer à des lésions ou des maladies (Li et Wang, 2009). Ces champignons produisent également souvent des composés bioactifs, qui peuvent être supposés contribuer à la défense de l'hôte (Holler *et al.*, 2000; Han *et al.*, 2009; Thirunavukkarasu *et al.*, 2011). Cependant, assez peu de données confirment la réelle fonction écologique des communautés fongiques vivant au sein des éponges

Bien qu'aucune association de type commensalisme ou mutualisme n'ait été décrite à ce jour entre champignons et mollusques bivalves, il pourrait être envisageable que les relations supposées à bénéfice réciproque entre éponges et champignons soient transposables aux associations entre mollusques bivalves et champignons.

La toxicité des champignons isolés de bivalves pourrait-elle être due au stress induit par la digestion du champignon par le coquillage ?

La production de métabolites actifs peut également être due au fait que le champignon subisse un stress lorsqu'il se fait ingérer par le coquillage. En effet, chez les micro-algues, il a été montré que les conditions environnementales influent fortement sur la production de toxines, et notamment des carences en certains nutriments. Par exemple, le dinoflagellé *Protoceratium reticulatum* relargue de plus grandes quantités de yessotoxines dans le milieu lorsque celui-ci est carencé en azote, ou en accumule de plus grandes quantités lorsqu'il est carencé en phosphore (Guerrini *et al.*, 2007). L'haptophyte *Prymnesium parvum* produit des prymnésines, composés connus pour être ichtyotoxiques, neurotoxiques, cytotoxiques, hépatotoxiques ou encore hémolytiques envers un certain nombre d'organismes marins. La toxicité de cette micro-algue est augmentée lorsqu'elle est cultivée en milieu carencé en azote ou phosphore (Granéli et Johansson, 2003). Il semble donc que certaines toxines de micro-algues jouent un rôle allélopathique, et que la production de telles toxines soient influencée par un stress induit par des carences du milieu, qui obligerait ainsi l'organisme à être plus compétitif. Ce raisonnement pourrait donc être appliqué aux champignons filtrés par des mollusques bivalves et expliquer ainsi la cytotoxicité plus importante retrouvée pour des souches isolées de coquillages.

Production de patuline par une souche de *Penicillium* isolée de bivalves

La patuline est une lactone, isolée pour la première fois en 1943 d'une souche de *P. patulum* (Birkinshaw *et al.*, 1943). Elle est produite par plus de 60 espèces de champignons couvrant plus de 30 genres, tel que *Penicillium expansum*, *P. roqueforti*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus giganteus* ou encore *Byssosclamyces nivea*. Chez la souris, la DL₅₀ de la patuline est comprise entre 15 et 35 mg.kg⁻¹ selon le mode d'administration. Chez l'homme la patuline est connue pour être très toxique en induisant des intoxications à la fois aiguës et chroniques. La symptomatologie retrouvée en intoxication aiguë implique des convulsions, une congestion pulmonaire, des oedèmes, une distension du tractus gastro-intestinal, des hémorragies intestinales ou encore des ulcères. En intoxication chronique, la patuline est génotoxique, neurotoxique, immunotoxique, tératogénique, immunosuppressive, et un pouvoir cancérigène est également fortement suspecté. Ce potentiel d'activité de la patuline est lié au fait qu'au niveau cellulaire, cette toxine perturbe et inhibe de nombreuses fonctions, telles que la perméabilité membranaire, l'organisation des filaments du cytosquelette, l'activité d'enzymes comme l'ADN-polymérase et l'ARN-polymérase ou encore la transcription de l'ADN (Codex, 1999; Moake *et al.*, 2005; Puel *et al.*, 2010).

En raison de sa dangerosité pour la santé humaine, la patuline est réglementée dans l'alimentation à la

concentration de $50 \mu\text{g.L}^{-1}$, sur la base d'une dose journalière tolérable de $0,4 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de poids corporel fixée par le JECFA (*Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*), FAO/WHO, 2004. Les aliments concernés sont les fruits, les légumes, les céréales, le fourrage ou encore les fromages. La contamination la plus fréquente est celle provoquée par *Penicillium expansum* rencontrée lors de certaines formes de pourrissement des pommes (moisissure bleue). Le produit le plus régulièrement contaminé par la patuline est le jus de pomme, dont la concentration a été rapportée jusqu'à $2500 \mu\text{g.L}^{-1}$ (FAO/WHO, 2004; Moake *et al.*, 2005). C'est pourquoi la production de patuline par des souches de *Penicillium* isolées de mollusques bivalves peut représenter un risque pour la santé des consommateurs. Il serait donc intéressant, par la suite, de rechercher la patuline dans des extraits de coquillages et notamment dans des extraits de moules ayant entraîné des toxicités atypiques.

Il est également intéressant de noter que la patuline a été produite par la souche MMS163 de façon alternative avec la chrysogine : la patuline a été retrouvée dans les extraits MES, YES et MEA uniquement, et la chrysogine dans les extraits CYA, DCA et PDA uniquement. Il est donc possible d'imaginer l'existence d'un carrefour métabolique entre la patuline et la chrysogine, et que les conditions environnementales influent sur l'induction de telle ou telle voie métabolique. Cependant, la patuline étant une lactone et la chrysogine un alcaloïde (Figure 57), ce carrefour doit se situer relativement en amont des voies métaboliques conduisant à la biosynthèse de ces molécules. Des études ont montré que la biosynthèse de la patuline était fortement régulée, et sous la dépendance de facteurs abiotiques tels que la composition du milieu. Le glucose est une source de carbone favorable, alors que des composés azotés inhibent sa production (Grootwassink et Gaucher, 1980; Rollins et Gaucher, 1994), et le manganèse est nécessaire à l'expression du gène codant l'isoeoxydon déshydrogénase, une enzyme impliquée dans la synthèse d'intermédiaires de la patuline (Scott *et al.*, 1986; Puel *et al.*, 2010). Dans cette étude, aucune corrélation n'a pu être mise en évidence entre des composants du milieu et la production de patuline ou de chrysogine (résultats non présentés). Il serait donc intéressant de faire varier la composition des milieux de culture afin de confirmer ou non ce carrefour métabolique et de voir quelles sources de nutriments favorisent la voie de biosynthèse de la patuline ou de la chrysogine.

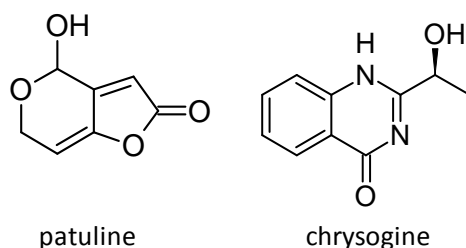


Figure 57 : Structure chimique de la patuline et de la chrysogine.

4. Résultats : Etude de l'activité des *Penicillium* sur larves de diptères

Les extraits des 10 souches précédemment sélectionnées de *Penicillium* isolées de mollusques bivalves et cultivées sur les 6 milieux ont été testés sur larves d'insectes. Cependant, l'interprétation des résultats est restée plus préliminaire que pour le test de cytotoxicité sur cellules KB. Les résultats exprimés en concentration minimale active (CMA, mg.mL⁻¹) sont donnés Tableau 33. Les symptômes observés avec l'injection d'extraits bruts se sont révélés être beaucoup moins fins que ceux induits par des molécules pures et décrits Chapitre 2. Ici, les symptômes observés étaient le plus souvent de type immobilisation, ou paralysie partielle (contractile ou flasque) évoluant en paralysie totale.

Tableau 33 : Activité sur larves de diptères d'extraits de souches de *Penicillium* isolées de coquillages et cultivées sur 6 milieux différents.

Numéro de souche	Activité sur larves de diptères (CMA en mg.mL ⁻¹)					
	MES	YES	CYA	MEA	DCA	PDA
MMS50	25,0	> 100	> 100	25,0	6,3	> 100
MMS163	25,0	25,0	> 100	50,0	> 100	> 100
MMS231	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
MMS266	25,0	> 100	> 100	≥ 100	25,0	> 100
MMS270	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
MMS330	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
MMS393	> 100	≥ 100	> 100	> 100	> 100	> 100
MMS399	25,0	6,3	> 100	> 100	50,0	50,0
MMS404	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
MMS417	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100

Dans un premier temps, il est intéressant de constater que le milieu ayant permis d'obtenir le plus d'extraits actifs est le milieu MES, sans tenir compte du niveau d'activité : sur les 10 extraits, 4 se sont révélés actifs, contre 3 pour le milieu DCA, 2 pour les milieux YES et MEA, 1 pour le milieu PDA et aucun pour le milieu CYA. De même que pour le test de cytotoxicité, l'extrait de moules semble bien favoriser l'obtention d'un extrait brut bio-actif lorsque la souche est cultivée sur milieu MES.

Il est également important de noter que les trois extraits MES, YES et MEA de la souche MMS163, décrits précédemment comme contenant de la patuline, ont tous induit une activité sur larves. Or la patuline a été montrée comme étant fortement toxique sur larves de diptères (Vansteelandt *et al.*, 2012), ce qui va dans le sens de cette observation.

Les extraits ayant présenté l'activité la plus importante sont ceux des souches MMS50 cultivée sur DCA et MMS399 cultivée sur YES, avec des CMA de 6,3 mg.mL⁻¹.

Les extraits actifs n'ont pu être dérépliqués pour cette étude. En revanche il est possible d'émettre des hypothèses quant à l'origine de ces activités. La souche MMS50 a été identifiée comme *P. venetum*, qui est une espèce appartenant à la série *Corymbifera* du genre *Penicillium*. Ce taxon renferme les espèces connues pour être les agents pathogènes responsables de la pourriture bleue de fleurs et de bulbes végétaux (Saaltink, 1970), et sont décrites comme productrices de roquefortine C, un alcaloïde actif sur le système nerveux (Scott *et al.*, 1976). L'activité des extraits MEA, DCA et MES pourrait donc être due à la présence de cet alcaloïde.

La souche MMS399 correspond à l'espèce *P. ligerum* dont la description est en cours, et pour laquelle aucune molécule potentiellement neuro-active n'a encore été rapportée. Des travaux sont en cours au laboratoire afin d'essayer d'identifier et d'isoler les composés responsables de cette activité.

5. Résultats : Etude de l'activité antibactérienne des *Penicillium*

L'activité antibactérienne des *Penicillium* est bien connue pour être à la source de la découverte de la pénicilline et de l'antibiothérapie. Pour cette étude, il semblait donc intéressant de tester des souches de *Penicillium* isolés du milieu marin pour leur activité antibactérienne vis-à-vis de souches bactériennes essentiellement marines pouvant être trouvées dans les mollusques bivalves ou les poissons.

En raison du grand nombre d'extraits à tester sur un large panel de bactéries (7 souches) dans le laps de temps imparti, et afin de suivre les recommandations de la procédure OSMAC qui propose de diminuer le nombre de souches étudiées mais de diversifier les milieux de culture, 5 souches de *Penicillium* ont été sélectionnées parmi les 10 souches précédemment étudiées.

Ainsi les souches conservées étaient la MMS399 (*P. ligerum*), qui est la nouvelle espèce en cours de description, deux souches ayant présenté une activité cytotoxique uniquement (MMS231 et MMS330), et deux souches inactives aussi bien sur KB que sur larves de diptères (MMS393 et MMS370).

Le Tableau 34, ainsi que l'Annexe 13 regroupent les résultats obtenus pour les trois types de paramètres étudiés : l'inhibition, le ralentissement et le retard de la croissance bactérienne.

Une première observation générale du Tableau 34 permet de relever, qu'à l'opposé de ce qui avait été constaté pour le test de cytotoxicité sur cellules KB, les extraits MES sont ceux ayant induit le moins d'effets sur la croissance des bactéries testées, et les extraits CYA se sont révélés induire le plus grand nombre de résultats positifs.

La souche MMS231 (*P. polonicum*) a présenté à la fois le plus grand nombre de résultats positifs, ainsi que la plus forte activité, sur la croissance de bactéries à la fois gram-positif et gram-négatif. Plus particulièrement, l'extrait DCA a présenté les activités les plus intéressantes sur la souche *V. crassostreae*, avec des CE_{50} entre 20 et 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Cette activité semble être à la fois bactéricide et bactériostatique, car les CE_{50} ont pu être calculées pour l'inhibition, le ralentissement et le retard de croissance. Des activités antibactériennes de l'espèce *P. polonicum* ont déjà été rapportées dans la littérature, avec une notamment une inhibition de la croissance de bactéries telles que *Staphylococcus aureus* (Wang *et al.*, 2011). De nombreuses molécules déjà été décrites chez cette espèce (Frisvad *et al.*, 2004) dont certaines sont connues pour présenter des activités antibactériennes, telles que : l'acide pénicillique (Kavanagh, 1947) ou encore les fructigénines (Lacey, 1950).

La souche MMS270 (*P. bioalowiezense*) n'a présenté des activités antibactériennes que sur les bactéries gram-positif et notamment *C. piscicola*, aucune activité n'ayant en effet été retrouvée sur les différentes souches de *Vibrio* et *E. coli*. Dans la littérature, un seul composé déjà décrit chez cette espèce et pourrait présenter des activités antibactériennes : l'asperphenamate (Frisvad *et al.*, 2004; Mateus Pomini *et al.*, 2006).

La souche MMS330 (*P. ubiquestum*) n'a induit aucune activité sur les différentes souches de *Vibrio* testées.

La souche MMS393, non identifiée et la souche MMS399 (*P. ligerum*), ont présenté chacune une activité plutôt spécifique à un milieu de culture, respectivement les milieux CYA et YES. Ces deux espèces étant soit inconnue soit en cours de description, leur activité respective ne peut être expliquée à ce jour par les données de la littérature. Il faut cependant remarquer que pour la souche MMS393, les activités antibactériennes de l'extrait CYA sont les seules activités biologiques observées sur les trois tests utilisés. Il pourrait donc s'agir d'un composé actif spécifique, qui mériterait par la suite d'être recherché et identifié.

Tableau 34: Screening de souches de *Penicillium* isolées de bivalves pour la recherche d'une activité antibactérienne.

Numéro et espèce de souche de micromycète testée	Bactérie	CE ₅₀ (µg.mL ⁻¹)																	
		MES			YES			CYA			MEA			DCA			PDA		
		Inhibit.	Ralent.	Retard	Inhibit.	Ralent.	Retard	Inhibit.	Ralent.	Retard	Inhibit.	Ralent.	Retard	Inhibit.	Ralent.	Retard	Inhibit.	Ralent.	Retard
MMS231 <i>Penicillium polonicum</i>	Gram - <i>V. crassostreae</i>	>100	>100	>100	>100	>100	79,4	51,4	56,8	32,0	>100	>100	>100	28,6	28,3	19,9	55,7	56,4	53,3
	Gram - <i>V. gigantis</i>	>100	>100	>100	>100	>100	54,5	59,2	55,5	33,8	>100	>100	>100	-	-	-	60,7	56,8	45,1
	Gram - <i>V. mytili</i>	>100	>100	>100	>100	>100	60,3	59,6	56,2	40,8	-	-	-	-	-	-	60,6	57,2	48,3
	Gram - <i>V. rotiferianus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Gram - <i>E. coli</i>	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
	Gram + <i>C. piscicola</i>	>100	>100	>100	68,5	>100	>100	47,9	73,5	64,0	-	-	-	-	-	-	88,4	>100	>100
	Gram + <i>L. garvieae</i>	>100	>100	79,4	50,0	>100	>100	57,4	>100	>100	>100	>100	>100	75,7	78,8	35,4	>100	>100	80,8
MMS270 <i>Penicillium bialowiezense</i>	<i>V. crassostreae</i>	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
	<i>V. gigantis</i>	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
	<i>V. mytili</i>	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
	<i>V. rotiferianus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>E. coli</i>	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
	<i>C. piscicola</i>	62,4	92,1	>100	67,5	100,0	>100	50,5	75,3	>100	-	-	-	65,4	>100	>100	82,8	>100	>100
	<i>L. garvieae</i>	>100	>100	>100	>100	>100	>100	73,0	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
MMS330 <i>Penicillium ubiquetum</i>	<i>V. crassostreae</i>	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
	<i>V. gigantis</i>	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
	<i>V. mytili</i>	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
	<i>V. rotiferianus</i>	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
	<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>C. piscicola</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>L. garvieae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MMS393 <i>Penicillium</i> sp.	<i>V. crassostreae</i>	>100	>100	>100	>100	>100	>100	87,6	84,0	58,7	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
	<i>V. gigantis</i>	>100	>100	>100	>100	>100	>100	78,7	77,7	58,1	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
	<i>V. mytili</i>	>100	>100	>100	>100	>100	>100	62,6	58,8	57,7	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
	<i>V. rotiferianus</i>	>100	>100	>100	>100	>100	>100	58,0	57,3	55,5	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
	<i>E. coli</i>	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
	<i>C. piscicola</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>L. garvieae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MMS399 <i>Penicillium ligerum</i>	<i>V. crassostreae</i>	-	-	-	42,2	57,1	30,2	>100	>100	>100	96,7	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
	<i>V. gigantis</i>	-	-	-	73,0	69,6	27,1	>100	>100	>100	>100	>100	70,7	>100	>100	>100	>100	>100	>100
	<i>V. mytili</i>	-	-	-	75,7	63,1	27,5	>100	>100	>100	>100	>100	66,7	>100	>100	>100	>100	>100	>100
	<i>V. rotiferianus</i>	-	-	-	>100	>100	43,1	>100	>100	>100	>100	>100	87,9	>100	>100	>100	>100	>100	>100
	<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>C. piscicola</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- : non testé ou problème de croissance ou témoin positif variable

6. Conclusion

Les *Penicillium* isolés du milieu marin, et plus particulièrement des mollusques bivalves, semblent renfermer un potentiel de bio-activité non négligeable.

Le bilan de ce screening est présenté Tableau 35. Un certain nombre de souches ont montré une activité différente en fonction de leur milieu de culture, mais également en fonction du test utilisé, montrant la complémentarité de ceux-ci. Ce tableau résume donc bien l'intérêt de l'approche OSMAC, et met en évidence une complémentarité des trois bio-essais pour le screening d'une activité dans des champignons issus de mollusques bivalves marins. Si l'on considère les résultats obtenus pour les cellules KB et les larves de diptères (tests mettant en évidence le plus large panel d'activités), c'est le milieu MES qui a permis d'obtenir le plus grand nombre de résultats positifs montrant ainsi l'intérêt de ce milieu pour ce type d'étude, et sans doute l'implication des métabolites de bivalves dans la stimulation de la production de molécules toxiques pour les champignons testés. En effet, c'est avec le milieu YES que l'on a observé le moins de résultats positifs, et la seule différence entre ces deux milieux est la nature de l'extrait utilisé (levure pour YES et moule pour MES). Le milieu CYA, quant à lui, s'est montré très favorable pour l'obtention d'extraits cytotoxiques, moyennement favorable pour l'obtention d'extraits antibactériens, et défavorable pour l'obtention d'extraits actifs sur larves de diptères. Les résultats obtenus sur MES et CYA ont été souvent différents pour une même souche. Si les résultats positifs de ces deux milieux sont compilés pour chaque souche et chaque test, une image représentative de l'activité de la souche est obtenue. Ainsi, si un des 6 extraits de cette souche a été positive sur un test, la valeur CYA+MES pour ce test a également été positive, bien qu'il ne puisse être affirmé que les composés responsables de ces résultats positifs soient identiques. Du fait de cette constatation, il pourrait être proposé une évolution pour le screening des souches de la mycothèque par ces tests, tout en gardant les avantages de la procédure OSMAC : l'ensemble des souches ne seraient cultivées que sur les deux milieux MES et CYA. Si un des deux extraits donnait un résultat positif sur un des tests, la souche correspondante serait alors cultivée sur les 6 milieux pour la recherche d'autres activités.

Les tests de cytotoxicité et le bio-essai sur larves de diptères a permis de mettre en évidence que certaines souches pouvaient produire des composés toxiques pour l'homme, tel que la patuline, une mycotoxine réglementée. Il semblerait donc primordial de rechercher cette molécule dans des mollusques bivalves prélevés *in situ*, afin d'évaluer le risque réel pour la santé des consommateurs.

Les activités observées sur les larves de diptères ou sur les bactéries ont été étudiées de façon beaucoup plus préliminaire que les résultats de cytotoxicité, et l'identification des composés potentiellement bio-actifs a été juste initiée depuis au laboratoire, par fractionnement bio-guidé et dérégulation.

Tableau 35 : Bilan du screening sur les trois tests de souches de *Penicillium* isolées de mollusques bivalves.

Numéro de souche	MES			YES			CYA			MEA			DCA			PDA		
	KB	Larves	Bactéries	KB	Larves	Bactéries	KB	Larves	Bactéries	KB	Larves	Bactéries	KB	Larves	Bactéries	KB	Larves	Bactéries
MMS50	-	+	nt	-	-	nt	+	-	nt	-	+	nt	-	+	nt	+	-	nt
MMS163	+	+	nt	+	+	nt	-	-	nt	+	+	nt	-	-	nt	-	-	nt
MMS231	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+
MMS266	+	+	nt	-	-	nt	-	-	nt	+	-	nt	+	+	nt	+	-	nt
MMS270	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+
MMS330	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
MMS393	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MMS399	+	+	nt	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-
MMS404	-	-	nt	-	-	nt	-	-	nt	-	-	nt	-	-	nt	-	-	nt
MMS417	+	-	nt	-	-	nt	+	-	nt	+	-	nt	-	-	nt	+	-	nt
Total résultats positifs 3 tests confondus	6	4	1	3	2	3	6	0	3	4	2	1	4	3	2	5	1	2
Total résultats positifs KB + larves	10			5			6			6			7			6		
	+ : actif			- : inactif			nt : non testé											

Chapitre 5 – *Application* : Contribution des bio-essais à la connaissance du dinoflagellé *Vulcanodinium rugosum* et de l'ascomycète *Beauveria brongniartii*

1. Introduction

Après avoir évalué la suite de bio-essais proposée pour la détection des phycotoxines connues et pour étudier l'activité de *Penicillium* marins, ce travail de thèse s'est également attaché à étudier, à l'aide des bio-essais, deux types de micro-organismes marins producteurs de toxines émergentes: le dinoflagellé *Vulcanodinium rugosum*, producteur de la pinnatoxine G (PnTX-G), et le champignon *Beauveria brongniartii*, producteur potentiel de la beauvéricine. L'objectif de cette étude était double : d'une part, évaluer la capacité de ces tests à détecter des toxines émergentes, et d'autre part approfondir les connaissances sur ces deux organismes.

2. *Vulcanodinium rugosum* : mise en évidence d'un potentiel toxique particulier

2.1. Rappel sur la toxicité de *V. rugosum* et de la pinnatoxine G

Vulcanodinium rugosum (Nézan et Chomérat) est classée dans la catégorie des micro-algues potentiellement toxiques, car productrice de la PnTX-G, une toxine dite émergente.

A ce jour, la toxicité pour l'homme de la pinnatoxine G n'est pas élucidée. Cette toxine est connue pour induire des symptômes neurologiques importants et rapides chez la souris par injection i.p., et présente également une toxicité importante par voie orale (Selwood *et al.*, 2010; Munday *et al.*, 2012). Les PnTX ont été détectées dans des mollusques bivalves en différentes régions du monde (Australie, Japon, Nouvelle-Zélande, Canada), ainsi qu'en Europe : elles ont été retrouvées dans des moules en Norvège, et ont été démontrées comme étant l'agent responsable de toxicités atypiques obtenues avec le TS, pour des moules provenant de l'étang d'Ingril dans le sud de la France (Rhodes *et al.*, 2011b; Rundberget *et al.*, 2011; McCarron *et al.*, 2012; Hess *et al.*, 2013). Cependant, aucune intoxication humaine par consommation de mollusques bivalves contaminés par des PnTX n'a encore été rapportée. Les PnTX agissent par blocage des récepteurs nicotiniques à acétylcholine (Hellyer *et al.*, 2011). Il était donc intéressant d'évaluer les effets de la PnTX-G sur les différents bio-essais, afin de voir d'une part le comportement des tests vis-à-vis d'une toxine émergente, et d'autre part afin d'essayer d'approfondir les connaissances sur le potentiel bio-actif de la PnTX-G et de son organisme producteur *V. rugosum*.

2.2. Matériel et méthodes

2.2.1. Mise en culture de l'organisme

La souche IFR-VRU-011 de *Vulcanodinium rugosum* a été cultivée pendant 41 jours dans des ballons de culture contenant 8 L de milieu L1 (Guillard et Hargraves, 1993). La souche a été maintenue à 18°C avec un flux de photons d'une densité de $200 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ et une photopériode alternant 16h de lumière et 8h d'obscurité. Le milieu de culture a été réalisé avec de l'eau de mer filtrée de 35 psu en provenance de Méditerranée. Les cellules ont été détachées du support à l'aide de billes de verre, et collectées par centrifugation de la culture (3500 g, 20 min, 4°C).

Les cultures axéniques ont été obtenues avec ajout dans le milieu de culture de 10 mL.L^{-1} d'une solution de *penicillin-streptomycin hybrid-maxTM* (Sigma-Aldrich) contenant 10000 U de pénicilline et 10 mg.mL^{-1} de streptomycine dans 0,9% de NaCl. Le traitement a été appliqué pendant 72 h et les cultures transférées dans un milieu frais.

2.2.2. Extraction, purification et fractionnement d'extraits de *V. rugosum*

2.2.2.1. Comparaison de l'efficacité de deux méthodes d'extraction de la PnTX-G

Chaque extraction a été réalisée à partir d'une pâte d'algues fraîches de 5 g provenant de la même culture d'algues et obtenue par centrifugation de la culture (3500 g, 4°C, 20 min)

- Extraction au méthanol

Trois extractions successives avec 15 mL de MeOH ont été réalisées sur le culot de 5 g. Chaque extraction a été suivie d'un broyage au polytron pendant 1 min puis la suspension a été passée aux ultra-sons pendant 30 min, avec vortex toutes les 10 min. Puis le surnageant a été récupéré par centrifugation (3500 g, 4°C, 10 min). Les trois surnageants ont été rassemblés, filtrés et évaporés à l'évaporateur rotatif, permettant l'obtention d'un extrait brut.

- Extraction sur résine diaion HP-20®

Les 5 g de pâte d'algues ont été reprises dans 35 mL d'eau milliQ et broyées au polytron pendant 1 min. La suspension a ensuite été passée aux ultra-sons pendant 30 min, avec vortex toutes les 10 min. La résine Diaion® HP-20 a été activée en présence de MeOH pendant 30 min et rincée à l'eau milliQ, et 2,5 g de résine activée ont été ajoutés à la suspension. La suspension et la résine ont macéré pendant 24 h sous agitation, puis la résine a été rincée à l'aide de 700 mL d'H₂O milliQ et filtrée à 200 μm afin d'éliminer les fragments

d'algue tout en retenant la silice. Cette dernière a été transférée dans une colonne en verre puis éluée en goutte à goutte avec 70 mL de MeOH. La solution obtenue a été évaporée à l'évaporateur rotatif, permettant l'obtention d'un extrait brut.

2.2.2.2. Fractionnement d'un extrait de *V. rugosum*

L'extrait brut obtenu par extraction au MeOH a ensuite fait l'objet d'étapes de fractionnement.

Une première étape de purification par partition liquide-liquide entre le dichlorométhane (DCM) et l'eau a été réalisée. L'extrait brut sec a été repris dans 100 mL de DCM et 100 mL d'eau milliQ à 0,1 M de NaCl. Les phases ont été séparées dans une ampoule à décanter, la phase aqueuse a été lavée avec deux fois 100 mL de DCM, puis la phase organique a été lavée avec 50 mL d'eau. La partition a été achevée par centrifugation (2500 g, 4°C, 8 min). La phase aqueuse et la phase organique sont récupérées séparément, filtrées sur 0,2 µm et évaporées.

Une seconde étape de purification par partition liquide-liquide entre le MeOHaq. et l'hexane a été réalisée. L'extrait sec DCM a été repris dans 50 mL de MeOHaq. (70:30 v/v), et le résidu formé dans le ballon d'extraction repris dans 50 mL d'hexane. La phase hexanique a été lavée deux fois avec 50 mL de MeOHaq. puis cette phase méthanolique a été lavée avec 50 mL d'hexane. La partition a été achevée par centrifugation (2500 g, 4°C, 8 min), les phases récupérées séparément et évaporées. Après reprise dans le MeOH, elles ont été filtrées sur 0,2 µm et analysées.

L'extrait méthanolique purifié obtenu précédemment a été séché et repris dans 5 mL de DCM. Le fractionnement a été réalisé en parallèle sur cinq cartouches SPE différentes (Upticlean SI-S, Interchim) avec environ 35 mg d'extrait déposé sur chaque cartouche. L'éluion s'est faite sous vide partiel, sans assécher les cartouches afin que la phase stationnaire reste homogène. Les différentes phases mobiles, les volumes utilisés et le nom des fractions correspondantes sont reportés Tableau 36.

Tableau 36 : Phases mobiles et volumes éluants utilisés pour le fractionnement sur cartouches SPE d'un extrait purifié de *V. rugosum*.

Numéro de fraction	Système éluant	Ratio (%)	Volume éluant (mL)
1	DCM	100	4
2			3
3	DCM/Acétone	85 / 15	3
4			2
5	DCM/Acétone	50 / 50	3
6			2
7	DCM/MeOH	80 / 20	3
8			3
9			3
10	MeOH	100	3
11			3

2.2.2.3. Analyse d'une culture axénique de *V. rugosum*

Pour l'analyse de la culture axénique, 200 mL de culture ont été prélevés 2 semaines après l'application du traitement antibiotique. Les cellules ont été décollées et collectées de la même façon que les cultures non axéniques. Un culot d'algues de 276 mg a été récolté et trois extractions successives ont été réalisées avec 5 mL de MeOH. L'extrait a été repris dans 1 mL de MeOH et des dilutions de cette solution ont été analysées à l'aide d'un triple quadripôle (QTrap, 5500, AB Sciex) pour la quantification de la PnTX-G et un hybride quadripôle-temps-de-vol (Q-TOF, Agilent) pour l'analyse métabolomique.

2.2.2.4. Quantification de la PnTX-G en CL-SM

L'analyse de la PnTX-G a été réalisée par UHPLC (Nexera, Shimadzu) avec couplage à un spectromètre de masse triple-quadripôle (Qtrap 5500, AB Sciex). La chromatographie a été réalisée sur une colonne C8 Hyperclone MOS (3 µm, 50 x 2 mm), avec une colonne de garde C8 (4 x 2,0 mm, 3 µm, Phenomenex). Une phase mobile binaire a été utilisée, avec une phase A (100% aqueuse) et une phase B (95% acetonitrile aqueux) contenant toutes deux du formate d'ammonium 2 mM et de l'acide formique 50 mM. Le débit était de 0,2 mL.min⁻¹ et le volume d'injection de 5 µL. Les températures de la colonne et de l'échantillon étaient respectivement de 25°C et 4°C. Un gradient d'élution a été utilisé, en commençant avec 30% jusqu'à 95% de B en 2,5 min, puis 95% de B maintenu pendant 5 min.

Le système CL-SM a été utilisé en mode ionisation positive et MRM (multiple reaction monitoring), avec les trois transitions suivantes pour chaque composé : PnTX-G m/z 694.4→676.4, 694.4→458.3 et 694.4→164.1; PnTX-A m/z 712.4→694.4, 712.4→458.3 et 712.4→164.1, PnTX-B et C, m/z 741.4→723.5, 741.4→458.3 et 741.4→164.1; PnTX-D, m/z 782.4→764.4, 782.4→488.3 et 782.4→164.1; PnTX-E, m/z 784.4→764.4, 784.4→488.3 et 784.4→164.1; PnTX F, m/z 766.4→738.4, 766.4→488.3 et 766.4→164.1; ptériatoxines A, B et C m/z 831.5→787.5, 831.5→458.3 et 831.5→164.1. La transition la plus intense, donnant l'ion produit m/z 164.1, été utilisé pour quantifier les toxines. Toutes les toxines ont été quantifiées contre un étalon de la PnTX-G provenant du NRCC, sur le principe que tous les analogues ont le même facteur de réponse que la PnTX-G.

L'interface ESI a été utilisée avec les paramètres suivants : curtain gaz 30 psi, température : 650°C, gaz 1 50 psi ; gaz 2 60 psi, ion spray potentiel 5500 V. Pour la détection, les paramètres étaient : potentiel de declustering 30 V, potentiel d'entrée 10 V. Trois énergies de collision ont été appliquées (53, 59 et 67 eV) avec des énergies de collision de 10, 6 et 10 V pour les transitions respectives 1, 2 et 3 de chaque composé.

2.2.2.5. Analyse métabolomique de fractions de *V. rugosum* par CL-SM

Des aliquots de 5 µL de chaque échantillon ont été séparés sur une colonne C18 100 Å Kinetex (1.7µm, 150 x 2,1 mm, Phenomenex) maintenue à 40°C, par un système Agilent 1290 Infinity LC, avec un gradient de phase mobile (0,5 mL.min⁻¹) comprenant d'acide acétique aqueux 0,1% (A) et de l'acétonitrile contenant 0,1% d'acide acétique (B). Le gradient a été réalisé de la façon suivante : 5% de B de 0 à 2,4 min, jusqu'à 25% de B de 2,4 à 4,5 min, puis jusqu'à 30% de B de 4,5 à 11 min et enfin jusqu'à 100% de B de 11 à 14 min avec maintien jusqu'à 16,5 min, puis diminution à 5% de B jusqu'à 20 min et maintien à 5% de B jusqu'à 25 min. L'appareil utilisé est un hybride d'un quadripôle avec couplage temps-de-vol 6540 UHD (Agilent Technologies, Waldbronn, Allemagne) utilisé en mode positif. Le voltage du capillaire, du fragmenteur et du skimmer était respectivement de 3900, 150 et 60 V. Le gaz de la gaine était à 350°C (12 mL.min⁻¹), le gaz d'assèchement à 175°C (5 mL.min⁻¹) et le nébuliseur à 43 psi. Les spectres de masse ont été acquis par une analyse en mode *full scan* (c'est-à-dire sans appliquer d'énergie de collision qui fragmenterait les molécules), le long d'une fenêtre de *m/z* allant de 50 à 1700. Pour maintenir une précision de la masse au long de l'analyse, une solution de référence contenant les ions de référence 121.0508 et 922.0097 a été utilisée en mode positif. La correction de l'axe des masses par utilisation de ces ions de référence a résulté en une précision de masse de l'ordre de 1 ppm en mode *full scan* et de 2 ppm en mode fragmentation. Le logiciel de traitement des données utilisé était MassHunter Workstation Software (Agilent Technologies, version B.05).

Les empreintes métabolomiques ont été déconvoluées pour permettre la conversion des données brutes en 3D (*m/z*, temps de rétention et abondance) en pics chromatographiques alignés en fonction de la masse et du temps, avec les aires des pics associées. Les données ont été traitées avec le logiciel MassHunter Qualitative Analysis (Agilent Technologies), avec lequel les composés ont été extraits des données brutes à l'aide de l'algorithme *Molecular Feature Extractor* (MFE), version 5.0 ou 6.0.

Les résultats ont ensuite été analysés à l'aide du logiciel MassProfiler (Agilent Technologies), et l'identification des composés a été réalisée à l'aide d'une base de données interne au laboratoire ainsi que la base de données MarinLitTM (Munro et Blunt).

Les analyses ont été réalisées en triplicata.

2.2.3. Bio-essais

Les protocoles des tests de cytotoxicité sur cellules KB, sur larves de diptères et sur bactéries sont décrits respectivement en Annexes 2, 4 et 9. Concernant le test de cytotoxicité, le XTT a été utilisé pour révéler la viabilité cellulaire et les essais ont été réalisés deux fois dans des puits en triplicata.

Le bio-essai sur larves a été réalisé en triplicata.

Un extrait brut de *V. rugosum* a été testé sur les bactéries suivantes : *Vibrio crassostreae*, *V. gigantis*, *V. mytili*, *Escherichia coli*, *Lactococcus garvieae* et *Carnobacterium piscicola*. La concentration maximale testée était de 100 µg.mL⁻¹ et les essais ont été réalisés une fois en triplicat.

2.2.4. Analyse des données des tests

Le logiciel GraphPad (GraphPad Prism, version 5.0c, San Diego, USA) a été utilisé pour l'analyse des données obtenues pour le test de cytotoxicité et le test d'activité sur larves de diptères. Les courbes d'inhibition de croissance par rapport au témoin ont été modélisées en appliquant la régression non linéaire à quatre paramètres de type « HillSlope ».

2.3. Résultats

2.3.1. Comparaison de l'efficacité de deux méthodes d'extraction de la PnTX-G

L'extraction au MeOH a conduit à l'obtention d'une masse d'extrait brut plus importante qu'avec la résine HP-20, avec des masses respectives de 235 mg et 8 mg (Tableau 37). Le MeOH a permis également d'extraire une plus grande quantité de PnTX-G, à savoir 117,3 µg dans la totalité de l'extrait brut contre 28,1 pour l'extraction avec la résine HP-20. Cependant il semble que la résine HP-20 permette de simplifier la composition de l'extrait brut, et de réaliser une première étape de purification. Rapportée à la quantité d'extrait brut, la PnTX-G était en concentration plus élevée avec la résine HP-20 : 3,5 µg.mg⁻¹ contre 0,5 µg.mg⁻¹ pour l'extraction au MeOH.

Tableau 37 : Comparaison des quantités d'extrait brut et de PnTX-G obtenues par extraction au MeOH ou résine HP-20.

	Extraction MeOH			Extraction HP-20		
	Extrait brut	Extrait DCM	Extrait H ₂ O	Extrait brut	Extrait DCM	Extrait H ₂ O
Masse d'extrait (mg)	235	22	191	8	4	5
Quantité de PnTX-G (µg par mg d'extrait)	0,5	1,5	0	3,5	3,9	0
Quantité de PnTX-G (µg dans extrait brut)	117,3	32,2	17,6	28,1	15,6	1,8
Quantité de PnTX-G (µg par g d'algue)	12,7	6,4	3,5	5,6	3,1	0,4

Le MeOH semble donc permettre d'extraire la PnTX-G de façon beaucoup plus efficace que la résine HP-20. Au vu de la faible disponibilité en PnTX-G, l'extraction au MeOH a donc été retenue comme mode opératoire. La résine HP-20 permet en revanche l'obtention d'un extrait brut plus simple, donc ayant une teneur plus élevée en PnTX-G. Il serait ainsi intéressant d'approfondir cette technique, afin de comprendre dans quelle fraction se retrouve la PnTX-G manquante, ou s'il s'agit d'une perte par adsorption irréversible.

Par la suite, 26 g de culot d'algues ont été extraits au méthanol, purifiés par partition liquide-liquide (DCM/Eau puis MeOH aq./Hexane), puis fractionnés sur SPE.

2.3.2. Reproductibilité du fractionnement sur SPE

Un premier lavage de la colonne a été réalisé avec le DCM 100% afin d'éluer la majorité des composés très apolaires (Figure 58). Le deuxième système de solvant, DCM / acétone (85:15), a permis d'éluer une masse importante dans la fraction F3 et une masse toujours non négligeable dans la fraction F4. Il semblerait donc que le volume de solvant utilisé n'ait pas épuisé les molécules de cette polarité. En revanche, les systèmes éluant DCM / acétone (50:50), DCM / MeOH (80:20) et MeOH 100%, ainsi que les volumes utilisés, ont semblé épuiser correctement les molécules correspondant à ces polarités.

Les fractions obtenues avec les SPE pour les différents réplicats A à D ont présenté une bonne reproductibilité, avec une répartition des masses relativement similaire selon le système éluant (Figure 58). Seule la SPE E a présenté un profil différent, avec notamment une quantité plus faible de composés ayant élués dans les fractions F2 et F3 (système éluant DCM / acétone, 85:15) et une quantité largement plus importante ayant élué dans les fractions F9, F10 et F11 (système éluant MeOH 100%).

La reproductibilité du fractionnement sur les SPE A à D s'est montrée satisfaisante, et les masses obtenues chaque fraction ont regroupées.

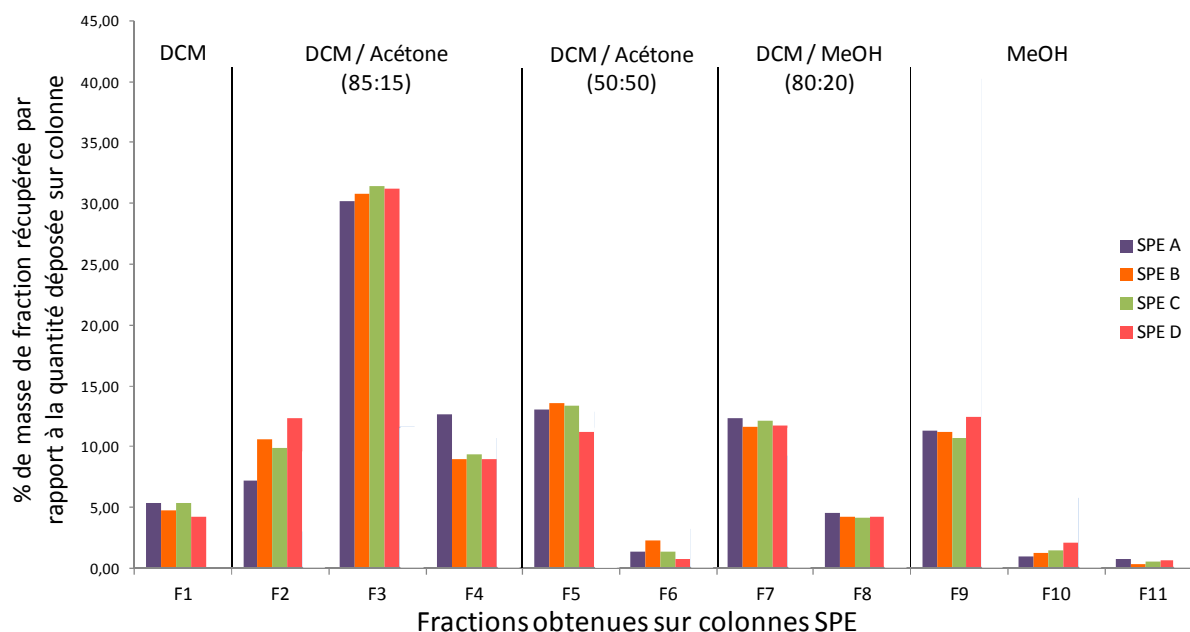


Figure 58 : Répartition des masses au cours du fractionnement sur SPE, réalisé en 4 réplicats (SPE A à SPE E). Les masses sont exprimées en pourcentage par rapport à la masse totale de la fraction déposée, soit 35 mg.

2.3.3. Quantification de la PnTX-G au long des processus de purification

Les quantités d'extraits et de PnTX-G récupérées à chaque étape sont décrites Tableau 38. Ainsi, 77% de la PnTX-G dosée dans l'extrait brut ont été récupérés dans les différentes fractions.

Tableau 38 : Répartition des masses et des quantités de PnTX-G après purification par partage liquide-liquide et fractionnement sur SPE.

	Fraction	Masse de la fraction (mg)	Quantité de PnTX-G (μ g)	% de récupération de PnTX-G à chaque étape	% de récupération d'extrait à chaque étape
	Extrait brut	2050	804	-	-
Partition 1	Extrait DCM	442	628	78,1	109
	Extrait H ₂ O	1618	0		
Partition 2	Extrait MeOHaq.	168	571	90,9	100
	Extrait hexane	274	21,2		
Fractionnement	F1	7	0	} 110	} 87,3
	F2	14,7	0		
	F3	44,1	0		
	F4	14,3	0,05		
	F5	19	224		
	F6	2,5	148		
	F7	17,3	277		
	F8	6,1	0,27		
	F9	18,2	0,16		
	F10	2,4	0		
	F11	1,1	0		

2.3.4. Régrouperment des fractions en vue de leur évaluation biologique

Les fractions ont été réunies en fonction de leur système éluant, mis à part les trois fractions contenant la PnTX-G qui ont été réunies (Figure 59). Ainsi la fraction 1 seule est restée fraction 1, les fractions 2, 3 et 4 ont été regroupées en fraction 2, les fractions 5,6 et 7 contenant toutes de la PnTX-G ont été regroupées en fraction 3, la fraction 8 seule a donné la fraction 4 et enfin les fractions 9, 10 et 11 ont donné la fraction 5. Ainsi, la fraction 3 contient l'ensemble de la PnTX-G extraite, soit 16,7 μ g de PnTX-G par mg d'extrait et 5,19 μ g de PnTX-G par g d'algues. Le facteur de purification de la PnTX-G dans cette fraction 3 est donc de 4,9 par rapport à la purification par partition liquide-liquide MeOHaq./Hexane, de 11,9 par rapport à la purification par partition liquide-liquide DCM/Eau, et de 40,8 par rapport à l'extrait brut.

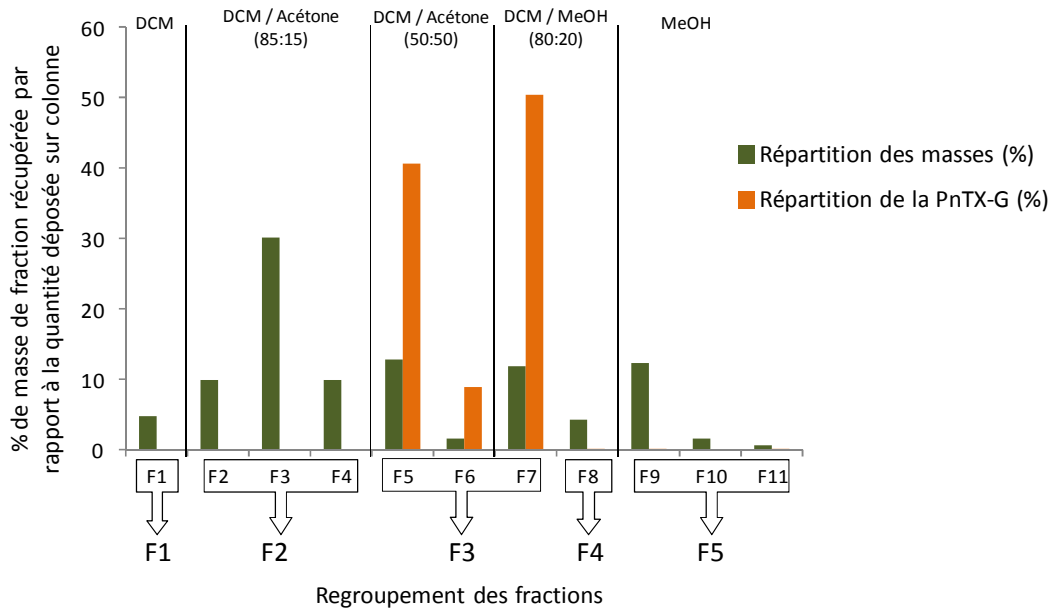


Figure 59 : Cumul des répartitions totales des 5 SPE par fraction, ainsi que de la PnTX-G, et schéma de regroupement des 11 fractions en 5 fractions.

2.3.5. Evaluation de la bio-activité d'un extrait brut de *V. rugosum* et de la PnTX-G

2.3.5.1. Test de cytotoxicité sur cellules KB

L'extrait brut de *V. rugosum* a été testé à trois temps d'exposition sur les cellules KB : 24, 48 et 72 h. De la même façon que pour l'extrait brut d'*A. spinosum* (Chapitre 3), 48 h d'incubation ont été nécessaires pour atteindre l'activité quasi maximale de l'extrait (Figure 60). Les courbes représentées montrent les points expérimentaux simplement reliés, car dans ce cas aucun modèle de courbe n'a pu être appliqué. En effet, les courbes semblent présenter deux paliers, donnant une forme générale non modélisable avec le modèle logistique à quatre paramètres de GraphPas précédemment appliqué. Les CI_{50} ont donc été calculées manuellement, selon la démarche suivante :

$$\% \text{ de mortalité cellulaire} = 100 - (DO \text{ échantillon} / DO \text{ moyenne témoin} * 100) ;$$

soit X_1 la concentration d'un échantillon induisant un % de mortalité cellulaire Y_1 inférieur à 50

et X_2 la concentration d'un échantillon induisant un % de mortalité cellulaire Y_2 supérieur à 50 ;

$$a = (Y_1 - Y_2) / (\log X_1 - \log X_2) ; b = Y_2 - (a * \log X_2) ;$$

$$CI_{50} = 10^{(50 - b)/a}$$

Les CI_{50} obtenues sont donc respectivement 8,9 (± 4) ; 1,1 ($\pm 0,3$) et 0,19 ($\pm 0,07$) $\mu\text{g.mL}^{-1}$ pour 24, 48 et 72 h.

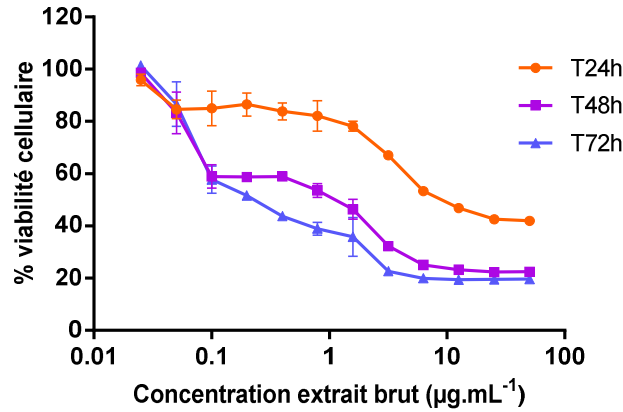


Figure 60 : Evaluation de la cytotoxicité d'un extrait brut de *V. rugosum* sur cellules KB à différents temps d'exposition : 24, 48 et 72 h.

La PnTX-G a ensuite été évaluée en tant que toxine pure sur les cellules KB. Au bout de 72 h d'exposition, la toxine n'a induit qu'une faible inhibition de la viabilité cellulaire à la concentration de 400 ng.mL⁻¹ (Figure 61). En comparaison avec l'activité de l'extrait brut de *V. rugosum*, cette concentration est très importante. En effet, l'analyse chimique de l'extrait brut a révélé que 1 µg d'extrait brut contenait 1,14 ng de PnTX-G. Ainsi, si la PnTX-G était responsable de la majorité de l'activité au sein de l'extrait, elle devrait induire une CI₅₀ autour de 0,3 ng.mL⁻¹ au bout de 72 h. Aucune activité significative n'ayant été observée à la concentration de 400 ng.mL⁻¹, il semble donc que la PnTX-G ne soit pas responsable de l'activité de l'extrait brut.

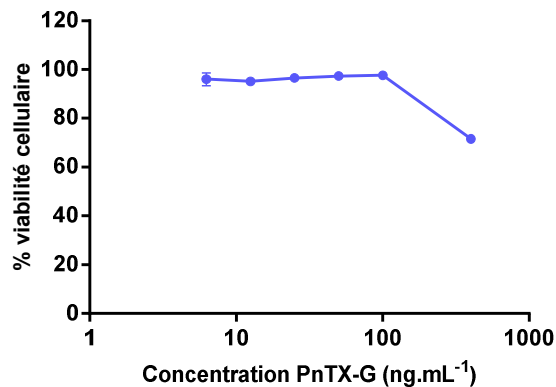


Figure 61: Evaluation de l'activité cytotoxique de la PnTX-G sur cellules KB après 72 h d'incubation.

2.3.5.2. Confirmation de l'activité cytotoxique sur d'autres lignées tumorales

Dans le cadre de ce projet de thèse, une collaboration a été mise en place avec l'Unité Toxicologie des Contaminants de l'ANSES, à Fougères (France). Les différents extraits et fractions ont ainsi été testés sur d'autres lignées tumorales, à savoir les cellules Neuro2A, et Caco-2 différenciées et non différenciées. La cytotoxicité sur Neuro2A et Caco-2 non différenciées a suivi le même schéma que pour les cellules KB. Les résultats obtenus sont détaillés dans la publication intitulée « Cytotoxicity, fractionation and metabolomic analysis of extracts of the dinoflagellate *Vulcanodinium rugosum*, a producer of Pinnatoxin G » et acceptée avec révisions mineures dans le journal *Marine Drugs* (Chapitre Publications).

2.3.5.3. Test d'activité sur larves de diptères

Une gamme d'extrait brut de *V. rugosum* testé sur larves de diptères a induit une réponse de type tout ou rien : soit une paralysie immédiate était observée à partir de la CMA de $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$, soit aucune paralysie pendant les 10 min d'observation pour des concentrations inférieures à $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figure 62). La paralysie induite était partielle, rapidement suivie par une paralysie totale.

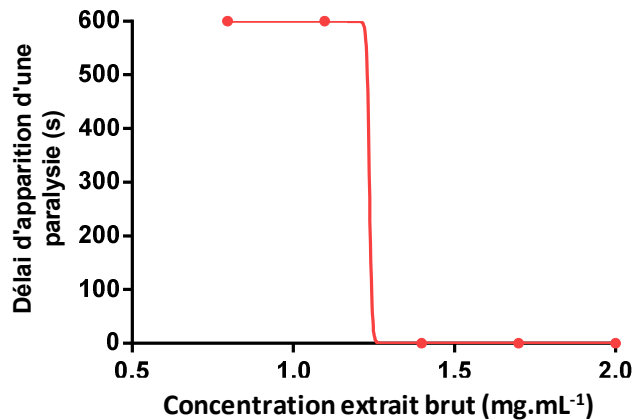


Figure 62 : Evaluation de l'effet d'une gamme d'extrait brut de *V. rugosum* sur le délai d'apparition d'une paralysie (partielle ou totale) sur larves.

La PnTX-G a également été testée sur larves en tant que toxine pure. De même que pour le test de cytotoxicité, aucune activité n'a pu être observée, ici jusqu'à la concentration de $1,85 \mu\text{g.mL}^{-1}$. En raison de la faible disponibilité en toxine, cette gamme n'a pu être élargie à des concentrations plus importantes. Si la concentration en extrait brut est convertie en équivalent PnTX-G, et si la PnTX-G est considérée comme majoritairement responsable de l'activité de l'extrait brut, elle devrait induire une activité sur larves autour de $28,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ mais cette concentration n'a pu être atteinte. Dans la littérature, il est rapporté que la PnTX-G induit une DL_{50} sur souris de $50 \mu\text{g.kg}^{-1}$ par injection i.p. et de $150 \mu\text{g.kg}^{-1}$ par voie orale (Selwood *et al.*,

2010). La concentration testée de $1,85 \mu\text{g.mL}^{-1}$ sur larves correspond à $185 \mu\text{g.kg}^{-1}$, ce qui est supérieur aux valeurs retrouvées dans la bibliographie. Cependant, cette absence d'activité observée sur larves est en cohérence avec les résultats observés pour le test larve avec des molécules pures dont le mécanisme d'action est connu (Tableau 11, Chapitre 2) concernant les antagonistes des récepteurs nicotiniques à acétylcholine. En effet, le bromure de pancuronium et le bromure de rocuronium n'ont induit aucun effet observable sur les larves jusqu'aux concentrations respectives de 17,5 mM et 18,9 mM. Cela confirme donc que le test larve ne puisse pas détecter de molécules présentant ce type d'activité, expliquant ainsi l'inactivité apparente de la PnTX-G.

2.3.5.4. Tests d'activité antibactérienne

Comme il a été décrit, Tableau 20 (Chapitre 3) et Annexe 11, un extrait brut de *V. rugosum* a été testé sur 6 bactéries, gram-négatif (*V. crassostreae*, *V. gigantis*, *V. mytili*, *E. coli*) et gram-positif (*L. garvieae* et *C. piscicola*) mais aucune CE_{50} d'inhibition, de ralentissement ou de retard n'a pu être calculée.

2.3.5.5. Conclusion sur la bio-activité d'un extrait brut de *V. rugosum* et de la PnTX-G

L'extrait brut de *V. rugosum* a présenté une activité importante sur le test de cytotoxicité et sur le test larve, sans qu'une activité de la PnTX-G puisse être détectée. Il semble donc que le dinoflagellé *V. rugosum* produise un ou plusieurs composés bio-actifs, autres que la PnTX-G, qui seraient responsables des activités observées sur les différents modèles. Le test de cytotoxicité, moins consommateur en extrait que le test larve, a été utilisé dans la suite de l'étude pour évaluer l'activité biologique des extraits purifiés et des différentes fractions de *V. rugosum*.

2.3.6. Evaluation de la bio-activité d'extraits purifiés de *V. rugosum*

L'extrait brut de *V. rugosum* a été repris dans le DCM et rincé à l'eau. La fraction DCM séchée a ensuite été reprise dans le MeOHaq. et rincée à l'hexane. L'ensemble de ces fractions, c'est-à-dire les fractions DCM, H₂O, MeOHaq. et hexane ont été testées sur cellules (Figure 63). L'activité a bien été retrouvée dans les fractions DCM et MeOHaq., avec des CI_{50} respectives de $7,2 (6,8-7,4) \text{ ng.mL}^{-1}$ et $3,5 (2,9-4,1) \text{ ng.mL}^{-1}$. Les fractions H₂O et MeOHaq. ont présenté une activité moins importante, avec des CI_{50} respectives de $8,5 (6,1-10,9) \mu\text{g.mL}^{-1}$ et $0,44 (0,22-0,66) \mu\text{g.mL}^{-1}$.

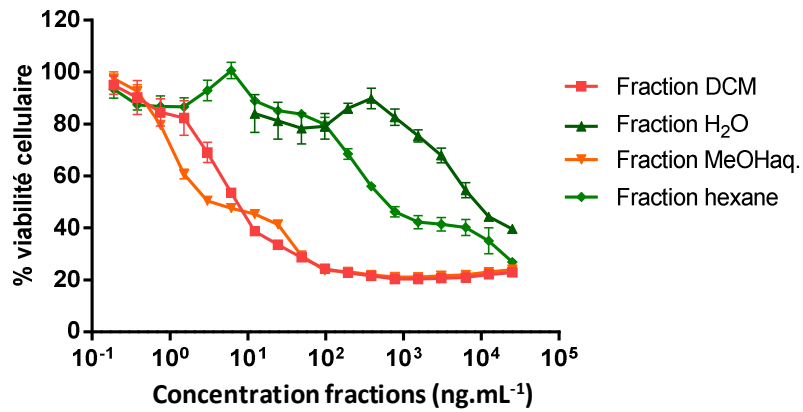


Figure 63 : Evaluation de la cytotoxicité d'extraits purifiés de *V. rugosum* sur cellules KB au bout de 72 h d'exposition.

Ces résultats renforcent les précédentes observations sur l'absence d'activité de la PnTX-G sur cellules KB. En effet, il a été vu qu'une partie de la PnTX-G était passée dans la fraction aqueuse lors de la partition DCM/H₂O. Or, l'activité a augmenté dans l'extrait DCM, ce qui tend à confirmer que cette activité n'est pas due à la PnTX-G.

2.3.7. Evaluation de l'activité des différentes fractions

Les 5 fractions obtenues ont été testées sur cellules KB uniquement. La fraction la plus active a été la F2, suivie de F3, F4, F5 puis F1 (Figure 64 et Tableau 39). La fraction F3 contient la totalité de la PnTX-G de l'extrait, mais comme il a été vu cette toxine n'est pas active sur cellules KB. Les courbes de F2 et F3 sont superposables en partie, il semble donc que le ou les composés responsables de l'activité au sein de F2 se retrouvent dans la fraction F3.

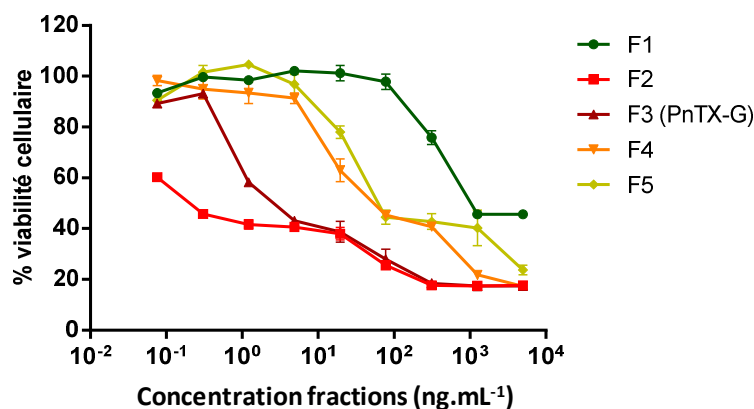


Figure 64 : Evaluation de la cytotoxicité de fractions de *V. rugosum* obtenues par SPE sur silice sur cellules KB au bout de 72 h d'exposition.

Tableau 39 : Détail des masses, du contenu en PnTX-G et des CI₅₀ de chaque fraction.

	Masse des fractions (%)	Répartition de la PnTx-G (%)	CI ₅₀ (72 h d'incubation)
F1	4,9	0	1023 (1088 - 958)
F2	50,3	0	0,21 (0,18 - 0,24)
F3	26,5	100	2,59 (2,55 - 2,63)
F4	4,6	0	53,6 (61,8 - 45,4)
F5	13,8	0	62,7 (69,5 - 55,9)

2.3.8. Déréplication de composés présents dans des extraits de *V. rugosum*

Le profil chimique d'un extrait brut obtenu à partir d'une culture axénique de *V. rugosum* a été étudié par spectrométrie de masse haute résolution en mode *full scan*. Les analyses ont été réalisées en triplicat, et les pics obtenus dans les trois expérimentations ont été dérépliqués. Les résultats sont donnés Figure 65 et Tableau 40. Le profil chimique de la fraction F2, obtenue cette fois-ci à partir d'une culture non axénique de *V. rugosum*, a également été investigué.

La présence de la PnTX-G a été confirmée sur la base du temps de rétention, de la fragmentation et du *m/z* avec utilisation d'une base de données interne au laboratoire.

La base de données MarinLit™ a été utilisée pour la déréplication des pics observés. Le composé le plus

abondant de l'extrait brut, qui correspond à 3 molécules dans la base de données : la nakijiquinone A, la N-carboxy-methyl-smenospongine et la stachybotrin A, avec un score très correct de 99,4 (Figure 65 a et Tableau 40). Ainsi dans le Tableau 40, les abondances des autres pics ont été exprimées en pourcentage du pic F. Cinq autres pics ont pu être annotés de façon putative, mais la majorité des pics n'a pu être identifiée.

La fraction F2 a été analysée de la même façon, et les composés retrouvés dans l'extrait brut ont été recherchés dans cette fraction (Figure 65 b). De même que pour l'extrait brut, le composé F s'est trouvé être le composé majoritaire de cette fraction. Les pics B, D et E ont également été retrouvés dans la fraction F2, mais en très faible abondance : respectivement 0,05 ; 0,06 et 0,07% du composé F. Le second composé le plus abondant de cette fraction (pic L, 24,44% du composé F), a été identifié de façon putative comme le 7,11-dihydroxy-16-oxo-12-spongien-17-al ; la furcellataepoxylactone ou encore le branacenal.

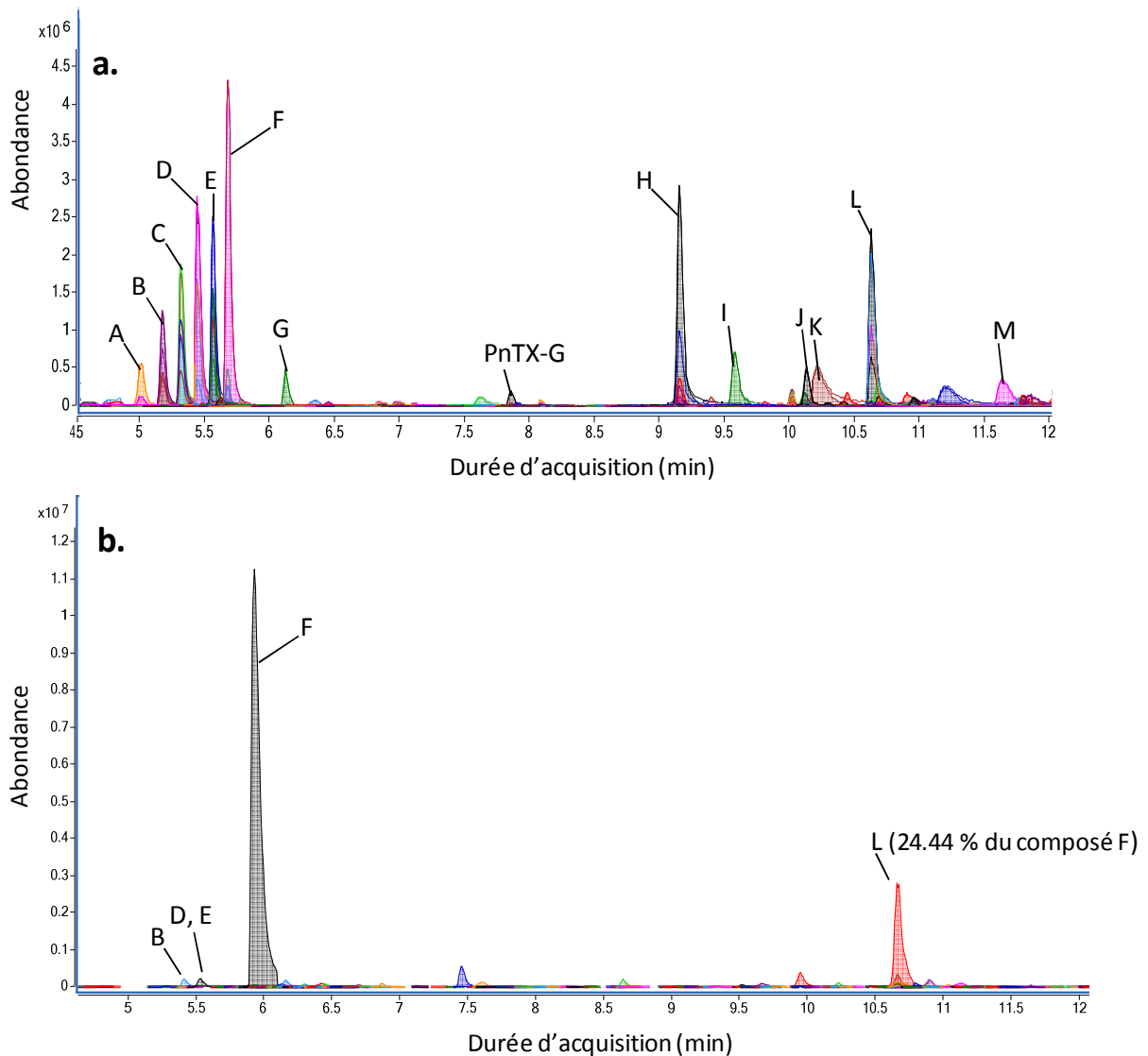


Figure 65 : Annotation des pics observés sur les chromatogrammes obtenus pour un extrait brut d'une culture axénique (a), et pour la fraction F2 d'une culture non-axénique de *V. rugosum* (b).

**Tableau 40 : Annotation possible des pics observés sur le chromatogramme (Figure 65)
d'un extrait brut d'une culture axénique de *V. rugosum***

Pics (Fig. 65)	<i>m/z</i> [M+H] ⁺ expérimental		Abondance relative par rapport au composé F (%)		Annotation possible d'après la base de données MarinLit	Score % (par rapport à la base de données)		Différence de ppm (par rapport à la base de données)	
	Moyenne (n=3)	Ecart-type	Moyenne (n=3)	Ecart-type		Moyenne (n=3)	Ecart-type	Moyenne (n=3)	Ecart-type
A	393,2102	0,0001	16,74	0,72	inconnu	-	-	-	-
B	437,2362	0,0002	26,65	0,62	inconnu	-	-	-	-
	432,2810	0,0002	9,97	0,47	inconnu	-	-	-	-
C	481,2622	0,0001	38,61	1,04	inconnu	-	-	-	-
	476,3067	0,0001	18,21	1,49	inconnu	-	-	-	-
D	520,3331	0,0002	33,91	0,50	inconnu	-	-	-	-
	525,2886	0,0002	59,92	0,90	inconnu	-	-	-	-
E	564,3593	0,0001	36,13	3,03	inconnu	-	-	-	-
	569,3147	0,0001	59,10	5,14	inconnu	-	-	-	-
F	613,3408	0,0003	13,70	5,11	inconnu	-	-	-	-
	402,2281	0,0003	100,00	100,00	Nakijiquinone A	98,14	1,34	-1,38	0,56
					N-carboxy-methyl-smenospongine				
Stachybotrin									
G	370,2748	0,0000	10,83	0,23	N1-methyl-xestamine D	99,44	0,03	-0,84	0,02
PnTX-G	694,4664	0,0003	1,06	0,06	-	-	-	-	-
	343,2958	0,0001	66,03	1,95	inconnu	-	-	-	-
H	240,2327	0,0001	8,74	0,50	2-hydroxypentadecanoic acid	98,13	0,44	-1,60	0,34
	272,2589	0,0001	20,50	0,70	2-amino-1,3,4-hexadecanetriol; (2S,3R,4R)-form	99,11	0,21	-1,18	0,14
J	692,3843	0,0003	4,04	0,38	inconnu	-	-	-	-
K	286,1444	0,0002	11,69	0,80	Solanapyrone B; 7ct-Hydroxy, 4'-demethoxy, 4'-amino, 1- aldehyde	99,03	0,71	-1,12	0,53
L	453,1680	0,0001	61,23	0,14	7,11-dihydroxy-16-oxo-12-spongien-17-al; (713,1113)-form, Di-Ac	97,96	0,94	-1,44	0,36
					Furcellataepoxylactone				
	Branacenal								
	288,2538	0,0001	9,02	0,52	inconnu	-	-	-	-
M	402,3575	0,0001	6,97	0,28	inconnu	-	-	-	-

La nakijiquinone A et la N-carboxy-methyl-smenospongine sont des amino-quinones sesquiterpeniques (Kondracki et Guyot, 1987; Shigemori *et al.*, 1994), et la stachybotrin A est un alcaloïde aromatique (Xu *et al.*, 1992). Ces trois composés sont connus pour présenter des activités biologiques, plus particulièrement cytotoxiques.

Les nakijiquinones, isolées d'éponges marines provenant de Okinawa au Japon, présentent diverses activités telles qu'une cytotoxicité contre les cellules KB ou les cellules de leucémie murine L-1210, ou encore une inhibition de la Her-2/Neu tyrosine kinase (Stahl *et al.*, 2001; Gordaliza, 2010). Il a été rapporté que cette activité antitumorale de la nakijiquinone était prometteuse pour des applications pharmacologiques (rapporté par Gordaliza, 2010).

La smenospongine est également un composé isolé d'éponges, plus particulièrement *Dactylospongia elegans* provenant d'Indonésie (Kong *et al.*, 2008). Elle présente des activités intéressantes telles qu'une induction de la différenciation de lignées cellulaires de leucémies HL60 et U937 en cellules normales, ou encore l'inhibition de la croissance de 39 lignées de tumeurs humaines solides (Aoki *et al.*, 2004; Kong *et al.*, 2011).

La nakijiquinone A et la N-carboxy-methyl-smenospongine sont donc des candidats probables pour expliquer l'activité de l'extrait brut et de la fraction F2 de *V. rugosum*. La nakijiquinone A a été isolée à partir d'éponges d'Okinawa. Or les pinnaoxines ont initialement été isolées de coquillages venant de ce même archipel d'Okinawa. Les éponges marines sont des organismes largement étudiés pour la recherche de composés bio-actifs (Mayer *et al.*, 2009; Blunt *et al.*, 2013), dont les activités peuvent résulter du métabolisme de divers micro-organismes qu'elles abritent. Les bactéries, micro-algues et micro-mycètes peuvent en effet représenter jusqu'à 40% du volume des éponges (Wilkinson, 1983). Il est donc tout à fait envisageable que *V. rugosum*, en tant que dinoflagellé benthique, ait colonisé certaines éponges et s'en soit servi comme support de croissance, et soit responsable de la production *de novo* de la nakijiquinone A ou de la N-carboxy-methyl-smenospongine. Les travaux d'isolement et d'identification définitive des composés actifs sont actuellement en cours au laboratoire.

3. *Beauveria brongniartii*

3.1. Introduction

Beauveria brongniartii est une espèce de champignon entomopathogène : elle produit des spores capables de germer sur les insectes, lui permettant de se développer dans le corps de ceux-ci. Elle est connue pour être particulièrement virulente contre les larves du hanneton commun *Melolontha melolontha*, insecte reconnu comme nuisible en agriculture. *B. brongniartii* est ainsi utilisée en lutte biologique, pour contrôler les populations de hannetons. Trois pays d'Europe dont la France commercialisent des produits contenant cette souche, tels que Melocont[®] de Agrifutur[®] (Seger *et al.*, 2005; Dolci *et al.*, 2006). Cette espèce semble donc plutôt de type terrestre, et à notre connaissance une seule autre étude fait état de son isolement à partir d'échantillons marins (Slinkina *et al.*, 2010). En revanche, la présente étude serait la première description de cette espèce à partir de mollusques bivalves.

La souche étudiée a été sélectionnée dans la mycothèque du laboratoire car très proche d'une autre espèce également entomopathogène, *Beauveria bassiana* (Leland *et al.*, 2005), beaucoup plus largement décrite dans la littérature. Son caractère virulent lui est conféré en grande partie par sa capacité à produire des chitinases et des protéases, responsables de la dégradation de la cuticule des insectes (Erlacher *et al.*, 2006; Sheng *et al.*, 2006; Kamat *et al.*, 2008). Cette virulence semble également dépendre du profil de composés volatiles produits, comme cela a été démontré sur les termites *Coptotermes formosanus* (Hussain *et al.*, 2010). De même que pour *B. brongniartii*, une seule étude rapporte l'isolement de *B. bassiana* à partir d'échantillons marins (Suresh et Chandrasekaran, 1999).

L'ensemble du genre *Beauveria* est connu pour produire un grand nombre de métabolites secondaires, dont la plupart ont été décrits à partir de *B. bassiana*, et les principaux sont détaillés ci-dessous et présentés dans la Figure 66.

Tout d'abord, le genre *Beauveria* est généralement producteur de la beauvéricine, un depsipeptide - peptide dont certaines liaisons peptidiques sont des esters - de structure cyclique (Figure 66), isolé initialement de *B. bassiana* et de *Paecilomyces fumoso-roseus* (Bernardini *et al.*, 1975; Ambrosino *et al.*, 2004). Cette molécule présente des activités biologiques diverses : elle inhibe la croissance de bactéries comme *Bacillus* spp. ou *Paenibacillus* spp. (Castlebury *et al.*, 1999), elle est cytotoxique pour différentes lignées cellulaires humaines (Calò *et al.*, 2004; do Nascimento *et al.*, 2012), d'insectes (Calo *et al.*, 2003), de rongeurs (Ferrer *et al.*, 2009), en induisant notamment les voies de l'apoptose avec fragmentation de l'ADN (Jow *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2005; Klarić *et al.*, 2008). La beauvéricine et certains de ses analogues présentent des activités insecticides, envers des larves du moustique *Aedes aegypti* (Grove et Pople, 1980; Gupta *et al.*, 1995) ou envers la mouche *Calliphora vomitoria* (Grove et Pople, 1980). La beauvéricine et la beauvéricine A sont également les agents responsables de l'activité antimalariale et antituberculeuse du champignon entomopathogène *Paecilomyces tenuipes* (Nilanonta *et al.*, 2000).

En parallèle de ces propriétés pharmacologiques intéressantes, la beauvéricine est considérée comme une mycotoxine. En effet, elle est également largement produite par des champignons du genre *Fusarium*, tels que *F. subglutinans*, *F. proliferatum* ou encore *F. oxysporum* (Logrieco *et al.*, 1998; Frisvad *et al.*, 2006), et appartient donc à la catégorie des fusariotoxines, au même titre que les trichotécènes, la zéaralénone, les fumosinines, les enniatines ou la fusarine C (Forget-Richard et Oswald, 2012). En Europe, les fusariotoxines représentent une préoccupation majeure pour les filières céréalières, car les céréales constituent un substrat privilégié pour la croissance de champignons producteurs de mycotoxines (Forget-Richard et Oswald, 2012). Certaines espèces de *Fusarium* productrices de beauvéricine sont ainsi capables d'infecter des grains de céréales telles que le maïs, le riz ou le blé (Prosperini *et al.*, 2012). La prévalence de cette molécule reste assez faible dans les céréales en provenance de régions froides ou tempérées, alors qu'elle est retrouvée en concentrations importantes dans le sud de l'Europe et au Maroc (Santini *et al.*, 2012). Cependant, très peu de données sont disponibles d'une part sur les facteurs influant la contamination des grains par *Fusarium* spp., et d'autre part et sur les effets toxiques aigus ou chroniques de la beauvéricine. Ainsi, à ce jour la beauvéricine est considérée comme une mycotoxine émergente, et sa présence n'est pas réglementée dans l'alimentation (Meca *et al.*, 2010b; Forget-Richard et Oswald, 2012).

Le genre *Beauveria* est également producteur de beauvériolides et beauvérolides, des cyclodepsipeptides isolés de souches de *B. bassiana* (Figure 66). Les beauvériolides I et III ont été particulièrement étudiés car ils présentent une activité anti-athéromateuse *in vivo* décrite comme très encourageante (Namatame *et al.*, 2004; Tomoda et Doi, 2007).

La ténelline, la bassianine et leurs dérivés sont des pigments de couleur jaune, appartenant à la classe des alcaloïdes de type 2-pyridone (Wat *et al.*, 1977), Figure 66. Cette classe de composés est produite par le genre *B. bassiana* ainsi que par d'autres champignons entomopathogènes du genre *Cordyceps* ou *Paecilomyces* (Jessen *et al.*, 2011). La ténelline a été rapportée comme étant le métabolite secondaire principal produit par *B. bassiana* (Halo *et al.*, 2008). Certains composés de type 2-pyridone présentent une activité de type neuritogène qui semble prometteuse pour le traitement de maladies neurodégénératives (Jessen *et al.*, 2011), mais cette activité n'a pas été démontrée spécifiquement pour la ténelline et la bassianine.

L'oosporéine a été rapportée comme étant le métabolite secondaire principal produit par *B. brongniartii*. Ce dimère de dihydroxyméthylparabenzoquinone (Figure 66) est un pigment rouge excrété par le champignon qui présente différentes activités telles qu'une inhibition de la croissance de certaines plantes (Cole *et al.*, 1974), ou encore des activités antifongiques (Nagaoka *et al.*, 2004; Mao *et al.*, 2010).

Dans cette partie, l'évaluation de la bio-activité d'extraits de la souche MMS1411, appartenant à l'espèce *B. brongniartii* et isolée de mollusques bivalves, sera confrontée à une étude chimique des métabolites produits.

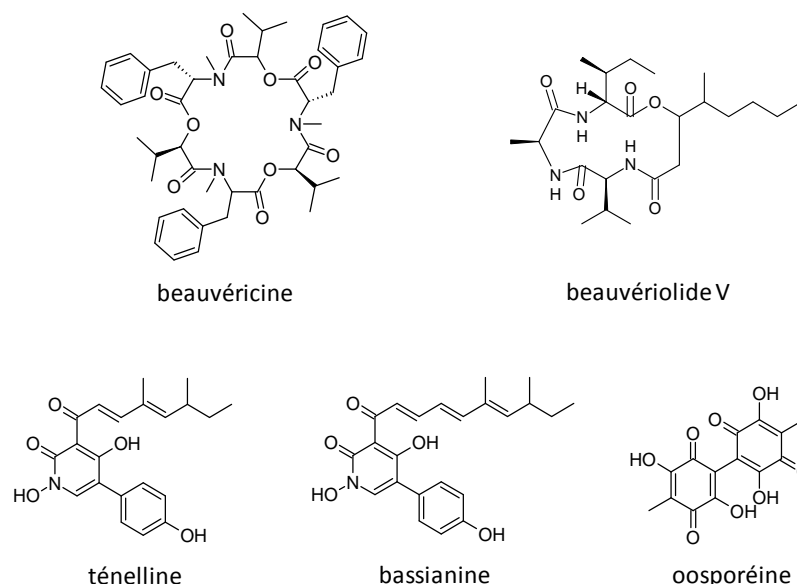


Figure 66 : Structure des principaux métabolites décrits dans le genre *Beauveria*

3.2. Matériel et méthodes

3.2.1. La souche MMS1411 : origine, description et identification

La souche MMS1411 a été isolée à partir d'échantillons de moules prélevées à Ars-en-Ré (Charente-Maritime).

Sur milieu DCA, le thalle qui se développe (Figure 67) est à bords non lisses, d'apparence laineuse, floconneuse, velouté à poudré, pouvant atteindre une épaisseur de 5 mm ; blanc dans un premier temps, il peut devenir jaunâtre ou rosâtre ; le verso du thalle peut être incolore, jaunâtre à orangé, parfois rougeâtre à pourpre ; le milieu de culture peut rester incolore, se colorer en rose-rouge ou en jaunâtre ; il n'y a pas d'observation d'exsudat. Les hyphes du mycélium sont hyalins, avec des parois lisses, mesurant de 1 à 4 μm de large, pouvant être rampants ou ascendants, portant de petits groupes de structures latérales orthotropiques ou légèrement plagiotropes qui en se ramifiant peuvent donner naissance à des phialides. L'appareil conidial est parfois concentré, mais le plus souvent les phialides sont disposées en petits groupes ou solitaires le long des hyphes (Figure 68). Elles peuvent être globuleuses ou en forme de flacon, avec une partie basale cylindrique. Les conidies sont hyalines, lisses, sphériques, avec parfois une base pointue, mesurant de 2 à 6 μm (De Hoog, 1972). L'identification finale a été réalisée par séquençage des régions ITS-1, ITS-2 et β -tubuline, et alignement avec les bases de données en ligne (GenBank, CBS), ce qui a permis d'identifier la souche MMS1411 comme appartenant à l'espèce *Beauveria brongniartii* (Saccardo) Petch.

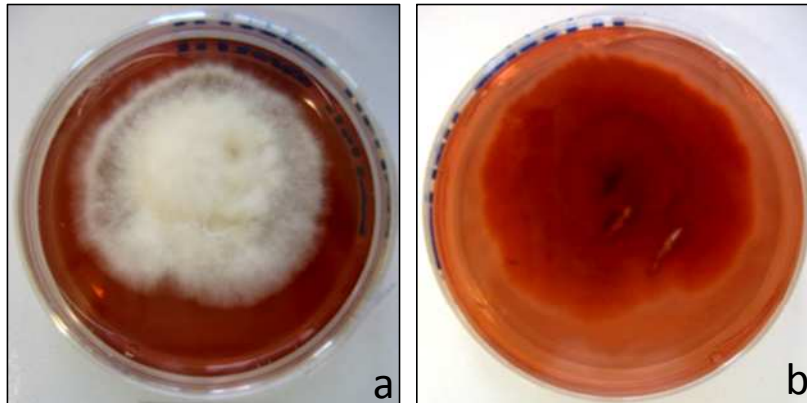


Figure 67 : Observation macroscopique du recto (a) et du verso (b) de la souche MMS1411 cultivée sur milieu DCA pendant 9 jours

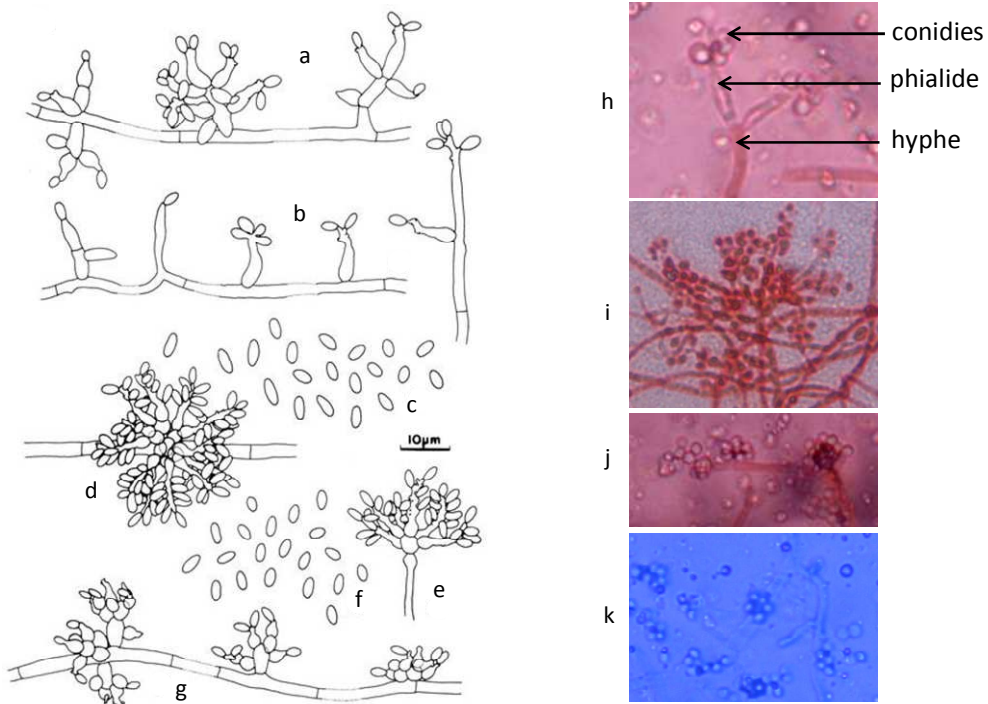


Figure 68 : Schéma de l'organisation des cellules conidiogènes et des spores de *Beauveria brongniartii* cultivée sur SDAY (dextrose agar yeast extract) (a-c) ou sur un insecte hôte (d-g) (Tzean *et al.*, 1997). Observation microscopique (x400) des structures de *Beauveria brongniartii* assurant la multiplication asexuée, coloration au rouge congo (h-j) et au bleu coton (k).

3.2.2. Culture, extraction, purification et fractionnement

La souche MMS1411 a été cultivée sur les 6 milieux YES, MES, CYA, MEA, DCA et PDA dont la composition est détaillée au Chapitre 4, Tableau 28. Les cultures ont été réalisées en triplicata dans des Erlenmeyers contenant 50 mL de milieu de culture solide. Les milieux ont été inoculés en trois points et incubés à 27°C pendant 26 j à la lumière naturelle.

Le milieu de culture a été co-extrait avec le mycélium afin d'inclure dans l'extrait les composés excrétés. Les cultures obtenues sur les 6 milieux ont ainsi été mises en contact successivement deux fois avec 100 mL d'un mélange dichlorométhane (DCM) /acétate d'éthyle 1:1 (v/v) puis broyées. Les macérats ont ensuite été soniqués pendant 30 min et laissés en contact durant une nuit. Après filtration sur Büchner, la phase organique a été déshydratée sur Na₂SO₄ anhydre. Les spores ont été éliminées de la solution par filtration sur cellulose régénérée de porosité 0,45 µm (Sartorius, Göttingen, Allemagne). La phase organique a été évaporée à sec pour donner un extrait brut.

Les six extraits obtenus ont ensuite été testés sur les différents modèles biologiques. L'extrait le plus actif sur cellules KB a été sélectionné pour poursuivre le processus de fractionnement et de dérégulation.

L'extrait repris dans le méthanol (MeOH) a ensuite été fractionné par chromatographie flash. Le fractionnement a été réalisé en phase normale, avec 64,3 mg d'extrait déposés sur une colonne prépackée de 4 g de silice de granulométrie 50 µm (Puriflash, Interchim). Les paramètres généraux ont été les suivants : débit de 7 mL.min⁻¹, volume collecté de 14 mL par tube, détection à 230 nm et 200-400 nm. Le système éluant était un gradient hexane/acétate d'éthyle puis DCM/MeOH (Tableau 41).

Ce fractionnement a permis l'obtention de 11 fractions, nommées fraction A à fraction K.

Tableau 41 : Paramètres du système éluant pour le fractionnement de l'extrait soluble de la souche MMS1411 en chromatographie flash

Temps (min)	Hexane / Acétate d'éthyle (%)	Dichlorométhane / Méthanol (%)
0	100/0	-
4	100/0	-
12	90/10	-
22	60/40	-
29	60/40	-
37	-	100/0
38	-	99/1
48	-	90/10
58	-	50/50
68	-	10/90
78	-	10/90
88	-	0/100
102	-	0/100

3.2.3. Bio-essais

La souche MMS1411 a été évaluée sur les trois types de bio-essais selon les protocoles décrits respectivement en Annexe 2, 4 et 9. Le MTT a été le colorant utilisé pour révéler la viabilité des cellules KB, et les tests ont été réalisés deux fois en duplicata. Le test d'activité sur larves de diptères a été réalisé en triplicata. Les tests antibactériens ont été réalisés en triplicata sur les espèces *E. coli*, *V. crassostreae*, *V. gigantis*, *V. mytili* et *V. rotiferianus*.

3.2.4. Analyse des données des tests

Le logiciel GraphPad (GraphPad Prism, version 5.0c, San Diego, USA) a été utilisé pour l'analyse des données obtenues pour le test de cytotoxicité et le test d'activité sur larves de diptères. Les courbes d'inhibition de croissance par rapport au témoin ont été modélisées en appliquant la régression non linéaire à quatre paramètres de type « HillSlope ».

3.3. Résultats et discussion

3.3.1. Rendements des cultures

Dans un premier temps, les rendements massiques des cultures de la souche MMS1411 sur les 6 milieux ont été comparés. Ces rendements sont exprimés en masse d'EB obtenue par Erlenmeyer et reportés dans le Tableau 42. Le milieu YES a présenté le rendement le plus important, et semble donc être le milieu le plus favorable pour la croissance de la souche MMS1411. Le remplacement de l'extrait de levure par de l'extrait de moule dans le milieu MES a donc semblé être moins favorable pour la production de métabolites, le rendement étant passé respectivement de 173,1 mg à 98,9 mg entre les milieux YES et MES. Le rendement de ce milieu MES reste cependant bien plus intéressant que celui des milieux MEA, DCA, PDA et CYA, ce dernier étant le moins propice pour l'obtention d'une masse extractible importante.

Tableau 42 : Rendements de la souche MMS1411 cultivée sur les 6 milieux.

Milieu de culture	Masse totale d'EB (mg)	Nombre d'Erlenmeyers ensemencés	Rendement (mg EB / Erlenmeyer)
YES	519,3	3	173,1
CYA	49,8	3	16,6
MES	296,6	3	98,9
MEA	73,2	3	24,4
DCA	87,2	2	43,6
PDA	123,4	3	41,1

3.3.2. Activités biologiques des extraits bruts

3.3.2.1. Test de cytotoxicité sur cellules KB

Les différents extraits bruts obtenus sur les 6 milieux ont été testés sur cellules KB (Figure 69). Les extraits YES et DCA ont présenté des CI_{50} de $1,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ($\pm 0,7$) pour l'extrait YES et de $2,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ($\pm 1,3$) pour l'extrait DCA. A l'échelle d'extraits bruts, sans étape de purification préalable, ces valeurs révèlent donc des activités assez importantes. Les extraits CYA, MES, MEA et PDA ont présenté des valeurs de CI_{50} plus élevées, mais qui restent néanmoins dans un ordre de grandeur intéressant pour des extraits bruts : $6,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ($\pm 1,1$) pour CYA ; $5,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ($\pm 0,8$) pour MES ; $10,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ($\pm 2,1$) pour MEA et $13,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ($\pm 1,9$) pour PDA.

Il est également important de noter que la dilution de l'extrait YES n'a pas permis d'atteindre la valeur de 100% de viabilité cellulaire, même pour des concentrations relativement faibles (50 ng.mL^{-1}). Il apparaît donc que cet extrait brut renferme un ou des composés présentant un fort potentiel de cytotoxicité. L'extrait DCA a semblé présenter cette même caractéristique, mais n'a pas été testé à des concentrations aussi faibles que l'extrait YES.

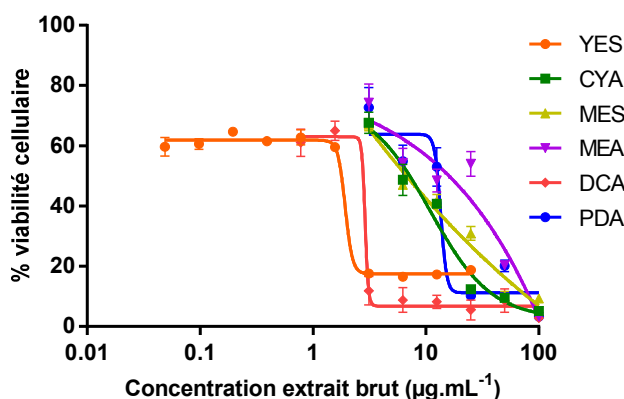


Figure 69 : Evaluation de la cytotoxicité sur cellules KB d'extraits bruts de la souche MMS1411 cultivée sur milieux YES, CYA, MES, MEA, DCA et PDA.

3.3.2.2. Test d'activité sur larves d'insectes

Les 6 extraits bruts de la souche MMS1411 ont été injectés aux larves de diptères à la concentration de 100 mg.mL^{-1} . Aucune immobilisation, paralysie ou état amorphe n'a pu être observée, pour aucun des extraits. Cette souche de *Beauveria brongniartii* ne semble donc pas produire de composés bio-actifs détectables par le bio-essai sur larves.

Cette absence d'activité sur un modèle d'insecte peut sembler surprenante, étant donné que cette souche est

entomopathogène et que la beauvéricine, connue pour être communément produite par *B. brongniartii*, présente des activités insecticides. Cependant, il est important de rappeler que ce test sur larves de diptères est un test réalisé sur un temps très court (10 min d'observation), et est donc à considérer comme un test de toxicité aiguë. Or, en milieu naturel l'infestation d'insectes par des spores de *Beauveria* sp. se fait sur plusieurs jours, ce qui en outre assure au champignon une bonne dissémination dans l'espace grâce au déplacement des insectes. Dans la littérature, les protocoles développés pour étudier la virulence de souches de *B. brongniartii* sont d'ailleurs réalisés sur un laps de temps assez long : par exemple, Dolci *et al.* (2006) ont disséminé des spores de *B. brongniartii* dans un verger infecté par le hanneton *Melolontha melolontha*, via des grains de seigle infestés par le champignon. La population de larves de hanneton a alors été suivie sur 2 ans, ce qui a montré que son effectif avait bien été affecté par la présence du champignon dans le sol. Les autres protocoles d'étude de l'activité insecticide de la beauvéricine ont consisté à placer des larves du moustique *Aedes aegypti* dans une solution contenant la beauvéricine (Gupta *et al.*, 1995) ou encore d'injecter une solution de beauvéricine à des mouches adultes *Calliphora vomitoria* puis d'évaluer la mortalité des insectes sur 24 ou 48 h. Ces tests se déroulant sur un temps beaucoup plus long que celui développé dans ce travail, les résultats sont donc difficilement comparables. Concernant un des modes d'action de la beauvéricine, il a été rapporté qu'elle induisait le blocage de canaux calciques de type L dans des cellules de neurones (Wu *et al.*, 2002). Dans le Chapitre 3, les molécules antagoniste (nifédipine) et agoniste (+/- Bay K8644) de ce type de canal n'ont malheureusement pas pu être testées à cause d'un problème de solubilisation (Tableau 11), ce qui fait qu'à ce stade il n'est pas possible de conclure sur la détectabilité de la beauvéricine par le test larve.

3.3.2.3. Tests d'activité antibactérienne

Les 6 extraits bruts de la souche MMS1411 ont également été testés sur des bactéries, uniquement de type gram-négatif. Les activités les plus importantes ont été retrouvées avec les milieux DCA et PDA, et sur la souche bactérienne *Vibrio rotiferianus* (Tableau 43 et Annexe 14). Il peut également être noté qu'en tenant compte de l'ensemble des tests antibactériens réalisés dans cette étude, la plus forte activité est retrouvée pour cette souche MMS1411, cultivée sur DCA et testée contre *V. rotiferianus*.

Tableau 43 : Evaluation de l'activité antibactérienne de la souche MMS1411 cultivée sur 6 milieux différents

Bactérie	CE ₅₀ (µg.mL ⁻¹)																	
	MES			YES			CYA			MEA			DCA			PDA		
	Inhibit	Ralent.	Retard	Inhibit	Ralent.	Retard	Inhibit	Ralent.	Retard	Inhibit	Ralent.	Retard	Inhibit	Ralent.	Retard	Inhibit	Ralent.	Retard
<i>V. crassostreae</i>	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	54,5	>100	>100	40,3	>100	>100	51,1
<i>V. gigantis</i>	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	96,5	50,0	>100	82,2	36,3	>100	99,2	46,6
<i>V. mytili</i>	>100	>100	>100	-	-	-	>100	>100	>100	-	-	-	>100	93,4	31,1	>100	>100	36,9
<i>V. rotiferianus</i>	>100	>100	88,5	-	-	-	>100	>100	>100	-	-	-	23,1	22,8	19,1	25,5	28,7	23,8
<i>E. coli</i>	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100

A notre connaissance, aucune étude n'a rapporté d'activité antibactérienne pour un extrait brut de *Beauveria brongniartii*, à l'inverse de *B. bassiana*, dont des extraits se sont montrés actifs sur diverses bactéries comme *Micrococcus luteus*, *Streptococcus aureus*, *Bacillus aureus* ou encore *E. coli* (Sahab, 2012).

Parmi les différents métabolites décrits dans le genre *Beauveria*, seule la beauvéricine semble présenter des activités antibactériennes notoires. Elle a en effet été décrite comme active sur un grand nombre de bactéries à la fois gram-positif et gram-négatif, telles que *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Agrobacterium tumefaciens*, *E. coli* ou encore *Paenibacillus macerans* (Castlebury *et al.*, 1999; Meca *et al.*, 2010a; Xu *et al.*, 2010)

Il pourrait donc être supposé que les activités antibactériennes observées ici soient induites par la présence de beauvéricine dans les extraits. Cependant, comme il sera vu dans la suite de l'étude, l'extrait YES de la souche MMS1411 semble contenir des composés reliés à la série des beauvéricines, or aucune activité antibactérienne n'a été retrouvée pour cet extrait testé sur trois bactéries. Il semblerait donc que la beauvéricine soit en concentration trop faible dans l'extrait YES pour induire une activité ou qu'elle ne soit pas responsable de l'activité des extraits DCA ou PDA, ou encore qu'elle ne soit pas active sur les souches de bactéries marines testées. Ces hypothèses seront à confirmer dans le futur, par mise en place d'un fractionnement bio-guidé.

3.3.3. Fractionnement par chromatographie flash

L'extrait brut obtenu sur le milieu YES ayant montré une des activités les plus importantes sur cellules KB, ainsi que le rendement d'extraction le plus intéressant, il a été sélectionné pour la suite de l'étude. L'extrait YES a ainsi été fractionné sur colonne de silice en phase normale, avec un dépôt de 65,3 mg et une élution par un gradient de polarité croissante utilisant les deux systèmes de solvants consécutifs hexane/acétate d'éthyle et DCM/MeOH. La masse de chaque fraction obtenue après évaporation est donnée Tableau 44. Un total de 71 mg de fractions est récupéré, soit un rendement de 109%. Il sera important de réaliser un nouveau fractionnement en triplicata, afin de vérifier sa reproductibilité.

Tableau 44 : Répartition des masses de chaque fraction obtenue par chromatographie flash

Fraction	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
Masse (mg)	1,7	2,9	3,3	4,3	21,2	11,1	10,5	8,4	4,5	1,0	2,1
Pourcentage	2,4	4,1	4,6	6,1	29,9	15,6	14,8	11,8	6,3	1,4	3,0

3.3.4. Activité biologique des fractions sur cellules KB

L'activité cytotoxique des 11 fractions a ensuite été évaluée. Il est apparu que les fractions C, D et E présentaient la plus forte cytotoxicité (Figure 70a). Les CI_{50} obtenues pour les fractions B, C, D, E et K (Figure 70b) étaient respectivement de $6,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ($\pm 2,3$); $1,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ($\pm 0,8$); $0,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ($\pm 0,3$); $0,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ($\pm 0,3$) et $1,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ($\pm 1,1$). Les fractions A, F, G, H, I et J présentées sur la Figure 70b ont induit une cytotoxicité moins importante que les autres, avec des CI_{50} difficilement calculables par le modèle de HillSlope du logiciel GraphPad (Prism). Cependant il est intéressant de noter qu'aux plus faibles concentrations testées, certaines des fractions considérées comme les moins actives induisaient toujours une inhibition de croissance autour de 40-50% (Figure 70b). Par exemple, malgré des dilutions successives, les fractions G, I et J n'ont vu leur activité ne diminuer que légèrement, semblant indiquer une absence de relation dose/effet. Ainsi, si les fractions C, D et E semblent renfermer des composés présentant une cytotoxicité importante alors les fractions G, I et J pourraient renfermer des composés agissant à faible concentration mais avec un ou des mécanismes d'action faiblement toxiques pour les cellules. Ces composés pourraient être responsables du fait que, même à la plus faible concentration testée (50 ng.mL^{-1}), les extraits bruts YES et DCA induisent toujours 40% d'inhibition de la viabilité cellulaire (Figure 69).

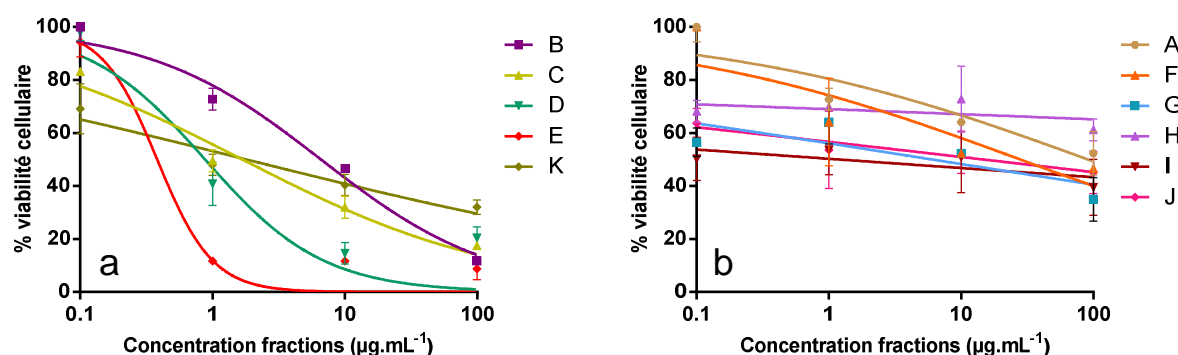


Figure 70 : Evaluation de la cytotoxicité sur cellules KB des 11 fractions de la souche MMS1411 obtenues par fractionnement sur chromatographie flash.

3.3.5. Déréplication des fractions cytotoxiques

Les trois fractions ayant présenté la plus forte activité (C, D et E) ont, dans un travail réalisé en parallèle à cette thèse, été analysées par couplage CLHP-SM à l'aide de deux spectromètres de masse complémentaires : un spectromètre haute résolution à source électrospray et détecteur à temps de vol (Q-TOF, Agilent) pour l'analyse de la composition des fractions, et un spectromètre basse résolution à source électrospray et détecteur à trappe ionique (LCQ, ThermoFisher Scientific) pour réaliser l'analyse structurale par fragmentation SM^n de certaines molécules ciblées.

Sur la Figure 71a, il est intéressant de constater que notamment deux groupes homogènes d'ions étaient remarquables, un premier autour de 400-600 Da (cercle rouge, groupe I), et un second autour de 800 Da (cercle bleu, groupe II), groupes renfermant les composés les plus abondants (Figure 71b).

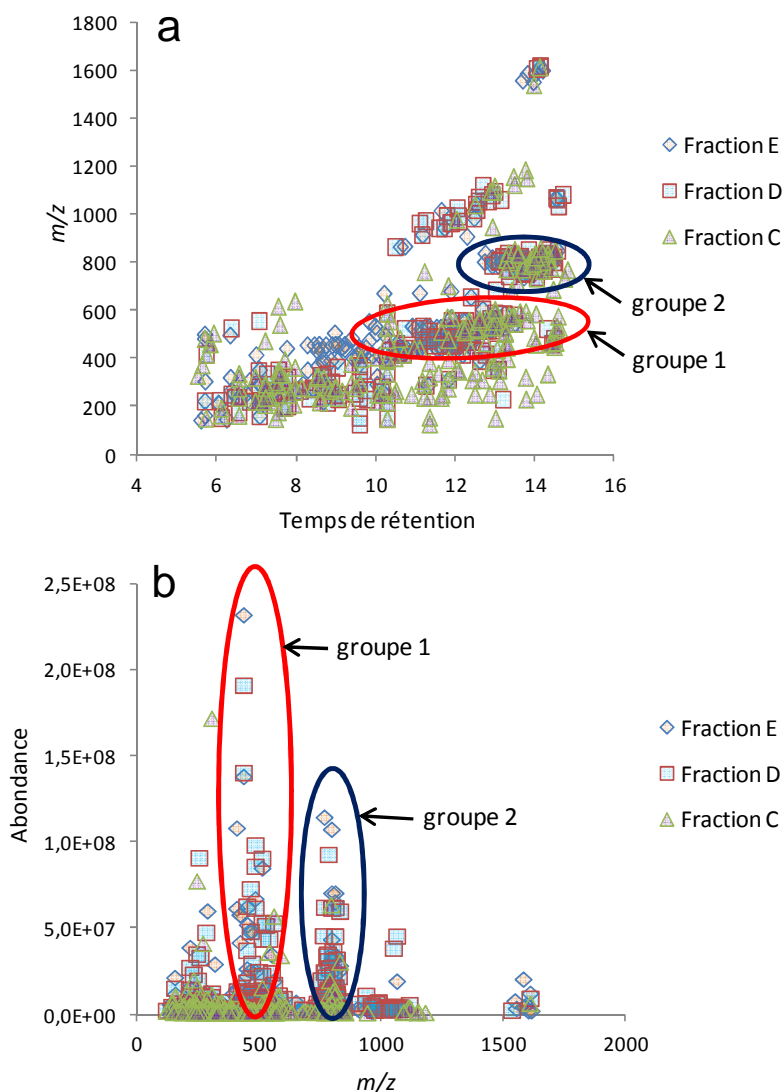


Figure 71 : Analyses CLHP-SM sur spectromètre Q-TOF des fractions C, D et E. Chromatogramme représentant les ions majoritaires détectés (m/z) en fonction du temps de rétention (a) et spectre de masse représentant l'abondance des ions détectés dans la totalité des fractions en fonction de leur m/z (b).

Comme il a été vu précédemment, les micromycètes du genre *Beauveria* sont connus pour produire des molécules bio-actives telles que les beauvéricines, les beauvériolides ou encore les beauvérolides. Dans la série des beauvéricines on retrouve des composés présentant une masse comprise autour de 800 Da, et dans la série des beauvériolides des composés dont la masse est comprise entre 400 et 600 Da

(beauvériolides et beauvérolides). Tous ces composés étant des cyclopeptides, ils ont été étudiés plus en détail par fragmentation SMⁿ, méthode permettant aisément de mettre en évidence des séquences peptidiques. Après comparaison avec les données de la littérature, les résultats de ce travail mené sur la fraction E ont permis de mettre en évidence la présence de plusieurs molécules appartenant à ces séries de depsipeptides à synthèse non ribosomale (Tableau 45).

Tableau 45 : Bilan des ions [M+Na]⁺ retrouvés au cours du travail de déréplication et comparaison avec des données de la littérature.

Ions [M+Na] ⁺ observés	Ions [M+H] ⁺ calculés	Masse monoisotopique (Da)	Métabolite	Organisme d'origine	Références
420,3	398,3				
434,2	412,2	411,273	Beauverolide S	<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	Jegorov <i>et al.</i> , 2006
448,3	426,3	425,289	Beauveriolide IV	<i>Beauvaria</i> sp. FO-6979	Matsuda <i>et al.</i> , 2004
462,3	440,3	439,305	Beauveriolide V	<i>Beauvaria</i> sp. FO-6979	Matsuda <i>et al.</i> , 2004
462,3	440,3	439,305	Beauveriolide VI	<i>Beauvaria</i> sp. FO-6979	Matsuda <i>et al.</i> , 2004
476,3	498,3				
492,3	541,3				
496,3	474,3	473,289	Beauveriolide VII	<i>Beauvaria</i> sp. FO-6979	Matsuda <i>et al.</i> , 2004
510,3	488,3	487,305	Beauveriolide I	<i>Beauvaria</i> sp.	Mochizuki <i>et al.</i> , 1993
510,3	488,3	487,305	Beauveriolide III	<i>Beauvaria</i> sp. FO-6979	Namatame <i>et al.</i> , 1999
510,3	488,3	487,305	Beauverolide H	<i>Beauvaria bassiana</i>	Elsw orth et Groove, 1980
524,3	502,3	501,320	Beauverolide D	<i>Beauvaria bassiana</i>	Elsw orth et Groove, 1980
538,3	516,3	515,336	Beauverolide Ea	<i>Beauvaria bassiana</i>	Elsw orth et Groove, 1980
538,3	516,3	515,336	Beauverolide E	<i>Beauvaria bassiana</i>	Elsw orth et Groove, 1980
538,3	516,3	515,336	Beauveriolide II	<i>Beauvaria</i> sp.	Mochizuki <i>et al.</i> , 1993
552,4	530,4	529,352	Beauverolide A	<i>Beauvaria bassiana</i>	Elsw orth et Groove, 1980
566,4	544,4	543,367	Beauverolide Ba	<i>Beauvaria bassiana</i>	Elsw orth et Groove, 1980
566,4	544,4	543,367	Beauverolide B	<i>Beauvaria bassiana</i>	Elsw orth et Groove, 1980
586,3	564,3	563,336	Beauverolide F	<i>Beauvaria bassiana</i>	Elsw orth et Groove, 1980
586,3	564,3	563,336	Beauverolide Fa (= Beauveriolide IX)	<i>Beauvaria bassiana</i>	Elsw orth et Groove, 1980
778,3	756,3	756,400	Beauvéricine G2	<i>Beauvaria bassiana</i>	Xu <i>et al.</i> , 2007
792,4	770,4	770,400	Beauvéricine D	<i>Beauveria</i> sp. FKI-1366	Fukuda <i>et al.</i> , 2004
792,4	770,4	770,400	Beauvéricine G1	<i>Beauvaria bassiana</i>	Xu <i>et al.</i> , 2007
806,5	784,5	784,400	Beauvéricine	<i>Beauvaria bassiana</i>	Gupta <i>et al.</i> , 1995
820,3	798,3	798,400	Beauvéricine A	<i>Beauvaria bassiana</i>	Gupta <i>et al.</i> , 1995
820,3	798,3	798,400	Beauvéricine F	<i>Beauveria</i> sp. FKI-1366	Fukuda <i>et al.</i> , 2004
828,3	806,3				
838,3	816,3	838,400	Beauvéricine H3	<i>Beauvaria bassiana</i>	Xu <i>et al.</i> , 2007
846,4	824,4				
852,5	830,5				
864,6	842,6				

Dans le groupe I, une série de 13 ions dont 8 présentant des *m/z* différants de 14 Da entre eux a été observée (1^{ère} partie du Tableau 45). Parmi ceux-ci 10 ions présentaient des formules brutes identiques à celles de beauvériolides ou beauvérolides (lignes vertes et oranges). Seul l'ion le plus abondant a pu être analysé par fragmentation SMⁿ. Cela a permis de mettre en évidence différents de ses éléments structuraux, à savoir sa nature tripeptidique cyclique, la présence d'une lactone ainsi que la présence d'un résidu acide gras à 9 carbones, ces trois éléments étant caractéristiques des beauvériolides/beauvérolides. Cet ion de *m/z*

462,3 ($[M+Na]^+$) a ainsi été identifié comme pouvant être un des beauvériolides V ou VI (1^{ère} partie du Tableau 45, lignes vertes), ces deux isomères différant par la présence d'un acide aminé de type leucine ou *Allo*-isoleucine, de même masse (Figure 72). L'appartenance de 8 ions à une même série $M+(CH_2)^n$ permet de conclure que ces 8 molécules détectées font partie de la série des beauvériolides (1^{ère} partie du Tableau 45, lignes oranges), dont trois qui pourraient correspondre à de nouveaux analogues différant des structures connues par la présence supplémentaire d'un groupement méthyle (1^{ère} partie du Tableau 45, lignes jaunes).

Dans le groupe II, 5 ions (m/z 778,3 ; 792,4 ; 806,5 ; 820,3 et 838,3, 2^{ème} partie du Tableau 45 lignes oranges et verte) observés par analyse CLHP-QTOF peuvent correspondre aux adduits sodium $[M+Na]^+$ de beauvéricines déjà décrites. L'ion de m/z 806,5, très majoritaire dans la fraction E, a révélé posséder une séquence peptidique identique à celle de la beauvéricine (Figure 72). Seul cet analogue a pu être identifié (2^{ème} partie du Tableau 45, ligne verte), les autres étant en trop faible abondance pour pouvoir être analysés avec certitude, tout comme 5 autres molécules de cette série dont la présence concomitante et les masses calculées semblent indiquer qu'il s'agirait de dérivés cyclopeptidiques non décrits dans la littérature (2^{ème} partie du Tableau 45, ligne jaune).

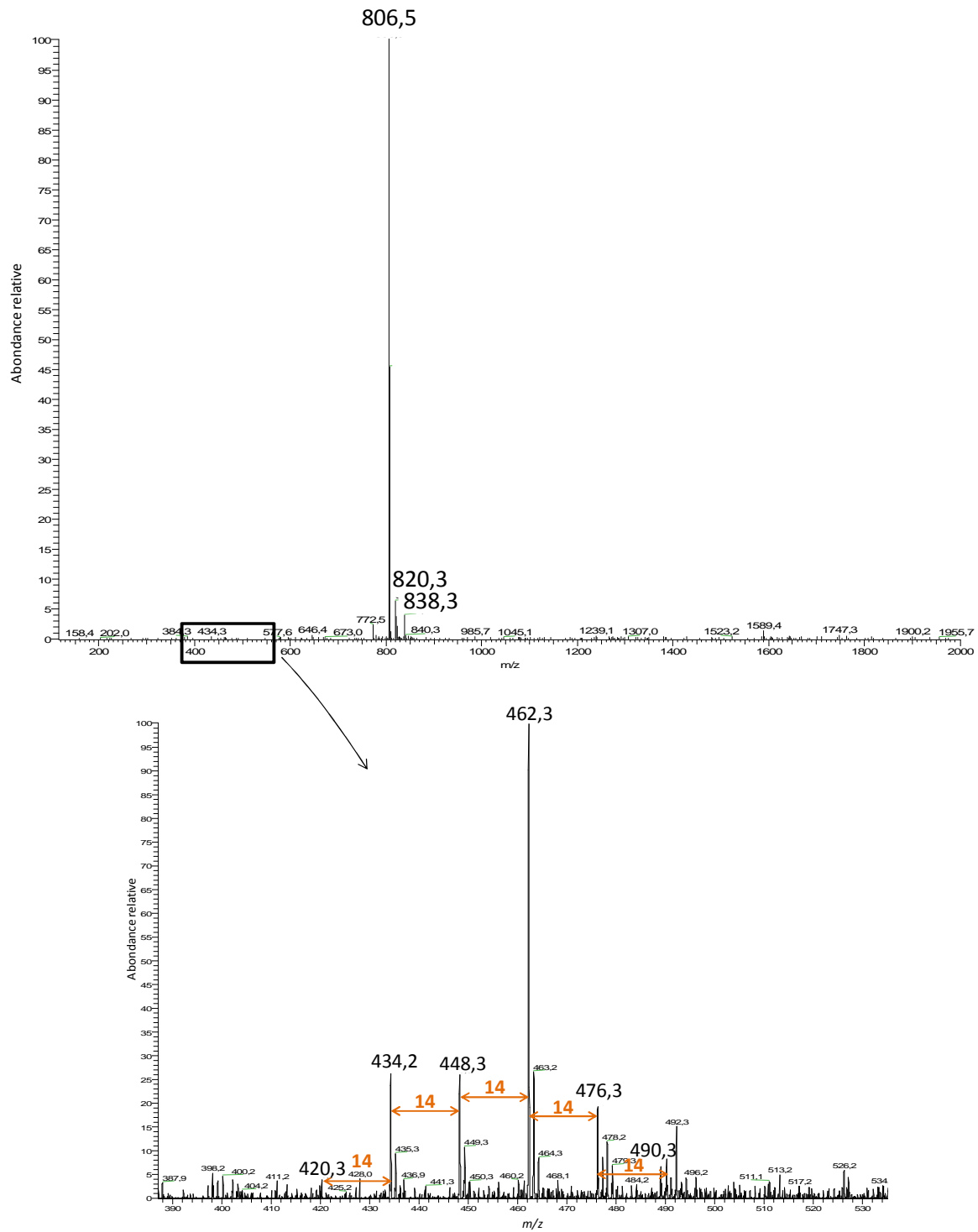


Figure 72 : Spectres de masse obtenus avec le LCQ pour la fraction E et représentant les ions $[M+Na]^+$. L'ion majoritaire de m/z 806,5 correspond à la beauvéricine. Zoom sur la partie du spectre correspondant potentiellement à la série des beauvériolides et des beauvérolides.

4. Conclusion du chapitre

Dans ce chapitre, les différents tests biologiques ont démontré la présence d'un ou plusieurs composés bio-actifs dans des extraits du dinoflagellé *V. rugosum* et du micromycète issu du milieu marin *B. brongniartii*.

Concernant *V. rugosum*, le test de cytotoxicité et le test larve ont permis de mettre en évidence que cette micro-algues produisait des métabolites bio-actifs autres que la PnTX-G. Le fractionnement d'un extrait brut de *V. rugosum*, l'évaluation biologique sur cellules KB des différentes fractions ainsi que la dérégulation de la fraction la plus active, ont fait ressortir que trois composés pouvaient potentiellement être responsables de l'activité des extraits et fractions. Cependant, leur identification reste à ce jour hautement hypothétique et nécessite de plus amples investigations. Si cette identification n'était pas confirmée, il se pourrait que l'on se trouve en présence d'un ou plusieurs composés bio-actifs non encore décrits. Les travaux se poursuivent actuellement au laboratoire afin d'identifier ce ou ces composés.

Concernant *B. brongniartii*, les tests biologiques et notamment le test sur cellules KB a démontré sa capacité à détecter une activité dans des extraits bruts produisant potentiellement des composés classés comme toxines émergentes, tels que la série des beauvéricines. Il semble en effet que des beauvéricines, des beauvériolides et des beauvérolides soient présents dans la fraction E de *Beauveria brongniartii* cultivée sur milieu YES. La beauvéricine étant connue pour être fortement cytotoxique, elle pourrait donc être à l'origine de l'activité de la fraction E sur cellules KB, mais également potentiellement des activités antibactériennes. Ces résultats seront à confirmer en purifiant les composés bio-actifs dans les différentes fractions. Si cela était avéré, ce serait le premier exemple de production de beauvéricines par un champignon isolé du milieu marin. Le même raisonnement que celui tenu précédemment avec la patuline pourrait être appliqué à la beauvéricine : cette molécule, produite par un champignon isolé de coquillages, pourrait donc potentiellement s'accumuler dans certains mollusques bivalves. Cependant, le risque pour la santé des consommateurs serait *a priori* beaucoup moins marqué que pour la patuline : la beauvéricine est connue pour être cytotoxique, mais il existe très peu de données sur sa toxicité aiguë, et cette molécule n'est donc pas réglementée même si sa présence est parfois avérée dans des céréales. Etant donné qu'aucune intoxication humaine par la beauvéricine n'a été rapportée, et que cette molécule présente des activités cytotoxiques importantes, certains auteurs ont envisagé de la valoriser en thérapie anticancéreuse (Wang et Xu, 2012). Cependant, sa nature peptidique, sa forte lipophilie, et le fait qu'elle viole quatre des cinq règles de Lipinsky sont des freins importants à ce type de développement. Enfin, il serait intéressant de chercher à isoler les molécules détectées comme de potentiels analogues originaux de ces depsipeptides, afin d'en établir la structure et de tester leur activité biologique sur les trois bioessais utilisés dans ce travail.

Conclusions et Perspectives

Les mollusques bivalves peuvent accumuler dans leur glande digestive des toxines produites par certaines micro-algues dont ils se nourrissent. Si les concentrations en toxines atteignent un certain seuil dans les coquillages, cela peut entraîner des phénomènes d'intoxication chez l'homme après consommation de ces fruits de mer contaminés. Afin de préserver la santé de leurs consommateurs, il est donc nécessaire d'évaluer la salubrité de ces bivalves. Ceci est réalisé grâce à la surveillance d'un certain nombre de toxines, et la réglementation de leur concentration. Ainsi, les toxines lipophiles connues sont à ce jour recherchées par techniques physico-chimiques, qui ont remplacé le test de toxicité aiguë sur souris (TS) depuis le 1^{er} janvier 2010 car ce test était largement décrié notamment pour des raisons éthiques et méthodologiques. Des toxines encore inconnues ou de nouveaux analogues de toxines connues - regroupés sous le terme de toxines émergentes - et produits par des micro-algues ou d'autres types d'organismes marins, peuvent également potentiellement contaminer les bivalves. La surveillance de l'apparition de ces phénomènes se fait toujours par utilisation du TS. Cependant, de par les inconvénients qu'il présente, son utilisation pour surveiller l'apparition de toxines émergentes n'est sans doute pas durable.

Dans ce contexte, l'objectif principal de ce travail de thèse visait à évaluer une suite de bio-essais pour la détection de composés lipophiles bio-actifs issus de micro-organismes marins, plus particulièrement de micro-algues marines et de micromycètes isolés de zones conchylicoles, dans le but à plus long terme de remplacer le test souris. Ces bio-essais consistaient en un test de cytotoxicité sur cellules KB, un test d'activité sur larves de diptères et un test d'activité antibactérienne sur différentes bactéries d'origine marine. Le choix d'une suite de bio-essais plutôt qu'un unique test de détection s'est fait en partant du principe que les toxines marines émergentes peuvent présenter des mécanismes d'action très divers, et qu'une suite de tests basés sur des mécanismes différents permettrait une détection plus large de toxines. Ainsi, le test de cytotoxicité sur cellules KB a été choisi car de nombreuses toxines ont déjà été décrites comme présentant des activités cytotoxiques sur diverses lignées cellulaires. Le test d'activité sur larves de diptères a été choisi car il est capable de détecter des composés neuro-actifs, et certaines toxines ont été rapportées comme induisant des effets neurologiques sur des modèles de mammifères. Enfin, le test d'activité antibactérienne sur bactéries marines a été ajouté aux deux précédents, afin de compléter le panel par un test pouvant détecter des mécanismes d'action très différents.

Evaluation de la suite de bio-essais pour la détection et l'étude de toxines lipophiles

Le Tableau 46 résume l'ensemble des résultats obtenus avec les trois tests utilisés pour la détection de différents modèles d'organismes toxiques : extraits bruts de micro-algues et de micromycètes, et toxines purifiées.

Le test de cytotoxicité a présenté des résultats assez cohérents concernant l'activité des extraits bruts de micro-algues et micromycètes connus pour produire des toxines réglementées ou non, ainsi que pour les toxines lipophiles pures, à l'exception de la pinnatoxine G qui s'est révélée inactive sur ce test. Le principal inconvénient de ce test est l'effet de matrice que peuvent induire les extraits de

moules.

Le bio-essai sur larves de diptères, de même que le test de cytotoxicité, a présenté une détection satisfaisante des extraits bruts de micro-algues et de micromycètes connus pour produire des toxines, sauf dans le cas de *Beauveria brongniartii*. Contrairement à l'extrait d'*Azadirachta indica*, l'azadirachtine-1 pur n'a pas induit d'activité sur ce test. En revanche, l'acide okadaïque a été détecté à des niveaux intéressants. Ces résultats sont donc complémentaires à ceux du test de cytotoxicité concernant les toxines réglementées, ce qui est une conclusion très encourageante pour la poursuite du développement de cette suite d'essais. Le périmètre fin de détection de ce test a été ébauché, et présente également des résultats intéressants, car certains symptômes observés chez les larves se sont montrés discriminants d'un mécanisme d'action particulier. Cependant, ces essais ont été réalisés avec des molécules pures, et les résultats observés pour des extraits bruts de micro-algues ou de micromycètes connus pour contenir des toxines ou des molécules actives laissent présager une difficulté dans leur interprétation, les principaux effets observés ont été peu discriminants, de type immobilité, état amorphe ou paralysie. Il sera en plus nécessaire d'évaluer des toxines en mélanges, afin d'étudier d'éventuels effets additifs, synergiques ou antagonistes et voir si la symptomatologie reste discriminante même en présence d'un mélange de composés.

Les tests antibactériens n'ont montré que peu de résultats positifs pour les extraits bruts de micro-algues toxiques, ce qui semble démontrer que les toxines lipophiles de micro-algues ne jouent sans doute pas un rôle écologique de défense de ces organismes contre des bactéries marines. Du point de vue de la surveillance stricte de l'émergence de nouvelles toxines de micro-algues, ce test peut donc ne pas sembler avoir sa place aux côtés des deux tests précédents. Cependant, un certain nombre d'extraits de champignons isolés de bivalves ayant présenté une activité sur ces bactéries marines. Ce test pourrait donc donner une indication sur la présence potentielle de composés bio-actifs de type fongique plutôt que de type algal, ce qui justifierait de l'inclure tout de même en tant que troisième test.

En compilant les différents résultats obtenus (Tableau 46, 4^{ème} colonne), il ressort que tous les extraits de micro-organismes ou les toxines pures testées, et qui représentent un risque sanitaire défini les consommateurs de mollusques bivalves (Tableau 46, 4^{ème} colonne), sont détectés par au moins un des trois tests. En revanche, les extraits de micro-algues non toxiques n'ont donné aucun résultat positif quel que soit le test utilisé. De la même façon, toutes les micro-algues toxiques, ou toxines algales ou fongiques connues qui pourraient être détectées par le TS (Tableau 46, 5^{ème} colonne), ont donné un résultat positif sur au moins un des tests étudiés, à l'exception de la pinnatoxine G.

Par contre, les échantillons de moules d'Arcachon ayant induit des toxicités atypiques sur souris non encore élucidées, et dont le risque sanitaire pour l'homme reste inconnu, ont donné des résultats négatifs sur les trois tests utilisés. Ceci pourrait être dû à la présence de molécules possédant, de la même façon que la pinnatoxine G, un mécanisme d'action non détectable par ces tests. Néanmoins, la toxicité réelle pour l'homme de ces extraits n'est pas avérée, et reste à vérifier.

Ainsi, ces bio-essais étant plus simples à mettre en œuvre, moins consommateurs d'extraits et ne nécessitant pas de manipulation de mammifères vivants, au vu de l'ensemble de ces résultats, un protocole est proposé pour leur utilisation.

Proposition d'une démarche de détection des molécules toxiques dans les mollusques bivalves par utilisation d'une suite de bio-essais

Tous les extraits actifs sur au moins un test, ont induit une activité sur le test de cytotoxicité (Tableau 46, colonnes 1 et 3). Ainsi, il semble que le test de cytotoxicité soit le test le plus général de cette suite d'essais, en donnant une indication sur la présence d'un composé actif et potentiellement toxique. Un arbre décisionnel a donc été construit sur la base de ces résultats, et constitue une proposition de démarche à suivre pour l'utilisation de ces tests (Figure 73).

Perspectives

Cette étude a montré l'intérêt de l'utilisation de tests biologiques pour la détection de composés toxiques contaminant les bivalves, et ouvre différentes perspectives :

- rechercher les molécules responsables des activités observées sur cellules KB et sur larves de diptères pour *Vulcanodinium rugosum*, cette étude ayant montré que la pinnatoxine-G, bien que présente, n'était pas responsable de ces activités,
- rechercher les molécules responsables de la toxicité sur larves d'*Azadinium spinosum*, cette toxicité ne semblant pas liée à la présence de l'azaspiracide-1,
- étudier les activités antibactériennes des micromycètes sur bactéries marines, dans un objectif de valorisation potentielle des molécules actives,
- rechercher des mycotoxines comme la patuline ou l'acide pénicillique dans les bivalves pour estimer le risque potentiel engendré par ces molécules,
- continuer à développer la suite d'essais en recherchant un test permettant de combler les lacunes de détection des tests étudiés ici par rapport au test souris (pinnatoxine-G, toxicités atypique d'Arcachon).

Tableau 46 : Bilan des résultats obtenus avec les différents extraits bruts et toxines pures évalués sur les trois bio-essais, et comparaison avec les données du tes de toxicité aigüe sur souris.

		Test de cytotoxicité sur cellules KB	Test d'activité sur larves de diptères	Test d'activité antibactérienne	Détection d'une activité par au moins un des 3 tests (en l'état actuel des essais)	Test de toxicité aigüe sur souris (injection i.p.)*	Risque sanitaire pour les consommateurs de mollusques bivalves*
Micro-algues productrices de toxines réglementées dont la symptomatologie est connue	<i>Prorocentrum lima</i>	+	+	-	+	+	+
	Acide okadaïque	+	+	nt	+	+	+
	<i>Azadinium spinosum</i>	+	+	+	+	+	+
	Azaspiracide-1	+	-	nt	+	+	+
Micro-algues productrices de toxines réglementées dont la symptomatologie est peu connue	<i>Vulcanidium rugosum</i>	+	+	-	+	+	inconnu
	Pinnatoxin G	-	-	nt	-	+	inconnu
	<i>Alexandrium ostenfeldii</i>	+	+	-	+	pas d'information	inconnu
	Spirolides	nt	nt	nt	nt	+	inconnu
Phycotoxines pures non réglementées	Yessotoxine	+	nt	nt	+	+	inconnu
	Pecténotoxine-2	+	nt	nt	+	+	inconnu
Micro-algues non toxiques	<i>Azadinium obesum</i>	-	-	nt	-	pas d'information	-
	<i>Heterocapsa triquetra</i>	-	-	nt	-	pas d'information	-
	<i>Isochrysis galbana</i>	-	-	nt	-	pas d'information	-
	<i>Ostreococcus tauri</i>	-	-	nt	-	pas d'information	-
	<i>Rhodomonas baltica</i>	-	-	nt	-	pas d'information	-
	<i>Rhodomonas salina</i>	-	-	nt	-	pas d'information	-
Micromycètes producteurs potentiels de mycotoxines dans les mollusques bivalves	<i>Penicillium antarcticum</i>	+	+	nt	+	pas d'information	inconnu
	Patuline	+	+	nt	+	+	inconnu
	<i>Beauveria brongniartii</i>	+	-	+	+	pas d'information	inconnu
	Beauvéricines	nt	nt	nt	nt	pas d'information	inconnu
	<i>Penicillium ligerum</i>	+	+	+	+	pas d'information	inconnu
Acide pénicillique	+	nt	nt	+	+	inconnu	
Micromycètes non démontrés comme producteurs de toxines	<i>Penicillium venetum</i>	+	+	nt	+	pas d'information	inconnu
	<i>Penicillium polonicum</i>	+	-	+	+	pas d'information	inconnu
	<i>Penicillium marinum</i>	+	+	nt	+	pas d'information	inconnu
	<i>Penicillium bialowiezense</i>	+	-	+	+	pas d'information	inconnu
	<i>Penicillium ubiquestum</i>	+	-	-	+	pas d'information	inconnu
	<i>Penicillium brevicompactum</i>	-	-	nt	-	pas d'information	inconnu
	<i>Penicillium restrictum</i>	+	-	nt	+	pas d'information	inconnu
Toxicités atypiques Arcachon 2009 et 2010		-	-	-	-	+	inconnu

+ = activité observée ; - = pas d'activité observée ; nt = non testé ; * d'après la littérature

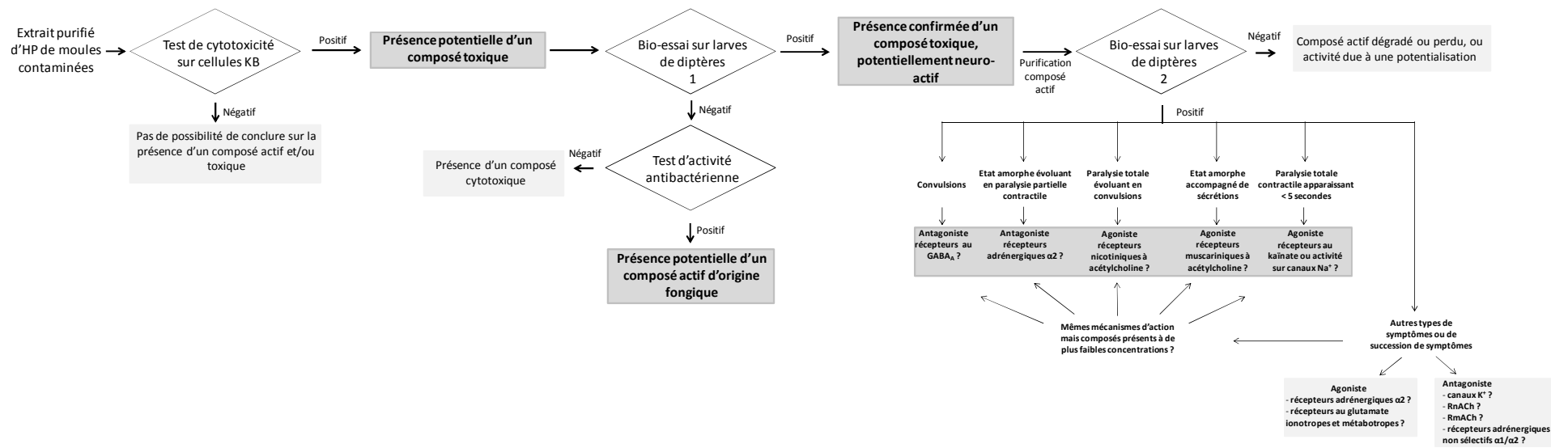


Figure 73 : Arbre décisionnel pour une conclusion sur la présence potentielle de composés actif et/ou toxiques ainsi que sur leurs mécanismes d'action possibles dans des extraits purifiés d'hépatopancreas de moules.

Références bibliographiques

Abraham W.R. et Hanssen H.P. (1992).

Fusoxysporone - a new type of diterpene from *Fusarium oxysporum*.

Tetrahedron, **48**, 10559-10562.

AFSSA (2006).

Saisine n° 2009-SA-0254 - Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à l'évaluation du dispositif de surveillance du milieu et à l'évaluation du risque lié à la consommation des coquillages, notamment dans la situation du bassin d'Arcachon.

13 p.

AFSSA (2009).

Saisine n° 2009-SA-0205 - Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif au dispositif de surveillance des phycotoxines lipophiles dans les zones conchylicoles concernant la détermination des périodes à risque et des points de référence.

24 p.

Al-Sabi A., McArthur J., Ostroumov V. et French R.J. (2006).

Marine toxins that target voltage-gated sodium channels.

Mar. Drugs, **4**, 157-192.

Albert J. et Lingle C. (1993).

Activation of nicotinic acetylcholine receptors on cultured *Drosophila* and other insect neurones.

J. Physiol., **463**, 605-630.

Alderman D.J. et Jones E.B.G. (1971).

Physiological requirements of two marine phycomycetes, *Althornia crouchii* and *Ostracoblabe implexa*.

Trans. Brit. Mycol. Soc., **57**, 213-225.

Alderman D.J. et Smith P. (2001).

Development of draft protocols of standard reference methods for antimicrobial agent susceptibility testing of bacteria associated with fish diseases.

Aquaculture, **196**, 211-243.

Alfonso A., de la Rosa L., Vieytes M.R., Yasumoto T. et Botana L.M. (2003).

Yessotoxin, a novel phycotoxin, activates phosphodiesterase activity: effect of yessotoxin on cAMP levels in human lymphocytes.

Biochem. Pharmacol., **65**, 193-208.

Alfonso A., Vieytes M.R., Yasumoto T. et Botana L.M. (2004).

A rapid microplate fluorescence method to detect yessotoxins based on their capacity to activate phosphodiesterases.

Anal. Biochem., **326**, 93-99.

Aligizaki K., Katikou P., Nikolaidis G. et Panou A. (2008).

First episode of shellfish contamination by palytoxin-like compounds from *Ostreopsis* species (Aegean Sea, Greece).

Toxicon, **51**, 418-427.

Ambrosino P., Galvano F., Fogliano V., Logrieco A., Fresa R. et Ritieni A. (2004).

Supercritical fluid extraction of beauvericin from maize.

Talanta, **62**, 523-530.

Amzil Z., Marcaillou-Le Baut C. et Bohec M. (1996).

Unexplained toxicity in molluscs gathered during phytoplankton monitoring.

Harmful and Toxic Algal Blooms, Yasumoto, T., Oshima, Y., Furuyo, Y. (Eds.).

pp. 543-546.

Amzil Z., Pouchus Y.F., Le B.J., Roussakis C., Verbist J.F., Marcaillou-Lebaut C. et Masselin P. (1992).

Short-time cytotoxicity of mussel extracts: a new bioassay for okadaic acid detection.

Toxicon, **30**, 1419-1425.

Amzil Z., Sibat M., Royer F. et Savar V. (2008).

First report on azaspiracid and yessotoxin groups detection in French shellfish.

Toxicon, **52**, 39-48.

Andersen B., Smedsgaard J. et Frisvad J.C. (2004).

Penicillium expansum: consistent production of patulin, chaetoglobosins, and other secondary metabolites in culture and their natural occurrence in fruit products.

J. Agr. Food Chem., **52**, 2421-2428.

Angelova B. et Schmauder H.P. (1999).

Lipophilic compounds in biotechnology - interactions with cells and technological problems.

J. Biotechnol., **67**, 13-32.

Anke H., Zaehner H. et Koenig W.A. (1978).

Metabolic products of microorganisms. 170. On the antibiotic activity of cladosporin.

Arch. Microbiol., **116**, 253-257.

Anonymous (2011).

Commission Regulation (EU) No 15/2011 of 10 January 2011 amending Regulation (EC) No 2074/2005 as regards recognised testing methods for detecting marine biotoxins in live bivalve molluscs.

4 p.

Antenucci R.N. et Palmer J.K. (1984).

Enzymic degradation of alpha- and beta-cyclodextrins by *Bacteroides* of the human colon.

J. Agr. Food Chem., **32**, 1316-1321.

Aoki S., Kong D., Matsui K., Rachmat R. et Kobayashi M. (2004).

Sesquiterpene aminoquinones, from a marine sponge, induce erythroid differentiation in human chronic myelogenous leukemia, K562 cells.

Chem. Pharm. Bull., **52**, 935-937.

Araoz R., Servent D., Molgo J., Iorga B.I., Fruchart-Gaillard C., Benoit E., Gu Z., Stivala C. et Zakarian A. (2011).

Total synthesis of pinnatoxins A and G and revision of the mode of action of pinnatoxin A.

J. Am. Chem. Soc., **133**, 10499-10511.

Ares I.R., Louzao M.C., Espina B., Vieytes M.R., Miles C.O., Yasumoto T. et Botana L.M. (2007).

Lactone ring of pectenotoxins: a key factor for their activity on cytoskeletal dynamics.

Cell. Physiol. Biochem., **19**, 283-292.

Ares I.R., Louzao M.C., Vieytes M.R., Yasumoto T. et Botana L.M. (2005).

Actin cytoskeleton of rabbit intestinal cells is a target for potent marine phycotoxins.

J. Exp. Biol., **208**, 4345-4354.

Armstrong R.W., Beau J.M., Cheon S.H., Christ W.J., Fujioka H., Ham W.H., Hawkins L.D., Jin H. et Kang S.H. (1989).

Total synthesis of palytoxin carboxylic acid and palytoxin amide.

J. Am. Chem. Soc., **111**, 7530-7533.

Artigas P. et Gadsby D.C. (2003).

Na⁺/K⁺-pump ligands modulate gating of palytoxin-induced ion channels.

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **100**, 501-505.

Aune T. (1989).

Toxicity of marine and freshwater algal biotoxins towards freshly prepared hepatocytes.

Mycotoxins and Phycotoxins, **88**, 461-468.

Aune T., Larsen S., Aasen J.A.B., Rehmann N., Satake M. et Hess P. (2007).

Relative toxicity of dinophysistoxin-2 (DTX-2) compared with okadaic acid, based on acute intraperitoneal toxicity in mice.

Toxicon, **49**, 1-7.

Aune T., Sorby R., Yasumoto T., Ramstad H. et Landsverk T. (2002).

Comparison of oral and intraperitoneal toxicity of yessotoxin towards mice.

Toxicon, **40**, 77-82.

Aune T., Yasumoto T. et Engeland E. (1991).

Light and scanning electron-microscopic studies on effects of marine algal toxins toward freshly prepared hepatocytes.

Rapid Commun. Mass Sp., **34**, 1-9.

Aune T. et Yndestad M. (1993).

Diarrhetic shellfish poisoning.

Algal toxins in seafood and drinking water, Falconer, I.R. (Ed.)

Academic Press, San Diego, pp. 87-104.

Aureli P., Costantini A. et Zolea S. (1992).

Antimicrobial activity of some plant essential oils against *Listeria monocytogenes*.
J. Food Protect., **55**, 344-348.

Austin B. et Austin D. (2007).

Bacterial fish pathogens - Diseases of farmed and wild fish - Fourth Edition.
Springer, Praxis, 552 p.

Baden D.G. (1989).

Brevetoxins: unique polyether dinoflagellate toxins.
FASEB J., **3**, 1807-1817.

Baden D.G., Bourdelais A.J., Jacocks H., Michelliza S. et Naar J. (2005).

Natural and derivative brevetoxins: Historical background, multiplicity, and effects.
Environ. Health Perspect., **113**, 621-625.

Bagnis R., Chanteau S., Chungue E., Hurtel J.M., Yasumoto T. et Inoue A. (1980).

Origins of ciguatera fish poisoning: a new dinoflagellate, *Gambierdiscus toxicus* Adachi and Fukuyo, definitively involved as a causal agent.
Toxicon, **18**, 199-208.

Balls M., Blaauboer B.J., Fentem J.H., Bruner L., Combes R.D., Ekwall B., Fielder R.J., Guillouzo A., Lewis R.W. et Lovell D.P. (1995).

Practical aspects of the validation of toxicity test procedures.
ATLA- Altern. Lab. Anim., **23**, 129-129.

Bardi L., Mattei A., Steffan S. et Marzona M. (2000).

Hydrocarbon degradation by a soil microbial population with β -cyclodextrin as surfactant to enhance bioavailability.
Enzym. Microb. Tech., **27**, 709-713.

Barile F.A. (2008).

Principles of toxicology testing.
New York. 312 p.

Belin C. (2011).

La surveillance des phycotoxines dans les coquillages du milieu marin. Le réseau REPHY : objectifs, stratégies, et principaux résultats.
Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation, **45**, 18-23.

Belin C., Soudant D. et Amzil Z. (2009).

Surveillance des toxines lipophiles dans les coquillages. Analyses statistique et comparaison des résultats obtenus par deux méthodes d'analyse : les bio-essais sur souris et les analyses chimiques par CL-SM/SM. Rapport exécuté dans le cadre de la Convention Etudes DGAL / Ifremer, correspondant à la Subvention pour charges de service public, Programme 206, 94 pp, Octobre 2009.

Bernardini M., Carilli A., Pacioni G. et Santurbano B. (1975).

Isolation of beauvericin from *Paecilomyces fumoso-roseus*.

Phytochemistry, **14**, 1865.

Bialojan C. et Takai A. (1988).

Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases - specificity and kinetics.

Biochem. J., **256**, 283-290.

Birkinshaw J.H., Michael S.E., Bracken A. et Raistrick H. (1943).

Patulin in the common cold. Collaborative research on a derivative of *Penicillium patulum* Bainier. II. Biochemistry and Chemistry.

625-630 p.

Blunt J.W., Copp B.R., Hu W.-P., Munro M.H.G., Northcote P.T. et Prinsep M.R. (2009).

Marine natural products.

Nat. Prod. Rep., **26**, 170-244.

Blunt J.W., Copp B.R., Keyzers R.A., Munro M.H.G. et Prinsep M.R. (2013).

Marine natural products.

Nat. Prod. Rep., **30**, 237-323.

Blunt J.W., Copp B.R., Munro M.H.G., Northcote P.T. et Prinsep M.R. (2011).

Marine natural products.

Nat. Prod. Rep., **28**, 196-268.

Boada L.D., Zumbado M., Luzardo O.P., Almeida-González M., Plakas S.M., Granade H.R., Abraham A., Jester E.L.E. et Dickey R.W. (2010).

Ciguatera fish poisoning on the West Africa Coast: An emerging risk in the Canary Islands (Spain).

Toxicon, **56**, 1516-1519.

Bocquet N., Prado de Carvalho L., Cartaud J., Neyton J., Le Poupon C., Taly A., Grutter T., Changeux J.P. et Corringier P.J. (2007).

A prokaryotic proton-gated ion channel from the nicotinic acetylcholine receptor family.

Nature, **445**, 116-119.

Bode H.B., Bethe B., Höfs R. et Zeeck A. (2002).

Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity.

ChemBioChem, **3**, 619-627.

Borenfreund E. et Puerner J.A. (1985).

Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption.

Toxicol. Lett., **24**, 119-124.

Box K.J., Völgyi G., Ruiz R., Comer J.E., Takács-Novák K., Bosch E., Ràfols C. et Rosés M. (2007).

Physicochemical properties of a new multicomponent cosolvent system for the pKa determination of poorly soluble pharmaceutical compounds.

Helv. Chim. Acta, **90**, 1538-1553.

Bradfish G.A. et Harmer S.L. (1990).

ω -conotoxin GVIA and nifedipine inhibit the depolarizing action of the fungal metabolite, destruxin B on muscle from the tobacco budworm (*Heliothis virescens*).

Toxicon, **28**, 1249-1254.

Brand L.E., Campbell L. et Bresnan E. (2012).

Karenia: The biology and ecology of a toxic genus.

Harmful Algae, **14**, 156-178.

Brewster M., Hora M., Simpkins J. et Bodor N. (1991).

Use of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin as a solubilizing and stabilizing excipient for protein drugs.

Pharm Res, **8**, 792-795.

Bugni T.S. et Ireland C.M. (2004).

Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms.

Nat. Prod. Rep., **21**, 143-163.

Butinar L., Frisvad J.C. et Gunde-Cimerman N. (2011).

Hypersaline waters - a potential source of foodborne toxigenic *Aspergilli* and *Penicillia*.

FEMS Microbiol. Ecol., **77**, 186-199.

Cahu C., Guillaume J.C., Stéphan G. et Chim L. (1994).

Influence of phospholipid and highly unsaturated fatty acids on spawning rate and egg and tissue composition in *Penaeus vannamei* fed semi-purified diets.

Aquaculture, **126**, 159-170.

Caillaud A., Eixarch H., de I.I.P., Rodriguez M., Dominguez L., Andree K.B. et Diogene J. (2012).

Towards the standardisation of the neuroblastoma (neuro-2a) cell-based assay for ciguatoxin-like toxicity detection in fish: application to fish caught in the Canary Islands.

Food Addit. Contam., Part A, **29**, 1000-1010.

Caldwell G.S. (2009).

The influence of bioactive oxylipins from marine diatoms on invertebrate reproduction and development.

Mar. Drugs, **7**, 367-400.

Calo L., Fornelli F., Nenna S., Tursi A., Caiaffa M.F. et Macchia L. (2003).

Beauvericin cytotoxicity to the invertebrate cell line SF-9.

J. Appl. Genet, **44**, 515-520.

Calò L., Fornelli F., Ramires R., Nenna S., Tursi A., Caiaffa M.F. et Macchia L. (2004).

Cytotoxic effects of the mycotoxin beauvericin to human cell lines of myeloid origin.

Pharmacol. Res., **49**, 73-77.

Cañete E., Campas M., de I.I.P. et Diogene J. (2010).

NG108-15 cell-based and protein phosphatase inhibition assays as alternative semiquantitative tools for the screening of lipophilic toxins in mussels. Okadaic acid detection.

Toxicol. in Vitro, **24**, 611-619.

Cañete E. et Diogene J. (2010).

Improvements in the use of neuroblastoma x glioma hybrid cells (NG108-15) for the toxic effect quantification of marine toxins.

Toxicon, **55**, 381-389.

Cañete E. et Diogène J. (2008).

Comparative study of the use of neuroblastoma cells (Neuro-2a) and neuroblastoma x glioma hybrid cells (NG108-15) for the toxic effect quantification of marine toxins.

Toxicon, **52**, 541-550.

Cao Z., LePage K.T., Frederick M.O., Nicolaou K.C. et Murray T.F. (2010).

Involvement of caspase activation in azaspiracid-induced neurotoxicity in neocortical neurons.

Toxicol. Sci., **114**, 323-334.

Cardol P., Bailleul B., Rappaport F., Derelle E., Béal D., Breyton C., Bailey S., Wollman F.A., Grossman A., Moreau H. et Finazzi G. (2008).

An original adaptation of photosynthesis in the marine green alga *Ostreococcus*.

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **105**, 7881-7886.

Cash R.A., Music S.I., Libonati J.P., Snyder M.J., Wenzel R.P. et Hornick R.B. (1974).

Response of man to infection with *Vibrio cholerae*. I. Clinical, serologic, and bacteriologic responses to a known inoculum.

J. Infect. Dis., **129**, 45-52.

Castlebury L.A., Sutherland J.B., Tanner L.A., Henderson A.L. et Cerniglia C.E. (1999).

Use of a bioassay to evaluate the toxicity of beauvericin to bacteria.

World J. of Microbiol. Biot., **15**, 119-121.

Cattaert D. et Birman S. (2001).

Blockade of the central generator of locomotor rhythm by noncompetitive NMDA receptor antagonists in *Drosophila* larvae.

J. Neurobiol., **48**, 58-73.

Cembella A. et Krock B. (2008).

Cyclic imine toxins: chemistry, biogeography, biosynthesis, and pharmacology.

Seafood and Freshwater Toxins - *Pharmacology, Physiology and Detection* - Second Edition, Botana, L.M. (Ed.)

CRC Press Taylor & Francis Group, p. 941.

Cembella A.D. (2003).

Chemical ecology of eukaryotic microalgae in marine ecosystems.

Phycologia, **42**, 420-447.

Cembella A.D., Lewis N.I. et Quilliam M.A. (2000).

The marine dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) as the causative organism of spirolide shellfish toxins.

Phycologia, **39**, 67-74.

Chae H.D., Choi T.S., Kim B.M., Jung J.H., Bang Y.J. et Shin D.Y. (2005).

Oocyte-based screening of cytokinesis inhibitors and identification of pectenotoxin-2 that induces Bim/Bax-mediated apoptosis in p53-deficient tumors.

Oncogene, **24**, 4813-4819.

Challa R., Ahuja A., Ali J. et Khar R.K. (2005).

Cyclodextrins in drug delivery: An updated review.

AAPS PharmSciTech, **6**, E329-E357.

Chapela M.J., Reboreda A., Vieites J.M. et Cabado A.G. (2008).

Lipophilic toxins analyzed by liquid chromatography-mass spectrometry and comparison with mouse bioassay in fresh, frozen, and processed molluscs.

J. Agr. Food Chem., **56**, 8979-8986.

Chauvin R. (1956).

Physiologie de l'insecte.

Paris, 917 p.

Chiang A.S., Lin W.Y., Liu H.P., Pszczolkowski M.A., Fu T.F., Chiu S.L. et Holbrook G.L. (2002).

Insect NMDA receptors mediate juvenile hormone biosynthesis.

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **99**, 37-42.

Choi Y.H., van Spronsen J., Dai Y., Verberne M., Hollmann F., Arends I.W., Witkamp G.-J. et Verpoorte R. (2011).

Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology?

Plant Physiol., **156**, 1701-1705.

Chou T., Haino T., Kuramoto M. et Uemura D. (1996).

Isolation and structure of pinnatoxin D, a new shellfish poison from the Okinawan bivalve *Pinna muricata*.

Tetrahedron Lett., **37**, 4027-4030.

Chrétiennot-Dinet M.J., Courties C., Vaquer A., Neveux J., Claustre H., Lautier J. et Machado M.C. (1995).

A new marine picoeucaryote: *Ostreococcus tauri* gen. et sp. nov. (Chlorophyta, Prasinophyceae).

Phycologia, **34**, 285-292.

Ciminiello P., Dell'Aversano C., Fattorusso E., Forino M., Magno G.S., Tartaglione L., Grillo C. et Melchiorre N. (2006).

The Genoa 2005 Outbreak. Determination of putative palytoxin in mediterranean *Ostreopsis ovata* by a new liquid chromatography tandem mass spectrometry method.

Anal. Chem., **78**, 6153-6159.

Codex (1999).

Programme mixte FAO/OMS sur les normes alimentaires - Comité du *Codex Alimentarius* sur les additifs alimentaires et les contaminants - Document de synthèse concernant la patuline.

9 p.

Cole R.J., Kirksey J.W., Cutler H.G. et Davis E.E. (1974).

Toxic effects of oosporein from *Chaetomium trilaterale*.

J. Agr. Food Chem., **22**, 517-520.

Combes R.D. (2003).

The mouse bioassay for diarrhetic shellfish poisoning: A gross misuse of laboratory animals and of scientific methodology.

ATLA- Altern. Lab. Anim., **31**, 1-16.

Cos P., Vlietinck A.J., Berghe D.V. et Maes L. (2006).

Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'.

J. Ethnopharmacol., **106**, 290-302.

Courties C., Vaquer A., Troussellier M., Lautier J., Chretiennot-Dinet M.J., Neveux J., Machado C. et Claustre H. (1994).

Smallest eukaryotic organism.

Nature, **370**, 255-255.

CRLMB (2009).

Community Reference Laboratory for Marine Biotoxins, 2009. EU Harmonised standard operating procedure for detection of lipophilic toxins by mouse bioassay.

14 p.

Croci L., Cozzi L., Stacchini A., De M.D. et Toti L. (1997).

A rapid tissue culture assay for the detection of okadaic acid and related compounds in mussels.

Toxicon, **35**, 223-230.

Daiguji M., Satake M., James K.J., Bishop A., MacKenzie L., Naoki H. et Yasumoto T. (1998).

Structures of new pectenotoxin analogs, pectenotoxin-2 seco acid and 7-epi-pectenotoxin-2 seco acid, isolated from a dinoflagellate and greenshell mussels.

Chem. Lett., 653-654.

Dalgaard P. et Koutsoumanis K. (2001).

Comparison of maximum specific growth rates and lag times estimated from absorbance and viable count data by different mathematical models.

J. Microbiol. Methods, **43**, 183-196.

Daranas A.H., Norte M. et Fernández J.J. (2001).

Toxic marine microalgae.

Toxicon, **39**, 1101-1132.

Das B.K., Pradhan J., Pattnaik P., Samantaray B.R. et Samal S.K. (2005).

Production of antibacterials from the freshwater alga *Euglena viridis* (Ehren).

World J. of Microbiol. Biot., **21**, 45-50.

De Hoog G. (1972).

The genera *Beauveria*, *Isaria*, *Tritirachium* and *Acrodontium* gen. nov.

1-41 p.

de la Rosa L.A., Alfonso A., Vilarino N., Vieytes M.R. et Botana L.M. (2001).

Modulation of cytosolic calcium levels of human lymphocytes by yessotoxin, a novel marine phycotoxin.

Biochem. Pharmacol., **61**, 827-833.

Deeds J.R. et Schwartz M.D. (2010).

Human risk associated with palytoxin exposure.

Toxicon, **56**, 150-162.

Denardou A., 1998

Contribution à l'étude d'un dinoflagellé toxique : *Prorocentrum minimum* et de son incidence sur la toxicité des coquillages cultivés. Développement d'un test biologique de dépistage des neurotoxines.

303 p.

Denizot F. et Lang R. (1986).

Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability.

J. Immunol. Methods, **89**, 271-277.

Derelle E., Ferraz C., Rombauts S., Rouzé P., Worden A.Z., Robbens S., Partensky F., Degroeve S., Echeynié S. et Cooke R. (2006).

Genome analysis of the smallest free-living eukaryote *Ostreococcus tauri* unveils many unique features.

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **103**, 11647-11652.

Dickey R., Jester E., Granade R., Mowdy D., Moncreiff C., Rebarchik D., Robl M., Musser S. et Poli M. (1999).

Monitoring brevetoxins during a *Gymnodinium breve* red tide: comparison of sodium channel specific cytotoxicity assay and mouse bioassay for determination of neurotoxic shellfish toxins in shellfish extracts.

Nat. Toxins, **7**, 157-165.

Dickey R.W., Bobzin S.C., Faulkner D.J., Bencsath F.A. et Andrzejewski D. (1990).

Identification of okadaic acid from a caribbean dinoflagellate, *Prorocentrum concavum*.

Toxicon, **28**, 371-377.

Diogène G., Fessard V., Dubreuil A. et Puiseux-Dao S. (1995).

Comparative studies of the actin cytoskeleton response to maitotoxin and okadaic acid.

Toxicol. in Vitro, **9**, 1-10.

Directive-86/609/CEE (1991).

Directive du Conseil du 24 novembre 1991 concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives des Etats membres relatives à la protection des animaux utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques (86/609/CEE).

Journal Officiel des Communautés Européennes.

Directive-91/492/CEE (1991).

Directive du Conseil du 15 juillet 1991 fixant les règles sanitaires régissant la production et la mise sur le marché de mollusques bivalves vivants (91/492/CEE).

Journal Officiel des Communautés Européennes.

do Nascimento A.M., Conti R., Turatti I.C.C., Cavalcanti B.C., Costa-Lotufo L.V., Pessoa C., de Moraes M.O., Manfrim V., Toledo J.S., Cruz A.K. et Pupo M.T. (2012).

Bioactive extracts and chemical constituents of two endophytic strains of *Fusarium oxysporum*.

Rev. Bras. Farmacogn., **22**, 1276-1281.

Dolah F.M.v. et Ramsdell J.S. (2001).

Review and assessment of in vitro detection methods for algal toxins.

J. AOAC Int., **84**, 1617-1625.

Dolci P., Guglielmo F., Secchi F. et Ozino O.I. (2006).

Persistence and efficacy of *Beauveria brongniartii* strains applied as biocontrol agents against *Melolontha melolontha* in the Valley of Aosta (northwest Italy).

J. Appl. Microbiol., **100**, 1063-1072.

Draisci R., Lucentini L., Giannetti L., Boria P. et Poletti R. (1996).

First report of pectenotoxin-2 (PTX-2) in algae (*Dinophysis fortii*) related to seafood poisoning in Europe.

Toxicon, **34**, 923-935.

Dubois J.M. (1999).

Les canaux ioniques cellulaires.

Polytechnica, 198 p.

Dubois N. et Amzil Z. (2009).

Toxicité atypique de coquillages due à la synergie entre toxines et/ou à la présence d'esters de ces toxines (spirolides et pecténotoxines).

Tâche T3a du Programme National Arcachon : "Toxicité due à des formes dérivées de toxines connues", **41 p.**,

Eagle H. (1955).

Propagation in a fluid medium of a human epidermoid carcinoma, strain KB.

P. Soc. Exp. Biol. Med., **89**, 362-364.

Ebel R. (2010).

Terpenes from marine-derived fungi.

Mar. Drugs, **8**, 2340-2368.

EFSA (2008a).

Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish - azaspiracids.

The EFSA Journal, **723**, 1-52.

EFSA (2008b).

Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish - okadaic acid and analogues.

The EFSA Journal, **589**, 1-62.

EFSA (2009a).

Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish - domoic acid.

The EFSA Journal, **1181**, 1-61.

EFSA (2009b).

Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish - palytoxin group.

The EFSA Journal, **7**, 1-83.

EFSA (2009c).

Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish - saxitoxin group.

The EFSA Journal, **1019**, 1-76.

EFSA (2010a).

Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish - cyclic imines (spirogones, gymnodimines, pinnatoxins and pteriatoxins).

The EFSA Journal, **8**, 1628.

EFSA (2010b).

Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish - emerging toxins: brevetoxin group.

The EFSA Journal, **8**, 1677.

Elgarch A., Vale P., Rifai S. et Fassouane A. (2008).

Detection of diarrhetic shellfish poisoning and azaspiracids toxins in Moroccan mussels: comparison of LC-MS method with the commercial immunoassay kit.

Mar. Drugs, **6**, 587-594.

Elsworth J.F. et Grove J.F. (1980).

Cyclodepsipeptides from *Beauveria bassiana*. Part 2. Beauverolides A to F and their relationship to isarolide.
J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 1795-1799.

Engel S., Jensen P.R. et Fenical W. (2002).

Chemical ecology of marine microbial defense.
J. Chem. Ecol., **28**, 1971-1985.

Erlacher A., Sousa F., Schroeder M., Jus S., Kokol V., Cavaco-Paulo A. et Guebitz G.M. (2006).

A new cuticle scale hydrolysing protease from *Beauveria brongniartii*.
Biotechnol. Lett., **28**, 703-710.

Espinosa E.P., Hassan D., Ward J.E., Shumway S.E. et Allam B. (2010).

Role of epicellular molecules in the selection of particles by the blue mussel, *Mytilus edulis*.
The Biological Bulletin, **219**, 50-60.

European Commission (2011).

Commission Regulation (EU) No 15/2011 of 10 January 2011 amending Regulation (EC) No 2074/2005 as regards recognised testing methods for detecting marine biotoxins in live bivalve molluscs.
Official Journal of the European Union.

Evans P. et Maqueira B. (2005).

Insect octopamine receptors: a new classification scheme based on studies of cloned *Drosophila* G-protein coupled receptors.
Invert. Neurosci., **5**, 111-118.

Fagherazzi-Pagel H. (2012).

Veille : Maladies émergentes et réémergentes chez l'homme, Concepts, Facteurs d'émergence, Alertes, Riposte mondiale.
Dossier de synthèse CNRS,

Fai P.B., Grant A. et Reid B.J. (2009).

Compatibility of hydroxypropyl- β -cyclodextrin with algal toxicity bioassays.
Environ. Pollut., **157**, 135-140.

Fairey E.R., Edmunds J.S.G. et Ramsdell J.S. (1997).

A cell-based assay for brevetoxins, saxitoxins, and ciguatoxins using a stably expressed c-fos-luciferase reporter gene.
Anal. Biochem., **251**, 129-132.

FAO, 2004

Worldwide regulation for mycotoxins in food and feed in 2003.
FAO Food and Nutrition Paper vol. 81.
Rome, p. 180.

FAO/IOC/WHO (2005).

Report of the joint FAO/IOC/WHO ad hoc expert consultation on biotoxins in bivalve molluscs, Oslo, Norway, Sept. 26-30, 2004. Available at: ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/biotoxin_report_en.pdf (accessed 5 June 2009).

40 p.

Farré M.I., Pérez S., Kantiani L. et Barceló D. (2008).

Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment.

TrAC Trends in Analytical Chemistry, **27**, 991-1007.

Faury N., Saulnier D., Thompson F.L., Gay M., Swings J. et Roux F.L. (2004).

Vibrio crassostreae sp. nov., isolated from the haemolymph of oysters (*Crassostrea gigas*).

Int. J. Syst. Evol. Micr., **54**, 2137-2140.

Fedorova I.M., Gmiro V.E., Magazanik L.G. et Tikhonov D.B. (2008).

Ion channels of glutamate receptors of nerve-muscle junction of larva of the fly *Calliphora vicina* demonstrate a high structural homology with vertebrate AMPA-channels.

J Evol Biochem Phys, **44**, 657-665.

Fernandez J.J., Candenás M.L., Souto M.L., Trujillo M.M. et Norte M. (2002).

Okadaic acid, useful tool for studying cellular processes.

Curr. Med. Chem., **9**, 229-262.

Fernandez M.T., Zitko V., Gascon S. et Novelli A. (1991).

The marine toxin okadaic acid is a potent neurotoxin for cultures cerebellar neurons.

Life Sci., **49**, PL157-PL162.

Fernandez M.T., Zitko V., Gascon S., Torreblanca A. et Novelli A. (1993).

Neurotoxic effect of okadaic acid, a seafood-related toxin, on cultured cerebellar neurons.

Ann. N. Y. Acad. Sci., **679**, 260-269.

Ferrer E., Juan-García A., Font G. et Ruiz M. (2009).

Reactive oxygen species induced by beauvericin, patulin and zearalenone in CHO-K1 cells.

Toxicol. in Vitro, **23**, 1504-1509.

Fessard V., Diogène G., Dubreuil A., Quod J.P., Durand-Clément M., Legay C. et Puiseux-Dao S. (1994).

Selection of cytotoxic responses to maitotoxin and okadaic acid and evaluation of toxicity of dinoflagellate extracts.

Nat. Toxins, **2**, 322-328.

Fiorntini C., Matarrese P., Fattorossi A. et Donelli G. (1996).

Okadaic acid induces changes in the organization of F-actin in intestinal cells.

Toxicon, **34**, 937-945.

Fladmark K.E., Serres M.H., Larsen N.L., Yasumoto T., Aune T. et Doskeland S.O. (1998).

Sensitive detection of apoptogenic toxins in suspension cultures of rat and salmon hepatocytes.

Toxicol., **36**, 1101-1114.

Flanagan A.F., Callanan K.R., Donlon J., Palmer R., Forde A. et Kane M. (2001).

A cytotoxicity assay for the detection and differentiation of two families of shellfish toxins.

Toxicol., **39**, 1021-1027.

Fleming J.J. et Du Bois J. (2006).

A synthesis of (+)-saxitoxin.

J. Am. Chem. Soc., **128**, 3926-3927.

Forbes B.A., Sahn D.F. et Weissfeld A.S. (1998).

Bailey and Scott's diagnostic microbiology.

696-710 p.

Forget-Richard F. et Oswald I. (2012).

Mycotoxines : quelles avancées scientifiques pour une meilleure maîtrise des risques ?

Innovations Agronomiques, **24**, 17-33.

Franchinia A., Marchesini E., Poletti R. et Ottaviani E. (2005).

Swiss mice CD1 fed on mussels contaminated by okadaic acid and yessotoxins: effects on thymus and spleen.

Eur. J. Histochem., **49**, 179-188.

Frisvad J.C. et Samson R.A. (2004).

Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins.

Stud. Mycol., **49**, C174.

Frisvad J.C., Smedsgaard J., Larsen T.O. et Samson R.A. (2004).

Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*.

Stud. Mycol., **49**, 201-241.

Frisvad J.C., Thrane U., Samson R.A. et Pitt J.I. (2006).

Important mycotoxins and the fungi which produce them.

Advances in food mycology,

Springer, pp. 3-31.

Fujiki H., Suganuma M., Suguri H., Yoshizawa S., Takagi K., Uda N., Wakamatsu K., Yamada K., Murata M., Yasumoto T. et Sugimura T. (1988).

Diarrhetic shellfish toxin, dinophysistoxin-1, is a potent tumor promoter on mouse skin.

Cancer Science, **79**, 1089-1093.

Fukuda T., Arai M., Yamaguchi Y., Masuma R., Tomoda H. et Omura S. (2004).

New beauvericins, potentiators of antifungal miconazole activity, produced by *Beauveria* sp. FKI-1366. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological properties.

J. Antibiot., **57**, 110-116.

Furey A., O'Doherty S., O'Callaghan K., Lehane M. et James K.J. (2010).

Azspiracid poisoning (AZP) toxins in shellfish: Toxicological and health considerations.

Toxicon, **56**, 173-190.

García-Rodríguez A., Fernández-Sánchez M., Reyero M., Franco J., Haya K., Martín J., Zitko V., Salgado C., Arévalo F. et Bermúdez M. (1998).

Detection of PSP, ASP and DSP toxins by neuronal bioassay: Comparison with HPLC and mouse bioassay.

Harmful Algae, 554-557.

Garnier M., Delamare J., Gélis-Malville E. et Delamare L. (2004).

Dictionnaire illustré des termes de médecine.

Maloine, 560 p.

Geiser D.M., Gueidan C., Miadlikowska J., Lutzoni F., Kauff F., Hofstetter V., Fraker E., Schoch C.L., Tibell L. et Untereiner W.A. (2006).

Eurotiomycetes: eurotiomycetidae and chaetothyriomycetidae.

Mycologia, **98**, 1053-1064.

Gleibs S. et Mebs D. (1999).

Distribution and sequestration of palytoxin in coral reef animals.

Toxicon, **37**, 1521-1527.

Gomez-Gil B., Thompson F.L., Thompson C.C. et Swings J. (2003).

Vibrio rotiferianus sp. nov., isolated from cultures of the rotifer *Brachionus plicatilis*.

Int. J. Syst. Evol. Micr., **53**, 239-243.

Gonzalez M.P., Siso M.I.G., Murado M.A., Pastrana L., Montemayor M.I. et Miron J. (1992).

Depuration and valuation of mussel-processing wastes. Characterization of amylolytic postincubates from different species grown on an effluent.

Bioresour. Technol., **42**, 133-140.

Goodfellow M. (1971).

Numerical taxonomy of some nocardioform bacteria.

J. Gen. Microbiol., **69**, 33-80.

Gordaliza M. (2010).

Cytotoxic terpene quinones from marine sponges.

Mar. Drugs, **8**, 2849-2870.

Gosling E. (2003).

Bivalve Molluscs ; Biology, Ecology and Culture.

Blackwell Publishing, 443 p.

Granéli E. et Johansson N. (2003).

Increase in the production of allelopathic substances by *Prymnesium parvum* cells grown under N- or P-deficient conditions.

Harmful Algae, **2**, 135-145.

Granéli E., Vidyarthna N.K., Funari E., Cumaranatunga P.R.T. et Scenati R. (2011).

Can increases in temperature stimulate blooms of the toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis ovata*?

Harmful Algae, **10**, 165-172.

Grassé P.P. (1951).

Tome X, *Fascicule 2* : Hymenopteroides (Apocrites Aculeata), Psocopteroides, Hemipteroides, Thysanopteroides.

Masson, 150 p.

Grindley R.M., Keogh J.A. et Friedman C.S. (1998).

Shell lesions in New Zealand *Haliotis* spp. (Mollusca, Gasteropoda).

J. Shellfish Res., **17**, 805-811.

Grootwassink J.W. et Gaucher G.M. (1980).

De novo biosynthesis of secondary metabolism enzymes in homogeneous cultures of *Penicillium urticae*.

J. Bacteriol., **141**, 443-455.

Grove J.F. et Pople M. (1980).

The insecticidal activity of beauvericin and the enniatin complex.

Mycopathologia, **70**, 103-105.

Grovel O., Pouchus Y.F., Robiou du Pont T., Montagu M., Amzil Z. et Verbist J.F. (2002).

Ion trap MSⁿ for identification of gliotoxin as the cytotoxic factor of a marine strain of *Aspergillus fumigatus* Fresenius.

J. Microbiol. Methods, **48**, 171-179.

Grovel O., Pouchus Y.F. et Verbist J.F. (2003).

Accumulation of gliotoxin, a cytotoxic mycotoxin from *Aspergillus fumigatus*, in blue mussel (*Mytilus edulis*).

Toxicon, **42**, 297-300.

Grzebyk D., Denardou A., Berland B. et Pouchus Y. (1997).

Evidence of a new toxin in the red-tide dinoflagellate *Prorocentrum minimum*.

J. Plankton Res., **19**, 1111-1124.

Guerrini F., Ciminiello P., Dell'Aversano C., Tartaglione L., Fattorusso E., Boni L. et Pistocchi R. (2007).

Influence of temperature, salinity and nutrient limitation on yessotoxin production and release by the dinoflagellate *Protoceratium reticulatum* in batch-cultures.

Harmful Algae, **6**, 707-717.

Guillard R.R.L. et Hargraves P.E. (1993).

Stichochrysis immobilis is a diatom, not a chrysophyte.

Phycologia, **32**, 234-236.

Gupta S., Montllor C. et Hwang Y.S. (1995).

Isolation of novel beauvericin analogs from the fungus *Beauveria bassiana*.

J. Nat. Prod., **58**, 733-738.

Halle W. (2003).

The registry of cytotoxicity: Toxicity testing in cell cultures to predict acute toxicity (LD₅₀) and to reduce testing in animals.

Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments

Russell & Burch House, 96-98 North Sherwood Street, Nottingham NG1 4EE, UK., 198 p.

Halo L.M., Heneghan M.N., Yakasai A.A., Song Z., Williams K., Bailey A.M., Cox R.J., Lazarus C.M. et Simpson T.J. (2008).

Late stage oxidations during the biosynthesis of the 2-pyridone tenellin in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*.

J. Am. Chem. Soc., **130**, 17988-17996.

Hammer K.A., Carson C.F. et Riley T.V. (2002).

In vitro activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against dermatophytes and other filamentous fungi.

J. Antimicrob. Chemot., **50**, 195-199.

Han Y., Yang B., Zhang F., Miao X. et Li Z. (2009).

Characterization of antifungal chitinase from marine *Streptomyces* sp. DA11 associated with South China Sea sponge *Craniella Australiensis*.

Mar. Biotechnol., **11**, 132-140.

Hauth A.M., Maier U.G., Lang B.F. et Burger G. (2005).

The *Rhodomonas salina* mitochondrial genome: bacteria-like operons, compact gene arrangement and complex repeat region.

Nucleic Acids Res., **33**, 4433-4442.

Hellyer S.D., Selwood A.I., Rhodes L. et Kerr D.S. (2011).

Marine algal pinnatoxins E and F cause neuromuscular block in an *in vitro* hemidiaphragm preparation.

Toxicon, **58**, 693-699.

Hess P. et Aasen J.A.B. (2007).

Chemistry, origins and distribution of Yessotoxin and its analogs. .

Chemistry and Biochemistry of Marine Biotoxins (Botana L. ed). Blackwell Publishing Ltd. Oxford, UK.,

(Botana L. ed). Blackwell Publishing Ltd. Oxford, UK., p. 187.

Hess P., Abadie E., Hervé F., Berteaux T., Séchet V., Aráoz R., Molgó J., Zakarian A., Sibat M. et Rundberget T. (2013).

Pinnatoxin G is responsible for atypical toxicity in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and clams (*Venerupis decussata*) from Ingril, a French Mediterranean lagoon.

Toxicon, *in press*,

Hess P., Butter T., Petersen A., Silke J. et McMahon T. (2009).

Performance of the EU-harmonised mouse bioassay for lipophilic toxins for the detection of azaspiracids in naturally contaminated mussel (*Mytilus edulis*) hepatopancreas tissue homogenates characterised by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry.

Toxicon, **53**, 713-722.

Hess P., Grune B., Anderson D.B., Aune T., Botana L.M., Caricato P., van Egmond H.P., Halder M., Hall S., Lawrence J.F., Moffat C., Poletti R., Richmond J., Rossini G.P., Seamer C. et Vilageliu J.S. (2006).

Three Rs approaches in marine biotoxin testing - The report and recommendations of a joint ECVAM/DG SANCO workshop (ECVAM workshop 55).

ATLA-Altern. Lab. Anim., **34**, 193-224.

Hess P., McCarron P. et Quilliam M.A. (2007).

Fit-for-purpose shellfish reference materials for internal and external quality control in the analysis of phycotoxins.

Anal. Bioanal. Chem., **387**, 2463-2474.

Hess P., McMahon T., Slattery D., Swords D., Dowling G., McCarron M., Clarke D., Gibbons W., Silke J. et O'Kinneide M. (2003).

Use of LC-MS testing to identify lipophilic toxins, to establish local trends and interspecies differences and to test the comparability of LC-MS testing with the mouse bioassay: an example from the Irish biotoxin monitoring programme 2001.

Conselleria de Pesca e Asuntos Marítimos da Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Santiago de Compostela, Spain, 57-65 p.

Heussner A.H., Dietrich D.R. et O'Brien E. (2006).

In vitro investigation of individual and combined cytotoxic effects of ochratoxin A and other selected mycotoxins on renal cells.

Toxicol. in Vitro, **20**, 332-341.

Hilgemann D.W. (2003).

From a pump to a pore: How palytoxin opens the gates.

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **100**, 386-388.

Hille B. (1968).

Pharmacological modifications of the sodium channels of frog nerve.

J. Gen. Physiol., **51**, 199-219.

Hoagland P. et Scatasta S. (2006).

The economic effects of harmful algal blooms.

Ecology of Harmful Algae, vol. 189. Granéli, E., Turner, J. (Eds.).

Springer Berlin Heidelberg, pp. 391-402.

Hoepfner D., McNamara Case W., Lim Chek S., Studer C., Riedl R., Aust T., McCormack Susan L., Plouffe David M., Meister S., Schuierer S., Plikat U., Hartmann N., Staedtler F., Cotesta S., Schmitt Esther K., Petersen F., Supek F., Glynne Richard J., Tallarico John A., Porter Jeffrey A., Fishman Mark C., Bodenreider C., Diagana Thierry T., Movva N.R. et Winzeler Elizabeth A. (2012).

Selective and specific inhibition of the *Plasmodium falciparum* Lysyl-tRNA synthetase by the fungal secondary metabolite cladosporin.

Cell Host & Microbe, **11**, 654-663.

Holler U., Wright A.D., Matthee G.F., König G.M., Draeger S., Aust H.J. et Schulz B. (2000).

Fungi from marine sponges: Diversity, biological activity and secondary metabolites.

Mycol. Res., **104**, 1354-1365.

Holmes C.F.B. (1991).

Liquid chromatography-linked protein phosphatase bioassay; A highly sensitive marine bioscreen for okadaic acid and related diarrhetic shellfish toxins.

Toxicon, **29**, 469-477.

Honkanen R.E., Codispoti B.A., Tse K. et Boynton A.L. (1994).

Characterization of natural toxins with inhibitory activity against serine threonine protein phosphatases

Toxicon, **32**, 339-350.

Hooijschuur E.W.J., Hulst A.G., de Jong A.L., de Reuver L.P., van Krimpen S.H., van Baar B.L.M., Wils E.R.J., Kientz C.E. et Brinkman U.A.T. (2002).

Identification of chemicals related to the chemical weapons convention during an interlaboratory proficiency test.

TrAC Trends in Analytical Chemistry, **21**, 116-130.

Hossen V. (2012).

Perspectives d'évolution des dispositifs au regard des travaux relatifs à l'évaluation des risques au niveau Européen et de l'évolution des méthodes d'analyse.

Journées REPHY 2012 - Nantes, 26 et 27 septembre 2012, Tome 2/2 Compilation des interventions pour la session sanitaire, surveillance et recherche,

pp. 5-28.

Houbraken J., Frisvad J.C. et Samson R.A. (2011).

Taxonomy of *Penicillium* section *Citrina*.

Stud. Mycol., **70**, 53-138.

Howe T. et WARD J.M. (1976).

The utilization of Tween 80 as carbon source by *Pseudomonas*.

J. Gen. Microbiol., **92**, 234-235.

Hussain A., Tian M.Y., He Y.R. et Lei Y.Y. (2010).

Differential fluctuation in virulence and VOC profiles among different cultures of entomopathogenic fungi.

J. Invertebr. Pathol., **104**, 166-171.

Hutter B., Schaab C., Albrecht S., Borgmann M., Brunner N.A., Freiberg C., Ziegelbauer K., Rock C.O., Ivanov I. et Loferer H. (2004).

Prediction of mechanisms of action of antibacterial compounds by gene expression profiling.

Antimicrob. Agents Ch., **48**, 2838-2844.

Hyde K.D., Jones E.B.G., Leano E., Pointing S.B., Poonyth A.D. et Vrijmoed L.L.P. (1998).

Role of fungi in marine ecosystems.

Biodivers. Conserv., **7**, 1147-1161.

Ianora A., Bentley M.G., Caldwell G.S., Casotti R., Cembella A.D., Engstrom-Ost J., Halsband C., Sonnenschein E., Legrand C., Llewellyn C.A., Paldaviciene A., Pilkaityte R., Pohnert G., Razinkovas A., Romano G., Tillmann U. et Vaiciute D. (2011).

The relevance of marine chemical ecology to plankton and ecosystem function: an emerging field.

Mar. Drugs, **9**, 1625-1648.

Ianora A., Miralto A., Poulet S.A., Carotenuto Y., Buttino I., Romano G., Casotti R., Pohnert G., Wichard T., Colucci-D'Amato L., Terrazzano G. et Smetacek V. (2004).

Aldehyde suppression of copepod recruitment in blooms of a ubiquitous planktonic diatom.

Nature (London, U. K.), **429**, 403-407.

Ito E., Satake M., Ofuji K., Higashi M., Harigaya K., McMahon T. et Yasumoto T. (2002).

Chronic effects in mice caused by oral administration of sublethal doses of azaspiracid, a new marine toxin isolated from mussels.

Toxicon, **40**, 193-203.

Ito E., Satake M., Ofuji K., Kurita N., McMahon T., James K. et Yasumoto T. (2000).

Multiple organ damage caused by a new toxin azaspiracid, isolated from mussels produced in Ireland.

Toxicon, **38**, 917-930.

Ito E. et Terao K. (1994).

Injury and recovery process of intestine caused by okadaic acid and related compounds.

Nat. Toxins, **2**, 371-377.

Iwamoto C., Minoura K., Oka T., Ohta T., Hagishita S. et Numata A. (1999).

Absolute stereostructures of novel cytotoxic metabolites, penostatins A–E, from a *Penicillium* species separated from an *Enteromorpha* alga.

Tetrahedron, **55**, 14353-14368.

Jaffe K. et Blanco M.E. (1994).

Involvement of amino acids, opioids, nitric oxide, and NMDA receptors in learning and memory consolidation in crickets.

Pharmacol. Biochem. Be., **47**, 493-496.

James K.J., Saez M.J.F., Furey A. et Lehane M. (2004).

Azaspic acid poisoning, the food-borne illness associated with shellfish consumption.

Food Addit. Contam., Part A, **21**, 879-892.

Jegorov A., Hajduch M., Sulc M. et Havlicek V. (2006).

Nonribosomal cyclic peptides: specific markers of fungal infections.

J. Mass Spectrom., **41**, 563-576.

Jellett J.F., Marks L.J., Stewart J.E., Dorey M.L., Watson-Wright W. et Lawrence J.F. (1992).

Paralytic shellfish poison (saxitoxin family) bioassays: Automated endpoint determination and standardization of the *in vitro* tissue culture bioassay, and comparison with the standard mouse bioassay.

Toxicon, **30**, 1143-1156.

Jellett J.F., Stewart J.E. et Laycock M.V. (1995).

Toxicological evaluation of saxitoxin, neosaxitoxin, gonyautoxin II, gonyautoxin II plus III and decarbamoylsaxitoxin with the mouse neuroblastoma cell bioassay.

Toxicol. in Vitro, **9**, 57-65.

Jessen H.J., Schumacher A., Shaw T., Pfaltz A. et Gademann K. (2011).

A unified approach for the stereoselective total synthesis of pyridone alkaloids and their neurotoxic activity.

Angew. Chem.-Int. Edit., **50**, 4222-4226.

Jow G.M., Chou C.J., Chen B.F. et Tsai J.H. (2004).

Beauvericin induces cytotoxic effects in human acute lymphoblastic leukemia cells through cytochrome C release, caspase 3 activation: the causative role of calcium.

Cancer Lett., **216**, 165-173.

Jung J.H., Sim C.J. et Lee C.O. (1995).

Cytotoxic compounds from a two-sponge association.

J. Nat. Prod., **58**, 1722-1726.

Kamat T., Rodrigues C. et Naik C.G. (2008).

Marine-derived fungi as a source of proteases.

Indian J. Mar. Sci., **37**, 326-328.

Kavanagh F. (1947).

Activities of twenty-two antibacterial substances against nine species of bacteria.

J. Bacteriol., **54**, 761.

Kennelly P.J. (2002).

Protein kinases and protein phosphatases in prokaryotes: a genomic perspective.

FEMS Microbiol. Lett., **206**, 1-8.

Khudyakova Y.V., Pivkin M.V., Kuznetsova T.A. et Svetashev V.I. (2000).

Fungi in sediments of the sea of Japan and their biologically active metabolites.

Microbiol.-Moscow, **69**, 608-611.

Kim C.K., Cho Y.J. et Gao Z.G. (2001).

Preparation and evaluation of biphenyl dimethyl dicarboxylate microemulsions for oral delivery.

J. Control. Release, **70**, 149-155.

Kim K. et Harvell C.D. (2004).

The rise and fall of a six-year coral-fungal epizootic.

The American Naturalist, **164**, S52-S63.

Kimura S., Hashimoto Y. et Yamazato K. (1972).

Toxicity of the zoanthid *Palythoa tuberculosa*.

Toxicon, **10**, 611-617.

Kimura Y., Hamasaki T. et Nakajima H. (1986).

Stereochemistry and biological activities of LL-P880y, a pestalotin analog, produced by *Penicillium citreo-viride*.

Agricultural and Biological Chemistry, **50**, 1649-1650.

King G.F. (2007).

Modulation of insect Ca_v channels by peptidic spider toxins.

Toxicon, **49**, 513-530.

Kirihata M., Ohe M., Ichimoto I. et Ueda H. (1992).

Stereoselective synthesis of unnatural stereoisomers of LL-P880fi and LL-P880y, pestalotin analogues from *Penicillium* sp.

Biosci. Biotech. Bioch., **56**, 1825-1828.

Klaine S.J., Alvarez P.J., Batley G.E., Fernandes T.F., Handy R.D., Lyon D.Y., Mahendra S., McLaughlin M.J. et Lead J.R. (2008).

Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects.

Environ. Toxicol. Chem., **27**, 1825-1851.

Klarić M., Rumora L., Ljubanović D. et Pepeljnjak S. (2008).

Cytotoxicity and apoptosis induced by fumonisin B1, beauvericin and ochratoxin A in porcine kidney PK15 cells: effects of individual and combined treatment.

Arch. Toxicol., **82**, 247-255.

Klontz K.C., Abraham A., Plakas S.M. et Dickey R.W. (2009).

Mussel-associated azaspiracid intoxication in the United States.

Ann. Intern. Med., **150**, 361.

Kogawa A., Nomura M., Murakami J. et Kobayashi E. (1989).

The effect of free fatty acids upon the mouse tests of diarrhetic shellfish poisons and the determination of the poison components.

Article in Japanese, **50**, 1413-1418.

Kogure K., Tamplin M.L., Simidu U. et Colwell R.R. (1988).

A tissue culture assay for tetrodotoxin, saxitoxin and related toxins.

Toxicon, **26**, 191-197.

Kohlmeyer J. et Kohlmeyer E. (1979).

Marine Mycology - The Higher Fungi.

Academic Press Inc., New York. 690 p.

Kondracki M.L. et Guyot M. (1987).

Smenospongine: A cytotoxic and antimicrobial aminoquinone isolated from *Smenospongia* sp.

Tetrahedron Lett., **28**, 5815-5818.

Kong D., Aoki S., Sowa Y., Sakai T. et Kobayashi M. (2008).

Smenospongine, a sesquiterpene aminoquinone from a marine sponge, induces G1 arrest or apoptosis in different leukemia cells.

Mar. Drugs, **6**, 480-488.

Kong D., Yamori T., Kobayashi M. et Duan H. (2011).

Antiproliferative and antiangiogenic activities of smenospongine, a marine sponge sesquiterpene aminoquinone.

Mar. Drugs, **9**, 154-161.

Kong K., Romo D. et Lee C. (2009).

Enantioselective total synthesis of the marine toxin (-) gymnodimine employing a Barbier-Type macrocyclization.

Angew. Chem.-Int. Edit., **48**, 7402-7405.

Korsnes M.S., Hetland D.L., Espenes A., Tranulis M.A. et Aune T. (2006).

Apoptotic events induced by yessotoxin in myoblast cell lines from rat and mouse.

Toxicol. in Vitro, **20**, 1077-1087.

Kreuzer M.P., O'Sullivan C.K. et Guilbault G.G. (1999).

Development of an ultrasensitive immunoassay for rapid measurement of okadaic acid and its isomers.

Anal. Chem., **71**, 4198-4202.

Kulagina N.V., Twiner M.J., Hess P., McMahon T., Satake M., Yasumoto T., Ramsdell J.S., Doucette G.J., Ma W. et O'Shaughnessy T.J. (2006).

Azaspiracid-1 inhibits bioelectrical activity of spinal cord neuronal networks.

Toxicon, **47**, 766-773.

Kuramoto M., Arimoto H. et Uemura D. (2004).

Bioactive alkaloids from the sea: A review.

Mar. Drugs, **2**, 39-54.

Labrousse H., Pauillac S., Legrand A.M. et Avrameas S. (1992).

Utilisation de larves de diptères pour la détection de poissons ciguatoxiques.

B. Soc. Pathol. Exot., **85**, 529.

Lacey M.S. (1950).

The antibiotic properties of fifty-two strains of *Fusarium*.

J. Gen. Microbiol., **4**, 122-131.

Lacoste A., Jalabert F., Malham S., Cueff A., Gélébart F., Cordevant C., Lange M. et S.A. P. (2001).

A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France).

Dis. Aquat. Organ., **46**, 139-145.

Landreau A., Pouchus Y.F., Biard J.F., Boumard M.C., Sallenave C. et Verbist J.F. (2000).

Purification of toxic metabolites by a strain of *Trichoderma koningii*.

Toxicon, **38**,

Larsen K., Petersen D., Wilkins A.L., Samdal I.A., Sandvik M., Rundberget T., Goldstone D., Arcus V., Hovgaard P., Rise F., Rehmann N., Hess O.P. et Miles C.O. (2007).

Clarification of the C-35 stereochemistries of dinophysistoxin-1 and dinophysistoxin-2 and its consequences for binding to protein phosphatase.

Chem. Res. Toxicol., **20**, 868-875.

Le Gall S., Hassen M.B. et Le Gall P. (1997).

Ingestion of a bacterivorous ciliate by the oyster *Crassostrea gigas*: protozoa as a trophic link between picoplankton and benthic suspension-feeders.

Mar Ecol.- Progr. Ser., **152**, 301-306.

Le Roux F., Goubet A., Thompson F.L., Faury N., Gay M., Swings J. et Saulnier D. (2005).

Vibrio gigantis sp. nov., isolated from the haemolymph of cultured oysters (*Crassostrea gigas*).

Int. J. Syst. Evol. Micr., **55**, 2251-2255.

Ledreux A., Serandour A.-L., Morin B., Derick S., Lancelleur R., Hamlaoui S., Furger C., Bire R., Kryz S., Fessard V., Troussellier M. et Bernard C. (2012).

Collaborative study for the detection of toxic compounds in shellfish extracts using cell-based assays. Part II: application to shellfish extracts spiked with lipophilic marine toxins.

Anal. Bioanal. Chem., **403**, 1995-2007.

Legrand C., Granéli E. et Carlsson P. (1998).

Induced phagotrophy in the photosynthetic dinoflagellate *Heterocapsa triquetra*.

Aquat. Microb. Ecol., **15**, 65-75.

Legrand C., Rengefors K., Fistarol G.O. et Granéli E. (2003).

Allelopathy in phytoplankton - biochemical, ecological and evolutionary aspects.

Phycologia, **42**, 406-419.

Leira F., Alvarez C., Vieites J.M., Vieytes M.R. et Botana L.M. (2001).

Study of cytoskeletal changes induced by okadaic acid in BE(2)-M17 cells by means of a quantitative fluorimetric microplate assay.

Toxicol. in Vitro, **15**, 277-282.

Leira F., Alvarez C., Vieites J.M., Vieytes M.R. et Botana L.M. (2002a).

Characterization of distinct apoptotic changes induced by okadaic acid and yessotoxin in the BE(2)-M17 neuroblastoma cell line.

Toxicol. in Vitro, **16**, 23-31.

Leira F., Cabado A.G., Vieytes M.R., Roman Y., Alfonso A., Botana L.M., Yasumoto T., Malaguti C. et Rossini G.P. (2002b).

Characterization of F-actin depolymerization as a major toxic event induced by pectenotoxin-6 in neuroblastoma cells.

Biochem. Pharmacol., **63**, 1979-1988.

Leisner J.J., Laursen B.G., Prévost H., Drider D. et Dalgaard P. (2007).

Carnobacterium: positive and negative effects in the environment and in foods.

FEMS Microbiol. Rev., **31**, 592-613.

Leland J.E., McGuire M.R., Grace J.A., Jaronski S.T., Ulloa M., Park Y.-H. et Plattner R.D. (2005).

Strain selection of a fungal entomopathogen, *Beauveria bassiana*, for control of plant bugs (*Lygus* spp.) (Heteroptera: Miridae).

Biol. Control, **35**, 104-114.

Lenoir S., Ten-Hage L., Turquet J., Quod J.P., Bernard C. et Hennion M.-C. (2004).

First evidence of palytoxin analogues from an *Ostreopsis mascarenensis* (Dinophyceae) benthic bloom in southwestern Indian ocean.

J. Phycol., **40**, 1042-1051.

Levinton J., Ward J. et Shumway S. (2002).

Feeding responses of the bivalves *Crassostrea gigas* and *Mytilus trossulus* to chemical composition of fresh and aged kelp detritus.

Marine Biology, **141**, 367-376.

Ley S.V., Humphries A.C., Eick H., Downham R., Ross A.R., Boyce R.J., Pavey J.B. et Pietruszka J. (1998).

Total synthesis of the protein phosphatase inhibitor okadaic acid.

Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1, 3907-3912.

Li Q. et Wang G. (2009).

Diversity of fungal isolates from three Hawaiian marine sponges.

Microbiol. Res., **164**, 233-241.

Lin H.I., Lee Y.J., Chen B.F., Tsai M.C., Lu J.L., Chou C.J. et Jow G.M. (2005).

Involvement of Bcl-2 family, cytochrome C and caspase 3 in induction of apoptosis by beauvericin in human non-small cell lung cancer cells.

Cancer Lett., **230**, 248-259.

Lindholm T. et Nummelin C. (1999).

Red tide of the dinoflagellate *Heterocapsa triquetra* (Dinophyta) in a ferry-mixed coastal inlet.

Hydrobiologia, **393**, 245-251.

Logrieco A., Moretti A., Castella G., Kostecki M., Golinski P., Ritieni A. et Chelkowski J. (1998).

Beauvericin production by *Fusarium* species.

Appl. Environ. Microb., **64**, 3084-3088.

Lopez-Rivera A., O'Callaghan K., Moriarty M., O'Driscoll D., Hamilton B., Lehane M., James K.J. et Furey A. (2010).

First evidence of azaspiracids (AZAs): A family of lipophilic polyether marine toxins in scallops (*Argopecten purpuratus*) and mussels (*Mytilus chilensis*) collected in two regions of Chile.

Toxicon, **55**, 692-701.

Luo D.Q., Zhang L., Shi B.Z. et Song X.M. (2012).

Two new oxysporone derivatives from the fermentation broth of the endophytic plant fungus *Pestalotiopsis karstenii* isolated from stems of *Camellia sasanqua*.

Molecules, **17**, 8554-8560.

Malagoli D., Marchesini E. et Ottaviani E. (2006).

Lysosomes as the target of yessotoxin in invertebrate and vertebrate cell lines.

Toxicol. Lett., **167**, 75-83.

Malaguti C., Ciminiello P., Fattorusso E. et Rossini G.P. (2002a).

Caspase activation and death induced by yessotoxin in HeLa cells.

Toxicol. in Vitro, **16**, 357-363.

Malaguti C., Milandri A., Poletti R. et Rossini G.P. (2002b).

Cytotoxic responses to unfractionated extracts from digestive glands of mussels.

Toxicon, **40**, 573-578.

Mancini L., D'Angelo A.M., Pierdominici E., Ferrari C., Anselmo A., Venturi L., Fazzo L., Formichetti P., Iaconelli M. et Pennelli B. (2005).

Microbiological quality of Italian beach sands.

Microchem. J., **79**, 257-261.

Manger R.L., Leja L.S., Lee S.Y., Hungerford J.M. et Wekell M.M. (1993).

Tetrazolium-based cell bioassay for neurotoxins active on voltage-sensitive sodium channels: Semiautomated assay for saxitoxins, brevetoxins, and ciguatoxins.

Anal. Biochem., **214**, 190-194.

Mangialajo L., Ganzin N., Accoroni S., Asnaghi V., Blanfuné A., Cabrini M., Cattaneo-Vietti R., Chavanon F., Chiantore M., Cohu S., Costa E., Fornasaro D., Grossel H., Marco-Miralles F., Masó M., Reñé A., Rossi A.M., Sala M.M., Thibaut T., Totti C., Vila M. et Lemée R. (2011).

Trends in *Ostreopsis* proliferation along the northern Mediterranean coasts.

Toxicon, **57**, 408-420.

Mao B.Z., Huang C., Yang G.M., Chen Y.Z. et Chen S.Y. (2010).

Separation and determination of the bioactivity of oosporein from *Chaetomium cupreum*.

Afr. J. Biotechnol., **9**, 5955-5961.

Matallah-Boutiba A., Ruiz N., Sallenave-Namont C., Grovel O., Amiard J.C., Pouchus Y.F. et Boutiba Z. (2012).

Screening for toxigenic marine-derived fungi in Algerian mussels and their immediate environment.

Aquaculture, **342-343**, 75-79.

Matheus Pomini A., Trevisan Ferreira D., Braz-Filho R., Ostrensky Saridakis H., Schmitz W., Kazue Ishikawa N. et Faccione M. (2006).

A new method for asperphenamate synthesis and its antimicrobial activity evaluation.

Nat. Prod. Res., **20**, 537-541.

Matsuda D., Namatame I., Tomoda H., Kobayashi S., Zocher R., Kleinkauf H. et Omura S. (2004).

New beauveriolides produced by amino acid-supplemented fermentation of *Beauveria* sp. FO-6979.

J. Antibiot., **57**, 1-9.

Maurer D., Bec B., Neaud-Masson N., Rumebe M., Auby I. et Grémare A. (2010).

Etude des relations entre le phytoplancton et les phénomènes de toxicité d'origine inconnue dans le Bassin d'Arcachon.

Tâche T3b du Programme National Arcachon : "Toxicité due à des espèces phytoplanctoniques réputées toxiques ou encore méconnues dans le Bassin d'Arcachon", **100 p.**,

Mayer A.M.S. et Gustafson K.R. (2003).

Marine pharmacology in 2000: Antitumor and cytotoxic compounds.

Int. J. Cancer, **105**, 291-299.

Mayer A.M.S., Rodríguez A.D., Berlinck R.G.S. et Hamann M.T. (2007).

Marine pharmacology in 2003–4: Marine compounds with anthelmintic antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action.

Comp. Biochem. Phys. C, **145**, 553-581.

Mayer A.M.S., Rodríguez A.D., Berlinck R.G.S. et Hamann M.T. (2009).

Marine pharmacology in 2005–6: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action.

BBA-Gen. Subjects, **1790**, 283-308.

McCarron P., Rourke W.A., Hardstaff W., Pooley B. et Quilliam M.A. (2012).

Identification of pinnatoxins and discovery of their fatty acid ester metabolites in mussels (*Mytilus edulis*) from Eastern Canada.

J. Agr. Food Chem., **60**, 1437-1446.

McCauley J.A., Nagasawa K., Lander P.A., Mischke S.G., Semones M.A. et Kishi Y. (1998).

Total synthesis of pinnatoxin A.

J. Am. Chem. Soc., **120**, 7647-7648.

McNabb P. (2008).

Diarrheic episodes: Phosphatase Inhibitors.

Seafood and Freshwater Toxins - *Pharmacology, Physiology and Detection* Second Edition, Botana, L.M. (Ed.)

CRC Press Taylor&Francis Group, p. 941.

Meca G., Sospedra I., Soriano J.M., Ritieni A., Moretti A. et Mañes J. (2010a).

Antibacterial effect of the bioactive compound beauvericin produced by *Fusarium proliferatum* on solid medium of wheat.

Toxicon, **56**, 349-354.

Meca G., Zinedine A., Blesa J., Font G. et Mañes J. (2010b).

Further data on the presence of *Fusarium* emerging mycotoxins enniatins, fusaproliferin and beauvericin in cereals available on the Spanish markets.

Food Chem. Toxicol., **48**, 1412-1416.

Miles C.O., Samdal I.A., Aasen J.A.G., Jensen D.J., Quilliam M.A., Petersen D., Briggs L.M., Wilkins A.L., Rise F., Cooney J.M. et MacKenzie A.L. (2005).

Evidence for numerous analogs of yessotoxin in *Protoceratium reticulatum*.

Harmful Algae, **4**, 1075-1091.

Miles C.O., Wilkins A.L., Hawkes A.D., Jensen D.J., Selwood A.I., Beuzenberg V., MacKenzie A.L., Cooney J.M. et Holland P.T. (2006).

Isolation and identification of pectenotoxins-13 and -14 from *Dinophysis acuta* in New Zealand.

Toxicon, **48**, 152-159.

Miles C.O., Wilkins A.L., Munday R., Dines M.H., Hawkes A.D., Briggs L.R., Sandvik M., Jensen D.J., Cooney J.M., Holland P.T., Quilliam M.A., MacKenzie A.L., Beuzenberg V. et Towers N.R. (2004a).

Isolation of pectenotoxin-2 from *Dinophysis acuta* and its conversion to pectenotoxin-2 seco acid, and preliminary assessment of their acute toxicities.

Toxicon, **43**, 1-9.

Miles C.O., Wilkins A.L., Samdal I.A., Sandvik M., Petersen D., Quilliam M.A., Naustvoll L.J., Rundberget T., Torgersen T., Hovgaard P., Jensen D.J. et Cooney J.M. (2004b).

A novel pectenotoxin, PTX-12, in *Dinophysis* spp. and shellfish from Norway.

Chem. Res. Toxicol., **17**, 1423-1433.

Miralto A., Barone G., Romano G., Poulet S.A., Ianora A., Russo G.L., Buttino I., Mazzarella G., Laabir M., Cabrini M. et Giacobbe M.G. (1999).

The insidious effect of diatoms on copepod reproduction.

Nature, **402**, 173-176.

Moake M.M., Padilla-Zakour O.I. et Worobo R.W. (2005).

Comprehensive review of patulin control methods in foods.

Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, **4**, 8-21.

Mochizuki K., Ohmori K., Tamura H., Shizuri Y., Nishiyama S., Miyoshi E. et Yamamura S. (1993).

The structures of bioactive cyclodepsipeptides, beauveriolides I and II, metabolites of entomopathogenic fungi *Beauveria* sp.

B. Chem. Soc. Jpn., **66**, 3041-3046.

Moore R.E. et Bartolini G. (1981).

Structure of palytoxin.

J. Am. Chem. Soc., **103**, 2491-2494.

Moore R.E. et Scheuer P.J. (1971).

Palytoxin: a new marine toxin from a coelenterate.

Science, **172**, 495-498.

Moore S.K., Trainer V.L., Mantua N.J., Parker M.S., Laws E.A., Backer L.C. et Fleming L.E. (2008).

Impacts of climate variability and future climate change on harmful algal blooms and human health.

Environmental Health, **7**, S4.

Mosmann T. (1983).

Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays.

J. Immunol. Methods, **65**, 55-63.

Munday R. (2008).

Toxicology of the pectenotoxins.

Seafood and Freshwater Toxins - *Pharmacology, Physiology and Detection* Second Edition, Botana, L.M. (Ed.)

CRC Press Taylor&Francis Group, p. 941.

Munday R., Selwood A.I. et Rhodes L. (2012).

Acute toxicity of pinnatoxins E, F and G to mice.

Toxicon, **60**, 995-999.

Munday R., Towers N.R., Mackenzie L., Beuzenberg V., Holland P.T. et Miles C.O. (2004).

Acute toxicity of gymnodimine to mice.

Toxicon, **44**, 173-178.

Munro M.H.G. et Blunt J.W., 2011

Marine Literature Database, Version 13.5. Marine Chemistry Group, Department of Chemistry - University of Canterbury, Christchurch, New Zealand; 2007.

Murata M., Kumagai M., Lee J.S. et Yasumoto T. (1987).

Isolation and structure of yessotoxin, a novel polyether compound implicated in diarrhetic shellfish poisoning.

Tetrahedron Lett., **28**, 5869-5872.

Nagai H., Satake M. et Yasumoto T. (1990).

Antimicrobial activities of polyether compounds of dinoflagellate origins.

J. Appl. Phycol., **2**, 305-308.

Nagaoka T., Nakata K., Kouno K. et Ando T. (2004).

Antifungal activity of oosporein from an antagonistic fungus against *Phytophthora infestans*.

J. Bioscience, **59**, 302-304.

Nagasawa K. (2000).

Total synthesis of pinnatoxin A.

J. Synth. Org. Chem. Jpn., **58**, 877-886.

Nakamura S., Inagaki J., Kudo M., Sugimoto T., Obara K., Nakajima M. et Hashimoto S. (2002).

Studies directed toward the total synthesis of pinnatoxin A: synthesis of the 6,5,6-dispiroketal (BCD ring) system by double hemiketal formation/hetero-Michael addition strategy.

Tetrahedron, **58**, 10353-10374.

Namatame I., Tomoda H., Ishibashi S. et Ōmura S. (2004).

Antiatherogenic activity of fungal beauveriolides, inhibitors of lipid droplet accumulation in macrophages.

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **101**, 737-742.

Namatame I., Tomoda H., Si S., Yamaguchi Y., Masuma R. et Omura S. (1999).

Beauveriolides, specific inhibitors of lipid droplet formation in mouse macrophages, produced by *Beauveria* sp. FO-6979.

J. Antibiot., **52**, 1.

Nataro J.P. et Kaper J.B. (1998).

Diarrheagenic *Escherichia coli*.

Clin. Microbiol. Rev., **11**, 142-201.

Nézan E. et Chomerat N. (2011).

Vulcanodinium rugosum gen. nov., sp. nov. (Dinophyceae): a new marine dinoflagellate from the French Mediterranean coast.

Cryptogam. Algol., **32**, 3-18.

Nicolaou K., Li Y., Uesaka N., Koftis T.V., Vyskocil S., Ling T., Govindasamy M., Qian W., Bernal F. et Chen D.Y.K. (2003).

Total synthesis of the proposed Azaspiracid-1 structure, Part 1: Construction of the enantiomerically pure C1–C20, C21–C27, and C28–C40 fragments.

Angew. Chem.-Int. Edit., **115**, 3771-3776.

Nicolaou K.C., Koftis T.V., Vyskocil S., Petrovic G., Tang W., Frederick M.O., Chen D.Y.K., Li Y., Ling T. et Yamada Y.M.A. (2006).

Total synthesis and structural elucidation of azaspiracid-1. Final assignment and total synthesis of the correct structure of azaspiracid-1.

J. Am. Chem. Soc., **128**, 2859-2872.

Nicolle C. (1933).

Destin des maladies infectieuses.

Paris. 278 p.

Nielsen K.J. et Smedsgaard J. (2003).

Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid chromatography–UV–mass spectrometry methodology.

J. Chromatogr. A, **1002**, 111-136.

Nilanonta C., Isaka M., Kittakoop P., Palittapongarnpim P., Kamchonwongpaisan S., Pittayakhajonwut D., Tanticharoen M. et Thebtaranonth Y. (2000).

Antimycobacterial and antiplasmodial cyclodepsipeptides from the insect pathogenic fungus *Paecilomyces tenuipes* BCC 1614.

Planta Med., **66**, 756-758.

Nishiwaki S., Fujiki H., Suganuma M., Furuya-Suguri H., Matsushima R., Iida Y., Ojika M., Yamada K., Uemura D., Yasumoto T., Schmitz F.J. et Sugimura T. (1990).

Structure-activity relationship within a series of okadaic acid derivatives.

Carcinogenesis, **11**, 1837-1841.

Ofuji K., Satake M., McMahon T., James K.J., Naoki H., Oshima Y. et Yasumoto T. (2001).

Structures of azaspiracid analogs, azaspiracid-4 and azaspiracid-5, causative toxins of azaspiracid poisoning in Europe.

Biosci. Biotech. Bioch., **65**, 740-742.

Ofuji K., Satake M., McMahon T., Silke J., James K.J., Naoki H., Oshima Y. et Yasumoto T. (1999).

Two analogs of azaspiracid isolated from mussels, *Mytilus edulis*, involved in human intoxication in Ireland.

Nat. Toxins, **7**, 99-102.

Ogino H., Kumagai M. et Yasumoto T. (1997).

Toxicologic evaluation of yessotoxin.

Nat. Toxins, **5**, 255-259.

Onuma Y., Satake M., Ukena T., Roux J., Chanteau S., Rasolofonirina N., Ratsimaloto M., Naoki H. et Yasumoto T. (1999).

Identification of putative palytoxin as the cause of clupectoxism.

Toxicon, **37**, 55-65.

Oros G., Cserhádi T., Fenyvesi É. et Szejtli J. (1990).

Microbial decomposition of some cyclodextrin derivatives by bacteria associated with plants.

Int. Biodeterior., **26**, 33-42.

Osborne R.H. (1996).

Insect neurotransmission: Neurotransmitters and their receptors.

Pharmacol. Ther., **69**, 117-142.

Otero A., Chapela M.J., Atanassova M., Vieites J.M. et Cabado A.G. (2011).

Cyclic imines: Chemistry and mechanism of action: A review.

Chem. Res. Toxicol., **24**, 1817-1829.

Overy D.P., Smedsgaard J., Frisvad J.C., Phipps R.K. et Thrane U. (2006).

Host-derived media used as a predictor for low abundant, *in planta* metabolite production from necrotrophic fungi.

J. Appl. Microbiol., **101**, 1292-1300.

Ozawa S., Kamiya H. et Tsuzuki K. (1998).

Glutamate receptors in the mammalian central nervous system.

Prog. Neurobiol., **54**, 581-618.

Paterson R.R.M., Venâncio A. et Lima N. (2004).

Solutions to *Penicillium* taxonomy crucial to mycotoxin research and health.

Res. Microbiol., **155**, 507-513.

Patton T., Barrett J., Brennan J. et Moran N. (2006).

Use of a spectrophotometric bioassay for determination of microbial sensitivity to manuka honey.

J. Microbiol. Methods, **64**, 84-95.

Penna A., Vila M., Fraga S., Giacobbe M.G., Andreoni F., Riobó P. et Vernesi C. (2005).

Characterization of *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophyceae) isolates in the western Mediterranean sea based on morphology, toxicity and internal transcribed spacer 5.8S rDNA sequences.

J. Phycol., **41**, 212-225.

Perdue R.E. (1982).

KB cell culture. I. Role in discovery of antitumor agents from higher plants.

J. Nat. Prod., **45**, 418-426.

Perumal Samy R., Ignacimuthu S. et Raja D.P. (1999).

Preliminary screening of ethnomedicinal plants from India.

J. Ethnopharmacol., **66**, 235-240.

Petit K.E., Biard J.F., Lapied B., Grolleau F. et Hamon A., 2010

Neuroactive substance and uses of one such substance, US Patent N° 7,838,695. DC: U.S. Patent

Petrović M., Gonzalez S. et Barceló D. (2003).

Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water.

Trends in Analytical Chemistry, **22**, 685-696.

Pierce R.H., Henry M.S., Blum P.C., Hamel S.L., Kirkpatrick B., Cheng Y.S., Zhou Y., Irvin C.M., Naar J., Weidner A., Fleming L.E., Backer L.C. et Baden D.G. (2005).

Brevetoxin composition in water and marine aerosol along a Florida beach: Assessing potential human exposure to marine biotoxins.

Harmful Algae, **4**, 965-972.

Pierotti S., Malaguti C., Milandri A., Poletti R. et Paolo Rossini G. (2003).

Functional assay to measure yessotoxins in contaminated mussel samples.

Anal. Biochem., **312**, 208-216.

Pitt J.I. (1979).

The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*.

Academic Press Inc. (London) LTD, 634 p.

Poirier L., Amiard J.C., Mondeguer F., Quiniou F., Ruiz N., Pouchus Y.F. et Montagu M. (2007a).

Determination of peptaibol trace amounts in marine sediments by liquid chromatography/electrospray ionization-ion trap-mass spectrometry.

J. Chromatogr. A, **1160**, 106-113.

Poirier L., Montagu M., Landreau A., Mohamed-Benkada M., Grovel O., Sallenave-Namont C., Biard J.F., Amiard-Triquet C., Amiard J.C. et Pouchus Y.F. (2007b).

Peptaibols, stable markers of fungal development in the marine environment.

Chemistry and Biodiversity, **4**, 1116-1128.

Pouchus Y.F., Amzil Z., Marcaillou LeBaut C., James K.J. et Verbist J.F. (1997).

Specificity of the test based on modification of cell morphology for detection of lipophilic inhibitors of protein phosphatases.

Toxicon, **35**, 1137-1142.

Prosperini A., Meca G., Font G. et Ruiz M.J. (2012).

Study of the cytotoxic activity of beauvericin and fusaproliferin and bioavailability *in vitro* on Caco-2 cells.

Food Chem. Toxicol., **50**, 2356-2361.

Pruden A., Pei R., Storteboom H. et Carlson K.H. (2006).

Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: Studies in Northern Colorado.
Environ. Sci. Technol., **40**, 7445-7450.

Pruzzo C., Gallo G. et Canesi L. (2005).

Persistence of vibrios in marine bivalves: the role of interactions with haemolymph components.
Environ. Microbiol., **7**, 761-772.

Puel O., Galtier P. et Oswald I.P. (2010).

Biosynthesis and toxicological effects of patulin.
Toxins, **2**, 613-631.

Pujalte M.J., Ortigosa M., Urdaci M.C., Garay E. et Grimont P.A.D. (1993).

Vibrio mytili sp. nov., from mussels.
Int. J. Syst. Bact., **43**, 358-362.

Quilliam M. (2001).

Analytical chemistry of phycotoxins in seafood and drinking water.
J. AOAC Int., **84**, 1615.

Raccaud-Schoeller J. (1980).

Les insectes: physiologie, développement - Volume 8.
Masson, 203 p.

Rang H.P., Dale M.M. et Ritter J.M. (1995).

Pharmacology
Churchill Livingstone, 855 p.

Rasky A., Foping D., Hamman M.T. et Twiner M., 2012

Comparative ionophoric studies of the marine algal toxin azaspiracid.
American Chemical Society, pp. CHED-633.

Rehmann N., Hess P. et Quilliam M.A. (2008).

Discovery of new analogs of the marine biotoxin azaspiracid in blue mussels (*Mytilus edulis*) by ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry.
Rapid Commun. Mass Sp., **22**, 549-558.

REPHY, 2012

Cahier de Procédures REPHY 2012-2013 - Rapport DYNECO / VIGIES / 12-07 - Document de prescription, Date d'application : 1er octobre 2012.
p. 81.

Rhodes L., Smith K., Selwood A., McNabb P., Molenaar S., Munday R., Wilkinson C. et Hallegraeff G. (2011a).

Production of pinnatoxins E, F and G by scrippsielloid dinoflagellates isolated from Franklin Harbour, South Australia.
N. Z. J. Mar. Freshw. Res., **45**, 703-709.

Rhodes L., Smith K., Selwood A., McNabb P., Munday R., Suda S., Molenaar S. et Hallegraeff G. (2011b).

Dinoflagellate *Vulcanodinium rugosum* identified as the causative organism of pinnatoxins in Australia, New Zealand and Japan.
Phycologia, **50**, 624-628.

Rhodes L., Smith K., Selwood A., McNabb P., van Ginkel R., Holland P. et Munday R. (2010).

Production of pinnatoxins by a peridinioid dinoflagellate isolated from Northland, New Zealand.
Harmful Algae, **9**, 384-389.

Ringø E. (2008).

The ability of *Carnobacteria* isolated from fish intestine to inhibit growth of fish pathogenic bacteria: a screening study.
Aquac. Res., **39**, 171-180.

Ríos J.L. et Recio M.C. (2005).

Medicinal plants and antimicrobial activity.
J. Ethnopharmacol., **100**, 80-84.

Rollins M.J. et Gaucher G.M. (1994).

Ammonium repression of antibiotic and intracellular proteinase production in *Penicillium urticae*.
Appl. Microbiol. Biot., **41**, 447-455.

Roman Y., Alfonso A., Louzao M.C., de la Rosa L.A., Leira F., Vieites J.M., Vieytes M.R., Ofuji K., Satake M., Yasumoto T. et Botana L.M. (2002).

Azaspiracid-1, a potent, nonapoptotic new phycotoxin with several cell targets.
Cell. Signal., **14**, 703-716.

Roman Y., Alfonso A., Vieytes M.R., Ofuji K., Satake M., Yasumoto T. et Botana L.M. (2004).

Effects of azaspiracids 2 and 3 on Intracellular cAMP, Ca²⁺, and pH.
Chem. Res. Toxicol., **17**, 1338-1349.

Ronzitti G., Hess P., Rehmann N. et Rossini G.P. (2007).

Azaspiracid-1 alters the E-cadherin pool in epithelial cells.
Toxicol. Sci., **95**, 427-435.

Rossini G.P. (2005).

Functional assays in marine biotoxin detection.
Toxicology, **207**, 451-462.

Rossini G.P. et Hess P. (2010).

Phycotoxins: chemistry, mechanism of action and shellfish poisoning.

Clinical Toxicology, vol. 2. Luch, A. (Ed.)

"Experientia Supplementa" (EXS) book series, Birkhäuser Publishing, Basel, pp. 65-122.

Ruiz N., Petit K., Vansteelandt M., Kerzaon I., Baudet J., Amzil Z., Biard J.F., Grovel O. et Pouchus Y.F. (2010).

Enhancement of domoic acid neurotoxicity on Diptera larvae bioassay by marine fungal metabolites.

Toxicon, **55**, 805-810.

Ruiz N., Wielgosz-Collin G., Poirier L., Grovel O., Petit K.E., Mohamed-Benkada M., Robiou du Pont T., Bissett J., Vérité P., Barnathan G. et Pouchus Y.F. (2007).

New Trichobrachins, 11-residue peptaibols from a marine strain of *Trichoderma longibrachiatum*.

Peptides, **28**, 1351-1358.

Rundberget T., Aasen J.A.B., Selwood A.I. et Miles C.O. (2011).

Pinnatoxins and spirolides in Norwegian blue mussels and seawater.

Toxicon, **58**, 700-711.

Saaltink G., 1970

The infection of bulbs by *Penicillium* sp.

Ist International Symposium on Flowerbulbs,

pp. 235-241.

Sahab A.F. (2012).

Antimicrobial efficacy of secondary metabolites of *Beauveria bassiana* against selected bacteria and phytopathogenic fungi.

J. Appl. Sci. Res., **8**, 1441-1444.

Sakamoto S., Sakazaki H., Hagiwara K., Kamada K., Ishii K., Noda T., Inoue M. et Hiram M. (2004).

A formal total synthesis of (+)-pinnatoxin A.

Angew. Chem.-Int. Edit., **43**, 6505-6510.

Sallenave-Namont C., Pouchus Y.F., Robiou du Pont T., Lassus P. et Verbist J.F. (2000).

Toxigenic saprophytic fungi in marine shellfish farming areas.

Mycopathologia, **149**, 21-25.

Sallenave C., Pouchus Y.F., Bardouil M., Lassus P., Roquebert M.F. et Verbist J.F. (1999).

Bioaccumulation of mycotoxins by shellfish: Contamination of mussels by metabolites of a *Trichoderma koningii* strain isolated in the marine environment.

Toxicon, **37**, 77-83.

Samson R.A., Hoekstra E.S. et Frisvad J.C. (2004).

Introduction to food-and airborne fungi.

Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), 389 p.

Sana T.R., Roark J.C., Li X., Waddell K. et Fischer S.M. (2008).

Molecular formula and METLIN Personal Metabolite Database matching applied to the identification of compounds generated by LC/TOF-MS.

JBT, **19**, 258.

Santini A., Meca G., Uhlig S. et Ritieni A. (2012).

Fusaproliferin, beauvericin and enniatins: occurrence in food - a review.

World Mycotoxin J., **5**, 71-81.

Satake M., Ofuji K., Naoki H., James K.J., Furey A., McMahon T., Silke J. et Yasumoto T. (1998).

Azaspiracid, a new marine toxin having unique spiro ring assemblies, isolated from Irish mussels, *Mytilus edulis*.

J. Am. Chem. Soc., **120**, 9967-9968.

Schumacher M., Kelkel M., Dicato M. et Diederich M. (2011).

A survey of marine natural compounds and their derivatives with anti-cancer activity reported in 2010.

Molecules, **16**, 5629-5646.

Scott P.M., Merrien M.A. et Polonsky J. (1976).

Roquefortine and isofumigaclavine A, metabolites from *Penicillium roqueforti*.

Experientia, **32**, 140-142.

Scott P.M. et Van W.W. (1971).

Cladosporin, a new antifungal metabolite from *Cladosporium cladosporioides*.

J. Antibiot., **24**, 747-755.

Scott R.E., Jones A., Lam K.S. et Gaucher G.M. (1986).

Manganese and antibiotic biosynthesis. I. A specific manganese requirement for patulin production in *Penicillium urticae*.

Can. J. Microbiol., **32**, 259-267.

Scudiero D.A., Shoemaker R.H., Paull K.D., Monks A., Tierney S., Nofziger T.H., Currens M.J., Seniff D. et Boyd M.R. (1988).

Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines.

Cancer Res., **48**, 4827-4833.

Seger C., Erlebach D., Stuppner H., Griesser U.J. et Strasser H. (2005).

Physicochemical properties of oosporein, the major secreted metabolite of the entomopathogenic fungus *Beauveria brongniartii*.

Helv. Chim. Acta, **88**, 802-810.

Séguy E. (1951).

Ordre des dipteres.

Grassé PP (éd.), *Traité de Zoologie*, **10**, 449-744.

Seki T., Satake M., Mackenzie L., Kaspar H.F. et Yasumoto T. (1995).

Gymnodimine, a new marine toxin of unprecedented structure isolated from New Zealand oysters and the dinoflagellate, *Gymnodinium* sp.

Tetrahedron Lett., **36**, 7093-7096.

Selander E., Thor P., Toth G. et Pavia H. (2006).

Copepods induce paralytic shellfish toxin production in marine dinoflagellates.

Proc. R. Soc. B, **273**, 1673-1680.

Sellner K., Doucette G. et Kirkpatrick G. (2003).

Harmful algal blooms: causes, impacts and detection.

J. Ind. Microbiol. Biotechnol., **30**, 383-406.

Selwood A.I., Miles C.O., Wilkins A.L., Van G.R., Munday R., Rise F. et McNabb P. (2010).

Isolation, structural determination and acute toxicity of pinnatoxins E, F and G.

J. Agr. Food Chem., **58**, 6532-6542.

Sérandour A.L., Ledreux A., Morin B., Derick S., Augier E., Lanceleur R., Hamlaoui S., Moukha S., Furger C., Bire R., Kryz S., Fessard V., Troussellier M. et Bernard C. (2012).

Collaborative study for the detection of toxic compounds in shellfish extracts using cell-based assays. Part I: screening strategy and pre-validation study with lipophilic marine toxins.

Anal. Bioanal. Chem., **403**, 1983-1993.

Sheng J., An K., Deng C., Li W., Bao X. et Qiu D. (2006).

Cloning a cuticle-degrading serine protease gene with biologic control function from *Beauveria brongniartii* and its expression in *Escherichia coli*.

Curr. Microbiol., **53**, 124-128.

Shi L., Potts M. et Kennelly P.J. (1998).

The serine, threonine, and/or tyrosine-specific protein kinases and protein phosphatases of prokaryotic organisms: a family portrait.

FEMS Microbiol. Rev., **22**, 229-253.

Shibata S., Ishida Y., Kitano H., Ohizumi Y., Habon J., Tsukitani Y. et Kikuchi H. (1982).

Contractile effects of okadaic acid, a novel ionophore-like substance from black sponge, on isolated smooth muscles under the condition of Ca deficiency.

Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics, **223**, 135-143.

Shigemori H., Madono T., Sasaki T., Mikami Y. et Kobayashi J. (1994).

Nakijiquinones A and B, new antifungal sesquiterpenoid quinones with an amino acid residue from an Okinawan marine sponge.

Tetrahedron, **50**, 8347-8354.

Shiraki K., Nakaya K., Sugitani A. et Yamada F. (1985).

Determination of diarrhetic shellfish poison by using *Tetrahymena pyriformis*. II. Determination of diarrhetic shellfish poison by measuring 50% acid phosphatase activity inhibitory concentration (APIC50).

Shokuhin Eiseigaku Zasshi, **26**, 638-642.

Si A., Helliwell P. et Maleszka R. (2004).

Effects of NMDA receptor antagonists on olfactory learning and memory in the honeybee (*Apis mellifera*).

Pharmacol. Biochem. Be., **77**, 191-197.

Slijkhuis H., Van Groenestijn J.W. et Kylstra D.J. (1984).

Microthrix parvicella, a filamentous bacterium from activated sludge: Growth on Tween 80 as carbon and energy source.

J. Gen. Microbiol., **130**, 2035-2042.

Slinkina N., Pivkin M. et Polokhin O. (2010).

Filamentous fungi of the submarine soils of the Sakhalin Gulf (Sea of Okhotsk).

Russian Journal of Marine Biology, **36**, 413-418.

Smith D.S. et Kitts D.D. (1995).

Enzyme immunoassay for the determination of domoic acid in mussel extracts.

J. Agr. Food Chem., **43**, 367-371.

Smith K.F., Rhodes L.L., Suda S. et Selwood A.I. (2011).

A dinoflagellate producer of pinnatoxin G, isolated from sub-tropical Japanese waters.

Harmful Algae, **10**, 702-705.

Sournia A., Chrétiennot-Dinet M.J. et Ricard M. (1991).

Marine phytoplankton: how many species in the world ocean?

J. Plankton Res., **13**, 1093-1099.

Spector I., Braet F., Shochet N.R. et Bubb M.R. (1999).

New anti-actin drugs in the study of the organization and function of the actin cytoskeleton.

Microsc. Res. Techniq., **47**, 18-37.

Stahl P., Kissau L., Mazitschek R., Huwe A., Furet P., Giannis A. et Waldmann H. (2001).

Total synthesis and biological evaluation of the nakijiquinones.

J. Am. Chem. Soc., **123**, 11586-11593.

Stivala C.E. et Zakarian A. (2008).

Total synthesis of (+)-pinnatoxin A.

J. Am. Chem. Soc., **120**, 7647-7648.

Stolk A.C. et Samson R.A. (1985).

A new taxonomic scheme for *Penicillium* anamorphs.

Advances in *Penicillium* and *Aspergillus* systematics, Plenum Press, N.Y. (Ed.)

pp. 163-192.

Suganuma M., Fujiki H., Suguri H., Yoshizawa S., Hirota M., Nakayasu M., Ojika M., Wakamatsu K., Yamada K. et Sugimura T. (1988).

Okadaic acid: an additional non-phorbol-12-tetradecanoate-13-acetate-type tumor promoter.

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **85**, 1768-1771.

Suresh P. et Chandrasekaran M. (1999).

Impact of process parameters on chitinase production by an alkalophilic marine *Beauveria bassiana* in solid state fermentation.

Process Biochem., **34**, 257-267.

Surh J., Ryu J.S. et Kwon H. (2003).

Seasonal variations of fatty acid compositions in various korean shellfish.

J. Agr. Food Chem., **51**, 1617-1622.

Suthers B.D., Jacobs M.F. et Kitching W. (1998).

Synthesis and NMR profiling of dioxabicyclo 3.2.1 octanes related to pinnatoxin D. Confirmation of the relative stereochemistry about rings E and F.

Tetrahedron Lett., **39**, 2621-2624.

Suzuki H. (2012).

Susceptibility of different mice strains to okadaic acid, a diarrhetic shellfish poisoning toxin.

Food Addit. Contam., Part A, **29**, 1307-1310.

Suzuki T. (2008).

Chemistry, metabolism, and chemical detection methods of pectenotoxins.

Seafood and Freshwater Toxins - *Pharmacology, Physiology and Detection* Second Edition, Botana, L.M. (Ed.)

CRC Press Taylor&Francis Group, p. 941.

Suzuki T. et Watanabe R. (2012).

Shellfish toxin monitoring system in Japan and some Asian countries.

New Trends in Marine and Freshwater Toxins, Food and Safety Concerns; Cabado, A., Vieites, JM, Eds. (Ed.)

NOVA: New York, NY, USA, pp. 305-314.

Suzuki T., Yoshizawa R., Kawamura T. et Yamasaki M. (1996).

Interference of free fatty acids from the hepatopancreas of mussels with the mouse bioassay for shellfish toxins.

Lipids, **31**, 641-645.

Tachibana K., Scheuer P.J., Tsukitani Y., Kikuchi H., Van E.D., Clardy J., Gopichand Y. et Schmitz F.J. (1981).

Okadaic acid, a cytotoxic polyether from two marine sponges of the genus *Halichondria*.

J. Am. Chem. Soc., **103**, 2469-2471.

Takada N., Umemura N., Suenaga K., Chou T., Nagatsu A., Haino T., Yamada K. et Uemura D. (2001a).

Pinnatoxins B and C, the most toxic components in the pinnatoxin series from the Okinawan bivalve *Pinna muricata*.

Tetrahedron Lett., **42**, 3491-3494.

Takada N., Umemura N., Suenaga K. et Uemura D. (2001b).

Structural determination of pteriatoxins A, B and C, extremely potent toxins from the bivalve *Pteria penguin*.

Tetrahedron Lett., **42**, 3495-3497.

Takagi T., Hayashi K. et Itabashi Y. (1984).

Toxic effect of free unsaturated fatty acids in the mouse assay of diarrhetic shellfish toxin by intraperitoneal injection.

Nippon Suisan Gakk., **50**, 1413-1418.

Takahashi C., Numata A., Yamada T., Minoura K., Enomoto S., Konishi K., Nakai M., Matsuda C. et Nomoto K. (1996).

Penostatins, novel cytotoxic metabolites from a *Penicillium* species separated from a green alga.

Tetrahedron Lett., **37**, 655-658.

Takai A., Bialojan C., Troschka M. et Caspar Rüegg J. (1987).

Smooth muscle myosin phosphatase inhibition and force enhancement by black sponge toxin.

FEBS Lett., **217**, 81-84.

Terao K., Ito E., Ohkusu M. et Yasumoto T. (1993).

A comparative study of the effects of DSP-toxins on mice and rats.

Dev. Mar. Biol., **3**, 581-586.

Thirunavukkarasu N., Suryanarayanan T., Girivasan K., Venkatachalam A., Geetha V., Ravishankar J. et Doble M. (2011).

Fungal symbionts of marine sponges from Rameswaram, southern India: species composition and bioactive metabolites.

Fungal Diversity, **55**, 37-46.

Thom C. (1930).

The Penicillia.

Williams and Wilkins, Baltimore

644 p.

Thompson F.L., Iida T. et Swings J. (2004).

Biodiversity of *Vibrios*.

Microbiol. Mol. Biol. R., **68**, 403-431.

Tillmann U., Elbrachter M., Krock B., John U. et Cembella A. (2009).

Azadinium spinosum gen. et sp nov (Dinophyceae) identified as a primary producer of azaspiracid toxins.
Eur. J. Phycol., **44**, 63-79.

Toma B. et Thiry E. (2003).

Qu'est-ce qu'une maladie émergente ?
Epidémiologie et santé animale, **44**, 1-11.

Tomoda H. et Doi T. (2007).

Discovery and combinatorial synthesis of fungal metabolites beauveriolides, novel antiatherosclerotic agents.
Accounts Chem. Res., **41**, 32-39.

Torigoe K., Murata M., Yasumoto T. et Iwashita T. (1988).

Prorocentrolide, a toxic nitrogenous macrocycle from a marine dinoflagellate, *Prorocentrum lima*.
J. Am. Chem. Soc., **110**, 7876-7877.

Torrado A., Vázquez J.A., Prieto M.Á., Fuciños P., Montemayor M.I., Pastrana L., González M.P. et Murado M.Á. (2013).

Amylase production by *Aspergillus oryzae* in a solid-state bioreactor with fed-batch operation using mussel processing wastewaters as feeding medium.
J. Chem. Technol. Biot., **88**, 226-236.

Trotureau S. (2012).

Point sur l'évolution du dispositif de surveillance des toxines lipophiles par analyse chimique.
Journées REPHY 2012 - Nantes, 26 et 27 septembre 2012, Tome 2/2 Compilation des interventions pour la session sanitaire, surveillance et recherche,
pp. 29-45.

Tsumuraya T., Takeuchi K., Yamashita S., Fujii I. et Hiram M. (2012).

Development of a monoclonal antibody against the left wing of ciguatoxin CTX1B: Thiol strategy and detection using a sandwich ELISA.
Toxicon, **60**, 348-357.

Tubaro A., Florio C., Luxich E., Sosa S., DellaLoggia R. et Yasumoto T. (1996a).

A protein phosphatase 2A inhibition assay for a fast and sensitive assessment of okadaic acid contamination in mussels.
Toxicon, **34**, 743-752.

Tubaro A., Florio C., Luxich E., Vertua R., Loggia R.D. et Yasumoto T. (1996b).

Suitability of the MTT-based cytotoxicity assay to detect okadaic acid contamination of mussels.
Toxicon, **34**, 965-974.

Tubaro A., Sosa S., Bornancin A. et Hungerford J. (2008).

Pharmacology and toxicology of diarrhetic shellfish toxins.
Seafood and Freshwater Toxins - *Pharmacology, Physiology and Detection* Second Edition, Botana, L.M. (Ed.)
CRC Press Taylor & Francis Group, p. 941.

Tubaro A., Sosa S., Carbonatto M., Altinier G., Vita F., Melato M., Satake M. et Yasumoto T. (2003).

Oral and intraperitoneal acute toxicity studies of yessotoxin and homoyessotoxins in mice.

Toxicon, **41**, 783-792.

Turcotte C., Lacroix C., Kheadr E., Grignon L. et Fliss I.I. (2004).

A rapid turbidometric microplate bioassay for accurate quantification of lactic acid bacteria bacteriocins.

Int. J. Food. Microbiol., **90**, 283-293.

Twiner M.J., El-Ladki R., Kilcoyne J. et Doucette G.J. (2012a).

Comparative effects of the marine algal toxins azaspiracid-1, -2, and -3 on jurkat T lymphocyte cells.

Chem. Res. Toxicol., **25**, 747-754.

Twiner M.J., Hanagriff J.C., Butler S., Madhkoor A.K. et Doucette G.J. (2012b).

Induction of apoptosis pathways in several cell lines following exposure to the marine algal toxin azaspiracid.

Chem. Res. Toxicol., **25**, 1493-1501.

Twiner M.J., Hess P., Dechraoui M.Y.B., McMahon T., Samons M.S., Satake M., Yasumoto T., Ramsdell J.S. et Doucette G.J. (2005).

Cytotoxic and cytoskeletal effects of azaspiracid-1 on mammalian cell lines.

Toxicon, **45**, 891-900.

Twiner M.J., Rehmann N., Hess P. et Doucette G.J. (2008).

Azaspiracid shellfish poisoning: A review on the chemistry, ecology, and toxicology with an emphasis on human health impacts.

Mar. Drugs, **6**, 39-72.

Tzean S., Hsieh L. et Wu W. (1997).

Atlas of entomopathogenic fungi from Taiwan.

214 p.

Uemura D., Chou T., Haino T., Nagatsu A., Fukuzawa S., Zheng S.Z. et Chen H.S. (1995).

Pinnatoxin-A a toxic amphoteric macrocycle from the Okinawan bivalve *Pinna muricata*.

J. Am. Chem. Soc., **117**, 1155-1156.

Vale C., Gomez-Limia B., Nicolaou K.C., Frederick M.O., Vieytes M.R. et Botana L.M. (2007).

The c-Jun-N-terminal kinase is involved in the neurotoxic effect of azaspiracid-1.

Cell. Physiol. Biochem., **20**, 957-966.

Vale P. (2006).

Differential dynamics of dinophysistoxins and pectenotoxins, part II: Offshore bivalve species.

Toxicon, **47**, 163-173.

Vale P. et Sampayo M.A.D. (2002a).

First confirmation of human diarrhoeic poisonings by okadaic acid esters after ingestion of razor clams (*Solen marginatus*) and green crabs (*Carcinus maenas*) in Aveiro lagoon, Portugal and detection of okadaic acid esters in phytoplankton.

Toxicon, **40**, 989-996.

Vale P. et Sampayo M.A.D. (2002b).

Pectenotoxin-2 seco acid, 7-epi-pectenotoxin-2 seco acid and pectenotoxin-2 in shellfish and plankton from Portugal.

Toxicon, **40**, 979-987.

Van Dover C.L., Ward M.E., Scott J.L., Underdown J., Anderson B., Gustafson C., Whalen M. et Carnegie R.B. (2007).

A fungal epizootic in mussels at a deep-sea hydrothermal vent.

Mar. Ecol., **28**, 54-62.

Vansteelandt M., 2011

Métabolites fongiques d'origine marine : isolement et caractérisation de substances antiprolifératives de *Penicillium* spp. Thèse de Doctorat, Université de Nantes, UFR des Sciences Pharmaceutiques.

365 p.

Vansteelandt M., Kerzaon I., Blanchet E., Fossi Tankoua O., Robiou Du Pont T., Joubert Y., Monteau F., Le Bizec B., Frisvad J.C., Pouchus Y.F. et Grovel O. (2012).

Patulin and secondary metabolite production by marine-derived *Penicillium* strains.

Fungal Biology, **116**, 954-961.

Vendrell D., Balcázar J.L., Ruiz-Zarzuola I., de Blas I., Gironés O. et Múzquiz J.L. (2006).

Lactococcus garvieae in fish: a review.

Comp. Immunol. Microbiol., **29**, 177-198.

Venkatasubbaiah P., Grand L. et Van Dyke C.G. (1991).

A new species of *Pestalotiopsis* on *Oenothera*.

Mycologia, **83**, 511-513.

Vieytes M.R., Fontal O.I., Leira F., deSousa J. et Botana L.M. (1997).

A fluorescent microplate assay for diarrheic shellfish toxins.

Anal. Biochem., **248**, 258-264.

Vilariño N. et Espiña B. (2008).

Pharmacology of pectenotoxins.

Seafood and Freshwater Toxins - *Pharmacology, Physiology and Detection* Second Edition, Botana, L.M. (Ed.)

CRC Press Taylor & Francis Group, p. 941.

Vilariño N., Nicolaou K.C., Frederick M.O., Cagide E., Ares I.R., Louzao M.C., Vieytes M.R. et Botana L.M. (2006).

Cell growth inhibition and actin cytoskeleton disorganization induced by azaspiracid-1 structure-activity studies.

Chem. Res. Toxicol., **19**, 1459-1466.

Vilariño N., Nicolaou K.C., Frederick M.O., Vieytes M.R. et Botana L.M. (2007).

Irreversible cytoskeletal disarrangement is independent of caspase activation during *in vitro* azaspiracid toxicity in human neuroblastoma cells.

Biochem. Pharmacol., **74**, 327-335.

Wang Q. et Xu L. (2012).

Beauvericin, a bioactive compound produced by fungi: a short review.

Molecules, **17**, 2367-2377.

Wang S., Li X.M., Teuscher F., Li D.L., Diesel A., Ebel R., Proksch P. et Wang B.G. (2006).

Chaetopyranin, a benzaldehyde derivative, and other related metabolites from *Chaetomium globosum*, an endophytic fungus derived from the marine red alga *Polysiphonia urceolata*.

J. Nat. Prod., **69**, 1622-1625.

Wang Y.-N., Shao C.-L., Zheng C.-J., Chen Y.-Y. et Wang C.-Y. (2011).

Diversity and antibacterial activities of fungi derived from the gorgonian *Echinogorgia rebekka* from the South China Sea.

Mar. Drugs, **9**, 1379-1390.

Wat C.K., McInnes A.G., Smith D.G., Wright J.L.C. et Vining L.C. (1977).

The yellow pigments of *Beauveria* species. Structures of tenellin and bassianin.

Can. J. Chem., **55**, 4090-4098.

Wicher D. et Penzlin H. (1997).

Ca²⁺ currents in central insect neurons: electrophysiological and pharmacological properties.

J. Neurophysiol., **77**, 186-199.

Wiegand I., Hilpert K. et Hancock R.E.W. (2008).

Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances.

Nat. Protocols, **3**, 163-175.

Wikfors G. (2013).

Site Internet Harmful Algae, [En ligne, <http://www.who.edu/redtide/impacts/ecosystems> (Page consultée en juin 2013)].

Wilkinson C.R. (1983).

Net primary productivity in coral reef sponges.

Science, **219**, 410-412.

Wolfe N.D., Daszak P., Kilpatrick A.M. et Burke D.S. (2005).

Bushmeat hunting, deforestation, and prediction of zoonoses emergence.

Emerg. Infect. Dis., **11**, 1822-1827.

Wu S.N., Chen H., Liu Y.C. et Chiang H.T. (2002).

Block of L-type Ca²⁺ current by beauvericin, a toxic cyclopeptide, in the NG108-15 neuronal cell line.

Chem. Res. Toxicol., **15**, 854-860.

Wudayagiri R., Inceoglu B., Herrmann R., Derbel M., Choudary P.V. et Hammock B.D. (2001).

Isolation and characterization of a novel lepidopteran-selective toxin from the venom of South Indian red scorpion, *Mesobuthus tamulus*.

BMC Biochemistry, **2**, 16.

Xu L., Wang J., Zhao J., Li P., Shan T., Li X. et Zhou L. (2010).

Beauvericin from the endophytic fungus, *Fusarium redolens*, isolated from *Dioscorea zingiberensis* and its antibacterial activity.

Natural Product Communications, **5**, 811.

Xu X., de Guzman F.S. et Gloer J.B. (1992).

Stachybotrins A and B: novel bioactive metabolites from a brackish water isolate of the fungus *Stachybotrys* sp.

J. Org. Chem., **57**, 6700-6703.

Xu Y., Zhan J., Wijeratne E.M.K., Burns A.M., Gunatilaka A.A.L. et Molnar I. (2007).

Cytotoxic and antihaptotactic beauvericin analogues from precursor-directed biosynthesis with the insect pathogen *Beauveria bassiana* ATCC 7159.

J. Nat. Prod., **70**, 1467-1471.

Yang T., Cui F.D., Choi M.K., Cho J.W., Chung S.J., Shim C.K. et Kim D.D. (2007).

Enhanced solubility and stability of PEGylated liposomal paclitaxel: *In vitro* and *in vivo* evaluation.

J. Biotechnol., **338**, 317-326.

Yasumoto T., Bagnis R. et Vernoux J.P. (1976).

Toxicity of the surgeonfish. II. Properties of the principal water-soluble toxin.

Nippon Suisan Gakk., **42**, 359-365.

Yasumoto T., Murata M., Oshima Y., Matsumoto Gayle K. et Clardy J.O.N. (1984).

Diarrhetic Shellfish Poisoning.

Seafood Toxins, vol. 262.

American Chemical Society, pp. 207-214.

Yasumoto T., Murata M., Oshima Y., Sano M., Matsumoto G.K. et Clardy J. (1985).

Diarrhetic shellfish toxins.

Tetrahedron, **41**, 1019-1025.

Zdarek J. et Fraenkel G. (1987).

Pupariation in flies: A tool for monitoring effects of drugs, venoms, and other neurotoxic compounds.

Arch. Insect Biochem., **4**, 29-46.

Zhang Y., Mu J., Feng Y., Kang Y., Zhang J., Gu P.J., Wang Y., Ma L.F. et Zhu Y.H. (2009).

Broad-spectrum antimicrobial epiphytic and endophytic fungi from marine organisms: isolation, bioassay and taxonomy.

Mar. Drugs, **7**, 97-112.

Zheng S., Huang F., Chen S., Tan X., Zuo J., Peng J. et Xie R. (1990).

The isolation and bioactivities of pinnatoxin.

Chinese Journal of Marine Drugs, **9**, 33-35.

Zielinski O., Busch J.A., A.D. C., Daly K.D., Engelbrektsson J., Hannides A.K. et Schmidt H. (2009).

Detecting marine hazardous substances and organisms: sensors for pollutants, toxins, and pathogens.

Ocean Sci., **5**, 329-349.

Zlotkin E., Fraenkel G., Miranda F. et Lissitzky S. (1971).

The effect of scorpion venom on blowfly larvae- A new method for the evaluation of scorpion venoms potency.

Toxicon, **9**, 1-2.

Zuccaro A., Schoch C.L., Spatafora J.W., Kohlmeyer J., Draeger S. et Mitchell J.I. (2008).

Detection and identification of fungi intimately associated with the brown seaweed *Fucus serratus*.

Appl. Environ. Microb., **74**, 931-941.

Zvereva L.V. et Vysotskaya M.A. (2005).

Filamentous fungi associated with bivalve mollusks from polluted biotopes of Ussuriiskii Bay, sea of Japan.

Ecology of Microorganisms, **31**, 382-385.

Zwietering M.H., Jongenburger I., Rombouts F.M. et Van't Riet K. (1990).

Modeling of the bacterial growth curve.

Appl. Environ. Microb., **56**, 1875-1881.

Publications

Article sous presse dans le journal *Letters in Applied Microbiology*

Cytotoxicity and mycotoxin production of shellfish-derived *Penicillium* spp., a risk for shellfish consumers

Marie Geiger^{1,2}, Yann Guitton¹, Marieke Vansteelandt¹, Isabelle Kerzaon^{1,4}, Elodie Blanchet¹, Thibaut Robiou du Pont¹, Jens C. Frisvad³, Philipp Hess², Yves François Pouchus¹, Olivier Grovel¹

1 - University of Nantes, MMS, Nantes, France

2 - IFREMER, Phycotoxins Laboratory, Nantes, France

3 - Technical University of Denmark, Center for Microbial Biotechnology, Lyngby, Denmark

4 - University of Lyon 1, UMR 5557 CNRS-UCBL, Lyon, France

Correspondence: Yves-Francois Pouchus - University of Nantes, Faculty of Pharmacy, MMS, BP 53508, F-44035 Nantes, France

E-mail : yves-francois.pouchus@univ-nantes.fr

Running title : Toxic shellfish-derived *Penicillium*

Significance and impact of the study: *Penicillium* strains isolated from bivalve molluscs produce extracts exhibiting a higher cytotoxicity than extracts from *Penicillium* strains isolated from the surrounding marine environment. The use of a mussel-based medium for cultures of some shellfish-derived strains enhances the cytotoxicity of extracts when compared to classical media. The production of cytotoxic compounds and of the mycotoxin patulin on such a host-derived medium highlights a potential health risk for shellfish consumers.

Abstract

In order to assess the putative toxigenic risk associated to the presence of fungal strains in shellfish-farming areas, *Penicillium* strains were isolated from bivalve molluscs and from the surrounding environment, and the influence of the sample origin on the cytotoxicity of the extracts was evaluated. Extracts obtained from shellfish-derived *Penicillium* exhibited higher cytotoxicity than the others. Ten of these strains were grown on various media including a medium based on mussel extract (*M. edulis*), MES, to study the influence of the mussel flesh on the production of cytotoxic compounds. The MES host-derived medium was created substituting the yeast extract of YES medium by an aqueous extract of mussel tissues, with other constituent identical to YES-medium. When shellfish-derived strains of fungi were grown on MES medium, extracts were found to be more cytotoxic than on the YES medium for some of the strains. HPLC-UV/DAD-MS/MS dereplication of extracts from *P. marinum* and *P. restrictum* strains grown on MES medium showed the enhancement of the production of some cytotoxic compounds. The mycotoxin patulin was detected in some *P. antarcticum* extracts and its

presence seemed to be related to their cytotoxicity. Thus, the enhancement of the toxicity of extracts obtained from shellfish-derived *Penicillium* strains grown on a host-derived medium and the production of metabolites such as patulin suggests that a survey of mycotoxins in edible shellfish should be considered.

Keywords

Shellfish, marine fungi, *Penicillium*, cytotoxicity, Mass spectrometry, dereplication

Introduction

In marine environments such as hypersaline waters, sediments, beaches sands or shellfish farming areas, *Penicillium* is one of the predominant genera (Khudyakova *et al.*, 2000; Sallenave-Namont *et al.*, 2000; Mancini *et al.*, 2005; Butinar *et al.*, 2011). Among the wide diversity of *Penicillium* species, numerous marine-derived *Penicillium* strains have been described for the production of toxic metabolites (Bugni et Ireland, 2004; Blunt *et al.*, 2009; Ebel, 2010; Blunt *et al.*, 2011) and some are known to produce mycotoxins such as ochratoxin A, penitrem A, roquefortine C or patulin (Frisvad *et al.*, 2004; Paterson *et al.*, 2004). Marine-derived fungi form a group of potential contaminants for marine bivalves such as mussels (Zvereva et Vysotskaya, 2005; Zielinski *et al.*, 2009). In previous studies, it has been shown that *Penicillium* strains sampled from shellfish farming areas produced roquefortine C and patulin (Vansteelandt *et al.*, 2012) and that some toxic fungal metabolites like gliotoxin or peptaibols produced by marine-derived fungi can be detected in marine sediments and can be accumulated in filter-feeding molluscs under laboratory conditions (Sallenave *et al.*, 1999; Grovel *et al.*, 2003). *In situ* contamination of bivalves by fungal compounds could be one of the origins of the unexplained toxicities of seafood observed along the French coast since the beginning of the 1990's (Belin *et al.*, 2009).

In this study, the cytotoxicity of shellfish-derived *Penicillium* strains in comparison with environment-derived ones was investigated. Subsequently, a host-derived medium was used to evaluate the influence of mussel flesh on the production of secondary metabolites and mycotoxins by shellfish-derived *Penicillia*.

Results and discussion

Influence of strain origin on cytotoxicity of culture extracts

Cytotoxicity of culture extracts from 24 *Penicillium* strains isolated from shellfish farming areas and grown on MEA medium was evaluated on KB cells. Activities obtained for isolates from shellfish were compared to those from their immediate environment (Figure 1). The number of inactive extracts from the two groups was similar. However, amongst toxic extracts, high cytotoxicities were found to be predominant in the extracts obtained from shellfish-derived isolates, with 45% of the extracts exhibiting an $IC_{50} < 10 \mu\text{g mL}^{-1}$, whereas only 10% of extracts from environment-derived strains exhibited such

high cytotoxicity. As samples of shellfish, sediment and seawater were gathered in the same place at the same moment, it seems that the origin of the samples has an influence on the cytotoxicity profiles of strains. Some *Penicillium* strains isolated from shellfish have been previously reported to be more toxic on an *Artemia salina* bioassay than others isolated from the marine environment (Sallenave-Namont *et al.*, 2000; Matallah-Boutiba *et al.*, 2012). This influence of the sample origin on the activity has also been reported for extracts of fungi isolated from different species of sponges (Holler *et al.*, 2000; Thirunavukkarasu *et al.*, 2011) or type of sediment (Khudyakova *et al.*, 2000). Thus, the observation of a highest number of cytotoxic extracts from shellfish-derived isolates could suggest the operation of some mechanism of selection from either of the organisms, leading to a kind of association.

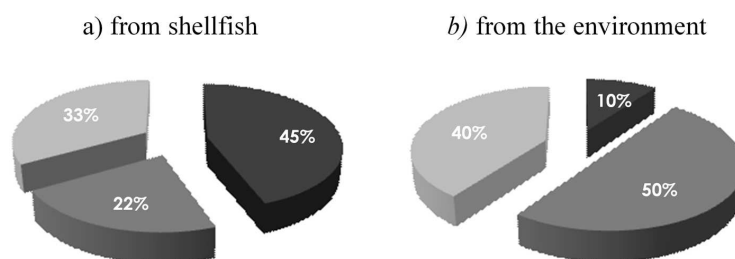


Figure 1. Comparison of crude extracts cytotoxicity for a) shellfish-derived (N=14), and b) environment-derived (N=10) *Penicillium* spp. strains cultured on MEA medium. Dark grey for IC₅₀ < 10 µg ml⁻¹; medium grey for 10 < IC₅₀ < 30 µg ml⁻¹; light grey for IC₅₀ > 30 µg ml⁻¹.

Associations between fungi and marine macro-organisms have been mainly studied through the investigation of the biodiversity or chemodiversity of sponge-derived fungi. Sponges are often associated to micro-organisms which have a profound impact on host biology (Wilkinson, 1983). Some sponge-derived fungi may be opportunistic and contribute to localized lesions and diseases (Li et Wang, 2009). These fungi may also contribute to host defense via the production of biologically active metabolites (Holler *et al.*, 2000; Han *et al.*, 2009; Thirunavukkarasu *et al.*, 2011). However, limited data are available on the ecological function of fungal communities living within these invertebrates. Associations of fungi with bivalves have rarely been studied: some marine fungi have been reported to exhibit a pathogenic character towards different species of molluscs (mussels, oysters, abalones) by infecting the shell or the flesh (Alderman et Jones, 1971; Grindley *et al.*, 1998; Van Dover *et al.*, 2007), but none of the other kind of associations such as commensalism or mutualism have been described. It could be envisaged that the different types of relationship described between sponges and fungi could be transposed to bivalve molluscs.

Influence of shellfish constituents on the cytotoxicity of shellfish-derived Penicillia

Ten fungal strains isolated from bivalves were grown on a mussel flesh-based medium (MES) obtained by substituting the yeast extract of the usual YES medium by a mussel flesh aqueous extract, in order to assess the influence of mussel constituents on the production of cytotoxic metabolites. Table 1 summarizes the cytotoxicity of culture extracts obtained for the MES medium as well as five other common media.

Table 1. Cytotoxicity of extracts of *Penicillium* spp. strains isolated from bivalves and grown on the MES medium and the five classical media (IC₅₀, µg ml⁻¹).

strain	species	Culture medium					
		MES	YES	CYA	DCA	MEA	PDA
MMS50	<i>P. venetum</i>	> 30.0	> 30.0	12.5	> 30.0	> 30.0	25.0
MMS163	<i>P. antarcticum</i>	5.0	16.9	> 30.0	> 30.0	8.8	> 30.0
MMS231	<i>P. polonicum</i>	21.6	> 30.0	6.3	24.1	> 30.0	20.9
MMS266	<i>P. marinum</i>	15.7	> 30.0	> 30.0	20.5	15.0	26.6
MMS270	<i>P. bialowiezense</i>	> 30.0	> 30.0	25.0	> 30.0	> 30.0	> 30.0
MMS330	<i>P. ubiquetum</i>	26.9	11.1	19.1	16.8	13.9	18.7
MMS393	<i>P. sp.</i>	> 30.0	> 30.0	> 30.0	> 30.0	> 30.0	> 30.0
MMS399	<i>P. ligerum</i>	14.4	25.7	16.5	21.4	> 30.0	> 30.0
MMS404	<i>P. brevicompactum</i>	> 30.0	> 30.0	> 30.0	> 30.0	> 30.0	> 30.0
MMS417	<i>P. restrictum</i>	4.9	> 30.0	6.3	> 30.0	12.5	> 30.0

All ten strains selected exhibited a similar growth on MES and YES media, showing that mussel constituents are also favorable to the development of fungi. In this way, fermentation studies have shown that mussel processing wastewaters can be depurated by fungi and yeasts, and such mussel-based media have proven to be suitable for the industrial production of amylase by several fungal species (Gonzalez *et al.*, 1992; Torrado *et al.*, 2013). Among the 60 extracts, 33 exhibited no activity, 22 a medium cytotoxicity and 5 were highly cytotoxic. IC₅₀ obtained for MES and CYA media appeared to have the similar distribution, *i.e.* four IC₅₀ were higher than 30 µg.ml⁻¹, four were between 10 and 30 µg.ml⁻¹ and two were lower than 10 µg.ml⁻¹, implying that these two media seemed to be equally favorable to induce the production of active metabolites by fungi although their composition were highly different. The CYA medium has been reported to be one of the most strongly inducing production of the widest range of secondary metabolites (Frisvad *et al.*, 2004). This study showed that the MES medium seems to induce in a similar manner the production of a large number of extrolites some of them being cytotoxic. On the contrary, the YES medium was the less favorable for the production of cytotoxic compounds, with only three extracts exhibiting an activity. For five strains (*P. antarcticum*, *P. polonicum*, *P. marinum*, *P. restrictum* and *P. sp* MMS351), the MES extracts were more cytotoxic than the corresponding YES extracts showing that shellfish-derived fungi grown on a host-derived medium could express a specific metabolome and could enhance the production of cytotoxic compounds. This influence of host-derived media on the specific expression of metabolites has been previously demonstrated with the stimulation of the production of corymbiferan lactones by necrotrophic fungi (Overy *et al.*, 2006).

Cytotoxic metabolites responsible for cytotoxicities of MES extracts

In order to investigate the compounds responsible for the enhanced activities on MES media, metabolic profiles of strains were analysed using HPLC-UV/DAD-HRMS/MS, and the composition of extracts obtained on the MES and YES media were compared. The dereplication of extracts was performed on the basis of the accurate mass, UV spectrum and MS/MS spectrum of the main chromatographic peaks. The results obtained for three strains presenting either a high cytotoxicity on

MES medium or a high differential activity between the MES and YES extracts are shown. Table 2 lists peaks which could be annotated.

MES and YES extracts of MMS266 (*P. marinum*) exhibited different chromatographic profiles (Figure 2A, 2B). Surprisingly, none of the cytotoxic indole alkaloids communesins or chaetoglobosins, some characteristic metabolites of this species, were found to be produced on these two media. The most abundant peaks observed in the YES extract were not observed in the MES extract, whereas several peaks were specific of the latter. Four of them (peaks A, B, C, E) were identified as penostatin derivatives, a group of compounds initially described from marine *Penicillium* strains and known to exhibit significant cytotoxicities on various cell lines (Takahashi *et al.*, 1996; Iwamoto *et al.*, 1999). The fifth identified compound, also specifically produced on MES medium, was fusoxysporone, a viscidane-type diterpene first isolated from a *Fusarium oxysporum* (Abraham et Hanssen, 1992). No biological activities have been described for this compound. Thus, further investigations on toxic effects of both penostatins and fusoxysporone would be required to assess their potential involvement in the cytotoxicity of MES extracts and their putative human health effects if they were produced *in situ* in mussels.

For the MMS417 strain (*P. restrictum*), YES and MES extracts exhibited chromatographic profiles of greater similarity (Figure 2C, 2D). The main difference was the relative abundance of peak C which represented 4.8 % of the total peak areas on YES and 14.1 % on MES. This compound could be annotated as pestalotin, a metabolite previously isolated from a *Penicillium* sp. strain, or less likely as pestalrone B, a *Pestalotiopsis karstenii* molecule (Kimura *et al.*, 1986; Luo *et al.*, 2012). All the other annotated compounds were also pyran-2-one derivatives (Table 2). As for peak C, peak B was thought to be hydroxypestalotin rather than pestalrone B, as it has once been reported in a *Penicillium* sp. strain (Kiriata *et al.*, 1992). Pestalotin derivatives have been described to exhibit only weak cytotoxicity against the human tumor cell line U-251 (Luo *et al.*, 2012). Thus, the high activity of the MES extract could also be attributed to one of the minor peaks that remained unidentified.

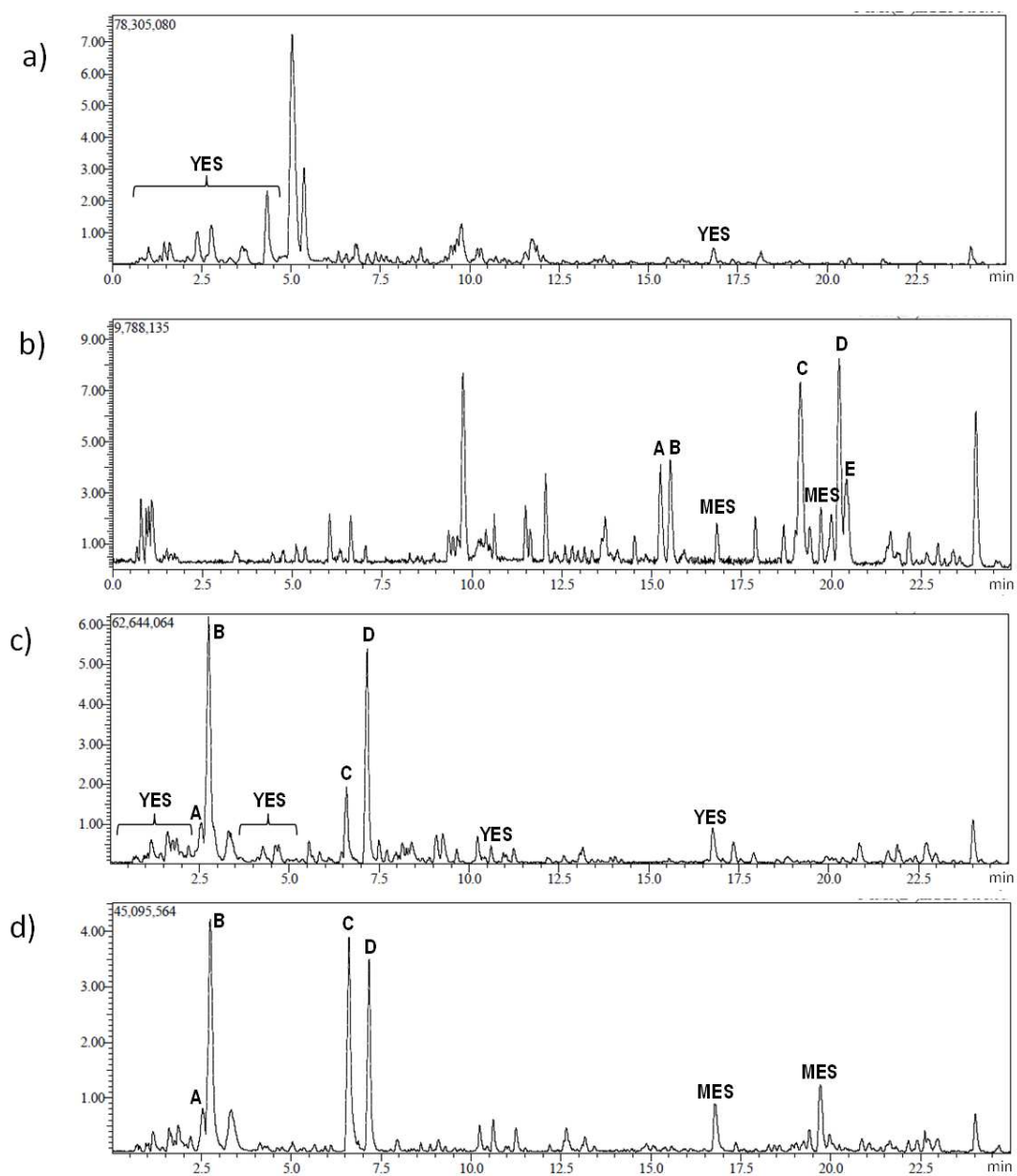


Figure 2. ESI positive mode base peak chromatograms (BPC) of crude extracts of a) MMS266 on YES medium, b) MMS266 on MES medium, c) MMS417 on YES medium and d) MMS417 on MES medium. Peaks annotated YES=YES medium component and MES=MES component.

Table 2. Annotated peaks observed on YES and MES chromatograms for MMS266 and MMS417.

Peak	Experimental m/z [M+H] ⁺	Molecular formula	Theoretical m/z [M+H] ⁺	ppm diff	Identification parameters			Annotation
					MS	MS/MS	UV	
<i>Strain MMS266</i>								
A, B	345.2418	C ₂₂ H ₃₂ O ₃	345.2424	1.74	X	X	X	Penostatin derivatives
C	327.23	C ₂₂ H ₃₀ O ₂	327.2319	5.81	X	X	X	Penostatin derivatives
D	287.2356	C ₂₀ H ₃₀ O	287.2369	4.53	X	X	X	Fusoxysporone
E	327.2283	C ₂₂ H ₃₀ O ₂	327.2319	8.86	X	X	nf*	Penostatin derivatives
<i>Strain MMS417</i>								
A	229.1064	C ₁₁ H ₁₆ O ₅	229.1071	3.06	X	X	X	LLP880-gamma
B	231.1214	C ₁₁ H ₁₈ O ₅	231.1227	5.62	X	X	ni**	Hydroxypestalotin or Pestalrone A
C	215.1262	C ₁₁ H ₁₈ O ₄	215.1278	7.44	X	X	nf	Pestalotin or Pestalrone B
D	213.1112	C ₁₁ H ₁₆ O ₄	213.1121	4.22	X	ni	ni	5,6-dihydro-4-methoxy-6-(1-oxopentyl)-2H-pyran-2-one

*nf: data not fully congruent with literature; **ni: no information on MS/MS or UV spectra in literature

Extracts of the strain MMS163 (*P. antarcticum*) were highly cytotoxic when it was grown on MES and MEA media, whereas no activity was observed for those obtained from cultures on CYA, PDA and DCA media. As marine isolates of this species are known to produce patulin (Vansteelandt et al., 2012), a mycotoxin cytotoxic on various cell lines (Iwamoto et al., 1999; Heussner et al., 2006), the six extracts were dereplicated with a focused attention to patulin detection (Table 3).

Table 3. Annotated peaks observed on extracts of MMS163.

Medium	IC ₅₀ ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Annotated compounds				
		patulin	chrysoquine	cladosporin	5'-hydroxy-asperentin	terrestrial acid
MES	5.0	X	-	X	X	-
YES	16.9	X	-	X	X	X
MEA	8.8	X	-	X	X	-
CYA	> 100.0	-	X	X	X	X
DCA	> 100.0	-	X	X	X	-
PDA	> 100.0	-	X	X	-	-

Cladosporin and 5'-hydroxy-asperentin were identified in six and five extracts, respectively. Cladosporin is a secondary metabolite initially isolated from *Cladosporium cladosporioides* (Scott et Van, 1971). This compound has been shown to exhibit antifungal, antimicrobial and antimalarial activities (Scott et Van, 1971; Anke et al., 1978; Hoepfner et al., 2012). To our knowledge, bioactivities of the cladosporin derivative 5'-hydroxy-asperentin have not yet been reported (Wang et al., 2006)(Wang et al., 2006)(Wang et al., 2006)(Wang Song et al. 2006). Patulin was detected in the three cytotoxic extracts and not in the others, contrary to the alkaloid chrysoquine which was only present in the non-active ones. This indicates that the cytotoxicity of the extracts is strongly related to the presence of patulin, and that there is a biosynthetic shift in the

routes leading to these two compounds. Several investigations have shown that the biosynthesis of patulin is highly regulated and dependent of abiotic factors such as medium components. Glucose is a favorable carbon source, whereas nitrogenous compounds inhibit its production (Grootwassink et Gaucher, 1980; Rollins et Gaucher, 1994), and manganese is required for the expression of the isoeopoxydon dehydrogenase gene implicated in the synthesis of patulin intermediates (Scott *et al.*, 1986; Puel *et al.*, 2010). In the present study, no correlation could be observed between any medium component and patulin or chrysogine production. Due to its cytotoxic, mutagenic, genotoxic, immunotoxic, neurotoxic and teratogenic effects (Andersen *et al.*, 2004), patulin is considered as a major mycotoxin and its presence in food is regulated (FAO, 2004). Thus, the stimulation of patulin production by mussel flesh constituents could lead to its accumulation in edible shellfish and then induce a putative health risk for their consumers.

In summary, this study shows that the most toxigenic *Penicillium* strains were found in association with natural samples corresponding to bivalve molluscs as opposed to sediment and seawater. As advised by Overy et al. (2006), who proposed to grow necrotrophic fungi on host-derived media to enhance the production of specific metabolites, the use of a mussel-based medium for the cultivation of shellfish-derived strains led to the observation of more cytotoxic compounds for some strains. Thus, the production of such toxic compounds may be generally enhanced by shellfish constituents. Further investigations must focus in priority on the isolation and identification of these compounds to assess the potential risk for human shellfish consumers. Moreover, the identification of the fungal toxin patulin in a *Penicillium* strain isolated from shellfish strengthens the interest of monitoring *Penicillium* mycotoxins in shellfish-farming areas.

Material and methods

Fungal strains

Twenty-four *Penicillium* strains were randomly selected from the marine-derived fungal strain collection of the laboratory. These strains had been isolated from cultured shellfish (cockles and mussels) and their immediate environment (sediment and seawater) gathered along the western coast of France. Strains were identified using their phenotypic characteristics, by metabolite profiling or by sequencing the internal transcribed spacers (ITS-1 and -2) and beta-tubulin regions of their genomic DNA. Sequences were compared to CBS and Genbank databanks. Three strains remained unidentified as they did not grow during the identification procedure. The list of all strains is given in supporting information (table S1). For the study of shellfish-derived *Penicillia*, 10 strains, isolated from shellfish and all belonging to different species, were kept from the previous selection.

Culture and extraction

Culture media: strains were grown on 6 different culture media all prepared with 15 g L⁻¹ of agar in-sterilized natural seawater (salinity of 32.8 psu) containing additionally: 5 g Czapek extract, 5 g yeast extract and 30 g saccharose for Czapek Yeast extract Agar medium (CYA); 40 g glucose and 10 g casein enzymatic digest for Dextrose Casein Agar

medium (DCA); 5 mg CuSO₄, 10 mg ZnSO₄, 1 g peptone, 20 g malt extract and 20 g glucose for Malt Extract Agar medium (MEA, medium used for the cytotoxicity screening of the 24 strains); 5 mg CuSO₄, 10 mg ZnSO₄, 4 g potato extract and 20 g glucose for Potato Dextrose Agar medium (PDA); 5 mg CuSO₄, 10 mg ZnSO₄, 0.5 g MgSO₄, 20 g yeast extract and 150 g saccharose for Yeast Extract Sucrose medium (YES). Mussel Extract Saccharose (MES) medium was realised by incorporating 20g of a freshly prepared mussel extract instead of the 20 g of yeast extract of the YES medium. Mussel extract was obtained by collecting total flesh of blue mussels (*Mytilus edulis*) from Normandy, France. The flesh was crushed and centrifuged at 6000 g, 5°C during 30 min. Supernatant was successively passed through filters of decreasing porosity (50, 5 and 1 µm; Sartorius, Göttingen, Germany) and finally lyophilized. The extract obtained was ground in order to obtain a homogeneous powder. Bioassay performed on non-inoculated MES medium extracts showed no cytotoxicity of the mussel flesh constituents.

Fungal cultures and extract preparation

Each culture was carried out in triplicates in Erlenmeyer flasks containing 50 mL of solid medium; cultures were incubated at 27°C for 12 days under natural light. Fungal mycelium was extracted together with the agar layer, in order to obtain both internal and excreted compounds. The cultures were extracted twice with 100 mL of dichloromethane/ethyl-acetate 1:1 (v/v). Mixtures were then sonicated during 30 min and macerated overnight. After filtration on Büchner funnel, the organic phase was dehydrated on Na₂SO₄. Spores were removed by filtration on regenerated cellulose 0.45 µm filters (Sartorius, Göttingen, Germany). Organic phases were evaporated to dryness leading to crude extracts.

Cytotoxicity assay

Cytotoxicity was evaluated on KB cells, a human epidermoid carcinoma cell line, with a 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) coloration after 72 h of incubation according to the protocol of Ruiz et al. (2007). Results were expressed as the concentration that inhibited 50% of cell growth (IC₅₀). Experiments were carried out in duplicate. Culture medium containing MeOH 5% was used as negative control and penicillic acid was used as positive control (IC₅₀ = 18.8 µg mL⁻¹). Cytotoxicity was considered as high if IC₅₀ was under 10 µg mL⁻¹ and low if IC₅₀ was between 10 and 30 µg mL⁻¹. Extracts with IC₅₀ higher than 30 µg mL⁻¹ were considered as inactive.

HPLC-DAD/ESI-IT-TOF-MS analyses

HPLC-DAD/ESI-IT-TOF-MSⁿ analyses were performed with a Shimadzu LCMS-IT-TOF instrument composed of two LC-20ADxr pumps, a SIL-20ACxr autosampler, a CTO-20AC column oven, an SPD-M20A PDA detector and a CBM-20A system controller, coupled to a mass spectrometer with an ESI ion source, and an hybrid Ion Trap-Time-Of-Flight mass analyser (Shimadzu, Kyoto, Japan). HPLC and EI-IT-MS analysis conditions are given as supporting informations. Dereplication of extracts was performed according to the method described by Vansteelandt et al. (2012). The data obtained were analysed using the fungal metabolite database of Nielsen and Smedsgaard (2003) and literature.

Acknowledgements

We acknowledge the *Région des Pays de la Loire* for funding of this study through the COLNACOQ and CHIMIMAR programs, and Yolaine Joubert and Solène Brochard for her help in identification of fungal strains, cultures and extractions. Authors have no conflict of interest to declare.

References

- Abraham, W.R. and Hanssen, H.P. (1992) Fusoxysporone - a new type of diterpene from *Fusarium oxysporum*. *Tetrahedron* **48**:10559-10562.
- Alderman, D.J. and Jones, E.B.G. (1971) Physiological requirements of two marine phycomyces, *Althornia crouchii* and *Ostracoblabe implexa*. *T Brit Mycol Soc* **57**:213-225.
- Andersen, B., Smedsgaard, J. and Frisvad, J.C. (2004) *Penicillium expansum*: consistent production of patulin, chaetoglobosins, and other secondary metabolites in culture and their natural occurrence in fruit products. *J Agr Food Chem* **52**:2421-2428.
- Anke, H., Zaehner, H. and Koenig, W.A. (1978) Metabolic products of microorganisms. 170. On the antibiotic activity of cladosporin. *Arch Microbiol* **116**:253-257.
- Belin, C., Soudant, D. and Amzil, Z. (2009) Surveillance des toxines lipophiles dans les coquillages. Analyses statistique et comparaison des résultats obtenus par deux méthodes d'analyse : les bio-essais sur souris et les analyses chimiques par CL-SM/SM. Rapport exécuté dans le cadre de la Convention Etudes DGAL / Ifremer, correspondant à la Subvention pour charges de service public, *Programme 206*, 94 pp, Octobre 2009.
- Blunt, J.W., Copp, B.R., Hu, W.P., Munro, M.H.G., Northcote, P.T. and Prinsep, M.R. (2009) Marine natural products. *Nat Prod Rep* **26**:170-244.
- Blunt, J.W., Copp, B.R., Munro, M.H.G., Northcote, P.T. and Prinsep, M.R. (2011) Marine natural products. *Nat Prod Rep* **28**:196-268.
- Bugni, T.S. and Ireland, C.M. (2004) Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. *Nat Prod Rep* **21**:143-163.
- Butinar, L., Frisvad, J.C. and Gunde-Cimerman, N. (2011) Hypersaline waters - a potential source of foodborne toxigenic aspergilli and penicillia. *FEMS Microbiol Ecol* **77**:186-199.
- Ebel, R. (2010) Terpenes from marine-derived fungi. *Mar Drugs* **8**:2340-2368.
- FAO (2004) Worldwide Regulation for Mycotoxins in Food and Feed in 2003. In: *FAO Food and Nutrition Paper* vol. 81, p 180 pp. Rome.
- Frisvad, J.C., Smedsgaard, J., Larsen, T.O. and Samson, R.A. (2004) Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. *Stud Mycol* **49**:201-241.
- Gonzalez, M.P., Siso, M.I.G., Murado, M.A., Pastrana, L., Montemayor, M.I. and Miron, J. (1992) Depuration and valuation of mussel-processing wastes. Characterization of amyolytic postincubates from different species grown on an effluent. *Bioresource Technol* **42**:133-140.
- Grindley, R.M., Keogh, J.A. and Friedman, C.S. (1998) Shell lesions in New Zealand *Haliotis* spp. (Mollusca, Gasteropoda). *J Shellfish Res* **17**:805-811.

- Grootwassink, J.W. and Gaucher, G.M. (1980) De novo biosynthesis of secondary metabolism enzymes in homogeneous cultures of *Penicillium urticae*. *J Bacteriol* **141**:443-455.
- Grovel, O., Pouchus, Y.F. and Verbist, J.F. (2003) Accumulation of gliotoxin, a cytotoxic mycotoxin from *Aspergillus fumigatus*, in blue mussel (*Mytilus edulis*). *Toxicon* **42**:297-300.
- Han, Y., Yang, B., Zhang, F., Miao, X. and Li, Z. (2009) Characterization of antifungal chitinase from marine *Streptomyces* sp. DA11 associated with South China sea sponge *Craniella Australiensis*. *Mar Biotechnol* **11**:132-140.
- Heussner, A.H., Dietrich, D.R. and O'Brien, E. (2006) In vitro investigation of individual and combined cytotoxic effects of ochratoxin A and other selected mycotoxins on renal cells. *Toxicol in Vitro* **20**:332-341.
- Hoepfner, D., McNamara, C.W., Lim, C.S., Studer, C., Riedl, R., Aust, T., McCormack, S. L., Plouffe, D. M., Meister, S., Schuierer, S., Plikat U., Hartmann, N., Staedtler, F., Cotesta, S., Schmitt, E. K., Petersen, F., Supek, F., Glynne R. J., Tallarico, J.A., Porter, J.A., Fishman M.C., Bodenreider C., Diagana, T. T., Mowva N.R. and Winzeler E.A. (2012) Selective and specific inhibition of the *Plasmodium falciparum* Lysyl-tRNA synthetase by the fungal secondary metabolite cladosporin. *Cell Host & Microbe* **11**:654-663.
- Holler, U., Wright, A.D., Matthee, G.F., König, G.M., Draeger, S., Aust, H.J., and Schulz, B. (2000) Fungi from marine sponges: Diversity, biological activity and secondary metabolites. *Mycol Res* **104**:1354-1365.
- Iwamoto, C., Minoura, K., Oka, T., Ohta, T., Hagishita, S. and Numata, A. (1999) Absolute stereostructures of novel cytotoxic metabolites, penostatins A–E, from a *Penicillium* species separated from an *Enteromorpha* alga. *Tetrahedron* **55**:14353-14368.
- Khudyakova, Y.V., Pivkin, M.V., Kuznetsova, T.A. and Svetashev, V.I. (2000) Fungi in sediments of the sea of Japan and their biologically active metabolites. *Microbiol-Moscow* **69**:608-611.
- Kimura, Y., Hamasaki, T. and Nakajima, H. (1986) Stereochemistry and biological activities of LL-P880y, a pestalotin analog, produced by *Penicillium citreo-viride*. *Agr Biol Chem Tokyo* **50**:1649-1650.
- Kirihata M, Ohe M, Ichimoto I, Ueda H (1992) Stereoselective synthesis of unnatural stereoisomers of LL-P880fi and LL-P880y, pestalotin analogues from *Penicillium* sp. *Biosci Biotech Biochem* **56**:1825-1828.
- Li, Q. and Wang, G. (2009) Diversity of fungal isolates from three Hawaiian marine sponges. *Microbiol Res* **164**:233-241.
- Luo, D.Q., Zhang, L., Shi, B.Z. and Song, X.M. (2012) Two new oxysporone derivatives from the fermentation broth of the endophytic plant fungus *Pestalotiopsis karstenii* isolated from stems of *Camellia sasanqua*. *Molecules* **17**:8554-8560.
- Mancini, L., D'Angelo, A.M., Pierdominici, E., Ferrari, C., Anselmo, A., Venturi, L., Fazzo, L., Formichetti, P., Iaconelli, M. and Pennelli, B. (2005) Microbiological quality of Italian beach sands. *Microchem J* **79**:257-261.
- Matallah-Boutiba, A., Ruiz, N., Sallenave-Namont, C., Grovel, O., Amiard, J.C., Pouchus, Y.F. and Boutiba, Z. (2012) Screening for toxigenic marine-derived fungi in Algerian mussels and their immediate environment. *Aquaculture* **342-343**:75-79.
- Nielsen, K.J. and Smedsgaard, J. (2003) Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid chromatography–UV–mass spectrometry methodology. *J Chromatogr A* **1002**:111-136.
- Overy, D.P., Smedsgaard, J., Frisvad, J.C., Phipps, R.K. and Thrane, U. (2006) Host-derived media used as a predictor for low abundant, in planta metabolite production from necrotrophic fungi. *J Appl Microbiol* **101**:1292-1300.
- Paterson, R.R.M., Venâncio, A. and Lima, N. (2004) Solutions to *Penicillium* taxonomy crucial to mycotoxin research and health. *Res Microbiol* **155**:507-513.
- Puel, O., Galtier, P. and Oswald, I.P. (2010) Biosynthesis and toxicological effects of patulin. *Toxins* **2**:613-631.
- Rollins, M.J. and Gaucher, G.M. (1994) Ammonium repression of antibiotic and intracellular proteinase production in *Penicillium urticae*. *Appl Microbiol Biot* **41**:447-455.
- Ruiz, N., Wielgosz-Collin, G., Poirier, L., Grovel, O., Petit, K.E., Mohamed-Benkada, M., Robiou du Pont, T., Bissett, J., Vérité, P., Barnathan, G. and Pouchus, Y.F. (2007) New Trichobrachins, 11-residue peptaibols from a marine strain of *Trichoderma longibrachiatum*. *Peptides* **28**:1351-1358.
- Sallenave-Namont, C., Pouchus, Y.F., Robiou du Pont, T., Lassus, P. and Verbist, J.F. (2000) Toxigenic saprophytic fungi

in marine shellfish farming areas. *Mycopathologia* **149**:21-25.

Sallenave, C., Pouchus, Y.F., Bardouil, M., Lassus, P., Roquebert, M.F. and Verbist, J.F. (1999) Bioaccumulation of mycotoxins by shellfish: Contamination of mussels by metabolites of a *Trichoderma koningii* strain isolated in the marine environment. *Toxicon* **37**:77-83.

Scott, P.M. and Van, W.W. (1971) Cladosporin, a new antifungal metabolite from *Cladosporium cladosporioides*. *J Antibiot* **24**:747-755.

Scott, R.E., Jones, A., Lam, K.S. and Gaucher, G.M. (1986) Manganese and antibiotic biosynthesis. I. A specific manganese requirement for patulin production in *Penicillium urticae*. *Can J Microbiol* **32**:259-267.

Takahashi, C., Numata, A., Yamada, T., Minoura, K., Enomoto, S., Konishi, K., Nakai, M., Matsuda, C. and Nomoto, K. (1996) Penostatins, novel cytotoxic metabolites from a *Penicillium* species separated from a green alga. *Tetrahedron Lett* **37**:655-658.

Thirunavukkarasu, N., Suryanarayanan, T., Girivasan, K., Venkatachalam, A., Geetha, V., Ravishankar, J. and Doble, M. (2011) Fungal symbionts of marine sponges from Rameswaram, southern India: species composition and bioactive metabolites. *Fungal Diversity* **55**:37-46.

Torrado, A., Vázquez, J.A., Prieto, M.Á., Fuciños, P., Montemayor, M.I., Pastrana, L., González, M.P. and Murado, M.Á. (2013) Amylase production by *Aspergillus oryzae* in a solid-state bioreactor with fed-batch operation using mussel processing wastewaters as feeding medium. *J Chem Technol Biot* **88**:226-236.

Van Dover, C.L., Ward, M.E., Scott, J.L., Underdown, J., Anderson, B., Gustafson, C., Whalen, M. and Carnegie, R.B. (2007) A fungal epizootic in mussels at a deep-sea hydrothermal vent. *Mar Ecol* **28**:54-62.

Vansteelandt, M., Kerzaon, I., Blanchet, E., Fossi Tankoua, O., Robiou Du Pont, T., Joubert, Y., Monteau, F., Le Bizec, B., Frisvad, J.C., Pouchus, Y.F. and Grovel, O. (2012) Patulin and secondary metabolite production by marine-derived *Penicillium* strains. *Fungal Biology* **116**:954-961.

Wilkinson, C.R. (1983) Net primary productivity in coral reef sponges. *Science* **219**:410-412.

Zielinski, O., Busch, J.A., Cembella, A.D., Daly, K.D., Engelbrektsson, J., Hannides, A.K. and Schmidt, H. (2009) Detecting marine hazardous substances and organisms: sensors for pollutants, toxins, and pathogens. *Ocean Science* **5**:329-349.

Zvereva, L.V. and Vysotskaya, M.A. (2005) Filamentous fungi associated with bivalve mollusks from polluted biotopes of Ussuriiskii Bay, sea of Japan. *Ecol Microorg* **31**:382-385.

Supporting informations

HPLC and ESI-IT-MS conditions

HPLC was performed with a Kinetex C18 column (100 mm × 2.1 mm i.d.; 2.6 μm particle size) from Phenomenex (Torrance, California, USA). A binary gradient of water + 0.1% formic acid (FA) vs acetonitrile + 0.1% FA was used. The injection volume was 5 μL, the flow rate was 0.3 mL min⁻¹, the column oven temperature was 40 °C, and UV spectra (DAD) were recorded between 190 and 800 nm.

The conditions of ESI-IT-TOF-MSⁿ analysis were: (1) flow rate: 0.3 mL min⁻¹; (2) detection mode: positive ion; (3) mass range: MS, m/z 100–1000; MS², m/z 50–1000; (4) heat block and curved desolvation line temperature: 230 °C; nebulizing nitrogen gas flow: 1.5 L min⁻¹; Interface voltage: (+), 4.5 kV; detector voltage of the TOF analyze: 1.61 kV; for MS the ion accumulation time: 30 ms; (5) MS² fragmentation were performed by a data-dependent program; the ion accumulation time: 40 ms relative collision-induced dissociation energy: 100% with 50% Collision gas; ultra-high-purity argon was used as the collision gas in the collision-induced dissociation (CID) (6) All data were recorded and analysed using Shimadzu software: LCMS solution Version 3.60, Formula Predictor Version 1.2, and Accurate Mass Calculator (Shimadzu, Kyoto,

Japan); (7) a NaTFA solution (2.5 mM) was used to calibrate the mass range from 50 to 1000 Da.

Table S1. List of the studied strains with their origins and their mode of identification.

Strain	Species	Sampling characteristics			Identification		
		Sample type	localization	Geographical type	molecular biology	phenotypic characters	metabolic profiling
MMS 5	<i>chrysogenum</i>	cockles	Le Croisic	laguna	X	X	-
MMS 14	<i>antarcticum</i>	cockles	Le Croisic	laguna	X	X	X
MMS 15	<i>antarcticum</i>	cockles	Le Croisic	laguna	X	X	X
MMS 29	<i>citreonigrum</i>	sediment	Le Croisic	laguna	-	X	-
MMS 42	<i>expansum</i>	sediment	Le Croisic	laguna	X	-	X
MMS 50	<i>venetum</i>	mussels	Loire estuary	rocky coast	-	X	X
MMS 163	<i>antarcticum</i>	mussels	Loire estuary	rocky coast	X	-	X
MMS 194	<i>canescens</i>	seawater	La Baule	sandy bay	-	X	X
MMS 231	<i>polonicum</i>	mussels	La Baule	sandy bay	X	-	-
MMS 266	<i>marinum</i>	mussels	La Baule	sandy bay	-	X	X
MMS 270	<i>bialowiezense</i>	cockles	La Baule	sandy bay	-	X	X
MMS 330	<i>ubiquetum</i>	mussels	Loire estuary	rocky coast	-	X	X
MMS 351	<i>ligerum</i> *	seawater	Loire estuary	rocky coast	X	-	X
MMS 388	<i>ligerum</i>	mussels	Loire estuary	rocky coast	X	-	X
MMS 393	sp.**	mussels	Loire estuary	rocky coast	-	-	-
MMS 399	<i>ligerum</i>	mussels	Loire estuary	rocky coast	X	-	X
MMS 404	<i>brevicompectum</i>	cockles	Le Croisic	laguna	-	X	X
MMS 417	<i>restrictum</i>	cockles	Le Croisic	laguna	X	-	-
MMS 460	<i>canescens</i>	sediment	Le Croisic	laguna	-	X	X
MMS 556	<i>atramentosum</i>	sediment	Bourgneuf Bay	sandy bay	-	X	X
MMS 747	<i>ligerum</i>	sediment	Bourgneuf Bay	sandy bay	X	-	X
MMS 906	<i>radicum</i>	sediment	Loire estuary	rocky coast	X	-	-
MMS 967	sp.	sediment	Loire estuary	rocky coast	-	-	-
MMS 976	sp.	sediment	Le Croisic	laguna	-	-	-

* *P. ligerum* = new species still undescribed; **sp. = species not identified

Article accepté avec révisions mineures dans le journal *Marine drugs***Cytotoxicity, fractionation and dereplication of extracts of the dinoflagellate *Vulcanodinium rugosum*, a producer of Pinnatoxin G**

Marie Geiger^{1,2,a*}, Gwenaëlle Desanglois^{3,a}, Kevin Hogeveen³, Valérie Fessard³, Thomas Leprêtre^{1,2}, Florence Mondeguer¹, Yann Guitton^{1,2}, Fabienne Hervé¹, Véronique Séchet¹, Olivier Grovel², Yves-François Pouchus², Philipp Hess¹

¹ Ifremer, Laboratoire Phycotoxines, Centre Atlantique. 44311 Nantes Cedex, France;

E-Mails: thomaslepretre@hotmail.com (T.L.); florence.mondeguer@ifremer.fr (F.M.);

yann.guitton@univ-nantes.fr (Y.G.); fabienne.herve@ifremer.fr (F.H.);

veronique.sechet@ifremer.fr (V.S.); philipp.hess@ifremer.fr (P.H.)

² LUNAM, Université de Nantes, MMS EA2160. Faculté de Pharmacie, 44035 Nantes, France; E-mails: olivier.grovel@univ-nantes.fr (O.G.); yves-francois.pouchus@univ-nantes.fr (Y.F.P.)

³ ANSES, Unité de toxicologie des contaminants. 35302 Fougères, France; E-Mails: gwenaelle.desanglois@anses.fr (G.D.); kevin.hogeveen@anses.fr (K.H.); valerie.fessard@anses.fr (V.F.)

*Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: marie.geiger@ifremer.fr

^a Both authors equally contributed to this work.

Received: / Accepted: / Published:

Abstract

Pinnatoxin G (PnTX-G) is a marine toxin belonging to the class of cyclic imines and produced by the dinoflagellate *Vulcanodinium rugosum*. In spite of its strong toxicity to mice, leading to the classification of pinnatoxins into the class of “fast-acting toxins”, its hazard for human health has never been demonstrated. In this study, crude extracts of *V. rugosum* exhibited significant cytotoxicity against Neuro2A and KB cells. IC₅₀ values of 0.38 µg mL⁻¹ and 0.19 µg mL⁻¹ were estimated on Neuro2A cells after only 24 h and on KB cells after 72 h of incubation, respectively. On Caco2 cells after 48 h exposure, although only 40% cytotoxicity was observed at the highest concentration tested (5 µg mL⁻¹), the crude extract of *V. rugosum* induced cell cycle arrest accompanied by a dramatic increase in double strand DNA breaks. However, PnTX-G was not a potent cytotoxic compound as no reduction of the cell viability was observed on the different cell lines. Moreover, no effects on the cell cycle or DNA damage were observed following treatment of undifferentiated Caco-2 cells with PnTX-G. The crude extract of *V. rugosum* was thus partially purified using liquid-liquid partitioning and SPE column filtration. *In vitro* assays revealed strong activity of some fractions

containing no PnTX-G. The crude extract and the most potent fraction were evaluated using full scan and tandem high resolution mass spectrometry. The dereplication revealed the presence of a major compound that could be putatively annotated as nakijiquinone A, N-carboxy-methyl-smenospongine or stachybotrin A, using the MarinLit™ database. Further investigations will be necessary to confirm the identity of the compounds responsible for the cytotoxicity and genotoxicity of the extracts of *V. rugosum*.

Keywords: dereplication; cyclic imine; HRMS; bioactivity; pinnatoxins.

1. Introduction

Shellfish belonging to the genus *Pinna* had first been implicated in food poisoning in China in 1990 [1]. Pinnatoxin A (PnTX-A) was the first analogue described [2] (Figure 1), followed by PnTX-B, -C and -D, all isolated from viscera of *Pinna muricata* originated from Okinawa, Japan [3,4]. PnTX-E, -F and -G were discovered in oysters coming from Australia and New-Zealand, and PnTX-F and -G, which are algal metabolites, are suspected to be the metabolic precursor of all known PnTXs [5]. In Europe, PnTXs were first identified in Norway in 2011, in mussels and seawater samples [6].

In the regions affected by these contaminations, different dinoflagellate producers of PnTXs have been isolated: one organism was identified as a producer of PnTX-E and -F in New-Zealand [7], one as a producer of PnTX-G in Japan [8] and another one producing PnTX-E, -F and -G in Australia [9]. In 2011, a new species belonging to a new benthic dinoflagellate genus was isolated from a French Mediterranean lagoon (Ingril), and has been named *Vulcanodinium rugosum* [10]. This isolate has been shown to produce PnTX-G [11]. By morphological and phylogenetic comparison with the isolates from Japan, New-Zealand and Australia, *V. rugosum* has been identified as a single species producing PnTX-E, -F and -G in these regions [12]. More recently, PnTX-A and -G have been identified in mussels in Canada, with the first description of PnTX-G fatty acids esters [13].

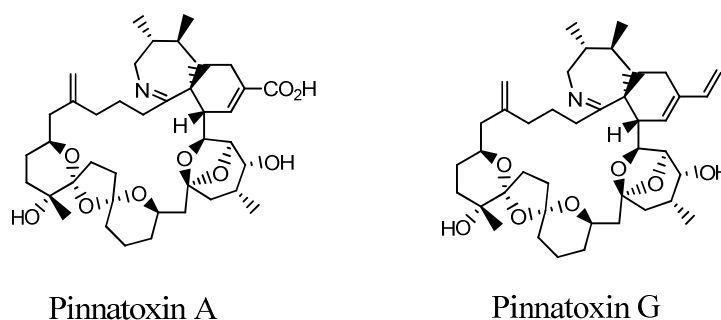


Figure 1: Structures of Pinnatoxin A (PnTX-A) and -G (PnTX-G). PnTX-A is a shellfish metabolite of the algal PnTX-G, with the double bond in the side chain oxidised to form a carboxylic acid group. PnTXs also contain a cyclic imine functional group.

To date, no acute human intoxication by consumption of shellfish contaminated by PnTXs has been reported, explaining the current absence of a regulation of PnTXs in Europe. However, a recent risk evaluation on cyclic imines suggested that further information is required on toxicology and distribution of these compounds [14]. Indeed, PnTXs and more generally cyclic imines, have been demonstrated to be fast acting toxins on mammalian models. These toxins exhibit acute toxicity, with neurological symptoms appearing in an “all or nothing” manner [15]. Following intra-peritoneal (*i.p.*) injection into mice, PnTX-E exhibited an LD₅₀ of between 16 and 57 $\mu\text{g kg}^{-1}$, PnTX-F an LD₅₀ of between 12.7 and 45 $\mu\text{g kg}^{-1}$, and PnTX-G an LD₅₀ of between 48 and 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ [5,16]. At a lethal dose, these three analogues induced a hyperactivity in mice during the first 10 min following the *i.p.* injection, then a strong decrease of the respiratory rate, followed by death of the animals between 30 and 50 min [5,16]. In comparison to other cyclic imines, PnTX-F and -G exhibited high oral toxicity in mice, with LD₅₀s of 25 and 150 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectively. This observation is likely to be correlated with the high hydrolytic stability of pinnatoxins at different pH in aqueous media [17], and suggested a high absorption of these toxins from the gastro-intestinal (GI) tract in mice [16].

Concerning *in vitro* activities, only PnTX-D has been reported to exhibit cytotoxicity, on the P388 leukemia cell line [18]. Initially, it has been suggested that the mechanism of action of PnTXs was an activation of calcium channels [1]. However this hypothesis has never been confirmed to our knowledge. PnTX-A, -E, -F and -G were then reported to block the nicotinic receptors of acetylcholine, with a major role of the spiro-imine subunit in this activity [19,20].

In this context, in order to investigate the various mechanisms of action and the extent of toxicity of PnTXs, the present work aimed at studying the *in vitro* toxicity of PnTX-G and *V. rugosum* extracts using cytotoxicity assays, investigating the DNA damage and effects on the cell cycle and trying to pinpoint bioactive compounds other than PnTX-G.

2. Results

2.1. Toxin content of *V. rugosum* and purification of PnTX-G

Axenic cultures of *V. rugosum* (276 mg pellet) yielded 22 mg of dried crude extract containing 10.5 μg of PnTX-G. The content of PnTX-G in this axenic biomass was somewhat less but of a similar height of order as the average over 10 batches of non-axenic cultures in our laboratory (data not shown). The biomass of *V. rugosum* used for the fractionation and the toxicological evaluation had not been grown under axenic conditions as it is extremely difficult to maintain pilot-scale cultures in such conditions.

The fractionation scheme, which followed the isolation scheme as published by Selwood et al., 2010 [5], allowed for separation of PnTX-G from other matrix components as PnTX-G was 40 times purer in fraction 3 of the silica fractionation step than in the crude extract, even when accounting for loss of toxin (Table 1). PnTX-G quantitatively partitioned into the DCM phase and the aqueous methanol (aqueous MeOH) phase in the first and second partitioning steps, respectively, the main cytotoxic components also were found in these two phases and not in the aqueous and hexane phases (data not shown). Also, fraction 2 only contained a negligible trace of PnTX-G compared to fraction 3.

Table 1: Fractionation of crude extract used for toxicological assessment of *V. rugosum*. Approximately 99% and 96% of PnTX were recovered in DCM and aqueous MeOH phases during the first and second partitioning, respectively. More than 99% of PnTX-G was recovered in fraction 3 of the silica SPE step.

	Fraction	Sample mass (mg)	PnTX-G (μg)
Crude extract	n/a	2050	844
Partitioning 1	DCM phase	442	620
	Aqueous phase	1618	0.80
	Interface	168	5.80
Partitioning 2	Aq. MeOH phase	168	571
	Hexane phase	274	21.2
Fractions	F1	7.00	0.00
	F2	73.1	0.05
	F3	38.8	649
	F4	6.10	0.27
	F5	21.7	0.16

2.2 *In vitro* toxic effects of crude and partitioned extracts of *Vulcanodinium rugosum*

The incubation times of *V. rugosum* crude extract varied according to the cell line.

Undifferentiated Caco-2 cells were incubated for 24 or 48 h. For Neuro2A and differentiated Caco-2 cells, incubation was 24 and 48 h, respectively. KB cells were incubated for 24, 48 or 72 h.

The crude extract of *V. rugosum* induced a concentration-dependent reduction of the cell viability of Neuro2A cells after only 24 h with an IC₅₀ of 0.38 (0.24 – 0.51) µg mL⁻¹ (Figure 2a). The same extract only slightly affected the viability of undifferentiated Caco2 cells, independent of exposure duration (24 or 48 h). For both exposure durations, no IC₅₀ could be determined, even though a 40% cytotoxicity was observed at the highest concentration tested (5 µg mL⁻¹), (Figure 2b). Moreover, no cytotoxicity was observed on differentiated Caco-2 cells after 48 h of incubation (data not shown). The crude extract of *V. rugosum* induced a time- and concentration-dependent reduction of the cell viability of KB cells (Figure 2c). The IC_{50s} (with confidence interval at 95%) of *V. rugosum* crude extract on KB cells were 9 (7.8 – 10.2), 1 (1.09 – 0.91) and 0.19 (0.26 – 0.12) µg mL⁻¹ after 24, 48 and 72 h of incubation, respectively. The extract was more potent on KB cells than on undifferentiated Caco-2 cells, and even more potent on Neuro2A cells.

The cytotoxic activities were monitored along the partitioning steps of the crude extract of *V. rugosum*. Cytotoxicity was higher in both the DCM and the aqueous MeOH fractions than in the crude extract, both when using Neuro2A and KB cells (Table 2). However, as with the crude extract, no IC₅₀ could be calculated for those two fractions on undifferentiated (Table 2) and differentiated (data not shown) Caco-2 cells, as only 40 to 45% cytotoxicity was reached in undifferentiated Caco-2 cells for the highest concentrations tested (5 µg mL⁻¹).

Table 2: Cytotoxicity IC₅₀ values (µg mL⁻¹) for the crude extract, DCM and aq.MeOH fractions of *V. rugosum* crude extract (N=2).

	IC ₅₀ (µg mL ⁻¹): median (values obtained with two independent experimentats)		
	Neuro2A cells (24 h of incubation)	KB cells (72 h of incubation)	Undifferentiated Caco-2 cells (48 h of incubation)
Crude extract	0.38 (0.24 – 0.51)	0.19 (0.26 – 0.12)	N.R. (40%)
DCM fraction	0.15 (0.14 – 0.15)	0.007 (0.006 – 0.008)	N.R. (40%)
aq.MeOH fraction	0.03 (0.01 – 0.04)	0.004 (0.003 – 0.004)	N.R. (45%)

N.R.: no IC₅₀ was observed and maximum cytotoxicity at 5 µg mL⁻¹ indicated in brackets

Ki-67 was measured as a biomarker of cell proliferation, typically present at specific phases of the cell cycle. Although the crude extract of *V. rugosum* had little effect on Caco-2 viability, there was a significant, dose-dependent increase in Ki-67 positive cells. This effect was even more pronounced for the partially purified aqueous MeOH fraction, where a maximum effect was already observed at the lowest dose level. The distinct punctate pattern of Ki-67 immunofluorescence in cells treated with the crude extract is indicative of a cell cycle arrest in the G1/S phase. This cell cycle arrest was accompanied by a dramatic increase in γH2AX immunofluorescence at mid-range concentrations of crude *V. rugosum* extract and even at the lowest range of the partially purified extract, i.e. in the aqueous MeOH-fraction (Figures 3a and 3b).

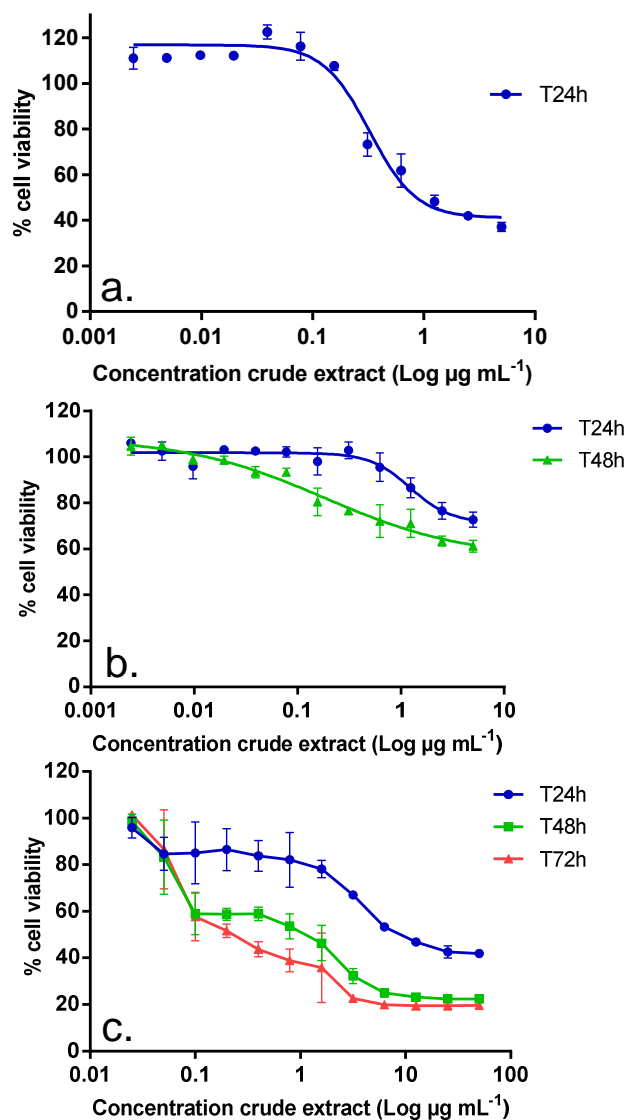


Figure 2: Effect of a crude extract of *V. rugosum* on Neuro2a cells (a), undifferentiated Caco-2 cells (b), and KB cells (c). Different exposure times were evaluated for the crude extract: 24 h for Neuro2A, 24 and 48 h for undifferentiated Caco-2 and 24, 48 and 72 h for KB cells. Data presented (mean \pm SEM) were obtained from 2 independent experiments (duplicate wells per experiment for Neuro2A and Caco-2, triplicate wells per experiment for KB cells).

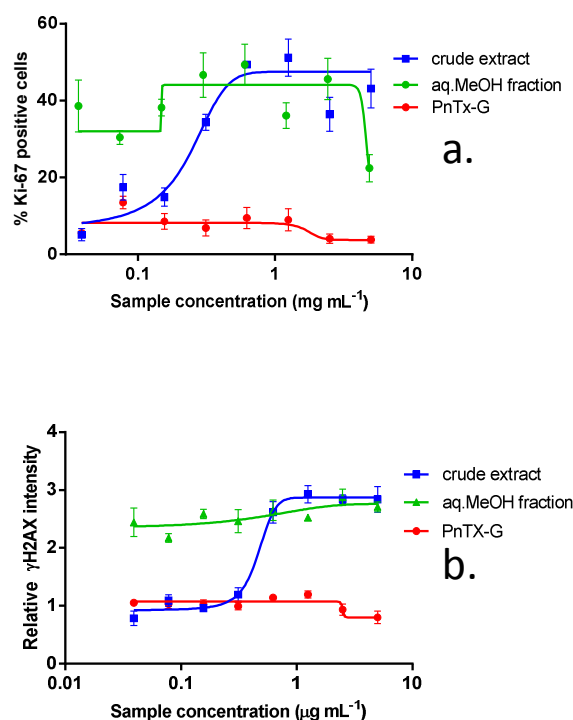


Figure 3: Effect of crude extract of *V. rugosum*, the aqueous MeOH fraction and PnTX-G on Ki-67 expression (a) and on γ H2AX phosphorylation (b) in Caco-2 cells. Data are presented as the mean average nuclear intensity of Ki-67 and γ H2AX immunofluorescence \pm SEM.

2.3. *In vitro* effects of various fractions of *V. rugosum* extract

The cytotoxic activities were monitored along the fractionation process on the three different cell lines.

Five fractions were obtained after fractionation of the aqueous MeOH fraction of the *V. rugosum* extract. Among these fractions, fraction 3 was the only one containing a significant amount of PnTX-G (Table 1). A similar classification of the potency of these fractions according to their IC_{50} was obtained from Neuro2A and KB cells results, as follows: F2 > F3 > F4 > F5 > F1 (Table 3). The most potent fraction, fraction 2, exhibited an IC_{50} of 11 (5 – 17) and 0.21 (0.18 – 0.24) ng mL⁻¹ on Neuro2A and KB cells, respectively. However, this fraction did not contain PnTX-G. The only fraction containing PnTX-G, fraction 3, showed IC_{50} of 25 and 2.59 ng mL⁻¹ on Neuro2A and KB cells, respectively. On undifferentiated Caco-2 cells, no IC_{50} could be determined for any fraction: cytotoxicity increased by ca. 40% except for fraction 4 (25% cytotoxicity), Table 3.

Table 3: Cytotoxicity IC₅₀ values (ng mL⁻¹) for the 5 fractions obtained using SPE cartridge (N=2).

		IC ₅₀ (ng mL ⁻¹): median (values obtained with two independent experiments)					
	Fraction Weight (%)	Distribution of PnTX-G (%)	KB cells (72 h of incubation)	Neuro2A cells (24 h of incubation)	Undifferentiated Caco-2 cells (48 h of incubation)		
1	4.9	0	1023 (958, 1088)	N.R.			N.R. (44.5%)
2	3	50.	0.21 (0.18, 0.24)	11 (5 - 17)			N.R. (41.6%)
3	5	26.	2.59 (2.55, 2.63)	25 (44 - 6)			N.R. (42.6%)
4		4.6	53.6 (45.4, 61.8)	575 (760 - 390)			N.R. (25.2%)
5	8	13.	62.7 (55.9, 69.5)	1140 (800 - 1480)			N.R. (41.1%)

N.R.: no IC₅₀ was observed and maximum cytotoxicity at 5 µg mL⁻¹ indicated in brackets

2.4. *In vitro* effects of Pinnatoxin G

In order to determine whether PnTX-G could contribute to the cytotoxicity observed with the crude extract, the pure toxin was tested on the different cell lines. Surprisingly, no cytotoxicity was induced in either Neuro2A cells (24 h exposure) or in undifferentiated Caco-2 cells (48 h exposure) following exposure to PnTX-G up to 32 ng mL⁻¹ (Figures 4a and b). Similarly, cell viability of differentiated Caco-2 was not affected by PnTX-G up to 32 ng mL⁻¹ (data not shown). In KB cells, higher concentrations up to 400 ng mL⁻¹ were tested, however, only slight reductions in KB cell viability (27%) were observed following 72 h of treatment (Figure 4c). In addition, PnTX-G had no effect on either cell cycle progression or DNA damage in undifferentiated Caco-2 cells (Figures 3a and 3b).

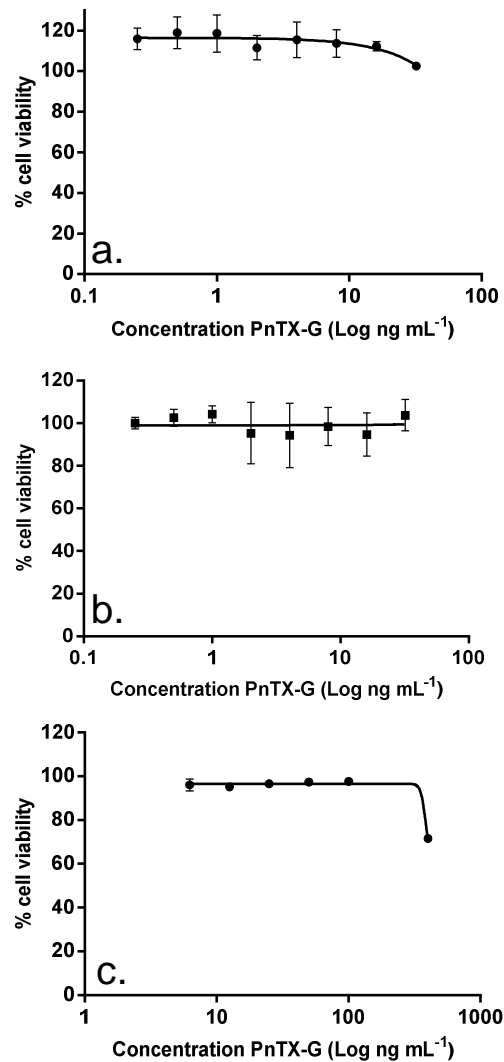


Figure 4: Effect of PnTX-G on Neuro2a cells (a), undifferentiated Caco-2 cells (b), and KB cells (c). The effect was evaluated at a single time exposure: 24 h for Neuro2A, 48 h for undifferentiated Caco-2 and 72 h for KB cells. Data presented (mean \pm SEM, in graph c, some error bars are smaller than the symbol of the data point) were obtained from 2 independent experiments (duplicate wells per experiment for Neuro2A and Caco-2, triplicate wells per experiment for KB cells).

In undifferentiated Caco-2 cells, the percentage of Ki-67 positive cells rose dramatically following treatment with purified fractions. This effect was primarily due to an increase in cells demonstrating a distinct punctate nuclear immunostaining, indicative of G1/S cell cycle arrest. Even though the fractions did not induce a large cytotoxicity in Caco-2 cells, in agreement with the cytotoxicity observed in Neuro2A and KB cells, fraction 2 had the greatest effect in promoting cell cycle arrest, followed by F3, F4, F5 and F1 (Figures 5a, 6a and 6b). The increase in γ H2AX immunofluorescence was closely associated with the cell cycle arrest, although appearing at higher concentrations of the purified fractions (Figures 5b, 6c and 6d).

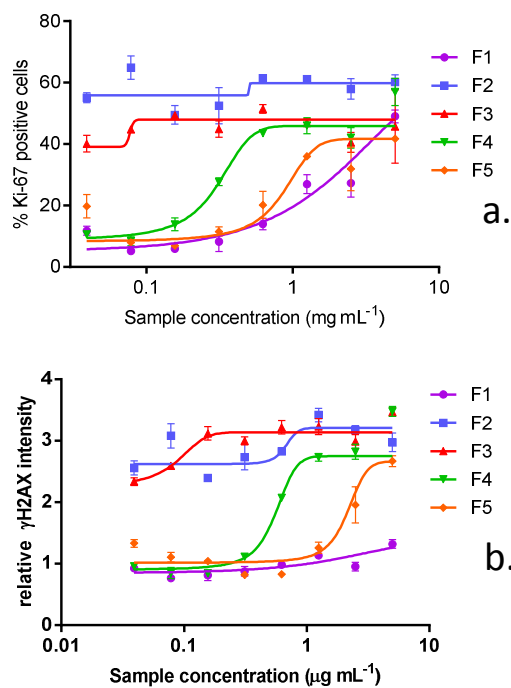


Figure 5: Effect of purified fractions of *V. rugosum* on Ki-67 expression (a) and on γ H2AX phosphorylation (b) in Caco-2 cells. Data are presented as the mean average nuclear intensity of Ki-67 and γ H2AX immunofluorescence \pm SEM.

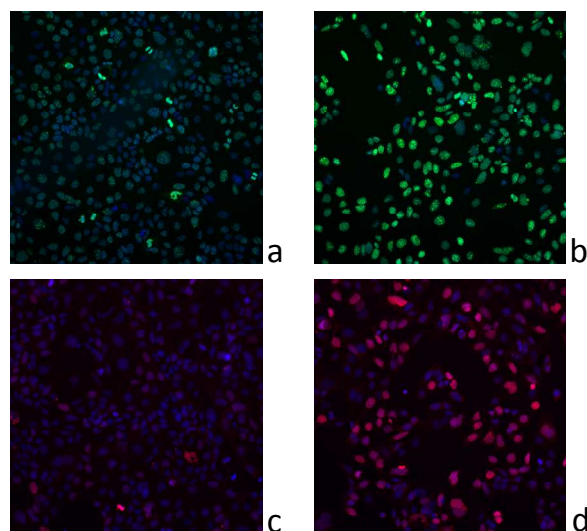


Figure 6: Representative images of γ H2AX immunofluorescence in untreated Caco-2 cells (a) and Caco-2 cells treated with F3 at 156 ng mL⁻¹ (b); and Ki-67 immunofluorescence in untreated Caco-2 cells (c) and Caco-2 cells treated with F3 at 156 ng mL⁻¹ (d).

2.5. Dereplication study

The chemical profile of the crude extract obtained from an axenic culture of *V. rugosum* was investigated using high resolution mass spectrometry in full scan mode. Analyses were carried out in triplicate, and the peaks obtained in the three experiments were dereplicated. PnTX-G could be confirmed on the basis of the retention time, fragmentation and the m/z using an in-house database of our laboratory. For dereplication of unknowns, Agilent Mass Hunter software was used to calculate scores which are based both on the closeness of the measured m/z -value to the theoretical value (Δ ppm) in a database and on the isotope distribution. Thus, compounds with identical molecular formula (isobaric compounds) have the same scores. Using the MarinLitTM [21] database, which does not contain retention time information, the most abundant compound (peak F) gave three hits for isobaric compounds: nakijiquinone A, N-carboxy-methyl-smenospongine or stachybotrin A, with a very good score of 99.4 (Figure 7a and Table 4). In table 4, the abundance of each peak was relative to the abundance of the major peak, compound F. Five other compounds could be putatively annotated, however, several major compounds remained unidentified.

Fraction 2 was analysed in the same way, and compounds observed in the crude extract were examined in this fraction (Figure 7b). As in the crude extract, the compound F was the most abundant. Peaks B, D and E were observed in fraction 2 but only in very low abundances: 0.05, 0.06 and 0.07% of compound F, respectively. The second most abundant compound (peak L, 24.4% of compound F), was putatively annotated as 7,11-dihydroxy-16-oxo-12-spongien-17-al, furcellataepoxylactone or branacenal.

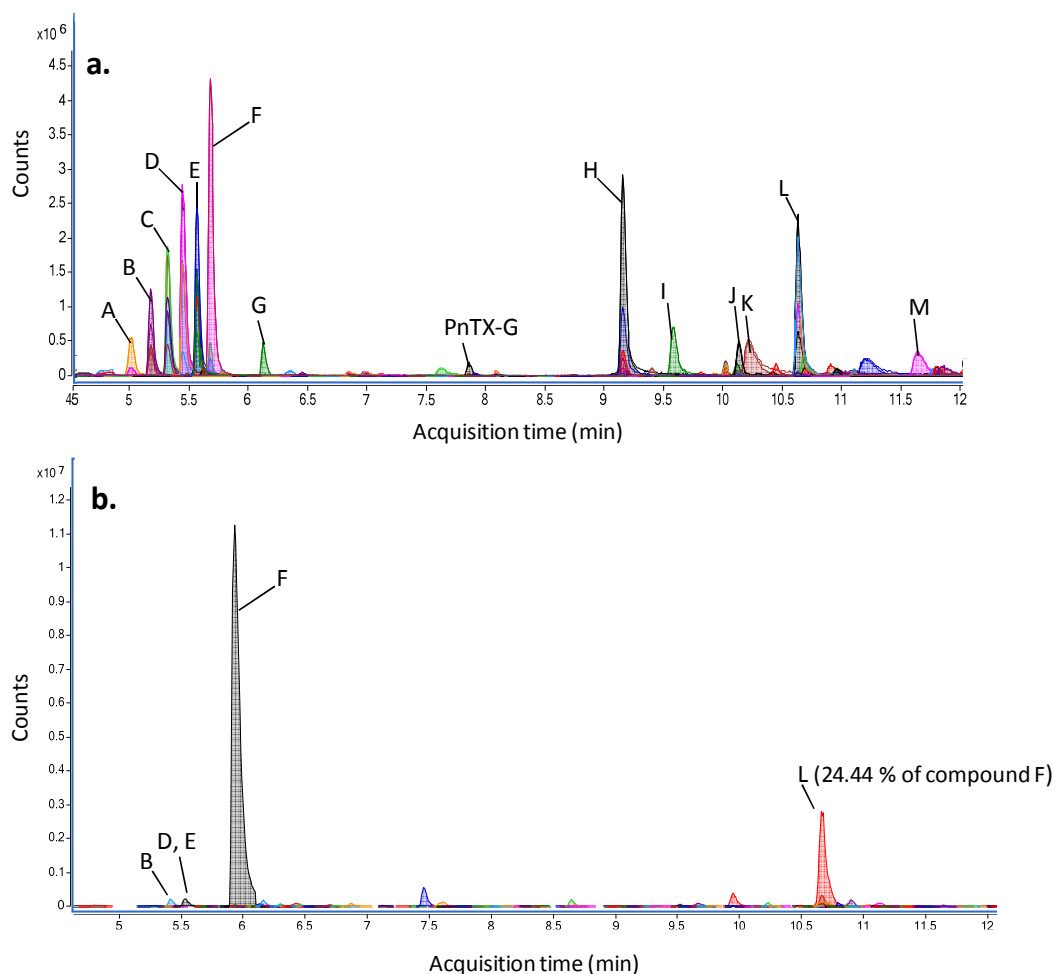


Figure 7: Compounds identified (using the *Molecular-Feature-Extraction* algorithm of the Mass Hunter software) in a crude extract of an axenic culture of *V. rugosum* (a) and of the F2 fraction obtained from a non-axenic culture of *V. rugosum* (b). The peak identification is detailed Table 4.

3. Discussion

Pinnatoxins are classified as “fast-acting toxins” and studies have demonstrated their high acute toxicity to mice by *i.p.* [2-4]. More specifically, the LD_{50} of PnTX-G by *i.p.* injection in mice was around $50 \mu\text{g kg}^{-1}$, with lethality always appearing within less than 30 min [5,16]. PnTX-G also exhibited a high toxicity by the oral route, with an LD_{50} of $150 \mu\text{g kg}^{-1}$ by gavage, with lethalities appearing within 25 to 40 min [16]. Similar results were found with a crude extract of a peridinoid dinoflagellate producer of PnTXs: the toxicity to mice was high both by *i.p.* injection (1.33 mg kg^{-1}) and by gavage (2.33 mg kg^{-1}) [7]. The similarity of the LD_{50} s determined for these two routes of administration is quite unusual among cyclic imines. Indeed, it has been reported that gymnodimine was 8 times less toxic by gavage than by *i.p.* injection, and desmethyl spirolide C was 18 times less toxic [22]. Therefore, contrary to the other cyclic imines, PnTX-G is likely to have a high oral bioavailability and to be easily absorbed through the GI tract.

In the present study, no inhibition of cell viability was observed with PnTX-G on the Neuro2A and Caco-2 cell lines exposed to concentrations as high as 32 ng mL^{-1} as well as on

KB cells exposed to up to 400 ng mL⁻¹, even after 72 h of exposure. PnTX-A, -E and -F have been shown to block neuromuscular transmission through the inhibition of nicotinic acetylcholine receptors subtypes [19,20]. These receptors also are the target of PnTX-G [11]. This mechanism of action seemed to be strongly related to the spiro-imine subunit [19]. In our study, no inhibition of cell viability was observed with PnTX-G on the different cell lines, which may suggest the absence of PnTX-sensitive nicotinic acetylcholine receptors in these *in vitro* models.

Table 4: Putative annotation of peaks observed on a chromatogram of an axenic *V. rugosum* crude extract, using the MarinLit™ database (SD = standard deviation).

Peak	Experimental m/z [M+H] ⁺		Relative abundance of compound F (%)		Putative annotation using MarinLit database	Score (DB)		Diff (DB, ppm)	
	Medium (N=3)	SD	Medium (N=3)	SD		Medium (N=3)	SD	Medium (N=3)	SD
A	393,2102	0,0001	16,74	0,72	unknown	-	-	-	-
B	437,2362	0,0002	26,65	0,62	unknown	-	-	-	-
	432,2810	0,0002	9,97	0,47	unknown	-	-	-	-
C	481,2622	0,0001	38,61	1,04	unknown	-	-	-	-
	476,3067	0,0001	18,21	1,49	unknown	-	-	-	-
D	520,3331	0,0002	33,91	0,50	unknown	-	-	-	-
	525,2886	0,0002	59,92	0,90	unknown	-	-	-	-
E	564,3593	0,0001	36,13	3,03	unknown	-	-	-	-
	569,3147	0,0001	59,10	5,14	unknown	-	-	-	-
F	613,3408	0,0003	13,70	5,11	unknown	-	-	-	-
	402,2281	0,0003	100,00	100,00	Nakijiquinone A	98,14	1,34	-1,38	0,56
					N-carboxy-methyl-smenospongine				
Stachybotrin									
G	370,2748	0,0000	10,83	0,23	N1-methyl-xestamine D	99,44	0,03	-0,84	0,02
PnTX-G	694,4664	0,0003	1,06	0,06	-	-	-	-	-
H	343,2958	0,0001	66,03	1,95	unknown	-	-	-	-
	240,2327	0,0001	8,74	0,50	2-hydroxypentadecanoic acid	98,13	0,44	-1,60	0,34
I	272,2589	0,0001	20,50	0,70	2-amino-1,3,4-hexadecanetriol; (2S,3R,4R)- form	99,11	0,21	-1,18	0,14
J	692,3843	0,0003	4,04	0,38	unknown	-	-	-	-
K	286,1444	0,0002	11,69	0,80	Solanapyrone B; 7 α -Hydroxy, 4'-demethoxy, 4'-amino, 1-aldehyde	99,03	0,71	-1,12	0,53
L	453,1680	0,0001	61,23	0,14	7,11-dihydroxy-16-oxo-12-spongien-17-al; (713,1113)-form, Di-Ac	97,96	0,94	-1,44	0,36
					Furcellataepoxylactone				
					Branacenal				
	288,2538	0,0001	9,02	0,52	unknown	-	-	-	-
M	402,3575	0,0001	6,97	0,28	unknown	-	-	-	-

The comparison of the axenic and non axenic profiles led to the identification of PnTX-G in both cultures. The fact that *V. rugosum* produces PnTX-G also in axenic conditions, and at levels similar to non-axenic cultures, corroborates that PnTX-G is produced *de novo* by the alga and not by bacterial symbionts or fungal contamination present. Several other compounds were also identified in both axenic and non-axenic cultures, including the compound with an m/z of 402.2281 ($[M+H]^+$). PnTX-G was exclusively concentrated in fraction 3, which was the second-most potent in terms of cytotoxicity (Table 3). As PnTX-G exhibited no activity on the different models, it could be concluded that other compounds were present and responsible for the toxicity. The compound with the m/z -value 402.2281 ($[M+H]^+$) as well as some unidentified compounds previously discussed could also be detected in this fraction and may be responsible for all or part of the cytotoxicity exhibited by fraction 3 (see also below).

Fraction 2 was shown to be the most potent fraction to both Neuro2A and KB cells. This fraction was also the most potent in arresting the cell cycle of undifferentiated Caco-2 cells in the G1/S phase. Occurring at lower concentrations, the cell cycle arrest appears to be the primary mechanism of toxicity. The increase in γ H2AX immunofluorescence appears at higher concentrations, and may either indicate genotoxicity, or an increase in the number of apoptotic cells. The chemical profile of fraction 2 suggested the presence of compounds with a mass-to-charge ratio of m/z 402.2281 ($[M+H]^+$) and with a molecular formula putatively corresponding to three compounds in the MarinLitTM database: nakijiquinone A, stachybotrin A or N-carboxy-methyl-smenospongine. Nakijiquinone A and N-carboxy-methyl-smenospongine both are sesquiterpenoid amino-quinones [23,24], whereas stachybotrin is an aromatic alkaloid [25]. Interestingly, those three classes of compounds are known to exhibit biological activities, especially cytotoxicity, albeit at rather high concentration. Even if the cytotoxicity is not particularly high ($\mu\text{g mL}^{-1}$ -range), the concentration of this compound appears rather high, since a 100-fold higher area was measured for peak F (Table 4) compared to PnTX-G (in the absence of calibration standards peak areas are indicative of concentration of a compound). Nakijiquinones, isolated from Okinawan marine sponges, exhibited various activities as cytotoxicity against L-1210 murine leukemia and KB cells or weak inhibition of the Her-2/Neu tyrosine kinase receptor [26,27]. Smenospongine, the main representative of this compound group had also been isolated from marine sponges and induced the differentiation of the leukemia cell line K562 into normal cells [28] and the inhibition of the growth of 39 human solid tumor [29]. Smenospongine and derivatives also induced a G1 arrest in the K562 cells, and apoptosis of other leukemia cell lines HL60 and U937 [30]. Stachybotrin A had initially been isolated from the marine fungus *Stachybotris* sp. Antifungal and antimicrobial activities were identified, as well as cytotoxicity on the epithelial adenocarcinoma A-549 cell line, the breast adenocarcinoma MCF-7 cell line and the colon adenocarcinoma HT-29 cell line [25]. Thus, any of these three compounds could potentially be responsible for the cytotoxicity of the fraction F2 of the *V. rugosum* extract. However, the

MarinLit™ database only constitutes a collection of marine natural products while many new marine natural products are being discovered every year [31]. Further in-depth literature screening and eventually full purification of the compound will be necessary for full structure elucidation.

4. Experimental section

4.1. Reagents

Methanol (MeOH), acetone, acetonitrile and dichloromethane (DCM) were obtained as HPLC grade solvents from JT Baker and Sigma Aldrich. Hexane, formic acid (puriss quality) and ammonium formate (purity for MS) were obtained from Sigma-Aldrich. Milli-Q water for HPLC was produced in-house using a Milli-Q integral 3 system (Millipore). Pinnatoxin G (PnTX-G) was obtained from the National Research Council of Canada.

4.2. *Vulcanodinium rugosum* growth conditions

Vulcanodinium rugosum (IFR-VRU-011) was grown during 83 days in flat-bottomed glass flask (10 L) of L1-medium [32]. The strain was maintained at 18°C, with a photon flux density at 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and a photoperiod of 16 h of light and 8 h of dark. Sea water (38 psu) was collected from the Mediterranean Sea, filtered and used for making up culture media. Cells were collected by centrifugation (3500 g, 20 min, 4°C).

Axenic cultures were obtained by using antibiotic-antimycotic treatment for 72 h using 10 ml L⁻¹ penicillin-streptomycin-amphotericin solution (Gibco) containing 10,000 units penicillin and 10,000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ streptomycin sulfate and 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ amphotericin B as Fungizone® in 0.85% saline, followed by transfer to fresh medium.

4.3. Extraction, purification and fractionation of a crude extract of *V. rugosum*

Three successive extractions of wet algal pellet (6.3 g) were carried out using 100% MeOH (20 mL), followed by centrifugation (2500 g, 10 min, 4°C). The supernatants were pooled and dried by rotary evaporation, leading to the crude extract (Figure 8). A first purification step was carried out on the crude extract by liquid-liquid partitioning using DCM: distilled water (v/v, 2:1). The DCM phase (300 mL) was rinsed twice with aqueous NaCl 0.1 M (150 mL) and centrifugation (2500 g, 10 min, 4°C). The supernatants were pooled and dried by rotary evaporation, leading to the DCM fraction. A second purification step was carried out on the DCM fraction by liquid-liquid partitioning using aqueous MeOH70% (aqueous MeOH) and hexane in proportions 2/1. The aqueous MeOH phase (150 mL) was rinsed twice with hexane (50 mL), followed by centrifugation (2500 g, 10 min, 4°C). The supernatants were pooled and dried by rotary evaporation, leading to the aqueous MeOH fraction. A solid-phase extraction (SPE) was then carried out for fractionation of the aqueous MeOH fraction. SPE cartridges were silica-based (SPE UPTI-CLEAN SI-S 500/3, Interchrom). The extractions were carried

out using five elution solvents: DCM 100%, DCM/Acetone (85:15), DCM/Acetone (50:50), DCM/MeOH (80:20) and MeOH 100%.

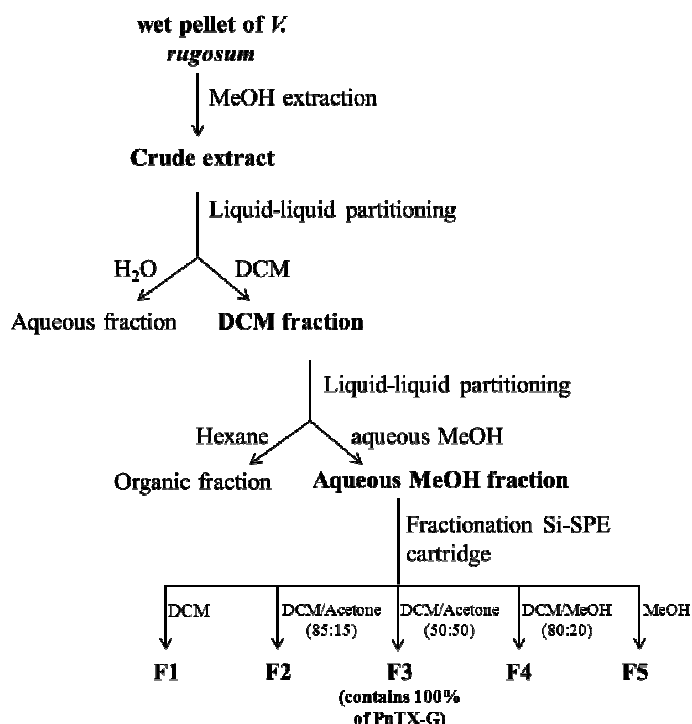


Figure 8: Schematic of the *V. rugosum* pellet purification procedure

For analysis of an axenic culture of *V. rugosum*, 200 mL of batch culture were sacrificed 2 weeks after axenisation of the main culture. Cells were collected using both glass beads and a scraper, with subsequent centrifugation of the wet biomass. The cell pellet (276 mg) was extracted in triplicate with MeOH (5 mL each) and taken up in 1 mL MeOH prior to further dilutions. Dilutions of this solution were analysed by triple-stage quadrupole analysis for quantitation of PnTX-G and by quadrupole/time-of-flight mass spectrometry for metabolomic assessment of the algal contents.

4.4. Quantification of PnTX-G using a triple stage quadrupole mass spectrometer

Analysis of pinnatoxins was performed on a UFLC (model Nexera, Shimadzu) coupled to a triple-quadrupole mass spectrometer (5500Qtrap, AB Sciex). Chromatography was performed on a Hyperclone MOS C8 column (50 × 2.0 mm, 3 μm), with a C8 guard column (4 × 2.0 mm, 3 μm, Phenomenex). A binary mobile phase was used, phase A (100% aqueous) and phase B (95% aqueous acetonitrile), both containing 2 mM ammonium formate and 50 mM formic acid. The flow rate was 0.2 mL min⁻¹ and injection volume was 5 μL. The column and sample temperatures were 25°C and 4°C, respectively. A gradient elution was employed, starting with 30% B, rising to 95% B over 2.5 min, held for 5 min, then decreased to 30% B in 0.1 min and held for 2.5 min to equilibrate the system.

The LC-MS/MS system was used in positive ionization and multiple reaction monitoring (MRM) mode, with the following three transitions per compound: PnTX-G m/z 694.4→676.4, 694.4→458.3 and 694.4→164.1; PnTX-A m/z 712.4→694.4, 712.4→458.3 and 712.4→164.1, PnTX-B and C, m/z 741.4→723.5, 741.4→458.3 and 741.4→164.1; PnTX-D, m/z 782.4→764.4 782.4→488.3 and 782.4→164.1; PnTX-E, m/z 784.4→764.4 784.4→488.3 and 784.4→164.1; PnTX F, m/z 766.4→738.4, 766.4→488.3 and 766.4→164.1; pteriatoxins A, B and C m/z 831.5→787.5, 831.5→458.3 and 831.5→164.1. The most intense transition, giving the product ion m/z 164.1, was used to quantify toxins. All toxins were quantified against the PnTX-G standard from NRC, assuming that all analogues had the same response factor as PnTX-G.

The ESI interface was operated using the following parameters: curtain gas 30 psi, temperature: 650°C, gas1 50 psi; gas2 60 psi, ion spray voltage 5500 V. For detection, parameters were: the declustering potential was 30 V and the entrance potential 10 V. Three collision energies were applied (53, 59 and 67 eV) with collision cell exit potentials of 10, 6 and 10 V for transitions 1, 2 and 3 of each compound, respectively.

The limit of detection (LOD) was determined from the signal-to-noise ratio of the lowest standard injected after injection of 20 samples, using automated calculation in the Analyst 1.5.1 software of Applied Biosystems: This algorithm calculates the LOD as the sample giving a signal height 3 times the standard deviation of the noise. The LOD (5 μ L injected) was 250 fg on column.

4.5. Growth conditions of the different cell lines

Different cell lines were chosen for this study: Neuro2A, undifferentiated and differentiated Caco-2 and KB cells. Neuro2A and Caco-2 cell lines respectively derived from the human nervous system and intestine, organs which are known to be the target of some phycotoxins. These two cell lines, as well as KB cells have been previously used to study the detection of toxin in shellfish extracts [33-36].

Neuro2A cells

The mouse Neuro2A neuroblastoma cell line (ATCC CCL-131, passages 11-50) was cultured in RPMI 1640-Glutamax containing 2 g L⁻¹ glucose, and supplemented with 10% FCS, 1 mM sodium pyruvate, 50 U mL⁻¹ penicillin and 50 μ g mL⁻¹ streptomycin. The cell line was routinely grown in 75 cm² flasks at 37°C and 5% CO₂ and detached mechanically for sub-culturing.

Undifferentiated Caco-2 cells

The human Caco-2 colorectal adenocarcinoma cell line (ATCC HTB-37, passages 18-40) were cultured in MEM-Glutamax containing 1 g L⁻¹ glucose and supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 50 U mL⁻¹ penicillin and 50 μ g mL⁻¹ streptomycin and 1% non-essential

amino acids. The cell line was routinely grown in 75 cm² flasks at 37°C and 5% CO₂ and passaged twice a week by trypsinization prior to cell centrifugation (5 min, 136 g).

Differentiated Caco-2 cells

To obtain differentiated Caco-2 cells, 60,000 cells cm² were seeded in 48 wells plates with 200 µL per well of medium as described previously, containing 10% FCS. Medium was renewed each 2-3 days. Caco-2 cells reached confluence after 3 days and were differentiated 21 days after.

KB cells

The KB cells were maintained at 37°C in a 95% air, 5% CO₂ atmosphere in Eagle's basal medium (Sigma-Aldrich) supplemented with 5% (v/v) of FCS and a mix leading to final concentrations of 400 nM L-glutamine, 20 U mL⁻¹ penicillin-G and 100 µg mL⁻¹ streptomycin (Sigma-Aldrich). Cells were grown in culture flasks (Dutscher) until cell confluence.

4.6. Cytotoxicity assays

Neuro2A and Caco-2 cells

Except for differentiated Caco-2, cells were seeded in 96-well plates at a density of 50,000 cells 100 µL⁻¹ well⁻¹ (for undifferentiated Caco-2) and 20,000 cells 100 µL⁻¹ well⁻¹ (for Neuro2A) 24 h prior to treatment. After removing the medium, cells were exposed in duplicate to the compound in serum free-medium (100 µL well⁻¹) for 24 or 48 h, as indicated. The template of each 96 well plate was designed by omitting marginal rows and columns; 6 wells were used for the control and 6 wells for the vehicle control. The vehicle control (VeC) contained 5% methanol, the highest concentration of methanol used and which was previously shown to induce no cytotoxicity [34]. Differentiated Caco-2 cells were treated in 48 wells plates with serum free-medium (200 µL well⁻¹) for 48 h.

KB cells

Cells were rinsed with Dulbecco's phosphate buffered saline (Sigma-Aldrich), removed from culture flasks by treatment with trypsin (Sigma-Aldrich), enumerated and diluted with fresh medium.

Inoculation of microplates was different for observations at 24, 48 and 72 h or to the single observation at 72 h. For the study with different time points, cells were seeded at a density of 70,000 cells 100 µL⁻¹ well⁻¹ and plates were incubated for 72 h. Medium culture was then removed from each well and replaced by 50 µL of fresh medium. For the single observation, cells were seeded at a density of 200,000 cells 50 µL⁻¹ well⁻¹ and plates were incubated for 48 h. The template of each 96 well plate was designed by omitting marginal rows and columns. For the two types of experiments, test samples were prepared in MeOH, diluted ten-fold in culture medium and 50 µL of this diluted test solution were added to each well,

reaching a final concentration of 5% methanol. Concentrations were tested in triplicate, and experiments were carried out in duplicate. Culture medium (5% MeOH) was used as negative control.

4.7. Assessment of the cell viability

Cytotoxicity testing for Neuro2A and undifferentiated Caco-2 cells followed the conditions set up in Sérandour et al (2011) [34]. Only a short duration of exposure was selected for Neuro2A while exposure on Caco-2 and KB cells was increased up to 72 h due to the longer cell doubling time of these two models (20 h and 48 h, respectively).

For Neuro2A and Caco-2 cells, the cytotoxicity was measured using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. After treatment, the medium was replaced by a FCS-free medium containing 0.5 mg mL^{-1} MTT (Sigma) for 2 h at 37°C . The medium was discarded prior to the addition of 0.1 N HCl-acidified isopropanol to dissolve the formazan. The absorbance was read at 570 nm and was expressed as the percentage of mean absorbance (N=2) in VeC (100% of viability).

For KB cells, after 24, 48 or 72 h of incubation at 37°C , 50 μL of a mix of solution 1 and 2 of a kit based on the 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium (XTT-based kit, Roche) were added to each well, followed by an incubation of 4 h at 37°C . Plates were gently shaken and read at 405 nm and 630 nm with a microplate reader (EL800, Bio-Tek). The absorption values for each extract were averaged and the averages were then expressed as a percentage, relative to the solvent control.

IC₅₀ determination

Inhibition curves for Neuro2A and Caco-2 cells were modeled using a nonlinear regression analysis (GraphPad Prism, version 5.0c, San Diego, USA). Concentrations at which cell growth was inhibited to 50% (IC₅₀s) and 95% confidence intervals were also calculated with the same model. The model did not fit with the curve of KB cells viability, so IC₅₀s were calculated using linear interpolation of the two points surrounding 50% inhibition.

4.8. DNA damage and cell cycle progression measurements

Following 24 h treatment, undifferentiated Caco-2 cells in 96-well plates were fixed with 4% formaldehyde and permeabilised with 0.2% Triton X-100. After 3 washes with PBS-tween 20 (0.05%), cells were incubated overnight with an anti- γH2AX mouse monoclonal antibody (Thermo MA1-2022; 1:1500), or a rabbit anti Ki-67 (Abcam ab15580; 1:1000). Histone H2AX is phosphorylated in γH2AX after DNA damages and Ki-67 is a marker of the cell proliferation. Cells were then washed 3 times with PBS-tween and incubated with Dylight 550-conjugated goat anti-mouse or Dylight 488-conjugated goat anti-rabbit secondary antibodies (1:1000) for 45 min. Nuclei were stained with DAPI. The mean average fluorescence intensity was quantified using an Arrayscan VTi high content screening

microscope using the Target Activation algorithm. The average nuclear intensity was calculated from 10 fields per well, 3 wells per condition. Two independent experimentations were carried out.

4.9. Dereplication study using a Quadrupole-Time-of-Flight hybrid mass spectrometer

As the cytotoxicity study suggested the presence of cytotoxic compounds different from PnTX-G, an in-depth study was undertaken using high resolution mass spectrometry (HRMS).

Aliquots (5 μL) of each sample were separated on a Kinetex 1.7 μm C18 100 \AA (Phenomenex) column (150 x 2.1 mm) maintained at 40 $^{\circ}\text{C}$, using an Agilent 1290 Infinity LC system with a gradient mobile phase (0.5 mL min^{-1}) comprising 0.1% aqueous acetic acid (A) and acetonitrile containing 0.1% acetic acid (B). The gradient was as follows: 5% B from 0 to 2.4 min, raise to 25% B from 2.4 to 4.5 min, then raise to 30 % B from 4.5 to 11 min, finally raise to 100 % B from 11 to 14 min and maintain until 16.5 min, subsequently decrease to 5% B until 20 min and maintain at 5% B until 25 min. The eluent was directly introduced into the mass spectrometer by electrospray. Mass spectrometry was performed on a 6540 UHD Q-TOF mass spectrometer (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), operating in positive ion mode. The capillary voltage, fragmentor voltage and skimmer were set to 3,900, 150 and 60 V, respectively. The sheath gas was at 350 $^{\circ}\text{C}$ (12 mL min^{-1}) and the drying gas at 175 $^{\circ}\text{C}$ (5 mL min^{-1}) and nebulizer 43 psi. Nitrogen was used as collision gas. Mass spectra were acquired in full scan analysis over an m/z range of 50–1,700 using extended dynamic range and storage in centroid mode. To maintain mass accuracy throughout the run, a reference mass solution containing reference ions 121.0508 and 922.0097 was used in the positive ionization mode. The correction of mass axis using these reference ions typically results in a mass accuracy of 1 ppm in full scan mode and 2 ppm in fragmentation mode. Data station operating software was MassHunter Workstation Software (version B.05).

Metabolomic fingerprints were deconvoluted to allow the conversion of the three-dimensional raw data (m/z , retention time, ion current) to time- and mass-aligned chromatographic peaks with associated peak areas. Data were processed using MassHunter Qualitative Analysis software (Agilent Technologies) where compounds were extracted from the raw data using the Molecular Feature Extractor (MFE) algorithm.

Molecular feature extractor. The MFE algorithm is a compound finding technique that locates individual sample components (molecular features), even when chromatograms are complex and compounds are not well resolved chromatographically. MFE locates ions that are covariant (rise and fall together in abundance) and the algorithm uses the accuracy of the mass measurements to group related ions—related by charge-state envelope, isotopic distribution, and/or the presence of adducts and dimers. It assigns multiple species (ions) that are related to the same neutral molecule (for example, ions representing multiple charge states or adducts of the same neutral molecule) to a single compound that is referred to as a feature. Using this approach, the MFE algorithm can locate multiple compounds at any given retention time, i.e. also in a single peak [37].

The result is a compound table with associated chromatograms and pure spectra, ready for further analysis. Subsequently, samples were processed using MassProfiler software (Agilent Technologies) and compound identification was performed using an in-house database and the MarinLit™ database.

To ensure reproducibility and precision, analyses were carried out in triplicate.

5. Conclusions

PnTX-G is a marine toxin inducing strong neurological symptoms in mice but this study revealed that it is not a potent cytotoxic compound, using the Neuro2A, Caco-2 and KB cell lines. However, a crude extract of a culture of *V. rugosum* induced a reduction of the cell viability of those three different cell lines, as well as cell cycle arrest accompanied by DNA damage. A crude extract was fractionated and the fraction exhibiting the more potent *in vitro* activity did not contain PnTX-G. The dereplication of the crude extract and fraction revealed that these activities could be induced by compounds such as nakijiquinone a, N-carboxymethyl-smenospongine or stachybotrin A, which have previously been reported to be cytotoxic. Further investigations will be necessary to identify and purify compounds responsible for the activity of *V. rugosum* crude extracts and fractions.

Acknowledgement

We acknowledge the collaboration of Paul McNabb and Andrew I. Selwood (both Cawthron Institute, New Zealand) and Michael A. Quilliam and Pearse McCarron (both Institute of Marine Biosciences, National Research Council Canada) for the provision of a well characterized reference solution for PnTX-G. The authors thank Thomas Glauner and Bernhard Wüst (both Agilent) for their collaboration on high resolution mass spectrometry. We gratefully thank Rachelle Lanceleur and Pierre-Jean Ferron (Anses, Fougères) for technical assistance. We also thank the technical staff of the Laboratoire Phycotoxines (Ifremer, Nantes) and the Laboratoire Ressources Environnement – Languedoc-Roussillon (Ifremer, Sète) for help in the selection of samples and initial analysis of samples from Ingril Lagoon. Informatic tools developed in the ChiMiMar project were used (Regional Council of the “Pays de la Loire” (2010 – 2013).

Funding for this work came from the following separate sources: i) the COLNACOQ project funded by the Regional Council of the “Pays de la Loire” (2009 – 2013); ii) the French Directorate General for Food (DGAL), through Programme 206, convention number 2011/203/2100482701 (2011 – 2012); iii) Ifremer through the DiALTOX and RISCAP projects funded by the French Ministry of Research and Higher Education through programme 148 (2009 – 2012).

References

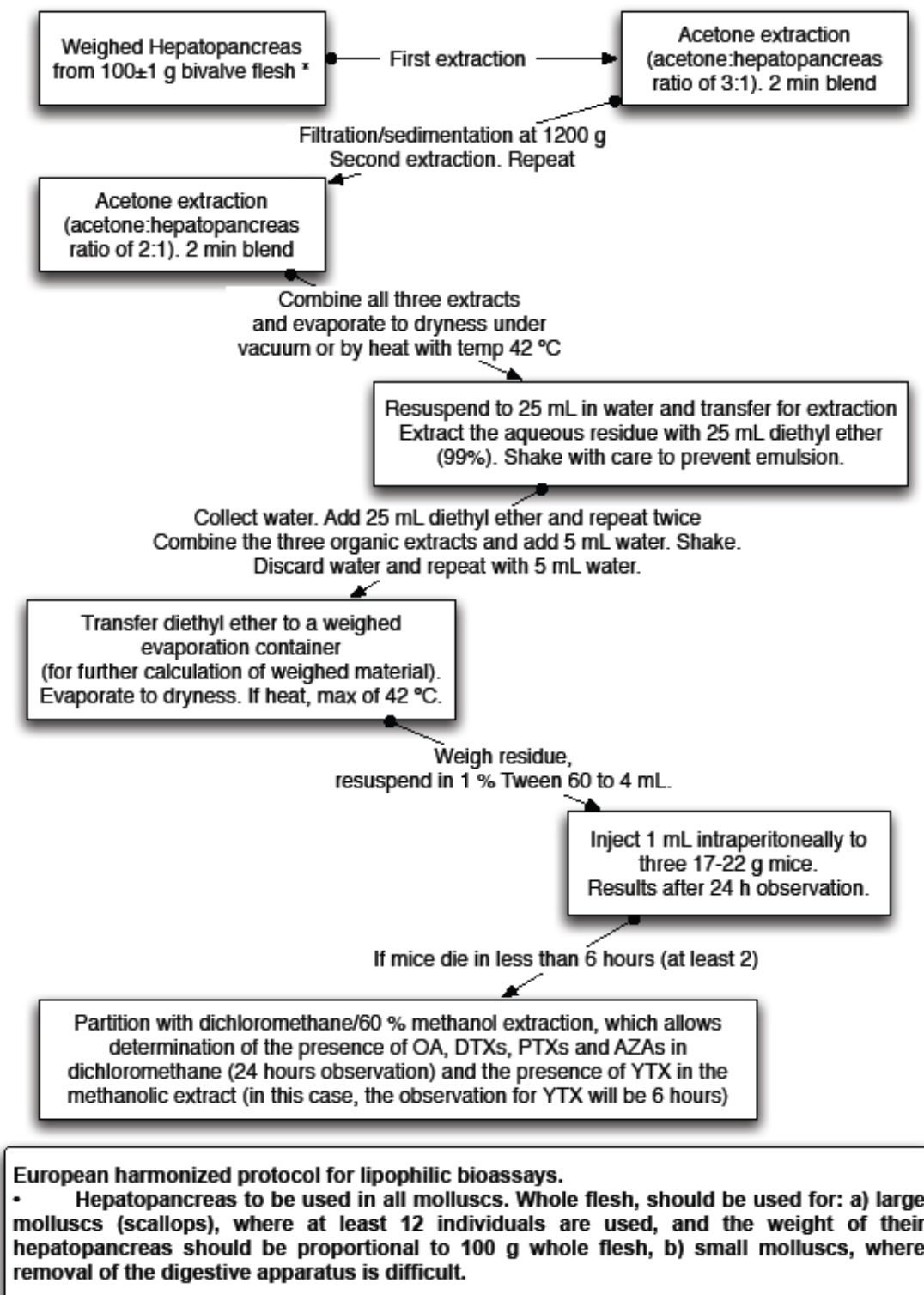
1. Zheng, S.; Huang, F.; Chen, S.; Tan, X.; Zuo, J.; Peng, J.; Xie, R., The isolation and bioactivities of pinnatoxin. *Chinese Journal of Marine Drugs* **1990**, *9*, 33-35.
2. Uemura, D.; Chou, T.; Haino, T.; Nagatsu, A.; Fukuzawa, S.; Zheng, S.Z.; Chen, H.S., Pinnatoxin-a a toxic amphoteric macrocycle from the okinawan bivalve *pinna muricata*. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 1155-1156.
3. Chou, T.; Haino, T.; Kuramoto, M.; Uemura, D., Isolation and structure of pinnatoxin d, a new shellfish poison from the okinawan bivalve *pinna muricata*. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 4027-4030.
4. Takada, N.; Umemura, N.; Suenaga, K.; Chou, T.; Nagatsu, A.; Haino, T.; Yamada, K.; Uemura, D., Pinnatoxins b and c, the most toxic components in the pinnatoxin series from the okinawan bivalve *pinna muricata*. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 3491-3494.
5. Selwood, A.I.; Miles, C.O.; Wilkins, A.L.; van, G.R.; Munday, R.; Rise, F.; McNabb, P., Isolation, structural determination and acute toxicity of pinnatoxins e, f and g. *J. Agr. Food Chem.* **2010**, *58*, 6532-6542.
6. Rundberget, T.; Aasen, J.A.B.; Selwood, A.I.; Miles, C.O., Pinnatoxins and spirolides in norwegian blue mussels and seawater. *Toxicon* **2011**, *58*, 700-711.
7. Rhodes, L.; Smith, K.; Selwood, A.; McNabb, P.; van Ginkel, R.; Holland, P.; Munday, R., Production of pinnatoxins by a peridinoide dinoflagellate isolated from northland, new zealand. *Harmful Algae* **2010**, *9*, 384-389.
8. Smith, K.F.; Rhodes, L.L.; Suda, S.; Selwood, A.I., A dinoflagellate producer of pinnatoxin g, isolated from sub-tropical japanese waters. *Harmful Algae* **2011**, *10*, 702-705.
9. Rhodes, L.; Smith, K.; Selwood, A.; McNabb, P.; Molenaar, S.; Munday, R.; Wilkinson, C.; Hallegraeff, G., Production of pinnatoxins e, f and g by scrippsielloid dinoflagellates isolated from franklin harbour, south australia. *N. Z. J. Mar. Freshw. Res.* **2011**, *45*, 703-709.
10. Nézan, E.; Chomerat, N., *Vulcanodinium rugosum* gen. Nov., sp. Nov. (dinophyceae): A new marine dinoflagellate from the french mediterranean coast. *Cryptogam. Algol.* **2011**, *32*, 3-18.
11. Hess, P.; Abadie, E.; Hervé, F.; Berteaux, T.; Séchet, V.; Aráoz, R.; Molgó, J.; Zakarian, A.; Sibat, M.; Rundberget, T., *et al.*, Pinnatoxin-g is responsible for atypical toxicity in mussels (*mytilus galloprovincialis*) and clams (*venerupis decussata*) from ingril, a french mediterranean lagoon. *Toxicon* **2013**.
12. Rhodes, L.; Smith, K.; Selwood, A.; McNabb, P.; Munday, R.; Suda, S.; Molenaar, S.; Hallegraeff, G., Dinoflagellate *vulcanodinium rugosum* identified as the causative organism of pinnatoxins in australia, new zealand and japan. *Phycologia* **2011**, *50*, 624-628.
13. McCarron, P.; Rourke, W.A.; Hardstaff, W.; Pooley, B.; Quilliam, M.A., Identification of pinnatoxins and discovery of their fatty acid ester metabolites in mussels (*mytilus edulis*) from eastern canada. *J. Agr. Food Chem.* **2012**, *60*, 1437-1446.
14. EFSA, Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the european commission on marine biotoxins in shellfish - cyclic imines (spirolides, gymnodimines, pinnatoxins and pteriatoxins). *The EFSA Journal* **2010**, *8*, 1628.
15. Cembella, A.; Krock, B., Cyclic imine toxins: Chemistry, biogeography, biosynthesis, and pharmacology. In *Seafood and freshwater toxins - pharmacology, physiology and detection - second edition*, Botana, L.M., Ed. CRC Press Taylor & Francis Group: 2008; p 941.

16. Munday, R.; Selwood, A.I.; Rhodes, L., Acute toxicity of pinnatoxins e, f and g to mice. *Toxicon* **2012**, *60*, 995-999.
17. Jackson, J.J.; Stivala, C.E.; Iorga, B.I.; Molgo, J.; Zakarian, A., Stability of cyclic imine toxins: Interconversion of pinnatoxin amino ketone and pinnatoxin a in aqueous media. *The Journal of Organic Chemistry* **2012**, *77*, 10435-10440.
18. Kuramoto, M.; Arimoto, H.; Uemura, D., Bioactive alkaloids from the sea: A review. *Mar. Drugs* **2004**, *2*, 39-54.
19. Araoz, R.; Servent, D.; Molgo, J.; Iorga, B.I.; Fruchart-Gaillard, C.; Benoit, E.; Gu, Z.; Stivala, C.; Zakarian, A., Total synthesis of pinnatoxins a and g and revision of the mode of action of pinnatoxin a. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 10499-10511.
20. Hellyer, S.D.; Selwood, A.I.; Rhodes, L.; Kerr, D.S., Marine algal pinnatoxins e and f cause neuromuscular block in an *in vitro* hemidiaphragm preparation. *Toxicon* **2011**, *58*, 693-699.
21. Munro, M.H.G.; Blunt, J.W., Marine literature database, version 13.5. Marine chemistry group, department of chemistry - university of canterbury. Christchurch, new zealand; 2007. 2011.
22. Munday, R., Toxicology of the pectenotoxins. In *Seafood and freshwater toxins - pharmacology, physiology and detection second edition*, CRC Press Taylor & Francis Group ed.; Botana, L.M., Ed. CRC Press Taylor&Francis Group: 2008; p 941.
23. Kondracki, M.L.; Guyot, M., Smenospongine: A cytotoxic and antimicrobial aminoquinone isolated from *smenospongia* sp. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 5815-5818.
24. Shigemori, H.; Madono, T.; Sasaki, T.; Mikami, Y.; Kobayashi, J., Nakijiquinones a and b, new antifungal sesquiterpenoid quinones with an amino acid residue from an okinawan marine sponge. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 8347-8354.
25. Xu, X.; de Guzman, F.S.; Gloer, J.B., Stachybotrins a and b: Novel bioactive metabolites from a brackish water isolate of the fungus *stachybotrys* sp. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 6700-6703.
26. Stahl, P.; Kissau, L.; Mazitschek, R.; Huwe, A.; Furet, P.; Giannis, A.; Waldmann, H., Total synthesis and biological evaluation of the nakijiquinones. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 11586-11593.
27. Gordaliza, M., Cytotoxic terpene quinones from marine sponges. *Mar. Drugs* **2010**, *8*, 2849-2870.
28. Aoki, S.; Kong, D.; Matsui, K.; Rachmat, R.; Kobayashi, M., Sesquiterpene aminoquinones, from a marine sponge, induce erythroid differentiation in human chronic myelogenous leukemia, k562 cells. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **2004**, *52*, 935-937.
29. Kong, D.; Yamori, T.; Kobayashi, M.; Duan, H., Antiproliferative and antiangiogenic activities of smenospongine, a marine sponge sesquiterpene aminoquinone. *Mar. Drugs* **2011**, *9*, 154-161.
30. Kong, D.; Aoki, S.; Sowa, Y.; Sakai, T.; Kobayashi, M., Smenospongine, a sesquiterpene aminoquinone from a marine sponge, induces g1 arrest or apoptosis in different leukemia cells. *Mar. Drugs* **2008**, *6*, 480-488.
31. Mayer, A.M.S.; Rodríguez, A.D.; Berlinck, R.G.S.; Hamann, M.T., Marine pharmacology in 2005–6: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. *BBA-Gen. Subjects* **2009**, *1790*, 283-308.
32. Guillard, R.R.L.; Hargraves, P.E., *Stichochrysis immobilis* is a diatom, not a chrysophyte. *Phycologia* **1993**, *32*, 234-236.
33. Ledreux, A.; Sérandour, A.-L.; Morin, B.; Derick, S.; Lancelour, R.; Hamlaoui, S.; Furger, C.; Biré, R.; Krys, S.; Fessard, V., Collaborative study for the detection of

- toxic compounds in shellfish extracts using cell-based assays. Part ii: Application to shellfish extracts spiked with lipophilic marine toxins. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *403*, 1995-2007.
34. Sérandour, A.L.; Ledreux, A.; Morin, B.; Derick, S.; Augier, E.; Lanceleur, R.; Hamlaoui, S.; Moukha, S.; Furger, C.; Bire, R., *et al.*, Collaborative study for the detection of toxic compounds in shellfish extracts using cell-based assays. Part i: Screening strategy and pre-validation study with lipophilic marine toxins. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *403*, 1983-1993.
 35. Amzil, Z.; Pouchus, Y.F.; Le, B.J.; Roussakis, C.; Verbist, J.F.; Marcaillou-Lebaut, C.; Masselin, P., Short-time cytotoxicity of mussel extracts: A new bioassay for okadaic acid detection. *Toxicon* **1992**, *30*, 1419-1425.
 36. Tubaro, A.; Florio, C.; Luxich, E.; Vertua, R.; Loggia, R.D.; Yasumoto, T., Suitability of the mtt-based cytotoxicity assay to detect okadaic acid contamination of mussels. *Toxicon* **1996**, *34*, 965-974.
 37. Sana, T.R.; Roark, J.C.; Li, X.; Waddell, K.; Fischer, S.M., Molecular formula and metlin personal metabolite database matching applied to the identification of compounds generated by lc/tof-ms. *JBT* **2008**, *19*, 258.

Annexes

Annexe 1 : Protocole du test de toxicité aigüe sur souris (*in* EFSA, 2008b)



Annexe 2 : Protocoles des tests de cytotoxicité sur cellules KB

a- Entretien des cellules KB

- Préparer du milieu BME complet à 5% de sérum de veau fœtal, 400 nM de L-glutamine, 20 U.mL⁻¹ de pénicilline G et 100 µg.mL⁻¹ de streptomycine finaux.
- Jeter le milieu de la flasque de culture contenant les cellules KB à trypsiner
- Laver 3 fois les cellules avec du tampon PBS
- Ajouter 5 ml de trypsine pour une flasque de 75 cm² et laisser agir 1 minute
- Jeter le surnageant correspondant à l'excès de trypsine
- Laisser agir l'enzyme en surveillant régulièrement l'état des cellules au microscope
- Quand les cellules sont arrondies, au bout de 5 minutes environ, arrêter l'action de la trypsine en ajoutant 5 mL de milieu complet
- Décoller les cellules par aspiration-refoulement successifs à l'aide d'une pipette
- Vérifier au microscope que les cellules sont bien séparées les unes des autres, sinon les décoller de nouveau par aspiration-refoulement
- Prélever 5 mL de la suspension de cellules pour réensemencer une autre flasque de KB
- Compléter les flasques avec du milieu complet de façon à recouvrir le fond de la flasque quand elle est allongée
- Incuber la flasque à 37°C, 5% CO₂

b- Trypsination des cellules KB

- Jeter le milieu de la flasque de culture contenant les cellules à trypsiner
- Laver 3 fois les cellules avec du PBS
- Ajouter la trypsine et laisser agir 1 minute
- Jeter le surnageant correspondant à l'excès de trypsine
- Laisser agir l'enzyme en surveillant régulièrement l'état des cellules au microscope
- Quand les cellules sont arrondies, au bout de 5 minutes environ, arrêter l'action de la trypsine en ajoutant 5 mL de milieu complet
- Décoller les cellules par aspiration-refoulement successifs à l'aide d'une pipette
- Vérifier au microscope que les cellules sont bien séparées les unes des autres, sinon les décoller de nouveau par aspiration-refoulement
- Effectuer un dénombrement sur cellule de Mallassez

c- Préparation des microplaques pour un test d'une durée de 72 h

- Diluer la suspension avec du milieu complet de façon à obtenir la concentration de 200 000 cellules.mL⁻¹ et en prévoyant une quantité de 5 mL par microplaque
- Mettre la suspension bien homogénéisée dans une boîte de Pétri stérile
- Déposer 50 µL dans chaque puits (soit 10 000 cellules par puits) en omettant les puits extérieurs qui seront remplis de milieu seul
- Incuber la plaque pour 48 h à 37°C, 5% de CO₂
- Au bout de 48 h d'incubation, déposer 50 µL des extraits préparés dans du BME à 10% de MeOH (le témoin MeOH recevra uniquement 50 µL de BME à 10% de MeOH) et remettre les plaques à incuber
- Révéler les plaques au bout de 72 h d'incubation

d- Préparation des microplaques pour des révélations à 24, 48 et 72 h

- Diluer la suspension avec du milieu complet de façon à obtenir la concentration de 70 000 cellules.mL⁻¹ et en prévoyant une quantité de 10 mL par microplaque
- Mettre la suspension bien homogénéisée dans une boîte de Pétri stérile
- Déposer 100 µL dans chaque puits (soit 7 000 cellules par puits) en omettant les puits extérieurs qui seront remplis de milieu seul
- Incuber les plaques pour 72 h à 37°C, 5% de CO₂
- Au bout de 72 h d'incubation, éliminer le milieu de chaque plaque par renversement
- Déposer 50 µL de milieu frais
- Déposer les extraits préparés dans du BME à 10% de MeOH (le témoin MeOH recevra uniquement 50 µL de BME à 10% de MeOH) et remettre les plaques à incuber
- Révéler une plaque au bout de 24 h, la deuxième à 48 h et la troisième après 72 h d'incubation

e- Evaluation de la viabilité cellulaire par le test MTT

- Préparer du MTT concentré à 5 mg.mL⁻¹ dans du PBS
- Au bout du temps d'incubation désiré, ajouter 50 µL de MTT (pour 100 µL de solution dans les puits), dans chaque puits excepté les puits périphériques
- Incuber la plaque à 37°C pendant 3h
- Éliminer le surnageant
- Ajouter 100 µL de tampon de lyse (isopropanol à 0,004% de HCl) dans chaque puits excepté les puits périphériques
- Agiter doucement la plaque jusqu'à solubilisation des cristaux formés
- Lire l'absorbance à 570 nm et 630 nm

f- Evaluation de la viabilité cellulaire par le test XTT

- Décongeler les réactifs et les homogénéiser de façon à obtenir une solution claire
- Mélanger 5 mL du réactif « XTT labeling reagent » pour 0,1 mL du réactif « electron coupling reagent »
- Au bout du temps d'incubation désiré, ajouter 50 µL de la solution de XTT (pour 100 µL de solution dans le puits) dans chaque puits excepté les puits périphériques
- Incuber la plaque à 37°C pendant au moins 4h
- Eliminer le surnageant
- Lire l'absorbance à 570 nm et 630 nm

Annexe 3 : Tableau détaillé des symptômes induit chez les larves aux différentes concentrations de produits purs testés

Abréviations : Ei = état initial ; Ef = état final ; EAi = état amorphe intermédiaire ; EAc = état amorphe contractile ; PPI = paralysie partielle intermédiaire ; PPc = paralysie partielle contractile ; PTi = paralysie totale intermédiaire ; PTc = paralysie totale contractile ; SA = segments antérieurs ; SP = segments postérieurs

Substance neuro-active	Détail des symptômes
penitrem A	-
nifedipine	-
+/- Bay K8644	-
ω -conotoxine GVIA	<ul style="list-style-type: none"> • 10mg/mL ($3,30 \cdot 10^{-3}$ M) : pas d'activité à cette concentration. • 2mg/mL ($6,59 \cdot 10^{-4}$ M) : pas d'activité à cette concentration.
amiloride HCl hydrate	<ul style="list-style-type: none"> • 10 mg/mL (43,6 mM) : Ei : PPI (mobilité des premiers ségments). Ef : EAi • 7,5 mg/mL (32,7 mM) : variabilité de la réponse des larves : Ei : EAi ou PPI ou PTi . Ef : EA • 5 mg/mL (21,8 mM) : pas d'activité à cette concentration. • 1 mg/mL (4,36 mM) : pas d'activité à cette concentration.
4-aminopyridine	<ul style="list-style-type: none"> • 1 mg/mL (10,6 mM) : Ei : convulsions. Ef : Déplacement décomposé • 0,75 mg/mL (7,97 mM) : Contraction en "U" accompagnée ou précédée d'une contraction des ségments antérieurs et/ou postérieurs. Possibilité de redressement de la larve. • 0,5 mg/mL (3,51 mM) : pas d'activité à cette concentration. • 0,1 mg/mL (1,06 m M) : pas d'activité à cette concentration.
dequalinium HCl hydrate	Injection du surnagent de la suspension à 5mg/mL (9,48 mM) dans du DMSO à 15% : pas d'activité à cette concentration.
glibenclamide	-
diazoxide	-
acide L-glutamique	<ul style="list-style-type: none"> • 10 mg/mL (68,0 mM) : Ei : PTi Ef : PTc • 5 mg/mL (34,0 mM) : Ei : PPI en "U" ou des SA ou des SP. Ef : PT. • 2,5 mg/mL (17,0 mM) : PPI de la moitiéé potsérieure. • 1,75 mg/mL (11,9 mM) : Ei : PPI en "U". Ef : Mobilitéé normale. • 1 mg/mL (6,80 mM) : pas d'activité à cette concentration.
glycine	10 mg/mL (0,133 M) : pas d'activité à cette concentration.
acide 5,7-dichlorokynurenique monohydrate	Injection du surnagent de la suspension à 5mg/mL dans MDM8% : pas d'activité à cette concentration.
acide L-aspartique	3,8 mg/mL (28,6 mM) : pas d'activité à cette concentration.
blue Evans (> 75%)	9,5 mg/mL (3,02 mM) : pas d'activité à cette concentration.

picrotoxine	<ul style="list-style-type: none"> • 10mg/mL (16,6 mM) : Ei : EAc. Ef : Convulsions. • 5mg/mL (8,30 mM) : Ei : EAc. Ef : Convulsions • 1mg/mL (1,66 mM) : Ei : EAc. Ef : Convulsions • 0,25mg/mL (0,415 mM) : Ei : EAc puis convulsion. Ef : EAc pouvant être précédé d'une phase de convulsion. • 0,125mg/mL (0,208 mM) : Ei : Déplacement décomposé. Ef : EAc puis possibilité de retour à l'état normal. • 62,5ug/mL (0,104 mM) : pas d'activité à cette concentration.
GABA	10 mg/mL (97,2 mM) : pas d'activité à cette concentration.
nicergoline	<ul style="list-style-type: none"> • 10 mg/mL (20,6 mM) : Ei : PPI (mobilité de la moitié postérieur). Ef : Immobilité entre coupé de phases de mouvements faibles des segments antérieurs. • 5 mg/mL (10,3 mM) : Ei : EAI ou PPI. Ef : PTi • 2.5 mg/mL (5,14 mM) : Ei : EAI ou PPI de la moitié postérieur. Ef : déplacement décomposé puis mobilité normale. • 1 mg/mL (2,06 mM) : pas d'activité à cette concentration.
yohimbine HCl	<p>Injection du surnageant de la suspension</p> <ul style="list-style-type: none"> • 5mg/mL (12,8 mM) : Ei : EAI ascendant (exception de la tête). Ef : PPc (mobilité de la tête) avec augmentation des contractions avec le temps. • 2,5mg/mL (6,40 mM) : Ei : EAI ascendant (exception de la tête). Cet EAI donne suite à une PPc ascendant. Ef : PTC. • 1mg/mL (2,56 mM) : Déplacement décomposé avec une possible phase de PTi. • 0,5mg/mL (1,28 mM) : pas d'activité à cette concentration.
clonidine HCl	<ul style="list-style-type: none"> • 10 mg/mL (37,5 mM) : PPI ascendante. EAI possible dans les 2 dernières minutes. • 5 mg/mL (18,8 mM) : EAI des segments postérieurs. • 2,5 mg/mL (9,38 mM) : pas d'activité à cette concentration. • 1 mg/mL (3,75 mM) : pas d'activité à cette concentration.
prazosine HCl	-
cytisine	<ul style="list-style-type: none"> • 10mg/mL (57,4 mM) : Ei : PTi donnant ensuite un EAI des SA. Ef : Convulsions. • 1mg/mL (5,74 mM) : Ei : PTC donnant ensuite un EAc des SA. Ef : Convulsions. • 0,25mg/mL (1,43 mM) : variabilité de la réponse des larves: PTC donnant une PPc, soit juste PPc soit juste déplacements décomposés. • 0,125mg/mL (0,717 mM) : pas d'activité à cette concentration.
pancuronium bromide	10 mg/mL (17,5 mM) : Ei : Déplacement décomposé. Ef : Mobilité normale. Il peut aussi n'y avoir aucun effet.
rocuronium bromide	<ul style="list-style-type: none"> • 10 mg/mL (18,9 mM) : Ei : Roulement de la larve sur elle même. Ef : Déplacement décomposé avec diminution de la fréquence et de l'intensité des contractions. • 5 mg/mL (9,45 mM) : soit brève étape de déplacement décomposé (à partir de 1min jusqu'à 2 voir 5min) soit aucun effet sur la larve.
scopolamine hydrochloride	<ul style="list-style-type: none"> • 10mg/mL (33,0 mM) : Ei : EAc ou intermédiaire voir PPI des segments postérieurs. Ef : alternance entre immobilité et déplacements. • 5mg/mL (16,5 mM) : variabilité des effets: Ei : EA donnant suite à une PP des segments postérieurs. Ef : alternance entre immobilité et déplacements (pouvant être décomposés). • 2,5mg/mL (8,25 mM) : pas d'activité à cette concentration.
pilocarpine hydrochloride	<ul style="list-style-type: none"> • 10 mg/mL (48,0 mM) : EA alternant entre intermédiaire et contractile (phases de 30 sec). • 5 mg/mL (24,0 mM) : Ei : EAI SP. Ef : Déplacements décomposés. • 2,5 mg/mL (12,0 mM) : EAI avec déplacements ou aucun effet. • 1 mg/mL (4,80 mM) : pas d'activité à cette concentration. <p>De façon générale pour la Pilocarpine on note une augmentation de la sécrétion.</p>

acide kaïnique monohydrate	<ul style="list-style-type: none"> ● 10 mg/mL (46,9 mM) : PTc immédiate et définitive. ● 3,89 mg/mL (18,2 mM) : PTc immédiate et définitive. ● 1mg/mL (4,69 mM) : Ei : EAc. Ef : Déplacements lents avec un état général contracté. ● 0,5mg/mL (2,35.10⁻³ M) : Ei : EAc de la moitié postérieur avec déplacements. Ef : Déplacement normaux. ● 0,25mg/mL (1,18 mM) : Ei : EAc. Ef : déplacements normaux. Voir aucun effet. ● 0,125mg/mL (0,590 mM) : aucun effet sur la larve.
cyclopiazonic acid	-
caféine	<ul style="list-style-type: none"> ● 10 mg/mL (51,5 mM) : Ei : EAc pouvant être précédé d'une PP d'abord intermédiaire puis contractil des ségments postérieurs. Ef : contractions en U de la larve : verticale ou horizontale. ● 5 mg/mL (25,7 mM) : Ei : EAc ascendant. Ef : contractions en U de la larve verticale ou horizontale. ● 2,5 mg/mL (12,9 mM) : Ei : EAc voir PPc des SP. Ef : contractions en U voir en S. ● 1 mg/mL (5,15 mM) : pas d'activité à cette concentration.
roténone	-

Annexe 4 : Protocole du bio-essai sur larves de diptères

Les boîtes contenant les larves sont stockées à 4°C
Remettre les boîtes à température ambiante environ 30 min avant les tests
Peser séparément 3 lots de 10 larves, définir le poids moyen d'une larve
Prévoir d'injecter 1 µL pour 10 mg de poids de larve

Aliquoter dans un tube à hémolyse la quantité d'extrait nécessaire
Evaporer le solvant
Prendre l'extrait avec le solvant choisi parmi la liste de solvants ou de système de solvants dans l'eau tolérés, en prévoyant un volume total d'au moins 50 µL :
Eau, DMSO 15%, MeOH 10%, DMSO 15% + MeOH 9%, HCl 0,075 N, HCL 0,075 N + DMSO 15%,
HCl 0,075 N + MeOH 9%, MDM 8% (MeOH ; 1,4-dioxane ; acétonitrile ; 1:1:1, v/v/v).
Laisser quelques minutes le solvant au contact de l'extrait sec, au besoin vortexer ou passer aux ultrasons
Ajouter la quantité d'eau nécessaire
Injecter l'extrait à trois larves minimum.
Noter l'observation de symptômes ainsi que leur délai d'apparition :

Symptômes définissant un effet sur la mobilité

Paralysie : une paralysie est définie au sens médical comme à une diminution ou une abolition de la motricité. Ici, une paralysie correspond donc à l'absence complète de mouvement de un ou plusieurs segments de la larve, sans réaction lorsque la partie concernée est touchée, sur une durée de 30 s au minimum.

Paralysie totale : paralysie de l'ensemble du corps et de la tête de la larve.

Paralysie partielle : paralysie d'une partie du corps de la larve.

Immobilisation : absence complète de mouvement de un ou plusieurs segments de la larve, sur une durée de 30 s au minimum, avec réaction de la larve lorsque la partie immobilisée est touchée.

Immobilisation totale : l'ensemble du corps et de la tête de la larve est concerné.

Immobilisation partielle : une partie du corps de la larve est concerné.

État amorphe : état pendant lequel un ou plusieurs segments sont très peu mobiles. Les mouvements sont très lents et la larve présente des phases d'immobilité de moins de 30 s.

Symptômes définissant un effet sur la contractilité

Convulsions : séries de contractions suivies de relâchements de l'ensemble du corps de la larve, sans déplacement de celle-ci. Ces contractions-relâchements peuvent se succéder de façon rapide ou lente.

Déplacement décomposé : déplacement de la larve avec présence d'ondes de contraction cheminant le long du corps. Ces ondes correspondent à des contractions lentes et fortes des segments les uns après les autres.

État contractile : contraction de la larve ou de certains segments, caractérisée par une rétraction longitudinale, une diminution de la taille et une dureté au toucher. Ainsi une paralysie totale contractile peut être définie lorsque l'ensemble des segments sont totalement immobiles et contractés

État flasque : allongement du corps de la larve caractérisé par une augmentation de sa taille et un toucher mou.

État intermédiaire : pas de modification de la taille ni de la dureté de la larve. Par exemple une immobilisation pourra être définie comme intermédiaire si elle n'est ni contractile ni flasque.

Contraction en U : contraction des segments de façon à donner au corps une forme de U. Cette forme peut se faire dans le plan vertical ou horizontal

État initial, intermédiaire et final : ils définissent dans le temps, et de façon relative, la survenue des symptômes précédemment décrits. Ainsi par exemple, l'état initial peut être un état amorphe, suivi d'un état intermédiaire correspondant à une paralysie partielle, puis un état final avec une paralysie totale. A l'inverse, il peut n'y avoir qu'un seul état du début à la fin de l'observation. La durée de ces états n'est pas définie, car il semble que ce soit l'enchaînement des symptômes qui définissent le mieux une activité, plutôt que la durée de ces symptômes.

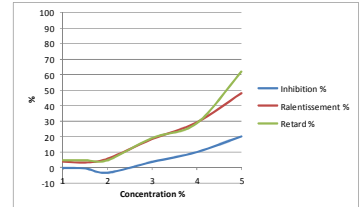
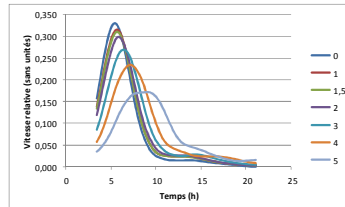
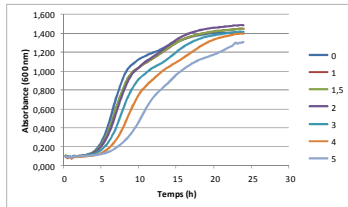
Annexe 5 : Evaluation de l'effet de différents solvants sur la croissance de la souche *V. crassostreae*

Courbes de croissance brutes de la souche incubée avec une concentration de solvant de 0 à 5%

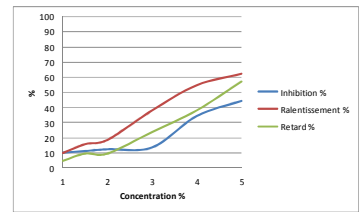
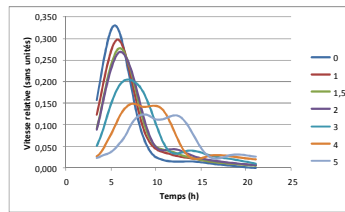
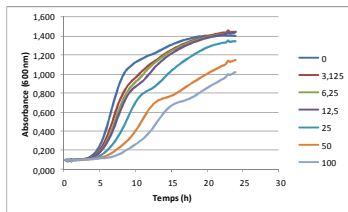
Transformation des données en vitesses de croissance relatives

Paramètres finaux d'interprétation

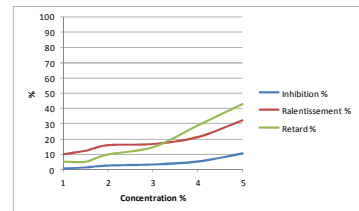
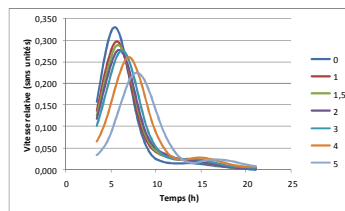
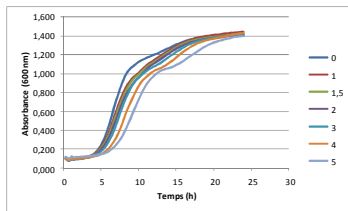
Méthanol



Ethanol



DMSO



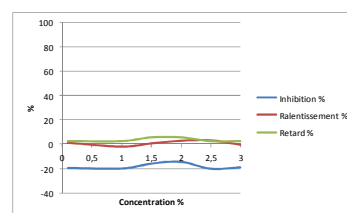
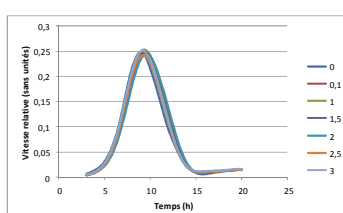
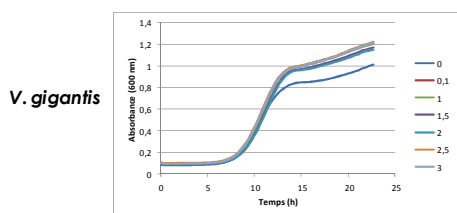
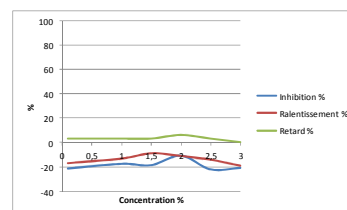
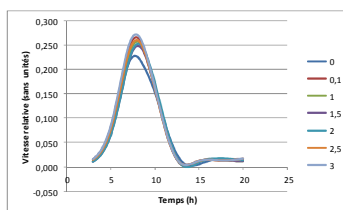
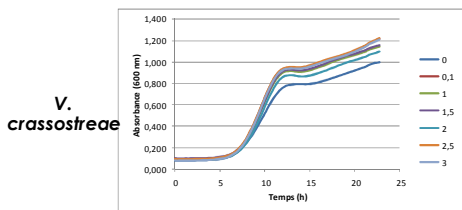
Annexe 6 : Evaluation de l'effet d'agents de solubilisation sur la croissance de bactéries

• Tween 80

Courbes de croissance brutes de la souche incubée avec une concentration de T80 de 0 à 3%

Transformation des données en vitesses de croissance relatives

Paramètres finaux d'interprétation

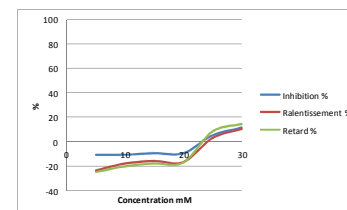
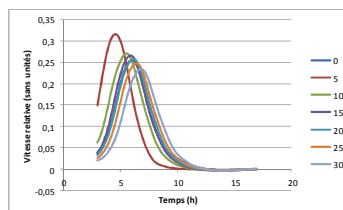
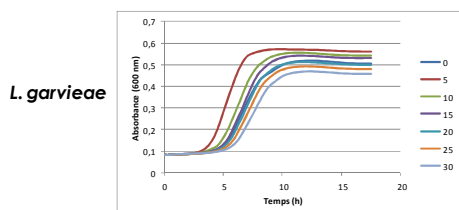
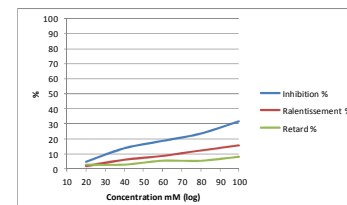
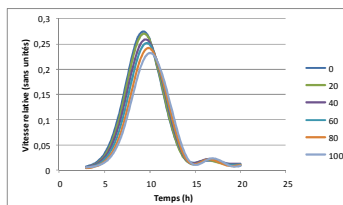
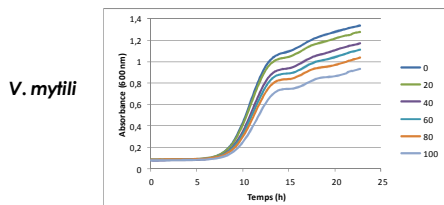
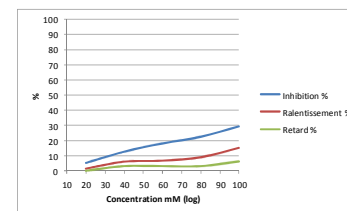
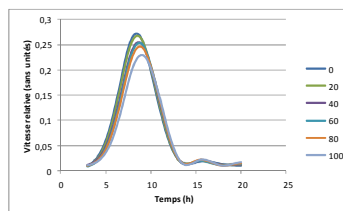
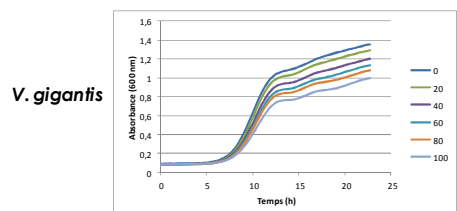
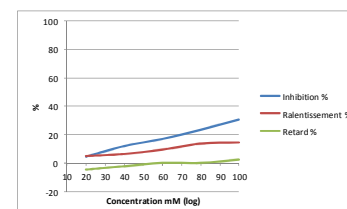
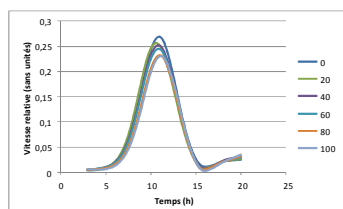
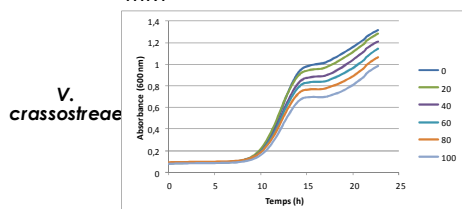


• β -cyclodextrines

Courbes de croissance brutes de la souche incubée avec une concentration de β -CD de 0 à 100 mM

Transformation des données en vitesses de croissance relatives

Paramètres finaux d'interprétation



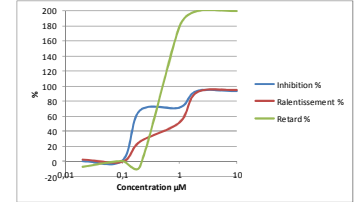
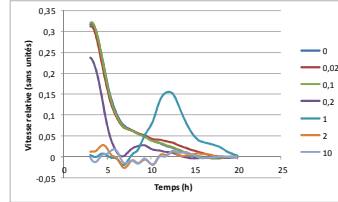
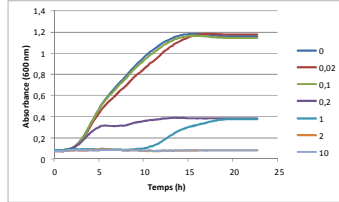
Annexe 7 : Evaluation de l'effet d'une gamme d'érythromycine sur la croissance de bactéries

Courbes de croissance brutes de la souche incubée avec une concentration d'antibiotiques de 0 à 10 μM

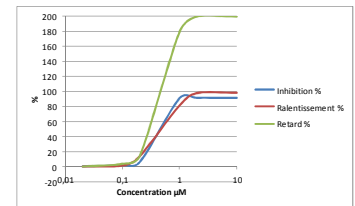
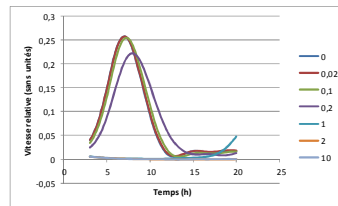
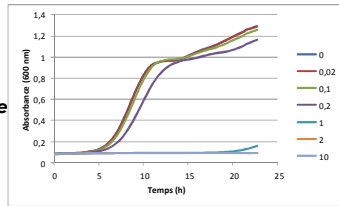
Transformation des données en vitesses de croissance relatives

Paramètres finaux d'interprétation

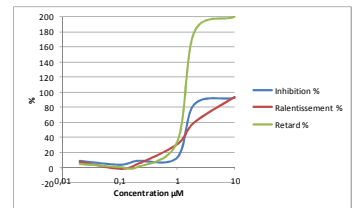
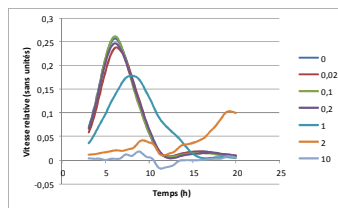
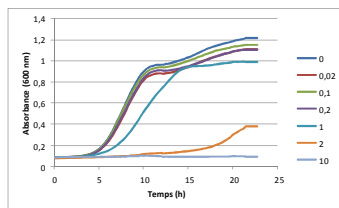
E. coli



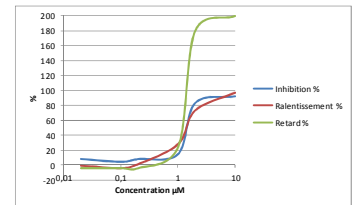
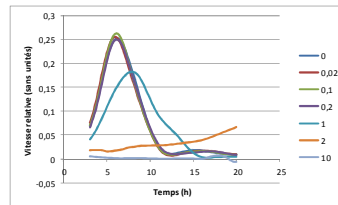
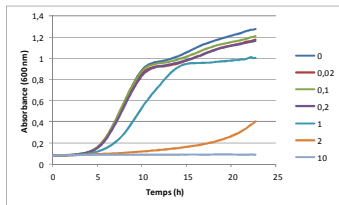
V. crassostreae



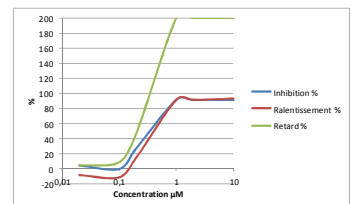
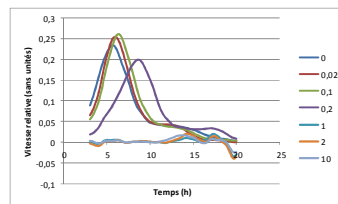
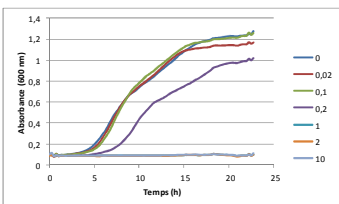
V. gigantis



V. mytili



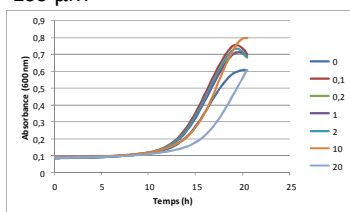
V. rotiferianus



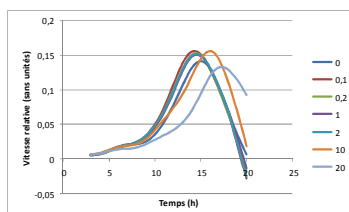
Annexe 8 : Evaluation de l'effet d'une gamme de carbénicilline sur la croissance de bactéries

Courbes de croissance brutes de la souche incubée avec une concentration d'extrait de 0 à 100 μM

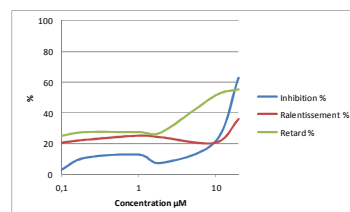
C. piscicola



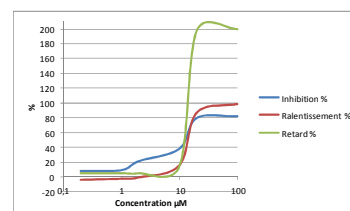
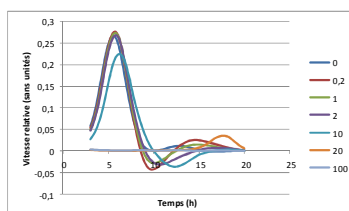
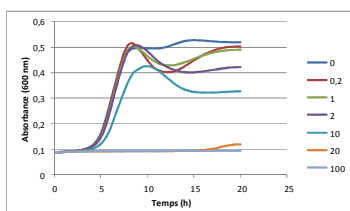
Transformation des données en vitesses de croissance relatives



Paramètres finaux d'interprétation



L. garvieae



Annexe 9 : Protocole final des tests antibactériens

- Mise en culture de la souche
 - Les souches sont stockées sur microbilles à -80°C, à J-1 prélever une microbille et la rouler sur une boîte de Petri contenant le milieu de culture correspondant à l'aide d'une oese
 - Placer la boîte dans une étuve à la température correspondante, couvercle vers le bas
 - A J0 quelques colonies sont apparues, vérifier à l'œil nu l'absence de contamination

- Préparation d'un inoculum
 - Remettre les milieux à température ambiante au moins 1 h avant les tests
 - Mettre 5 mL d'EPHT dans un tube en verre 15 mL à fond plat (tube annoté 10⁸)
 - Mettre 4,5 mL de milieu de culture dans un tube à hémolyse de 10 mL (tube noté 10⁷)
 - Mettre 13,5 mL de milieu de culture dans un tube en verre de 20 mL (tube noté 10⁶)
 - Prélever plusieurs colonies sur boîte de Pétri avec une oese, puis agiter l'oese dans l'EPHT
 - Vortexer doucement le tube ou homogénéiser par inversion du tube
 - Placer le tube dans le néphélomètre et lire la DO
 - Concentrer la solution en rajoutant des colonies, ou diluer avec de l'EPHT pour être à 0,5 McFarland
 - Transférer 500 µL de 10⁸ dans 10⁷ puis vortexer doucement
 - Transférer 1,5 mL de 10⁷ dans 10⁶ puis vortexer doucement
 - Transvaser l'inoculum dans une boîte de Pétri
 - Inoculer la microplaque par aliquots 100 µL avec pipette multicanaux (ne pas inoculer le 10^{ème} puits de chaque ligne, il servira pour contrôle de stérilité)

- Préparation des extraits

Les extraits sont repris dans du MeOH à 100%, sachant que la concentration finale dans le puits sera de 1,5% de MeOH.

- Préparer une gamme de concentration de l'extrait à 66,7 X
- Déposer 100 µL de chaque point de gamme dans les 100 µL de culture bactérienne
- Homogénéiser la solution par aspiration-refoulement

- Schéma des plaques

Les plaques devront contenir systématique, dans des puits en triplicat :

- Un témoin sans solvant
- Un témoin à 1,5% de MeOH
- La gamme de l'antibiotique correspondant
- Des contrôles de stérilité constitués par du milieu de culture seul, dans le 10^{ème} puits de chaque colonne. Si le schéma de la plaque le permet, laisser une colonne vide entre deux souches bactériennes différentes.

Annexe 10 : Protocole pour une analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux

Réactifs

Trypsine

BME 4°C

PBS 4°C

Ethanol à 70% glace (-20°C)

Solution de marquage (pour 1 mL) :

Réactifs	Concentration solution-mère	Volume à prélever	Concentration finale
Iodure de propidium	1 mg/mL	50 µL	50 µg/mL
RNase (DNase free)*	10 mg/mL	5 µL	50 µg/mL
TritonX-100		10 µL	0.1 % (v/v)
PBS		935 µL	Qsp 1 mL

*Si RNase n'est pas DNase free, nécessité de faire bouillir une solution de 2 mg de RNase dans 1 mL d'eau désionisée pendant 5 min

Etape d'obtention d'un culot de 1×10^6 cellules

Cultiver les cellules sur plaques 6 puits, à une quantité de 70 000 cell/mL pendant 72h ou 100 000 cell/mL pendant 48h

Trypsiner 4 puits pour une répétition (1mL de trypsine par puits)

Stopper la trypsination avec 4 mL par puits de BME à 4°C

Décoller les cellules par aspiration/refoulement, pooler les 4 puits dans un falcon 15 mL

Centrifuger à 1200 g pendant 5 min à 4°C

Retirer le surnageant et laver le culot de cellules avec 10 mL de PBS à 4°C (par inversion du tube)

Centrifuger à 1200 g pendant 5 min à 4°C

Renouveler l'étape de lavage au PBS et de centrifugation

Reprendre le culot dans 7 mL de PBS, faire un dénombrement et récupérer 1×10^6 cellules

Etape de marquage des cellules

Reprendre le culot dans 1 mL de PBS 4°C

Déposer goutte à goutte la suspension dans 2.5 mL d'éthanol à 70°C glacé (aliquot dans falcon 15 mL)

Vortexer doucement au fur et à mesure et vérifier qu'il n'y ait pas d'agrégation de cellules

Laisser au moins une nuit ou 24h à -20°C (possibilité de stocker les cellules à cette étape pendant quelques semaines)

Centrifuger à 200 g pendant 10 min à 4°C

Laver 2 fois le culot avec du PBS (centrifugation à 800 g, 5 min à 4°C)

Reprendre le culot avec 1 mL de la solution de marquage préparée extemporanément

Vortexer

Incuber à 37°C pendant 30 min (ou à 20°C pendant 1h ou à 4°C pendant 3h)

Conserver à 4°C et à l'obscurité avant analyse FACS

Annexe 11 : Screening de souches de micro-algues marines pour la recherche d'activités antibactériennes

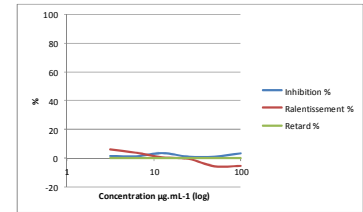
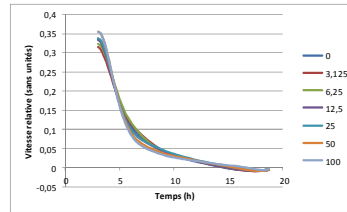
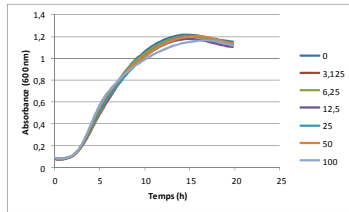
Alexandrium ostenfeldii

Courbes de croissance brutes de la souche incubée avec une concentration d'extrait de 0 à 100 µg.mL⁻¹

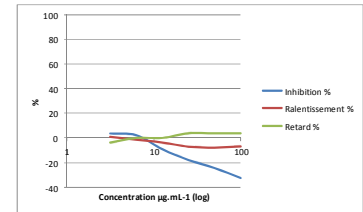
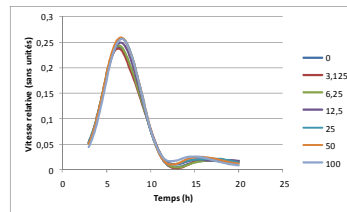
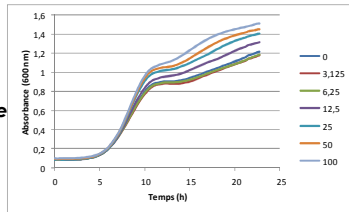
Transformation des données en vitesses de croissance relatives

Paramètres finaux d'interprétation

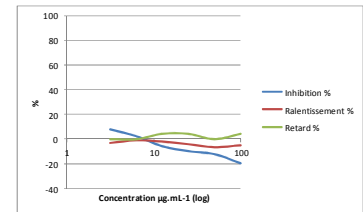
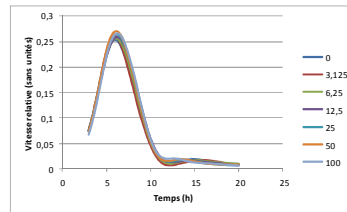
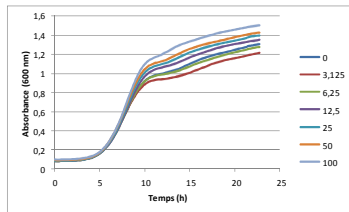
E. coli



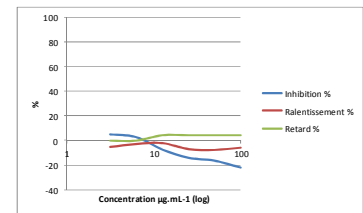
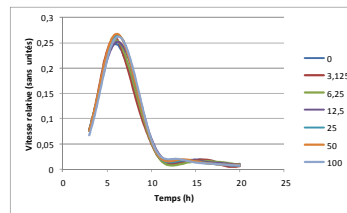
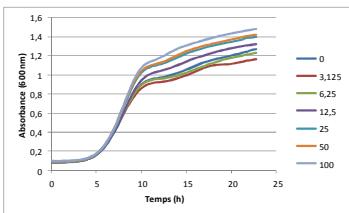
V. crassostreae



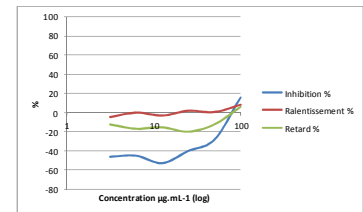
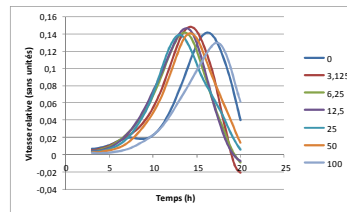
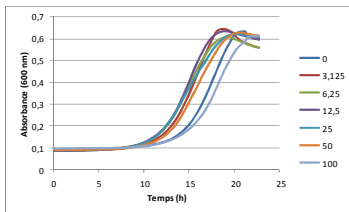
V. gigantis



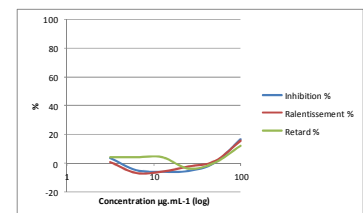
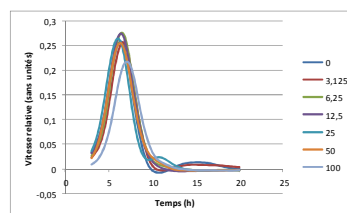
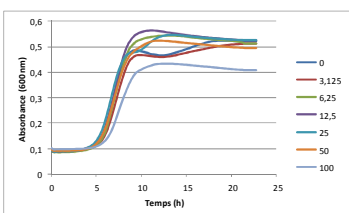
V. mytili



C. piscicola



L. garvieae



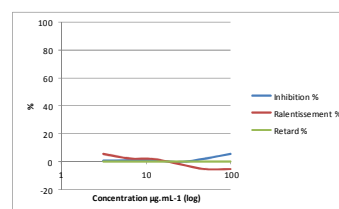
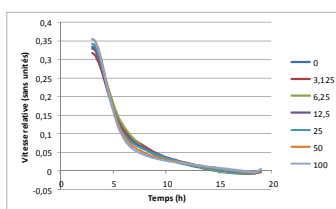
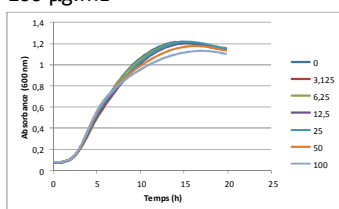
Azadinium spinosum

Courbes de croissance brutes de la souche incubée avec une concentration d'extrait de 0 à 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

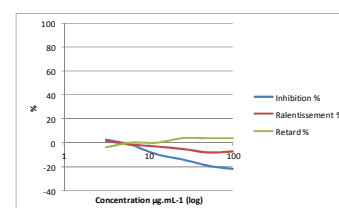
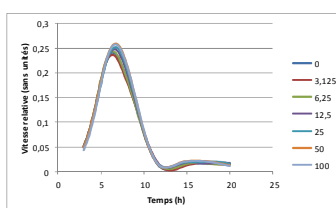
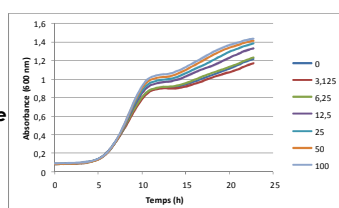
Transformation des données en vitesses de croissance relatives

Paramètres finaux d'interprétation

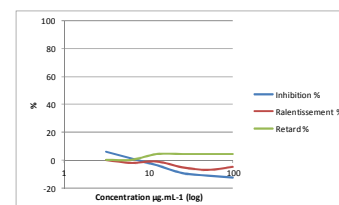
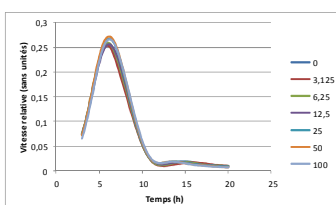
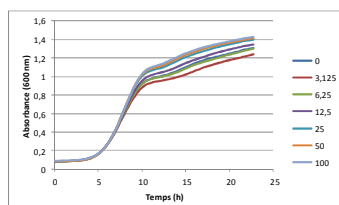
E. coli



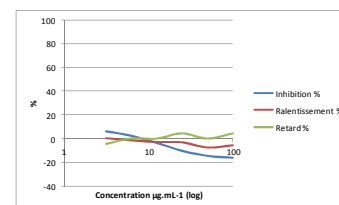
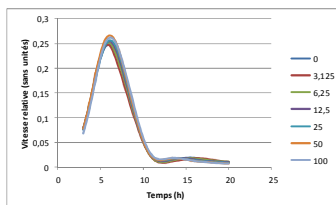
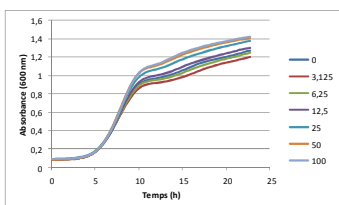
V. crassostreae



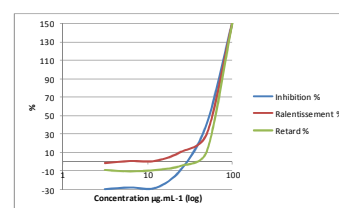
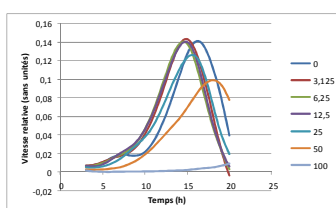
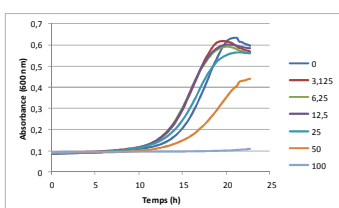
V. gigantis



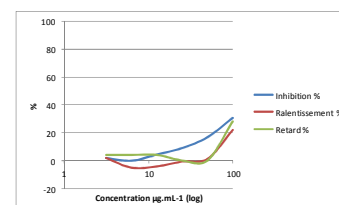
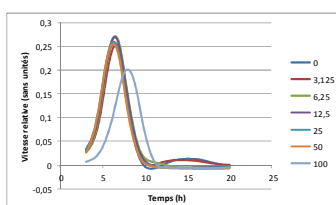
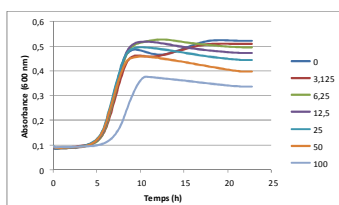
V. mytili



C. piscicola



L. garvieae



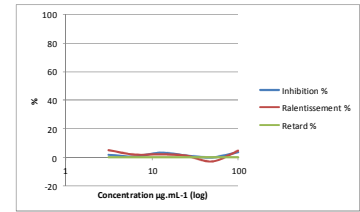
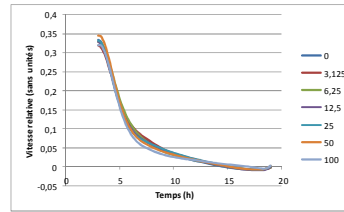
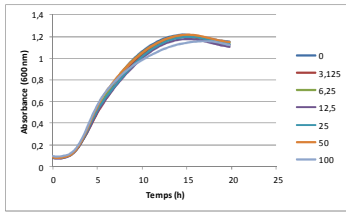
Prorocentrum lima

Courbes de croissance brutes de la souche incubée avec une concentration d'extrait de 0 à 100 µg.mL⁻¹

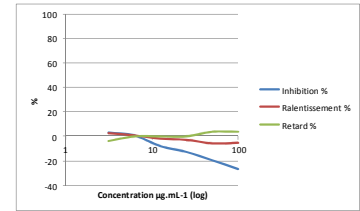
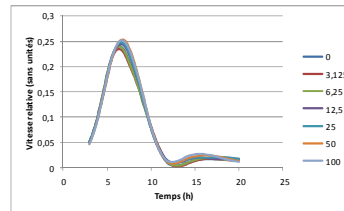
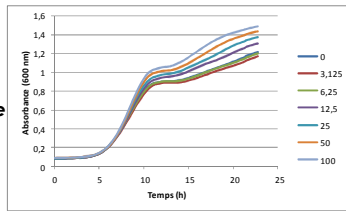
Transformation des données en vitesses de croissance relatives

Paramètres finaux d'interprétation

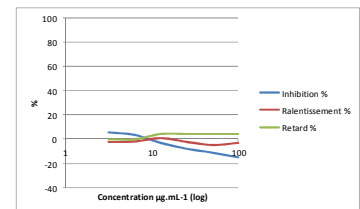
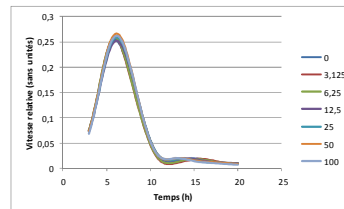
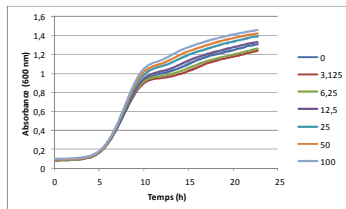
E. coli



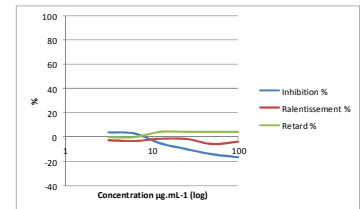
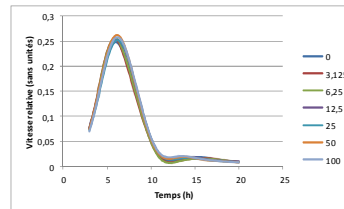
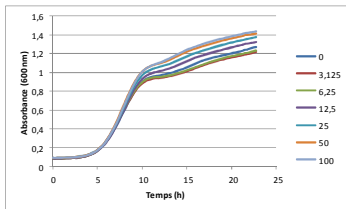
V. crassostreae



V. gigantis



V. mytili



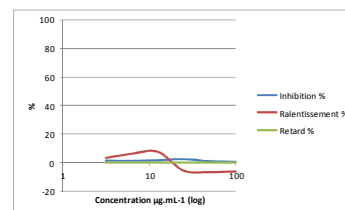
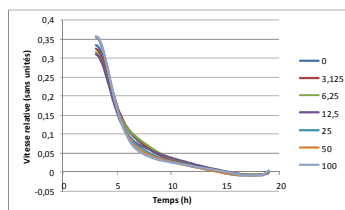
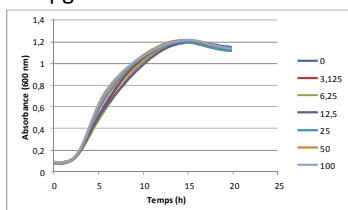
Vulcanodinium rugosum

Courbes de croissance brutes de la souche incubée avec une concentration d'extrait de 0 à 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

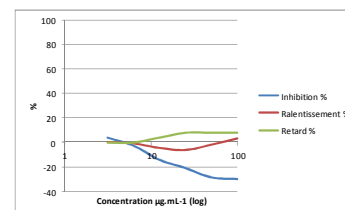
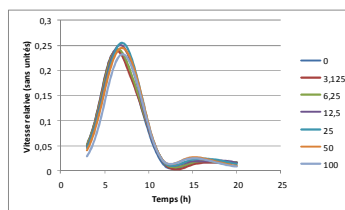
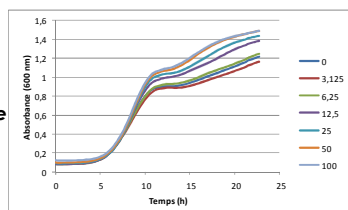
Transformation des données en vitesses de croissance relatives

Paramètres finaux d'interprétation

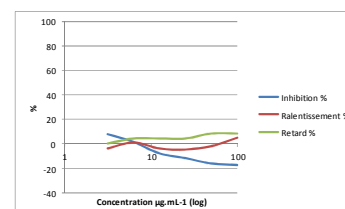
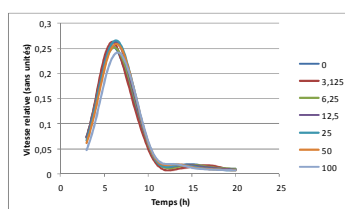
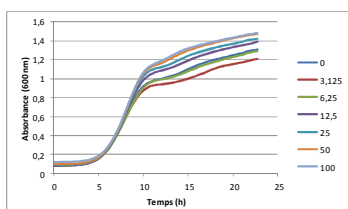
E. coli



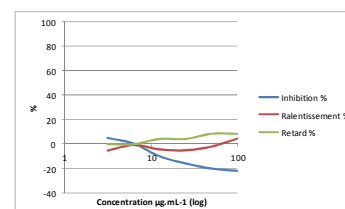
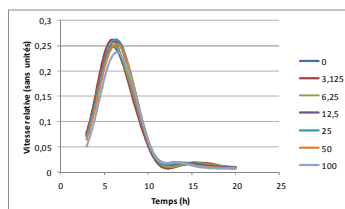
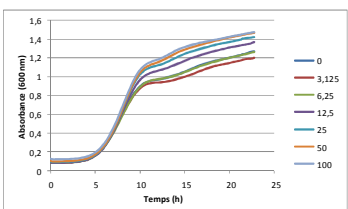
V. crassostreae



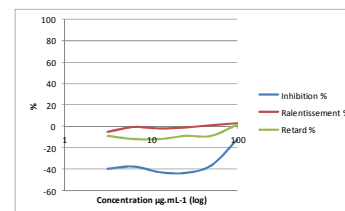
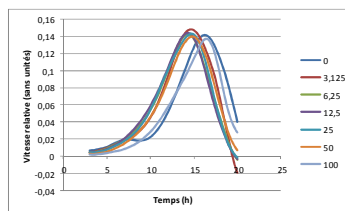
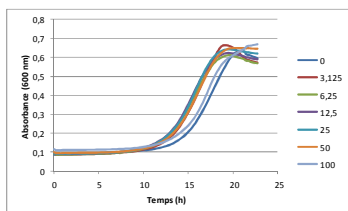
V. gigantis



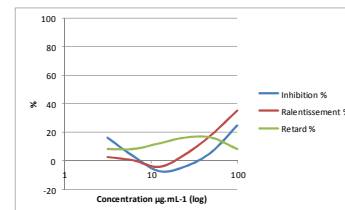
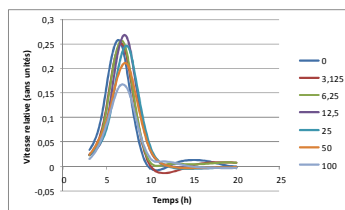
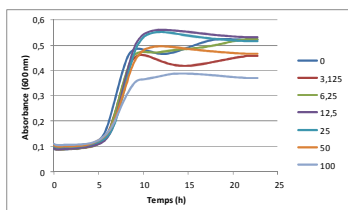
V. mytili



C. piscicola



L. garvieae



Annexe 12 : Evaluation sur bactéries des effets de matrice de moules non contaminées et partiellement purifiées

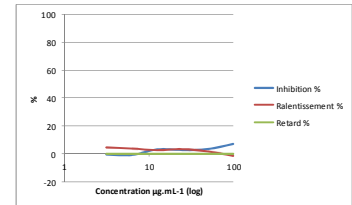
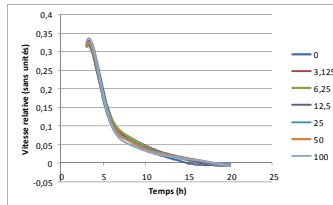
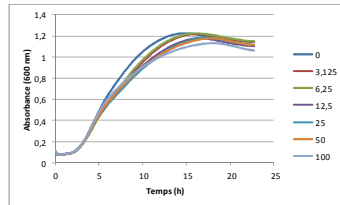
Matrices moules EB

Courbes de croissance brutes de la souche incubée avec une concentration d'extrait de 0 à 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

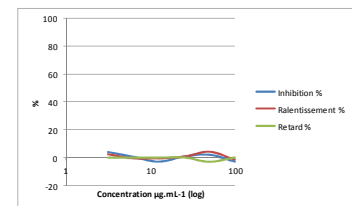
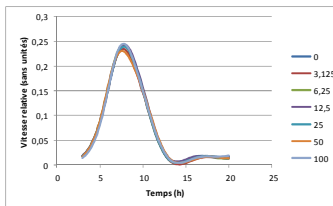
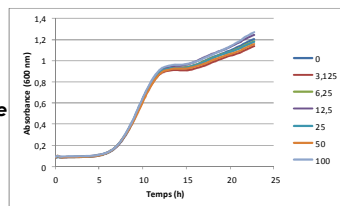
Transformation des données en vitesses de croissance relatives

Paramètres finaux d'interprétation

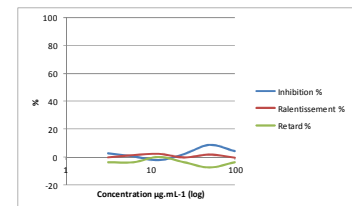
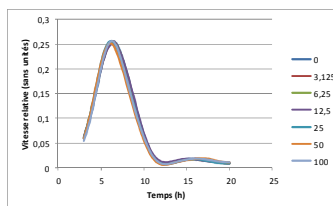
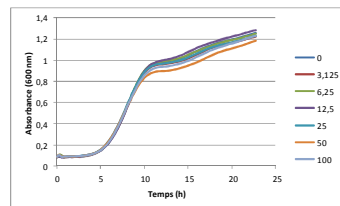
E. coli



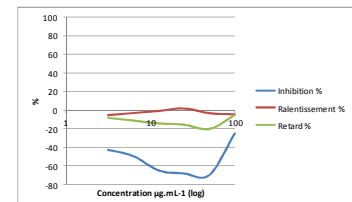
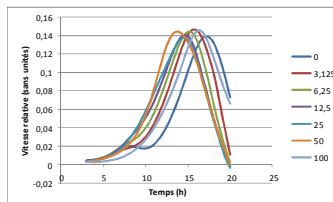
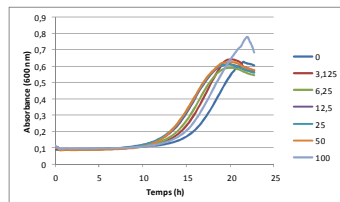
V. crassostreae



V. gigantis



C. piscicola

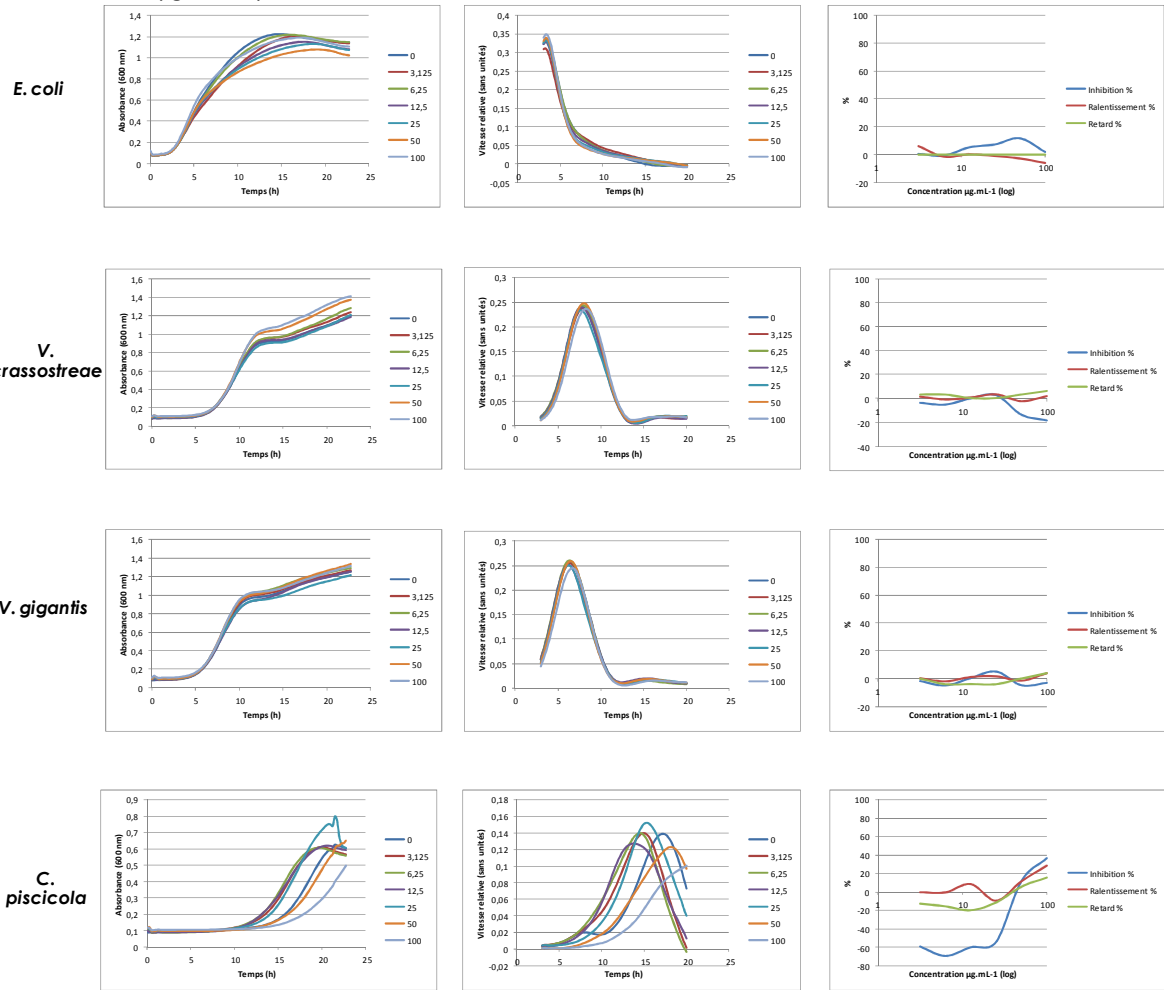


Matrices moules EP1

Courbes de croissance brutes de la souche incubée avec une concentration d'extrait de 0 à 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ équivalent EB

Transformation des données en vitesses de croissance relatives

Paramètres finaux d'interprétation



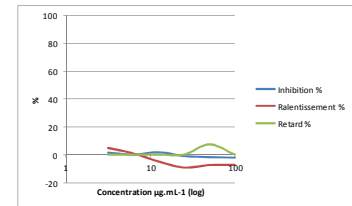
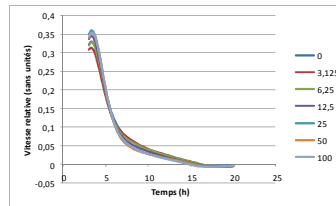
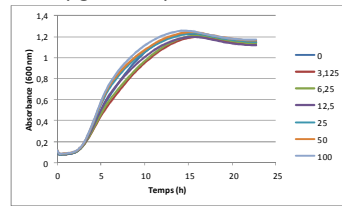
Matrices moules EP2

Courbes de croissance brutes de la souche incubée avec une concentration d'extrait de 0 à 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ équivalent EB

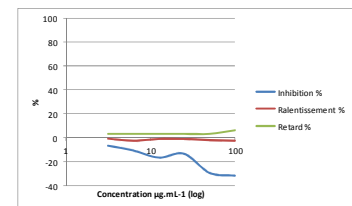
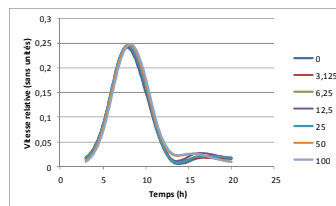
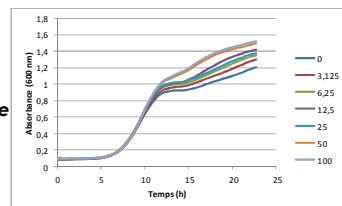
Transformation des données en vitesses de croissance relatives

Paramètres finaux d'interprétation

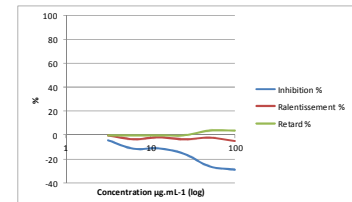
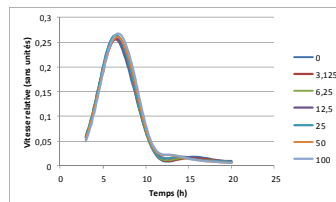
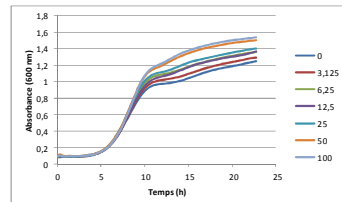
E. coli



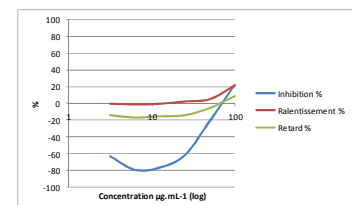
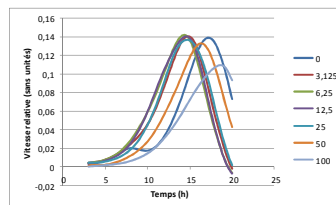
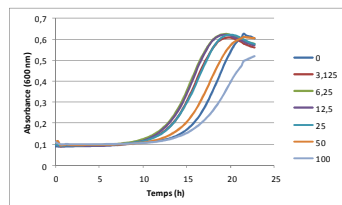
V. crassostreae



V. gigantis



C. piscicola



Annexe 13 : Screening de souches de micro-mycètes marins pour la recherche d'activités antibactériennes

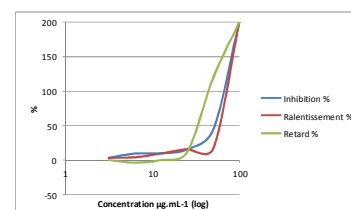
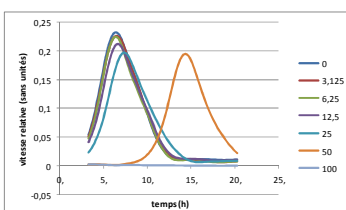
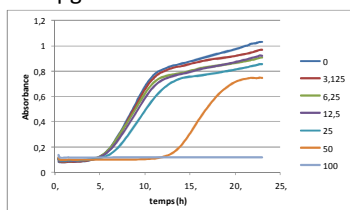
MMS231 – *P. polonicum* x *V. crassostreae*

Courbes de croissance brutes de la souche incubée avec une concentration d'extrait de 0 à 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

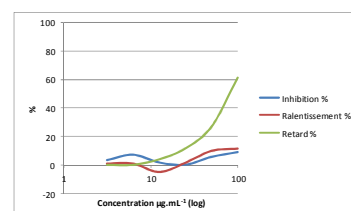
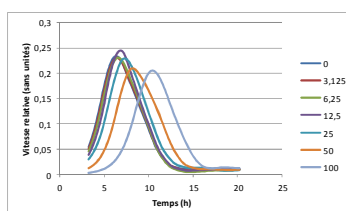
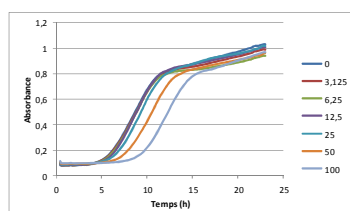
Transformation des données en vitesses de croissance relatives

Paramètres finaux d'interprétation

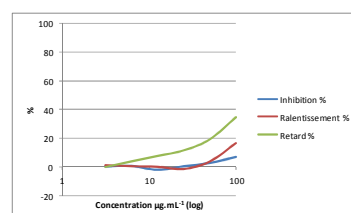
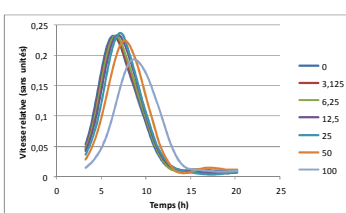
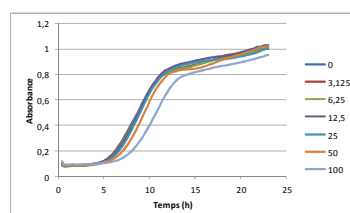
CYA



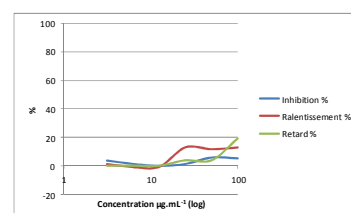
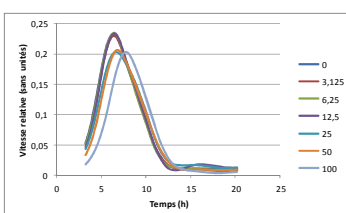
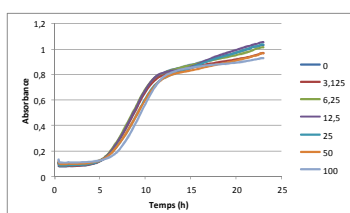
YES



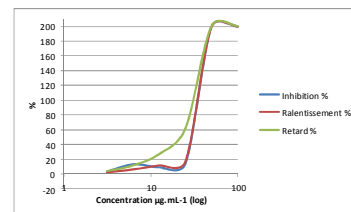
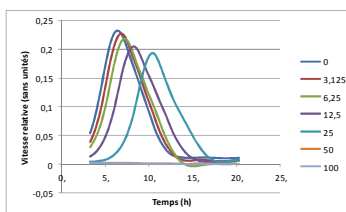
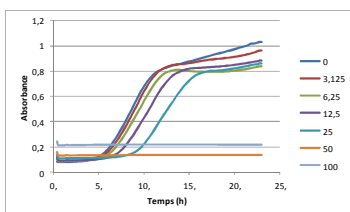
MEA



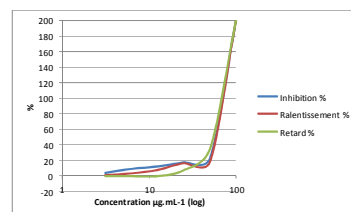
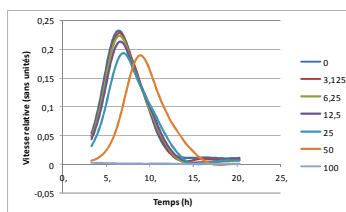
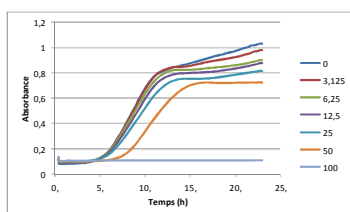
MES



DCA



PDA



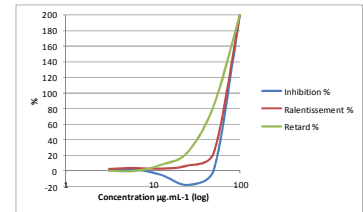
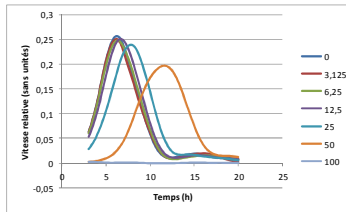
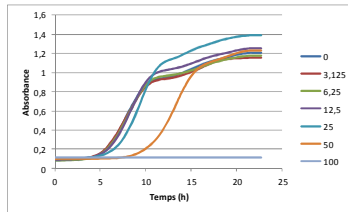
MMS231 – *P. polonicum* x *V. giganteis*

Courbes de croissance brutes de la souche incubée avec une concentration d'extrait de 0 à 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

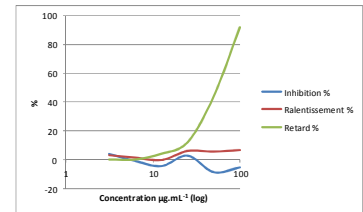
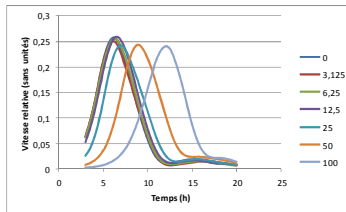
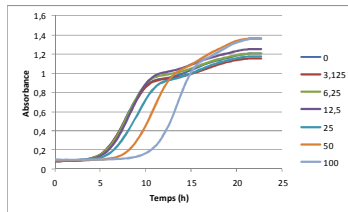
Transformation des données en vitesses de croissance relatives

Paramètres finaux d'interprétation

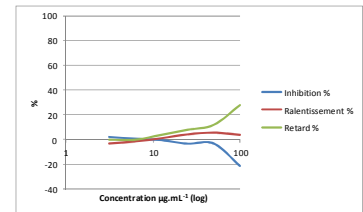
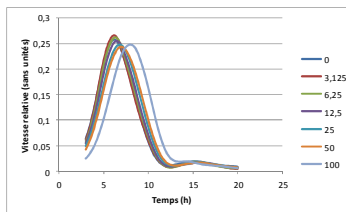
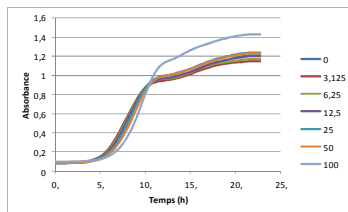
CYA



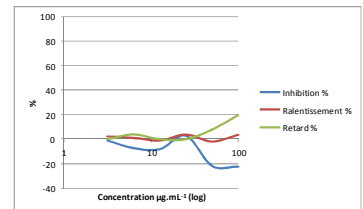
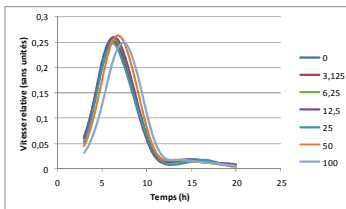
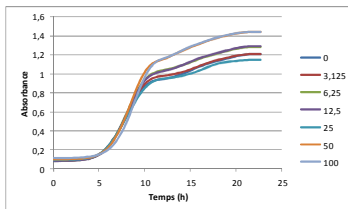
YES



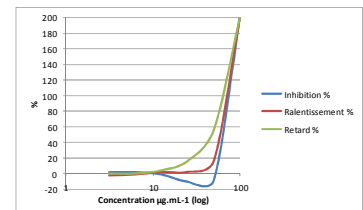
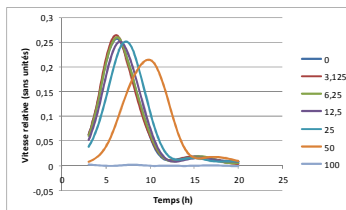
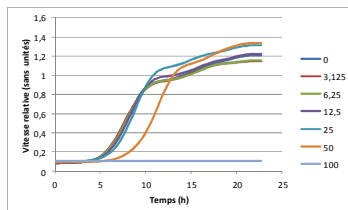
MEA



MES



PDA



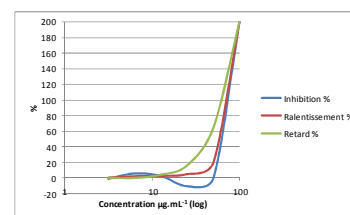
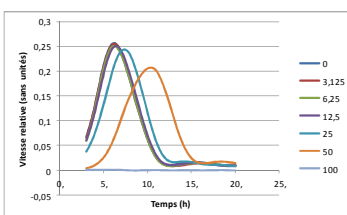
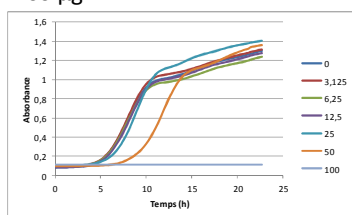
MMS231 – *P. polonicum* x *V. mytili*

Courbes de croissance brutes de la souche incubée avec une concentration d'extrait de 0 à 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

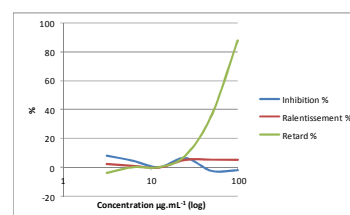
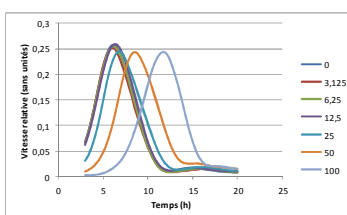
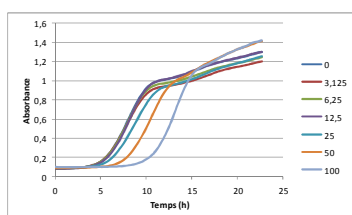
Transformation des données en vitesses de croissance relatives

Paramètres finaux d'interprétation

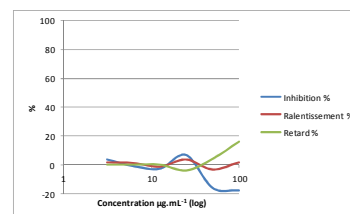
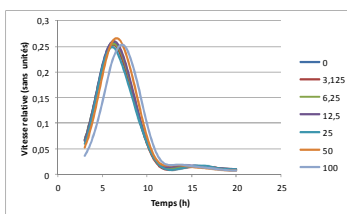
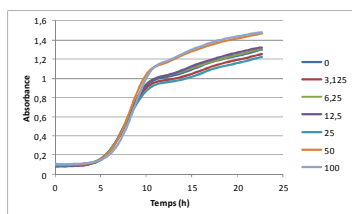
CYA



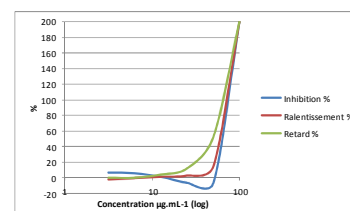
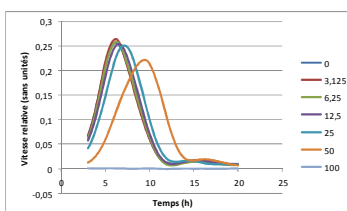
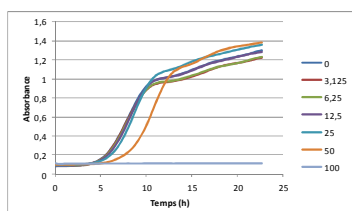
YES



MES



PDA



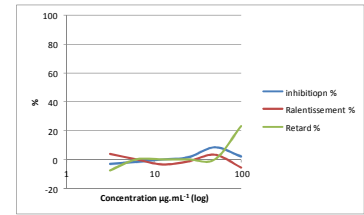
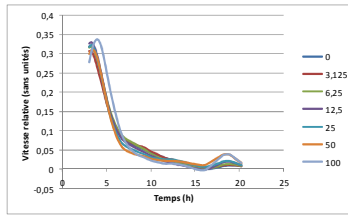
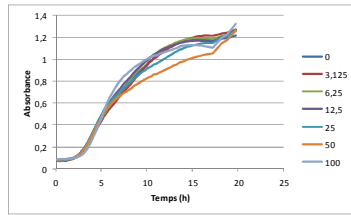
MMS231 – *P. polonicum* x *E. coli*

Courbes de croissance brutes de la souche incubée avec une concentration d'extrait de 0 à 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

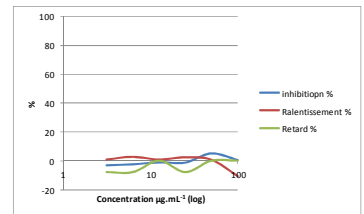
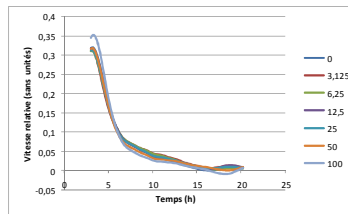
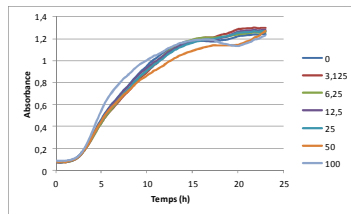
Transformation des données en vitesses de croissance relatives

Paramètres finaux d'interprétation

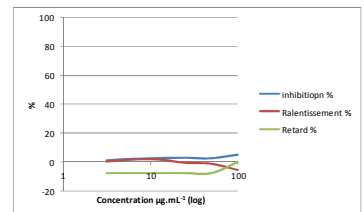
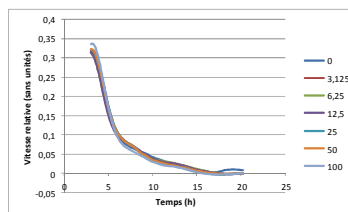
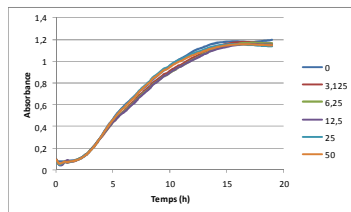
CYA



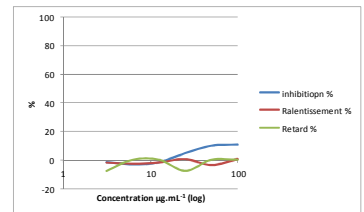
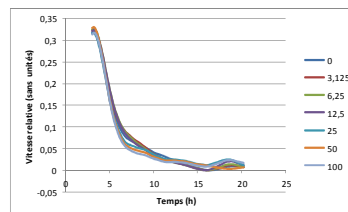
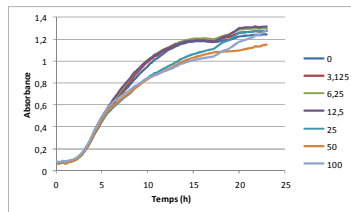
YES



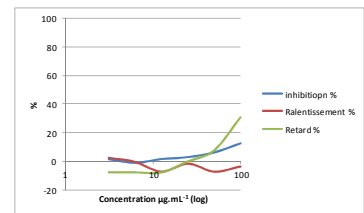
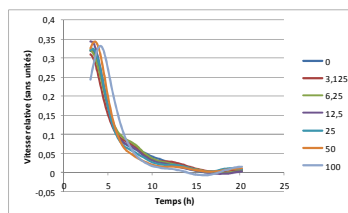
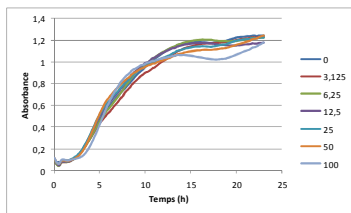
MEA



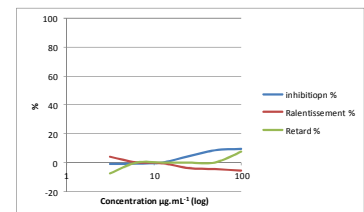
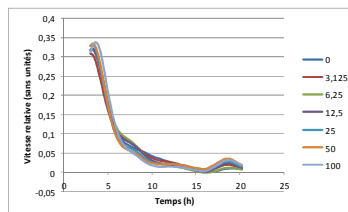
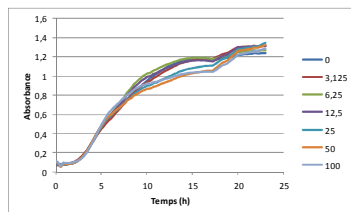
MES



DCA



PDA



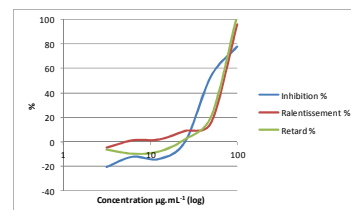
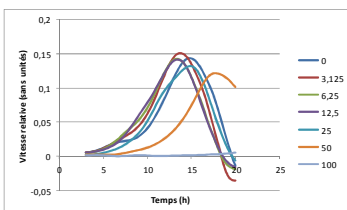
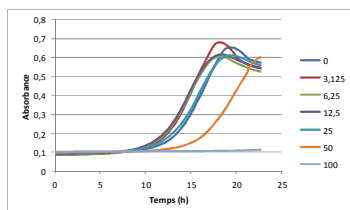
MMS231 – *P. polonicum* x *C. piscicola*

Courbes de croissance brutes de la souche incubée avec une concentration d'extrait de 0 à 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

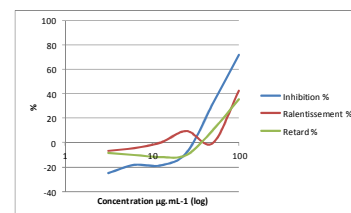
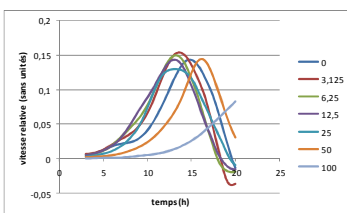
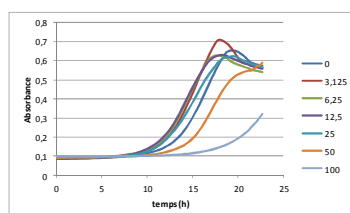
Transformation des données en vitesses de croissance relatives

Paramètres finaux d'interprétation

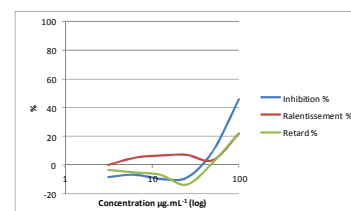
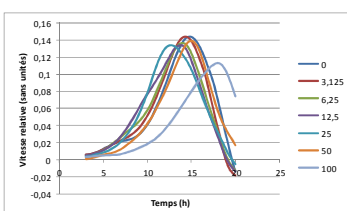
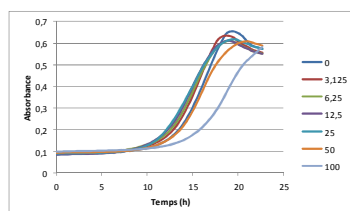
CYA



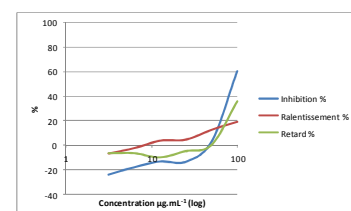
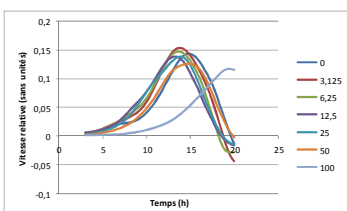
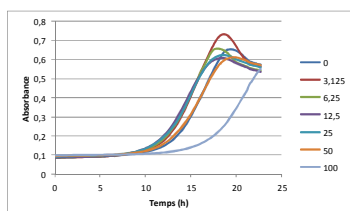
YES



MES



PDA



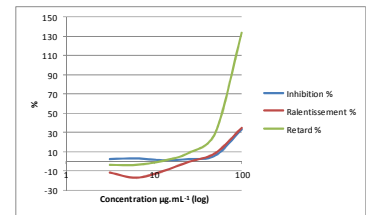
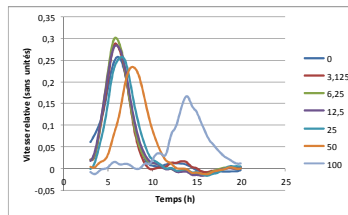
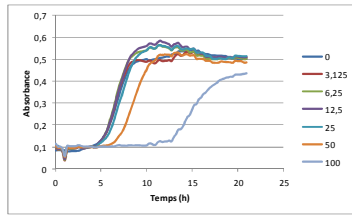
MMS231 – *P. polonicum* x *L. garvieae*

Courbes de croissance brutes de la souche incubée avec une concentration d'extrait de 0 à 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

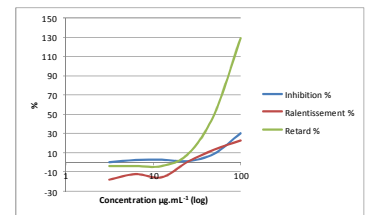
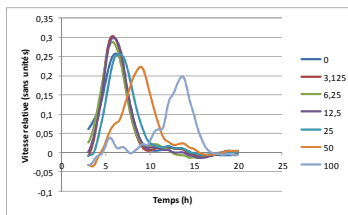
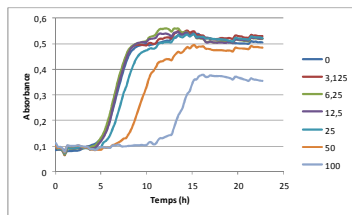
Transformation des données en vitesses de croissance relatives

Paramètres finaux d'interprétation

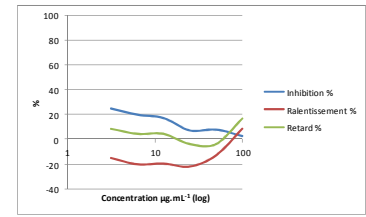
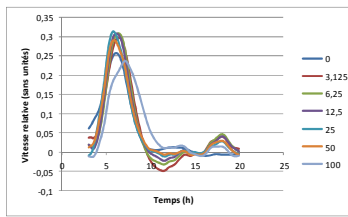
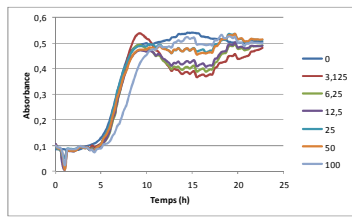
CYA



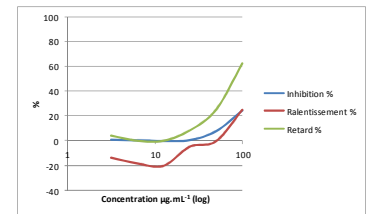
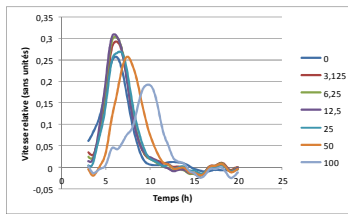
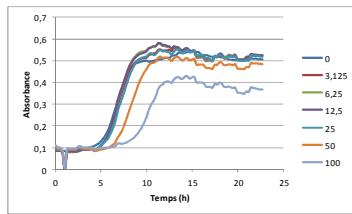
YES



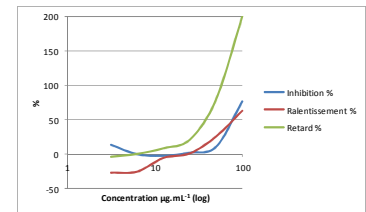
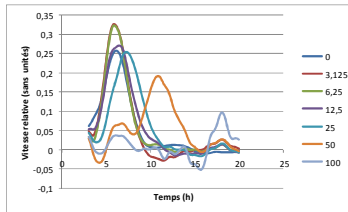
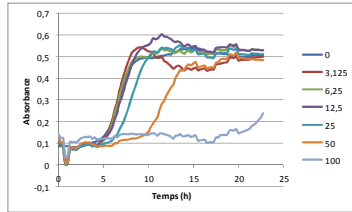
MEA



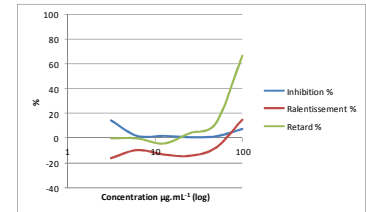
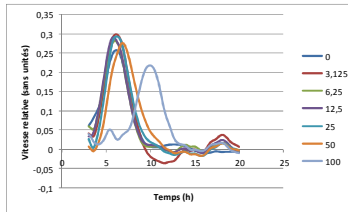
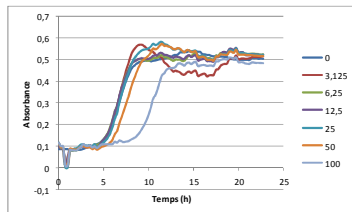
MES



DCA



PDA



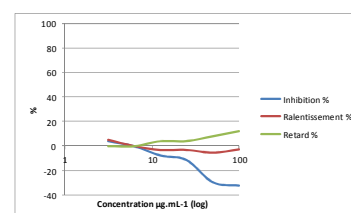
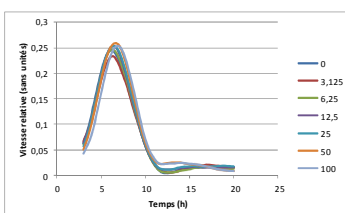
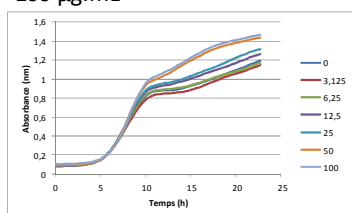
MMS270 – *P. bialowiezense* x *V. crassostreae*

Courbes de croissance brutes de la souche incubée avec une concentration d'extrait de 0 à 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

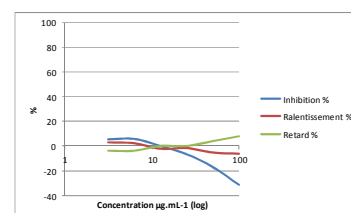
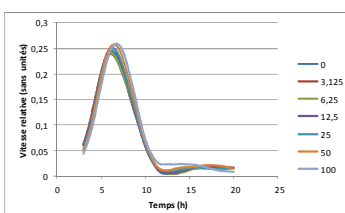
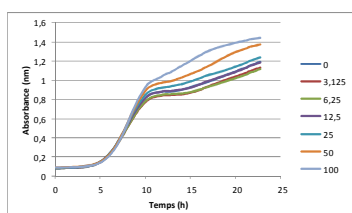
Transformation des données en vitesses de croissance relatives

Paramètres finaux d'interprétation

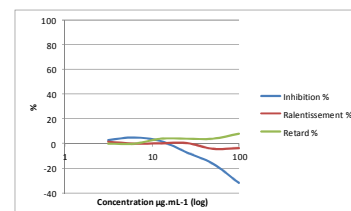
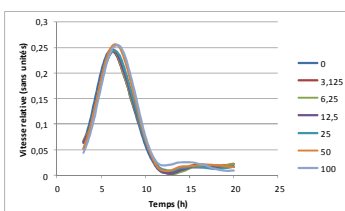
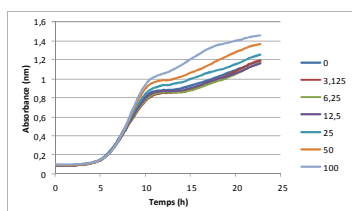
CYA



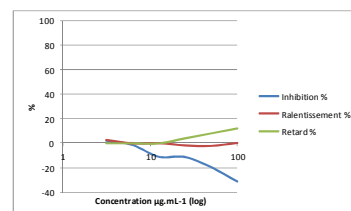
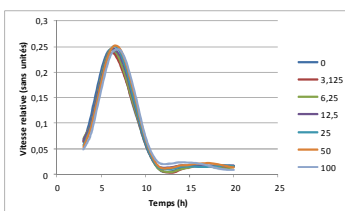
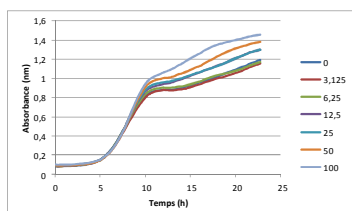
YES



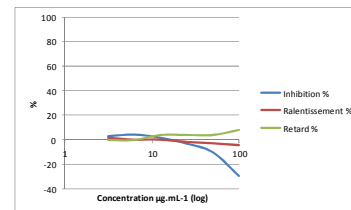
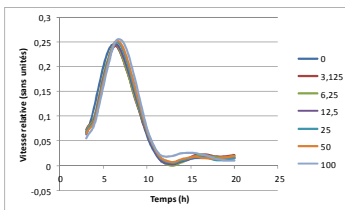
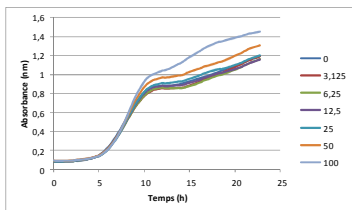
MEA



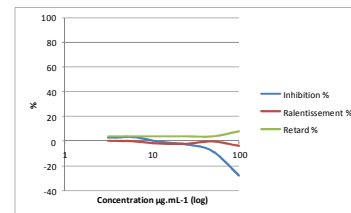
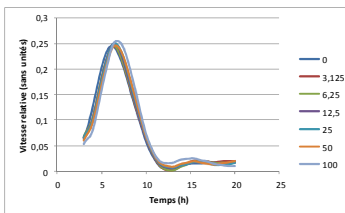
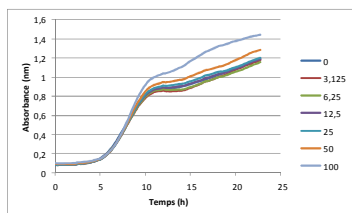
MES



DCA



PDA



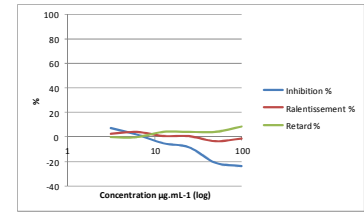
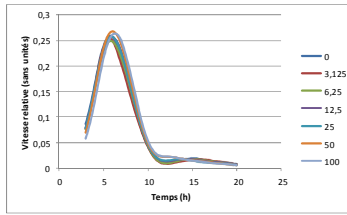
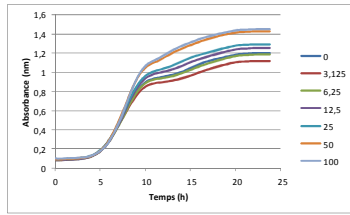
MMS270 – *P. bialowiezense* x *V. gigantis*

Courbes de croissance brutes de la souche incubée avec une concentration d'extrait de 0 à 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

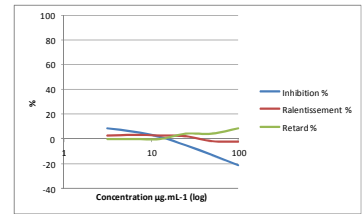
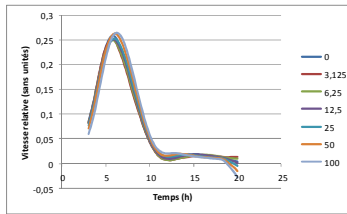
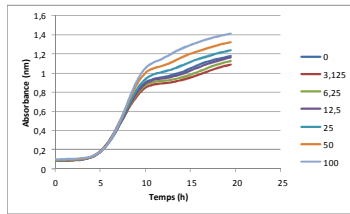
Transformation des données en vitesses de croissance relatives

Paramètres finaux d'interprétation

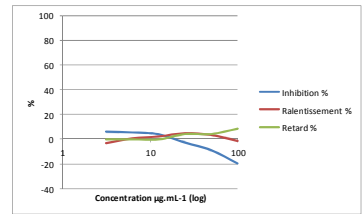
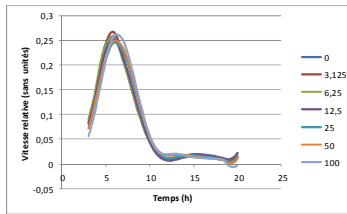
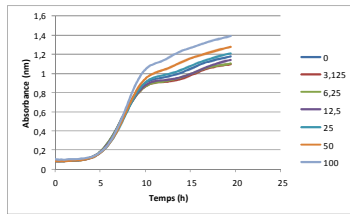
CYA



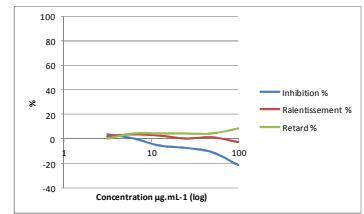
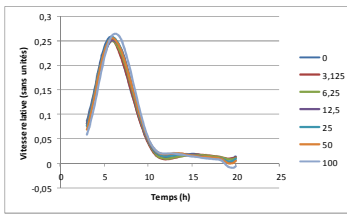
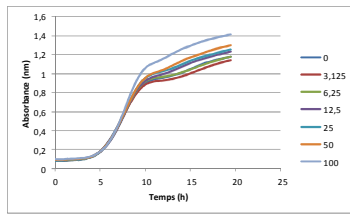
YES



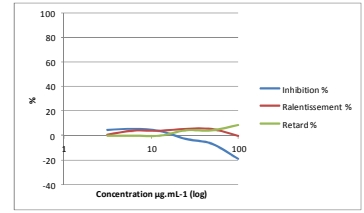
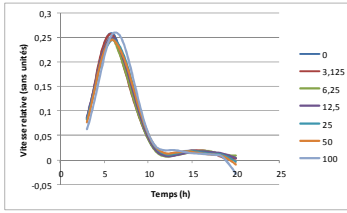
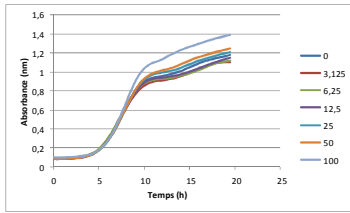
MEA



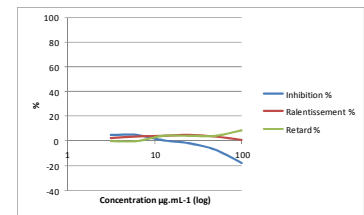
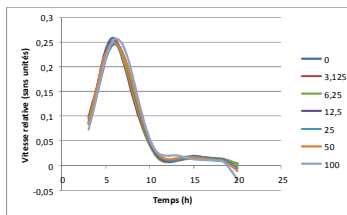
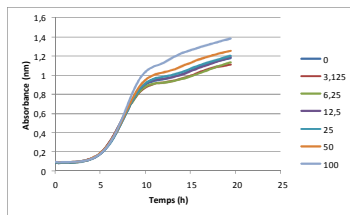
MES



DCA



PDA



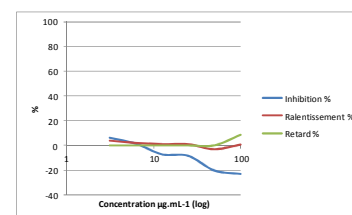
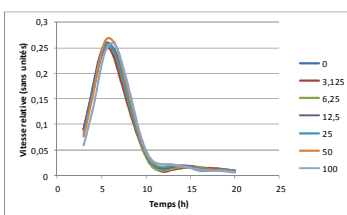
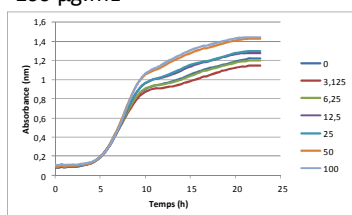
MMS270 – *P. bialowiezense* x *V. mytili*

Courbes de croissance brutes de la souche incubée avec une concentration d'extrait de 0 à 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

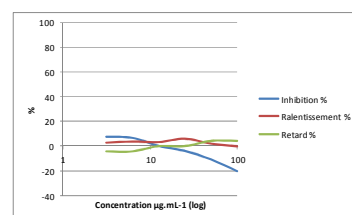
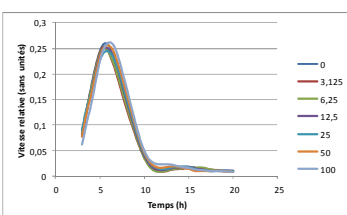
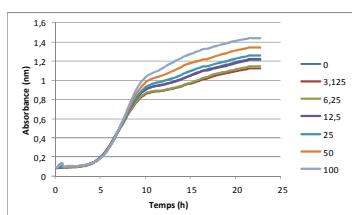
Transformation des données en vitesses de croissance relatives

Paramètres finaux d'interprétation

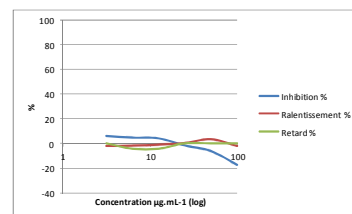
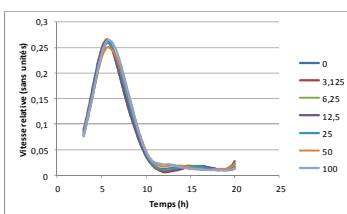
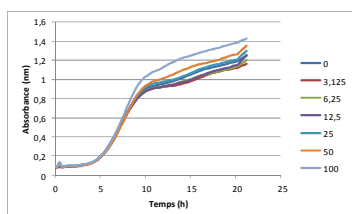
CYA



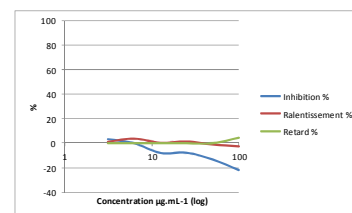
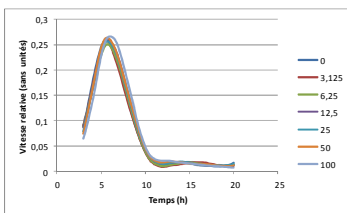
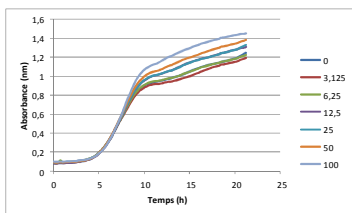
YES



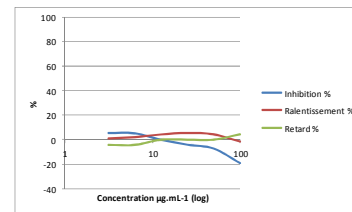
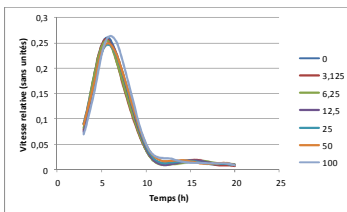
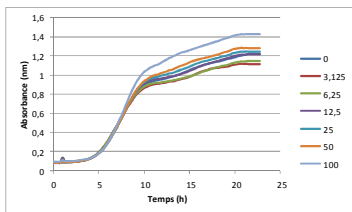
MEA



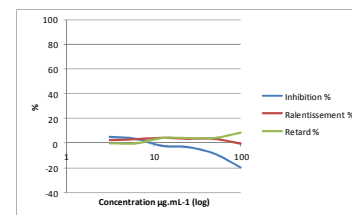
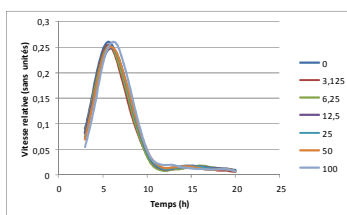
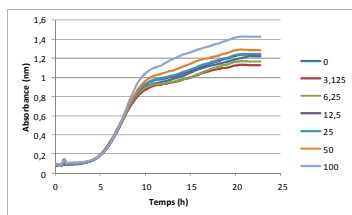
MES



DCA



PDA



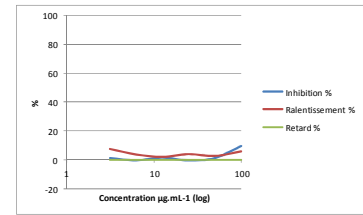
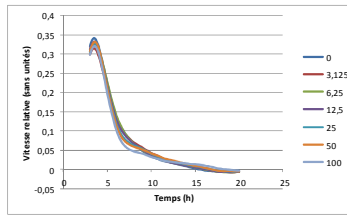
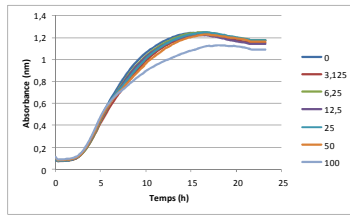
MMS270 – *P. bialowiezense* x *E.coli*

Courbes de croissance brutes de la souche incubée avec une concentration d'extrait de 0 à 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

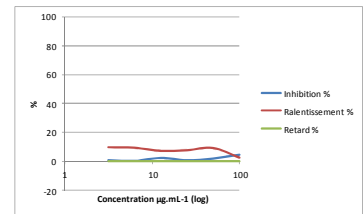
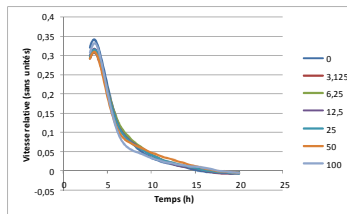
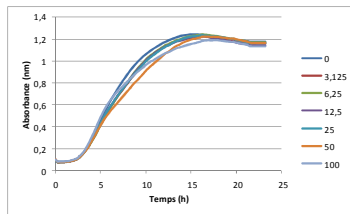
Transformation des données en vitesses de croissance relatives

Paramètres finaux d'interprétation

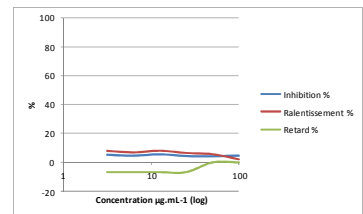
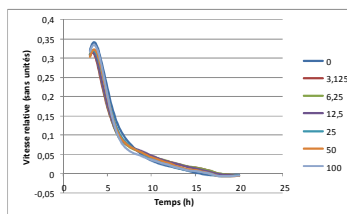
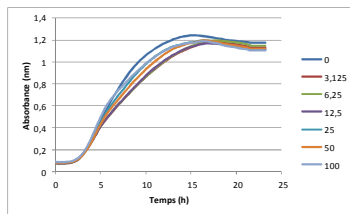
CYA



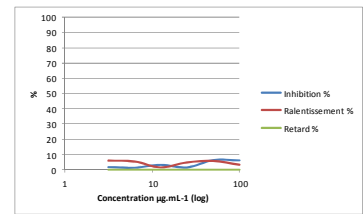
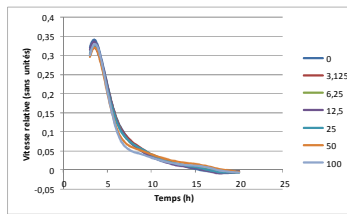
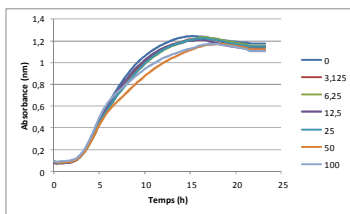
YES



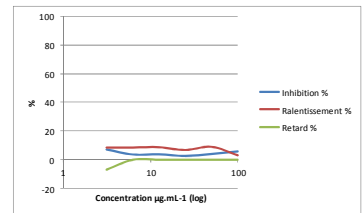
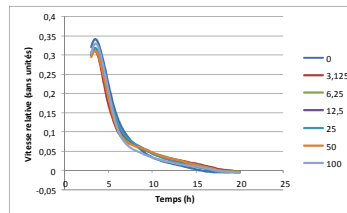
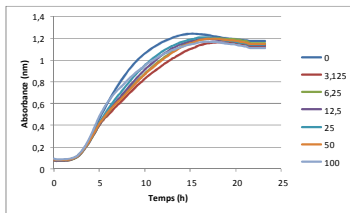
MEA



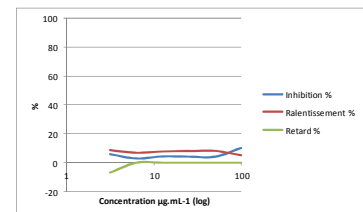
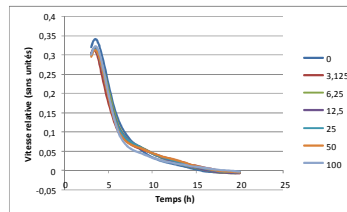
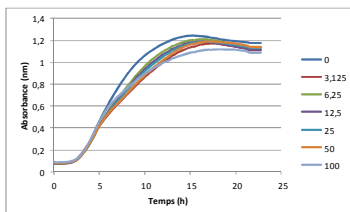
MES



DCA



PDA



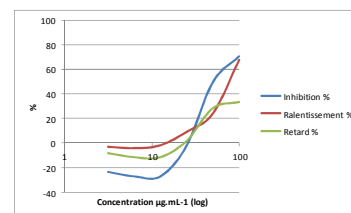
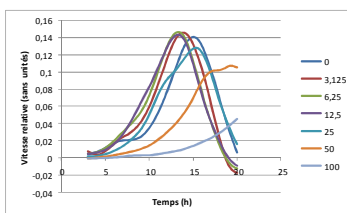
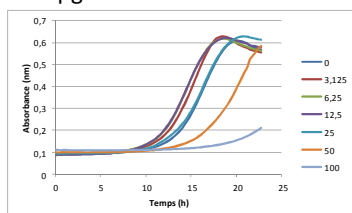
MMS270 – *P. bialowiezense* x *C. piscicola*

Courbes de croissance brutes de la souche incubée avec une concentration d'extrait de 0 à 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

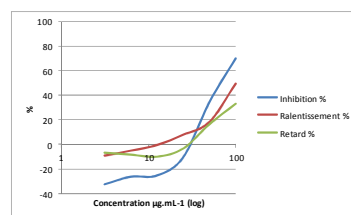
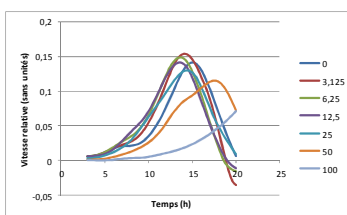
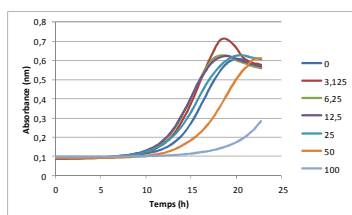
Transformation des données en vitesses de croissance relatives

Paramètres finaux d'interprétation

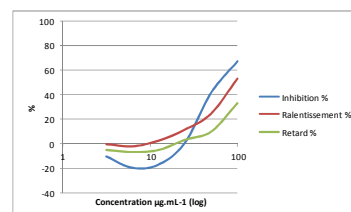
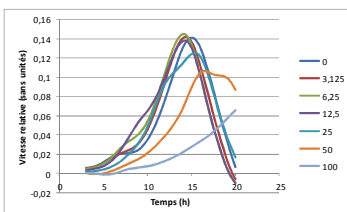
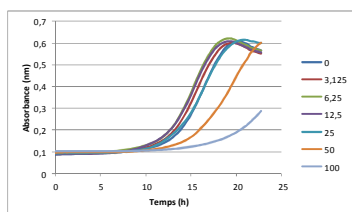
CYA



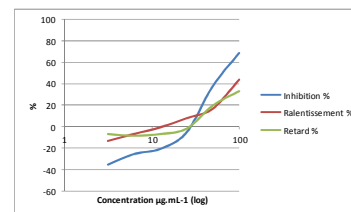
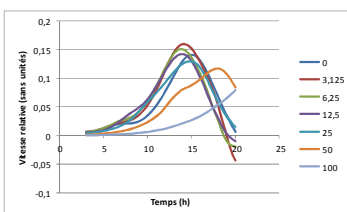
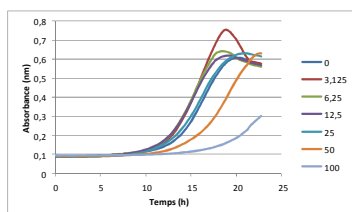
YES



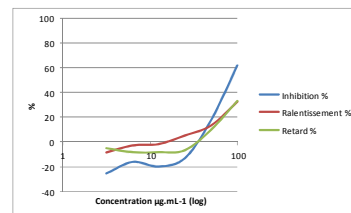
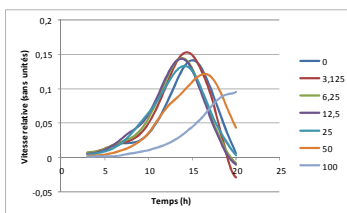
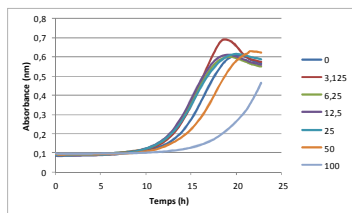
MES



DCA



PDA



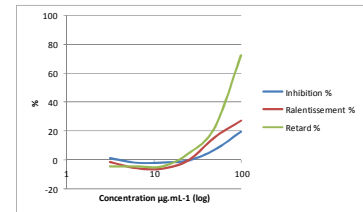
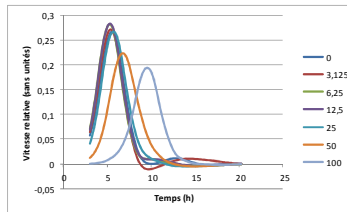
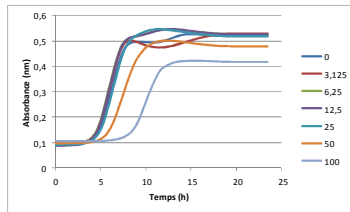
MMS270 – *P. bialowiezense* x *L. garvieae*

Courbes de croissance brutes de la souche incubée avec une concentration d'extrait de 0 à 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

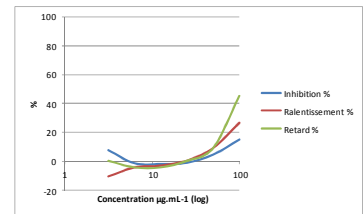
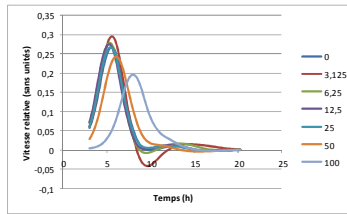
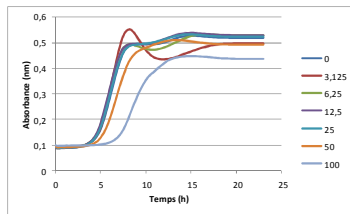
Transformation des données en vitesses de croissance relatives

Paramètres finaux d'interprétation

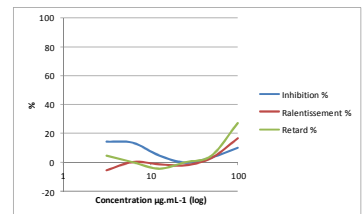
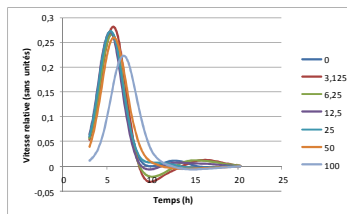
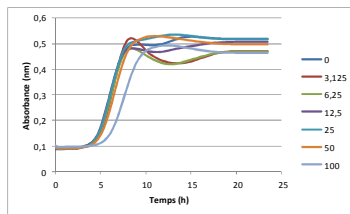
CYA



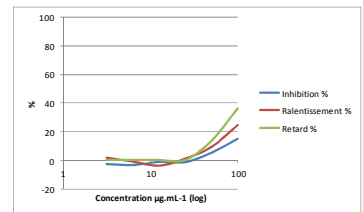
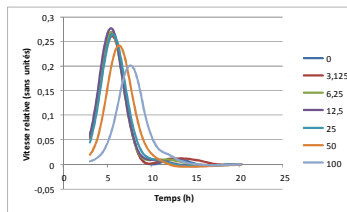
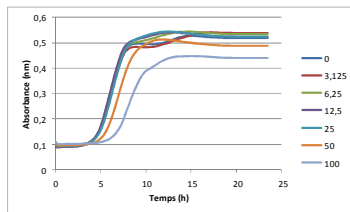
YES



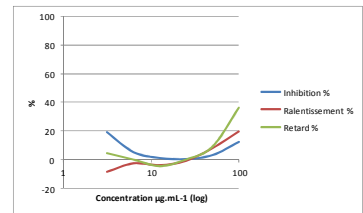
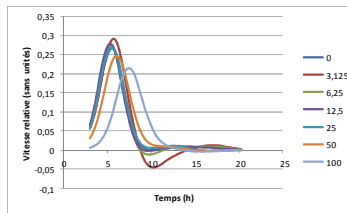
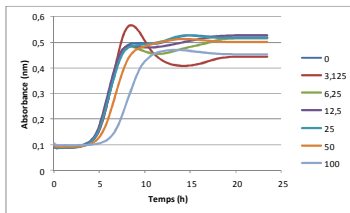
MEA



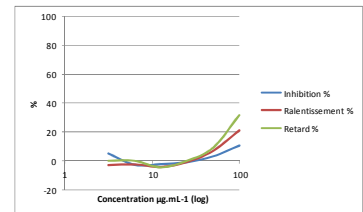
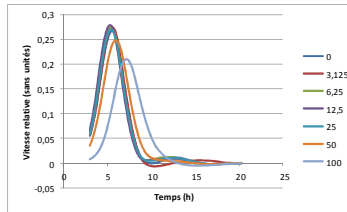
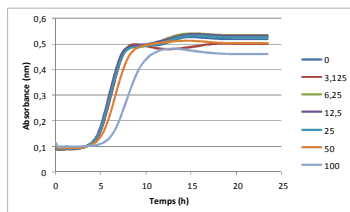
MES



DCA



PDA



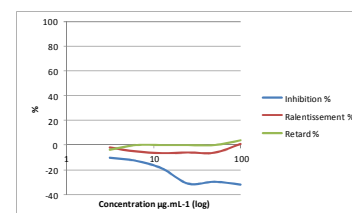
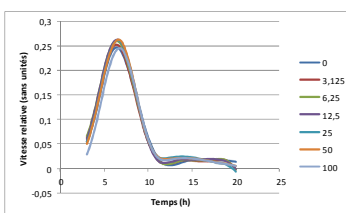
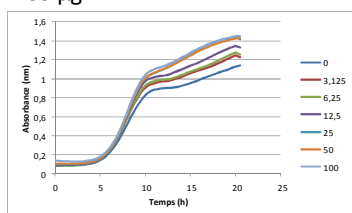
MMS330 – *P. ubiquetum* x *V. crassostreae*

Courbes de croissance brutes de la souche incubée avec une concentration d'extrait de 0 à 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

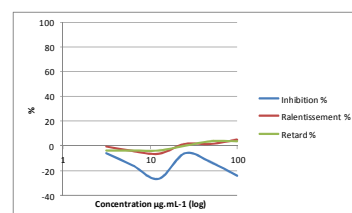
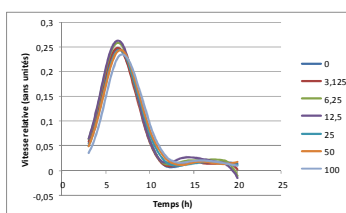
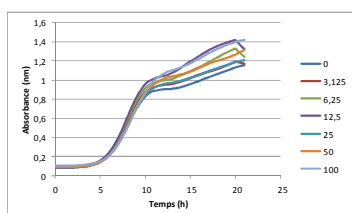
Transformation des données en vitesses de croissance relatives

Paramètres finaux d'interprétation

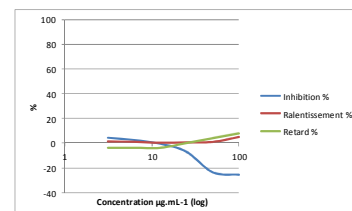
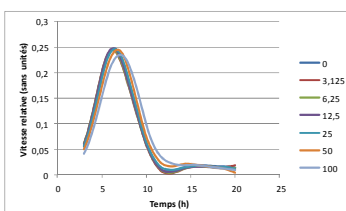
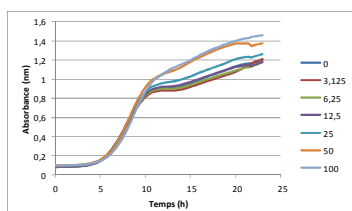
CYA



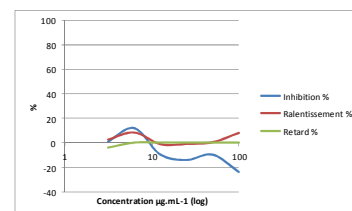
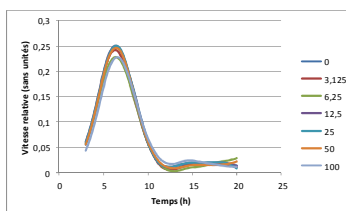
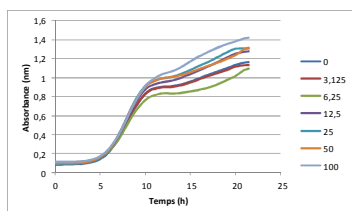
YES



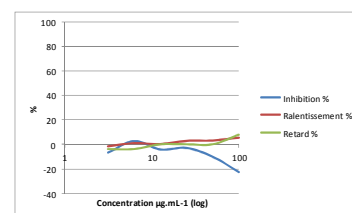
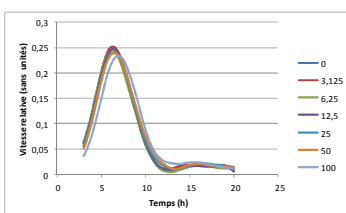
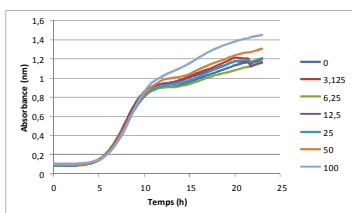
MEA



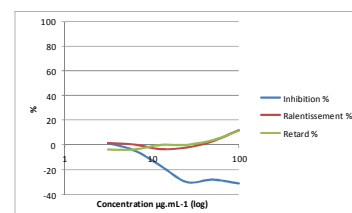
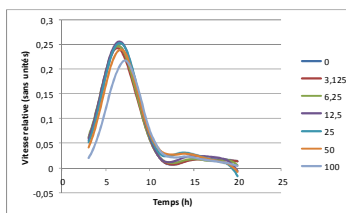
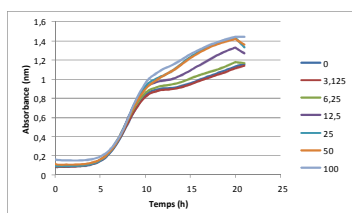
MES



DCA



PDA



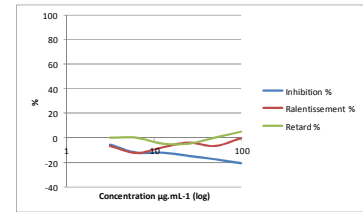
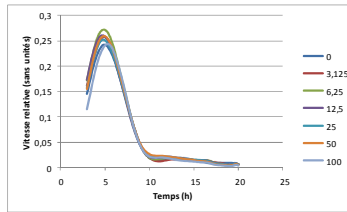
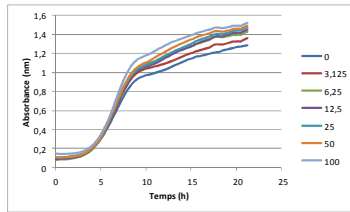
MMS330 – *P. ubiquetum* x *V. gigantis*

Courbes de croissance brutes de la souche incubée avec une concentration d'extrait de 0 à 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

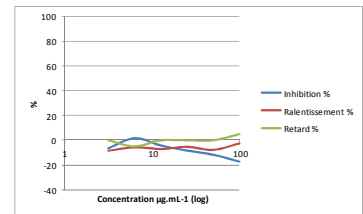
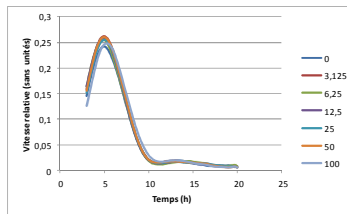
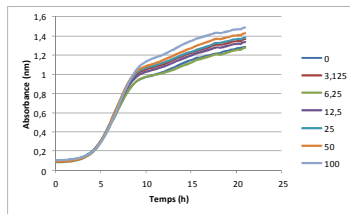
Transformation des données en vitesses de croissance relatives

Paramètres finaux d'interprétation

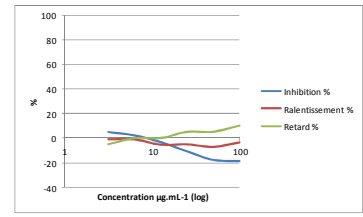
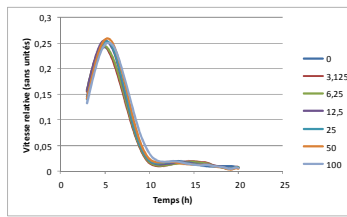
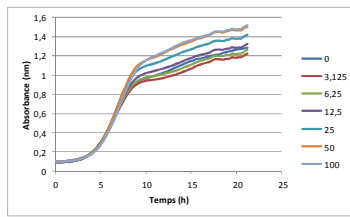
CYA



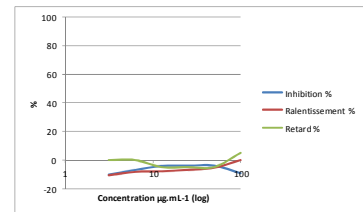
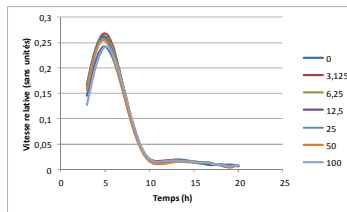
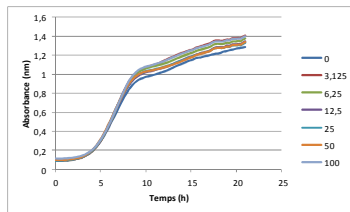
YES



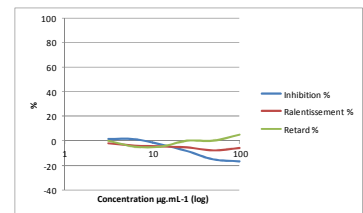
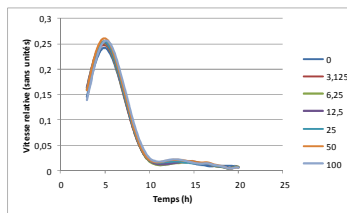
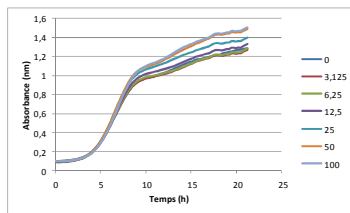
MEA



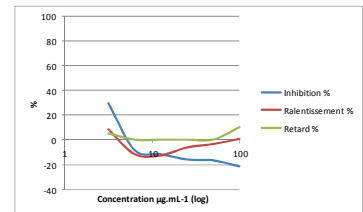
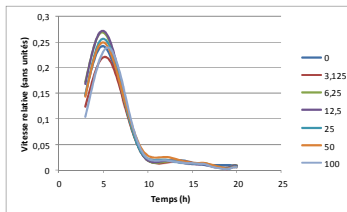
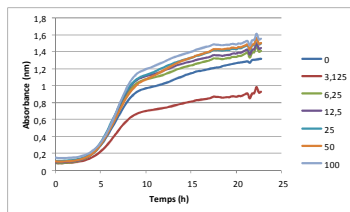
MES



DCA



PDA



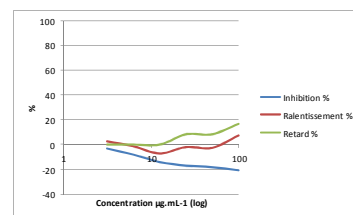
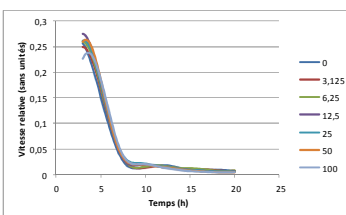
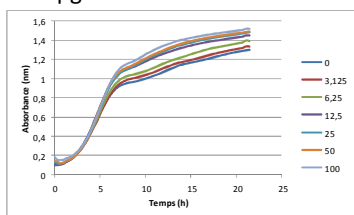
MMS330 – *P. ubiquestum* x *V. mytili*

Courbes de croissance brutes de la souche incubée avec une concentration d'extrait de 0 à 100 µg.mL⁻¹

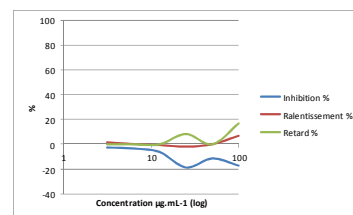
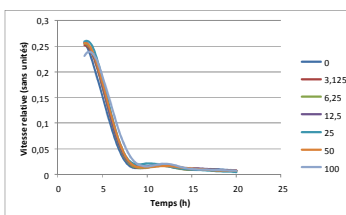
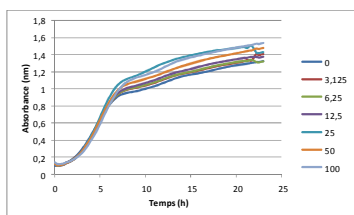
Transformation des données en vitesses de croissance relatives

Paramètres finaux d'interprétation

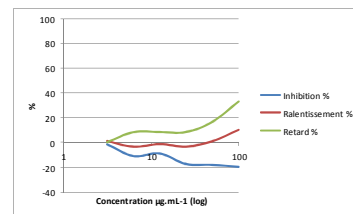
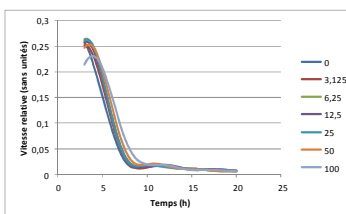
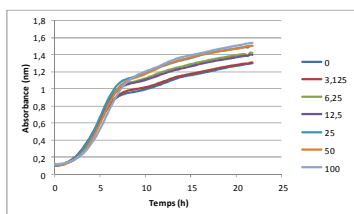
CYA



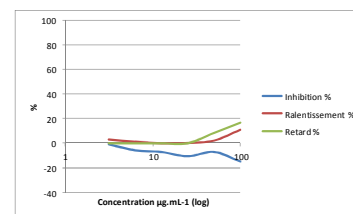
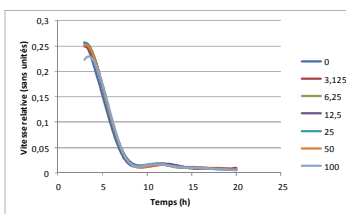
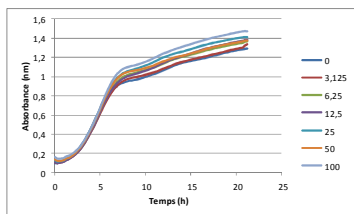
YES



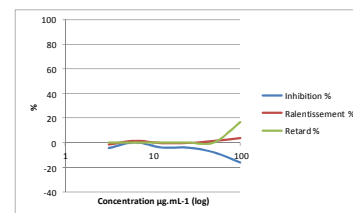
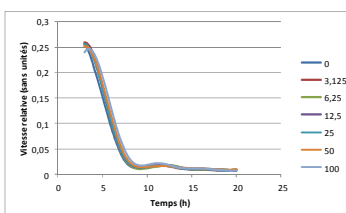
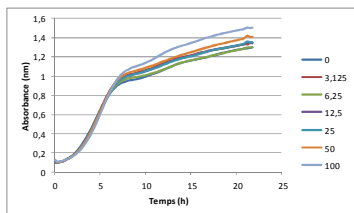
MEA



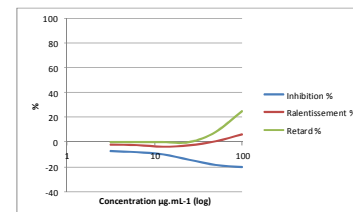
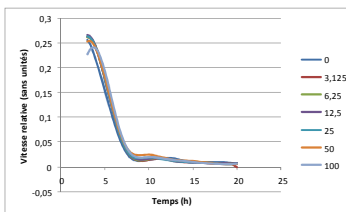
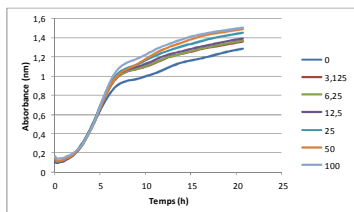
MES



DCA



PDA



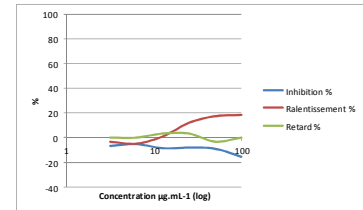
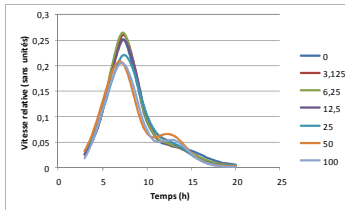
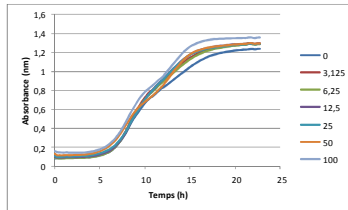
MMS330 – *P. ubiquetum* x *V. rotiferianus*

Courbes de croissance brutes de la souche incubée avec une concentration d'extrait de 0 à 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

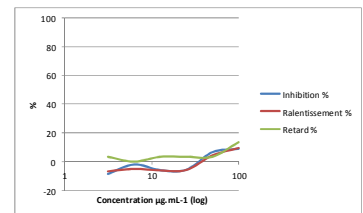
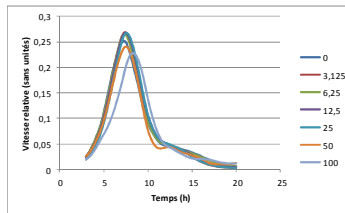
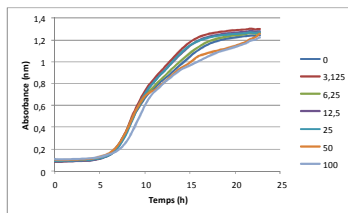
Transformation des données en vitesses de croissance relatives

Paramètres finaux d'interprétation

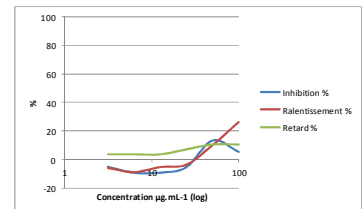
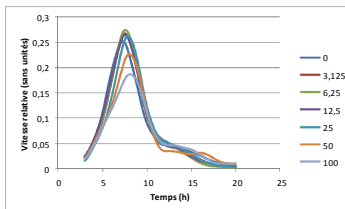
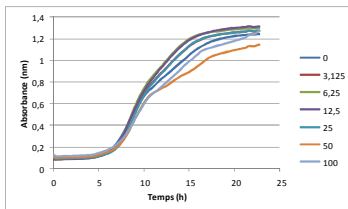
CYA



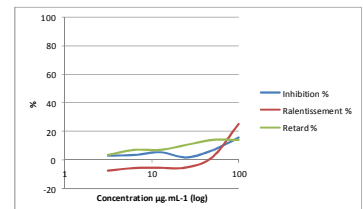
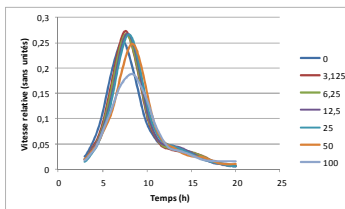
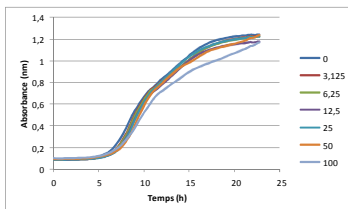
YES



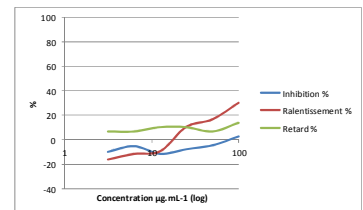
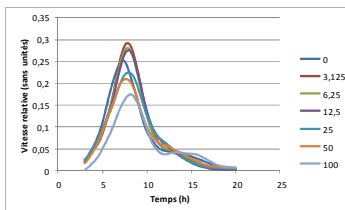
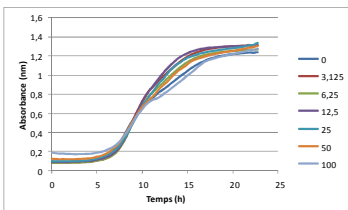
MES



DCA



PDA



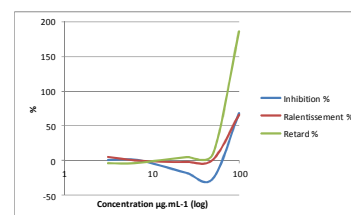
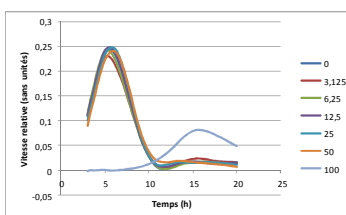
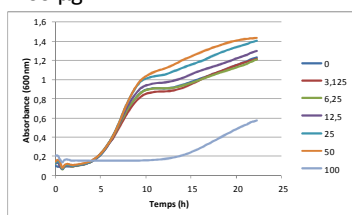
MMS393 – *P. sp. x V. crassostreae*

Courbes de croissance brutes de la souche incubée avec une concentration d'extrait de 0 à 100 µg.mL⁻¹

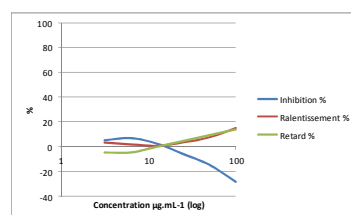
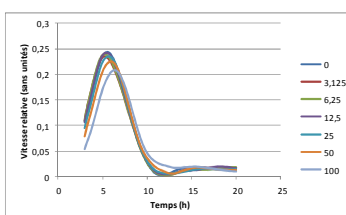
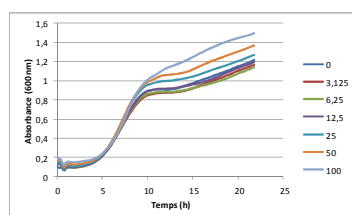
Transformation des données en vitesses de croissance relatives

Paramètres finaux d'interprétation

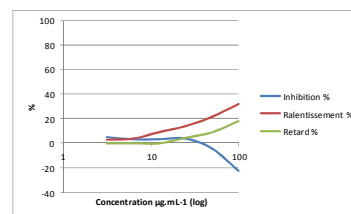
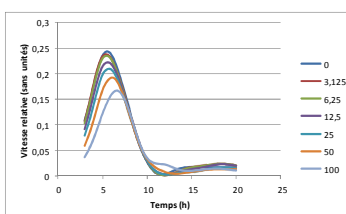
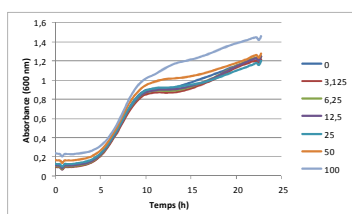
CYA



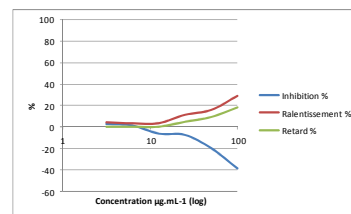
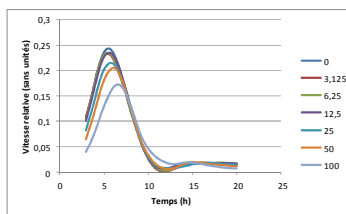
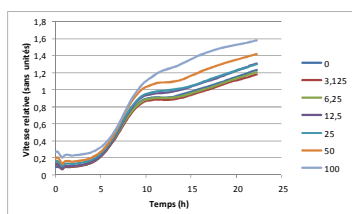
YES



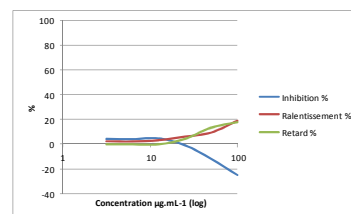
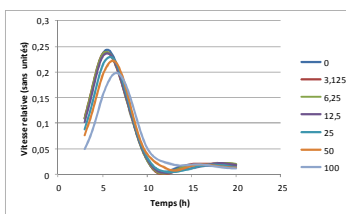
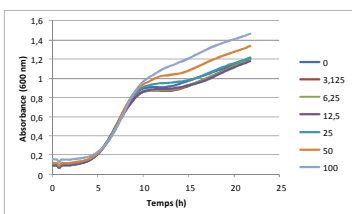
MEA



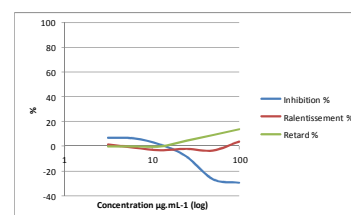
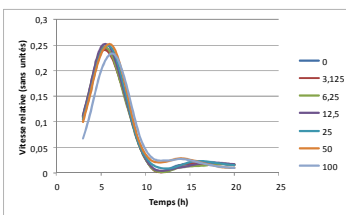
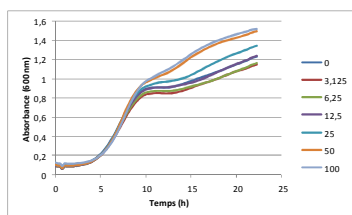
MES



DCA



PDA



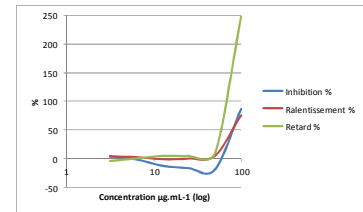
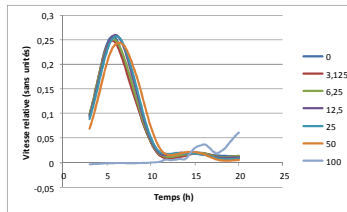
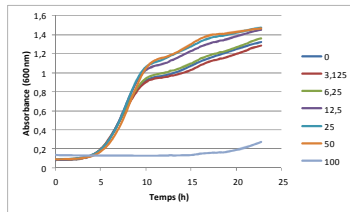
MMS393 – *P. sp. x V. gigantis*

Courbes de croissance brutes de la souche incubée avec une concentration d'extrait de 0 à 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

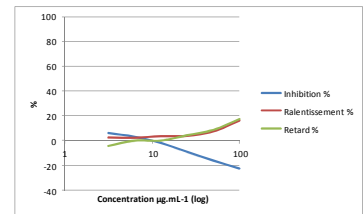
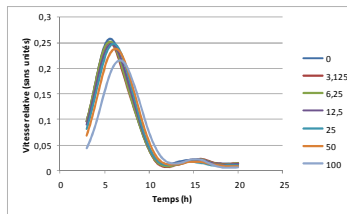
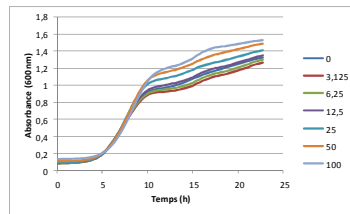
Transformation des données en vitesses de croissance relatives

Paramètres finaux d'interprétation

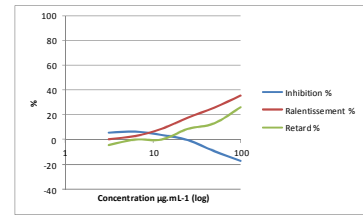
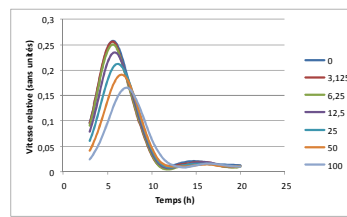
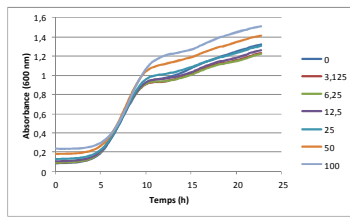
CYA



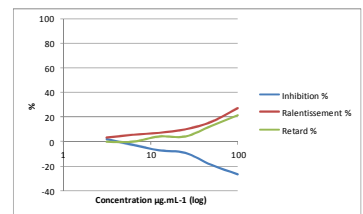
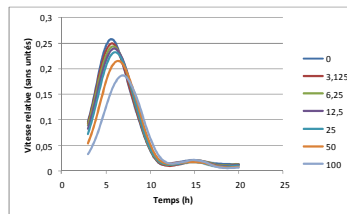
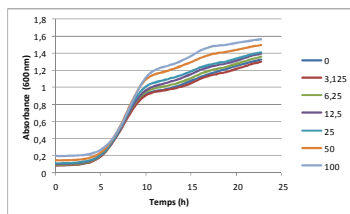
YES



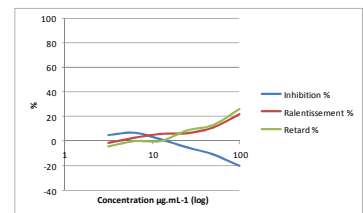
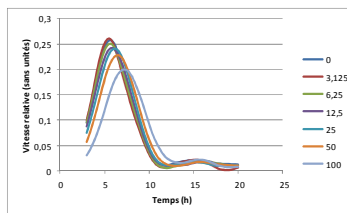
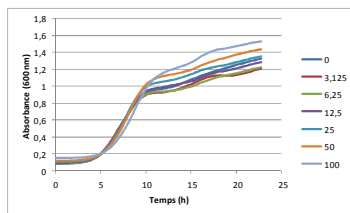
MEA



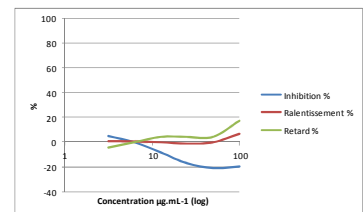
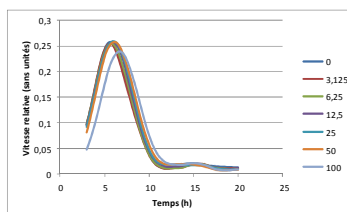
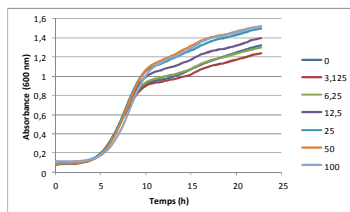
MES



DCA



PDA



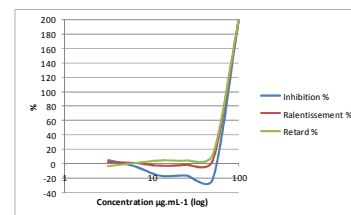
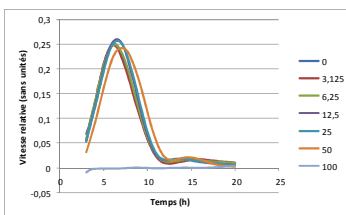
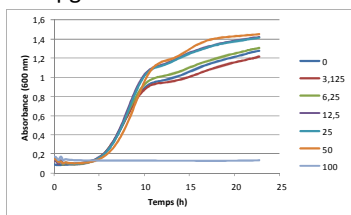
MMS393 – *P. sp.* x *V. mytili*

Courbes de croissance brutes de la souche incubée avec une concentration d'extrait de 0 à 100 µg.mL⁻¹

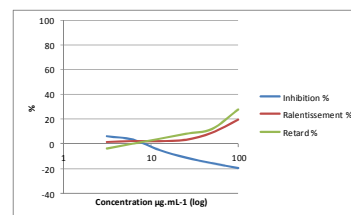
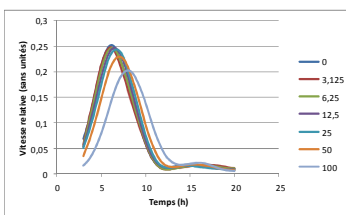
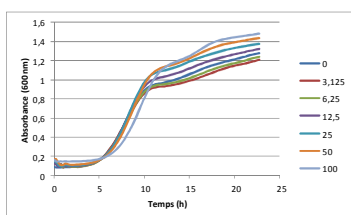
Transformation des données en vitesses de croissance relatives

Paramètres finaux d'interprétation

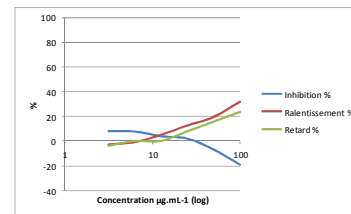
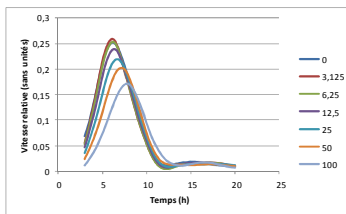
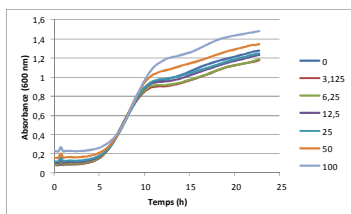
CYA



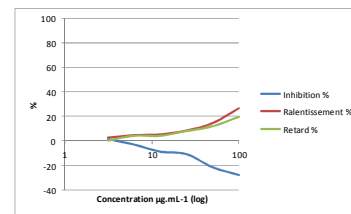
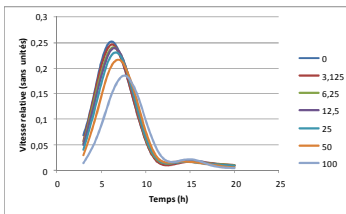
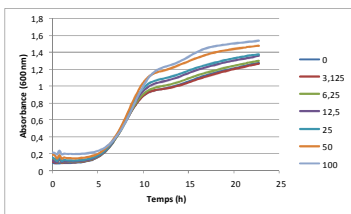
YES



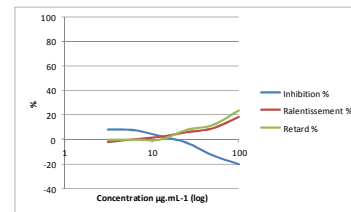
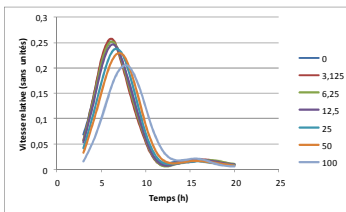
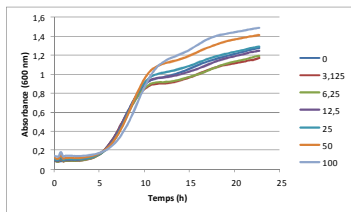
MEA



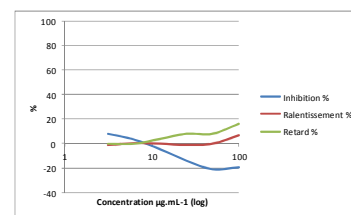
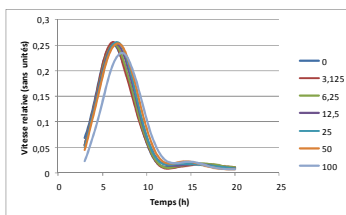
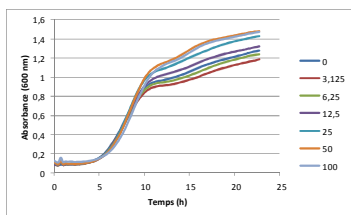
MES



DCA



PDA



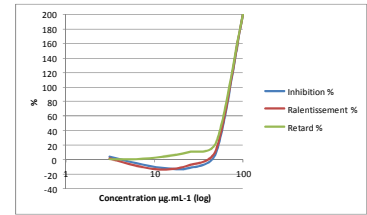
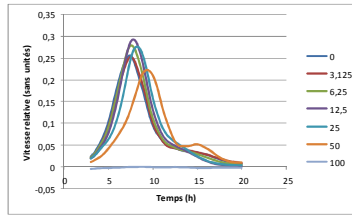
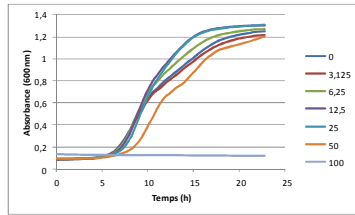
MMS393 – *P. sp. x V. rotiferianus*

Courbes de croissance brutes de la souche incubée avec une concentration d'extrait de 0 à 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

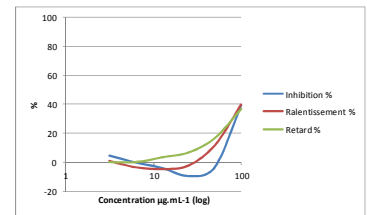
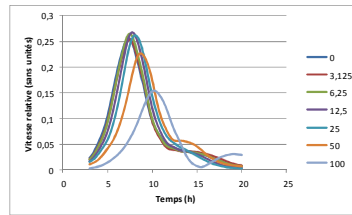
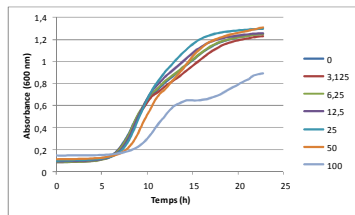
Transformation des données en vitesses de croissance relatives

Paramètres finaux d'interprétation

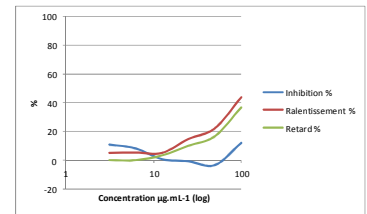
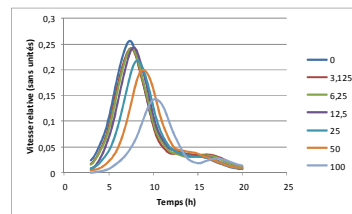
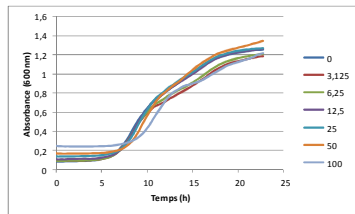
CYA



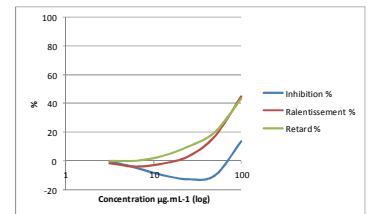
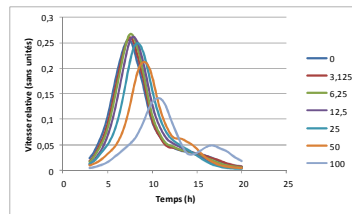
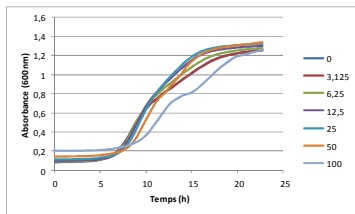
YES



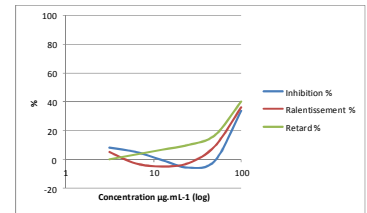
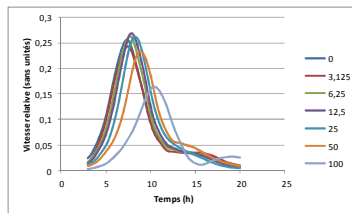
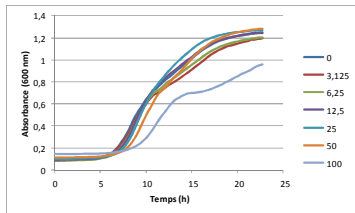
MEA



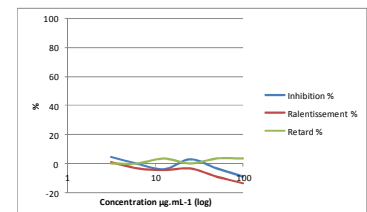
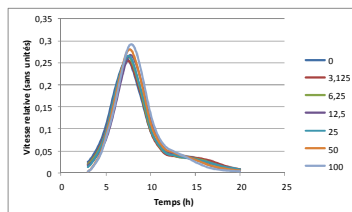
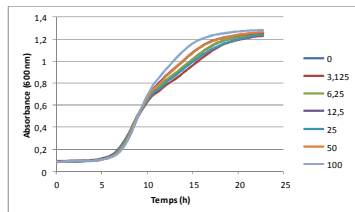
MES



DCA



PDA



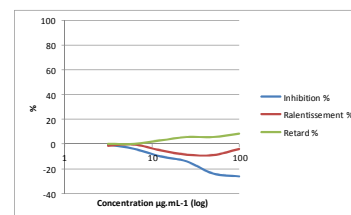
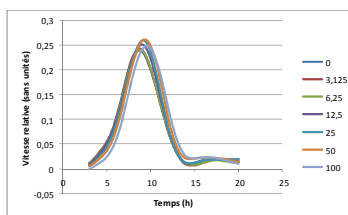
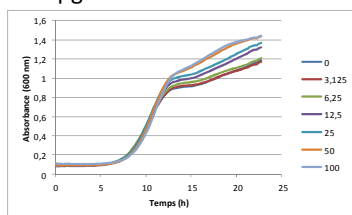
MMS399 – *P. ligerum* x *V. crassostreae*

Courbes de croissance brutes de la souche incubée avec une concentration d'extrait de 0 à 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

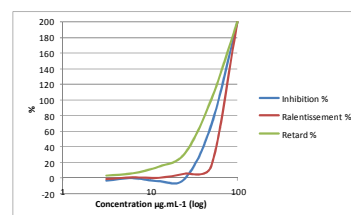
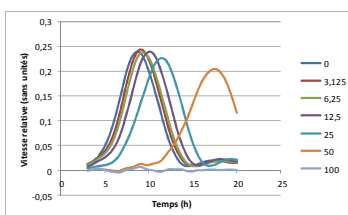
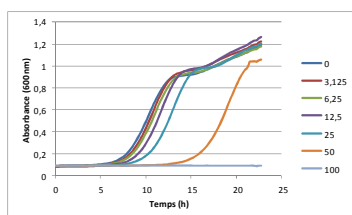
Transformation des données en vitesses de croissance relatives

Paramètres finaux d'interprétation

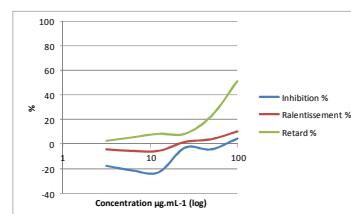
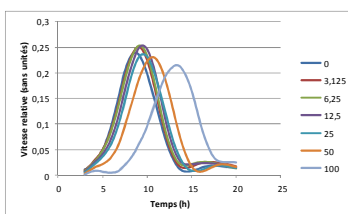
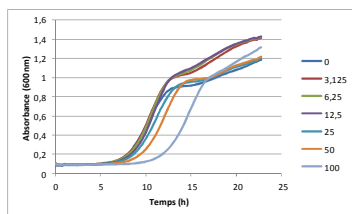
CYA



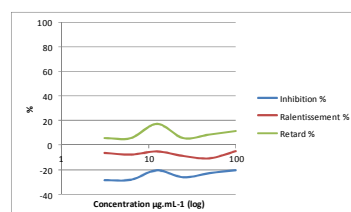
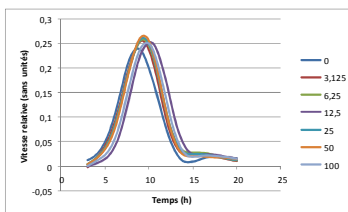
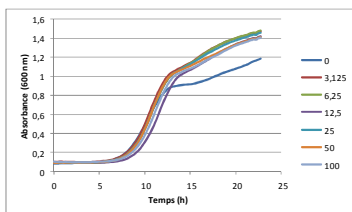
YES



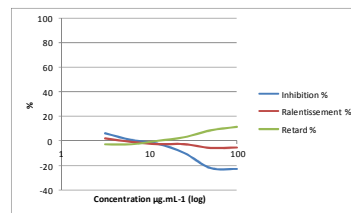
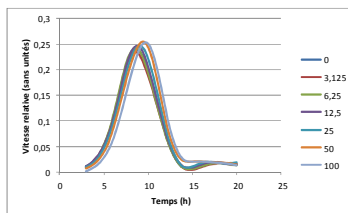
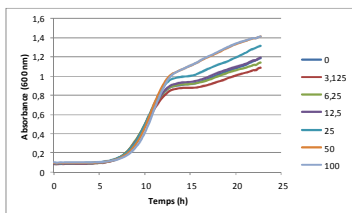
MEA



DCA



PDA



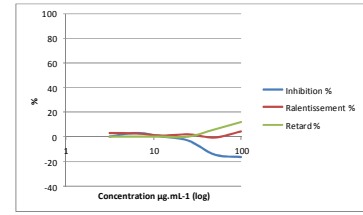
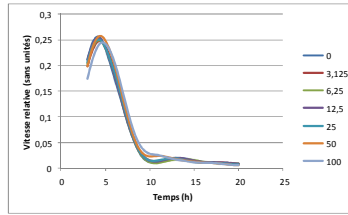
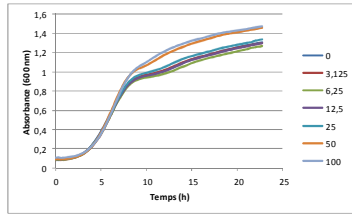
MMS399 – *P. ligenum* x *V. gigantis*

Courbes de croissance brutes de la souche incubée avec une concentration d'extrait de 0 à 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

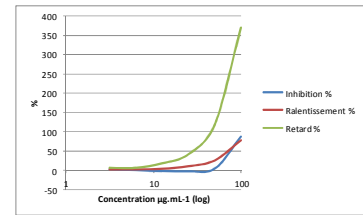
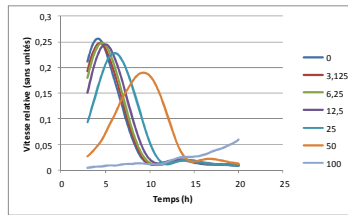
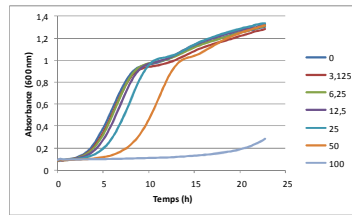
Transformation des données en vitesses de croissance relatives

Paramètres finaux d'interprétation

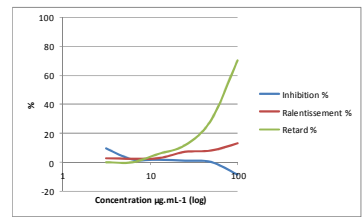
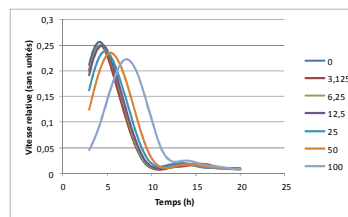
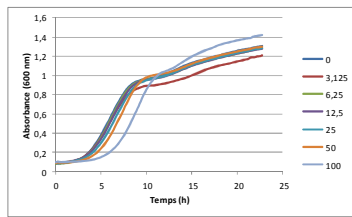
CYA



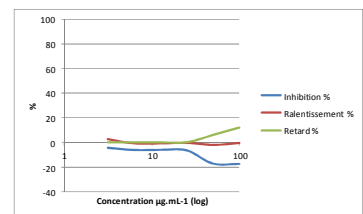
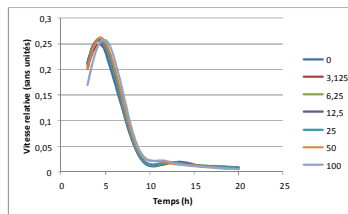
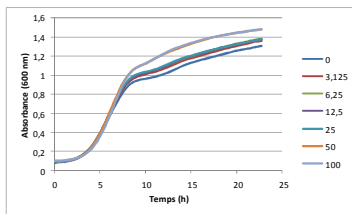
YES



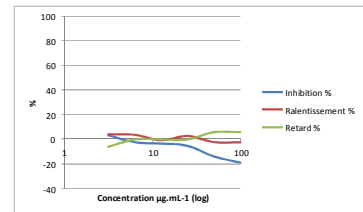
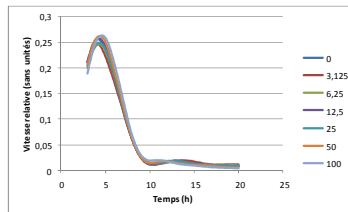
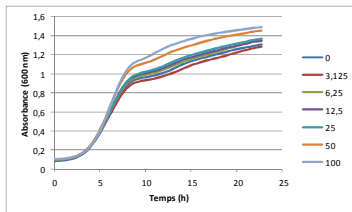
MEA



DCA



PDA



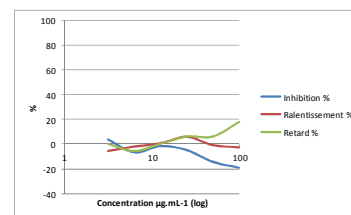
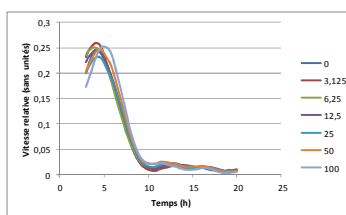
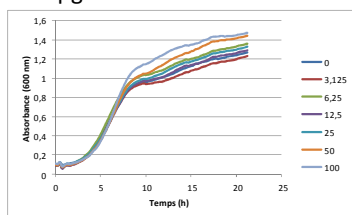
MMS399 – *P. ligerum* x *V. mytili*

Courbes de croissance brutes de la souche incubée avec une concentration d'extrait de 0 à 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

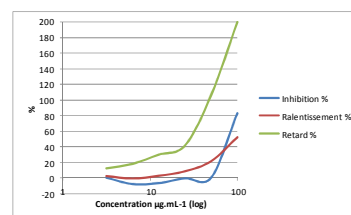
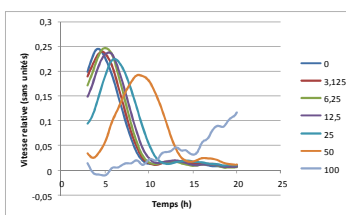
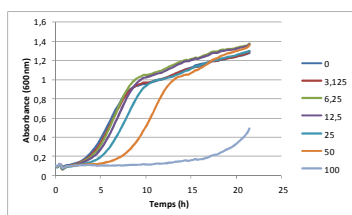
Transformation des données en vitesses de croissance relatives

Paramètres finaux d'interprétation

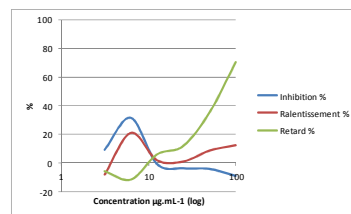
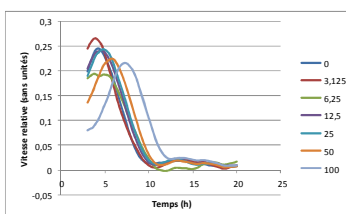
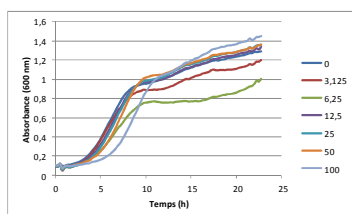
CYA



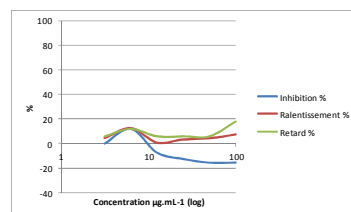
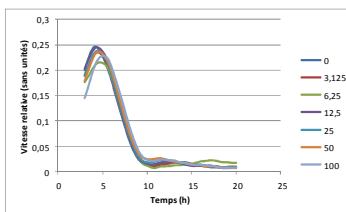
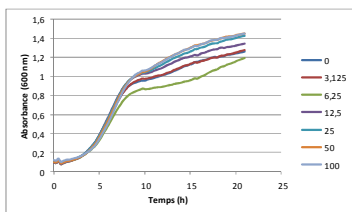
YES



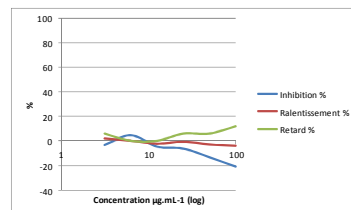
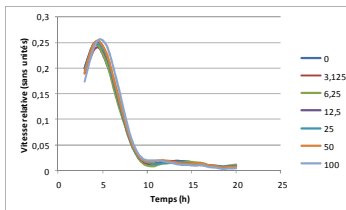
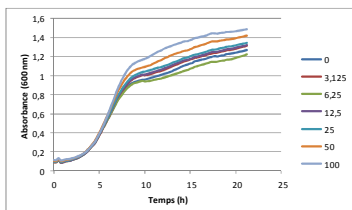
MEA



DCA



PDA



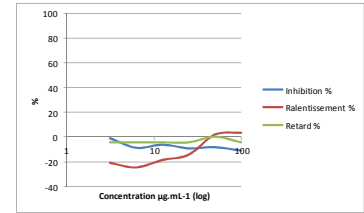
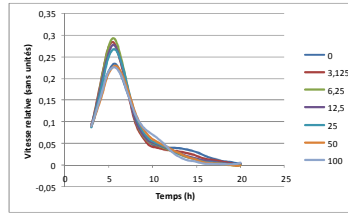
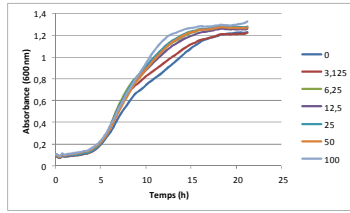
MMS399 – *P. ligurum* x *V. rotiferianus*

Courbes de croissance brutes de la souche incubée avec une concentration d'extrait de 0 à 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

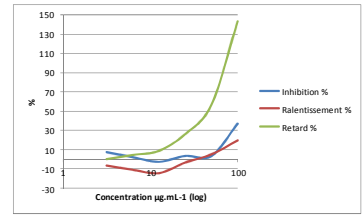
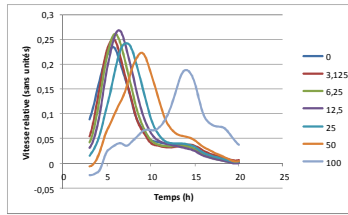
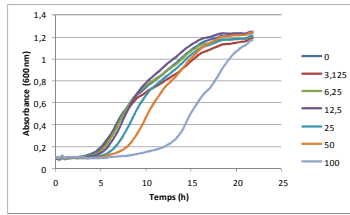
Transformation des données en vitesses de croissance relatives

Paramètres finaux d'interprétation

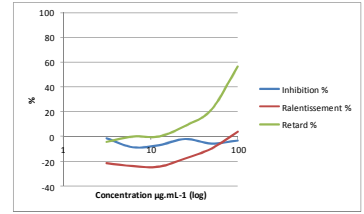
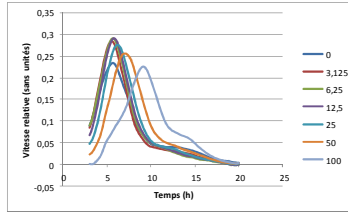
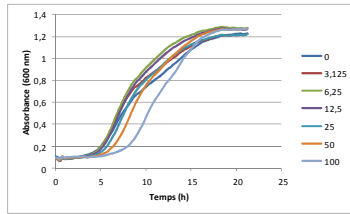
CYA



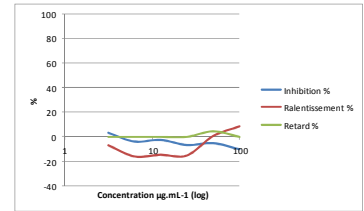
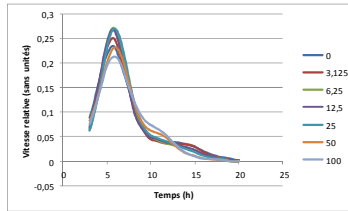
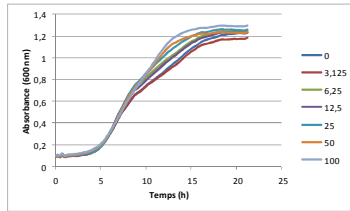
YES



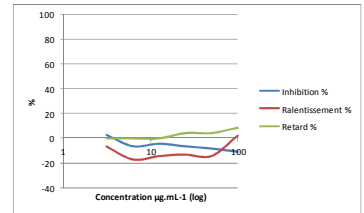
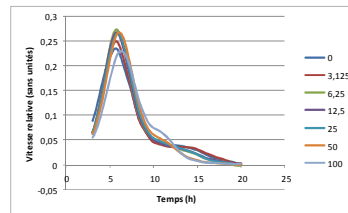
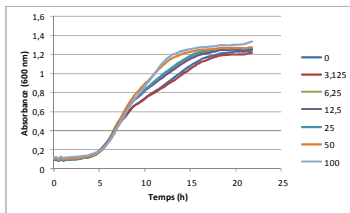
MEA



DCA



PDA



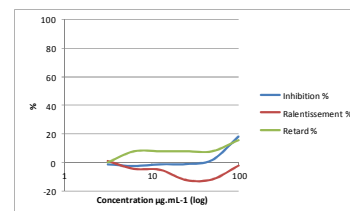
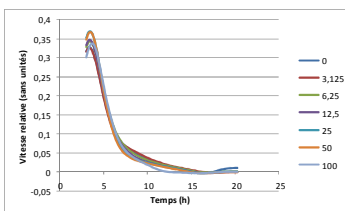
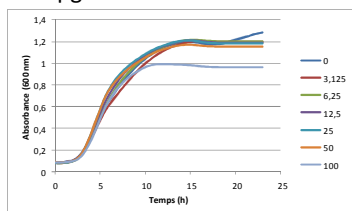
MMS393 – *P. sp. x E. coli*

Courbes de croissance brutes de la souche incubée avec une concentration d'extrait de 0 à 100 µg.mL⁻¹

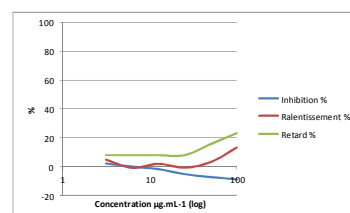
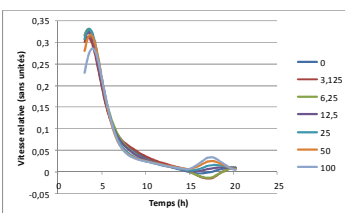
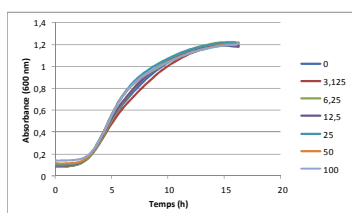
Transformation des données en vitesses de croissance relatives

Paramètres finaux d'interprétation

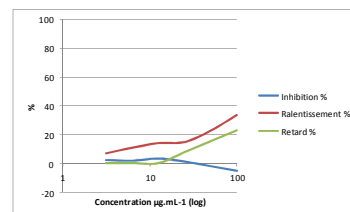
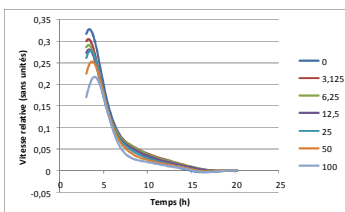
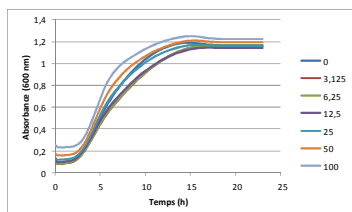
CYA



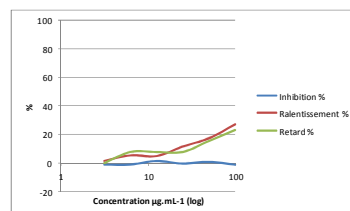
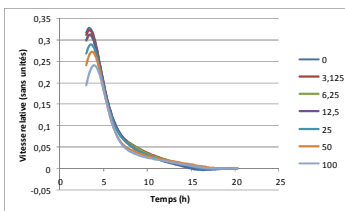
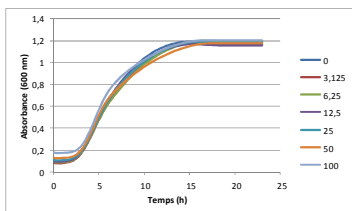
YES



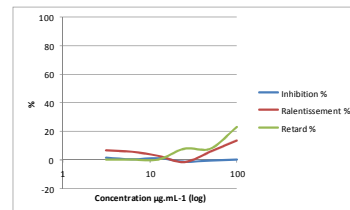
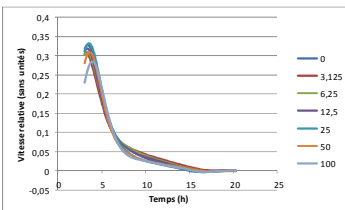
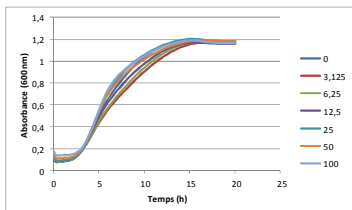
MEA



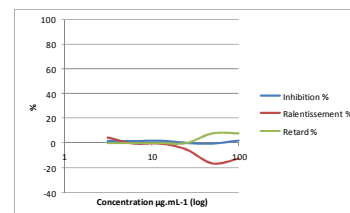
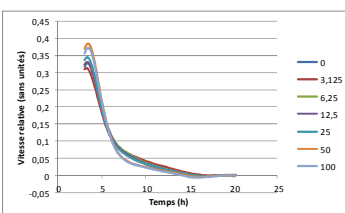
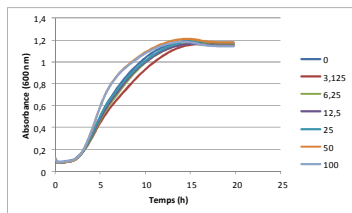
MES



DCA



PDA



Annexe 14 : Screening de la souche MMS1411 (*Beauveria bassiana*) pour la recherche d'activités antibactériennes

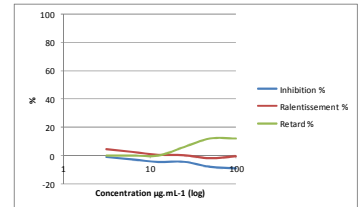
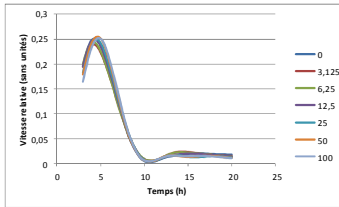
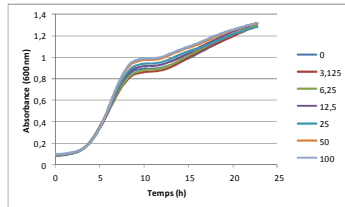
V. crassostreae

Courbes de croissance brutes de la souche incubée avec une concentration d'extrait de 0 à 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

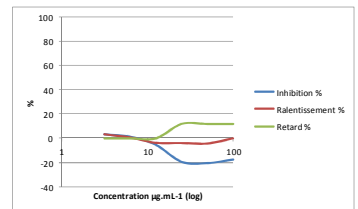
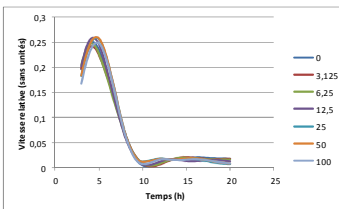
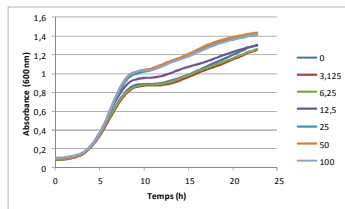
Transformation des données en vitesses de croissance relatives

Paramètres finaux d'interprétation

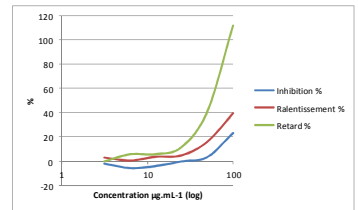
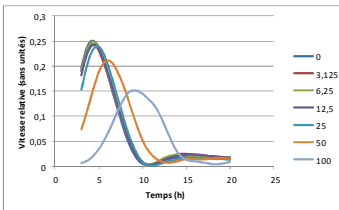
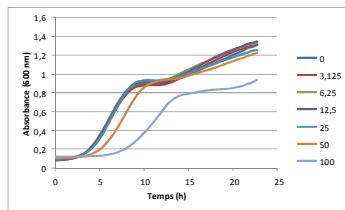
CYA



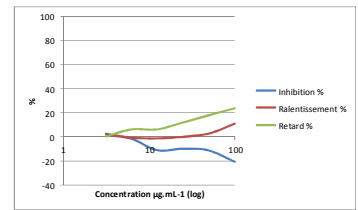
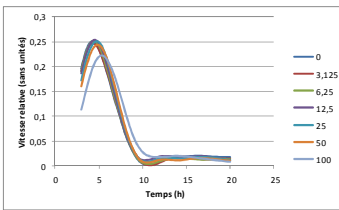
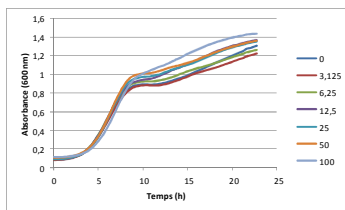
YES



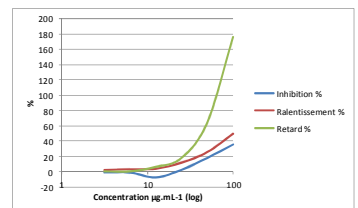
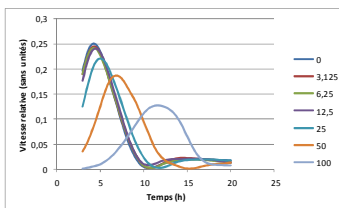
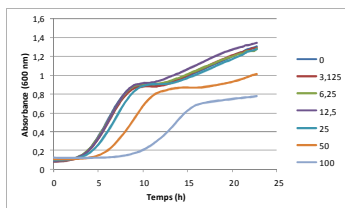
MEA



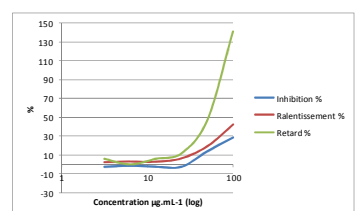
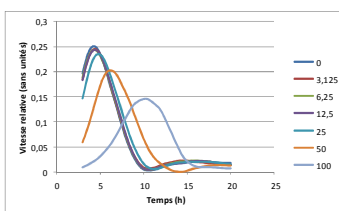
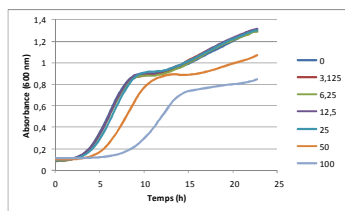
MES



DCA



PDA



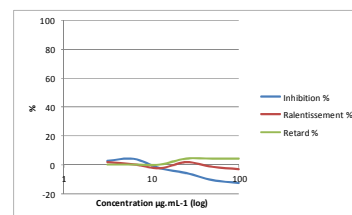
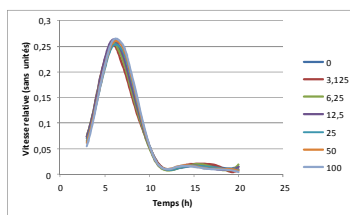
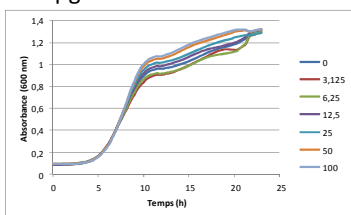
V. gigantis

Courbes de croissance brutes de la souche incubée avec une concentration d'extrait de 0 à 100 µg.mL⁻¹

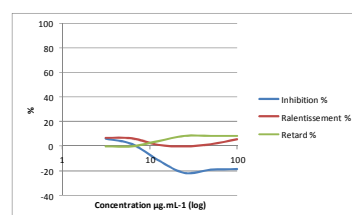
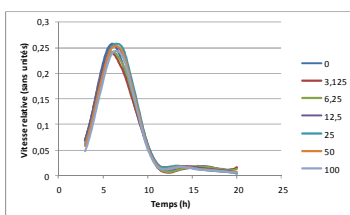
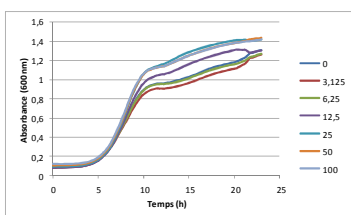
Transformation des données en vitesses de croissance relatives

Paramètres finaux d'interprétation

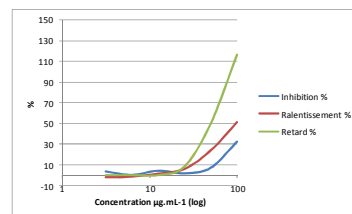
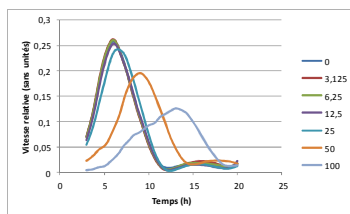
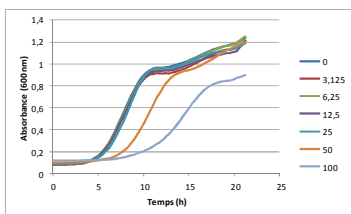
CYA



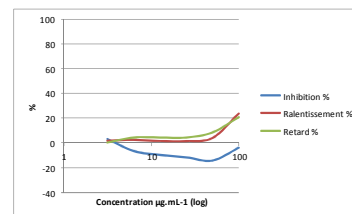
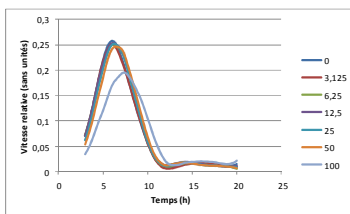
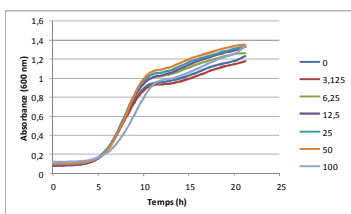
YES



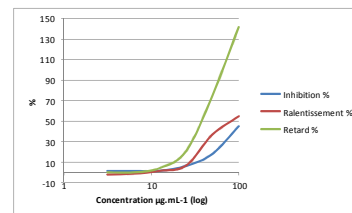
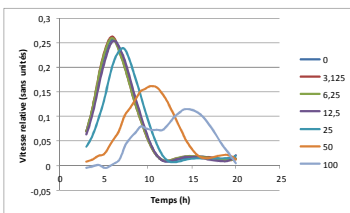
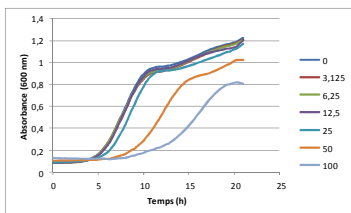
MEA



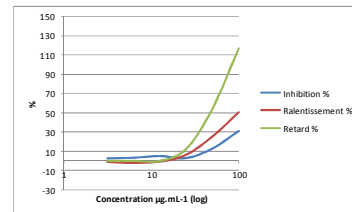
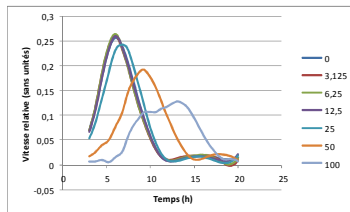
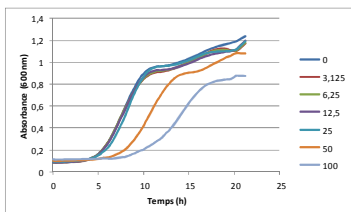
MES



DCA



PDA



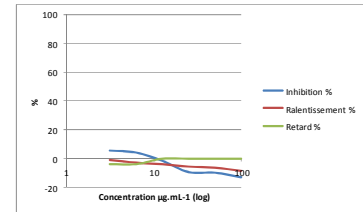
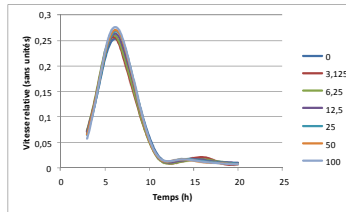
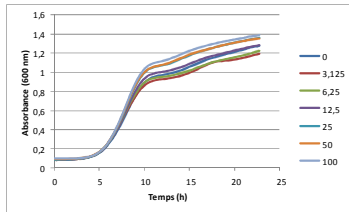
V. mytili

Courbes de croissance brutes de la souche incubée avec une concentration d'extrait de 0 à 100 µg.mL⁻¹

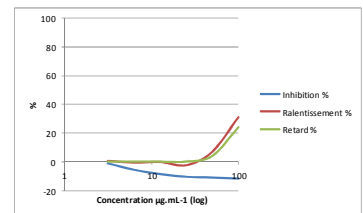
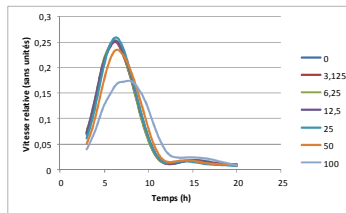
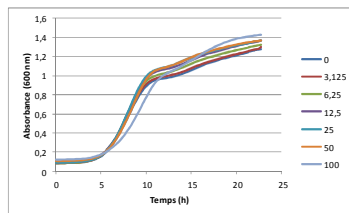
Transformation des données en vitesses de croissance relatives

Paramètres finaux d'interprétation

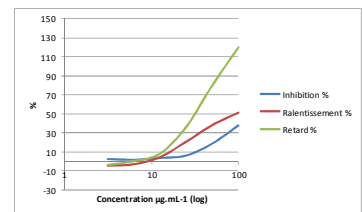
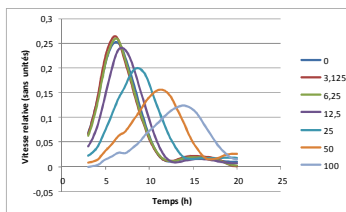
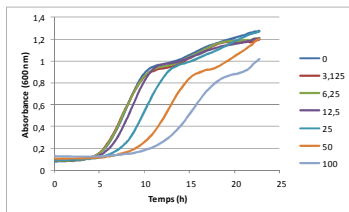
CYA



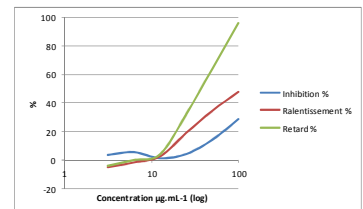
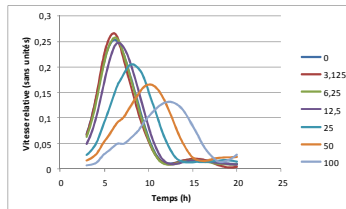
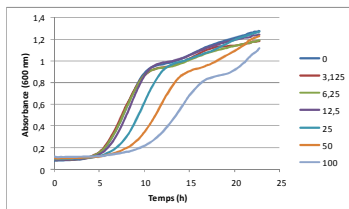
MES



DCA



PDA

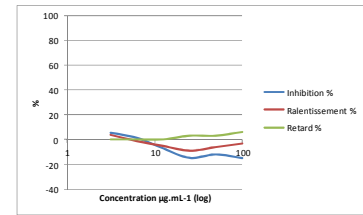
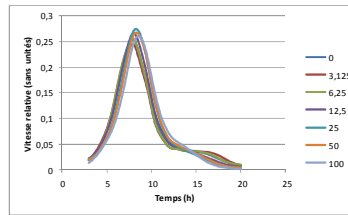
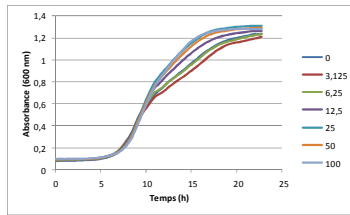
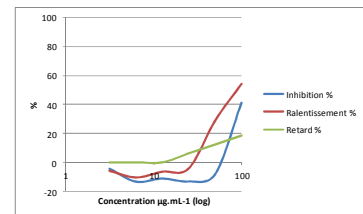
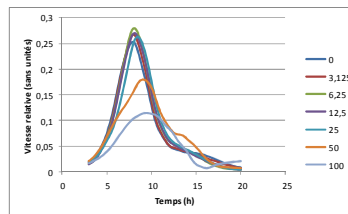
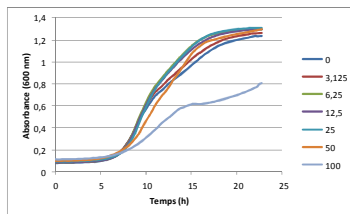
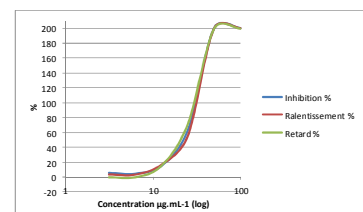
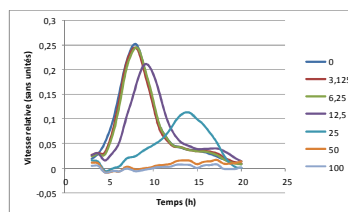
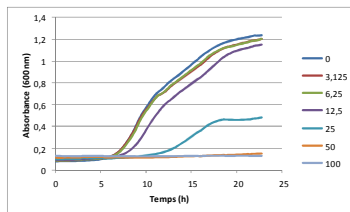
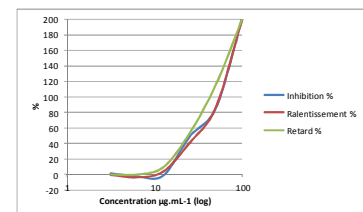
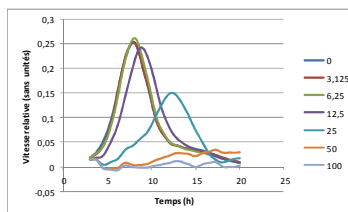
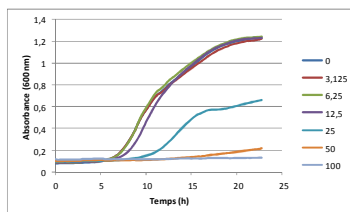


V. rotiferianus

Courbes de croissance brutes de la souche incubée avec une concentration d'extrait de 0 à 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

Transformation des données en vitesses de croissance relatives

Paramètres finaux d'interprétation

CYA**MES****DCA****PDA**

*« Le cœur battant de la science se trouve non pas tant dans les découvertes déjà réalisées que dans les régions incertaines où nous avançons si souvent dans un curieux désaccord », disait le physicien Brian Greene.
Et Richard Feynman, un autre physicien : « Ce qui n'est pas entouré d'incertitude ne peut être la vérité ».*

*C'est dans l'ombre de cette incertitude que peuvent se côtoyer sans s'effacer et avancer ensemble la lumière que projette ce qui nous fait humain.
A la découverte sans cesse nouvelle de ce que nous sommes et qui nous a fait naître.*

*C'est dans l'ombre de cette incertitude que peut persister la sensation d'un manque sans lequel il n'est pas d'émerveillement.
Pas de questionnement.
Pas de véritable découverte.
Pas de première fois.*

*« La fin est l'endroit d'où nous partons, disait T.S. Eliot.
Et la fin de toutes nos explorations
Sera d'arriver à l'endroit d'où nous sommes partis
Et de connaître le lieu pour la première fois »*

Jean Claude Ameisen

Evaluation d'une suite de bio-essais pour la détection et l'étude de composés lipophiles de micro-organismes marins issus de mollusques bivalves et de leur environnement

Résumé

Ce travail de thèse s'est inscrit dans un contexte d'évaluation de la salubrité des mollusques bivalves de consommation. Ces organismes peuvent en effet accumuler dans leur glande digestive des phycotoxines en concentrations importantes, pouvant induire des intoxications chez les personnes consommant ces bivalves contaminés. Afin d'assurer la protection des consommateurs, les toxines réglementées sont recherchées dans les coquillages par techniques physico-chimiques. En parallèle, les toxines émergentes, potentiellement produites par d'autres organismes que les micro-algues tels que les micromycètes, peuvent être surveillées par l'utilisation du test de toxicité aigüe sur souris. Cependant, ce bio-essai présente de très nombreux inconvénients, notamment éthiques et méthodologiques. Ainsi, l'objectif de ce travail était d'étudier la capacité d'une suite de bio-essais alternatifs à détecter des toxines lipophiles. Cette suite consistait en trois types de tests : cytotoxicité sur cellules KB, activité sur larves de diptères, et activités antibactériennes sur bactéries marines. Ces tests ont dans un premier temps été adaptés à des protocoles de routine, puis leur périmètre de détection a été évalué à différents niveaux de complexité de la matrice : toxine lipophile pure connue ou émergente, extrait brut de micro-algue ou micromycète producteur de toxine, et matrices de bivalves dopées. Les trois tests se sont révélés être complémentaires dans leurs champs de détection, et une démarche pour leur mise en place a pu être proposée.

Mots-clés : cytotoxicité, larves de diptères, activité antibactérienne, toxines lipophiles, micro-algues, dinoflagellés, micromycètes, *Penicillium*, acide okadaïque, azaspiracide, pinnatoxine G, *Vulcanodinium rugosum*, *Prorocentrum lima*, *Azadinium spinosum*, *Beauveria brongniartii*

Evaluation of a suite of bioassays to detect lipophilic compounds from marine microorganisms in bivalve molluscs and their environment

Abstract

The context of this study was the assessment of the safety of edible bivalve molluscs. Bivalve can indeed accumulate high concentrations of phycotoxins into their hepatopancreas, potentially leading to human intoxication outbreaks after consumption of such contaminated bivalves. In order to ensure the protection of shellfish consumers, regulated toxins are monitored using physico-chemical techniques. In parallel, emerging toxins, that can be putatively produced by microalgae or marine fungi, are monitored using the intraperitoneal mouse bioassay. However, this bioassay suffers ethical and methodological drawbacks. Thus, the objective of this work was to assess the ability of a bioassay suite to detect lipophilic toxins. This suite was composed of three types of assays: cytotoxicity on KB cells, a bioassay on diptera larvae and antibacterial activity on marine bacteria. These bioassays were first adapted to routine protocols, subsequently their detection perimeter was evaluated at different levels of matrix complexity: known or emerging pure toxin, crude extract of microorganisms producing the toxin, and spiked shellfish matrices. These three bioassays exhibited a complementary scope of detection, and an approach for their implementation was proposed.

Keywords: cytotoxicity, diptera larvae, antibacterial activity, lipophilic toxins, microalgae, dinoflagellates, marine fungi, *Penicillium*, okadaic acid, azaspiracid, pinnatoxin G, *Vulcanodinium rugosum*, *Azadinium spinosum*, *Prorocentrum lima*, *Beauveria brongniartii*