

APPEL À PROJETS RECHERCHE

REGION DES PAYS DE LA LOIRE

COLNACOQ

Composés lipophiles naturels dans l'environnement des coquillages

Philipp Hess¹,

Marie Geiger^{1,2}, Solène Brochard^{1,2}, Thomas Leprêtre^{1,2}, Valérie Fessard³, Jean-Philippe Antignac⁴, Jacques Dupont⁵, Véronique Séchet¹, Faustine Vanel¹, Florence Mondeguer¹, Fabienne Hervé¹, Sabrina Leborgne⁴, Gwenaëlle Deslanglois³, Lindsey Marshall^{1,5}, Lucy Rounds^{1,2}, Yann Guitton^{1,2}, Zouher Amzil¹, Olivier Grovel², Nicolas Ruiz², Yves-François Pouchus²

¹ Ifremer, Laboratoire Phycotoxines, Nantes

² Université de Nantes, Laboratoire Mer Molécules Santé, Nantes

³ ANSES, Unité Toxicologie des Contaminants, Fougères

⁴ ONIRIS, Laberca, Nantes

⁵ Ifremer, LNR Contaminations Microbiologiques des Mollusques Bivalves

Rapport final
27 février 2015

1. Identification du projet

Acronyme du projet	COLNACOQ
Titre du projet	Composés lipophiles naturels dans l'environnement des coquillages
Coordinateur du projet (société/organisme)	Ifremer
Période du projet (date de début – date de fin)	2009 - 2013
Site web du projet, le cas échéant	

Rédacteur de ce rapport	
Civilité, prénom, nom	M. Philipp HESS
Téléphone	02 40 37 42 57
Adresse électronique	Philipp.hess@ifremer.fr
Date de rédaction	27/02/2015

Liste des partenaires présents à la fin du projet (société/organisme et responsable scientifique)	Coordinateur : Ifremer, Laboratoire Phycotoxines et Partenaire principal : Université de Nantes, Laboratoire Mer Molécules Santé Partenaires associés : Oniris, Laberca (Nantes, France) ; Anses, Unité Toxicologie des contaminants (Fougères, France)
---------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

2. Résumé grand public (1 page max)

Cette étude s'est inscrite dans un contexte d'évaluation de la salubrité des mollusques bivalves destinés à la consommation humaine. Ces organismes peuvent en effet accumuler des toxines, en particulier de microalgues, en concentrations importantes, pouvant induire des intoxications chez les personnes les consommant. 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 telles que les micromycètes, peuvent être détectées par l'utilisation du test de toxicité aiguë sur souris. Cependant, ce bio-essai présente de très nombreux inconvénients, notamment éthiques et méthodologiques.

C'est pourquoi une suite de bio-essais miniaturisés a été développée en utilisant trois types de tests : cytotoxicité sur cellules KB, la toxicité aiguë 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 de micromycète producteur de toxine, et matrices de bivalves dopées par des toxines. 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.

Une douzaine de souches de microalgues et 24 souches de micromycètes ont été cultivées et testées avec la suite de bio-essais. Pour certaines souches de micro-algues et de micromycètes de nouveaux composés ont pu être mis en évidence. En s'appuyant sur des techniques de spectrométrie de masse haute résolution, des exercices de dérégulation ont été entrepris pour deux organismes en particulier : le dinoflagellé *Vulcanodinium rugosum* et le micromycète *Beauveria brongniartii*.

La procédure développée a été validée pour la matrice coquillage et pourra de ce fait être utilisée dans le cadre de recherche de composés toxiques dans cette matrice, notamment dans les dispositifs nationaux de vigilance alimentaire.

Mots-clés : cytotoxicité, toxicité sur larves de diptères, activité antibactérienne, bactéries marines, toxines lipophiles, micro-algues, dinoflagellés, micromycètes, *Penicillium*, acide okadaïque, azaspiracide, pinnatoxine G, *Vulcanodinium rugosum*, *Prorocentrum lima*, *Azadinium spinosum*, *Beauveria brongniartii*

3. Rappel succinct du contexte et des objectifs du projet (1 page max)

De par leur nature de filtreurs, les mollusques bivalves ingèrent de nombreuses microalgues marines et accumulent leurs métabolites secondaires. D'autres composés potentiellement bioactifs s'accumulent dans les bivalves peuvent provenir des bactéries associées avec ces bivalves et leur nourriture ou encore d'organismes physiquement proches de l'habitat écologique des bivalves, par exemple des champignons. La totalité des composés bioaccumulés dans les bivalves reste largement inconnue; néanmoins, un certain nombre de composés ont été identifiés suite aux intoxications de consommateurs de coquillages contenant notamment des toxines de micro-algues (acide okadaïque, acide domoïque, azaspiracides, brevetoxines et saxitoxines). Le test officiel utilisé pour la protection du consommateur était le test souris, test de toxicité globale. En plus de ces composés connus pour causer des maladies, on a découvert dans les coquillages d'autres groupes de composés toxiques mais qui n'ont pas encore provoqué d'intoxications aiguës chez les consommateurs (imines cycliques, yessotoxines, spirolides), mais qui étaient toutefois détectés par les tests souris du fait de leur bioactivité *in vivo* chez ces animaux. Or, la chimie médicinale s'intéresse à priori à toute molécule bioactive qu'elle soit considérée toxique ou non dans un autre contexte de valorisation.

Le projet COLNACOQ avait pour objectif principal d'identifier les différents groupes de composés bioactifs accumulés dans les bivalves, en considérant non seulement l'aspect risque sanitaire mais aussi l'intérêt potentiel de ces composés du point de vue pharmaceutique. C'est pourquoi des outils adaptés à la caractérisation de paramètres pharmaceutiques de ces molécules, tels que leur taille moléculaire, leur lipophilicité et leur capacité à traverser des membranes biologiques, ont été utilisés. Les objectifs suivants ont été spécifiés :

1. Développement d'une suite de bio-essais primaires adapté au contexte de la bio-découverte de composés lipophiles naturels dans les coquillages (tests de cytotoxicité, tests antibactériens et de toxicité aux larves d'insecte)
2. Développement d'un procédé d'isolement préparatif et de purification par bio-suivi pour les composés lipophiles en utilisant des techniques caractérisant les propriétés pharmacologiques des produits isolés
3. Culture de micro-organismes échantillonnés dans les eaux et sédiments de site de production conchylicole
4. Identification des molécules chimiques inconnues produites par ces organismes microbiens en culture, en utilisant des techniques de spectrométrie de masse à haute résolution et résonance magnétique nucléaire
5. Déréplication de composés bioactifs marins connus provenant des microalgues et des champignons dans l'investigation des toxicités atypiques rencontrées dans les coquillages

4. Bilan de la mise en œuvre du projet : dates clés, gouvernance et animation, implication des partenaires, acquisition d'équipements lourds, éventuels décalages avec le projet initial... (2 pages)

Durée du projet

Le projet avait été initialement conçu sur 3 ans (36 mois). Cette durée a été dépassée significativement (environ d'une année), essentiellement dû au dépassement de la durée de la thèse de doctorat intégrée dans le projet. La thèse de doctorat a débuté le 1/11/2009 et a été soutenue le 25/09/2013.

Période des dépenses

Le budget pour ce projet a été voté et approuvé à la Commission Permanente du 28/9/2009. Toutes les dépenses du projet ont été effectuées sur la période 2009 – 2013.

Gestion du projet

La gestion scientifique du projet a été assurée par Philipp Hess. Les tâches de gestion comprenaient :

1. Le pilotage général du projet et les communications entre partenaires
2. L'organisation des réunions « Assemblées Générales » de projet (10/06/2010 et 10/07/2012)
3. Les recrutements (1 doctorant, 3 CDD, 2 stagiaires M2, 1 stagiaire M1, 2 stagiaires ERASMUS)
4. La codirection de la thèse de doctorat (suivi journalier, trimestriel et annuel)
5. Le suivi budgétaire (conventions de reversement, allocations annuelles, suivi des dépenses)
6. La diffusion des résultats
7. La rédaction du rapport final.

Pour la gestion financière, P. Hess

Recrutements

Une doctorante a été recrutée par l'Ifremer en début du projet (1/11/2009). Deux personnels techniques en été recrutés en CDD pour une année chaque par l'Université de Nantes et un technicien pour un mois à l'Ifremer. Les deux stagiaires M2 ont été recrutés par les partenaires associés (Laberca et Anses). Un stagiaire M1 avait été recruté à l'Ifremer pour une durée de 6 mois. L'accueil des deux stagiaires ERASMUS a été initié par l'Ifremer, une a été accueillie à l'Ifremer alors que l'autre a été accueillie à l'Université de Nantes. Des conventions d'accueils ont été préparées pour les CDD recruté à l'Université de Nantes afin de pouvoir les accueillir à l'Ifremer et faciliter la collaboration effective.

Implication des partenaires

Les deux partenaires principaux (Ifremer et Université de Nantes) ont été pleinement impliqués dans la conduite du projet. La thèse de doctorat, qui était une pierre « clé-de-voute » de ce projet, a été codirigée par Yves-François Pouchus (Université de Nantes) et Philipp Hess (Ifremer). La doctorante, Marie Geiger a passé la première année de sa thèse quasi-exclusivement à l'Ifremer alors que le restant de son temps rémunéré était à peu près équitablement partagé entre les deux instituts principaux.

Les deux partenaires associés « locaux » étaient le Laberca (ONIRIS) et l'Unité de Toxicologie des Aliments (ANSES, Fougères). Chacun de ces deux partenaires ont collaboré avec l'Ifremer à travers un stage de M2, tel que prévu au début du projet. La stagiaire recrutée au Laberca travaillait en parallèle à la thèse de doctorat et a donné lieu à une publication (publication numéro 1° dans l'annexe 1). La stagiaire recrutée à l'Anses travaillait en directe collaboration avec la doctorante M. Geiger ; son travail a donné lieu à la publication numéro 2° de l'annexe 1.

Des deux partenaires internationaux prévus, l'Université Federico II de Naples était représentée par la Professeur Patrizia Ciminiello à la première réunion de projet en 2010. En plus de son animation par présentation orale, elle a participé aux discussions alimentant les démarches de recherches à suivre. De plus, sa venue a facilité

l'établissement d'un contact durable à travers l'échange d'étudiants via le mécanisme ERASMUS. Le deuxième partenaire associé prévu à l'international était le National Cancer Institute aux Etats-Unis. Malheureusement, son représentant, David Newman, n'était pas disponible aux dates proposées pour les réunions en 2010. Aussi, il était difficile d'établir une relation de travail durant le projet.

Différents autres partenaires, non-prévus initialement, ont été contactés durant le projet. Notamment, une collaboration existante avec le *National Research Council Canada* à Halifax, Nouvelle Ecosse, a été productive pour ce projet afin d'obtenir des toxines algales pures en grande quantité (1 mg d'acide okadaïque). Un accord d'échange pour ce matériau a été formalisé et facilité la conduite du projet. Un deuxième collaborateur non-prévu a été contacté (Dr. Michael Twiner, University of Michigan, E.U.). Un stage avait été convenu mais malheureusement pas conduit durant le projet à cause de l'indisponibilité de la doctorante Ifremer.

La partenariat avec d'autres équipes Ifremer n'avait pas été explicité au dépôt du projet mais a eu lieu pour la collecte d'échantillon à Arcachon et à Ingril (lagune méditerranéenne). La collaboration avec le Laboratoire Environnement Ressource de l'Ifremer à Sète a permis d'identifier un composé nouveau impliqué dans les toxicités atypiques observées à Ingril, la pinnatoxine-G. Ce travail a donné lieu à une publication (numéro 4° dans l'annexe 1).

Délais par rapport au planning initial

Des conseils fournis par Jacques Dupont du laboratoire national de référence sur les contaminations microbiologiques des coquillages (Ifremer Nantes) et une visite de M. Geiger à l'Anses Fougère d'une semaine en première année ont facilité la mise en place et l'évaluation des bio-essais sur le modèle d'activité antibactérienne, une technique qui n'était pas en place aux laboratoires partenaires principaux. Cette technique s'est montrée finalement peu probante pour les métabolites algaux mais très révélatrice pour les métabolites fongiques. Le temps du développement pour cette technique a été sous-estimé et a contribué aux retards accumulés dans le projet et la thèse. Un stage de 3 mois aux US avait été prévu pour la doctorante afin de mieux valoriser ses développements sur les techniques de cytotoxicité. Malheureusement, la doctorante n'était pas disposée au voyage à deux reprises, malgré son intérêt initial déclaré pour cette opportunité. Ce contretemps a également contribué aux délais engendrés.

Avec du recul de gestion de projet, il n'était pas approprié de concevoir un projet de cette envergure pour 36 mois seulement car la thèse de doctorat dans les meilleurs délais dure déjà 36 mois.

Diffusion des résultats

Les résultats ont été diffusés de manières différentes :

- a) publication dans des revue à comité de lecture (4)
- b) présentations orales (7) à des conférences nationales (3) et internationales (4)
- c) présentations par affiches (6) à des conférences nationales (4) et internationales (2)
- d) résumés dans revues internationales référencées (2)
- e) rapports de projet (2)
- f) Mémoire de thèse de doctorat (1)

Ces publications sont ou seront disponibles dans Archimer, les archives de l'Ifremer (publiquement accessible).

En plus, un portrait de ce projet est disponible sur le site web du GdR PHYCOTOX afin d'avoir une trace web regroupé du projet au lien : <http://www.phycotox.fr/decouvrir/projets-completes/colnacoq.html>

5. Bilan financier et humain : dépenses réalisées, recrutements (cf. tableaux), cofinancements obtenus

Suite à notre demande initiale à hauteur de 299 750€, le Conseil Régional des Pays de la Loire a accordé au projet COLNACOQ une subvention de 269 775€ pour une dépense subventionnable à hauteur de 344 063€ TTC.

Comme le montre le tableau 2, le total de la dépense réalisée s'élève à 349 998,79€.

Une feuille Excel (annexe 2, envoyé séparément) explicite le détail des dépenses pour votre examen approfondi.

Le personnel Ifremer permanent a dépensé plus que 1831 h sur ce projet, soit nettement plus qu'une année personne. Le personnel supplémentaire pour ce projet consistait essentiellement en une doctorante (36 mois/personne, plus 1 mois/personne en post-doctorat) et deux CDD d'une année chacun.

Tableau 1 : récapitulatif des équipements lourds acquis dans le cadre du projet.

Nature de l'équipement lourd	Propriétaire / Emplacement	« Label » éventuel	Coût global	Conditions d'accès
s/o				

Tableau 2 : récapitulatif des dépenses réalisées, par partenaire, dans le cadre du projet.

Laboratoire	Etablissement	Subvention prévue (INV.)	Subvention réalisée (INV.)	Subvention prévue (FONCT.)	Subvention réalisée (FONCT.)
	Université de Nantes	25 000	27 955,14	74 700	118 268,59
	ANSES	-	-	3 000	3 000,00
	ONIRIS	-	-	10 300	17 350,74
	IFREMER	25 000	48 137,09	20 500	211 379,46

Tableau 3 : récapitulatif des recrutements réalisés dans le cadre du projet.

Type de support	Nom du bénéficiaire	Date démarrage	Durée	Labo accueil 1	Labo accueil 2	Devenir professionnel
thèse	Marie GEIGER	01/11/09	3 an	IFREMER	Univ Nantes	CDI
post-doc			1 mois			
CDD Ingénieur ou technicien	LE ROY Evan LEPETRE Thomas BROCHARD Solène	02/2012 14/11/2011	1 mois 1 an 1 an	IFREMER Univ Nantes Univ Nantes	IFREMER IFREMER	Th. Leprêtre actuellement en CDD à l'IFREMER

6. Résultats scientifiques obtenus dans le projet (au moins 2 pages) – mettre en annexe les articles publiés (ou soumis)

Les résultats scientifiques de ce projet sont décrits en fonction des cinq objectifs formulés ci-dessus en section 3.

6.1. Développement d'une suite de bio-essais

Jusqu'en 2010, la méthode officielle de surveillance des toxines lipophiles dans les mollusques bivalves était le test de toxicité aigüe 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, ce test 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* – par exemple sur le rat - ou sur des modèles *in vitro*, comme les tests fonctionnels ou immunologiques. 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. Un des objectifs de ce projet était donc de développer et d'évaluer la capacité de différents types de bio-essais pour détecter des 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 de toxicité aigüe sur larves de diptères, et des tests d'activités antibactériennes essentiellement sur bactéries marines.

Le premier objectif était donc d'adapter ou de développer les protocoles de chacun des bio-essais pour pouvoir les appliquer à la détection de composés bio-actifs produits par des micro-organismes marins.

6.1.1. Le test de cytotoxicité sur cellules KB

La lignée KB, référencée à l'ATCC (American Type Culture Collection) sous le code CCL-17TM, a été isolée d'un cancer du nasopharynx d'un adulte. *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.

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, l'activité de plusieurs toxines a été évaluée sur de nombreuses lignées de cellules, tumorales ou saines. 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.

Le principe de ce test de cytotoxicité est classique : les cellules sont entretenues dans des flasques par repiquages toutes les 48 h, et les tests sont réalisés dans des micropaques 96 puits. Les puits sont d'abordensemencés avec des cellules, et après la croissance de celles-ci sont ajoutés les extraits ou composés purs à tester. Après incubation des cellules pendant un temps déterminé, la viabilité cellulaire est définie à l'aide d'un réactif permettant de mettre en évidence ou non la présence d'une respiration mitochondriale des cellules par une réaction colorée.

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 les protocoles ont été modifiés pour avoir différents temps d'incubation (24, 48 et 72 h), 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 cytostatique. Le protocole de révélation de la viabilité cellulaire a été également modifié et simplifié, par remplacement du MTT par du XTT. Ce changement de réactif permet un gain de temps ainsi qu'une diminution de la variabilité des résultats due à la manipulation et à la volatilité des réactifs. Un témoin positif a également été défini pour suivre la reproductibilité de ce test de cytotoxicité. Il s'agit de l'acide pénicillique, un composé fongique, dont la concentration inhibitrice 50 (CI50) doit se trouver entre 7,3 et 9,3 µg.mL⁻¹ pour que le test soit validé. La quantité de sérum de veau fœtal (SVF) rajouté dans le milieu a également été modifiée afin de voir si cela modifiait la sensibilité et la division cellulaire. Initialement de 5% dans le milieu de culture, le SVF a été testé à 10 et 20%. Les résultats montrant une sensibilité moins importante des cellules envers des composés cytotoxiques témoins, la concentration de 5% de SVF a été conservée tant pour l'entretien des cellules que pour la réalisation des tests de cytotoxicité.

6.1.2. Le test de neuro-activité sur larves de diptères

Ce test a été développé par Zlotkin en 1971 pour étudier le potentiel neurotoxique de venins de scorpions, et par la suite utilisé pour évaluer la neuro-activité de divers composés. Ainsi, au cours d'une précédente étude de l'équipe, il avait été démontré que des phycotoxines induisaient une paralysie des larves, démontrant un potentiel de ce test pour la détection de toxines. L'optimisation de ce test était donc tout à fait pertinente dans ce contexte.

Les organismes utilisés sont des larves de la mouche *Calliphora vomitoria* au stade larvaire III, précédant la forme définitive de l'insecte. Le système nerveux des larves est constitué d'une chaîne ganglionnaire composée de 3 ganglions thoraciques et d'une paire de ganglions par segment abdominal. Les nerfs irradient de cette chaîne ganglionnaire.

Les larves de diptères proviennent de la Verminière de l'Ouest, et le principe du test repose sur l'injection de la substance à tester au niveau de la partie ventrale postérieure de l'organisme, à l'aide d'une microseringue munie d'une aiguille hypodermique. Le comportement de chaque larve est ensuite observé pendant 10 min, et sont notées les phases d'immobilisation ou de déplacement.

Les mises au point de protocoles ont tout d'abord porté sur la définition d'un plus large panel de solvants compatibles avec ce bio-essai. Ceci permet d'augmenter le nombre de composés pouvant être testés, les problèmes de solubilisation étant récurrents dans la réalisation de tests biologiques. Les mises au point suivantes ont porté sur une définition plus précise et plus exhaustive des symptômes ou enchaînements de symptômes pouvant être rencontrés.

Par la suite, le périmètre de détection de ce test a également été défini de façon plus fine. Pour cela, des composés purs, connus pour être agonistes ou antagonistes de certains canaux et récepteurs, ont été testés sur larves. Il ressort de cette étude que les larves présentent une symptomatologie spécifique en présence de molécules présentant les mécanismes d'action suivants : antagoniste des récepteurs au GABA-A, antagoniste des récepteurs adrénergiques α , agoniste des récepteurs nicotiques à l'acétylcholine, agoniste des récepteurs muscariniques à l'acétylcholine ou encore agoniste des récepteurs au kaïnate. Il sera par la suite nécessaire de tester un plus grand nombre de composés, et de les tester en présence de matrices biologiques.

Un témoin positif a également pu être choisi : l'acide L-glutamique, induisant une paralysie partielle évoluant en totale à la concentration minimale de 11,9 mM.

6.1.3. Le test d'activité antibactérienne

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.

Afin de réaliser ces tests, 7 souches de bactéries ont été sélectionnées : 6 souches isolées du milieu marin, à savoir *Vibrio crassostreae*, *V. gigantis*, *V. mytili*, *V. rotiferianus*, *Carnobacterium piscicola*, *Lactococcus garvieae*, ainsi que la souche modèle *Escherichia coli*. 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.

Ces tests ont été entièrement développés au cours de ce travail. L'objectif était de réaliser ces tests en milieu liquide, sur microplaques, afin de pouvoir travailler à du plus haut débit qu'avec des protocoles d'antibiogrammes classiques. Ainsi pour chaque souche, les conditions de cultures ont du être définies : 5 milieux de cultures et 3 températures d'incubation ont été systématiquement testés, permettant de retenir les meilleures conditions de croissance. Les quatre souches de *Vibrio* ont donc été cultivées dans du BHI supplémenté à 2% en NaCl et à 20°C, *L. garvieae* et *E. coli* dans du BHI à 30°C, et *C. piscicola* dans du BHI à 20°C. Un appareil Bioscreen a été utilisé pour la réalisation de ces tests : c'est un incubateur et un lecteur de plaques, permettant de définir la courbe de croissance des organismes par lecture de l'absorbance à 600 nm. Sur chaque courbe ont ainsi pu être définis les paramètres suivants par rapport à une courbe témoin : une inhibition, un ralentissement ou encore un retard de la croissance.

Puis, pour chaque souche, la tolérance à différents solvants et agents de solubilisation a été réalisée, et un témoin positif représenté par un antibiotique classique a pu être choisi.

6.2 Procédés d'extraction et de purification

Différents procédés d'extraction et de purification ont été comparés pour les trois matrices majeures étudiées (micro-algues, micromycètes et coquillages).

Ainsi une extraction solide-liquide a été comparée avec une extraction solide-liquide-solide pour la microalgue *Vulcanodinium rugosum*. 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 (voir Tableau ci-dessous). 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.

	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

Au final, il n'a pas été possible d'harmoniser toutes les procédures pour toutes les matrices en un seul procédé. Ceci était essentiellement dû aux faits suivants :

- 1) Pour les micro-algues, il n'est pas nécessaire d'extraire le milieu de culture car il y a peu de substances extracellulaires. Ceci est très différent pour les micromycètes qui présentent beaucoup de composés extracellulaires.
- 2) La complexité de la matrice coquillage ainsi que la volonté de pouvoir comparer les extraits de coquillage avec le test souris ont nécessité un procédé d'extraction et de purification différent pour cette matrice.

6.3 Culture de micro-organismes

6.3.1 Culture de micro-algues

Treize souches de microalgues dont quatre productrices de toxines lipophiles et une productrice de toxines hydrophiles ont été cultivées en flacons de culture ou en bioréacteurs dans le laboratoire Phycotoxines.

Classe	Espèce	Souche	Toxines	Récolte	Type de culture
Peridineae	<i>Alexandrium ostenfeldii</i>	Ccmp 1773	Spirolides	A l'équilibre	Continu, photobioréacteur 100 L, milieu L ₁
	<i>Azadinium spinosum</i>	3D9	Azaspiracides	A l'équilibre	Continu, photobioréacteur 100 L, milieu K _{mod}
	<i>Azadinium obesum</i>	2E10	Non toxique	A l'équilibre	Continu, photobioréacteur 100 L, milieu K _{mod}
	<i>Prorocentrum lima</i>	PL4V	Acide okadaïque et analogues	35 jours	Batch ballon 10 L, milieu L1
	<i>Vulcanodinium rugosum</i>	IFR-VRU-01	Pinnatoxines	83 jours	Batch ballon 10 L, milieu L ₁
	<i>Alexandrium minutum</i>	AMBM89	Saxitoxine, gonyautoxines	A l'équilibre	Continu, photobioréacteur 100 L, milieu L1
	<i>Heterocapsa triquetra</i>			A l'équilibre	Continu, photobioréacteur 100 L, milieu f/2
Prymesiophyceae	<i>Tisochrysis lutea</i>	Tiso	Non toxique	7 jours	Continu, photobioréacteur 100 L, milieu f/2
Prasinophyceae	<i>Ostreococcus tauri</i>	H95		40 jours	ballon 10 L, milieu L1
Cryptophyceae	<i>Rhodomonas baltica</i>	RCC350		22 jours	ballon 10 L, milieu L1
	<i>Rhodomonas salina</i>	RCC 1506		22 jours	ballon 10 L, milieu L1
	<i>Non identifiée</i>	AC162		22 jours	ballon 10 L, milieu f/2
	<i>Non identifiée</i>	VFC1	22 jours	ballon 10 L, milieu f/2	

Toutes les souches ont été cultivées en eau de mer naturelle enrichie (milieux L₁, f/2 ou K_{mod}), à 18°C (excepté *Ostreococcus* et *Vulcanodinium*, cultivés à 22°C), avec une photopériode de 16L/8D, et une irradiance de 200 µmol m⁻² s⁻¹.

Les culots de microalgues ont été recueillis après centrifugation (3500g, 4°C, 20 min) pour les cultures en ballons, une étape préalable de filtration tangentielle (Sartorius) a été réalisée pour les bioréacteurs. Ces techniques de collecte de cellules avaient été mises en place au préalable.

La culture en batch, montrée ci-dessous sur la gauche en ballon de 10 L, est plus laborieuse du fait qu'il faut repiquer et diluer pour arriver à de grands volumes. La culture en mode continu, montré ci-dessous en réacteurs sériels de 100 L chaque est plus productive mais moins stable, donc difficile à maintenir à longue durée.



Fig. Culture en ballon pour *Vulcanodinium rugosum* et en bioréacteur pour *Alexandrium minutum*

A l'exception de *Vulcanodinium rugosum*, récemment isolé des eaux françaises (2011), tous les modes de culture avaient été optimisés lors d'études précédentes. Pour le dinoflagellé *Vulcanodinium* une étude d'optimisation de la croissance et de la production de toxines a été nécessaire. Cet organisme pélagique présente un cycle de vie particulier, mis en culture de très nombreuses cellules non-mobiles apparaissent, sécrètent du mucus et adhèrent fortement sur les parois des flacons de verre. Ce phénomène complique la collecte des cellules lors du processus d'extraction. L'influence des facteurs physiques (température, salinité) sur la cinétique de croissance a été testée ainsi que l'influence des sources d'azote (nitrates, urée) sur l'adhésion des cellules sur les parois de verre et la production de toxines par cet organisme. Si l'enrichissement du milieu en urée a favorisé la proportion de cellules mobiles, il a entraîné non seulement une baisse de la biomasse maximale obtenue dans les ballons mais également une baisse de la production de pinnatoxines par cellule.

6.3.2 Culture de micromycètes

Comme pour les cultures de micro-algues, un criblage d'un grand nombre de cultures (24) avait été effectué dans un premier temps. Les 24 souches de micromycètes étudiées initialement avaient tous été isolées au préalable dans l'environnement côtier des Pays de la Loire. Parmi ces souches (voir tableau ci-dessous), 14 avaient été isolées de bivalves, deux de l'eau de mer directement et huit à partir de sédiments.

Le tableau ci- dessous donne les 24 souches qui ont été examinées au cours du projet :

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	

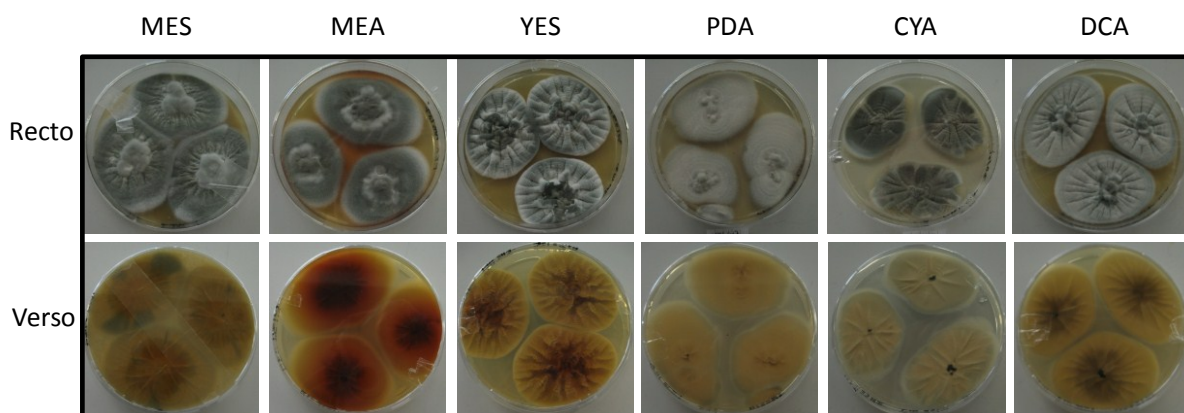
Par la suite sept souches de micromycètes sélectionnées parmi les vingt-quatre précédentes pour leur bio-activité ont été cultivées sur six milieux différents. Cinq des six milieux utilisés étaient des milieux classiques, alors que le sixième avait été développé spécialement pour cette étude. Ce sixième milieu avait été constitué à partir d'un extrait de moules afin de simuler l'apport de la matrice coquillage pour la croissance des micromycètes (voir composition des milieux dans le tableau ci-dessous).

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

Comme anticipé pour les micromycètes, les souches cultivées sur différents milieux donnent des profils métaboliques très différents. Ces différences sont déjà visible à l'œil nu, voir graphique ci-dessous pour la souche MMS417 (cultivée sur les 6 milieux décrits ci-dessus).

MMS 417



6.4 Identification des molécules chimiques produites par des organismes microbiens cultivables par criblage biologique et par techniques de spectrométrie de masse à haute résolution

6.4.1 Criblages avec tests biologiques

6.4.1.1 Microalgues toxiques

Test de cytotoxicité sur cellules KB

Screening des 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, 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. ostensfeldii*, 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).

Evaluation des seuils de toxicité de toxines et extraits bruts de micro-algues toxiques

Proocentrum lima et AO

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, ou encore révélation au MTT. 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. 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.

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. 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).

Azadinium spinosum et AZA1

Les toxines produites par *A. spinosum* ont fait l'objet de plusieurs études d'activité sur lignées cellulaires, 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. Cependant à 24 h la CI_{50} n'était pas encore atteinte, même à la concentration maximale de 100 µg.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.

Après 24 h d'incubation avec AZA1, les cellules KB n'ont présenté qu'une faible réduction de leur viabilité. 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.

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.

Evaluation biologique des effets de matrice des extraits de moules 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'extrait brut (EB) obtenu par extraction au méthanol, d'extrait purifié 1 (EP1) obtenu par partition liquide-liquide de EB dans du dichlorométhane/eau, et d'extrait purifié 2 obtenu par partition liquide-liquide méthanol aqueux/hexane de EP1, ont été testés sur cellules KB. 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 $1,54 \mu\text{g.mL}^{-1}$ éq_{EB} pour EP2. En tenant compte des facteurs d'extraction et de purification, la conversion de ces concentrations expérimentalement testées en équivalent hépatopancreas a donné les valeurs maximales 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.

Evaluation de la cytotoxicité de matrices de moules dopées

Les concentrations de $715 \mu\text{g.mL}^{-1}$ éq_{EB} pour EP1 et $1,54 \mu\text{g.mL}^{-1}$ éq_{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*. 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. 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 à 4 classes : *Azadinium obesum* (*Dinophyceae*), *Ostreosoccus tauri* (*Mamiellophyceae*), *Isochrysis galbana* (*Prymnesiophyceae*) et *Rhodomonas baltica* (*Cryptophyceae*). 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.

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 $715 \mu\text{g.mL}^{-1}$ éq_{EB} pour EP1 et $1,54 \mu\text{g.mL}^{-1}$ éq_{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.

Conclusion

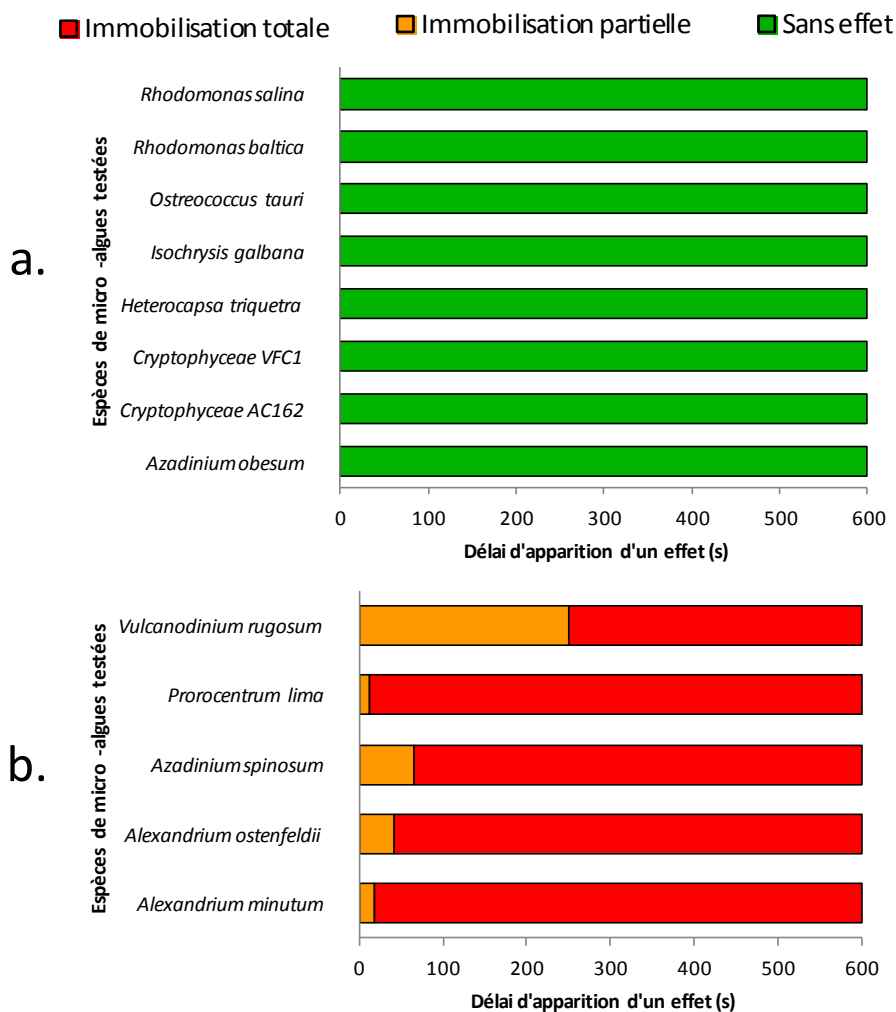
Les cellules KB ont présenté une tolérance intéressante aux matrices représentées par des glandes digestives de moules. Une légère interférence de cette matrice avec le test a été observée, avec une plus grande sensibilité du test envers les extraits bruts de micro-algues et les toxines en présence de 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 diminuée 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 (LD) de l'AZA1 en EP1 était de $2,9 \mu\text{g}_{AZA1} \cdot \text{kg}^{-1}_{\text{chair totale}}$, et de $1,6 \mu\text{g}_{AZA1} \cdot \text{kg}^{-1}_{\text{chair totale}}$ en EP2. Le test sur cellules KB présentait donc une plus faible sensibilité envers l'AO, dont la LD était de $218 \mu\text{g}_{AO} \cdot \text{kg}^{-1}_{\text{chair totale}}$ 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 $160 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 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 $160 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$. Le test sur cellules KB semble ainsi plus adapté à la détection de l'AZA1 qu'à la détection de l'AO.

Test de neuro-activité sur larves de diptères

Screening des 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. 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. La figure ci-dessous donne les résultats pour les différentes souches testées : (a) algues réputées non toxiques, (b) algues toxiques.



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. 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 toxiques n'induisent aucun effet chez les larves, même à la concentration importante de 100 mg.mL⁻¹.

Evaluation des seuils de toxicité de toxines et extraits bruts de micro-algues toxiques

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 mg.mL⁻¹ contre 12,5 mg.mL⁻¹ pour *A. spinosum*, soit une activité environ 30 fois plus importante.

Une gamme d'AO et AZA1 a été évaluée sur larves. L'AO a présenté une concentration minimale active (CMA) de 1 µg.mL⁻¹, avec observation d'une courbe dose-réponse, contre une absence d'activité observée pour AZA1 jusqu'à la concentration de 50 µg.mL⁻¹. L'effet neurologique induit par l'AO était de type partiel, rapidement suivi par une paralysie totale de la larve.

Etude des effets d'extraits de moules dopés

Dans le but d'étudier la possibilité d'utiliser le test de neuro-activité sur larves de diptères 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.

Evaluation biologique des effets de matrice des extraits de moules bruts et purifiés

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. 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 mg.mL⁻¹ éq_{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.

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 mg.mL⁻¹ éq_{EB}, et dopées avec une gamme d'extrait brut de *P. lima* et d'*A. spinosum*. 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.

Toxicités atypiques

Des glandes digestives lyophilisées de moules provenant du Bassin d'Arcachon et ayant montré une toxicité atypique avec le test de toxicité aigüe 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.

Conclusion

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.

Tests d'activités antibactériennes

La même démarche que précédemment a été suivie avec le test d'activité antibactérienne. Cependant, aucune activité n'a été retrouvée dans les divers extraits bruts de micro-algues toxiques. 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.

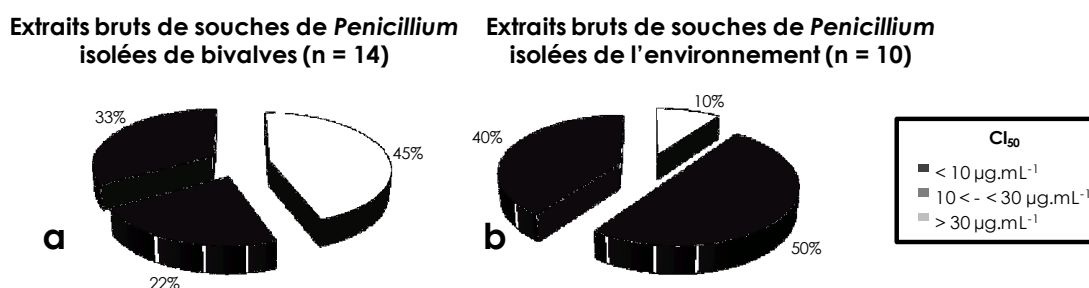
6.4.1.2 Micromycètes

Etude de la cytotoxicité de *Penicillium* sur cellules KB

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 (isolées de bivalves ou de l'environnement), ont été comparés. Le nombre d'extraits considérés comme inactifs ($CI_{50} > 30 \mu\text{g.mL}^{-1}$) 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 comme le montre la figure ci-dessous, avec 45% des souches présentant une $CI_{50} < 10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, 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, 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.



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

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

Les extraits obtenus à partir de ces différentes cultures ont été testés sur cellules KB. 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 « *One Strain Many Compounds* » (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 (milieu préparé avec l'extrait de moules) 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, 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.

Etude de l'activité de *Penicillium* sur larves de diptères

Dans un premier temps, il est intéressant de noter 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 (mycotoxine réglementée en milieu terrestre), ont tous induit une activité sur larves. Or la patuline a été montrée comme étant fortement toxique sur larves de diptères, 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.

Etude de l'activité antibactérienne de Penicillium

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 une 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).

A 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 CE₅₀ entre 20 et 30 µg.mL⁻¹. Cette activité semble être à la fois bactéricide et bactériostatique, car les CE₅₀ 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*. De nombreuses molécules déjà été décrites chez cette espèce [9] dont certaines sont connues pour présenter des activités antibactériennes, telles que : l'acide pénicillique ou encore les fructigénines.

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.

La souche MMS330 (*P. ubiquetum*) 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.

6.4.2 Criblages chimiques et dérégulation de composés bioactifs connus

6.4.2.1 Criblage de microalgues toxiques

Les caractères globaux et non ciblés du profilage métabolique sont une approche de choix pour découvrir de nouveaux biomarqueurs. Dans le cadre de la thèse de Marie Geiger, une prise d'empreinte métabolique a comparé une culture axénisée versus une culture non axénisée de la souche du dinoflagellé *Vulcanodinium rugosum* (IFR-VRU-011), producteur de Pinnatoxine G (PnTx-G). Pour ce faire dans une première étape, *V. rugosum* a été cultivé en ballon de 8L, en milieu L1 (Guillard et Hargraves, 1993), avec de l'eau de mer de Méditerranée filtrée (35 psu). Durant 41 jours la culture non axénique a été maintenue en salle à 22°C, sans oxygénation du milieu, 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.

Dans une deuxième étape, dans le but d'obtenir cette fois une culture IFR-VRU-011 axénique, un traitement antibiotique a été appliqué pendant 72 h. L'axénisation est réalisée par ajout, dans le milieu de culture, de 10 mL L⁻¹ d'une solution de pénicilline-streptomycine hybrid-maxTM (Sigma-Aldrich) contenant 10000 U de pénicilline et 10 mg mL⁻¹ de streptomycine dans 0,9% de NaCl. La culture est ensuite transférée dans un milieu frais, et pour l'analyse de cette culture axénique, 200 mL de culture seront prélevés 2 semaines après l'application du traitement antibiotique.

Les cellules de deux cultures, axénique et non axénique, sont décollées de leur support à l'aide de billes de verre, puis centrifugées (3500 g, 20 min, 4°C). Au final, une triple extraction méthanolique (5 mL) réalisée respectivement sur des culots de 5 g d'une pâte d'algue fraîche centrifugées pour la culture non axénique et de 276 mg pour *V. rugosum* axénique, donne les 2 extraits bruts sur lesquels on réalise l'analyse différentielle d'empreintes métaboliques par CL-SMHR (Chromatographie Liquide couplée à un Spectromètre de Masse Haute Résolution).

Le protocole de ce genre d'analyse commence à être bien standardisé au laboratoire Phycotoxines-Ifrermer. Sur des analyses toujours réalisées en triplicata, il est le suivant :

Pour un volume analysé de 5 μL , la séparation chromatographique est réalisée sur une colonne C₁₈ 100 Å Kinetex (1,7 μm , 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 de l'acide acétique aqueux 0,1% (A) et de l'acétonitrile à 0,1% d'acide acétique (B). Le gradient d'élution utilisé (A: B v / v) est le suivant: 95: 5 de 0 à 2,40 min; 75:25 à 4,50 min; 30:70 à 11 min; 0: 100 de 14 à 16,5 min; 95: 5 de 19 à 25 min. La détection des composés est réalisée avec un spectromètre de masse haute résolution Q-TOFI 6540 UHD (Agilent Technologies, Waldbronn, Allemagne) utilisé en mode full scan positif le long d'une fenêtre de m/z allant de 50 à 1700. 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. Pour maintenir une précision de la masse au long de l'analyse, une solution de référence contenant les ions de référence m/z 121.0508 et 922.0097 a été utilisée (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. Les spectres sont acquis à la fois en mode profil et centroïde avec la solution logiciel MassHunter Workstation Software (Agilent Technologies, version B.06).

Les empreintes métaboliques 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 6.0 (fig 1).

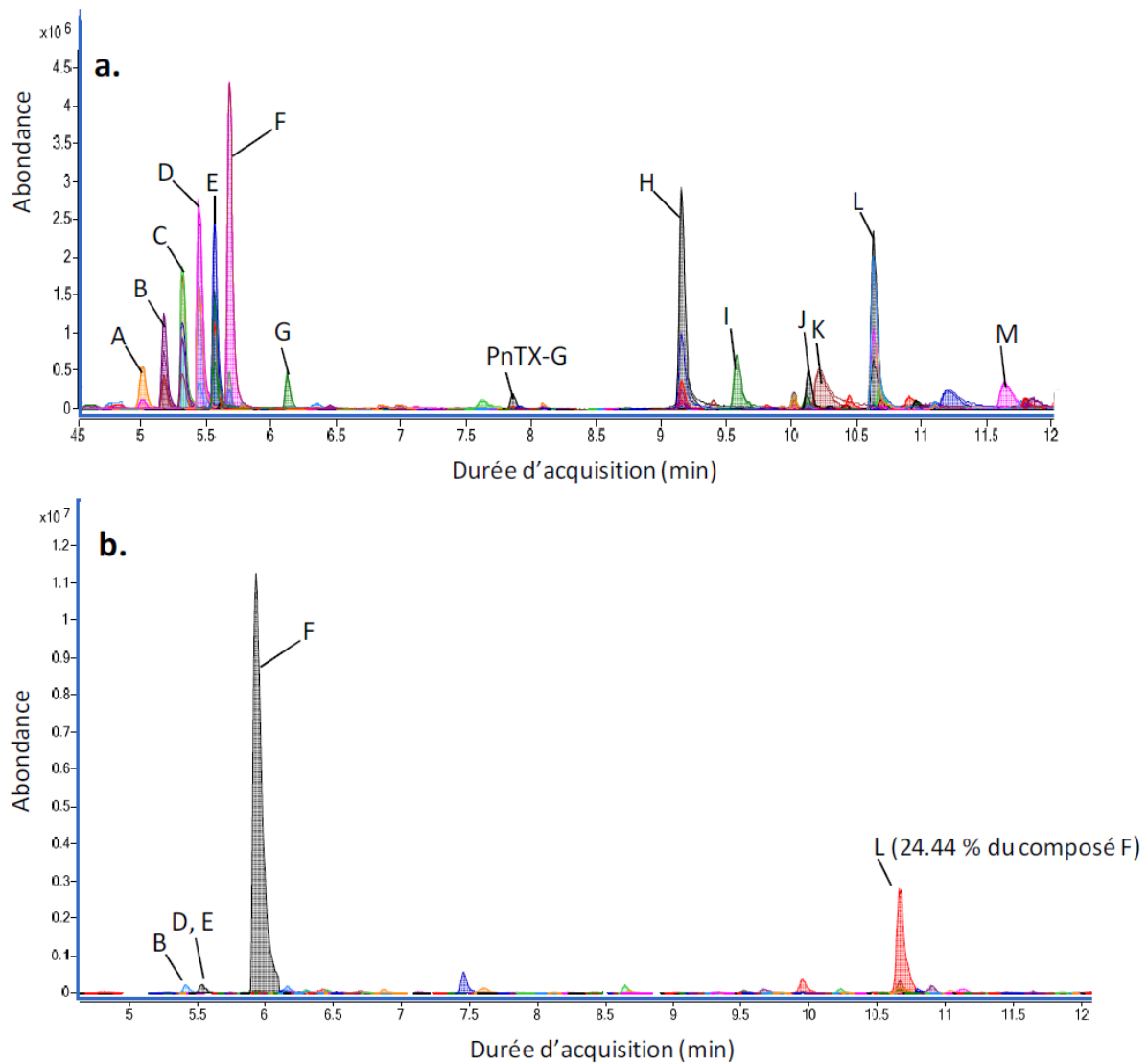
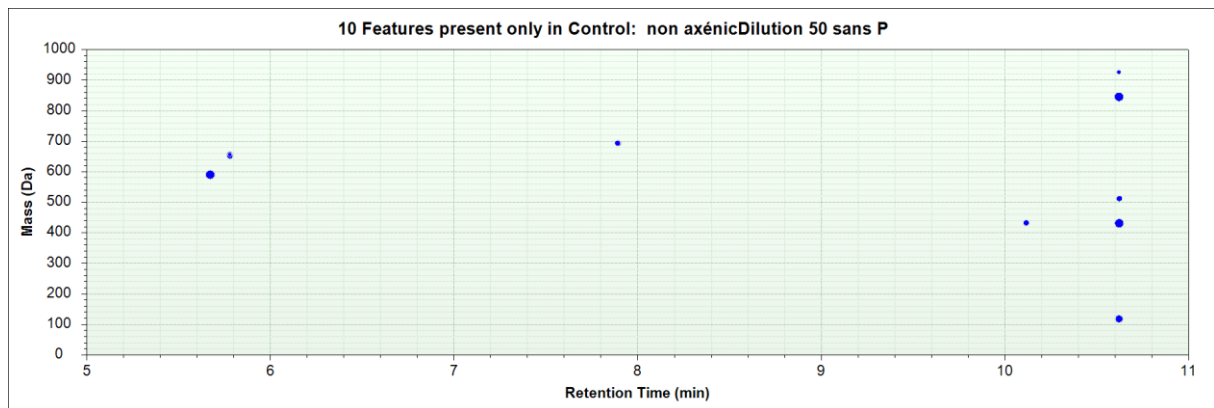


Figure 1 : Annotation des pics observés sur les chromatogrammes obtenus pour un extrait brut d'une culture axénique (a), et non-axénique de *V. rugosum* (b).

Les résultats ont ensuite été analysés à l'aide du logiciel MassProfiler (Agilent Technologies), (fig 2). Cet outil d'analyse différentielle permet de déterminer rapidement un facteur de changement dans les échantillons. Dans cet exemple selon un axe m/z vs R_t sont mis en évidence les composés (features) qui sont présents dans le premier groupe d'échantillons (non axénique), mais pas dans le deuxième groupe (axénique) d'échantillons.

a)



b)

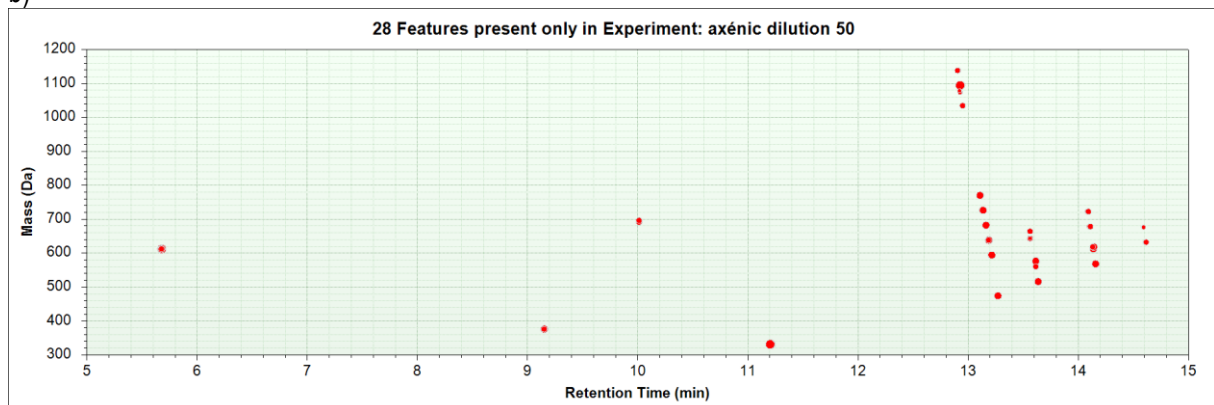


Figure 2 : le résultat d'analyse différentielle de profils : a) échantillon sans traitement antibiotique ; b) échantillon axénisé.

Enfin l'identification des composés a été réalisée à l'aide d'une base de données interne au laboratoire PHYC-Iframer, ainsi que la base de données MarinLitTM (Munro et Blunt) (tab 1).

A la lecture des résultats du tableau 1, on constate que la présence de la PnTX-G est 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. Tandis que la base de données MarinLitTM propose pour le composé le plus abondant de l'extrait brut (F), qui correspondait à la formule $C_{23}H_{31}NO_{53}$ 3 possibles candidats : nakijiquinone A ou Ncarboxy-methylsmenospongine ou stachybotrin A. Néanmoins en juin 2013, ce composé a été élucidé comme une nouvelle molécule : la portimine, $C_{23}H_{31}NO_{53}$, de masse $[(M+H)^+]$ 402.2275 (Selwood & al, 2013). Remarquons que 5 autres pics ont pu être annotés de façon putative, mais la majorité des pics n'a pu être identifiée.

Tableau 1 : Annotation putative des pics observés sur le chromatogramme (Figure 1) d'un extrait brut d'une culture axénique de *V. rugosum*.

Peak	Experimental <i>m/z</i> [M+H] ⁺		abondance relative du composé F (%)		Annotation tentative avec la base de données MarineLit™	Score (DB)		Diff (DB, ppm)	
	Medium (N=3)	SD	Medium (N=3)	SD		Moyenne (N=3)	SD	Medium (N=3)	SD
A	393.2102	0.0001	16.9	16.0	unknown	-	-	-	-
B	437.2362	0.0002	26.6	26.0	unknown	-	-	-	-
	432.2810	0.0002	9.8	9.6	unknown	-	-	-	-
C	481.2622	0.0001	38.3	37.8	unknown	-	-	-	-
	476.3067	0.0001	19.8	18.0	unknown	-	-	-	-
D	520.3331	0.0002	34.4	33.5	unknown	-	-	-	-
	525.2886	0.0002	60.8	59.0	unknown	-	-	-	-
E	564.3593	0.0001	32.8	36.9	unknown	-	-	-	-
	569.3147	0.0001	53.3	61.1	unknown	-	-	-	-
F	613.3408	0.0003	9.0	12.9	unknown	-	-	-	-
	402.2281	0.0003	100.0	100.0	Nakijiquinone A	98.14	1.34	-1.38	0.56
					N-carboxy-methyl-smenospongine				
Stachybotrin									
G	370.2748	0.0000	10.8	0.2	N1-methyl-xestamine D	99.44	0.03	-0.84	0.02
PnTX-G	694.4664	0.0003	1.1	0.1	-	-	-	-	-
H	343.2958	0.0001	66.0	1.9	unknown	-	-	-	-
	240.2327	0.0001	8.7	0.5	2-hydroxypentadecanoic acid	98.13	0.44	-1.60	0.34
I	272.2589	0.0001	20.5	0.7	2-amino-1,3,4-hexadecanetriol; (2S,3R,4R)-form	99.11	0.21	-1.18	0.14
J	692.3843	0.0003	4.0	0.4	unknown	-	-	-	-
K	286.1444	0.0002	11.7	0.8	Solanapyrone B; 7 α -Hydroxy, 4'-demethoxy, 4'-amino, 1-aldehyde	99.03	0.71	-1.12	0.53
L	453.1680	0.0001	61.2	0.1	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	9.0	0.5	unknown	-	-	-	-
M	402.3575	0.0001	7.0	0.3	unknown	-	-	-	-

A l'identique, l'extrait résultant de la souche non axénique a aussi été analysé et les composés déjà trouvés dans l'extrait axénique ont été recherchés. De même que pour l'extrait axénique, le composé F s'est trouvé être le composé majoritaire. Les pics B, D et E ont également été retrouvés mais en plus 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.

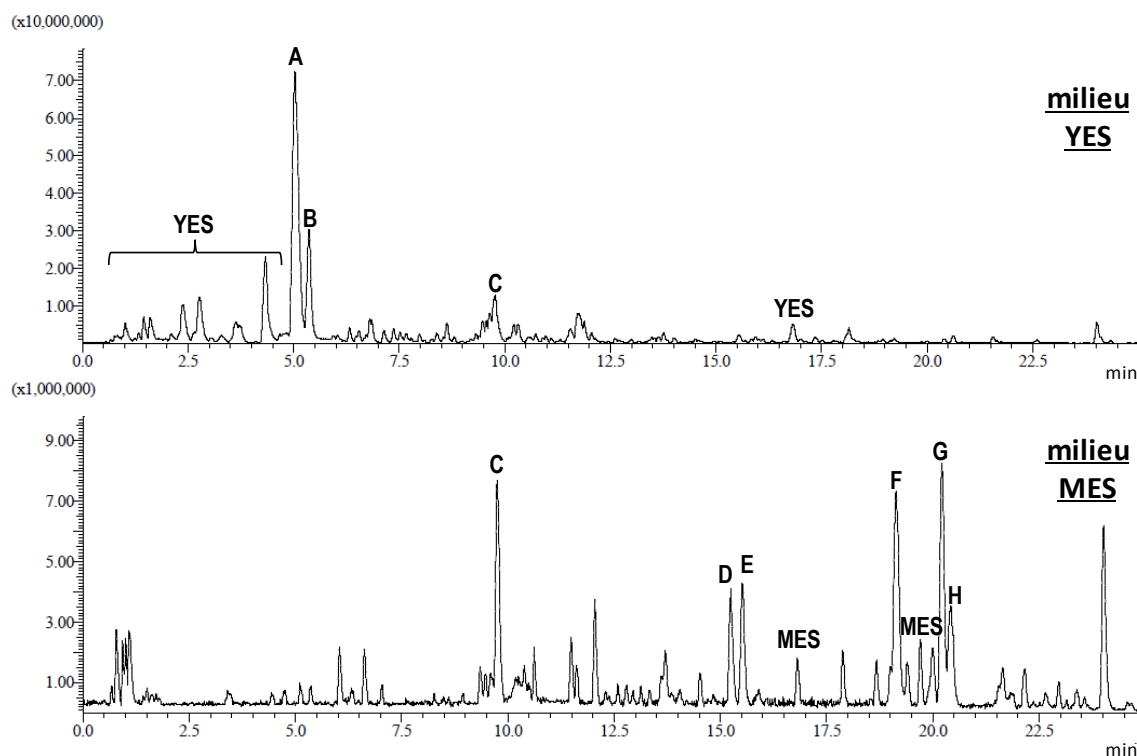
6.4.2.2 Micromycètes

Déréplication d'extraits bruts bioactifs

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.

Déréplication de la souche MMS266

Les extraits de MMS266 obtenus sur les milieux MES (à base d'extrait de moules) et YES (à base d'extrait de levures), et qui présentaient des activités cytotoxiques différentes, ont été analysés par CLHP-UV/DAD-HRSM/SM, et ont présenté des profils chromatographiques assez différents :



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. Curieusement, aucun des alcaloïdes indoliques cytotoxiques caractéristiques de cette espèce, tels que les communésines ou les chaetoglobosines, n'ont pu être identifiés.

Quatre des pics les plus abondants de l'extrait MES 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. 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*. 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.

Déréplication de la souche MMS417

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. 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, un métabolite déjà isolé de *Penicillium* sp., ou encore comme la pestalrone B, isolée initialement de *Pestalotiopsis karstenii*. 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'hydroypestalotine plutôt que la pestalrone A, car l'hydroypestalotine 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 LLP880y et une pyran-2-one, qui sont des dérivés de l'hydroypestalotine. Les dérivés de la pestalotine ont été décrits comme induisant une faible cytotoxicité contre la lignée tumorale humaine U-251. 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.

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, une mycotoxine réglementée en particulier dans les produits alimentaires à base de pomme et décrite pour être notamment cytotoxique. La présence potentielle d'une mycotoxine réglementée a donc justifié d'élargir l'étude de déréplication sur les 6 extraits disponibles. Cependant, la patuline est difficilement détectable par spectrométrie de masse du fait de sa mauvaise ionisation dans les conditions d'étude. Son spectre UV caractéristique et son indice de rétention sont alors des données importantes pour son identification.

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. 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*. Il a été rapporté que ce composé présentait des activités antifongiques, antimicrobiennes et antimalariales. Cependant, à notre connaissance aucune activité de la 5'-hydroxyaspérentine, qui est un dérivé de la cladosporine, n'a été rapportée.

6.5 Déréplication de composés bioactifs marins connus provenant des microalgues et des champignons dans l'investigation des toxicités atypiques rencontrées dans les coquillages

Dans le cadre du projet régional COLNACOQ, le LABERCA a développé puis appliqué une stratégie analytique de profilage métabolique non ciblé en vue de mettre en évidence des biomarqueurs associés à une toxicité chez la moule. Ce travail a fait l'objet d'un stage de master (Melle Sabina Le BORGNE) co-encadré par le LABERCA d'Oniris (Jean-Philippe Antignac) et le laboratoire Phycotoxines de l'IFREMER (Florence Mondeguer).

Une précédente étude de faisabilité conduite en collaboration entre les unités LABERCA (Oniris) et Phycotoxines (Ifremer) avait en effet permis de caractériser une signature biologique associée à une toxicité atypique (crise sanitaire de 2006) observée sur des échantillons d'huîtres du bassin d'Arcachon, par une approche de phénotypage chimique non ciblée, basée sur le couplage CL-SMHR. En effet, cette approche a démontré la possibilité de différencier des échantillons non toxiques des échantillons toxiques sur la base de leur profil métabolique global et de révéler des signaux spectrométriques plus particulièrement impliqués dans cette différenciation. Suite à cette première preuve de concept et étude de faisabilité, le projet COLNACOQ a fourni aux deux laboratoires l'opportunité de poursuivre ces travaux. Un premier objectif était ici de confirmer les résultats précédents sur une nouvelle expérimentation indépendante. Un second objectif était d'aller plus loin quant à l'identification de biomarqueurs caractérisant l'un ou l'autre des groupes de prélèvements considérés, i.e. non toxiques versus toxiques. En effet, le contrôle sanitaire est actuellement basé sur une méthode ciblée d'identification et de quantification de toxines connues qui ne permet pas de détecter des toxines encore inconnues. Dans ce contexte, des échantillons collectés dans le cadre du plan de surveillance du bassin d'Arcachon en 2009 et 2010 ont été sélectionnés, ceux-ci ayant montré une toxicité positive chez la souris, mais sans que les substances potentiellement responsables de cet effet toxique n'aient été mises en évidence par les méthodes ciblées. Nous avons alors envisagé une nouvelle approche de profilage chimique différentiel et non ciblé, de type métabolomique, pour mettre en évidence une signature biologique associée à cette toxicité, puis caractériser des biomarqueurs (substances toxiques encore non identifiées ou leur métabolites directs, ou bien marqueurs métaboliques plus indirects) exploitables à terme pour la mise en place d'une nouvelle stratégie de contrôle.

Après une phase d'étude et de synthèse bibliographique concernant les différentes classes de substances responsables d'une toxicité chez la moule, une stratégie analytique dédiée à la mise en évidence d'une telle toxicité atypique chez la moule a été développée et appliquée. Celle-ci comprend une étape de préparation des échantillons suivant un protocole qui a été mis en place pendant ce stage de master, et qui a demandé un travail de compromis entre une faible sélectivité afin d'avoir accès à une fraction du métabolome la plus large possible mais en même temps un degré de purification suffisant des extraits pour permettre une compatibilité avec une mesure par couplage CL-SMHR. Une étape de profilage métabolomique a ensuite été appliquée, avec des conditions instrumentales optimisées pour la détection de toxines. Pour finir, une procédure de retraitement des données, basée sur l'utilisation de solutions logicielles dédiées, a été utilisée en vue de révéler les signaux spectrométriques caractéristiques d'une toxicité.

Les résultats obtenus ont indiqué la possibilité de mettre en évidence des marqueurs différenciellement exprimés dans les échantillons contrôles et toxiques avec la présence d'ions discriminants très marqués, caractéristiques d'un groupe d'échantillons particulier (toxique ou non toxique). Nous avons ainsi pu mettre en évidence l'existence d'une signature particulière associée aux échantillons « conformes ». Notamment, un ion de rapport m/z 665 est apparu particulièrement intéressant en tant que marqueur d'une absence de toxicité. Ce résultat est très prometteur puisqu'au-delà d'une détection de toxines particulières, on a ici un ion qui n'est pas dépendant de la nature exacte de la toxine impliquée dans la contamination. Cet ion pourrait correspondre à une molécule présente de façon endogène dans la glande digestive de la moule et donc un marqueur assez générique des moules non toxiques. La recherche des potentielles structures chimiques correspondant à cet ion dans les principales bases de données disponibles et accessibles sur Internet a conduit à une structure potentielle, correspondant à l'un des isomères du HODE cholesteryl ester. La recherche des différents isomères possibles de ce composé (notamment 13(S) ou 9(S)) commercialement disponibles en standard, puis des essais de fragmentation en spectrométrie de masse en tandem afin de collecter d'autres informations structurales sont nécessaires afin de confirmer la structure de ce candidat.

Ces essais ont été réalisés à partir de 10 échantillons variés (régions, dates, toxicités) de matrices de glandes digestives de moule rassemblés de manière hebdomadaire tout au long de l'année sur tout le littoral par la surveillance sanitaire liée au dépistage des toxines lipophiles dans les coquillages. Toutefois en raison du temps imparti à cette étude, ce nombre d'échantillons reste faible. Il apparaît dès lors nécessaire d'effectuer de nouvelles étapes de validation de ces résultats afin de définir le domaine ainsi que les conditions d'applicabilité de la méthode. Etant donné que l'hypothèse de départ concernait la recherche de substances de structures proches de celles de toxines connues, nous nous sommes avant tout focalisés sur une fraction particulière des extraits préparés. Cependant, les deux autres fractions d'élution obtenues à chaque préparation des échantillons restent à étudier pour peut-être mettre en évidence d'autres types de molécules ou de toxines particulières. De plus, un prétraitement des échantillons pourra également être mis en place, par exemple par une hydrolyse d'éventuelles formes estérifiées de toxines non accessibles à l'analyse dans les conditions actuellement utilisées. Enfin, d'autres techniques d'analyse complémentaires pourront par la suite être envisagées afin de générer différentes autres « images » du métabolome de la moule. Le couplage GC-MS en particulier pourra être employé pour ce type d'analyse mais nécessitera une étude préliminaire concernant la préparation des échantillons et le retraitement des données.

7. Actions de valorisation économique, académique (hors publications) et sociétale menées dans le projet ¹ (1 page max)

Du fait de la nature du projet (paris scientifique), la valorisation dans ce projet a été essentiellement académique.

La première valorisation académique est une thèse de doctorat (**Marie Geiger**). Le manuscrit de thèse avait déjà été fourni à la Région des Pays de la Loire pour finaliser les versements relatifs à cette bourse. A la suite de sa thèse, Marie Geiger a été embauchée en CDI pour s'occuper du laboratoire de développement d'une entreprise du domaine agroalimentaire de la région de Rennes.

Les actions du projet ont également permis une valorisation dans le cadre de deux stages de M2 de 6 mois chacun:

M2-1 : **Sabrina LeBorgne** (collaboration Laberca Oniris – Ifremer, organisme recruteur du stagiaire ONIRIS) : identification agents toxicité atypique

M2-2 : **Gwenaëlle Deslanglois** (collaboration Anses - Fougères – Ifremer, organisme recruteur du stagiaire ANSES).

De plus, les travaux ont également donné occasion à un stage M1 de 6 mois (**Faustine Vanel**, culture du dinoflagellé *Vulcanodinium rugosum*; organisme recruteur du stagiaire : Ifremer).

Enfin le projet a également permis d'établir des connexions internationales avec l'Angleterre (Université de Portsmouth) ainsi que l'Italie (Université Federico II de Naples). Au fait l'université de Naples est un partenaire associé au projet et une convention de longue durée pour des échanges ERASMUS (2010 – 2014, renouvelée en 2014 jusqu'en 2021).

Deux étudiants ERASMUS de l'université de Portsmouth ont été accueillis dans le cadre du projet COLNACOQ pour des stages de trois mois chacun :

a) **Lindsey Marshall** (criblage d'activité antimicrobienne)

b) **Lucy Rounds** (criblage d'activité cytotoxicité)

Un stagiaire a été accueilli au laboratoire PHYC pour un stage ERASMUS (non-affilié au projet COLNACOQ) en provenance de l'université Federico II de Naples:

Francesco Pisapia (2012, 3 mois)

¹ La valorisation est entendue au sens large et peut porter sur différents domaines et sur différentes actions :

- Valorisation académique : organisation de colloques, séminaires, conférences, promotion collective...
- Créations ou évolutions significatives des formations d'enseignement supérieur et notamment les masters et les formations doctorales.
- Valorisation économique : dépôt de brevets, protection de la propriété intellectuelle, activités de transfert et de prestation, recrutement d'un ingénieur de valorisation, création d'entreprise, etc.
- Valorisation sociétale : actions favorisant l'innovation dans les services publics (santé, sport, culture, collectivités locales,...) et les services collectifs développés par les acteurs de l'économie sociale et solidaire, applications cliniques.
- Actions de mise de débat de la science et de diffusion de la culture scientifique technique et industrielle

8. Impact du projet sur la structuration de la recherche en Pays de la Loire : rapprochement de laboratoires, création de structures fédératives... (1 page)

Ce projet appartient à la catégorie de paris scientifique, et n'a donc pas de but majeur en termes de structuration des équipes.

Toutefois, le projet a permis de croître la collaboration entre quatre équipes nantaises (Ifremer – Laboratoire PHYC, Ifremer – Laboratoire LNR Contaminations Microbiologiques des Coquillages, ONIRIS – Laberca et Université de Nantes – Mer Molécules Santé).

De plus, le projet a placé ces équipes à la fois mieux au plan national (en collaborant avec un laboratoire de l'Anses à Fougères) ainsi qu'à l'échelle internationale (à travers la collaboration avec le laboratoire de Prof. Ciminiello à l'Université Federico II de Naples, Italie). Pour cette dernière partie voir aussi la valorisation académique dans le cadre d'échanges ERASMUS.

9. Effet levier du projet (réponse à d'autres appels à projets, insertion dans des réseaux...)

Enfin, les résultats du projet ont été intégrés avec ceux du projet ChiMiMar dans le savoir-faire des deux laboratoires partenaires principaux (Ifremer-PHYC et UN-MMS).

Au niveau sociétal, les résultats de ce projet ont permis de mieux répondre aux besoins de la Direction Générale de l'Alimentation (DGAL) en termes de recherche par rapport aux substances potentiellement toxiques accumulées dans les coquillages. Ainsi, les tests de cytotoxicité ainsi que le protocole d'isolement préparatif ont de nouveau été utilisés dans le cadre d'un projet national (financé par la DGAL (Projets Pinnatoxines, phase I et II ; 2011 - 2014). (voir aussi la référence 5) dans la liste des publications de rapport de projet associé, annexe 1).

10. Perspectives

Actuellement, une application sociétale est en train d'être discutée avec la Direction Générale de l'Alimentation dans le cadre du programme nationale de la vigilance pour la surveillance des coquillages. Si financé par la DGAL, cette action impliquera le plus probablement l'Ifremer et l'Anses.

Le savoir-faire acquis dans COLNACOQ par les deux laboratoires MMS et PHYC servira aussi économiquement dans le cadre de la plateforme Thalassomics récemment créée dans le cadre du BioGenOuest :

http://www.mms.univ-nantes.fr/44781238/0/fiche_pagelibre/&RH=MMS_FR1&RF=1421848458602

ANNEXE 1
Liste des publications et communications

		Publications multipartenaires	Publications monopartenaires
International	Revue à comité de lecture	3	
	Ouvrages ou chapitres d'ouvrage		
	Communications (conférence)	4 présentations orales et 2 présentations par affiche 2 résumés référencés	
France	Revue à comité de lecture	1	
	Ouvrages ou chapitres d'ouvrage	1 manuscrit de thèse de doctorat	
	Communications (conférence)	3 présentations orales et 4 présentations par affiche	
Actions de diffusion	Articles vulgarisation		
	Conférences vulgarisation		
	Autres	1 rapport de projet final (ce document-ci) 1 rapport de projet associé (numéro 5)	

Publications de rang A :

1. Mondegue F., Antignac J.P., Guitton Y., Monteau F., LeBorgne S., Hess, P. 2012 Nouvelle stratégie de caractérisation non ciblée de type métabolomique au service de l'identification de composés bioactifs accumulés dans les mollusques bivalves. *Spectra Analyse* 284 (3) 24-33.
2. Geiger, M., Desanglois, G., Hogeveen, K., Fessard, V., Leprêtre, T., Mondegue, F., Guitton, Y., Hervé, F., Séchet, V., Grovel, O., Pouchus, Y.F., Hess, P., 2013. Cytotoxicity, fractionation and dereplication of extracts of the dinoflagellate *Vulcanodinium rugosum*, a producer of Pinnatoxin G. *Mar. Drugs* 11, 3350-3371.
3. Geiger M., Guitton Y., Vansteelandt M., Kerzaon I., Blanchet E., Robiou du Pont, T., Frisvad J., Hess P., Pouchus Y.F., Grovel O. 2013 Cytotoxicity and mycotoxin production of shellfish-derived *Penicillium* spp., a risk for shellfish consumers. *Letters in Applied Microbiology* 57, 385-392.
4. Hess P., Abadie E., Hervé F., Berteaux T., Séchet V., Araújo R., Molgó J., Zakarian A., Sibat M., Rundberget T., Miles C.O., Amzil Z. 2013 Pinnatoxin-G is responsible for atypical toxicity in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and clams (*Venerupis decussata*) from Ingril, a French Mediterranean lagoon. *Toxicon* 75, 16-26.

Rapports :

5. Hess P., Herve F., Abadie E., Sechet V., Molgo J., Amzil Z., Fessard V. (2012). Pinnatoxines en lien avec l'espèce *Vulcanodinium rugosum*. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00094/20518/> Rapport Ifremer.

Résumés dans des revues internationales référencées :

6. Geiger M., Deslanglois G., Hogeveen K., Fessard V., Abadie E., Lepretre T., Herve F., Sechet V., Araoz R., Molgo J., Grovel O., Pouchus Y.F., Hess P., (2013) Cellular models and cytotoxicity of pinnatoxin-G and extracts of the dinoflagellate *Vulcanodinium rugosum* recently isolated from the French mediterranean lagoon of Ingril. *Toxicon*, 75, 215-216.
7. Geiger M., Brochard S., Sechet V., Grovel O., Pouchus Y.F., Hess P., (2013) Study on the usefulness and limitations of a cytotoxicity bio-assay using KB cells to detect lipophilic toxins in shellfish matrices. *Toxicon*, 75, 216.

Présentations orales :

8. Geiger M., Grovel O., Pouchus Y.-F. and Hess P. (2012) Development of a bio-assay suite for the detection of bio-active compounds from micro-algae and fungi in shellfish. Oral presentation at The World Mycotoxin Forum and the 13th IUPAC Intl. Symp. on Mycotoxins and Phycotoxins, 5-9 November 2012 Rotterdam, The Netherlands.

9. 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) 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. Oral presentation at the 15th Intl. Conf. on Harmful Algae (ICHA), Oct. 29 to Nov. 2, 2012 in Changwon, Korea.
10. Hess P., Séchet V., LeRoy E., Vanel F., Hervé F., Abadie E., Geiger M., LePrêtre T., Molgo J., Quéré J., Chomérat N., Nézan E., Deslanglois G., Fessard F., Amzil Z. (2012) Etude des Pinnatoxines en lien avec l'espèce *Vulcanodinium rugosum*. Oral presentation at the Journées REPHY, 25 – 27 September, Nantes, France.
11. Geiger M, Grovel O, Sechet V, Pouchus YF, Hess P. Bioessais pour le screening de composés fongiques et microalgues issus du milieu marin environnant les mollusques bivalves. 3ème Journée scientifique du GDR BioChiMar, Paris - MNHN, 27-29 juin 2011.
12. Blanchet E, Vansteelandt M, Geiger M, Le Bot R, Egorov M, Petit KE, Pouchus YF, Grovel O - Marine natural and semisynthetic fumagillin derivatives as anti-osteosarcoma agents. NAD 2012 - Natural Anticancer Drugs, Olomouc, Czech Republic, 30 juin-4 juil., 2012.
13. Guitton Y, Blanchet E, Vansteelandt M, Roullier C, Geiger M, Pouchus YF, Grovel O. Towards the developpement of metabolomics for marine micro-organisms compounds discovery. 7èmes Journées scientifiques du RFMF (Réseau Français de Métabolomique et Fluxomique), Amiens, 27-29 10-12juin 2013
14. Hess P., Geiger M., Glauner T., Wüst B., Guitton Y., Mondeguer F., Antignac J.-P., Sibat M., Zendong Z., Séchet V., Dussud C., Fessard V., Herrenknecht C., Pouchus Y.-F. and Amzil Z (2014) Criblage non-ciblé des toxines émergentes - fractionnement bioguidé. Présentation orale lors des Journées REPHY 1-2nd October, Nantes, France.

Présentations par affiches :

15. Geiger M., Dupont J., Grovel O., Pouchus Y.F., Hess P. (2010) Development of a liquid-medium assay for screening antimicrobial natural products against marine bacteria. Poster presentation at the International Conference on Antimicrobial Research, 3 – 5 Nov 2010, Valladolid, Spain.
16. Blanchet E., Vansteelandt M., Geiger M., Le Bot R., Pouchus Y.F., Grovel O. LC-HRMS/MS investigation of a new marine-derived *Penicillium* species for the rapid detection of original bioactive compounds. 8th joint meeting AFERP, ASP, GA, PSE & SIF, (ICNPR 2012), New-York, USA, juil. 2012.
17. Geiger M., Brochard S., Séchet V., Grovel O., Pouchus Y.-F. and Hess P. (2012) Study on the usefulness and limitations of a cytotoxicity bio-assay using KB cells to detect lipophilic toxins in shellfish matrices. Poster presentation the 20th Annual Meeting of the "Société Française d'Etudes sur les Toxines" SFET. 10 – 11 December 2012, Paris, France.
18. Mondeguer F., Antignac J.-P., Guitton Y., Monteau F., Le Borgne S., Hess P. (2012) Stratégie de mesure non ciblée de type métabolomique (couplage LC-HRMS) pour identifier différents groupes de composés bioactifs accumulés dans les mollusques bivalves. Poster presentation at the 6ième Journées Scientifiques Réseau Français de Métabolomique et de Fluxomique; 21 – 23 mai 2012, Nantes, France.
19. Guitton Y., Blanchet E., Vansteelandt M., Roullier C., Geiger M., Pouchus YF., Grovel O. MeHaloCoA project (MarinE HALOgenated COmpounds Analysis). 7èmes Journées scientifiques du RFMF (Réseau Français de Métabolomique et Fluxomique), Amiens, 27-29 10-12 juin 2013.
20. Guitton G., Blanchet E., Vansteelandt M., Roullier C., Geiger M., Pouchus YF. and Grovel O. Approche métabolomique pour la recherche de composés bioactifs originaux dans des souches de *Penicillium* marins. Journée scientifique de la plate-forme CORSAIRE – BIOGENOUEST, Rennes, 8 novembre 2013.

Mémoire de these de doctorat

21. Geiger M. (2013) 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 pour le Doctorat de l'Université de Nantes, soutenue le 25 septembre 2013, 350 p. Disponible sur Archimer: <http://archimer.ifremer.fr/doc/00183/29426/27787.pdf>