

Année 2014

N° attribué par la bibliothèque

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

Ovatoxines :
Purification à partir d'*Ostreopsis* cf. *ovata* en culture et
Niveaux d'accumulation dans les produits de la mer

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : chimie analytique
Spécialité : toxines d'algues

*Présentée
et soutenue publiquement par*

Charline BRISSARD

Le 21 octobre 2014, devant le jury ci-dessous

Président	Yves-François POUCHUS, Professeur, Université de Nantes
Rapporteurs	Sophie TOMASI, Professeur, Université de Rennes Olivier THOMAS, Professeur, Université de Nice
Examineurs	Marina NICOLAS, Docteur, ANSES Sabine CONSTANT, Maître de conférences, Université de Nantes
Directeur de thèse	Zouher AMZIL, Docteur, Ifremer
Membre invité	Christine HERRENKNECHT, Professeur, Université de Nantes

Directeur de thèse : Zouher Amzil

*N'essaie rien, fais le ou ne le fais pas.
Maître Yoda*

Remerciements

Il y a maintenant plus de trois ans, je me suis lancée dans la préparation de ce doctorat. Après un long voyage, avec ses moments de tempête et d'accalmie, cette aventure touche désormais à sa fin. Je tiens alors à remercier toutes les personnes qui ont croisé mon chemin pendant ces années. Pardonnez-moi les moments décalés, parfois même un peu mielleux, et désolée pour ceux que j'aurais oublié.

J'aimerais tout d'abord remercier Mme Sophie Tomasi et Mr Olivier Nicolas, pour m'avoir fait l'honneur d'être rapporteur de cette thèse, ainsi que Mme Marina Nicolas, Mme Sabine Constant et Mr Yves-François Pouchus, pour avoir accepté de juger ce travail.

J'adresse toute ma gratitude à Mr Zouher Amzil, directeur de cette thèse, pour m'avoir donné l'opportunité de travailler sur un sujet aussi passionnant, ainsi que pour tes conseils qui ont fait avancer ces recherches.

J'exprime toute ma reconnaissance à Mme Christine Herrenknecht, ma co-directrice de thèse. Tu as été plus que ma bouée de sauvetage, tu as été mon étoile du Bergé. Je te remercie pour ton soutien, aussi bien moral que professionnel, et pour m'avoir aidé à m'accomplir et m'épanouir en tant que chercheur. Les mots me manquent pour te remercier à ta juste valeur. Alors merci, tout simplement.

Je remercie Véronique Séchet, mon encadrante de thèse, pour m'avoir initié à la culture de microalgue. Grâce à toi, le monde de la biologie me paraît un peu moins étrange.

Je tiens à remercier les membres de mon comité de suivi de thèse, Mr Laurent Barrille, Mr Emmanuel Gentil et Rodolphe Lemée, pour avoir eu des regards critiques sur mon travail qui ont fait avancer la réflexion sur le sujet.

Je souhaiterais remercier toutes les personnes avec qui j'ai eu le plaisir de collaborer : Rodolphe Lemée, qui m'a initié à l'écologie et m'a fait découvrir son activité de récolte d'organismes en snorkeling et de pêche (ca y est, je sais ce que je veux faire quand je serais grande), sans oublier ses stagiaires rebaptisées les « Rodolphettes » ; Nicolas Chomérat, qui a eu l'amabilité d'effectuer les analyses phylogénétiques de mes souches ; Phillip Hess, pour les relectures de mes publications ; Yann Guitton, pour s'être arraché les cheveux à essayer d'analyser mes toxines ou mes « grosses bêtes », je te rassure, elles ne t'embêteront plus. Merci à toutes les personnes du laboratoire MMS avec qui j'ai eu le plaisir d'interagir.

Je voudrais remercier du fond du cœur toutes les personnes du laboratoire Phycotoxine, qui m'ont supporté durant ces années (et heureusement que j'attendais que tout le monde soit parti pour me mettre à chanter), qui ont fait de ces années un moment de partage. Merci pour votre soutien au quotidien, qui m'a aidé à garder le cap.

Merci à Georges, je compte bien (re)gouter ton punch le jour de ma soutenance ; Virginie, merci pour ta bonne humeur qui m'a toujours redonné le sourire, et merci de prendre désormais soin de mes petits *Ostreopsis*, Véro, merci de m'avoir aidé à réparer tous les ordinateurs qui s'autodétruisaient sous le simple effet de mon regard ; Florence, merci pour tous tes conseils ; Amandine, j'ai été contente de te connaître.

Michèle, ma camarade, merci d'avoir veillé sur moi et sur tous les autres ; Mano, merci de m'avoir transmis ton savoir sur les palytoxines, merci de m'avoir formée et surtout merci de ton soutien, j'ai pris beaucoup de plaisir à travailler avec toi ; Nathalie, j'ai été heureuse de partager ce bureau avec toi pendant trois ans et merci pour toutes nos discussions.

Merci à mes compagnons de galère, aux anciens thésards, Marie, Thierry et Benoit, pour m'avoir fait bénéficier de votre expérience, et aux apprentis docteurs, Zita, Damien et Judith, je quitte le navire mais je continue de veiller sur vous. Je vous souhaite bon vent.

Merci aux retraités, Patrick Lassus et Philippe Truquet ; vous rencontrer a été un privilège, j'ai pris beaucoup de plaisir à discuter avec vous.

Merci à mes stagiaires pour m'avoir aidé à réaliser ce travail, Francesco et surtout Jocelyn, mon mini-moi de 1,90 m. Merci aussi à tous les techniciens et stagiaires qui m'ont aidé à extraire mes organismes.

Fabienne, mon amie de fortune (ou d'infortune). Ta présence au laboratoire a adouci mon quotidien. J'ai aimé travailler avec toi, merci pour ton aide technique et scientifique ; j'ai aimé nos discussions pleines d'intelligences (ou pas toujours), le tout agrémenté de beaucoup d'humour.

Merci à ma Soso (la cerdita), Pierrick (ma gueule chevelue) et Andrea (ma chilienne préférée), merci d'avoir été là à mes débuts, de m'avoir aidé à embarquer dans cette aventure avec sérénité et merci de m'avoir fait découvrir cette belle région. Je vous souhaite bon vent et j'espère bien vous revoir dans les environs.

Je tiens à rendre hommage à tous ceux qui un jour ont croisé la route d'*Ostreopsis* et qui en ont subi les conséquences : votre souffrance a permis de faire avancer la science. Merci aussi à mes cultures, qui ont survécu pendant ces trois années, malgré le fait que je n'ai jamais eu la main verte (ni bleue d'ailleurs).

Enfin, j'aimerais remercier ma famille et mes amis, qui ont toujours cru en moi, qui malgré la distance ont toujours été là pour me soutenir et me remonter le moral.

Merci à mes parents, ça y est, vous pourrez enfin dire que votre fille a fini ses études ; Maman, mille fois merci, pour m'avoir gardée à flot pendant ces années et bien plus encore, ton soutien m'a été inestimable ; Jérémie, mon grand frère, merci de m'avoir aidée à garder les pieds sur terre et à ne pas perdre de vue l'essentiel ; merci à Nelly, ma michette, savoir que tu veilles sur moi a toujours été réconfortant. Merci à tous les « nouveaux » amis qui ont croisé ma route pendant ces années.

Merci à Benji, mon étoile filante. Grâce à toi, toutes les tourmentes de cette thèse se sont envolées. Merci d'avoir pris soin de moi, surtout dans les derniers moments. Merci d'être là, tout simplement, j'espère pour longtemps.

Pour conclure, Christine, j'aimerais te dédicacer ce travail.

Sommaire

Liste des figures	9
Liste des tableaux	13
Liste des abréviations	15
Résumé	18
Abstract.....	19
<u>Introduction générale et objectifs de l'étude</u>	<u>21</u>
<u>Chapitre 1 – État de l'art</u>	<u>29</u>
1. Toxines d'algues	31
1.1. Toxines lipophiles (dont les toxines diarrhéiques)	33
1.2. Toxines paralysantes	40
1.3. Toxines amnésiantes	42
1.4. Brévétotoxines	43
1.5. Ciguatoxines	45
1.6. Les substances toxiques pour la faune marine	48
1.7. Toxines du groupe palytoxine.	51
2. Situation en France	51
2.1. Toxines algales réglementées.....	52
2.2. Toxines algales non réglementées.....	55
3. Toxines produites par le dinoflagellé <i>Ostreopsis sp.</i>	57
3.1. Découverte des toxines du groupe palytoxine.....	57
3.2. Structure et propriétés chimiques de la palytoxine	59
3.3. Les analogues de la palytoxine	60
4. Le genre <i>Ostreopsis</i>	65
4.1. Identification	65
4.2. Conditions d'efflorescences d' <i>Ostreopsis sp.</i>	67
4.3. Facteurs de croissance et de production toxinique au laboratoire	68
5. Activité toxicologique des PLTXs	71
5.1. Risques sanitaires	71
5.2. Symptômes chez l'Homme.....	72
5.3. Toxicité de la palytoxine chez les mammifères	73
5.4. Toxicité chez les poissons et les invertébrés	75
5.5. Toxicité relative des analogues	76
6. Mode d'action de la PLTX	77
7. Méthodes de détection des PLTXs.....	79
7.1. Méthodes d'analyses biologiques	79

7.2. Méthodes d'analyses physico-chimiques	82
--	----

Chapitre 2 – Matériels et Méthodes **89**

1. Prépuration par Sephadex LH20.....	91
2. Méthodes d'analyse des toxines	91
2.1. Système CL-SMHR-QTOF	92
2.2. Système chromatographique pour la quantification des toxines (CL-SM/SM).....	93
2.3. Système CL-SM et/ou CL-DAD	94
2.4. Système CL-DAD	97
3. Sélection d'une colonne capable de séparer les OVTXs.....	97
3.1. Évaluation des caractéristiques des colonnes testées.	97
3.2. Sélection de colonnes capables de séparer les OVTXs.....	97
4. Culture de souches d' <i>Ostreopsis cf. ovata</i>	99
4.1. Identification génétique des espèces d' <i>Ostreopsis cf. ovata</i>	99
4.2. Conditions de culture.....	100
4.3. Suivi des souches	102
4.4. Cinétique de croissance	104
5. Études terrain 2011 et 2012	105
5.1. Échantillonnage <i>in situ</i> des cellules d' <i>Ostreopsis cf. ovata</i>	105
5.2. Campagnes de prélèvement d' <i>Ostreopsis cf. ovata</i> et des produits de la mer.....	106
5.3. Traitement des échantillons prélevés durant les étés 2011 et 2012.....	109
5.4. Extraction des toxines à partir du matériel biologique récolté <i>in situ</i>	111
6. Test hémolytique	112
6.1. Préparation des solutions.....	112

Chapitre 3 – Distribution d'*Ostreopsis cf. ovata* dans la baie de Villefranche-sur-Mer et niveau de contamination dans les organismes marins..... **115**

1. Suivi <i>in situ</i> des efflorescences d' <i>Ostreopsis cf. ovata</i> en Méditerranée	117
1.1. Caractérisation des sites	117
1.2. Suivi de la prolifération de cellules d' <i>Ostreopsis cf. ovata</i>	118
2. Distribution verticale d' <i>Ostreopsis cf. ovata</i> : résultat de la campagne de 2011	120
2.1. Site de Villefranche-sur-Mer	120
2.2. Site de Monaco	123
2.3. Comparaison des deux sites	125
3. Niveaux d'accumulation des OVTXs par CL-SM/SM dans les produits de la mer.....	126
4. Mise en place du test hémolytique, en complément de l'analyse CL-SM/SM.....	128
4.1. Principe du test	128
4.2. Optimisation du test hémolytique	130
4.3. Évaluation des effets matrices	132
4.4. Niveaux de contamination des produits de la mer déterminés par le test hémolytique	137

5. Conclusion.....	139
--------------------	-----

Chapitre 4 – Cinétiques de croissance et de production de toxines au laboratoire 141

1. Description des souches d' <i>Ostreopsis cf. ovata</i> suivies	143
2. Identification taxonomique des souches isolées par analyse génétique moléculaire	145
3. Optimisation des conditions de culture	146
3.1. Choix du milieu d'enrichissement.....	146
3.2. Comparaison de la source azotée : nitrate et urée.....	148
4. Comparaison des souches d' <i>Ostreopsis cf. ovata</i>	151
5. Essais de cultures dans différents contenants de différents volumes	154
5.1. Culture en poche d'aquaculture	154
5.2. Flacons en verre	156
5.3. Bilan	163
6. Cinétiques de croissance et de production des ovatoxines.....	164
7. Conclusion.....	166

Chapitre 5 – Purification des ovatoxines à partir d'extraits d'*Ostreopsis cf. ovata* 169

A. Caractérisation des différentes ovatoxines dans les extraits d' <i>Ostreopsis cf. ovata</i> par CL-SMHR-QTOF	172
1. Identification des différentes ovatoxines.....	172
2. Caractérisation du nouvel analogue : l'ovatoxine-h.....	175
B. Méthodologie mise en œuvre pour la purification des extraits d' <i>Ostreopsis cf. ovata</i>	181
1. Étude préliminaire : vérification du relargage des toxines dans le milieu de culture.....	181
1.1. Efficacité de l'extraction liquide-liquide des OVTXs par le butanol.....	182
1.2. Efficacité de l'extraction en phase solide sur résine HP20	184
1.3. Application des deux types d'extraction au milieu de culture d' <i>Ostreopsis cf. ovata</i>	189
2. Mise au point d'une méthode de prépurification des extraits d' <i>Ostreopsis cf. ovata</i>	191
2.1. Partition liquide-liquide	191
2.2. Ultrafiltration	193
2.3. Prépurification des OVTXs à partir de l'extrait d' <i>Ostreopsis</i> par chromatographie d'exclusion stérique (Sephadex LH-20)	194
3. Choix de colonnes HPLC pour la séparation et la purification des OVTXs	202
3.1. Présentation et qualification des colonnes testées.....	203
3.2. Présélection par CL-UV de colonnes capables de séparer les OVTXs.....	206
3.3. Sélection par CL-SM d'une colonne permettant la meilleure séparation des OVTXs.....	211
4. Essais de purification des ovatoxines par CL-DAD/SM.....	215
4.1. Ajustement des conditions aux colonnes analytique et semi-préparative.....	215

4.2. Collecte des OVTXs après séparation sur une colonne analytique.....	217
4.3. Collecte des OVTXs après séparation sur une colonne semi-préparative	220
5. Intérêt de l'acidification de la phase mobile.....	223
6. Conclusion.....	226
<u>Conclusion générale et perspectives</u>	<u>229</u>
<u>Références</u>	<u>237</u>
<u>Annexes.....</u>	<u>257</u>
1. Identification génétique des espèces d' <i>Ostreopsis cf. ovata</i>	259
1.1. Amplification ADN et séquençage.....	259
1.2. Alignement des séquences et analyses phylogénétiques	259
2. Relation statistique de l'abondance d' <i>Ostreopsis cf. ovata</i> en fonction de la profondeur	261
3. Caractéristiques des espèces contaminées	262
4. Milieu d'enrichissement K.....	263
4.1. Préparation du milieu K (Keller and Guillard 1985, Keller <i>et al.</i> 1987).....	263
4.2. Solution de métaux traces de l'enrichissement K.....	263
5. Comparaison des données obtenues à partir des spectres CID obtenue par CL-SMHR des ovatoxines en CL- HRSM.....	265
6. Comparaison de l'OVTX-h avec l'OVTX-a : comparaison des différentes hypothèses	268
7. Chromatogramme d'un extrait prépurifié sur une phase Sephadex LH-20 et spectres de masse « full scan » des composés d'intérêt obtenus en CL-SM.....	272
7.1. Spectre du composé inconnu P1	273
7.2. Spectre du composé inconnu P2	274
7.3. Spectre du composé inconnu P3	275
7.4. Spectre du composé inconnu P4	276
7.5. Spectre du composé inconnu P5	277
7.6. Spectre du composé inconnu P6	278
7.7. Spectre de l'OVTX-c.....	279
7.8. Spectre de l'OVTX-d	280
7.9. Spectre de l'OVTX-e	281
7.10. Spectre de l'OVTX-b	282
7.11. Spectre de l'OVTX-a	283
7.12. Spectre de l'OVTX-a'.....	284
7.13. Spectre de l'OVTX-h	285
Résumé	288
Abstract	288

Liste des figures

Figure 1. Formules chimiques des principales toxines du groupe acide okadaïque produites par les microalgues.	34
Figure 2. Formules chimiques des principales azaspiracides (AZAs).....	35
Figure 3. Formules chimiques des principales PTXs.	36
Figure 4. Formules chimiques des principales YTXs.	37
Figure 5. Formules chimiques des spirolides	39
Figure 6. Formule chimique de la Gymnodimine-A.....	39
Figure 7. Formule chimique de la pinnatoxine-A	40
Figure 8. Formule chimique de la ptériatoxine-A	40
Figure 9. Structures des saxitoxines (STXs) et gonyautoxines (GTXs) les plus toxiques.....	42
Figure 10. Structure de l'acide domoïque.....	43
Figure 11. Formules chimiques des principales brevéttoxines.....	44
Figure 12. Formule chimique de la P-CTX-1 et C-CTX-1.....	47
Figure 13. Formule chimique de la maïtotoxine.....	48
Figure 14. Formule développée de la gymnocine-A.	49
Figure 15. Structures des prymnesine-1 et prymnesine-2.....	50
Figure 16. a). Anémone du genre <i>Palythoa</i> (http://doris.ffessm.fr/).....	58
Figure 17. Formule chimique de la palytoxine et propriétés analytiques [33].....	60
Figure 18. Formules chimiques des analogues connus des PLTXs.	63
Figure 19. Cellules d' <i>Ostreopsis sp.</i> (A) [130], (B) [fotoalbum.virgilio.it]. (C) "Fleur d'eau" d' <i>Ostreopsis sp.</i> en surface. [http://www.ramoge.org/fr/ostreopsis_ovata.aspx].....	66
Figure 20. Cellule d' <i>Ostreopsis ovata</i> et mucilage [130].	66
Figure 21. Risques sanitaires liés à la présence d' <i>Ostreopsis sp.</i> dans les zones balnéaires.....	72
Figure 22. Fonctionnement de la pompe Na ⁺ /K ⁺ ATPase [172,173].....	78
Figure 23. Interaction de la PLTX avec la pompe Na ⁺ /K ⁺ ATPase [172,173].....	78
Figure 24. Principe de fonctionnement de l'ionisation par électro-spray [201].	85
Figure 25. Principe de fonctionnement d'un quadripôle [201].	86
Figure 26. Principe de l'analyse en MRM [201].	86
Figure 27. Gradient linéaire d'élution pour les analyses sur la CL-SMHR QTOF.....	92
Figure 28. Gradient linéaire d'élution utilisé pour l'analyse des p-PLTX-OVTXs par CL-SM/SM.	93
Figure 29. Gradient linéaire d'élution pour le choix des colonnes pour l'analyse et la purification.	95
Figure 30. Gradient linéaire d'élution pour l'analyse des extraits et fractions en CL-SM.	96
Figure 31. Gradient linéaire d'élution pour le fractionnement des différents extraits d' <i>Ostreopsis cf. ovata</i> prépurifiés sur une phase Sephadex LH-20.....	96
Figure 32. Gradient linéaire d'élution utilisé pour sélectionner une colonne capable de séparer les OVTXs. x représente un temps isocratique utilisé avant le début du gradient.	99
Figure 33. Boîte de culture «Corning cell bind».....	100
Figure 34. Séparation d' <i>Ostreopsis cf. ovata</i> des macroalgues.	106
Figure 35. Disque de SPATT contenant de la résine Diaion HP20.	108
Figure 36. (A) Faux murex (<i>Starmonita haesmastera</i>), (B) Oursin (<i>Paracentrotus lividus</i>), (C) Saupe (<i>Sarpa salpa</i>), (D) Mulet (<i>Mullus surmuletus</i>), (E) Castagnole (<i>Chromis chromis</i>) (http://doris.ffessm.fr/).....	109
Figure 37. Installation des SPATTs (entourés en rouge) dans la zone de Rochambeau, à 0,5 et 1 mètre de profondeur.	109

Figure 38. Séparation équitable du volume contenant les cellules épiphytes.....	110
Figure 39. Lavage du sang. (A) homogénéisation du sang. (B) surnageant limpide.....	114
Figure 40. Localisation de Villefranche-sur-Mer, de la plage de Rochambeau (43°41'34.83" N 7°18'31.66" E) et du Lido (43° 41' 30.3" N/07° 19' 15.5" E), et de la plage du Larvotto à Monaco (43° 44' 44.3" N/07° 26' 04.1" E) Les points A, B, C ;1,2,3 sont les points de prélèvement pour caractériser la zone ; ▲ et ■ sont les zones où trois prélèvements ont été faits en profondeur.	118
Figure 41. Concentrations cellulaires d' <i>Ostreopsis cf. ovata</i> dans la colonne d'eau (cellule.L ⁻¹) et sur la macroalgue <i>Stypaucolon scoparium</i> (cellule.g ⁻¹ de poids frais de macroalgues PF) observées à Villefranche-sur-Mer, sur la plage de Rochambeau, pendant les étés 2011 (A) et 2012 (B). Moyenne et écart-types des trois points de prélèvement (A,B,C).	119
Figure 42. Étude de la prolifération de cellules d' <i>Ostreopsis cf. ovata</i> récoltées à Villefranche-sur-Mer en juillet 2011 (semaine 30) entre la surface et 5 mètres de profondeur : A- Prolifération des cellules benthiques sur la macroalgue <i>Padina pavonica</i> ; B- Prolifération des cellules épiphytes récoltées à 5 cm de la macroalgue. Les résultats correspondent à la moyenne et écarts des trois points de prélèvement (▲) précédemment décrits.....	121
Figure 43. Corrélation entre les concentrations en cellules épiphytes d' <i>Ostreopsis cf. ovata</i> et la profondeur. Les relations statistiques sont détaillées en annexe 2.	121
Figure 44. Concentration et profil toxiques des extraits d' <i>Ostreopsis cf. ovata</i> récoltés à Villefranche-sur-Mer en juillet 2011 (semaine 30) entre la surface et 5 mètres de profondeur (▲). A : concentration en toxines par cellules (pg.cellule ⁻¹) en fonction de la profondeur ; et B : moyenne du profil toxinique. * concentrations inférieures à la limite de détection. LD = 0,015 µg.mL ⁻¹	122
Figure 45. Étude de la prolifération des cellules d' <i>Ostreopsis cf. ovata</i> récoltées à Monaco en juillet 2011 (semaine 30) entre la surface et 5 mètres de profondeur : A- Prolifération des cellules benthiques sur la macroalgue <i>Padina pavonica</i> ; B- Prolifération des cellules épiphytes récoltées à 5 cm de la macroalgue. Les résultats correspondent à la moyenne et écarts des trois points de prélèvement (■) précédemment décrits.....	123
Figure 46. Extraits d' <i>Ostreopsis cf. ovata</i> récoltés à Monaco en juillet 2011 (semaine 30) entre la surface et 5 mètres de profondeur (■). A : concentration en toxines par cellule d' <i>Ostreopsis cf. ovata</i> (pg.cellule ⁻¹) en fonction de la profondeur ; B : moyenne du profil toxinique d' <i>Ostreopsis cf. ovata</i>	124
Figure 47. Comparaison des sites de Rochambeau et du Lido (été 2012) : A: concentrations cellulaires épiphytes (cellule.g ⁻¹ PF) et pélagiques (cellule.mL ⁻¹) ; B : Concentration toxinique dans les extraits de cellules épiphytes (pg.cellule ⁻¹). Échantillons prélevés à 0,5 m de profondeur. Les résultats correspondent à la moyenne et écarts des trois points de prélèvement A, B et C précédemment décrits.....	126
Figure 48. Pourcentage de lyse en fonction de la concentration en PLTX en fonction du temps d'incubation : temps d'incubation de 4 ou 20 h : A : dans du sang-PBS; B: dans du sang-ouabaïne.....	130
Figure 49. Courbe d'étalonnage de PLTX dans le sang-PBS et sang-ouabaïne.....	131
Figure 50. Pourcentage de lyse des hématies en fonction de la nature du solvant mis en présence de sang.	133
Figure 51. Analyse par le test hémolytique d'extraits de tubes digestifs (TD) et du reste des chairs (RC) de saupe, de mullet, de castagnole, ainsi qu'un faux murex, sur des extraits dilués par 10, 20, 40, 80 et 160 et dopés avec de la PLTX (75 µg/kg). A : Pourcentage de lyse (PBS) B : concentration en estimée PLTXs.	136
Figure 52. Analyse des tubes digestifs d'oursins (1 à 5) par le test hémolytique. Les traits en rouge sont les résultats des analyses des mêmes échantillons réalisées par CL-SM/SM. La limite en pointillé est la limite de quantification en CL-SM/SM.	138
Figure 53. Localisation des isolats des cellules d' <i>Ostreopsis cf. ovata</i> (https://www.google.fr/maps/).....	144
Figure 54. Arbre phylogénétique des souches d' <i>Ostreopsis cf. ovata</i> . Les souches cultivées au laboratoire sont encadrées en rouge.....	145
Figure 55. Concentrations cellulaires (A) et concentrations toxiques (B) des souches IFR-OST-0.3 V et IFR-OST-0.1 V après 21 jours de culture, en présence de nitrate ou d'urée.	149
Figure 56. Suivi sur plusieurs repiquages de la souche de IFR-OST-0.3 V avec un enrichissement avec du nitrate ou avec de l'urée A : concentrations cellulaires d' <i>Ostreopsis cf. ovata</i> ; B : concentrations toxiques. * problème sur la quantification de l'échantillon.	150
Figure 57. Moyenne et écart-type sur 3 années des concentrations cellulaires (A) et toxiques (B) de chaque souche cultivée au laboratoire, pour un volume de culture de 175 mL et une période de récolte entre 20 et 24 jours de culture. 0.1 M = IFR-OST-0.1 M ; 0.2 M = IFR-OST-0.2 M ; 0.1 V = IFR-OST-0.1 V ;	

0.2 V = IFR-OST-0.2 V ; 0.3 V = IFR-OST-0.3 V ; 0.1 Mo = IFR-OST-0.1 Mo ; Z1 = CNR-OST- Z1 ; A1 = CNR-OST- A1.....	151
Figure 58. Profil toxinique des souches d' <i>Ostreopsis cf. ovata</i> : (A) Moyenne des souches IFR-OST- 0.1 V, IFR-OST- 0.2 V, IFR-OST-0.1-Mo, CNR-OST- Z1 et CNR-OST- A1 ; (B) IFR-OST-0.3 V; (C) IFR-OST-0.1 M; (D) IFR-OST-0.2-M.....	153
Figure 59. Schéma du prototype de la poche d'aquaculture utilisée pour la culture <i>Ostreopsis cf. ovata</i>	154
Figure 60. Photographie (A) et schéma (B) de la poche d'aquaculture en semi-continu.....	156
Figure 61. Culture d' <i>Ostreopsis cf. ovata</i> (A) dans un Fernbach ; (B) dans un erlenmeyer de 6 L et dans une bonbonne de 5 L.....	157
Figure 62. Mise en culture dans des Fernbachs : (A) avec des colliers de serrage ; (B) avec un goupillon ; (C) avec de la toile de nylon.....	158
Figure 63. Concentrations cellulaires et toxiniques pour chaque mode de culture réalisé en Fernbachs après 21 jours de culture d' <i>Ostreopsis cf. ovata</i> . Les témoins 1 et 2 sont des cultures simples, les autres ayant des objets dans le milieu de culture, des goupillons, des toiles bultex, des serflexs. Les barres d'erreurs représentent les écarts types des duplicats.....	158
Figure 64. Concentrations cellulaires et toxiniques des cultures effectuées dans un erlenmeyer de 6 L et dans une bonbonne de 5 L, après 15 jours de culture.....	160
Figure 65. Culture d' <i>Ostreopsis cf. ovata</i> dans des ballons de culture de 8 L, en fonction du temps : A : concentrations cellulaires et toxiniques ; B : profils toxiniques. * concentration toxinique au-dessous de la limite de détection.....	161
Figure 66. Concentrations cellulaires, profil toxinique et concentrations toxiniques durant la croissance de la souche IFR-OST-0.3 V (trois répliquats ont été prélevées dans chaque boîte de culture, les barres d'erreurs représentent la déviation standard).....	165
Figure 67. OVTXs détectées dans les extraits d' <i>Ostreopsis cf. ovata</i> . Les spectres SM HR QTOF ont été obtenus par fragmentation des ions di-chargés $[M+2H-H_2O]^{2+}$ des différentes OVTXs avec différentes énergies de collision : 20, 40 et 60 eV.....	174
Figure 68. Spectres de masse HR CID SM ² de l'ion dichargé $[M+2H]^{2+}$ de (A) l'ovatoxine-a m/z 1324,7543 et de (B) l'ovatoxine-h m/z 1317,7627 à une énergie de collision de 20 eV et spectres HR CID SM ² de l'ion trichargé $[M+H+Ca]^{3+}$ de l'ovatoxine-a m/z 896,1549 à une énergie de collision de (C) 30 eV et (E) 40 eV et de l'ovatoxine-h m/z 891,4935 à une énergie de collision de (D) 30 eV et (F) 40 eV.....	177
Figure 69. Structure de l'OVTX-a et ruptures obtenues en MS ² HR CID pour l'OVTX-a et pour l'OVTX-h.....	178
Figure 70. Protocole d'extraction liquide-liquide de la PLTX à partir du milieu de culture.....	183
Figure 71. (A) Suivi de l'élution par du méthanol des PLTXs de la résine HP20 et (B) calcul des rendements pour chaque étape.....	185
Figure 72. Suivi de l'élution de la PLTX à partir de la résine HP20 avec différents solvants d'élution : MeOH 100% et MeOH/eau 1/1 (v/v).....	186
Figure 73. Suivi de l'élution, par du MeOH, de la PLTX à partir : (A) de colonnes de différente nature, remplies avec de la résine HP20 et possédant des frités en téflon : colonne de verre, colonne de polypropylène et colonne de verre avec échantillon de PLTX additionné de formiate d'ammonium ; et (B) de colonnes de verre sans résine avec des frités de téflon accolés ou distants de 1 cm.....	188
Figure 74. Protocole d'évaluation du relargage des toxines dans le milieu de culture.....	190
Figure 75. Protocole de purification d'un extrait d' <i>Ostreopsis cf. ovata</i> par extraction liquide/liquide.....	192
Figure 76. Quantités d'OVTXs totales en fonction du volume d'élution. Les barres rouges correspondent aux fractions rassemblées par la suite.....	195
Figure 77. Comparaison du chromatogramme obtenu en CL/SM mode « full scan » de l'extrait brut (en rouge), de la fraction d'intérêt contenant les OVTXs après élution sur phase Sephadex LH-20 (en vert) et du blanc MeOH (en bleu).....	197
Figure 78. Quantité de toxines présentes dans chaque fraction en fonction du volume d'élution par (A) du MeOH 100 % et (B) un mélange MeOH/eau 1/1 (v/v). Les carrés de couleur correspondent aux fractions rassemblées par la suite.....	198
Figure 79. Quantités de toxines obtenues en fonction du volume d'élution.....	201
Figure 80. Gradients d'élution testés.....	207

Figure 81. Comparaison des chromatogrammes obtenus de la fraction a en fonction des pentes des gradients.....	207
Figure 82. Chromatogrammes analytique de la fraction b.....	208
Figure 83. Comparaison des chromatogrammes de la fraction b obtenus avec huit colonnes différentes (Tableau 29).....	209
Figure 84. Comparaison des chromatogrammes d'une fraction de la fraction b avec les trois colonnes : (A) Kinetex C ₁₈ (100×4,6 mm, 2,6 μm), (B) Kinetex PFP (150×2,1 mm, 2,6 μm) and (C) Uptisphere C ₁₈ -TF (250×4,6mm, 5μm).....	213
Figure 85. Comparaison des chromatogrammes de la fraction c , obtenus avec la colonne Uptisphere C ₁₈ -TF analytique (250×4,6 mm, 5 μm).....	216
Figure 86. Comparaison des chromatogrammes de la fraction c ; injectée 8 fois.....	217
Figure 87. Chromatogramme montrant les différentes fractions récoltées par le collecteur de fractions.	218
Figure 88. Comparaison des chromatogrammes des fractions obtenues après fractionnement des OVTXs.....	219
Figure 89. Comparaison des chromatogrammes (A) de l'étalon de PLTX ; (B) de la fraction d'OVTX-a obtenue après fractionnement.....	220
Figure 90 Chromatogramme montrant les différentes fractions récoltées par le collecteur de fraction.	221
Figure 91. Comparaisons des chromatogrammes d'une fraction b	225
Figure 92. Processus de purification proposé, ainsi que les pertes en ovatoxines observées pour chaque étape.....	228
Figure 93. Chromatogramme de l'extrait prepurifié sur une phase Sephadex LH-20 (fraction a) sur Uptisphere C ₁₈ -TF (250×4,6mm, 5μm). La séparation a été effectuée avec un gradient linéaire d'éluant pendant 40 min avec H ₂ O (éluant A) et ACN/eau 95% (éluant B) tous deux contenant 0,2 % d'acide acétique, de 20 à 50 % de B. Débit 1 mL/min. 20 μL de volume d'injection. La détection a été réalisée en SM « full scan » (m/z [300-1450]).....	272
Figure 94. Extraction du spectre à 12,3 minutes.	273
Figure 95. Extraction du spectre à 13,3 minutes.	274
Figure 96. Extraction du spectre à 15,2 minutes.	275
Figure 97. Extraction du spectre à 15,9 minutes.	276
Figure 98. Extraction du spectre à 16,9 minutes.	277
Figure 99. Extraction du spectre à 17,4 minutes.	278
Figure 100. Extraction du spectre à 26,7 minutes.	279
Figure 101. Extraction du spectre à 27,3 minutes.	280
Figure 102. Extraction du spectre à 27,9 minutes.	281
Figure 103. Extraction du spectre à 28,2 minutes.	282
Figure 104. Extraction du spectre à 28,8 minutes.	283
Figure 105. Extraction du spectre à 29,5 minutes.	284
Figure 106. Extraction du spectre à 30,1 minutes.	285

Liste des tableaux

Tableau 1. Principales phycotoxines et leurs différentes caractéristiques.	32
Tableau 2. Palytoxine et analogues produits par <i>Palythoa tuberculosa</i> , <i>Palythoa toxica</i> , <i>Chondria armata</i> , <i>Lophozozymus pictor</i> , <i>Ostreopsis lenticularis</i> , <i>Ostreopsis mascarenensis</i> , <i>Ostreopsis siamensis</i> et <i>Ostreopsis ovata</i> . NC : non connu.	62
Tableau 3. Description des différents paramètres des purifications réalisées sur Sephadex LH20.	91
Tableau 4. Transitions caractéristiques des p-PLTX-OVTXs recherchées en CL-SM/SM.	94
Tableau 5. Phases stationnaires et colonnes testées pour la séparation des OVTXs.	98
Tableau 6. Débits et temps isocratique utilisés pour chaque colonne testée.	99
Tableau 7. Préparation du milieu L1.	101
Tableau 8. Composition de la solution d'éléments traces utilisée pour la préparation du milieu L1.	101
Tableau 9. Composition de la solution de vitamines.	102
Tableau 10. Comparaison de la contamination des oursins en fonction de la prolifération cellulaire. (LD = 25 µg/kg)	128
Tableau 11. Pourcentage de lyse et concentration trouvées par le test hémolytique dans des extraits de tubes digestifs d'oursins, dilués et dopés. (* problème avec cet échantillon).	134
Tableau 12. Description des souches cultivées au laboratoire Phyc.	144
Tableau 13. Enrichissements ajoutés au milieu de culture.	147
Tableau 14. Comparaison entre les différents milieux de culture : accroissement cellulaire (cells.mL ⁻¹), concentration toxinique à 17 jours de culture et rapport entre les concentrations de p-PLTX et d'OVTX-a.	147
Tableau 15. Concentrations cellulaires et toxiques d' <i>Ostreopsis cf. ovata</i> après mise en culture dans 3 poches d'aquaculture.	155
Tableau 16. Résumé des résultats obtenus pour la souche IFR-OST-0.3 V avec les différents modes de culture, en fonction de la surface et du volume de culture : concentrations cellulaires, quantité théorique de toxines que l'on pourrait obtenir avec 100 % de rendement d'extraction et de purification par récipient et estimation de quantité de toxines pour un volume de 10 L.	163
Tableau 17. Formules élémentaires, temps de rétention, et ions monoisotopiques (<i>m/z</i>) des OVTXs trouvées dans un extrait d' <i>Ostreopsis cf. ovata</i> de la souche française IFR-OST-0.3 V et déterminés par CL-HRSM-QTOF en mode positif <i>m/z</i> [100 – 1700].	172
Tableau 18-a. Attribution des fragments des cotés A et B issus des spectres HR CID SM ² aux ruptures caractéristiques de l'OVTX-a et de l'OVTX-h.	179
Tableau 19. Caractéristiques de la résine Diaion HP20 (données fournisseur).	182
Tableau 20. Moyennes des pourcentages de recouvrement obtenus par extraction liquide-liquide avec du butanol, coefficients de variations et recouvrement sur les 10 extractions réalisées sur les deux jours d'analyse.	183
Tableau 21. Pourcentage de récupération des toxines à chaque étape de l'extraction liquide-solide (SPE) avec une résine HP20, pour les différents solvants d'élution testés (LD : 0,015 µg.mL ⁻¹).	186
Tableau 22. Pourcentage de récupération de la PLTX à chaque étape (chargement, rinçage et élution) sur tous les types de colonnes testés (plastique, verre, verre + solution de formiate d'ammonium (AF) et sans résine) (LD = 0,015 µg.mL ⁻¹).	188
Tableau 23. Quantités et pourcentages de toxines récoltées avec chaque technique d'extraction.	190
Tableau 24. Rendement en p-PLTX-OVTXs et bilans massiques de chaque fraction obtenue (aqueuse et organique), acidifiée et non acidifiée.	192
Tableau 25. Pourcentages moyens en p-PLTX-OVTXs obtenus dans les filtrats pour chaque filtre ainsi que les coefficients de variations correspondants.	193
Tableau 26. Rendement en p-PLTX-OVTXs et bilan massique de chaque fraction rassemblée.	195
Tableau 27. Bilan massiques, rendement en toxines et estimation des teneurs en toxines pour chaque fraction rassemblée ainsi que le total de toxines récupérées pour chaque type d'élution.	199

Tableau 28. Récapitulatif des différentes étapes de purifications sur phase Sephadex LH-20 effectuées à partir d'extraits d' <i>Ostreopsis cf. ovata</i> : masse de phase utilisée, volumes d'élutions des p-PLTX-OVTXs et utilisations des fractions d'intérêts obtenues.....	202
Tableau 29. Résultat de la qualification des différentes colonnes analysées par le test simplifiée d'Engelhardt [203].....	205
Tableau 30. Résumé des résolutions obtenues entre les pics qui ont pu être séparés sur les différentes colonnes. (*) pas de séparation entre l'OVTX-d et l'OVTX-e ; (**) épaulement de pics ; (***) mauvaise séparation entre l'OVTX-a et l'OVTX-a'.....	210
Tableau 31. Quantité de toxines et proportion des OVTXs dans la fraction d de départ puis, après fractionnement, après rassemblement des fractions contenant les mêmes OVTXs et après concentration des fractions par évaporation partielle.....	222
Tableau 32. Analyse de variance.....	261
Tableau 33. Moyenne des observations corrigées.....	261
Tableau 34. Composition de l'enrichissement K.....	263
Tableau 35. Composition de la solution de métaux traces de l'enrichissement K.....	263
Tableau 36. Attribution des fragments obtenus à partir des ruptures obtenues dans les spectres CID des OVTX-a, -b, -c, -d et -e des ions trichargés. Les formules élémentaires des ions mono-isotopiques (m/z) sont reportées dans leur état de charge (1+, 2+, 3+), et les différences entre les valeurs expérimentales et théoriques (exprimées en ppm).....	265
Tableau 37. Attribution des fragments obtenus à partir des ruptures obtenues dans les spectres CID des OVTX-a, -b, -c, -d et -e des ions dichargés. Les formules élémentaires des ions mono-isotopiques (m/z) sont reportées dans leur état de charge (1+, 2+, 3+), et les différences entre les valeurs expérimentales et théoriques (exprimées en ppm).....	266
Tableau 38. Attribution des fragments obtenus à partir des ruptures obtenues dans les spectres CID des OVTX-a, -b, -c, -d et -e des ions dichargés. Les formules élémentaires des ions mono-isotopiques (m/z) sont reportées dans leur état de charge (1+, 2+, 3+), et les différences entre les valeurs expérimentales et théoriques (exprimées en ppm). a = abondance faible.....	268
Tableau 39. Attribution des fragments obtenus à partir des ruptures obtenues dans les spectres CID des OVTX-a, -b, -c, -d et -e des ions trichargés. Les formules élémentaires des ions mono-isotopiques (m/z) sont reportées dans leur état de charge (1+, 2+, 3+), et les différences entre les valeurs expérimentales et théoriques (exprimées en ppm). a = abondance faible.....	269
Tableau 40. Attribution des fragments obtenus à partir des ruptures obtenues dans les spectres CID des OVTX-a, -b, -c, -d et -e des fragments internes. Les formules élémentaires des ions mono-isotopiques (m/z) sont reportées dans leur état de charge (1+, 2+, 3+), et les différences entre les valeurs expérimentales et théoriques (exprimées en ppm). a = abondance faible. DLR : nombre de doubles liaisons relatives.....	270

Liste des abréviations

A :	asymétrie
AccQ :	agent de dérivation de fluorescence (6-Aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate)
ACN :	acétonitrile
AD :	acide domoïque
AO :	acide okadaïque
AZA :	azaspiracide
BTX :	brévétotoxines
BuOH :	butanol
C-CTX :	ciguatoxine des caraïbes
cf. :	<i>confer</i>
CID :	« <i>Collision Induced Dissociation</i> » (fragmentation induite par un gaz inerte)
CL :	chromatographie liquide.
CLHP :	chromatographie liquide haute performance
CLUHP :	chromatographie liquide ultra haute performance
CXP :	« cells exit potentiel » (potentiels de sortie de cellule)
DAD :	« diode array detector » (détecteur à barrettes diode)
DL₅₀ :	dose létale médiane.
DMA :	diméthylaniline
DP :	« declustering potentiel »
DTX :	dinophysistoxine
DV/AP :	dorso-ventrale / antéro-postérieur
E :	éthylbenzène
E.C. :	énergie de collision
EDTA :	éthylène diamine tétra acétique
EFSA :	« European Food Safety Authorities » (Autorité européenne de sécurité des aliments)
FAB :	« Fast Atom Bombardment » (ionisation par bombardement d'atomes neutres)
FLD :	détection par fluorescence
GYM :	gymnodimine
HAB :	« Harmful algae bloom » (efflorescences d'algue toxique)
HILIC :	« hydrophilic interaction liquid chromatography » (chromatographie à interaction hydrophile)
HR :	haute résolution.
i.p. :	intrapéritonéale
IAFM :	intoxication amnésiante par les fruits de mer
I-CTX :	ciguatoxine de l'océan indien
IDFM :	intoxication diarrhéique par les fruits de mer
Ifremer :	Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer
IPC :	intoxication par la ciguatera

IPFM : intoxication paralysante par les fruits de mer
LD : limite de détection
LQ : limite de quantification
MALDI : « *Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation* » (désorption-ionisation laser assistée par matrice)
McTX : mascarenotoxine
MEB : microscope à balayage électronique
MeOH : méthanol
NOAEL : « no observable adverse effect level » (dose sans effet toxique observable)
OST : ostréocine
OVTX : ovatoxine.
PE : potentiel d'entrée
PBS : « phosphate buffer saline » (tampon salin phosphate)
P-CTX : ciguatoxine du pacifique
PCR : « *Polymerase Chain Reaction* » (réaction en chaîne par polymérase)
PF : poids frais
Phyc : laboratoire phycotoxine
PLTX : palytoxine.
PMT : palme, masque, tuba
PnTX : pinnatoxine
p-PLTX : putative-palytoxine (palytoxine d'*Ostreopsis cf. ovata*)
p-PLTX-OVTXs : groupe comprenant la putative-palytoxine et les ovatoxines, produites par *Ostreopsis cf. ovata*
PTX : pecténotoxine
RC : reste des chairs
REPHY : Réseau de surveillance du Phytoplancton et des Phycotoxines
RMN : résonance magnétique nucléaire
SM : spectrométrie de masse
SPATT : « Solid phase adsorption toxin tracking »
SPE : « solid phase extraction » (extraction sur phase solide)
SPX : spirolide
STX : saxitoxine
TD : tube digestif
TOF : « time of flight » (temps de vol)
UV : ultraviolet
YTX : yessotoxine

Souches d'*Ostreopsis cf. ovata* :

IFR-OST-0.1 M : Souche provenant de Morgiret (France), isolée en 2008

IFR-OST-0.2 M : Souche provenant de Morgiret (France), isolée en 2009

IFR-OST-0.1 V : Souche provenant de Villefranche-sur-Mer (France), isolée en 2008

IFR-OST-0.2 V : Souche provenant de Villefranche-sur-Mer (France), isolée en 2009

IFR-OST-0.3 V : Souche provenant de Villefranche-sur-Mer (France), isolée en 2011

IFR-OST-0.1 Mo : Souche provenant de Monaco, isolée en 2011

CNR-OST-Z1 : Souche provenant des Baléares (Espagne), isolée en 2008

CNR-OST-A1 : Souche provenant des Gioia Tauro (Italie), isolée en 2008

Résumé

Les dinoflagellés du genre *Ostreopsis* sont connus dans les zones tropicales pour être à l'origine d'intoxications alimentaires, suite à l'accumulation de palytoxine dans les produits de la mer. Probablement en lien avec le changement climatique, *Ostreopsis* sp. est de plus en plus présent depuis 2006 en Méditerranée française. Dans le cadre de la thèse, les études terrain effectuées durant les étés 2011 et 2012, ont montré que : i) les souches d'*Ostreopsis* cf. *ovata* présentent un profil toxinique complexe composé de la palytoxine et surtout 90 % d'ovatoxines (OVTX-a, -b, -c, -d, -e). Un nouvel analogue (OVTX-h) a également été détecté ; ii) les concentrations cellulaires et toxiniques d'*O. ovata* diminuent avec la profondeur ; iii) différents produits de la mer accumulent les toxines, pouvant présenter un risque réel pour les baigneurs et les consommateurs. Comme il n'existe pas d'étalon d'OVTXs, un des objectifs de la thèse a porté sur le développement d'une procédure de leur purification à partir des extraits d'*O. ovata*. Pour cela, des conditions optimales de culture ont été recherchées permettant une production maximale d'OVTXs (300 pg/cellule). Les différentes étapes d'extraction et de concentration développées ont permis d'obtenir une fraction très riche en toxines. La purification finale a été menée par chromatographie liquide/spectrométrie de masse/détection UV en utilisant une colonne Uptisphere C₁₈-TF. Les travaux de thèse ont permis d'acquérir des données qui vont contribuer à l'analyse de l'impact sanitaire puisque actuellement, au niveau international, il existe très peu de données permettant d'établir des seuils d'alerte d'*Ostreopsis* sp. et de sécurité sanitaire.

Mots clés : *Ostreopsis ovata*, ovatoxines, purification, contamination des produits de la mer, chromatographie liquide/spectrométrie de masse.

Abstract

Dinoflagellates of genus *Ostreopsis* are known in tropical areas to provoke food intoxication, after palytoxin accumulation in seafood. Probably in link with climatic changes, *Ostreopsis* sp. is increasingly present in French Mediterranean since 2006. In the context of the PhD, the studies in natural environment, in summer 2011 and 2012, showed that: i) *Ostreopsis* cf. *ovata* strain presented a complex toxic profile, including palytoxin and especially ovatoxins (OVTX-a, -b, c, -d, -e). A new analog (OVTX-h) was detected; ii) cell and toxic concentrations decreased with depth; iii) different seafood accumulated toxins, which could represent real risk for bathers and consumers. Because there are no standards for OVTXs, one of the PhD goals was to develop a OVTXs purification protocol from *Ostreopsis* cf. *ovata* extracts. For this purpose, optimal culture conditions were investigated, allowing a maximal production of OVTXs (300 pg/cell). Different extraction and concentration steps developed had permitted to obtain a toxin rich fraction. Final purification was performed using liquid chromatography/mass spectrometry/ UV detection, using Uptisphere C₁₈-TF column. PhD researches have allowed to acquire data, which contribute to analysis of sanitary impact, since nowadays, at international level, there are just few data allowing to establish *Ostreopsis* sp. alert and sanitary security threshold.

Keys words: *Ostreopsis ovata*, ovatoxins, purification, seafood contamination, liquid chromatography / mass spectrometry.

Introduction générale et objectifs de l'étude

Depuis des millénaires, l'Homme exploite les mers et les océans comme ressource nourricière et d'expansion, tout autour de la planète. De nos jours, le phénomène de globalisation, ainsi que l'avancée des technologies de pointe, entraînent une augmentation du marché mondial des produits de la mer. La production globale de la pêche et de l'aquaculture a été multipliée par 7 en 60 ans, passant de 20 millions de tonnes en 1950, à plus de 154 millions de tonnes en 2011, fournissant 18,8 kg de produits de la mer par habitant et par année [1]. Les produits de la mer se réfèrent à toutes formes de vie marine, animale ou végétale, utilisées comme source de nutrition pour l'Homme, dont les poissons, les mammifères marins et les mollusques (crustacés et échinodermes), de hautes mers ou d'aquaculture [2]. A la base des chaînes alimentaires marines, les microalgues sont une source directe ou indirecte de nourriture pour des organismes marins supérieurs et un acteur majeur des écosystèmes marins.

Mais l'exploitation de ces ressources est une arme à double tranchant, lorsque la santé humaine est atteinte. En effet, certaines espèces de microalgues (comprenant le phytoplancton et le microphytobenthos) sont capables de produire des biotoxines, appelées alors phycotoxines, qui peuvent être absorbées par les animaux marins, en particulier par les coquillages. Les mollusques bivalves filtreurs, parmi lesquels les huîtres, les moules, les palourdes, les coquilles Saint-Jacques..., se nourrissent par filtration de l'eau de mer et retiennent les particules en suspension dans le milieu aquatique, dont les microalgues et les toxines, qui les accumulent alors dans leurs tissus adipeux. Ils entrent ainsi dans la chaîne alimentaire marine, dès lors que les mollusques sont ingérés par leurs prédateurs. Les toxines d'algues peuvent avoir différents effets sur l'Homme, du simple effet indésirable jusqu'à la mort. Chaque année, on décompte dans le monde entier entre 50 000 et 500 000 cas d'intoxications humaines liés à l'exposition à des biotoxines marines [3].

Les espèces marines productrices de phycotoxines susceptibles de s'accumuler dans les produits de la mer et consommés par l'Homme sont actuellement cantonnées à deux classes de microalgues eucaryotes, les Dynophycées (ou dinoflagellés ; microalgues possédant deux flagelles orientés perpendiculairement pour se déplacer) et les Diatomophycées (ou diatomées ; caractérisées par un squelette de silice) [4]. Ces deux classes de microalgues renferment également des organismes toxiques pour la faune. Il existe une grande variété de toxines qui sont synthétisées par les dinoflagellés ou les diatomées. En 1995, moins de 2 % de toutes les espèces de microalgues, comprenant environ 60 à 80 espèces de dinoflagellés et un petit nombre de diatomées, sont capables de produire des phycotoxines [4]. À l'heure actuelle, la raison pour laquelle les microalgues produisent des toxines reste obscure [5]. Les

hypothèses sont qu'elles pourraient être produites dans un but de compétition pour l'espace ou de prédation [6].

Il est largement admis que les efflorescences d'algues toxiques (« Harmful Algal Bloom » en anglais, connu par le sigle HAB) subissent un accroissement autour du globe, aussi bien en ce qui concerne leur taille et leur durée, que leur distribution géographique [7]. Plusieurs raisons peuvent être attribuées à ce phénomène : une meilleure et plus large surveillance, l'eutrophisation des côtes d'origine anthropique, le transport des eaux de ballast par les bateaux ou encore l'élévation de la température due au changement climatique [2]. Le phytoplancton croît dans une plage de température préférentielle. L'élévation de température dans des zones tempérées pourrait ouvrir de nouvelles niches écologiques pour les HABs [8]. C'est le cas des espèces de dinoflagellés du genre *Ostreopsis*, producteur de la palytoxine (PLTX) et de ses analogues. La palytoxine fait partie des toxines marines parmi les plus toxiques connues, avec une forte activité biologique pour de faibles concentrations, qui est dépendante de la voie d'administration [9]. Avec un poids moléculaire voisin de 2680 Da, la palytoxine est une grosse molécule, de structure complexe, polyhydroxylée, ayant des propriétés amphiphiles.

Connues à l'origine sous les latitudes tropicales, les espèces d'*Ostreopsis* prolifèrent désormais sur les côtes du pourtour méditerranéen [10-15]. En effet, ces microalgues sont observées depuis 2005 sur les côtes espagnoles, italiennes et françaises, avec une multiplication intense, jamais rencontrée auparavant sur les côtes méditerranéennes. À ces événements, ont été associés des cas de mortalités d'invertébrés marins, mais aussi des cas d'intoxications par inhalation et/ou des irritations cutanées [16]. Par exemple, à Marseille en août 2006, des cas d'intoxications cutanées sur des plongeurs ont été rapportés, conduisant à la fermeture des plages et à l'interdiction de la consommation de fruits de mer [17]. Bien que des cas d'intoxications alimentaire aient été décrits dans la littérature, notamment à Madagascar [73], il faut noter qu'aucun cas d'intoxication alimentaire dû à la palytoxine ou à ses analogues n'a été reporté en Méditerranée à l'heure actuelle.

Les espèces du genre *Ostreopsis* trouvent leur niche écologique près des plages, sur des substrats rocheux ou des blocs de pierres disposés pour lutter contre l'érosion des plages. Les cellules sont épiphytes/benthiques, c'est-à-dire qu'elles vivent sur les macroalgues ou directement sur les substrats abiotiques. Avec une prolifération rapide, les cellules peuvent se détacher du substrat, se retrouver dans la colonne d'eau et former des agrégats denses, pouvant provoquer différents types d'intoxications [16]. En effet, ces efflorescences sont

associées à de sévères irritations cutanées et à des problèmes respiratoires chez l'Homme, à cause de la dispersion des microalgues ou de ses toxines dans l'air. De plus, ces toxines peuvent s'accumuler dans différents organismes marins, comme les mollusques, les échinodermes, les crustacés ou les poissons [14, 18-20], et présenter un risque réel d'intoxication alimentaire chez le consommateur. Elles provoqueraient alors des vomissements, des difficultés respiratoires, des problèmes rénaux, et dans quelques cas sévères, ces symptômes sont suivis par un décès.

La première mise en évidence d'*Ostreopsis sp.* en Méditerranée remonte aux années 70, où elle a été observée dans la baie de Villefranche-sur-Mer (France) [16]. L'absence de surveillance régulière à cette époque ne permet pas de savoir quand cette espèce a été introduite, ou si elle a toujours été présente à de faibles concentrations. Depuis une dizaine d'années, des efflorescences régulières de cette microalgue sont observées chaque été sur le pourtour méditerranéen, et sont associées à des cas d'intoxications de personnes exposées aux aérosols marins ou de plongeurs, de plus ou moins grande ampleur. C'est ainsi, qu'en 2005 en Italie, 200 personnes ont nécessité une attention médicale, suite à une exposition à des aérosols marins, qui coïncidait avec une forte prolifération d'*Ostreopsis conf. ovata* ($1,6 \cdot 10^6$ cellule.L⁻¹) (Di Girolamo et al, dans [21]).

En France, l'espèce *Ostreopsis cf. ovata* prolifère de manière récurrente chaque été depuis 2006. Cette espèce produit de la palytoxine (PLTX) ainsi que six autres toxines de structure proche, nommées ovatoxines-a, -b, -c, -d, -e, -f (OVTX-) et récemment décrites dans la littérature [21-23]. Cependant, il faut noter que, compte tenu du grand nombre de stéréoisomères potentiels pouvant exister pour la palytoxine, et compte tenu du fait qu'on ne puisse pas exclure qu'il s'agisse du même isomère de la palytoxine que celui déjà décrit, cet analogue est nommé dans la littérature putative-palytoxine (p-PLTX) [24]. Des OVTXs décrites, seule la structure de l'OVTX-a a été élucidée, à la fois par spectrométrie de masse haute résolution (SM-HR) et par résonance magnétique nucléaire (RMN) [22, 25, 26]. Pour les autres OVTXs, seules les différences, en termes de formule brute et/ou d'indication de la partie de la molécule qui diffère de l'OVTX-a, ont été déterminées par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse (CL-SM). Seul l'étalon non certifié de palytoxine était disponible jusqu'à fin 2013, pour la détermination de la concentration en OVTXs dans les échantillons d'origine marine. Or, la PLTX ne représente que 10% du profil toxique d'*Ostreopsis cf. ovata*. C'est pourquoi, pour la quantification des ovatoxines, le résultat est exprimé en équivalent-palytoxine, en considérant que les OVTXs se fragmentent en

spectrométrie de masse (SM) de la même manière que la PLTX et qu'elles présentent le même facteur de réponse en SM. Cependant, afin de déterminer des seuils d'alerte et de sécurité sanitaire, il est indispensable de disposer d'étalons d'ovatoxines et de matériaux de référence certifiés pour développer et valider des méthodes de quantification applicables en routine, mais aussi pour mener des études toxicologiques permettant d'évaluer le risque de l'impact des OVTXs chez le consommateur, en comparaison avec les données acquises sur la PLTX. En effet, à l'heure actuelle, aux niveaux européen et international, il n'existe aucune réglementation régissant la gestion des produits de la mer à l'égard de la contamination par les toxines d'*Ostreopsis cf. ovata*, appartenant à la famille des p-PLTX-OVTXs.

Dans ce contexte, cette thèse avait trois objectifs :

- l'acquisition des données sur les niveaux d'accumulation en p-PLTX et en OVTXs dans différentes espèces de la chaîne alimentaire,
- l'obtention d'un grand volume de culture d'*Ostreopsis cf. ovata* avec une production maximale de toxines,
- le développement d'une procédure de purification des OVTXs, afin de disposer ultérieurement d'étalons pour le développement analytique et pour les études toxicologiques, afin notamment d'estimer la toxicité des ovatoxines

La thèse comporte cinq chapitres :

Le **chapitre 1** développe un état de l'art concernant, dans une première partie, les risques associés à la consommation de produits de la mer, en décrivant les différentes phycotoxines marines ainsi que leur distribution dans le monde et en France. Dans une seconde partie, les différents aspects concernant *Ostreopsis* sp. sont présentés, les toxines produites et leur mode d'action, ainsi que les méthodes de détection.

Le **chapitre 2** décrit les protocoles utilisés afin d'atteindre les objectifs de la thèse listés plus haut.

Le **chapitre 3** présente les résultats des données « terrains » acquises sur les niveaux d'accumulation de la p-PLTX et des OVTXs, dans différentes espèces de la chaîne alimentaire, ainsi que les profils toxiques des cellules d'*Ostreopsis cf. ovata*, à la fois en

suspension dans la colonne d'eau et fixées sur les macroalgues, lors des efflorescences d'*Ostreopsis* cf. *ovata* des étés 2011 et 2012.

Le **chapitre 4** décrit les modes de culture d'*Ostreopsis* cf. *ovata* dans différents volumes, permettant l'obtention d'une production maximale de toxines. Différents supports ont notamment été étudiés pour la culture de la microalgue, ainsi que l'intérêt et les moyens à mettre en œuvre pour augmenter les volumes de culture. La quantité de biomasse obtenue au cours de ces essais a été utilisée pour la purification des ovatoxines.

Le **chapitre 5** présente la méthodologie de purification et d'isolement des ovatoxines mise au point au cours de cette thèse.

Chapitre 1 – État de l'art

1. Toxines d'algues

Lorsque les efflorescences d'algues toxiques (HAB) apparaissent sur le littoral, elles peuvent avoir des effets négatifs, d'une part, en provoquant de sévères pertes économiques pour l'aquaculture, la pêche et le tourisme, et d'autre part, impacter sur la santé humaine et l'environnement [5]. En effet, en s'accumulant dans les produits de la mer, les phycotoxines entrent dans la chaîne alimentaire humaine et peuvent provoquer des intoxications plus ou moins graves chez le consommateur. Dans le cadre de la réglementation européenne, dès que la teneur en toxines réglementées dépasse le seuil de sécurité sanitaire officiel, l'administration procède à la fermeture des zones de production de coquillages affectées par les algues toxiques.

Les HABs ont des impacts différents selon les familles de toxines produites. Deux types de classifications ont été proposés pour les toxines de microalgues, soit en fonction de leur structure chimique, soit selon les signes cliniques d'intoxication. L'**Intoxication Par la Ciguatéra** (IPC) est le syndrome dont la description est la plus ancienne et dont l'intoxication a lieu *via* l'ingestion de chairs de poissons ; les **Intoxications Paralytiques par les Fruits de Mer** (IPFM) provoquent des paralysies ; les **Intoxications Neurologiques par les Fruits de Mer** (INFM) induisent diverses atteintes neurologiques ; les **Intoxications Diarrhéiques par les Fruits de Mer** (IDFM) déclenchent des désordres intestinaux ; les **Intoxications Amnésiques par les Fruits de Mer** (IAFM) occasionnent des pertes de mémoire. D'autres classes de toxines peuvent également être répertoriées, sur la base de leurs symptômes, notamment les toxines du groupe palytoxine, mais aussi des toxines ne présentant pas de cas d'intoxications avérées, comme les yessotoxines et les imines cycliques (Tableau 1).

Au niveau international, cinq groupes de phycotoxines à l'origine de ces intoxications sont soumis actuellement à une réglementation et donc à une surveillance obligatoire : (a) les toxines amnésiantes (IAFM, groupe acide domoïque) ; (b) les toxines paralysantes (IPFM, groupe saxitoxines) ; (c) toxines lipophiles incluant les toxines diarrhéiques (IDFM, groupes acide okadaïque et azaspiracides) et les toxines dites « classées » IDFM (groupes pecténotoxines et yessotoxines) ; (d) les brevéttoxines (INFM, groupe brevéttoxine) et (e) les ciguatoxines (IPC). En France métropolitaine, le réseau de surveillance du phytoplancton et des phycotoxines (REPHY) de l'Ifremer s'intéresse à trois familles de toxines réglementées (IAFM, IPFM et IDFM), ainsi qu'à d'autres groupes de toxines non réglementées, qui font principalement l'objet d'un suivi dans les coquillages, dans le but d'acquérir des séries de données, pour une évaluation du risque, et pour la mise en place d'une réglementation. C'est

le cas du groupe des palytoxines lié aux efflorescences d'*Ostreopsis sp.* en Méditerranée Nord occidentale, ainsi que les imines cycliques (pinnatoxines, spirolides) liées aux efflorescences de *Vulcanodinium rugosum* [27]. L'optimisation des données sur les niveaux d'accumulation de ces toxines dans les produits de la mer, et l'obtention d'étalons et de matériels de référence, pour la validation des méthodes d'analyses de ces toxines émergentes, sont actuellement les principaux objectifs, au niveau européen, pour pouvoir mettre en place des seuils d'alertes et de sécurité sanitaire.

En plus de leurs impacts nocifs sur la santé humaine, quelques toxines marines induisent également de sérieuses perturbations écologiques, notamment par la mortalité massive de poissons, de coquillages, de mammifères marins, d'oiseaux, et d'autres organismes vivant près de la mer.

Tableau 1. Principales phycotoxines et leurs différentes caractéristiques.

Groupe de toxines (Abréviation)	Organismes producteurs	Lipophilicité	Formule	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	Intoxication
Acide domoïque (AD)	<i>Pseudo-nitzschia spp.</i>	Hydrophile	C ₁₅ H ₂₁ NO ₆	311	IAFM
	<i>Alexandrium spp.</i>				
Saxitoxine (STX)	<i>Gymnodinium catenatum</i>	Hydrophile	C ₁₀ H ₁₇ N ₇ O ₄	299	IPFM
	<i>Pyrodinium bahamense</i>				
Palytoxine (PLTX)	<i>Ostreopsis spp.</i>	Amphiphile	C ₁₂₉ H ₂₂₃ N ₃ O ₅₄	2680	Neurotoxique
Acide okadaïque (AO)	<i>Dynophysis spp.</i>	Lipophile	C ₄₄ H ₆₈ O ₁₃	805	IDFM
	<i>Prorocentrum spp.</i>				
Azaspiracide-1 (AZA-1)	<i>Azadinium spinosum</i>	Lipophile	C ₄₇ H ₇₁ NO ₁₂	842	IDFM
Brévétoxine-2 (BTX-2)	<i>Karenia brevis</i>	Lipophile	C ₅₀ H ₇₀ O ₁₄	895	INFM
	<i>Chattonella spp.</i>				
Ciguatoxine-P (P-CTX-1)	<i>Gambierdiscus toxicus</i>	Lipophile	C ₆₀ H ₈₆ O ₁₉	1111	IPC
Gymnodimine (GYM)	<i>Karenia selliformis</i>	Lipophile	C ₃₂ H ₄₅ NO ₄	508	Mal connue
Pecténotoxine-2 (PTX-2)	<i>Dynophysis spp.</i>	Lipophile	C ₄₇ H ₇₀ O ₁₄	859	Classée IDFM
	<i>Prorocentrum spp.</i>				
Pinnatoxine-A (PnTX-A)	<i>Vulcanodinium rugosum</i>	Lipophile	C ₄₁ H ₆₁ NO ₉	712	Mal connue
Prorocentrolide (PCL)	<i>Prorocentrum spp.</i>	Lipophile	C ₅₆ H ₈₅ NO ₁₃	980	Mal connue
Spirolide (SPX)	<i>Alexandrium ostenfeldii</i>	Lipophile	C ₄₁ H ₆₁ NO ₇	680	Mal connue
Yessotoxine (YTX)	<i>Protoceratium reticulatum</i> ,	Lipophile	C ₅₅ H ₈₂ O ₂₁ S ₂	1143	Classée IDFM
	<i>Lingudinium polyedrum</i>				

1.1. Toxines lipophiles (dont les toxines diarrhéiques)

Les différentes phycotoxines peuvent être classées selon le syndrome qu'elles provoquent, qu'il soit diarrhéique, paralysant, amnésiant, neurologique ou ciguatérique. Contrairement aux autres familles, les toxines diarrhéiques font partie d'un ensemble de familles baptisées « toxines lipophiles », regroupant les toxines du syndrome IDFM (groupes acide okadaïque et azaspiracides), les toxines classées diarrhéiques (groupes pecténotoxines et yessotoxines) et des neurotoxines à action rapide (groupes imine cyclique). Les toxines appartenant à ce groupe possèdent des propriétés physico-chimiques voisines, mais des activités biologiques différentes [28]. Seules les toxines diarrhéiques et les toxines classées diarrhéiques sont actuellement réglementées au niveau européen.

1.1.1. Groupe acide okadaïque

Le groupe de l'acide okadaïque (AO) est composé de l'**acide okadaïque** ainsi que de ses analogues, les **dinophysistoxines** (DTXs). L'Intoxication Diarrhéique par les Fruits de Mer (IDFM) est un syndrome gastro-intestinal sévère, provoqué par l'ingestion de coquillages contaminés principalement par le groupe de toxines auquel appartiennent l'acide okadaïque (AO) et les dinophysistoxines (DTX). Ce type d'intoxication est caractérisé principalement par des diarrhées, mais aussi par des nausées, des vomissements et des crampes abdominales, survenant très peu de temps (30 min) après leur ingestion [29]. La première mise en évidence de toxines diarrhéiques date de 1978 au Japon, d'où l'acide okadaïque a été isolé pour la première fois à partir d'éponges *Halichondria okadaï* et dont il a gardé le nom [30]. Plus tard, il a été montré que ces toxines sont en réalité produites par des dinoflagellés appartenant au genre *Dinophysis* principalement, mais aussi par les dinoflagellés benthiques du genre *Prorocentrum* [31, 32]. Des syndromes d'intoxication par des toxines diarrhéiques ont été rapportés partout dans le monde ; en Europe, au Canada, en Amérique du Sud, au Japon et en Afrique du Nord [2]. Le vecteur habituel de l'AO et de ses dérivés sont les bivalves filtreurs comme les moules, les coquilles Saint-Jacques, les huîtres ou les palourdes, qui accumulent les toxines dans leurs tissus adipeux.

Chimiquement, l'AO est un composé polyéther lipophile possédant un groupement acide carboxylique terminal (carbone C1) et un assemblage de trois anneaux tri-spiro (deux cycles

reliés par un atome). La différence entre l'AO et ses analogues est liée aux nombres des groupements méthyles (CH_3) et/ou à leur position (Figure 1). D'autres analogues sont également impliqués dans le syndrome diarrhéique, mais ils sont suspectés d'être des précurseurs de ces toxines ou des produits de métabolisation par les coquillages [33].

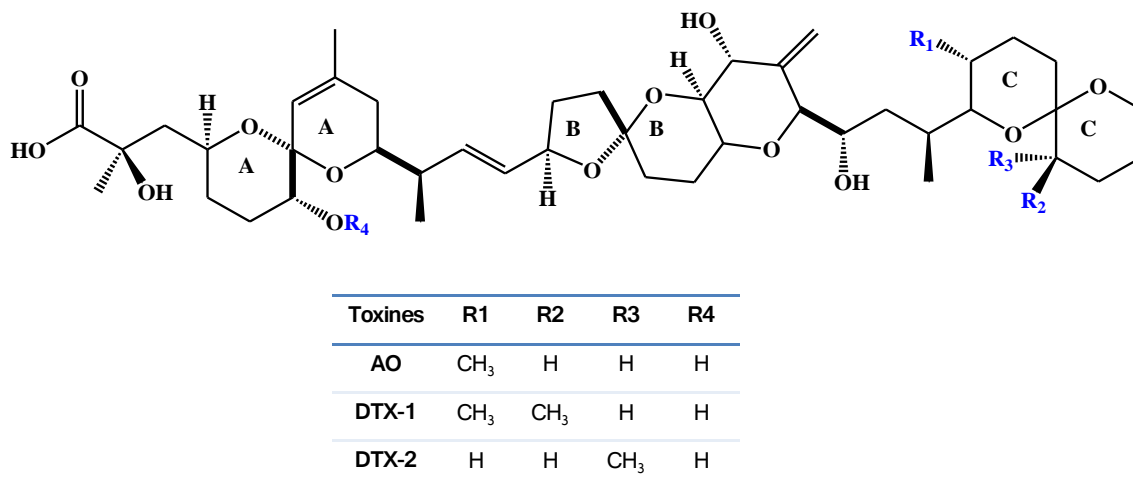


Figure 1. Formules chimiques des principales toxines du groupe acide okadaïque produites par les microalgues.

Dans le groupe de l'AO, les composés les plus toxiques sont l'acide okadaïque, la dinophysistoxine-1 (DTX-1) et la dinophysistoxine-2 (DTX-2). Le mécanisme d'action diarrhéique ainsi que l'activité promotrice de tumeur de l'AO et de la DTX-1 sont principalement expliqués par leur effet inhibiteur contre la protéine phosphatase (ser/tr), impliquée dans la régulation de la plupart des cellules [34].

La réglementation concernant l'AO et ses dérivés établit que les exploitants du secteur alimentaire doivent veiller à ce que les mollusques bivalves mis sur le marché de la consommation humaine ne contiennent pas plus de $160 \mu\text{g}$ d'équivalent AO par kg, déterminé par LC-MS/MS dans l'ensemble des chairs ou dans toute partie consommée séparément [35].

1.1.2. Groupe azaspiracide

L'intoxication par les azaspiracides (AZA) est le syndrome associé à l'ingestion de fruits de mer le plus récemment découvert. Cette intoxication, de type diarrhéique, est apparue pour la première fois en 1995, aux Pays Bas, après ingestion de moules irlandaises (*Mytilus edulis*) [36]. Depuis, ces toxines ont été détectées en Europe, surtout en Irlande où la contamination des moules est récurrente, au nord-ouest de l'Afrique et au Chili [2]. Bien que

la consommation de mollusques contaminés par les AZAs ait causé plusieurs problèmes de santé publique, ce n'est qu'en 2003 que des AZAs ont été détectés pour la première fois dans un échantillon de phytoplancton (*Protoperdinium crassipes*). Cependant, il est apparu que ce dinoflagellé n'était pas l'organisme producteur, mais un petit dinoflagellé du genre *Azadinium*, qui a été isolé pour la première fois en 2007 au cours d'une campagne de prélèvement en Mer du Nord [37].

Les AZAs sont des molécules composées d'une amine cyclique (cycle (A)) appelée aza, un unique assemblage tri-spiro (S), et d'un acide carboxylique aliphatique (C1), d'où elles tirent leur nom : AZA-SPIR-ACIDE [37] (Figure 2). Un total de 32 analogues a été reporté, parmi lesquels seulement 6 ont été isolés et structurellement élucidés (AZA-1 à 6) [33, 38]. Les structures des autres analogues ont été déduites uniquement à partir des différences de fragmentation des spectres obtenus en spectrométrie de masse.

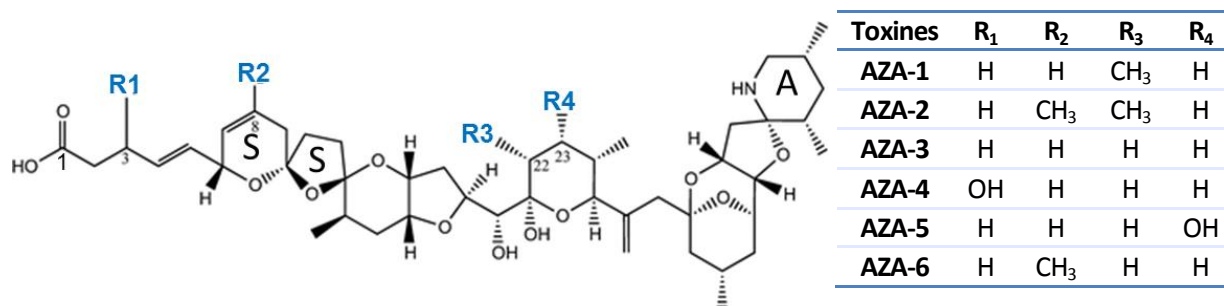


Figure 2. Formules chimiques des principales azaspiracides (AZAs).

Ni le mécanisme d'action des AZAs, ni le comportement pharmacocinétique n'ont été élucidés, principalement à cause du manque de standards et de tissus de référence [39]. Les azaspiracides provoquent des symptômes tels que nausées, vomissements, diarrhées et crampes d'estomac [40]. Ce groupe de toxines présente une très forte toxicité par voie orale.

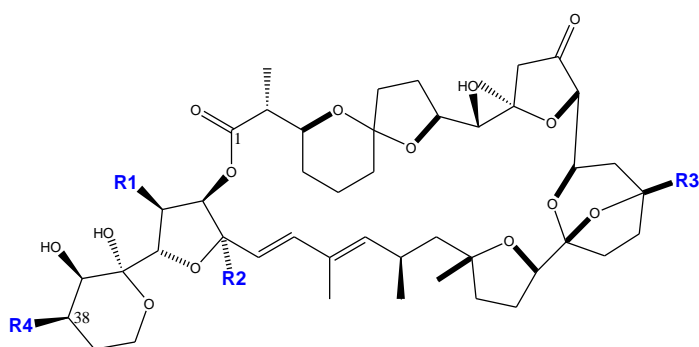
La dose aiguë de référence, basée sur les données disponibles sur l'Homme est de 0,2 µg de AZA-1 équivalent /kg [41]. Tout comme les toxines appartenant au groupe de l'AO, les exploitants du secteur alimentaire doivent veiller à ce que les mollusques bivalves placés sur le marché de la consommation humaine ne contiennent pas plus de 160 µg d'AZA équivalent par kg, mesuré dans l'ensemble des chairs ou dans toute partie consommée séparément [42].

1.1.3. Groupe des pecténotoxines

Les toxines du groupe des pecténotoxines (PTX) sont produites par des espèces du genre *Dinophysis* (*Dinophysis acuta*, *D. acuminata*, *D. caudata*, *D. fortii*, *D. infundibulus*, *D.*

norvegica, et *Phalacrocoma rotundatum*) [34]. Les PTX-1 et PTX-2 ont été isolées pour la première fois au Japon en 1985, à partir des coquilles Saint-Jacques (*Patinopecten yessoensis*), d'où elles tiennent leur nom. Elles sont présentes dans plusieurs parties du globe, notamment en Nouvelle Zélande, en Australie, au Japon, et dans des pays d'Europe [2]. Elles peuvent s'accumuler dans les organismes filtreurs tels que les coquilles Saint-Jacques ou les moules. Les PTX sont classées parmi les toxines diarrhéiques, en raison de leur coexistence avec les toxines du groupe acide okadaïque, également produit par *Dinophysis sp.*, dans les mollusques contaminées par cette microalgue. Par ailleurs, leur mécanisme d'action et leur effet chez l'Homme sont mal connus.

Les PTXs sont des polyétherlactones lipophiles. À ce jour, une vingtaine d'analogues différents ont été isolés et caractérisés. La PTX-2 est la toxine la plus produite et est soupçonnée d'être le principal précurseur de ses analogues [43]. Parmi toutes les PTXs décrites, seulement 4 ont été identifiées comme des produits de la biosynthèse de *Dinophysis*, la PTX-2, PTX-12, PTX-11, et PTX-13 (**Figure 3**), les autres étant, soit des produits de métabolisation, soit des artéfacts d'extraction [33, 44].



Toxines	R1	R2	R3	R4
PTX-2	CH ₃	H	H	CH ₃
*36S PTX-12	CH ₃	H	H	= CH ₂
*36R PTX-12	CH ₃	H	H	= CH ₂
PTX-11	CH ₃	OH	H	CH ₃
PTX-13	CH ₃	H	OH	CH ₃

Figure 3. Formules chimiques des principales PTXs.

Tout comme les toxines appartenant au groupe de l'OA, la réglementation concernant les PTXs établit que les exploitants du secteur alimentaire doivent veiller à ce que les mollusques bivalves mis sur le marché de la consommation humaine ne contiennent pas plus de 160 µg d'AO équivalent par kg, mesuré pour les OA, DTX et PTX ensemble [45].

1.1.4. Groupe des yessotoxines

Les yessotoxines (YTX) ont été isolées pour la première fois en 1986, des glandes digestives des coquilles Saint-Jacques *Patinopecten yessoensis*, pêchées dans la baie Mutsu au Japon [46]. La première espèce reportée comme productrice de YTXs est le dinoflagellé

Protoceratium reticulatum, puis d'autres producteurs de YTXs ont été identifiés, comme les dinoflagellés *Lingodinium polyedrum* et *Gonyaulax spinifera* [47]. Ces dinoflagellés ont été retrouvés sur les côtes de plusieurs pays, comme le Japon, l'Italie, la Norvège, l'Espagne, la France ou le Canada [2, 3]. Les YTXs sont capables de s'accumuler chez diverses espèces de mollusques bivalves filtreurs telles que les huîtres, les moules, les coquilles Saint-Jacques et les palourdes. À l'instar des PTXs, les YTXs ont d'abord été regroupées avec les toxines diarrhéiques, car elles sont souvent retrouvées coexistantes avec ces dernières [44].

Les YTXs sont des éthers polycycliques di-sulfatés. Elles sont constituées de noyaux éthers (cycle comprenant des O) reliés entre eux en une structure en échelle rigide. La présence de deux esters sulfatés (-OSO₃H) les rend moins lipophiles que les PTXs. Une centaine d'analogues ont été décrits à partir de bivalves ou de dinoflagellés, mais seules les structures de 40 d'entre eux ont été identifiées par des techniques de résonance magnétique nucléaire (RMN) ou de CL-SM/SM [33]. Le grand nombre d'analogues structurels décrits peut être expliqué par la conversion métabolique qui a lieu dans les coquillages. Les analogues les plus abondants typiquement retrouvés sont le 45-hydroxy-YTX, suivi par le carboxy-YTX (Figure 4).

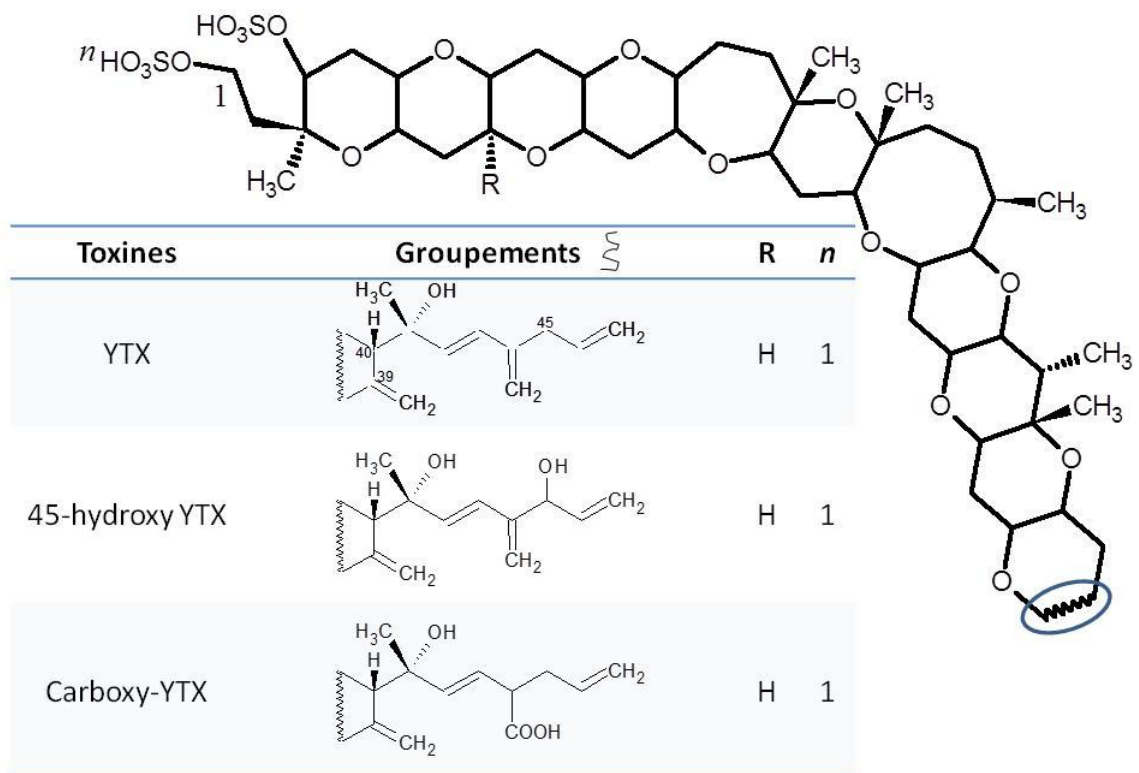


Figure 4. Formules chimiques des principales YTXs.

Les YTXs ne sont pratiquement pas toxiques par voie orale chez la souris. Elles n'ont aucun effet diarrhéique et n'ont jamais été associées à des intoxications humaines. L'organe cible semble être le muscle cardiaque [48]. Le mécanisme d'action des YTXs n'a pas encore été déterminé avec certitude [29].

Parce que les YTXs ont été reportées partout dans le monde, à des concentrations excessives, allant jusqu'à l'ordre du mg/kg, elles sont réglementées en Europe à hauteur de 3,75 mg d'YTX équivalent par kg de coquillage [49].

1.1.5. Groupe imines cycliques

Les toxines du groupe imines cycliques constituent un groupe de phycotoxines lipophiles partageant une structure de macrocycle avec une partie imine typique, qui semble être le pharmacophore bioactif. Un nombre assez important de composés toxiques appartiennent à ce groupe dont les spirolides, les gymnodimines, les pinnatoxines et les ptériatoxines [34] (**Figure 5**, 6, 7, 8). Tous ces composés appartiennent à une classe de composés dont la toxicité chez l'Homme n'est pas avérée. Ces molécules sont des « neurotoxines à action rapide » puisqu'elles induisent des symptômes de type neurologique chez la souris, suivis d'une mort rapide (quelques minutes) après une injection intrapéritonéale. Elles montrent un seuil de réponse aigu dans les bio-essais de mammifères [3].

Les **spirolides** ont été les premiers composés identifiés dans les années 90 sur des échantillons ayant présenté une toxicité atypique [34]. Les dinoflagellés *Alexandrium ostenfeldii* et *Alexandrium peruvianum* sont les principaux producteurs de spirolides (SPX). Cependant, les différentes souches d'*Alexandrium ostenfeldii* récoltées dans différentes régions géographiques montrent de grandes différences de profil toxinique. En effet, en Nova Scotia (Canada), les cellules d'*Alexandrium ostenfeldii* contiennent de grandes quantités de spirolides, contrairement aux populations de Nouvelle Zélande qui produisent des toxines paralysantes, ou encore les populations de Scandinavie qui synthétisent à la fois des spirolides et des toxines paralysantes [3].

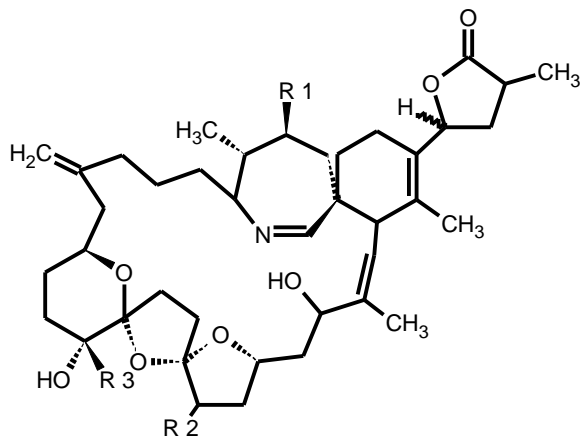


Figure 5. Formules chimiques des spirolides

Les **gymnodimines** (GYMs) sont produites par le dinoflagellé *Karenia selliformis*. Elles sont retrouvées en Nouvelle Zélande, en Tunisie et en Australie [41]. Les GYMs, avec un poids moléculaire de 500 Da, sont les plus petites molécules parmi le groupe des imines cycliques (Figure 6). À l'heure actuelle, 3 analogues ont été décrits, les GYM-A, -B, -C [50]. Le mécanisme d'action de la GYM-A, découvert à partir de toxines purifiées accumulées dans des palourdes, a été confirmé : il cible, avec une haute affinité, les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine (un neurotransmetteur du système nerveux central), ce qui explique leur neurotoxicité [50]. Les GYMs peuvent être retrouvés dans les coquillages plusieurs mois après un bloom de *Karenia selliformis* [51].

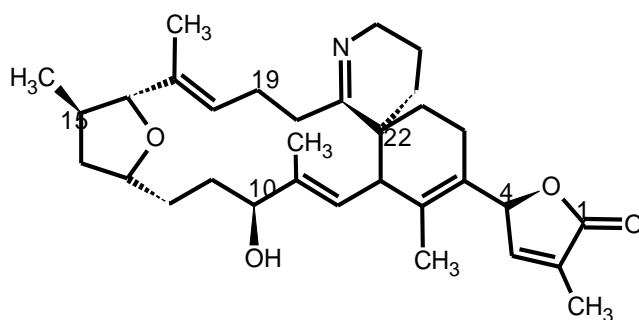


Figure 6. Formule chimique de la Gymnodimine-A

Les **pinnatoxines** (PnTXs) (Figure 7) sont produites par le dinoflagellé *Vulcanodinium rugosum* [52, 53]. Les PnTXs ont été retrouvées en Nouvelle Zélande, au Japon, en Australie, mais aussi en Norvège et récemment dans le sud de la France [41, 54]. Jusqu'à maintenant, sept analogues ont été caractérisés (PnTX-A à G), avec des poids moléculaires allant de 693 à 783 Da [33].

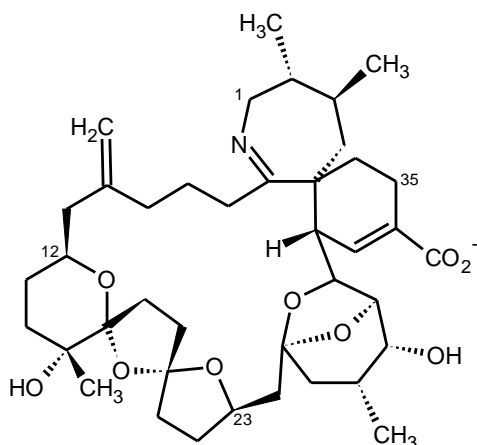


Figure 7. Formule chimique de la pinnatoxine-A

Les PnTX-F et -G ont été supposées être les molécules d'origine à partir desquelles les PnTXs et les **ptériatoxines** (PtTxS) (Figure 8) sont produites, par des transformations métaboliques dans les coquillages [55].

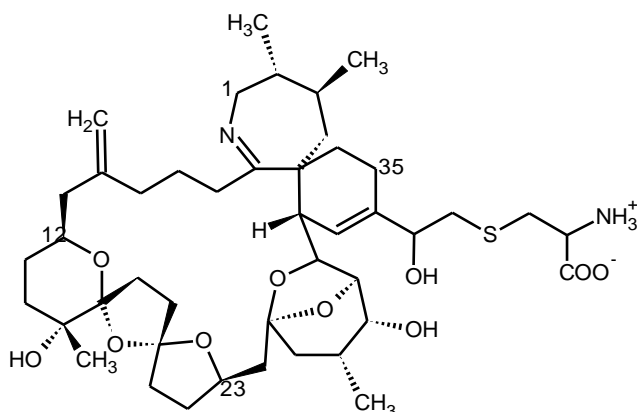


Figure 8. Formule chimique de la ptériatoxine-A

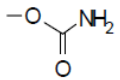
Aucune intoxication chez l'Homme n'a été reportée pour les toxines appartenant à ce groupe. De plus, en raison du peu de données disponibles, notamment le manque de données toxicologiques, les imines cycliques ne font pas l'objet d'une réglementation en Europe [41].

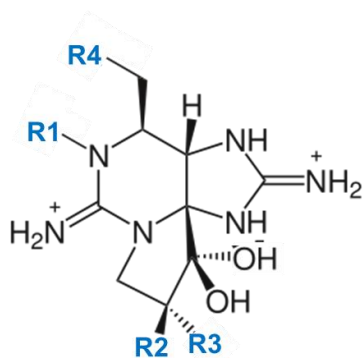
1.2. Toxines paralysantes

Le premier cas d'intoxication mortelle après ingestion de coquillages rapporté remonte à 1793, quand le capitaine George Vancouver et son équipage naviguèrent en Colombie Britannique (Canada), dans une zone connue sous le nom de « Poison Cove », littéralement la crique empoisonnée. Il remarqua que pour les tribus locales, il était tabou de manger des coquillages quand l'eau de mer devenait bioluminescente [5]. La description de cette

intoxication, donnée par le médecin du navire, était cohérente avec celle de l'Intoxication Paralysante par les Fruits de Mer (IPMF). L'IPMF est le résultat de l'exposition au groupe des toxines comprenant la saxitoxine et ses analogues (STXs). Elles provoquent des symptômes tels qu'une sensation de picotements dans la bouche et le bout des doigts et les pieds, des sensations de brûlure sur la peau et les lèvres, des vertiges, une impression de flottement, des maux de tête, de l'ataxie et de la fièvre [40]. Ces symptômes apparaissent rapidement après l'ingestion de coquillages contaminés, de 30 minutes à 2 heures en fonction de la concentration de toxines consommées, classant ainsi les STXs dans les neurotoxines à action rapide [3]. Différentes espèces de dinoflagellés appartenant au genre *Alexandrium* (à l'origine *Gonyaulax*), *Gymnodinium* et *Pyrodinium* sont connues pour produire les saxitoxines. Quelques espèces de cyanobactéries d'eau douce ont également été reconnues comme productrices des STXs [34]. Les STXs ont été retrouvées chez diverses espèces de mollusques bivalves filtreurs telles que les huîtres, les moules, les coquilles Saint-Jacques et les palourdes de diverses régions du monde, comme par exemple l'Europe, l'Amérique de Nord, les eaux japonaises, le sud de l'Afrique, l'Australie [2].

Les toxines paralysantes sont des groupes d'alcaloïdes (hétérocycles azotés) neurotoxiques solubles dans l'eau. La saxitoxine (SXT) est la première toxine à avoir été identifiée en 1957. Depuis 57 analogues ont été décrits [56]. Chimiquement, ce sont des dérivés tétra-hydro-puriques, dont la structure varie en fonction de différentes combinaisons de substitutions par des groupements hydroxyles et/ou sulfates (Figure 9). En fonction de la nature des substitutions en R4, les saxitoxines peuvent être classées en 4 groupes : (1) les dérivés carbamates, très toxiques, dont la saxitoxine (STX), la néosaxitoxine (Néo-STX) et les gonyautoxines (GTX-1,-2, -3, -4) ; (2) les toxines N-sulfocarbamoyles, faiblement toxiques ; (3) les analogues décarbamoyles (dc-) qui sont moyennement toxiques ; (4) et enfin les toxines déoxydécarbamoyles (do-), qui ont seulement été détectées dans des populations australiennes de *G. catenatum* [3]. Seulement 18 des analogues décrits présentent clairement une activité biologique caractéristique du syndrome paralysant.

Toxines				
	R1	R3	R3	R4
Saxitoxine (STX)				
Gonyautoxine (GTX)				
STX	H	H	H	
Néo-STX	OH	H	H	



GTX-1	OH	H	OSO ₃ ⁻
GTX-4	OH	OSO ₃ ⁻	H ⁻

Figure 9. Structures des saxitoxines (STXs) et gonyautoxines (GTXs) les plus toxiques.

Les saxitoxines agissent spécifiquement en bloquant les canaux sodiques voltage-dépendant des nerfs et des cellules musculaires. Ce mécanisme d'action induit un blocage de la conduction nerveuse, provoquant les signes de paralysie [47].

La réglementation concernant les STXs établit que les exploitants du secteur alimentaire doivent veiller à ce que les mollusques bivalves mis sur le marché de la consommation humaine ne contiennent pas plus de 800 µg de STX par kg, mesurés dans l'ensemble des chairs ou dans toute partie consommée séparément [57].

1.3. Toxines amnésiantes

Traditionnellement, des extraits de la macroalgue rouge *Chondria armata*, (hanayanagi ou domoi en japonais) sont utilisés dans la médecine japonaise pour leurs propriétés antiparasitaires. La molécule active est l'acide domoïque, isolé et caractérisé pour la première fois en 1958, et synthétisé en 1982. Pourtant, même si l'acide domoïque présente quelques vertus pharmacologiques, il n'éveilla l'intérêt public qu'en 1987, après qu'il fut associé à une intoxication alimentaire affectant une centaine de personnes, suite à l'ingestion de moules contaminées sur l'île du Prince Edouard (Canada) [33].

L'acide domoïque (AD) et ses analogues sont des biotoxines marines, responsables chez l'Homme de l'Intoxication Amnésiante par les Fruits de Mer (IAFM), principalement produites par les algues rouges du genre *Chondria*, *Alsidium*, *Amansia*, *Digenea* et *Vidalia*, mais aussi par les diatomées du genre *Pseudo-nitzschia*, *Nitzschia*, et *Amphora* [58]. Ces diatomées sont distribuées partout dans le monde, et les toxines amnésiantes sont retrouvées aux États-Unis, au Canada, en France, en Grande Bretagne, en Espagne, en Irlande, au Portugal et en Italie [2]. Il existe une grande variété de vecteurs de l'AD aussi bien des coquillages (moules, couteaux, coquilles Saint-Jacques, crabes), que des poissons (anchois,

sardines, maquereaux, thons jaunes) [41]. L'AD a également été retrouvé accumulé chez des oiseaux de mer et des mammifères marins, provoquant des mortalités en masse pour ces animaux, par exemple pour les lions de mer [59].

L'acide domoïque est un petit acide aminé d'un poids moléculaire de 311 Da, possédant 3 groupes carboxyliques (sur les carbones C6, C8 et C6'), ce qui lui confère un caractère très polaire et hydrophile (Figure 10). Environ 10 stéréo-isomères ont été décrits à ce jour et seulement 4 stéréo-isomères ont été trouvés dans des extraits de coquillage [33].

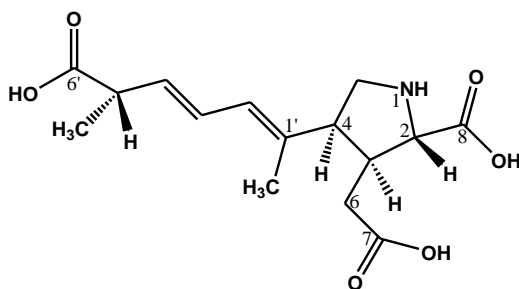


Figure 10. Structure de l'acide domoïque.

Une quinzaine de minutes après ingestion de coquillages contaminés, les premiers symptômes apparaissent, à la fois gastro-intestinaux, comme des nausées, des vomissements, des diarrhées, des crampes abdominales, mais aussi neurologiques (pertes de mémoire). En cas d'intoxications sévères, des déficits neurologiques importants sont habituellement décrits, impliquant des confusions, du mutisme, de l'épilepsie, des dysfonctionnements du système nerveux autonome, de l'agressivité, occasionnellement suivis par le coma et la mort [40]. L'acide domoïque présente une structure proche du glutamate, un neurotransmetteur exciteur majeur du cerveau. Son action sur les récepteurs cérébraux perturbe alors les neurotransmissions, provoquant les symptômes décrits. Les isomères de l'AD sont présents en plus faible quantité dans les coquillages et présentent une plus faible activité biologique [39].

La réglementation concernant les dérivés de l'AD établit que les exploitants du secteur alimentaire doivent veiller à ce que les mollusques bivalves mis sur le marché de consommation humaine ne contiennent pas plus de 20 mg de DA par kg, mesuré dans l'ensemble des chairs ou dans toute partie consommée séparément [60].

1.4. Brévéttoxines

Les composés à l'origine de l'Intoxication Neurologique par les Fruits de Mer (INFM) sont les toxines du groupe brévéttoxine, principalement produites par le dinoflagellé *Karenia brevis*

(originellement connu sous *Gymnodinium breve* ou *Ptychodiscus breve*). Pendant longtemps, ce dinoflagellé a été associé à des efflorescences « d'algues rouges » de grande ampleur dans le Golfe du Mexique, qui commençaient au large et étaient ensuite transportées sur les côtes par le vent et les courants. Ces efflorescences ou « blooms » ont provoqué des mortalités en masse de poissons, de mammifères marins et d'oiseaux et des problèmes respiratoires chez l'Homme [3]. Plus récemment, d'autres espèces productrices des toxines du groupe BTX ont été recensées, comme des espèces de flagellés (de classe *Raphidophyceae*) du genre *Chatonella*, *Fibrocapsa* et *Heterosigma* [2]. Des efflorescences de ces espèces d'algues ont été rapportées principalement dans le Golfe du Mexique et en Floride, et plus récemment en Nouvelle Zélande, mais aucune contamination de coquillages n'a été décrite en Europe [41].

Les brevéttoxines sont des polyéthers cycliques liposolubles. En fonction de leur structure moléculaire, deux types de BTX peuvent être distingués : le type A, avec 10 anneaux éthers fusionnés, dont la BTX-1 en est la principale, et le type B contenant 11 de ces anneaux et représentés par la BTX-2 (Figure 11). La BTX-1 (type A) est l'analogue le plus toxique, le BTX-2 (type B) est le plus abondant. BTX-1 et BTX-2 sont considérées comme les toxines parentes desquelles les analogues des BTX dérivent. De nombreux analogues et dérivés ont été identifiés dans des souches de *K. brevis* naturelles et en culture, incluant des produits de réduction, d'oxydation et d'hydrolyse [33].

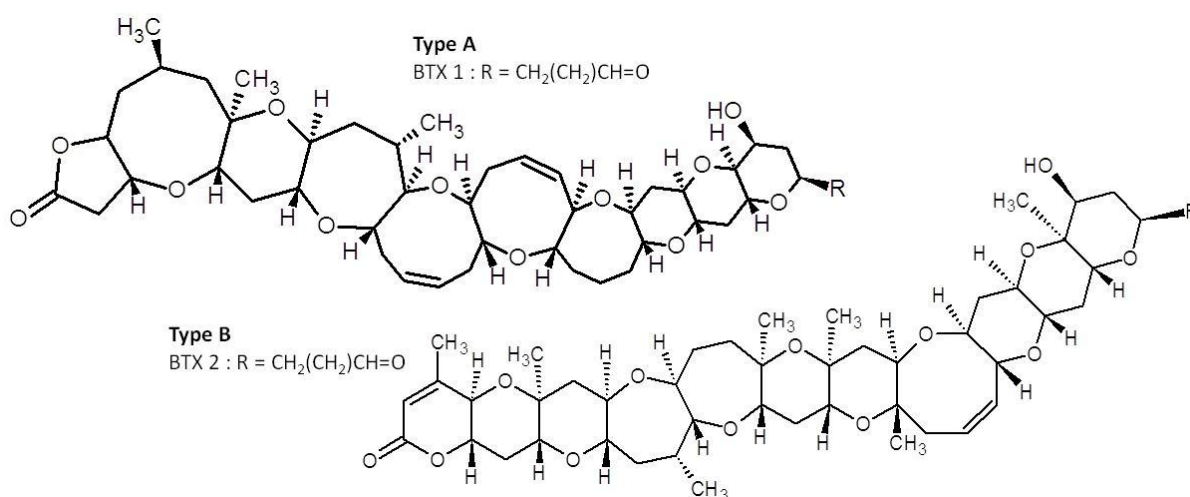


Figure 11. Formules chimiques des principales brevéttoxines.

Les symptômes liés à l'absorption alimentaire de ces toxines sont principalement gastro-intestinaux (douleurs abdominales, nausées, diarrhées, vomissements) et neurologiques (paresthésies, crampes, bronchoconstrictions, paralysies, attaques et coma) [40]. Aucun cas de

mortalité lié à ces toxines n'a été reporté jusqu'alors [29]. En plus de l'impact sur la santé humaine, les BTXs peuvent avoir un impact dévastateur sur la faune, comme les poissons, les oiseaux, les dauphins ou les lamantins [41]. Les brévétotoxines ont pour site de fixation les canaux sodium des cellules sensibles aux différences de potentiel membranaire [39].

Les BTXs ne sont pas réglementées par l'Union Européenne, puisqu'aucune toxine de ce groupe n'a été reportée dans les coquillages en Europe. Cependant, une réglementation a été mise en place à hauteur de 800 µg de BTX-2 équivalent par kg dans d'autres pays du monde tels que les États-Unis, le Mexique et la Nouvelle Zélande, où les brévétotoxines sont considérées comme des toxines émergentes [61].

1.5. Ciguatoxines

La ciguatéra est le syndrome lié, à l'origine, de l'ingestion d'espèces de poissons marins tropicaux comestibles dont la chair a été contaminée par les ciguatoxines (CTXs) [41]. Ce syndrome peut aussi apparaître lors de l'ingestion de coquillages (moules, palourdes, conques) dont la chair a également été contaminée par les CTXs. Parmi les 425 espèces de poissons potentiellement infectées, les grands poissons prédateurs comme le barracuda, la murène, le mérou ou encore les carangues sont les plus susceptibles de provoquer cet empoisonnement [33]. Ce phénomène est généralement imprévisible car les poissons ciguatoxiques apparaissent sporadiquement, à la fois dans le temps et l'espace. Les CTXs entrent dans la chaîne alimentaire par les poissons herbivores et migrent vers les poissons carnivores et l'Homme.

Les toxines de la ciguatéra sont retrouvées dans les régions tropicales et subtropicales des régions du Pacifique, de l'Atlantique (dont les Caraïbes, le Cameroun, les Iles Canaries, les îles Madères) et de l'Océan Indien. Comme les CTXs de ces régions diffèrent en termes de structure chimique, mais aussi de toxicité, de symptomatologie, et de dangerosité pour l'Homme, les CTXs sont distinguées suivant leur distribution géographique : les P-CTX pour celles du Pacifique, C-CTX pour celles provenant des Caraïbes, et I-CTX pour les CTX originaires de l'Océan Indien [2]. Concernant leur activité biologique, les CTXs engendrent des symptômes singulièrement différents, en fonction de la région géographique, et qui peuvent être classés en 4 catégories principales : gastro-intestinaux, neurologiques, cardiovasculaires et des symptômes généraux. Un des symptômes les plus caractéristiques est l'inversion de la perception de la température, où un point froid induit une sensation de brûlure typique. La ciguatéra peut être un syndrome invalidant mais rarement fatal. En plus

d'un empoisonnement chez l'Homme, il y a également une évidence que les phoques-moines des Caraïbes soient exposés aux CTX au travers de leur alimentation, sans avoir de données concernant la santé de l'animal [34].

Les dinoflagellés du genre *Gambierdiscus* ont été identifiés comme producteurs de toxines responsables de la ciguatera. Ces dinoflagellés épiphytiques croissent sur les macroalgues des récifs coralliens. Le genre a été nommé ainsi à cause des îles Gambier, une région endémique ciguaterique, où il a été découvert pour la première fois [41]. Des études ultérieures sur *Gambierdiscus toxicus*, à la fois dans le milieu naturel et cultivé en laboratoire, ont permis l'isolement et la détermination de la structure chimique d'autres CTXs comme le gambiérole, et d'un puissant antifongique nommé l'acide gambiérique. Une autre neurotoxine importante impliquée dans la ciguatera est la maïtotoxine. Jusqu'à aujourd'hui, 3 analogues de la maïtotoxine ont été identifiés à partir de *Gambierdiscus toxicus* [3].

Les ciguatoxines sont des polyéthers lipophiles avec une structure comprenant 13 à 14 anneaux éthers fusionnés. Plus d'une vingtaine de d'analogues des P-CTX ont été identifiés, ainsi que 2 C-CTX et 4 toxines proches des I-CTX [39]. Ces analogues sont généralement des produits d'épimérisation, d'hydroxylation ou d'oxydation des précurseurs produits par *Gambierdiscus sp.* (Figure 12). Les ciguatoxines présentent le même type de mécanismes d'action que les brevétoxines : elles ont pour site de fixation les canaux sodium des cellules sensibles aux différences de potentiel membranaire [40].

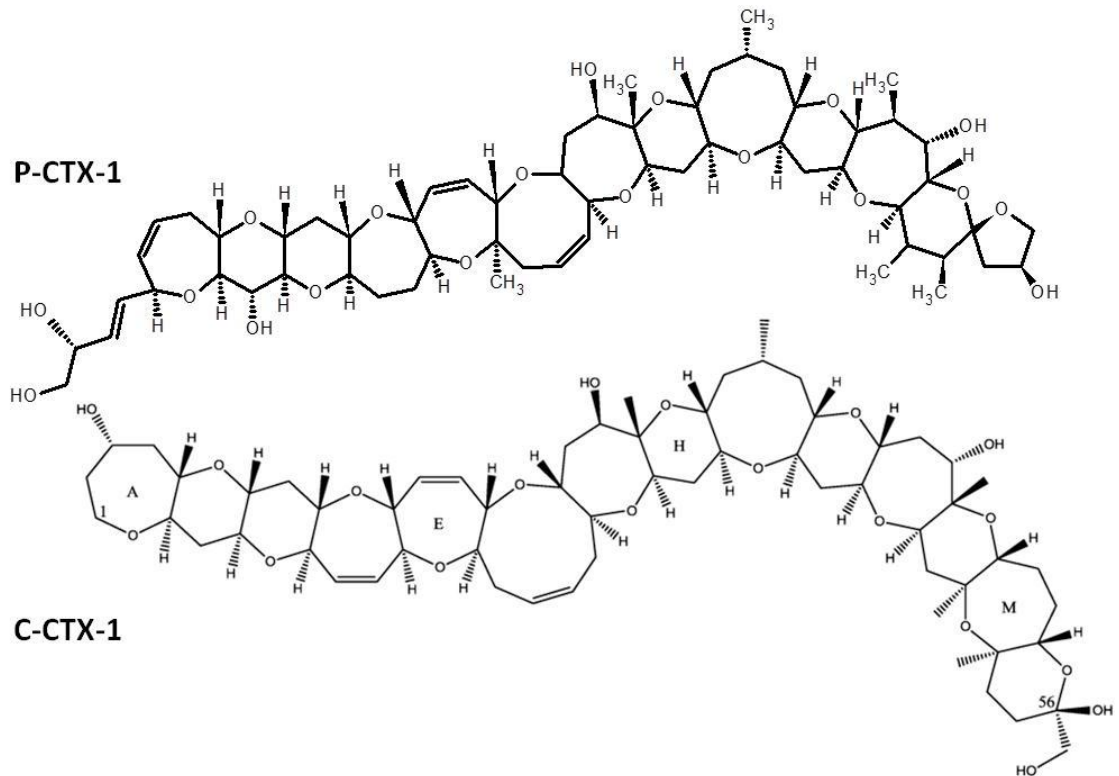


Figure 12. Formule chimique de la P-CTX-1 et C-CTX-1

La maïtotoxine (MTX) (Figure 13) est le plus grand composé naturel identifié ($C_{164}H_{256}O_{68}S_2Na_2$, 3426 Da) à l'exception des bio-polymères, et est un des métabolites secondaires les plus toxiques connus à ce jour [3]. La MTX est un polyéther en forme d'échelle, comprenant 32 éthers cycliques, qui peut être composé à la fois par des régions hydrophobes et hydrophiles. La MTX est un puissant activateur des canaux calcium voltage dépendant, qui stimule le mouvement des ions Ca^{2+} à travers les membranes d'une large variété d'organismes, induisant par exemple, la sécrétion d'hormones ou de neurotransmetteurs [62]. Cette toxine présente un pouvoir hémolytique, et des activités ichthyologiques et cytotoxiques. Les MTXs ont été retrouvées dans les viscères des poissons herbivores.

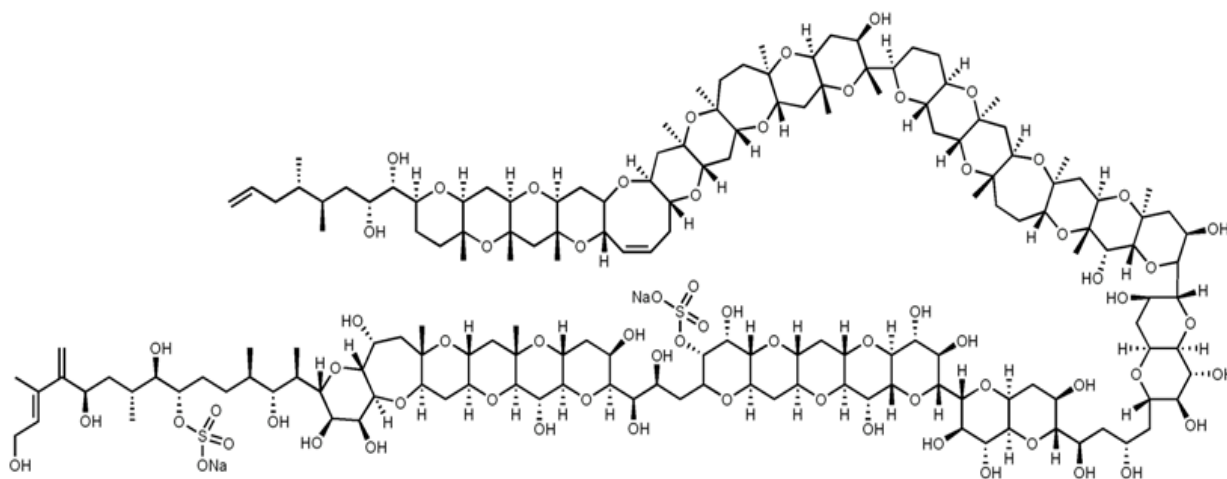


Figure 13. Formule chimique de la maïtotoxine

En 2004, un cas de ciguatéra a été confirmé pour la première fois en Europe. Il était lié à la consommation de la chair de poissons pêchés dans les îles Canaries [63]. La présence de ciguatoxines a aussi été suspectée dans des poissons de l'île de Crète (en 2007) et de l'île Madère (en 2008) [64, 65]. De plus, des espèces de *Gambierdiscus*, potentiellement producteurs de CTX, sont détectées en Mer Méditerranée depuis 2003. Le risque ciguatérique, émergent en Europe, est donc bien réel dans cette zone. Pourtant, il n'existe pas de législation régulant les toxines responsables de la ciguatéra en Europe [41].

1.6. Les substances toxiques pour la faune marine

Beaucoup d'efflorescences d'espèces de dinoflagellés sont associées à des mortalités de poissons, et sont désignées sous le terme de « marée rouge ». Le qualificatif de « marée rouge » provient des pigments des dinoflagellés lorsque le nombre de ces algues connaît une croissance brusque et rapide et colore l'océan ou la mer à certains endroits. Elles résultent généralement de la présence de plusieurs espèces d'algues unicellulaires ou de dinoflagellés, notamment *Karenia brevis*, *Karenia mikimotoi* et *Prymnesium parvum*, produisant les brevétoxines (décrites précédemment), les gymnocines et les prymnesines respectivement. Elles sont capables de provoquer des dommages immenses sur l'écosystème côtier, sur les espèces benthiques et les algues, et peut avoir des conséquences économiques pour les fermes aquacoles. La mortalité importante des poissons à cause des « marées rouges » est un phénomène global, et est suspecté d'avoir une distribution géographique croissante, en raison de l'eutrophisation des eaux côtières.

Le dinoflagellé *Karenia mikimotoi* fait partie des espèces tristement célèbres à l'origine de « marées rouges ». Elles produisent les **gymnocines**, des éthers cytotoxiques. La première gymnocine à avoir été isolée est la gymnocine-A [66]. Plusieurs analogues ont également été découverts, notamment la gymnocine-B [67]. La structure de la gymnocine-A ($C_{55}H_{80}O_{18}$, 1029 Da) est caractérisée par 14 anneaux éthers saturés (Figure 14). Le mécanisme d'action n'a pas encore été élucidé.

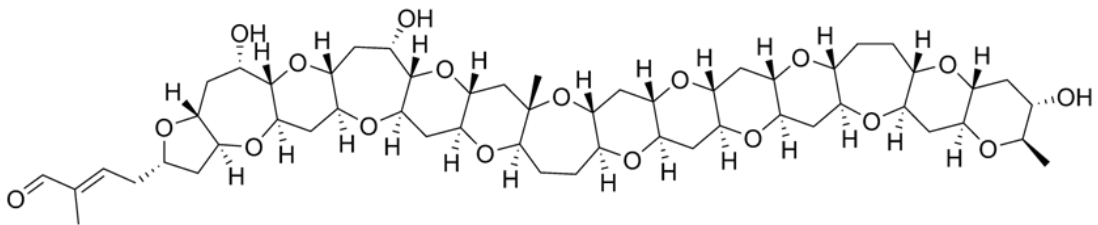


Figure 14. Formule développée de la gymnocine-A.

Prymnesium parvum est un biflagellé qui produit les **prymnésines** (PRM). Parmi les 15 substances actives isolées, les PRM-1 ($C_{93}H_{137}Cl_2NO_{36}$, 1970 Da) et PRM-2 ($C_{96}H_{136}Cl_3NO_{35}$, 1967 Da) sont les principales. Ces toxines amphiphiles contiennent des anneaux éthers polycycliques, entre une chaîne polyhydroxylée et une chaîne polyènique (Figure 15) [68, 69]. Elles possèdent une activité hémolytique extrêmement puissante, probablement en interagissant directement avec les récepteurs des membranes cellulaires. Cependant, son mécanisme d'action n'a pas été déterminé [70].

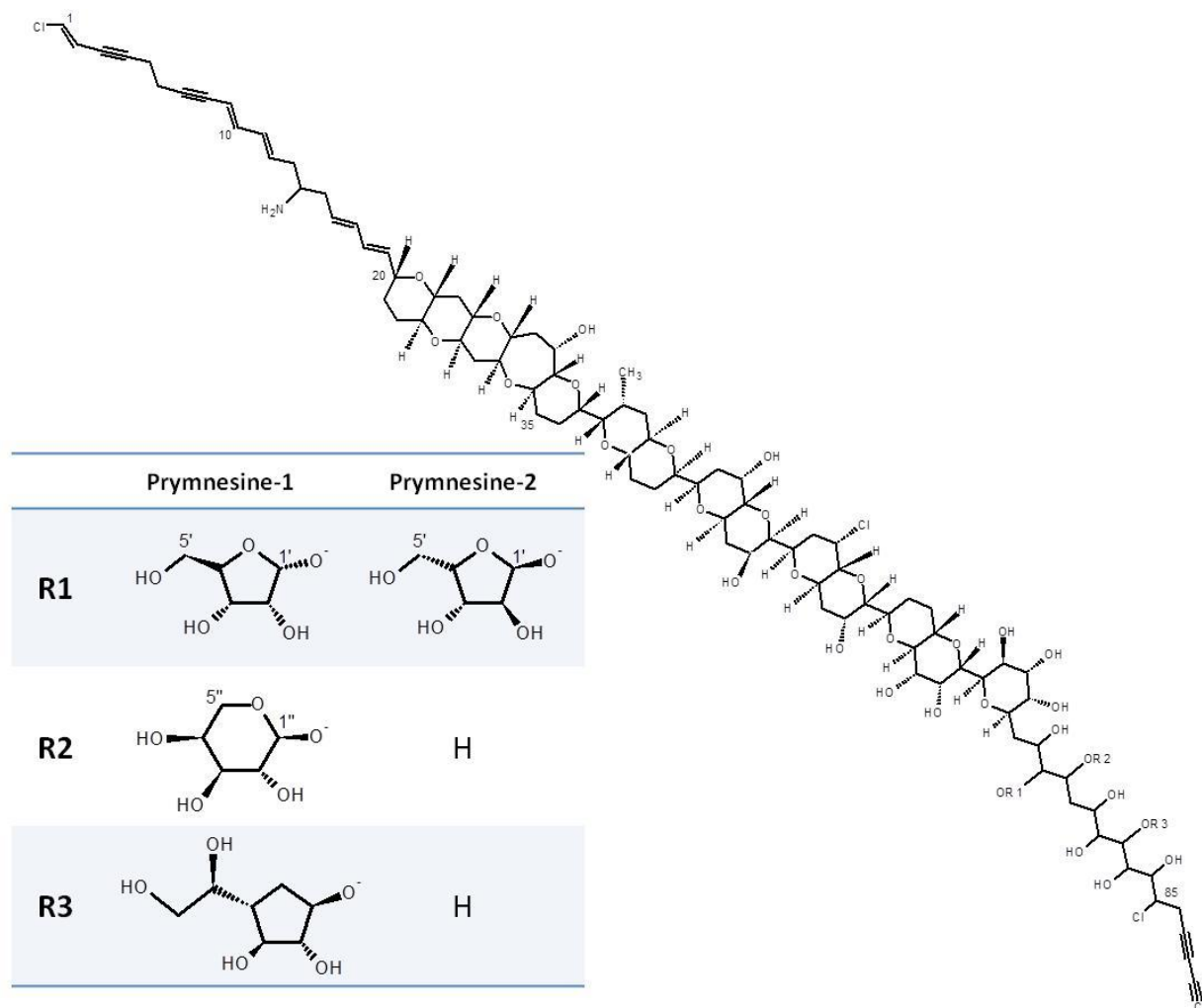


Figure 15. Structures des pymnesine-1 et pymnesine-2.

D'autres dinoflagellés ont été associés à des mortalités de poissons [34]. *Karenia brevasulcata*, qui est associé à des mortalités de poissons récurrentes en Nouvelle Zélande, produit une suite de toxines hydrophiles et lipophiles, la dernière toxine isolée étant l'**acide brévisculcalique**. Les **karlotoxines** sont de puissantes toxines tueuses de poissons, extensives dans le monde, produites par *Karlodinium veneficum*. Les **goniodomines** sont des macrolides polyéthers et puissants antifongiques produits par *Alexandrium monilatum* et *Alexandrium iranoi*. Elles ont été associées à des mortalités de poissons et une coloration de l'eau la première fois à la fin du mois d'août 1951 dans un lagon marin sur la côte est de la Floride.

1.7. Toxines du groupe palytoxine.

Les palytoxines et leurs analogues étaient connus à l'origine sous les latitudes tropicales mais présentent maintenant une distribution sur l'ensemble du globe. Des cas d'intoxications alimentaires, parfois mortelles, dues à la palytoxine ou à ses analogues ont ainsi été reportés aux Philippines [71], au Japon [72], à Madagascar [73]. Depuis une décennie, les efflorescences d'*Ostreopsis* sont, par ailleurs, de plus en plus observées dans des régions tempérées, comme en Nouvelle Zélande, en Tasmanie, en Australie du sud, au Japon, en Russie et en Europe, où les côtes du nord-ouest de la Méditerranée sont particulièrement affectées [10, 12, 16, 74, 75]. Les toxines du groupe palytoxine sont produites par le dinoflagellé benthique *Ostreopsis sp.* Cette microalgue et ses toxines étant l'objet de cette thèse, une synthèse bibliographique plus approfondie est donnée dans les paragraphes suivants (Chapitre 1.3 à Chapitre 1.7), ainsi qu'un état de la situation des efflorescences d'*Ostreopsis* sur les côtes Méditerranéennes françaises.

2. Situation en France

Depuis 1983, les bivalves des côtes françaises sont régulièrement contaminés par des phycotoxines. Le Réseau de surveillance du PHYtoplancton et des PHYcotoxines (REPHY) a été créé par l'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (Ifremer) en 1984, suite à des cas de milliers d'intoxications à effets diarrhéiques, observés dans l'ouest de la France et dues à la consommation de coquillages contaminés par *Dinophysis*. La surveillance du REPHY s'applique aux coquillages dans leur milieu naturel, comme les zones de productions (parcs, filières, bouchots...) ou dans les zones de pêche professionnelles [76].

En plus des toxines réglementées, le REPHY suit également les toxines émergentes non réglementées, pour acquérir des données sur leur répartition le long du littoral. En effet, depuis quelques dizaines d'années, de nouvelles espèces/souches productrices de molécules actives potentiellement toxiques pour l'Homme, sont mises en évidence, comme par exemple *Vulcanodinium rugosum*, producteur de pinnatoxines [52, 54]. Une fois installées, il n'est pas rare que ces microalgues toxiques prolifèrent, deviennent dominantes et produisent des efflorescences, récurrentes d'une année sur l'autre. C'est le cas d'*Ostreopsis cf. ovata*, qui prolifère régulièrement en Méditerranée française depuis 2006 [14, 15].

2.1. Toxines algales réglementées

2.1.1. Toxines lipophiles

Les premiers épisodes toxiques clairement associés à des toxines diarrhéiques ont été observés en France en 1983, avec 3 000 à 4 000 intoxications diarrhéiques recensées en Bretagne sud. Ce sont ces événements qui ont d'ailleurs été à l'origine de la création du réseau de surveillance REPHY de l'Ifremer. Parmi les toxines lipophiles présentes sur le littoral français, on recense l'acide okadaïque et ses analogues depuis 1983, les pecténotoxines depuis 2004, les spirolides depuis 2005, les yessotoxines depuis 2007 et les azaspiracides depuis 2008. En France, les toxines lipophiles sont associées majoritairement au genre phytoplanctonique *Dinophysis*, producteur d'acide okadaïque et de dynophysistoxines ; c'est pourquoi les efflorescences de ce dinoflagellé vont être développées ici.

Dinophysis sp. a la particularité de ne jamais proliférer à de fortes concentrations, les toxines qu'il produit sont donc susceptibles de contaminer les coquillages, même quand il est observé à très faible concentration. Parmi les espèces présentes sur le littoral français, *Dinophysis acuminata*, *D. acuta*, *D. caudata*, *D. fortii*, *D. sacculus*, et *D. tripos* sont principalement retrouvées. Malgré des configurations variables d'une année à l'autre, *Dinophysis* est observé tous les ans en baie de Seine, sur la côte du Cotentin, en Bretagne ouest et sud, et dans les lagunes méditerranéennes du Languedoc-Roussillon et de Corse. Il est par contre beaucoup moins présent sur le littoral du nord de la France, de l'ouest Cotentin et de Bretagne nord. Les concentrations maximales annuelles sont généralement inférieures à 10 000 cellules par litre. Le seul cas de concentrations supérieures à 100 000 cellules par litre a été observé en baie de Seine-Orne en 2006 avec 800 000 cellules par litre. Les périodes de présence sont différentes selon les régions. Généralement, *Dinophysis* peut être observé à partir de mars-avril en Bretagne ouest et sud, et à partir de juillet-août en Normandie. Alors qu'il est rarement observé en hiver sur les côtes de la Manche et de l'Atlantique, *Dinophysis* est présent toute l'année en Méditerranée [77].

2.1.2. Toxines paralysantes

Les toxines paralysantes sont, en France, associées exclusivement au genre phytoplanctonique *Alexandrium*, producteur de saxitoxines. Les premiers épisodes de contamination IPFM dans des coquillages, clairement attribuables à *Alexandrium*, ont été observés en France en 1988, dans les Abers (Bretagne nord-ouest) [78], puis en 1998 dans l'étang de Thau (Languedoc) [79]. Même si les preuves formelles n'existent pas, de fortes présomptions laissent à penser

que les espèces du genre *Alexandrium* les plus présentes sur le littoral, pourraient avoir été introduites dans les eaux françaises par divers vecteurs, tels que les ballasts de bateaux ou les transferts de coquillages à partir de zones contaminées. En effet, aucune prolifération d'*Alexandrium* ne semble avoir été décrite dans les eaux littorales avant les années 1980. Grace au REPHY, aucune intoxication par les toxines du syndrome IPFM associée à des coquillages provenant de zones françaises n'a été rapportée à ce jour.

Les principales espèces observées en France sont *Alexandrium minutum*, qui est retrouvée en Atlantique, principalement en Bretagne, alors que l'espèce *A. catenella* prolifère majoritairement dans l'étang de Thau en Méditerranée [80]. D'autres espèces sont plus rarement rencontrées comme *Alexandrium andersonii*, *A. insuetum*, *A. leei*, *A. margalefii*, *A. ostenfeldii*, *A. pseudogonyaulax* et *A. tamutum*.

Les données disponibles depuis 1987, dans le cadre du REPHY, montrent que les coquillages ne deviennent toxiques qu'après un développement important d'*Alexandrium*, de plusieurs milliers ou dizaines de milliers de cellules par litre. *Alexandrium sp.* a été observé sur l'ensemble du littoral français, avec des concentrations maximales annuelles qui sont le plus souvent inférieures à 10 000 cellules par litre, sur la période 2004-2008. Les plus fortes concentrations d'*Alexandrium* recensées proviennent de l'estuaire de la Penzé en Bretagne (Finistère) avec 350 000 cellules par litre (en 2005), et de l'étang de Thau en Languedoc avec 320 000 cellules par litres (en 2004). Les périodes d'efflorescence sont différentes selon les régions : les efflorescences sont importantes en Bretagne plutôt en été, et en Méditerranée plutôt en automne-hiver [80].

La précédente décennie a connu des épisodes toxiques avec des contaminations non négligeables dans les coquillages, par exemple (i) 7 000 µg/kg dans les huîtres en 2001, en Bretagne nord-ouest (Abers et baie de Morlaix), (ii) 3 300 µg/kg dans les coques, en 1998 dans la Rance (Bretagne nord), (iii) et dans l'étang de Thau avec des contaminations allant de 3 000 à 6 000 µg/kg dans les moules, les huîtres et les palourdes, entre 2001 et 2004 [80]. Les toxines paralysantes n'étaient pratiquement plus observées en France depuis 2005 jusqu'en 2012, année marquée par le développement massif d'*Alexandrium minutum* (près de 42 000 000 cellules /L) pendant la période estivale, dans un secteur inédit, la rade de Brest. Cette efflorescence a perturbé l'activité professionnelle pendant un mois, avant de gagner l'Aber Wrac'h en fin d'été, conduisant à la fermeture de ces deux sites conchylicoles très actifs. Ce sont les moules qui ont concentré les toxines paralysantes, jusqu'à atteindre

11 664 µg eq STX/kg, soit des concentrations toxiques plus de 15 fois supérieure à la norme admise [81].

2.1.3. Toxines amnésiantes

Les toxines amnésiantes sont, en France, associées exclusivement au genre phytoplanctonique *Pseudo-nitzschia*, producteur de l'acide domoïque. Des toxines amnésiantes ont été observées pour la première fois en France, en mer d'Iroise et dans la baie de Douarnenez (Bretagne ouest) en 2000 [82]. Or les données historiques du REPHY montrent que des proliférations importantes de *Pseudo-nitzschia* avaient été observées dans de nombreuses régions françaises, bien avant cette date. Une explication possible est que la composition des populations de *Pseudo-nitzschia* lors de ces proliférations a pu évoluer en une à deux décennies, passant d'une majorité d'espèces non toxiques à une proportion plus importante d'espèces toxiques. La méthode réglementaire européenne pour la détection de ces toxines dans les coquillages consiste en une analyse chimique par chromatographie liquide et une détection en ultraviolet (CL-UV). Grace au REPHY, aucune intoxication IAFM associée à des coquillages provenant de zones françaises n'a été rapportée à ce jour.

Les espèces de *Pseudo-nitzschia* observées sur l'ensemble du littoral français sont celles appartenant au complexe dit « *delicatissima* » (comprenant *P. calliantha*, *P. delicatissima*, *P. pseudodelicatissima*), et celles appartenant au complexe dit « *seriata* » (comprenant *P. australis*, *P. fraudulenta*, *P. seriata*, *P. subpacificica*). D'autres espèces sont plus rarement rencontrées comme *Pseudo-nitzschia americana* (Bretagne), *P. pungens* (Bretagne et Méditerranée), *P. multistriata* (Manche et Atlantique).

Malgré des efflorescences variables d'une année à l'autre, une toxicité des coquillages peut être observée tous les ans en Bretagne ouest et sud, touchant très majoritairement les coquilles Saint-Jacques dans les gisements de la rade de Brest et de la baie de Quiberon, et à Belle-Île-en-mer en particulier, mais pouvant affecter occasionnellement d'autres coquillages comme les palourdes roses ou les donaces. Deux autres régions sont également affectées, en particulier la baie de Seine.

La comparaison des données, sur les toxicités IAFM d'une part, et sur les proliférations de *Pseudo-nitzschia* d'autre part, montre que de nombreuses régions ne sont pas sujettes à des épisodes de toxicité IAFM, alors que *Pseudo-nitzschia* prolifère sur tout le littoral. Ceci peut s'expliquer par la variabilité de la composition de la population de *Pseudo-nitzschia*, pouvant

comporter une proportion plus ou moins importante d'espèces produisant réellement des toxines IAFM, le reste de la population étant composée d'espèces non toxiques [77].

La configuration générale est assez semblable d'une année à l'autre : *Pseudo-nitzschia* est observé tous les ans sur l'ensemble du littoral français, avec des concentrations maximales annuelles importantes, très souvent supérieures à 100 000 cellules par litre et assez fréquemment supérieures à 1 million de cellules. Les périodes de prolifération sont majoritairement entre avril et juin dans toutes les régions. En effet, *Pseudo-nitzschia* appartient à la classe des diatomées, qui ne sont pas mobiles dans la colonne d'eau (contrairement aux dinoflagellés), et qui sont par conséquent très dépendantes des apports en nutriments : les conditions favorables aux proliférations de *Pseudo-nitzschia* sont donc réunies au printemps, lorsque l'enrichissement des eaux littorales en nutriments par les apports des rivières est à son maximum, et que l'allongement de la durée du jour favorise la photosynthèse [77].

2.2. Toxines algales non réglementées

En plus du phytoplancton producteur de toxines réglementées, le REPHY observe également régulièrement de nouvelles espèces potentiellement dangereuses sur les côtes du littoral français. Parmi les espèces détectées, des efflorescences de *Vulcanodinium rugosum*, producteur d'imines cycliques (notamment les pinnatoxines), ainsi que d'*Ostreopsis sp.* sont généralement retrouvées.

2.2.1. Imines cycliques (toxines lipophiles)

En 1996, le REPHY a mis en évidence dans le Golfe de Fos, en Mer Méditerranée, la présence d'un dinoflagellé dont les caractéristiques ressemblaient à celles d'une espèce ressemblant au genre *Gonyaulax*. Les concentrations n'étaient cependant pas assez élevées pour effectuer des études approfondies. En 2001, cette même espèce est de nouveau observée en Petite Camargue, également en Mer Méditerranée, mais là encore, les densités cellulaires étaient trop faibles. C'est en 2009 que de fortes abondances de ce dinoflagellé dans l'étang d'Ingril, en Méditerranée, ont permis, grâce à des observations au Microscope à Balayage Électronique (MEB) et à des analyses moléculaires de décrire une espèce d'un nouveau genre *Vulcanodinium rugosum gen. nov, sp. nov* [52]. Parallèlement, des toxicités atypiques ont été

relevées dans le cadre de la surveillance des toxines lipophiles utilisant le test sur souris (remplacé par l'analyse chimique depuis 2010).

Par la suite, des analyses CL-SM/SM sur des extraits de moules et de palourdes sur la période 2009-2012 ont mis en évidence une récurrence de la contamination par la pinnatoxine-g (PnTX-G), principalement dans l'étang d'Ingril [54]. De mai à octobre, des toxicités généralement supérieures à 40 µg/kg de chair totale sont observées. Le maximum de contamination date de septembre 2010 avec des concentrations allant jusqu'à 1 244 µg/kg de chair totale. En plus des PnTXs, la souche *Vulcanodinium rugosum* produit une substance cytotoxique la beauvéricine [83, 84], ce qui laisse à penser qu'il existe un risque pour la santé des consommateurs.

2.2.2. Palytoxine et ovatoxines

L'espèce observée sur le littoral français est très proche d'*Ostreopsis ovata*, elle est donc nommée *Ostreopsis confer* (cf.) *ovata*. Suite à des épisodes toxiques, ayant eu lieu en Italie et en Espagne, une surveillance renforcée de cette espèce a été progressivement mise en place à partir de 2006 sur le littoral Est-Méditerranéen français. Les données historiques du REPHY montrent que cette espèce était déjà présente sur le littoral méditerranéen avant 2006 ; l'espèce *Ostreopsis siamensis* a, quant à elle, été observée sur le littoral Atlantique, mais de façon beaucoup plus épisodique et à de très faibles concentrations. Il semble qu'une augmentation des concentrations observées ces dernières années sur le littoral Est-Méditerranéenne ait eu lieu, sans qu'il soit possible actuellement de certifier qu'il s'agit d'un phénomène nouveau. *Ostreopsis* cf. *ovata* est observée essentiellement sur la côte Est-Méditerranée et en Corse. Les concentrations maximales annuelles semblent indiquer une augmentation sur la période 2006-2008, avec un maximum de 2 930 000 cellules en rade de Marseille en 2008. Les périodes de prolifération sont majoritairement entre juin et septembre [77].

Les travaux de thèse ayant portés sur la palytoxine et les ovatoxines produites par *Ostreopsis* cf. *ovata*, le reste du chapitre est consacré à l'état des connaissances approfondies sur cette problématique.

3. Toxines produites par le dinoflagellé *Ostreopsis sp.*

3.1. Découverte des toxines du groupe palytoxine

3.1.1. La légende

L'histoire commence sur l'île de Maui, dans l'archipel d'Hawaïi, aux États-Unis. Selon la légende, le village de Hana était hanté par un terrible fléau : trop souvent, à leur retour de mer, un des pêcheurs avait mystérieusement disparu, sans que personne ne puisse trouver d'explications. Un jour, alors qu'une des pirogues venait encore à manquer, les villageois désespérés accusèrent un ermite bossu coupable de leur maux. Ils s'emparèrent alors de ce pauvre homme et tout en lui arrachant ses vêtements, ils découvrirent une énorme mâchoire bardée d'une rangée de dents pointues. Pour les villageois, l'explication est simple, ils viennent d'attraper le Dieu Requin, qui emportait avec lui les pêcheurs pour assouvir sa faim de chair humaine. Par vengeance, ils brûlèrent le démon et jetèrent ses cendres dans une piscine naturelle près du port de Hana. Mais la colère du Dieu Requin ne s'est pas arrêtée là. Peu de temps après, de petites créatures brunes ont commencé à pousser au même endroit. Lorsque que cette « créature » était enduite sur la pointe d'une lance, celle-ci était capable de causer une mort instantanée à sa victime. La fameuse piscine naturelle devint alors tabou, les hawaïiens croyant fermement qu'un désastre allait s'abattre sur quiconque tentait de récolter la créature toxique. Ainsi est née la légende du « *limu-make-o-Hana* », littéralement « *l'algue mortelle de Hana* » [85-87].

3.1.2. L'histoire

Il y a une quarantaine d'années, peu d'informations étaient disponibles sur la Ciguatera, une maladie humaine provoquée par l'ingestion de certains poissons de récifs coralliens. Les chercheurs ont noté que les poissons herbivores devenaient ciguatériques avant les poissons carnivores, suggérant que l'agent responsable était d'origine algale et passait dans les poissons par la chaîne alimentaire. C'est dans ce contexte que les Professeurs J. Shupe et P. Helfrich de l'Institut Hawaïien de Biologie Marine se sont intéressés au « *limu-make-o-Hana* ». Malgré les réticences et les avertissements des hawaïiens locaux, ils réussirent à localiser l'endroit maudit et l'après-midi du 30 décembre 1961, le premier prélèvement majeur du *limu* a été réalisé. Curieusement, le même jour, un feu d'origine inconnue a détruit à la fois le laboratoire et les prélèvements. Un peu comme une malédiction, en effectuant les secondes récoltes les pieds et mains nus dans l'eau, le préleveur tomba malade, avec des symptômes tels que des

nausées, des vertiges, des maux de têtes, de nombreuses griffures et des abrasions sur la peau. Quoiqu'il en soit, Helfrich et Shupe ont été les premiers à introduire le fameux *limu* dans le monde scientifique [85-87].

3.1.3. L'origine

Fasciné par la légende, le Professeur Scheuer, un pionnier de la chimie des métabolites marins, en collaboration avec le Professeur Helfrich et Richard Moore, a étudié les échantillons toxiques collectés dans la piscine naturelle. Il s'est avéré que le *limu-make-o-Hana* n'était pas une algue mais un « corail mou », ressemblant à une colonie de petites anémones, et connu sous le nom scientifique de *Palythoa toxica* (Figure 16) [88] d'où la molécule responsable de la toxicité tire son nom : la **palytoxine**. Après son isolement, en 1971, il a fallu environ 11 ans à deux groupes de recherche, un de l'université de Hawaïi et mené par R. Moore, et l'autre de l'université de Nagoya (Japon), mené par le Professeur Hirata, pour élucider sa structure chimique à partir de *Palythoa tuberculosa*. Il a fallu autant de temps pour déterminer la formule chimique de la PLTX, en raison de la complexité de la molécule et de son instabilité [89-93]. Par la suite, la palytoxine a été détectée dans d'autres espèces de *Paythoa*, comme *P. tuberculosa* [94], *P. aff. margaritae* [95], *P. caribaeorum* [96], et *P. mammilosa* [97].



Figure 16. a). Anémone du genre *Palythoa* (<http://doris.ffessm.fr/>).

Bien que la palytoxine ait été isolée à partir des espèces du genre *Palythoa* à travers le monde, son origine biologique a longtemps été controversée, certains auteurs suggérant une production bactérienne ou algale [86, 98]. En 1995, le Pr T. Yasumoto a isolé un analogue de la palytoxine à partir d'une microalgue du genre *Ostreopsis*, qui proliférait sur les côtes d'Okinawa (Japon) [99]. Il est depuis établi que les dinoflagellés du genre *Ostreopsis* sont producteurs d'une palytoxine ainsi que de plusieurs analogues. Les PLTXs ont également été retrouvées dans d'autres espèces de *Zoanthidia* (cnidaires à l'aspect de petits anémones de mer), comme *Zoanthus solanderi* et *Z. sociatus*, des espèces compétitrices de *Palythoa* dans

les récifs coralliens [100], mais aussi dans d'autres espèces de *Zoanthidia* comme *Anthozoa* et *Hexacorallia*, des espèces d'anémones de mer (*Radianthus macrodactylus*) [101]. Les *Palythoa sp.* et *Ostreopsis sp.* représentent les sources majeures de production de ces toxines.

3.2. Structure et propriétés chimiques de la palytoxine

La palytoxine est une grosse molécule amphiphile très complexe dont la formule brute est $C_{129}H_{223}N_3O_{54}$. Le poids moléculaire de la palytoxine diffère (entre 2 659 et 2 680 Da), en fonction de l'espèce de *Palythoa* à partir de laquelle elle est isolée [102]. Dans des solutions aqueuses, elle a été trouvée également sous forme de dimère, avec un poids moléculaire de 5 700 Da [103, 104]. Le squelette de la molécule consiste en une longue chaîne aliphatique, partiellement insaturée, contenant des éthers cycliques, 40-42 groupements hydroxyles et 2 fonctions amides, ainsi que 64 centres chiraux, ce qui signifie que la palytoxine possède 2^{64} isomères stéréogéniques potentiels. Le groupement amine primaire sur le C_{115} est à l'origine du caractère basique de la molécule. C'est un composé hygroscopique, amorphe, blanc, qui n'a jamais pu être cristallisé. Le point de fusion de la palytoxine n'est pas connu. Elle serait très résistante à la chaleur, mais brûle au-delà de $300^{\circ}C$ [105]. Elle est insoluble dans les solvants apolaires ou peu polaires, comme le *n*-hexane, le chloroforme et l'éther, modérément soluble dans le méthanol et l'éthanol, et soluble dans la pyridine, le diméthylsulfoxyde et l'eau. En solution aqueuse, la PLTX produit une mousse lorsqu'elle est sous agitation, certainement à cause de son caractère amphiphile, mais ne peut pas être clivée par hydrolyse acide entre fractions lipophiles et hydrophiles [85, 105]. La palytoxine présente un spectre d'adsorption ultraviolet (UV) avec deux maximums d'absorption à 233 et 263 nm, attribués à la présence de deux groupements chromophores (Figure 17). En spectrométrie de masse, en utilisant l'ionisation par électrospray, la palytoxine est caractérisée par un ion de forte abondance, qui provient de la coupure de la liaison entre les carbones 8 et 9 accompagnée d'une perte d'eau [105]. Cet ion (m/z 327) correspond au fragment A [M -fragment B- H_2O]⁺ représenté dans la Figure 17.

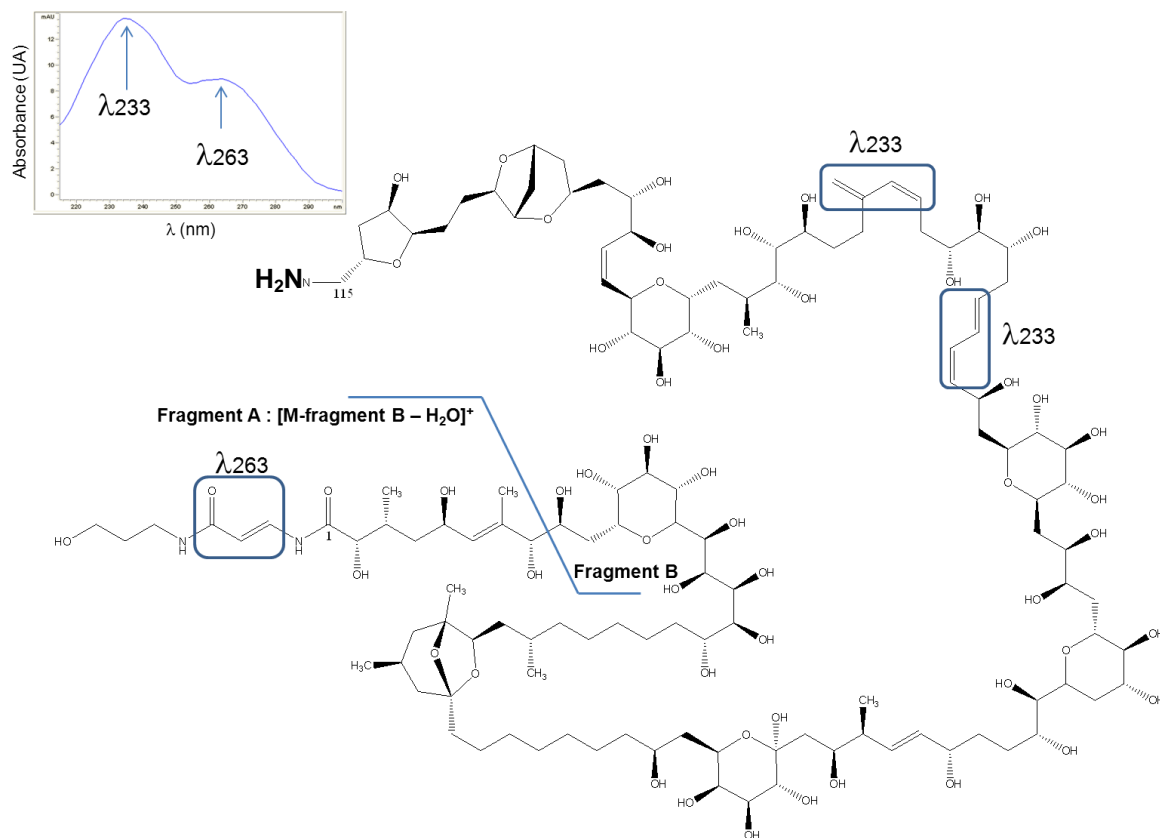


Figure 17. Formule chimique de la palytoxine et propriétés analytiques [33].

Un groupe de recherche a réussi à synthétiser la palytoxine provenant de *Palythoa tuberculosa*. En comparant l'activité biologique, le comportement chromatographique et les données spectrométriques, le composé synthétisé semblait similaire au produit naturel [106, 107]. Cependant, la synthèse chimique de cette énorme molécule comprend environ 65 étapes, rendant cette méthode excessivement longue [108].

3.3. Les analogues de la palytoxine

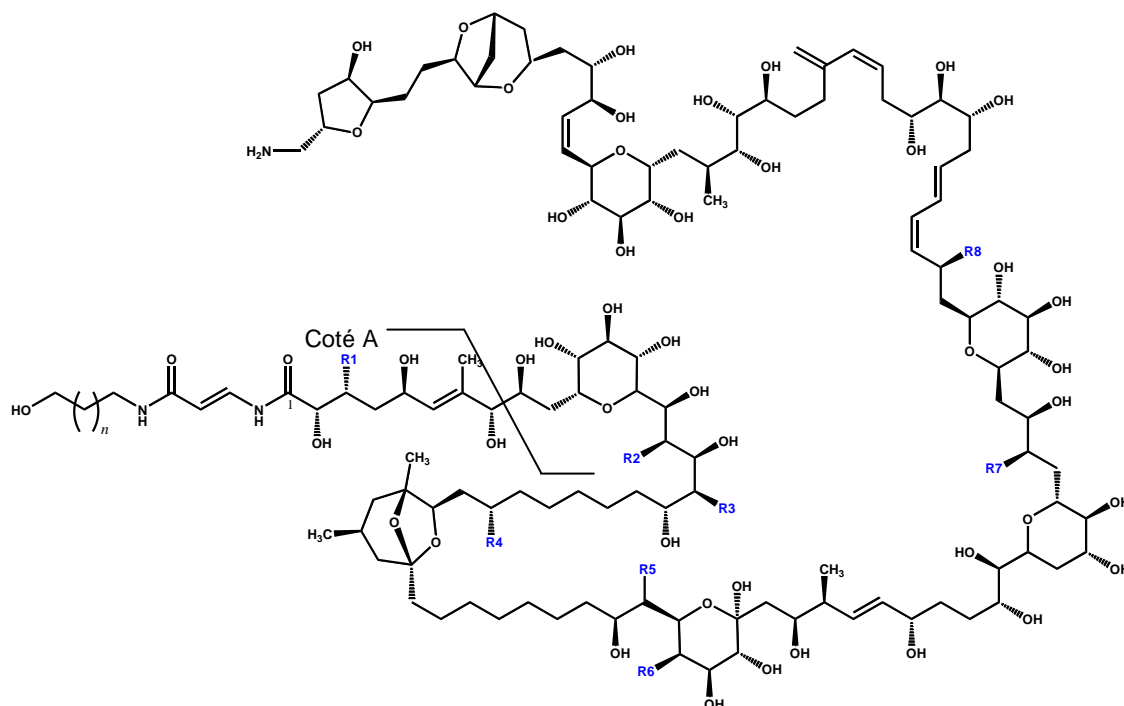
Depuis la première description de la palytoxine en 1971, plusieurs groupes de recherche du monde entier ont entrepris d'étudier cette molécule. Ces recherches ont mené à la découverte de plusieurs analogues, isolés principalement à partir des espèces des genres *Palythoa* et *Ostreopsis*. Ces organismes produisent à la fois la palytoxine ainsi que des analogues qui leur sont propres (Tableau 2). Parfois même, différentes souches de la même espèce peuvent avoir un profil toxinique différent, c'est-à-dire qu'ils ne produisent pas les mêmes analogues. Par exemple, la souche d'*Ostreopsis* cf. *ovata* française provenant de méditerranée produit les ovatoxines de -a à -e [15], alors que la souche d'Italie produit les ovatoxines de -a à -f [23], tandis que celle du Japon produit seulement les ovatoxines-a, d et e [109]. Les quantités de toxines présentes dans les cellules peuvent également varier. Parmi tous les analogues, les

plus connus sont ceux produits par *Palythoa tuberculosa*, *Palythoa toxica*, *Ostreopsis siamensis*, *Ostreopsis mascarenensis* et *Ostreopsis ovata*. *Ostreopsis lenticularis* est également connu pour produire des ostreotoxines, bien que ces dernières n'aient jamais été élucidées. Beaucoup d'études montrent que *Ostreopsis lenticularis* prolifère en association avec des bactéries, qui pourraient être à l'origine des toxines produites [110, 111].

Tableau 2. Palytoxine et analogues produits par *Palythoa tuberculosa*, *Palythoa toxica*, *Chondria armata*, *Lophozozymus pictor*, *Ostreopsis lenticularis*, *Ostreopsis mascarenensis*, *Ostreopsis siamensis* et *Ostreopsis ovata*. NC : non connu.

Composé	Organisme producteur	Poids moléculaire Da	Formule chimique	Références
Palytoxine	<i>Palythoa tuberculosa</i>	2679,5	C ₁₂₉ H ₂₂₃ N ₃ O ₅₄	[85]
Homo-palytoxine	<i>Palythoa tuberculosa</i>	2693,5	C ₁₃₀ H ₂₂₅ N ₃ O ₅₄	[112]
Bishomo-palytoxine	<i>Palythoa tuberculosa</i>	2707,5	C ₁₃₁ H ₂₂₇ N ₃ O ₅₄	[112]
Néo-palytoxine	<i>Palythoa tuberculosa</i>	2661,5	C ₁₂₉ H ₂₂₁ N ₃ O ₅₃	[112]
Déoxy-palytoxine	<i>Palythoa tuberculosa</i>	2663,5	C ₁₂₉ H ₂₂₄ N ₃ O ₅₃	[112]
Palytoxine-b	<i>Palythoa tuberculosa</i>	2721,5	C ₁₃₁ H ₂₂₅ N ₃ O ₅₅	[113]
42-OH-palytoxine	<i>Palythoa toxica</i>	2696,5	C ₁₂₉ H ₂₂₃ N ₃ O ₅₅	[114]
Chondria Armata-I	<i>Chondria armata</i>	NC	NC	Maeda et al (1985) dans [97]
Chondria Armata-II	<i>Chondria armata</i>	NC	NC	Maeda et al (1985) dans [97]
Toxine <i>L. pictor</i>	<i>Lophozozymus pictor</i>	NC	NC	[115]
Ostreotoxine	<i>Ostreopsis lenticularis</i>	NC	NC	[116]
Ostreotoxine 1	<i>Ostreopsis lenticularis</i>	NC	NC	[116]
Ostreotoxine 3	<i>Ostreopsis lenticularis</i>	NC	NC	[117]
Mascarenensis-a	<i>Ostreopsis mascarenensis</i>	2500-2535	NC	[118]
Mascarenensis-a	<i>Ostreopsis ovata</i>	2589,5	C ₁₂₇ H ₂₂₁ N ₃ O ₅₀	[113]
Mascarenensis-b	<i>Ostreopsis mascarenensis</i>	2500-2535	NC	[118]
Mascarenensis-c	<i>Ostreopsis ovata</i>	2629,5	C ₁₂₉ H ₂₂₁ N ₃ O ₅₁	[113]
Ostréocine-d	<i>Ostreopsis siamensis</i>	2634,5	C ₁₂₇ H ₂₁₉ N ₃ O ₅₃	[119]
Ostréocine-b	<i>Ostreopsis siamensis</i>	2650,4	C ₁₂₇ H ₂₁₉ N ₃ O ₅₄	[120]
Ovatoxine-a	<i>Ostreopsis ovata</i>	2648,1	C ₁₂₉ H ₂₂₃ N ₃ O ₅₂	[22]
Ovatoxine-b	<i>Ostreopsis ovata</i>	2692,2	C ₁₃₁ H ₂₂₇ N ₃ O ₅₃	[22]
Ovatoxine-c	<i>Ostreopsis ovata</i>	2708,2	C ₁₃₁ H ₂₂₇ N ₃ O ₅₄	[22]
Ovatoxine-d	<i>Ostreopsis ovata</i>	2664,1	C ₁₂₉ H ₂₂₃ N ₃ O ₅₃	[22]
Ovatoxine-e	<i>Ostreopsis ovata</i>	2664,1	C ₁₂₉ H ₂₂₃ N ₃ O ₅₃	[22]
Ovatoxine-f	<i>Ostreopsis ovata</i>	2676,2	C ₁₃₁ H ₂₂₇ N ₃ O ₅₂	[23]

Seuls certains analogues ont été caractérisés structurellement par des techniques de spectrométrie de masse et de RMN (Figure 18), pour d'autres, seules les différences structurelles sont connues.



Toxines	n	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
Palytoxine	1	CH ₃	OH	OH	CH ₃	H	OH	OH	OH
Homo-palytoxine	2	CH ₃	OH	OH	CH ₃	H	OH	OH	OH
Bishomo-palytoxine	3	CH ₃	OH	OH	CH ₃	H	OH	OH	OH
Néo-palytoxine	1	Côté A*	OH	OH	CH ₃	H	OH	OH	OH
Déoxy-palytoxine	1	CH ₃	OH	OH	CH ₃	H	OH	OH	H
42-OH-palytoxine	1	CH ₃	OH	OH	CH ₃	OH	OH	OH	OH
Ostréocine-d	1	H	OH	H	H	OH	H	OH	OH
Ovatoxine-a	1	CH ₃	H	OH	CH ₃	OH	H	H	OH

Côté A* =

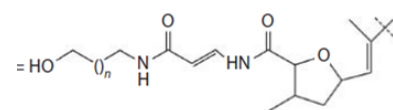


Figure 18. Formules chimiques des analogues connus des PLTXs.

En 1985, le groupe japonais de l'Université de Nagoya a isolé le contenu toxinique de *Palythoa tuberculosa* et en a extrait la palytoxine ainsi que les analogues homo-palytoxine, bishomo-palytoxine, néo-palytoxine et déoxy-palytoxine [112]. Leurs structures ont été déterminées par RMN, par l'intermédiaire d'une série de réactions de dégradations comme l'oxydation, la réduction et l'acétylation.

L'ostrocine-d (OST-D) est produite par *Ostreopsis siamensis*. Usami a été le premier à élucider sa structure en 1995 et a rapporté sa ressemblance avec la PLTX [121], bien que *Ostreopsis siamensis* ait déjà été identifié comme un producteur de toxines [122, 123]. Elle est décrite comme étant la 42-hydroxy-3,26-didéméthyl-19,44didéoxypalytoxine. L'ostrocine-d représente 70% du contenu toxinique total d'extraits d'*Ostreopsis siamensis*. Parmi les toxines produites par cette microalgue, seule l'ostrocine-d a été étudiée en détail, alors que peu d'informations sont disponibles sur la structure de l'ostrocine-b.

Ostreopsis ovata est le plus petit dinoflagellé du genre et est distribué dans le monde, dans l'océan Pacifique, les Mers des Caraïbes, l'Océan Atlantique et la Mer Méditerranée. Il est capable de produire plusieurs analogues d'ovatoxines (OVTXs), dont sept congénères, de structure très proche, ont été décrits : OVTX-a, -b, -c, -d, -e, et -f [22, 23]. Un groupe de recherche espagnol a récemment découvert une nouvelle ovatoxine, nommée ovatoxine-g, dans des souches d'*Ostreopsis cf. ovata* (communication personnelle). Généralement, l'OVTX-a représente au moins 50 % des toxines produites par la microalgue, à l'exception d'une souche italienne unique, dans laquelle l'OVTX-f représente 50 % des ovatoxines produites. *Ostreopsis ovata* produit également une palytoxine, mais à cause de la stéréostructure complexe de cette toxine, ce composé a été nommé putative-palytoxine (p-PLTX) plutôt que PLTX, sans rejeter l'hypothèse que ce composé soit un isomère de la PLTX. Toutes les ovatoxines absorbent à 233 et 263 nm et subissent une fragmentation entre le C8 et le C9 en spectrométrie de masse. Pourtant, elles ne donnent pas toujours le même fragment A m/z 327. À part la p-PLTX, l'OVTX-a, l'OVTX-d et l'OVTX-f qui donnent le fragment $[M\text{-fragment B-H}_2\text{O}]^+$ m/z 327, l'OVTX-b et l'OVTX-c produisent le $[M\text{-fragment B-H}_2\text{O}]^+$ m/z 371 et l'OVTX-e donne le fragment $[M\text{-fragment B-H}_2\text{O}]^+$ m/z 343. Dans des études japonaises, des isomères d'ovatoxines, possédant les mêmes formules chimiques mais des temps de rétention différents des ovatoxines décrites par les équipes européennes ont été récemment décrits dans des souches d'*Ostreopsis ovata* [124].

Ostreopsis mascarenensis produit les mascarenotoxines-a -b et -c (McTX). Cette espèce a d'abord été identifiée dans les récifs coralliens peu profonds du sud-ouest de l'océan Indien. Elle est désormais reportée également dans les îles de la Réunion, de Mayotte et Rodrigues [105]. Les mascarenotoxines ont été mises en évidence par chromatographie liquide haute performance associé à un détecteur à barrettes diode (CLHP-DAD) par comparaison avec le spectre UV de l'étalon de la PLTX et grâce au fragment caractéristique m/z 327 obtenu en spectrométrie de masse, mais la structure chimique de ces composés n'a pas encore été

élucidée [118, 125]. Ces toxines peuvent également être produites par *Ostreopsis ovata*. C'est chez cette dernière espèce que les formules chimiques et les poids moléculaires ont été déterminés pour McTX-a et pour McTX-c [113].

4. Le genre *Ostreopsis*

4.1. Identification

Ostreopsis sp. est une algue unicellulaire. Il appartient au groupe des dinoflagellés, c'est-à-dire que les cellules sont mobiles et définies par deux flagelles dissemblables insérés dans deux sillons perpendiculaires de la cellule. Le flagelle localisé dans le sillon transversal (cingulum) assure la propulsion tandis que celui situé dans le sillon longitudinal (sulcus) dirige la nage de la cellule [4]. *Ostreopsis sp.* appartient à la famille des Ostreopsidaceae Linderman. Le genre a d'abord été décrit en 1901 avec l'espèce *Ostreopsis siamensis* Schmidt (1901), et plus tard redécrit par Fukuyo (1981) avec deux autres espèces *Ostreopsis ovata* Fukuyo, et *Ostreopsis lenticularis* Fukuyo [126]. À l'heure actuelle, 9 espèces différentes ont été décrites parmi lesquelles *Ostreopsis siamensis*, *Ostreopsis lenticularis*, *Ostreopsis ovata*, *Ostreopsis heptagona*, *Ostreopsis labens*, *Ostreopsis marinus*, *Ostreopsis belizeanus*, *Ostreopsis caribbeanus* et *Ostreopsis mascarenensis* [127-129].

Les cellules d'*Ostreopsis spp.* sont assez larges, en forme de gouttes et aplaties, avec une épaisseur (notée W) comprise entre 25 et 138 µm (Figure 19 A et B). Le diamètre dorso-ventral (DV) (longueur de la cellule) est compris entre 27 µm et 195 µm. Elles possèdent des pores qui sont représentés par des fentes longues, courbés ou droites. Ces pores sont des ouvertures ou des canaux dans les parois cellulaires qui peuvent être impliqués dans l'extrusion de trichocystes ou de mucocystes, ou dans d'autres processus actifs [130]. Le cingulum est fin, profond et presque circulaire avec des bords lisses. Le sulcus est, quant à lui, très petit, encastré et caché dans le cingulum. Les cellules possèdent de nombreux chloroplastes marron-dorés, excepté sur le bec ventral qui est transparent, permettant leur fonction photosynthétique [127].

Ce sont des espèces principalement benthiques, c'est-à-dire qu'elles ont besoin d'un substrat pour se développer, qu'il soit abiotique comme les rochers, ou biotiques comme des macroalgues. Les cellules peuvent également être trouvées dans la colonne d'eau, en plus faible abondance, et former des « fleurs d'eau » en surface (Figure 19 C). Le lien entre les cellules planctoniques et les cellules benthiques n'est pas encore clairement défini [16]. Il

s'agirait d'une resuspension des cellules benthiques mûres dans la colonne d'eau ; cette hypothèse est renforcée par le fait que les cellules planctoniques sont plus grosses que les cellules benthiques [131].

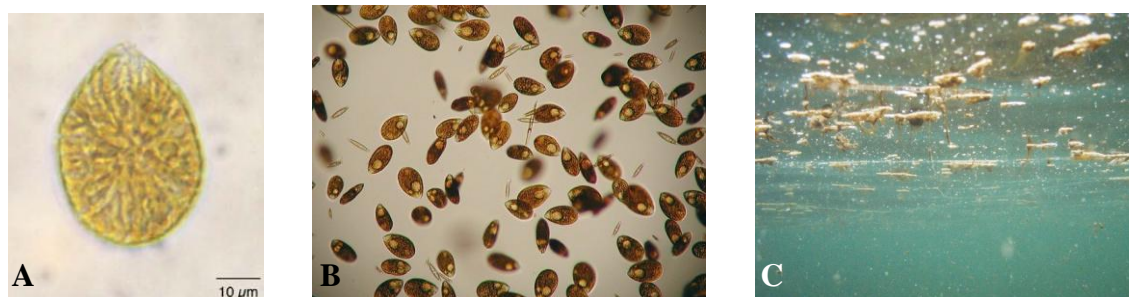


Figure 19. Cellules d'*Ostreopsis* sp. (A) [130], (B) [fotoalbum.virgilio.it]. (C) "Fleur d'eau" d'*Ostreopsis* sp. en surface. [http://www.ramoge.org/fr/ostreopsis_ovata.aspx].

Les cellules sont aussi retrouvées enfermées dans du mucus, qui est constitué de filaments de polysaccharides (Figure 20). Ce mucilage est une caractéristique commune pour beaucoup de microalgues et il semble avoir plusieurs fonctions, comme la défense contre le broutage, la capture des proies ou l'attachement sur des substrats. De plus, il joue un rôle important dans la dynamique des efflorescences d'*Ostreopsis*, caractérisée par une phase initiale benthique avec la formation d'un film marron sur les surfaces colonisées, suivi de leur détachement du fond et la resuspension des cellules dans la colonne d'eau par l'action mécanique des vagues [130].



Figure 20. Cellule d'*Ostreopsis ovata* et mucilage [130].

La différenciation des espèces d'*Ostreopsis* est traditionnellement basée sur leurs caractères morphologiques, comprenant leur taille, leur forme, la forme de leur enveloppe, et le nombre de plaques sur la thèque (système de nomenclature des dinoflagellés) [11]. Pourtant, l'outil utilisé pour discriminer les espèces entre-elles est la comparaison du rapport des diamètres dorso-ventraux et antéro-postérieurs (DV/AP), supérieurs à 4 pour *Ostreopsis siamensis* et inférieurs à 2 pour *Ostreopsis ovata* par exemple [11, 132, 133]. La résolution de la taxonomie des espèces d'*Ostreopsis*, basée sur la morphologie a été très difficile à cause de la

variabilité intra-spécifique des spécimens et la gamme de taille étendue des cellules, aussi bien dans la nature qu'en culture. Depuis ces dernières années, des études phylogénétiques se sont révélées utiles pour l'identification de ces espèces.

4.2. Conditions d'efflorescences d'*Ostreopsis sp.*

L'émergence des espèces d'*Ostreopsis* autour du bassin méditerranéen a conduit à une augmentation des études sur l'écophysiologie de ce dinoflagellé. En effet, la connaissance des paramètres influençant la croissance de l'algue permet non seulement d'en maîtriser la culture, à des fins de recherches en laboratoire, mais aussi de tenter de prévoir les zones de prolifération des cellules et ainsi fournir aux gestionnaires des outils d'aide à la décision, afin de protéger la population et le consommateur du danger que représente *Ostreopsis sp.*

4.2.1. Le substrat

Les espèces d'*Ostreopsis* sont des dinoflagellés benthiques qui sont préférentiellement épiphytiques, c'est-à-dire qu'elles poussent plus facilement sur les macroalgues, bien qu'elles soient capables de croître sur une variété de substrats différents. Certains auteurs indiquent des différences de densités d'*Ostreopsis* selon l'espèce de macrophyte [132] ; d'autres suggèrent qu'*Ostreopsis* préférerait certaines algues dont l'architecture serait tridimensionnelle [10]. Dans une autre étude, les plus fortes abondances de cellules ont été retrouvées sur des substrats durs, tels que des rochers ou des coquilles de mollusques (environ 7300 cells.cm⁻²), par rapport aux macroalgues (environ 1800 cells.cm⁻²). En effet, il serait possible que les substrats vivants soient moins favorables à la microalgue hôte, probablement à cause de la production de substances allélopathiques (ensemble de plusieurs interactions biochimiques directes ou indirectes, positives ou négatives, d'une plante sur une autre), contrairement aux substrats non-vivants [13].

4.2.2. L'hydrodynamisme

L'hydrodynamisme, c'est-à-dire les vagues et les courants, induit la plupart du temps par les vents, joue un rôle déterminant sur la croissance des microalgues pour deux raisons : lorsque les vents sont forts, ils peuvent induire une diminution de la température de l'eau par une homogénéisation de la couche de surface avec les couches plus profondes. Cette diminution de la température de la couche de surface de l'eau, même si elle est souvent accompagnée d'une augmentation de la concentration en sels nutritifs, ne semble pas être favorable au développement d'*Ostreopsis sp* [134]. De plus, un brassage des eaux, lors d'un coup de vent,

facilite le décrochage des microalgues benthiques de leur substrat. Plusieurs études et observations soulignent l'importance de l'hydrodynamisme qui est capable d'affecter la dynamique des efflorescences des espèces d'*Ostreopsis*, qui sont plus abondantes dans les zones abritées que dans les zones exposées [13, 135, 136].

4.2.3. La saisonnalité

La saisonnalité des efflorescences de phytoplancton est fréquemment reliée avec la présence de kystes benthiques [137], qui correspondent à une phase non-mobile et benthique du cycle d'un dinoflagellé, morphologiquement très résistants et qui peuvent survivre pendant une période plus ou moins longue avant de « germer » à nouveau [4].

Une remarquable particularité dans la croissance d'*Ostreopsis* est la haute variabilité de la taille des cellules. En effet, deux classes de population de cellules, différentes en taille, peuvent être observées à la fois dans le milieu naturel et en culture. La présence de petites cellules, morphologiquement similaires aux petites cellules végétatives, est commune dans le cycle de vie des dinoflagellés et peut être attribué à une division asexuée rapide qui favorise le renouvellement de la population cellulaire [137]. Les grosses cellules apparaissent, quant à elle, à un stade plus avancé de la croissance de la microalgue

Le modèle temporel des efflorescences d'*Ostreopsis* peut être différent selon les zones géographiques. En effet, alors qu'autour du bassin Méditerranéen elles apparaissent en juillet-août, dans le nord de la mer Adriatique, la première cellule apparaît fin août et l'efflorescence atteint son maximum dans la première moitié du mois d'octobre, quand les températures de l'eau commencent à diminuer [12, 13].

4.3. Facteurs de croissance et de production toxinique au laboratoire

Contrairement aux espèces pélagiques, les dinoflagellés benthiques, comme *Ostreopsis sp.*, ont besoin d'un support pour se fixer. De plus, ils forment du mucus au cours de sa croissance. De ce fait, sa mise en culture en laboratoire exige une mise au point particulière pour étudier l'influence des paramètres environnementaux sur la croissance des cellules et la production des toxines.

4.3.1. La lumière

Les espèces de dinoflagellés photosynthétiques peuvent s'adapter rapidement à des variations d'intensité lumineuse, même si cela influence le taux de croissance et la production de toxines. La température et l'irradiance sont les moteurs principaux du cycle saisonnier dans les régions côtières tempérées.

La plupart des études menées sur *Ostreopsis sp.* montre que cette espèce prolifère dans des zones où l'intensité lumineuse est forte, même si les valeurs d'irradiance ne sont pas toujours reportées. Les études en laboratoire montrent qu'*Ostreopsis sp.* survit difficilement dans les zones d'ombres, présentant de faibles valeurs d'irradiance ($10 \mu\text{mol photons m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), mais ne permettent pas clairement de définir une préférence de luminosité [138].

Dans le milieu naturel, les abondances des cellules d'*Ostreopsis* diminuent généralement de 0,5 à 3 mètres de profondeur. La présence de populations denses en sub-surface indique une haute résistance à une forte intensité lumineuse. Il s'avèrerait qu'*Ostreopsis sp.* possède une capacité d'acclimatation suivant les conditions environnementales, comme la température ou les conditions d'irradiance [139, 140].

4.3.2. La salinité

La salinité est un paramètre qui agit sur l'activité enzymatique des microalgues, en modifiant le pH, et sur la consommation énergétique allouée à la régulation osmotique. La salinité va donc avoir un effet sur le métabolisme cellulaire et sur la croissance [141].

Ostreopsis sp. semble être tolérant à une gamme de salinité comprise entre 26 et 40 psu [142]. Morton et al. (1992) rapportent qu'*Ostreopsis siamensis* et *Ostreopsis heptagona* isolées des îles Keys en Floride possèdent une croissance maximale à 33 psu [143], tandis que Rhodes et al (2000) ont observé qu'*Ostreopsis cf. siamensis* a une préférence pour une gamme de salinité comprise entre 28 et 34 psu [144]. À l'inverse, la croissance d'*Ostreopsis cf. ovata* est corrélée négativement avec la salinité à Hawaii (salinité comprise entre 23 et 36) [145], alors que Pistocchi a démontré que la croissance d'*Ostreopsis cf. ovata* de la mer Adriatique est légèrement influencée par la salinité, où le taux de croissance est augmenté pour de fortes valeurs de salinité (36-40 psu) [146].

4.3.3. La température

Tout comme la salinité, la température va influencer l'activité enzymatique des microalgues. En effet, les enzymes ont une température optimale de fonctionnement, en deçà de laquelle

les vitesses des réactions sont plus lentes, et au-delà de laquelle les enzymes se dégradent plus facilement [141]. Plusieurs rapports affirment que la condition environnementale la plus importante, qui conditionne la tendance saisonnière et l'abondance des dinoflagellés benthiques toxiques est la température de l'eau [143, 147, 148].

Ostreopsis sp. est capable de survivre à des températures comprises entre 14°C et 32°C. Cependant, en étudiant la croissance et l'aspect des cellules, il s'avère que ce dinoflagellé est mieux adapté à une fenêtre de température comprise entre 18°C et 30°C. Plusieurs études ont été menées pour trouver la température optimale de croissance, mais beaucoup apparaissent contradictoires, sûrement en raison des différences d'espèces et de localisation géographique. En effet, *Ostreopsis cf. ovata* de Méditerranée semble répondre à de fortes températures en mer Tyrrhénienne (entre 26-31 °C) [149], mais les cellules ne croissent que lorsque la température passe dessous 22°C en mer Adriatique [13] ; tandis qu'*Ostreopsis. siamensis* et *Ostreopsis ovata* en provenance du Japon semblent stimulés par de plus faibles températures (de 7 à 25°) [133], et *Ostreopsis siamensis* de Nouvelle-Zélande ne croît pas au-dessous de 20°C [144].

4.3.4. Les nutriments

Il est connu que les écosystèmes côtiers deviennent de plus en plus susceptibles de s'enrichir en nutriments, principalement à cause des activités humaines, entraînant l'eutrophisation des eaux côtières. La disponibilité des nutriments est considérée comme un facteur environnemental important dans l'efflorescence des dinoflagellés benthiques [150].

La limitation en phosphore et en azote affecte le taux de croissance d'*Ostreopsis* et réduit la biomasse finale d'un facteur 2 environ [151]. La limitation en azote augmente la population de petites cellules, tandis que la limitation en phosphore augmente la population de grosses cellules. La limitation en nutriments affecte également la production de toxines, le rendement diminuant jusqu'à 53% pour une déficience en azote, cet atome étant nécessaire à la construction de la molécule. En revanche, le profil toxinique, quant à lui, reste le même quelle que soit la déficience. Sans surprise, le silicium n'a pas d'impact clair sur l'abondance d'*Ostreopsis*, puisque cette espèce n'utilise pas spécialement le silicium pour sa croissance, contrairement aux diatomées [152].

5. Activité toxicologique des PLTXs

5.1. Risques sanitaires

Le mode de vie des espèces d'*Ostreopsis* peut être résumé ainsi : les cellules prolifèrent à l'abri des vagues, dans des zones peu profondes, avec des conditions de fortes températures (entre 26-31 °C) et de luminosité. De plus, les cellules peuvent être facilement resuspendues dans la colonne d'eau. Il est donc très probable de les retrouver sur les plages à fonds rocheux, ou sur les plages qui utilisent des structures en conglomérats, pendant les périodes estivales, mais leur présence n'est pas sans risque [13, 128, 132, 144].

En effet, les cellules benthiques, qui prolifèrent sur les fonds côtiers, peuvent être ingérées par les poissons ou les échinodermes qui viennent brouter directement sur les macroalgues. Les toxines ainsi assimilées entrent dans la chaîne alimentaire et peuvent provoquer des effets sanitaires indésirables. En plus du risque pour l'Homme, les toxines d'*Ostreopsis* peuvent provoquer la mort des invertébrés, notamment celle des oursins, ainsi qu'une perte significative de leur épines [13, 136]. La mortalité des organismes marins sont liées à la fois aux cellules planctoniques, *via* les coquillages filtreurs, et aux cellules benthiques, *via* les organismes herbivores [13, 136]. La particularité d'*Ostreopsis sp.* est d'être capable de provoquer des intoxications cutanées et des problèmes respiratoires *via* la dispersion d'aérosols, contenant des cellules d'*Ostreopsis*, dans l'air, sur les baigneurs et les personnes présentes sur les plages. Si un coup de vent intervient lors d'efflorescences intenses d'*Ostreopsis* et qu'il transporte des embruns chargés de microalgues ou de toxines vers la côte, le risque sanitaire augmente. En Méditerranée nord occidentale, le plus vaste phénomène de ce type d'intoxication date de l'été 2005, sur la côte ligurienne, où une centaine de personnes a été exposée à des aérosols durant des activités balnéaires, et ont alors nécessité des soins médicaux, à cause de symptômes principalement respiratoires [21]. Cet événement s'est produit en parallèle d'une efflorescence importante d'*Ostreopsis* et les symptômes disparurent après la diminution des concentrations cellulaires. Alors que les intoxications par inhalation semblent principalement liées aux concentrations cellulaires dans la colonne d'eau (cellules planctoniques), les irritations par contact sont, quant à elles, plutôt liées à l'abondance des cellules en « fleurs d'eau » (Figure 21).

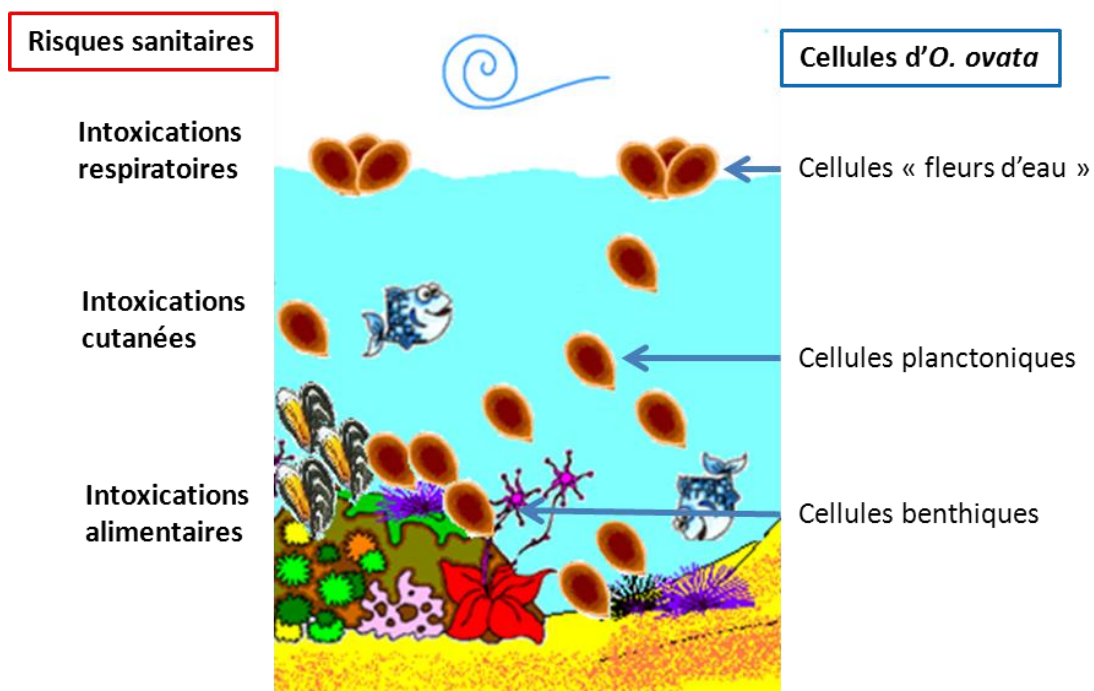


Figure 21. Risques sanitaires liés à la présence d'*Ostreopsis sp.* dans les zones balnéaires.

Outre le risque sanitaire, dû à la présence d'*Ostreopsis sp.* dans les zones balnéaires, le risque socio-économique n'est pas négligeable. En effet, l'augmentation de l'intensité du phénomène pourrait obliger les autorités compétentes à fermer des plages, ce qui pourrait avoir un impact économique significatif [134].

5.2. Symptômes chez l'Homme

Les palytoxines sont connues dans les zones tropicales pour être la cause d'intoxications alimentaires après ingestion de poissons contaminés et entraînant la mort. De tels cas ont été rapportés dans le monde. On retient ainsi le cas d'un homme de 49 ans aux Philippines qui est mort 15 h après s'être nourri de crabe contaminé par les PLTXs [71] ; d'un couple de Japonais empoisonné par la consommation de poisson perroquet contenant des PLTXs. L'homme guérit au bout d'une semaine, la femme décéda après 4 jours [72]. On retient par ailleurs le cas d'une femme à Madagascar qui succomba après avoir mangé des sardines contaminées, à la fois par les PLTXs, mais aussi par d'autres toxines impliquées dans la ciguatéra [73]. Plus récemment, un cas d'intoxication de 11 personnes par les PLTXs, après ingestion de mérou contaminé par les PLTX a été décrit au Japon. Dans ce cas, les analyses ont rejetées l'implication des ciguatoxines [153].

Plusieurs symptômes ont été reportés par les consommateurs après avoir mangé des produits de la mer contaminés par les PLTXs, comme des malaises gastro-intestinaux, des diarrhées,

des nausées, des vomissements, des ataxies (pathologie neuromusculaire qui consiste en un manque de coordination fine des mouvements volontaires), des vertiges, des engourdissements des extrémités, des convulsions et des bradycardies. L'intoxication par les PLTXs est caractérisée par un goût métallique dans la bouche. Lorsque le vent emporte les cellules d'*Ostreopsis* ou ses toxines sous forme d'aérosols sur la côte, des intoxications respiratoires ou cutanées peuvent être observées sur l'Homme.

5.3. Toxicité de la palytoxine chez les mammifères

Pour bien comprendre le risque toxicologique dû à la PLTX dans la chaîne alimentaire, des études *in vivo* sont nécessaires. La dose de palytoxine nécessaire pour obtenir une toxicité aigüe est fortement dépendante du mode d'administration [154].

5.3.1. Toxicité après administration intraveineuse

C'est lorsqu'elle est injectée par voie intraveineuse que la palytoxine exhibe la plus forte toxicité. Cependant, de larges différences peuvent être observées selon la sensibilité des espèces traitées. Beaucoup d'études concernent l'injection de PLTX par voie intraveineuse chez le chien. En effet, cette espèce est très sensible à la PLTX. Pour la PLTX isolée à partir de corail du genre *Palythoa*, la toxine (à 0,5 µg/kg) est létale au bout de 10 min et provoque des anomalies de la pression sanguine et de l'électrocardiogramme, qui dans la plupart des cas, mènent à des arrêts cardiaques [105, 155]. Ces mêmes symptômes ont été observés chez le chat [155, 156]. Chez le singe, les premiers signes de toxicité de PLTX extraite de *Palythoa sp.* sont l'ataxie, la somnolence et la faiblesse des membres, suivis d'évanouissements et de la mort (dose létale médiane (DL₅₀) 0,078 ± 0,018 µg/kg.). Dans les mêmes conditions, c'est le lapin qui semble l'animal le plus sensible (DL₅₀ 0,025 ± 0,001 µg/kg) [157].

5.3.2. Toxicité après administration intrapéritonéale

Le test de toxicité le plus couramment utilisé est l'injection intrapéritonéale (i.p.) chez la souris, notamment pour la détection des PLTXs pour le test souris. La toxicité de la palytoxine est plus faible par injection intrapéritonéale que par voie intraveineuse. De manière générale, l'injection d'étalon de PLTX commerciale ou purifiée à partir de diverses matrices donne les mêmes résultats. À partir de l'étalon de PLTX, les résultats de DL₅₀ rapportés sont basses ; 0,72 ± 0,18 µg/kg pour Rhodes et al [18], et 294,6 ng/kg (± 5,38 ng/kg) rapportée par Riobo et al [158]. Dans les deux cas, les souris présentaient une démarche anormale, les pattes

postérieures écartées à l'arrière, le souffle court, l'arrêt de mouvements volontaires et mouraient. Plusieurs études ont été réalisées sur l'effet de l'injection intrapéritonéale chez la souris d'extraits de différentes matrices contenant de la PLTX, telles que les poissons, les crustacés ou les microalgues. Dans ces études, la probabilité que les effets observés soient dus à la PLTX, ou à ses analogues est considérée comme importante, mais le degré de pureté des matrices pose des problèmes de comparaison. Pourtant, les symptômes décrits sont généralement l'incoordination motrice, et/ou la paralysie, la dyspnée, parfois accompagnée de cyanoses et de convulsions [159-161]. L'injection intrapéritonéale d'un extrait de crabe (*D. alcalai*) contenant de la PLTX (1 µg/kg) a abouti à la paralysie des pattes arrières et entraîné une perte de poids de l'animal pour les souris survivantes, ainsi qu'une perte de poids de la rate, des glandes lymphatiques et du foie. D'un point de vue histologique, l'observation des intestins a montré que les parois étaient rougeâtres, congestionnées et en sang, et qu'il s'était produit une perte et une dégradation des cellules épithéliales [162]. L'injection i.p. répétée de PLTX (de 29 injections 0,25 µg/kg) d'un extrait de crabe (*D. alcalai*) chez les souris ont provoqué les mêmes symptômes, mais celles-ci ont récupéré après l'arrêt du traitement.

5.3.3. Toxicité après administration orale

La palytoxine est beaucoup moins toxique lors d'une administration orale. Une étude sur les rats dans laquelle la palytoxine est administrée par gavage, indique une DL₅₀ au-delà de 40 µg/kg. D'autres études sur des souris ont donné des valeurs de DL₅₀ comprises entre 311 et 1 039 µg/kg [163, 164]. Alors que pour les doses les plus basses, les signes extérieurs se limitent à des démangeaisons, la fréquence et la sévérité des signes augmentent à des doses plus fortes, incluant des spasmes, des paralysies des pattes postérieures, des détresses respiratoires et des agitations. L'analyse chimique du sang montre alors une dose significativement élevée de créatine phosphokinase et de lactate déshydrogénase, des enzymes impliquées dans la libération de l'énergie et le métabolisme du glucose respectivement. Le « niveau sans effet nocif observé » (NOAEL) serait de 200 à 300 µg de PLTX/ kg de poids corporel selon les auteurs [154, 163]. La toxicité de la PLTX chez la souris est bien plus basse par voie orale lorsqu'elle est ingérée mixée avec de la nourriture, puisqu'aucun effet n'est observé à de fortes concentrations pouvant aller jusqu'à 2 500 µg/kg [164]. À notre connaissance, aucune étude n'a été effectuée sur la toxicité de PLTX purifiée chez d'autres mammifères que les souris.

5.3.4. Toxicité par d'autres voies d'administration

D'autres voies d'administration des PLTXs ont été étudiées. La palytoxine est toxique par **administration sublinguale**, incluant des symptômes tels que des hémorragies pulmonaires, des inflammations intestinales et des troubles gastro-intestinaux ; cependant, la DL_{50} par cette voie n'a pas été établie [154]. Les valeurs de DL_{50} rapportées par des **injections intramusculaires et sous-cutanées** sont similaires à celles observées par injection intrapéritonéale. Un blanchiment de la peau est observé après injection sous-cutanée, indiquant une constriction des capillaires sanguins. La palytoxine est également extrêmement toxique par **instillation intra-trachée**, méthode qui consiste à introduire goutte à goutte une solution de palytoxine dans la trachée et d'en observer les effets. Dans cette étude, la DL_{50} est de $0,63 \mu\text{g}/\text{kg}$ chez le rat, avec des symptômes similaires à une injection intraveineuse [157]. Une **instillation dans les yeux** induit de sévères conjonctivites, des œdèmes, des ulcérations et l'opacité de la cornée. Par ailleurs, après une **application sur la peau** de PLTX, de sévères réactions irritantes sont observées, impliquant des inflammations, des œdèmes et des nécroses [157]. Après injections répétées de PLTX ($0,5\mu\text{g}$) deux fois par semaine pendant un mois, le développement de tumeurs est observé dans 62,5 % des souris traitées [165].

5.4. Toxicité chez les poissons et les invertébrés

La palytoxine a été impliquée dans de nombreux cas d'intoxications alimentaires, *via* l'ingestion d'organismes capables d'accumuler cette toxine, par exemple les poissons et les crabes. Les effets toxicologiques surviennent directement du producteur de toxines ou indirectement par des vecteurs plus ou moins sensibles qui l'accumulent. Une variété d'organismes est capable d'accumuler de très hautes doses de palytoxine dans leurs tissus, sans dommages apparents, et sont très tolérants à sa forme active, parmi lesquels les poissons, les crabes, les oursins et les organismes vivant à proximité des *Palythoa spp.* comme les éponges et d'autres coraux mous, les moules, les étoiles de mer et les gorgones [166, 167].

À l'inverse, des mortalités d'invertébrés, dues à la palytoxine et à ses analogues, ont été reportées dans les zones d'efflorescence d'*Ostreopsis sp.* L'oursin peut-être très touché par ce phénomène avec notamment des pertes d'épines, l'altération de son exosquelette et leur mort [18, 136, 168]. Le crustacé *Artemia salina* est également très sensible à la palytoxine, des concentrations comprises entre 542 et $906 \text{ cellule.mL}^{-1}$ sont suffisantes pour causer de 65 à 100 % de mortalité [132]. En Italie, des mortalités en masse d'invertébrés et de macroalgues, des impacts visibles sur les épi-benthos sessiles, comme les crustacés, les bivalves et les

gastéropodes, et mobiles, comme les échinodermes, des céphalopodes et des petits poissons ont été observés pendant les efflorescences d'*Ostreopsis ovata* [13, 24, 169].

5.5. Toxicité relative des analogues

Il a été défini qu'il existe peu de différences structurelles entre la palytoxine et ses analogues, ce qui laisse supposer que ces derniers se fixeraient sur la même cible biologique et auraient donc les mêmes effets. Pourtant, il a également été montré que des changements structurels de la palytoxine peuvent réduire son pouvoir cytotoxique et hémolytique.

L'**ostrécine-d** a été reportée comme étant environ aussi toxique que la palytoxine par administration intrapéritonéale (5 µg/kg), intra-trachée, et orale, même si la quantification des toxines n'ont pas été rapporté en parallèle [154]. D'autres études quantitatives montrent une DL₅₀ de 0,75 µg/kg pour l'ostrécine-d par injection intrapéritonéale [121]. À des doses létales, administrées par injection intrapéritonéale, l'ostrécine-d provoque des brûlures dans l'estomac et les intestins, contrairement à la palytoxine, qui ne cause pas de péritonites. La DL₅₀ par voie orale de la **42-OH-palytoxine** est comprise entre 384 et 1 018 µg/kg, avec une moyenne de 652 µg/kg (95 % de confiance), ce qui n'est pas significativement différent de la palytoxine [114]. La **N-acétyle-palytoxine** a été reportée moins toxique que la palytoxine, même si, à l'instar de l'ostrécine-d, les quantifications dans les échantillons n'ont été effectuées [170]. Concernant les **mascarenotoxines**, seules des études préliminaires sur des extraits pré-purifiés ont été réalisées. Elles ont montré que ces toxines sont hémolytiques, la McTX-b plus que la McTX-a, mais toutes deux, bien moins que la palytoxine. Lorsque les McTX sont injectées par voie intrapéritonéale, les symptômes sont semblables à ceux provoqués la palytoxine, tels que prostration, paralysies progressives des membres, dyspnées et la mort après convulsions, 20 minutes après l'injection [125].

L'**ovatoxine-a** a été isolée récemment, et de la même manière, seules des études préliminaires ont été réalisées sur cette toxine. La toxicité potentielle a été évaluée par injection intrapéritonéale chez la souris. Une à 3 minutes après l'injection (7 µg/kg), les souris ont commencé à se tortiller, toutes sont mortes au bout de 30 minutes avec des membres paralysés [26]. Les autres ovatoxines n'ont pas encore été isolées, par conséquent aucune information sur leur toxicité n'est disponible. Pourtant, l'évaluation de la toxicité des ovatoxines constitue une étape cruciale afin d'évaluer le danger sanitaire réel causé par la présence d'*Ostreopsis ovata* dans les eaux méditerranéennes.

6. Mode d'action de la PLTX

La palytoxine est une des substances naturelles parmi les plus toxiques connues. C'est une grosse molécule complexe, dont le caractère amphiphile conduit à la haute capacité des PLTXs à interagir avec des systèmes biologiques et participe à sa toxicité [171].

La palytoxine exerce son action biologique puissante en ciblant les canaux ioniques Na^+/K^+ -ATPase des membranes cellulaires de la plupart des cellules des êtres vivants. Le caractère hydrophobe de la double couche lipidique, caractéristique de la membrane cellulaire, permet à la cellule de maintenir des concentrations de solutés différentes de part et d'autre de la membrane, c'est-à-dire entre le cytoplasme et le milieu extracellulaire. La séparation des compartiments définis par la membrane ne doit cependant pas être totale, car des échanges moléculaires sont nécessaires à la vie cellulaire. Les cellules ont ainsi développé des systèmes de transport d'ions et de macromolécules faisant intervenir des protéines membranaires : transporteurs, pompes ou canaux. Ces protéines, dont l'ouverture est finement contrôlée selon une multitude de mécanismes, permettent aux ions de diffuser à travers la membrane. Celles exprimées dans les cellules excitables, c'est à dire capables de modifier leur activité suite à une stimulation (cerveau, nerfs, cœur, muscles, glandes endocrines) permettent de générer un signal électrique à l'origine de la perception, de la contraction musculaire, des battements cardiaques ou de la sécrétion des hormones. Dans les cellules non excitables, ces protéines servent à réguler la composition ionique des fluides corporels (sang, lymph, milieux intra et extra cellulaires, urine, etc...), contribuant à l'équilibre hydrominéral.

Dans son cycle de transport, la pompe Na^+/K^+ -ATPase assure la double fonction de faire sortir trois ions Na^+ de la cellule et de faire entrer deux ions K^+ , en alternance, contre le gradient de concentration. Son mécanisme moléculaire de transport exige trois étapes : d'abord les ions se fixent à la protéine, avec une haute affinité, puis les ions sont transférés au travers de la membrane, et enfin, l'affinité de la protéine avec les ions diminue, permettant la libération des ions de l'autre côté de la membrane (Figure 22). Le gradient Na^+/K^+ est impliqué dans la régulation du pH, la régulation du volume cellulaire, le transport des nutriments, tels que le glucose et certains acides aminés, la transmission du signal dans le système nerveux.

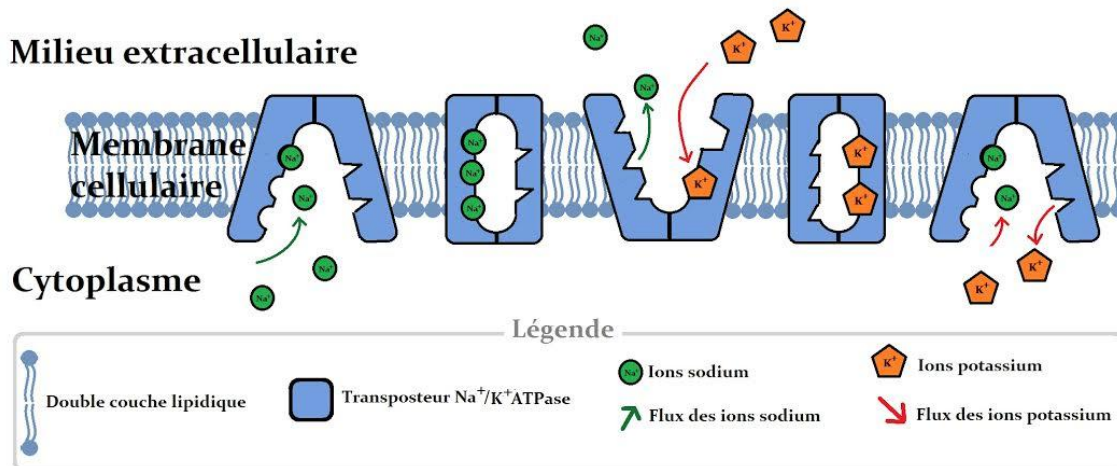


Figure 22. Fonctionnement de la pompe Na^+/K^+ ATPase [172,173].

L'interaction de la palytoxine avec la pompe Na^+/K^+ -ATPase induit un changement dans la conformation de la protéine qui se transforme en canal cationique non-spécifique, c'est-à-dire que les canaux sont ouverts simultanément [172, 173]. Cela provoque un influx de Na^+ dans la cellule et une sortie des ions K^+ , de manière à rétablir l'équilibre osmotique, provoquant la dépolarisation de la cellule (Figure 23) [174-177]. Ce changement de potentiel va avoir des effets secondaires sur la vie cellulaire. Par exemple, l'influx du sodium va affecter d'autres transporteurs ioniques couplés avec un gradient de Na^+ , comme les échangeurs $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ et Na^+/H^+ [178, 179].

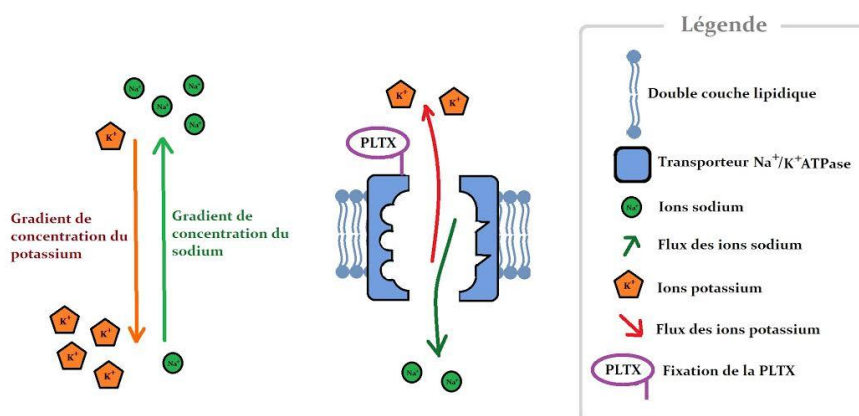


Figure 23. Interaction de la PLTX avec la pompe Na^+/K^+ ATPase [172,173].

Le chargement intracellulaire des ions Na^+ , sous l'action des PLTX, va activer l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en mode inverse, c'est-à-dire qu'il va laisser sortir le surplus de Na^+ et laisser entrer des ions Ca^{2+} . Ceci va provoquer une élévation de la concentration en Ca^{2+} , ce qui est pour la

cellule, le signal pour le relargage de neurotransmetteurs ou d'hormones, la contraction musculaire, la prolifération cellulaire ou la réabsorption osseuse [180-182].

L'augmentation intracellulaire du sodium, en conséquence de l'interaction de la cellule avec la PLTX, va également interférer avec le fonctionnement de la régulation du canal Na^+/H^+ , qui laisse alors entrer les protons dans la cellule, pour libérer un sodium, le pH intracellulaire chutant alors. L'acidification cytosolique peut entraîner, entre autre, la mort cellulaire programmée.

7. Méthodes de détection des PLTXs

L'apparition des toxines du groupe palytoxine et ovatoxines est un phénomène émergeant en Europe. À l'heure actuelle, le manque de données toxicologiques, d'étalon et de matériaux de référence d'ovatoxines ne permettent pas d'apprécier le risque sanitaire engendré, ni de développer et harmoniser des procédures de surveillance validées pour la quantification des ovatoxines dans les organismes marins.

Actuellement, en l'absence de réglementation de ces toxines aux niveaux européen et international et de méthode officielle pour l'analyse des toxines du groupe p-PLTX-OVTXs, les travaux de recherche menés pour acquérir des données sur cette problématique utilisent des méthodes biologiques et/ou physico-chimiques.

7.1. Méthodes d'analyses biologiques

L'avantage des méthodes d'analyses biologiques est qu'elles sont capables de donner des indications sur l'activité biologique caractéristique d'une molécule donnée.

7.1.1. Test sur des rongeurs

Le test sur souris par voie intrapéritonéale est la méthode la plus simple pour détecter la présence des biotoxines marines dans les extraits de coquillages, car il donne une toxicité globale de l'échantillon traité. Il est très utilisé dans les réseaux de surveillances des phycotoxines dans les coquillages au niveau international (par exemple, le suivi des toxines paralysantes). Le test sur rongeur ne donne aucune indication sur la nature des toxines dans les échantillons testés.

Le principal avantage sur les analyses physico-chimiques ou sur les méthodes *in vitro* est que la toxicité aigüe peut être examinée directement, puis reliée avec les effets toxiques possibles

sur l'Homme. Dans le cas des toxines du groupe PLTX, cette méthode est rapide, puisque suite à une injection intrapéritonéale, la mort des souris intervient sous 15 minutes. De plus, elle ne nécessite pas d'équipements coûteux, ni de préparation d'échantillon complexe. L'avantage le plus notable, surtout dans le cas des PLTXs et de ses analogues, est que la détermination de la toxicité globale ne requiert pas d'avoir des étalons de référence de tous les analogues, contrairement aux méthodes analytiques instrumentales. Elle permet de vérifier la présence de composés toxiques, très peu définis ou inconnus, qui pourraient avoir un impact sur la santé publique.

Néanmoins, l'inconvénient associé d'un tel test est le manque de spécificité. En effet, les solvants utilisés pour l'extraction ainsi que les autres substances présentes dans la matrice étudiée sont autant d'interférences potentielles qui altèrent la performance du test. La méthode est également très dépendante du type de souris utilisé, comme la souche, le sexe, l'âge, le poids, l'état général de santé, le régime alimentaire, le stress... Pour cette raison, la définition de paramètres pertinents pour une observation correcte n'est pas clairement définie dans la littérature, comme les unités utilisées, la limite de détection (LD), les valeurs de DL₅₀, et les temps d'observation (de 4 à 48h) [18, 73, 147, 153, 158].

Cette méthode est peu susceptible d'être utilisée comme technique officielle puisqu'elle pose des problèmes éthiques et logistiques inhérents aux bio-essais sur les mammifères.

7.1.2. Tests de cytotoxicité

Les tests de toxicité sur différents types de cellules vivantes sont des méthodes alternatives à l'utilisation d'animaux dans les essais de toxicité. Ils sont basés sur les changements morphologiques cellulaires ou sur les effets secondaires causés par la toxine et permettent la détection de la concentration des PLTXs jusqu'à la pico-mole. L'utilisation de microplaques permet d'analyser plusieurs échantillons en même temps. Cependant, ce genre de tests présente plusieurs désavantages. Des aménagements sont nécessaires pour maintenir et manipuler les cultures cellulaires ; ils ne donnent pas d'informations sur le profil toxique et des faux positifs peuvent apparaître à cause d'autres toxines présentes dans les échantillons ou d'effets matrice.

Différents types de cellules sont utilisés pour évaluer la présence des PLTXs, comme les **cellules HeLa** (lignée cellulaire cancéreuse) [115], les cellules de rats **3Y1** (cellules fibroblastiques) [95] ou les **cellules MCF-7** (lignée cellulaire du cancer du sein) [183, 184]. La quantification des dommages cellulaires peut être faite en utilisant des colorants qui se

fixent sur les cellules intactes (ex : rouge neutre) ou les cellules endommagées (ex : bleu trypan). L'intensité des colorations peut être mesurée grâce à un spectrophotomètre. La cytotoxicité des PLTXs peut également être évaluée indirectement en mesurant les composés relargués par les cellules [95, 115, 183]. Des **neuroblastes** peuvent être également utilisés pour estimer la concentration en PLTXs. Ce sont des cellules issues de tumeurs extra-crâniennes les plus fréquentes chez le jeune enfant. Ce test est capable de détecter une concentration de 50 µg/kg de PLTX dans des coquillages [185-187].

Le test cytotoxique qui semble le plus simple et le plus sensible est basé sur le **relargage des ions K⁺**. En effet, c'est la première conséquence induite par la palytoxine. La mesure de la concentration des ions K⁺ relargués est effectuée grâce à un photomètre de flamme. Ce type de test est dépendant de la concentration en palytoxine ; la sensibilité de la méthode est environ de 1 pM de PLTX [177].

7.1.3. Tests hémolytiques

Le test hémolytique est un test cytotoxique particulier dans lequel sont impliqués les globules rouges, aussi appelés hématies ou érythrocytes. Il est basé sur la capacité de la toxine à interagir avec la pompe Na⁺/K⁺ATPase et de la convertir en un canal non-spécifique. Dans le cas des hématies, ce déséquilibre va entraîner la lyse différée des cellules. Cette lyse va impliquer le déversement du contenu cellulaire, notamment l'hémoglobine, dans le milieu extracellulaire. La mesure de l'hémoglobine relarguée, par des techniques de spectrophotométrie en UV visible, est dépendante du temps et de la concentration en palytoxine. L'effet de la palytoxine est spécifiquement inhibé par l'ouabaine, hétéroside cardiotonique qui se lie à la pompe Na⁺/K⁺ATPase et inhibe le fonctionnement de la pompe [174]. La palytoxine ne peut alors plus impliquer la lyse immédiate des hématies. L'inconvénient de cette méthode est que beaucoup de paramètres peuvent interférer avec la détection des PLTXs, comme les effets matrices ou la présence d'autres composés hémolytiques dans les échantillons. Néanmoins, ce test est très largement utilisé pour la détection des PLTXs sur les extraits de produits de la mer [15, 153, 161, 188-190], suivant le protocole établi par Bignami [191] avec plus ou moins de modifications.

7.1.4. Tests immunologiques

Plusieurs méthodes basées sur la reconnaissance des anticorps ont été utilisées pour la détection des PLTXs. Ces méthodes sont rapides et faciles à utiliser et peuvent être appliquées

au screening de beaucoup d'échantillons. Néanmoins, les anticorps ne sont pas facilement disponibles et aucune information ne peut être obtenue sur le profil toxique.

Une technique de **radio-immunologie**, technique de médecine nucléaire *in vitro* qui utilise des composés radioactifs associés à des antigènes, a été développée pour la détection des PLTX en 1988 par Levine [192]. La PLTX a été marquée avec un réactif ^{125}I -Bolton-Hunter sur son amine terminale. La méthode est très sensible et permet la détection de la toxine pour des quantités de l'ordre de la picomole. Plus tard, le groupe du professeur Bignami a développé un test **ELISA en sandwich** [193], de l'anglais *enzyme-linked immunosorbent assay*, littéralement « dosage d'immuno-adsorption par enzyme liée », autrement dit, des anticorps spécifiques sont fixés sur un support solide, permettant l'adsorption des PLTXs. Ce test a permis de quantifier des extraits de *P. tuberculosis* jusqu'à des concentrations en PLTX de l'ordre de 10 pg.mL^{-1} . Plus tard, ce test a été amélioré pour pouvoir diminuer les limites de détection à $6\text{-}250 \text{ ng.mL}^{-1}$. Plusieurs anticorps recombinants contre la PLTX ont été obtenus et ont montré une très grande spécificité avec la PLTX. Les résultats d'un test ELISA en sandwich utilisant ce type d'anticorps montrent une limite de détection (LD) de $0,5 \text{ pg.mL}^{-1}$ [194]. Récemment, une méthode a été développée pour la détection de la PLTX à l'aide de **capteurs chimio-luminescents**, utilisant la propriété de certains composés à devenir lumineux sous l'action d'un champ électrique [195]. Sur le même principe que le test ELISA, des anticorps spécifiques de la PLTX ont été fixés sur un support solide qui lui-même était lié à des nanotubes de carbones, assurant ainsi la conductance vers un transducteur luminescent. Ce capteur est capable de produire un signal lumineux, dépendant de la concentration, et permet la quantification des PLTX dans les moules pour de faibles concentrations avec une limite de quantification (LQ) de $2,2 \text{ }\mu\text{g/kg}$ de moules.

7.2. Méthodes d'analyses physico-chimiques

Les méthodes d'analyse physico-chimiques sont un outil précieux pour la détection et la quantification des p-PLTX-OVFXs. Ce sont principalement des méthodes utilisant la chromatographie liquide haute performance (CLHP) couplée à différents types de détecteurs, principalement la détection par ultraviolet (UV), par fluorescence (FLD) ou par spectrométrie de masse (SM). Ce sont des techniques automatisables, fiables, permettant d'obtenir le profil des toxines présentes dans les échantillons, contrairement aux méthodes de détection biologiques, qui elles, permettent de fournir des renseignements sur l'activité biologique d'un extrait, en fonction du test utilisé.

7.2.1. CLHP-UV

La détection grâce à la spectrophotométrie dans l'ultraviolet (UV) est possible grâce à la présence de deux groupements chromophores présents sur la molécule de PLTX. Ce type de détecteur a été utilisé en association avec de l'électrophorèse capillaire (CE) [196] et de la CLHP. Lorsqu'un détecteur à barrettes diode (DAD) est utilisé, l'obtention du spectre de la PLTX montre qu'elle présente deux maximums d'absorption à 233 nm (coefficient d'absorption molaire $\varepsilon = 47\,000$) et 263 nm ($\varepsilon = 28\,000$) [197]. Le rapport des absorbances UV entre 233 nm et 263 nm est de 1,71 [85]. Cette caractéristique du spectre UV de la palytoxine est un paramètre qui permet de vérifier la présence de cette toxine et de ses analogues dans des échantillons. En effet, l'identification des mascarenotoxines a pu être réalisée grâce à leur spectre UV ainsi qu'à leur temps de rétention, en comparaison avec celui de la palytoxine [125]. Cette méthode a également été largement utilisée pour la détermination des PLTXs dans des extraits d'*Ostreopsis sp.*, par CLHP en combinant plusieurs colonnes et phases mobiles [11, 95, 166, 198]. Il n'a pas encore été rapporté de méthode de quantification des p-PLTX-OVXs dans des organismes marins par CLHP-UV, probablement à cause du manque de la spécificité de la détection UV-visible [72]. Pour cette raison, cette méthode basée sur une détection UV ne constitue pas une méthode de confirmation pour l'analyse de toxines dans les différentes matrices (microalgues, coquillages, poissons).

7.2.2. CLHP-FLD

Il est largement reconnu que la détection par fluorescence (FLD) est plus sensible que la détection par UV. La fluorescence est une émission lumineuse provoquée par l'excitation d'une molécule (généralement par absorption d'un photon) immédiatement suivie d'une émission spontanée. Pour rendre la PLTX fluorescente, celle-ci est préalablement dérivatisée sur son groupement amine terminal, grâce à un agent de dérivation (6-Aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate ; AccQ) [198]. La dérivation de la PLTX avec AccQ montre une forte fluorescence à 395 nm lorsqu'elle est excitée à 250 nm. La limite de détection (LD) pour la PLTX dérivée est de 0,75 ng de standard injecté. Cependant, l'information sur la LD et la LQ pour des échantillons de coquillage n'est pas connue.

7.2.3. CLHP-SM

La spectrométrie de masse (SM) utilise le mouvement des ions dans les champs électriques et magnétiques afin de les classer en fonction de leur rapport masse/charge. Le principe repose

sur la transformation des molécules d'intérêt d'un échantillon en ions, qui sont ensuite soumis à des champs électriques (et éventuellement magnétiques). Ces champs vont conditionner la trajectoire des ions, qui dépendra alors du rapport m/z ; où m est la masse de l'ion et z le nombre de charges portées par l'ion. Dans le fonctionnement de tous les spectromètres de masse (SM), quelle que soit leur conception, on observe les étapes suivantes : ionisation des molécules, accélération, séparation et détection des ions. Cette méthode est très largement utilisée dans l'analyse des p-PLTX-OVXs. Selon les caractéristiques de l'échantillon à analyser, plusieurs types de sources d'ionisation ou de principe de détection sont disponibles ; seules les techniques utilisées pour analyser les p-PLTX-OVXs sont reportées ici. Il faut noter que le schéma d'ionisation ainsi que le degré de fragmentation dépendent fortement de la méthode d'ionisation et des paramètres SM utilisés [199].

Étape d'ionisation

Dans la littérature, différentes techniques d'ionisation sont reportées, notamment l'ionisation par électro-spray [21, 118], la désorption-ionisation laser assistée par matrice (en anglais *Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation* ou MALDI) [73] et l'ionisation par bombardement d'atomes neutres (en anglais *Fast Atom Bombardment* ou FAB) [121, 200]

- **Ionisation par électro-spray** : l'échantillon est ionisé dans la source de l'appareil par électro-nébulisation. Cette technique repose sur l'introduction de l'échantillon à analyser en solution aqueuse par un capillaire très fin sur lequel une tension à haut potentiel est appliquée. Cette tension crée des charges dans la solution et forme un nébulisat (ou "spray") de fines gouttelettes (1 μm) à la sortie du capillaire. Dans la source, à pression atmosphérique, ces gouttelettes rencontrent un flux d'azote chaud à contre-courant ou « turbo-gaz », ce qui conduit à l'évaporation progressive du solvant. Après plusieurs étapes de désintégration, des ions sont produits en phase gazeuse, physiquement intacts et pouvant porter plusieurs charges, en raison de l'attachement de protons aux sites basiques des molécules. Ces ions, ou fragments d'ions, sont introduits dans l'analyseur de masse via la « curtain » (Figure 24).

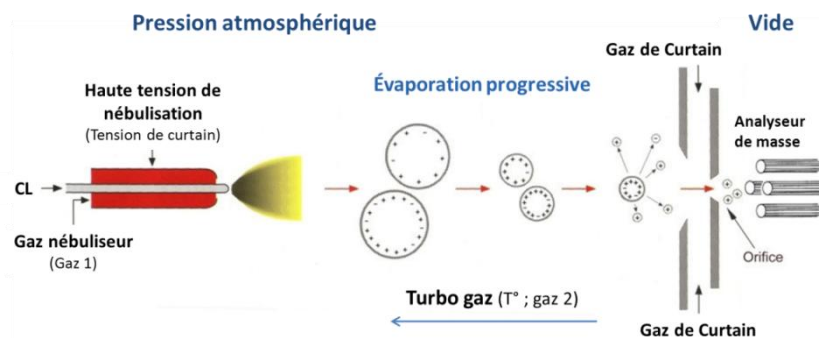


Figure 24. Principe de fonctionnement de l'ionisation par électro-spray [201].

- **MALDI** : la technique par MALDI s'applique idéalement aux composés dont le poids moléculaire est supérieur à 1 000 Da et qui ne se prêtent pas à l'ionisation par électro-spray. La technique utilise un faisceau laser pulsé pour désorber et ioniser un mélange de matrice/échantillon co-cristallisé et séché sur une surface métallique. L'irradiation de la matrice et de l'échantillon va provoquer la création d'une grande quantité d'énergie dans la phase condensée, par excitation électronique des molécules de la matière. Des ions, formés par transfert de protons ou d'électrons entre la matière photoexcitée et l'échantillon analysé, se désorbent alors.
- **FAB** : Elle permet d'analyser des molécules non vaporisables sous vide (grosses molécules biologiques). L'échantillon est mélangé en solution à une matrice liquide non volatile (glycérol, thioglycérine, alcool *m*-nitrobenzylique). Un faisceau à haute énergie (de l'ordre de 4 à 10 keV) d'atomes neutres (Argon ou Xénon) est envoyé sur l'échantillon et la matrice, dans la chambre de collision, causant ainsi les phénomènes de désorption et d'ionisation. Les molécules ainsi ionisées n'ont pas beaucoup d'énergie interne, la fragmentation est donc faible, mais l'ion moléculaire est facile à obtenir, et la masse moléculaire est ainsi facile à déterminer.

Étape d'accélération des ions moléculaires :

Les ions sont extraits de la source puis accélérés et focalisés par des lentilles électroniques (champ électriques). Le but est d'accroître leur énergie cinétique.

Étape de séparation des ions :

Les ions sont ensuite discriminés (« filtrés ») suivant leur rapport m/z par l'analyseur. Différents analyseurs sont utilisés dans la littérature pour l'analyse des PLTXs comme

l'analyseur quadripolaire [15], l'analyseur en temps de vol (TOF) [73, 118], et la trappe d'ions [198].

- **L'analyseur quadripolaire** : il est constitué de 4 barres parallèles ayant idéalement une section hyperbolique, disposées symétriquement autour d'un axe. Ces 4 barres sont associées électriquement 2 par 2, créant ainsi un champ électrique oscillant (Figure 25). En effet, les forces de répulsion et d'attraction, associées à l'énergie cinétique des ions imposent une trajectoire oscillante des ions au travers le quadripôle, laissant passer certaines masses, tandis que d'autres ont une trajectoire instable, ne leur permettant pas d'atteindre le détecteur. Le quadripôle est donc un filtre de masse.

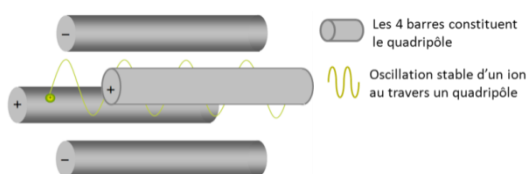


Figure 25. Principe de fonctionnement d'un quadripôle [201].

L'association de trois quadripôles permet le mode d'analyse en « Multiple Reaction Monitoring » (MRM), qui est utilisé pour la détection et la quantification d'une ou plusieurs transitions d'ions avec une grande spécificité. Le premier quadripôle (Q1) permet de sélectionner l'ion désiré, dit « ions parents », qui passera dans le second quadripôle (Q2) ou « cellule de collision » où il va subir une fragmentation caractéristique des ions choisis, les « ions fils » sont alors créés. Les « ions fils » issus des « ions parents » sont ensuite sélectionnés par le troisième quadripôle (Q3) (Figure 26).

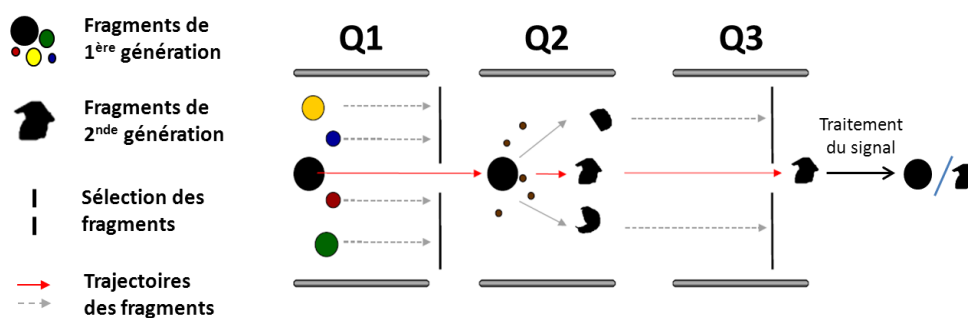


Figure 26. Principe de l'analyse en MRM [201].

- La **spectrométrie à Temps de Vol** (en anglais, « Time of Flight » ou TOF) : dans cette méthode, les ions sont accélérés par un champ électrique donné. En conséquence, les ions de même charge électrique acquièrent la même énergie cinétique. Par contre, la vitesse des ions dépend quant à eux du rapport masse/charge. Le temps mis par une particule chargée pour atteindre un détecteur sous vide situé à une distance connue est mesuré et dépendra du rapport m/z de la particule considérée. Ce sont les particules avec les masses les plus faibles qui seront accélérées aux vitesses les plus hautes.
- **La trappe d'ions** : cet analyseur comporte une électrode annulaire et deux calottes sphériques. À ces trois éléments sont appliquées des tensions, f_0 pour les calottes et $-f_0$ pour l'électrode annulaire. Ces valeurs de tensions permettent de garder les ions formés captifs au sein de la trappe. Ils y suivent une trajectoire en forme de huit en trois dimensions. En fonction de leur rapport m/z , les ions vont être expulsés de la trappe vers le détecteur.

Étape de détection : après séparation, les ions terminent leur course un détecteur où le courant ionique est transformé en un signal mesurable.

Différentes méthodes de CL-MS et CL-MS/MS ont été utilisées pour identifier et quantifier les p-PLTX-OVTVs dans différentes matrices (produits de la mer, phytoplancton) [11, 21, 24, 118, 198]. La présence des toxines dans les échantillons est confirmée par l'obtention de fragments caractéristiques, notamment le fragment A $[M\text{-fragment B-H}_2\text{O}]^+$, des ions bi-chargés et tri-chargés caractéristiques de chaque analogue, ainsi que des amas de fragments générés par la perte multiple de molécules d'eau.

Les avantages principaux de ces méthodes sont la sensibilité, la spécificité et la mesure individuelle des toxines, permettant la connaissance du profil toxinique. Cependant, cette technique nécessite des équipements coûteux et une très haute technicité. Ces techniques sont également des outils précieux pour l'identification formelle et la quantification des PLTVs dans les matrices analysées. Néanmoins, le développement et la validation intra- et inter-laboratoire de ces méthodes, pour l'analyse des toxines d'intérêt, nécessitent des étalons et des matériaux de référence, pour une harmonisation européenne des méthodes d'analyse et des normes à imposer [202].

Chapitre 2 – Matériels et Méthodes

1. Prépurification par Sephadex LH20

La phase Sephadex LH20 a été utilisée pour prépurifier l'extrait d'*Ostreopsis cf. ovata*. Pour cela, elle est tout d'abord conditionnée avec le solvant d'éluion (MeOH/H₂O 1/1 v/v ou le MeOH) durant toute la nuit, puis transférée dans une colonne de verre, avant d'être finalement rincée avec ce même solvant. Les extraits d'*Ostreopsis cf. ovata* sont concentrés et filtrés avant d'être déposés en tête de colonne. Les composés sont élués et récoltés en sortie de colonne, filtrés sur filtre Nanosep MF 0.2 µm et analysés en CL-SM/SM, afin d'identifier les fractions contenant les toxines d'intérêt. Différents solvants d'éluion ont été utilisés selon l'expérience menée, et sont précisés dans le chapitre 5. Plusieurs purifications ont été réalisées dont les paramètres sont résumés dans le Tableau 3.

Tableau 3. Description des différents paramètres des purifications réalisées sur Sephadex LH20.

Masse de phase (g)	Dimension de la colonne (L × d cm)	Volume d'éluion totale (mL)	Volume d'extrait déposé (mL)
6	34 × 1	30	1
10	50 × 1	90	1
60	160 × 2	400	5

2. Méthodes d'analyse des toxines

Au cours de cette thèse, 4 systèmes chromatographiques ont été utilisés en fonction des objectifs poursuivis :

1. **CL-SMHR QTOF** pour caractériser les toxines d'intérêt présentes dans des extraits d'*Ostreopsis* et dans des fractions de toxines purifiées ;
2. **CL-SM/SM** pour identifier formellement et quantifier les p-PLTX-OVTXs dans différents échantillons (extrait de phytoplancton, extraits de produits de la mer...) ;
3. **CL-UV et/ou -SM**, utilisée dans différents buts (i) suivre les toxines dans les différents extraits au cours du processus de purification, (ii) pour confirmer le choix de la colonne pour la purification chromatographique et (iii) pour réaliser la chromatographie préparative (CL-SM).
4. **CL-UV** pour caractériser et sélectionner les phases stationnaires utilisées pour la purification des ovatoxines ;

Les systèmes CL de ces appareils sont généralement constitués de réservoirs de phase mobile, de dégazeur en ligne, d'une pompe quaternaire, d'un injecteur automatique thermostaté, et d'un four à colonne thermostaté.

2.1. Système CL-SMHR-QTOF

Des spectres de masse haute résolution des toxines d'intérêt ont été acquis à l'aide d'un système de chromatographie liquide ultra-haute performance (UHPLC) (1290 INFINITY, Agilent Technologies) couplé à spectromètre de masse haute résolution Q-TOF UHD (Agilent Technologie) et équipé d'une double source ESI.

Les séparations chromatographiques ont été effectuées sur une colonne Kinetex C₁₈ (100 × 2,1 mm, 1,7 μm) (Phenomenex) maintenue à 40°C, et avec un gradient linéaire d'élution réalisé avec H₂O (A) et un mélange ACN/H₂O 95/5 (v/v) (B), tous deux contenant 0,2 % d'acide acétique (Figure 27). Le débit de la phase mobile était de 0,3 mL.min⁻¹.

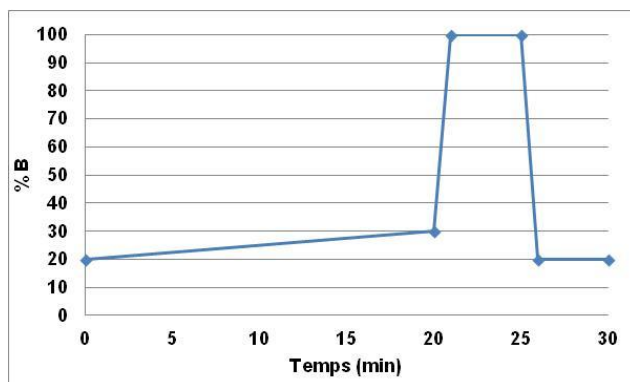


Figure 27. Gradient linéaire d'élution pour les analyses sur la CL-SMHR QTOF.

La détection a été effectuée en mode positif et en « full scan » dans le domaine m/z [100 – 1700] avec une acquisition de 2 spectres par seconde. Les fragmentations SM/SM ont été effectuées avec une acquisition de 5 spectres par seconde. La tension du capillaire est fixée à 3500 V et la tension du fragmenteur est à 150 V. La température de la source « Jet Stream Technologies™ » est fixée à 200°C avec un débit d'azote à 5 L.min⁻¹, et « sheath » à 11 L.min⁻¹ à 350°C. Trois énergies de collision différentes ont été appliquées aux ions précurseurs, afin d'obtenir une vue d'ensemble des différentes fragmentations. Les analyses, les acquisitions et le traitement des données ont été effectués avec le logiciel Mass Hunter.

2.2. Système chromatographique pour la quantification des toxines (CL-SM/SM)

Tout au long de mes travaux, les toxines ont été quantifiées en chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem (CL-SM/SM). Les méthodes de chromatographie liquide et d'analyse en SM/SM dérivent de méthodes précédemment optimisées au laboratoire [14] et de méthodes décrites dans la littérature [22]. La quantification des toxines a été effectuée par CL-SM/SM en utilisant un système de chromatographie liquide (UFLC XR, Shimadzu) couplé à un spectromètre de masse (SM) hybride triple quadripôle / trappe d'ions (4000 Qtrap ; ABSCIEX) équipé d'une interface turbo spray. Les p-PLTX-OVTXs ont été séparées sur une colonne Gemini C₁₈, 3 µm (150 × 2,0 mm, Phenomenex) thermostatée à 22 °C, en utilisant un gradient linéaire d'éluion avec de l'eau (H₂O) (A) et de l'acétonitrile (ACN)/H₂O 95/5 (v/v) (B) tous deux contenant 2 mM de formiate d'ammonium et 50 mM d'acide formique (Figure 28), à un débit de 0,2 mL/min.

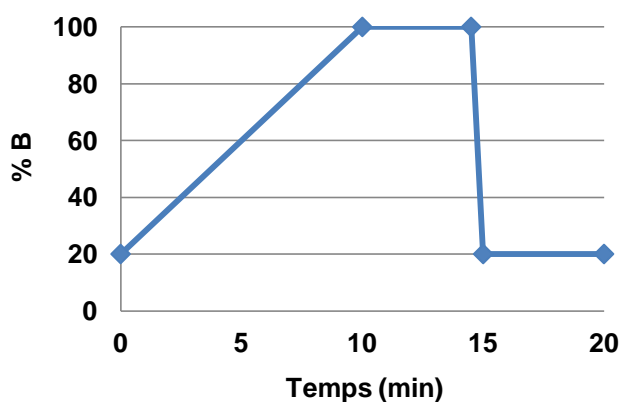


Figure 28. Gradient linéaire d'éluion utilisé pour l'analyse des p-PLTX-OVTXs par CL-SM/SM.

La détection est effectuée en utilisant la spectrométrie de masse en tandem (MRM) en mode positif. Les paramètres optimisés de sources sont les suivants : gaz de la curtain à 30 psi, tension d'ionisation à 5000 V, la température du turbo-gaz à 300 °C, les gaz 1 et 2 paramétrés à 30 et 40 psi respectivement et un potentiel d'entrée (PE) à 10 V. Toutes les ovatoxines sont caractérisées par une fragmentation entre le C8 et le C9 en spectrométrie de masse mais elles ne donnent pas toujours le même fragment A $[M\text{-fragment B-H}_2\text{O}]^+$. En effet l'ion correspondant à ce fragment présente un rapport m/z dont les valeurs sont les suivantes : 327 pour la p-PLTX, l'OVTX-a, l'OVTX-d et l'OVTX-f, 371 pour l'OVTX-b et l'OVTX-c et 343 pour l'OVTX-e. Chaque toxine est analysée et quantifiée en utilisant 3 transitions qui aboutissent toutes à l'ion caractéristique du fragment A et dont les paramètres sont rassemblés dans le Tableau 4. Au début des travaux de thèse, seules la p-PLTX et l'OVTX-a étaient quantifiées. Au fur et à mesure de l'avancée de mes travaux, d'autres ovatoxines connues

d'*Ostreopsis* ont été décrites dans la littérature, ce qui nous a permis de les rechercher et de les quantifier : les OVTX-b, -c et -d/e, puis par la suite l'OVTX-d a été distinguée de l'OVTX-e, et enfin l'OVTX-f. De plus, dans une souche française d'*Ostreopsis* cf. *ovata*, un nouvel analogue des OVTXs a été mis en évidence : l'OVTX-h.

Tableau 4. Transitions caractéristiques des p-PLTX-OVTXs recherchées en CL-SM/SM.

Toxines	$[M+2H]^{2+} \rightarrow$	Partie A	$[M+2H-H_2O]^{2+} \rightarrow$	Partie A	$[M+3H-H_2O]^{3+} \rightarrow$	Partie A
p-PLTX	1340,3	\rightarrow 327,3	1331,3	\rightarrow 327,3	887,8	\rightarrow 327,3
OVTX-a	1324,3	\rightarrow 327,3	1315,3	\rightarrow 327,3	877,2	\rightarrow 327,3
OVTX-b	1346,3	\rightarrow 371,2	1337,3	\rightarrow 371,2	891,8	\rightarrow 371,2
OVTX-c	1354,3	\rightarrow 371,2	1345,3	\rightarrow 371,2	897,2	\rightarrow 371,2
OVTX-d	1332,3	\rightarrow 327,3	1323,3	\rightarrow 327,3	882,5	\rightarrow 327,3
OVTX-e	1332,3	\rightarrow 343,2	1323,3	\rightarrow 343,2	882,5	\rightarrow 343,2
OVTX-f	1338,3	\rightarrow 327,3	1329,3	\rightarrow 327,3	886,5	\rightarrow 327,3
OVTX-h	1317,6	\rightarrow 327,3	1308,3	\rightarrow 327,3	872,5	\rightarrow 327,3

Les énergies de collisions (EC) sont appliquées à 47 eV pour les ions di-chargés $[M+2H]^{2+}$, $[M+2H-H_2O]^{2+}$ et à 31 eV pour les ions tri-chargés $[M+3H-2H_2O]^{3+}$ pour produire l'ion caractéristique $[M+H- \text{fragment B} - H_2O]^+$ (partie A). Le potentiel de « declustering » (DP) est à 56 V pour toutes les transitions utilisées et les potentiels de sortie de cellule (« cells exit potentiel » (CXP)) sont à 20 V et 18 V pour les ions di-chargés et tri-chargés respectivement. Les transitions sont résumées dans le Tableau 4 et sont acquises toutes les 250 ms pour chaque transition. Parce que seul l'étalon de la palytoxine est disponible, les p-PLTX-OVTXs ont été quantifiées en réalisant l'étalonnage à partir de cet étalon de la palytoxine (Wako, Neuss, Allemagne) en considérant que leurs réponses molaires sont les mêmes. La droite d'étalonnage a été réalisée avec des solutions de concentrations suivantes : 0,05, 0,01, 0,5, 1, 2, 4, 8 et 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Toutes les acquisitions et l'analyse des données ont été réalisées par le logiciel Analyst 1.5.1 (ABSCIEX).

2.3. Système CL-SM et/ou CL-DAD

Pour l'analyse en « full scan » des différents échantillons obtenus durant les travaux expérimentaux, un système de chromatographie liquide couplé un spectromètre de masse simple quadripôle (CL/SM) a été utilisé. Ce système chromatographique a aussi été utilisé pour étudier la faisabilité de la purification des ovatoxines.

Les analyses en CL-SM ont été effectuées sur un système chromatographique Agilent 1160 LC/MS (Agilent). Un détecteur à barrette de diodes (DAD) a également été monté en série pour le suivi de purification en UV.

Les analyses en « full scan » ont été réalisées en mode positif dans le domaine m/z [300-1450]. Les conditions de la source électro-spray (ESI) étaient les suivantes : l'azote à un débit de $12 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ et une température de 325°C , la pression du nébuliseur à 50 psi, la tension du capillaire à 4800 V et la tension du fragmenteur à 165 V. Toutes les acquisitions et analyses de données ont été contrôlées par le logiciel Chemstation LC/MSD Agilent (Agilent, Les Ulis, France). Une solution (Turning mix G 2421-60001) a été utilisée pour calibrer les masses.

Cet appareil a été utilisé pour différentes applications : 1) pour confirmer le choix de la colonne de purification, 2) pour analyser les extraits et fractions, et 3) pour réaliser la purification et l'isolement des différentes OVTXs à partir des fractions obtenues par séparation sur phase Sephadex LH-20.

2.3.1. Choix des colonnes pour l'analyse et la purification

Parmi les huit phases chromatographiques testées, trois ont été sélectionnées en comparant le même extrait purifié : Kinetex C_{18} ($100 \times 4,6 \text{ mm}$, $2,6 \mu\text{m}$); Kinetex PFP ($150 \times 2,1 \text{ mm}$, $2,6 \mu\text{m}$); Uptisphere C_{18} -TF ($250 \times 4,6 \text{ mm}$, $5\mu\text{m}$).

Un extrait pré-purifié sur une phase Sephadex LH-20 (fraction B, *cf.* chapitre 5 §2.3.) a été injecté sur ces trois colonnes. Les conditions chromatographiques étaient les suivantes : volume d'injection $20 \mu\text{L}$, température du four à colonne 25°C , le gradient linéaire d'élution a été accompli en 40 minutes avec H_2O (A) et $\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}$ 95/5 (v/v) (B) chacun contenant 0,2 % d'acide acétique (Figure 29). Pour comparer les rétentions et la séparation des OVTXs sur les colonnes, les débits ont été adaptés pour chaque dimension de colonne : Kinetex C_{18} , $0,7 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; Kinetex PFP, $0,2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; Uptisphere C_{18} -TF, $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

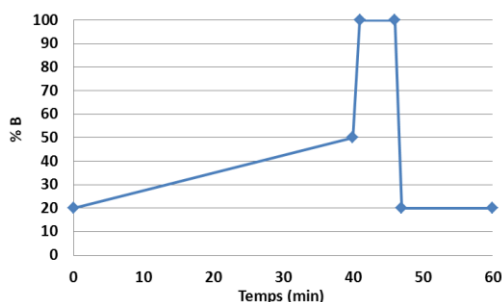


Figure 29. Gradient linéaire d'élution pour le choix des colonnes pour l'analyse et la purification.

2.3.2. Analyses des extraits et fractions

Le suivi de purification a été effectué en « full scan » (m/z [300-1450]) sur une colonne Kinetex C₁₈ (100 × 4,6 mm, 2,6 μm) thermostatée à 25°C. Un gradient linéaire a été accompli en 20 min avec H₂O (A) et ACN/H₂O 95/5 (v/v) (B) chacun contenant 0,2 % d'acide acétique (Figure 30). Le débit était de 0,7 mL.min⁻¹.

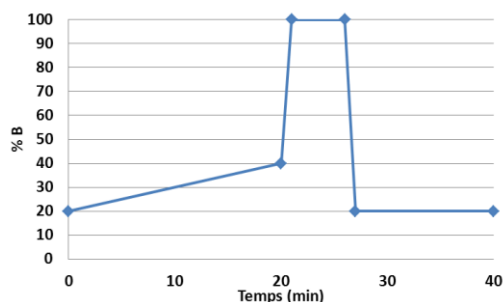


Figure 30. Gradient linéaire d'élution pour l'analyse des extraits et fractions en CL-SM.

2.3.3. Purification à partir des fractions sur phase Sephadex LH-20

Pour la purification, un collecteur de fraction et un détecteur UV à barrettes de diodes (DAD-UV) ont été ajoutés en ligne au système de chromatographie CL/SM. La collection des fractions était automatique et était basée sur le temps de rétention de chaque composé. Pour suivre la séparation, les chromatogrammes ont été enregistrés à 263 nm et en SM « full scan » dans le domaine m/z [300-1450].

Le processus de purification a été réalisée avec une colonne Uptisphere C₁₈-TF (250 × 10 mm, 5 μm) (Interchim, Montluçon, France) thermostatée à 25°C. Le gradient linéaire d'élution a été accompli en 40 minutes avec H₂O (A) et ACN/H₂O 95/5 (v/v) (B) chacun contenant 0,2 % d'acide (Figure 31). Le volume d'injection a varié entre 300 et 500 μL en fonction du volume d'extrait disponible.

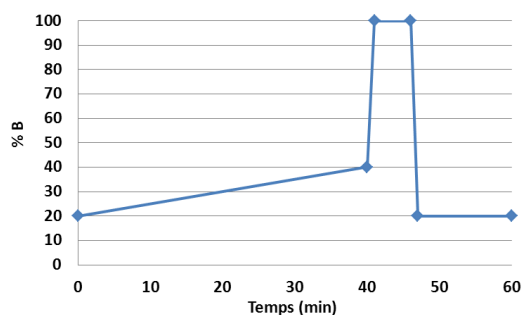


Figure 31. Gradient linéaire d'élution pour le fractionnement des différents extraits d'*Ostreopsis cf. ovata* prépurifiés sur une phase Sephadex LH-20.

2.4. Système CL-DAD

Ce système a été utilisé pour la caractérisation et la sélection d'une phase chromatographique pour la purification des OVTXs. Un appareil de chromatographie CL-UV 3000RS LC (Thermo Fisher) a été utilisé, couplé à un détecteur à barrette de diodes (en anglais « diode array detector » (DAD)). Toutes les acquisitions et l'analyse des données ont été contrôlées par le logiciel Chromeleon 6.8 (Thermo Fisher). Différentes colonnes ont été testées afin de trouver celle qui sera capable de séparer les OVTXs, dont les propriétés physico-chimiques sont très proches, afin d'étudier la faisabilité de la purification des OVTXs par CL-DAD/SM à partir d'extraits d'*Ostreopsis* cultivés au laboratoire.

3. Sélection d'une colonne capable de séparer les OVTXs

3.1. Évaluation des caractéristiques des colonnes testées.

Une partie de la procédure décrite par Engelhardt et al (1997) a été utilisée [203], avec, tout d'abord, un mélange contenant du toluène (T) et de l'éthylbenzène (E) pour évaluer l'hydrophobicité et la sélectivité méthylénique, puis une solution contenant de la diméthylaniline (DMA) pour évaluer l'activité des groupements silanols de la colonne, et enfin une solution de thiourée (Th) pour évaluer les volumes morts des colonnes testées.

Les conditions chromatographiques étaient les suivantes : une phase mobile constituée de méthanol/eau (MeOH/H₂O) 60/40 (v/v), un volume d'injection de 5 ou 1 µL en fonction des volumes morts des colonnes, une température de colonne de 30°C, et une détection UV à 254 nm.

3.2. Sélection de colonnes capables de séparer les OVTXs

Tout d'abord, une pré-sélection de colonnes a été réalisée. Pour cela, un extrait d'*Ostreopsis* cf. *ovata* pré-purifié sur une phase Sephadex LH-20 (**fraction b**) a été injecté sur les différentes phases chromatographiques sélectionnées (Tableau 5).

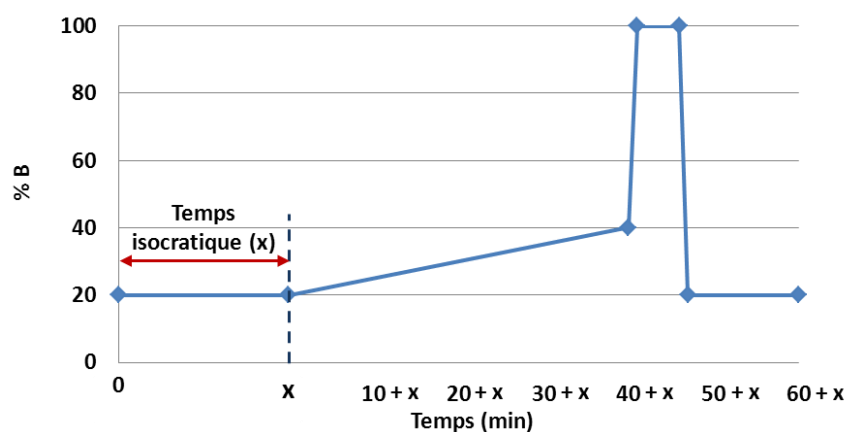
Tableau 5. Phases stationnaires et colonnes testées pour la séparation des OVTXs.

Phases stationnaires et fournisseurs	Dimension de colonnes (mm×mm)	Tailles de particules (µm)	Tailles des pores (Å)	Volume mort (mL)	Aire de surface spécifique (m ² /g)	Teneur en carbone %	Types de greffage	End-capped	Réf.
Colonnes en phase inverse									
Gemini (C₁₈) Phenomenex	150 × 2	3	110	0,380	390	14	C ₁₈ , organo-silice pleinement poreuse	Oui	[204]
Kinetex (C₁₈) Phenomenex)	150 × 2,1	2,6	100	0,301	200	12	C ₁₈ , avec une silice « Core-shell »	Oui	*
Kinetex (C₁₈) Phenomenex	150 × 4,6	5	100	1,392	200	12	C ₁₈ , avec une silice « Core-shell »	Oui	*
Uptisphere C₁₈-TF Interchim	150 × 2,1	5	300	0,369	310	14	C ₁₈ polyfonctionnelle	Oui	[204]
Colonnes en mode mixte									
Acclaim Polar Advantage II Dionex	100 × 2,1	2,2	120	0,180	300	17	Amide intégré avec un comportement monomérique	Oui	[204]
Synergi fusion RP Phenomenex	150 × 4,6	4	80	1,720	475	12	Colonne en mode mixte avec un groupement polaire intercalé C ₁₈ , Silice poreuse	Oui	[204] *
Polaris C₁₈ amide Varian	150 x 4,6	5	200	1,877	180	14,7	Amide intégré avec un comportement polymérique	Oui	[204] *
Colonnes avec d'autres modes de greffages									
Kinetex PFP Phenomenex	150 × 2,1	2,6	100	0,308	200	9	Pentafluorophenyle avec une silice « Core-shell »	Oui	*

Les conditions chromatographiques étaient les suivantes : volume d'injection 2 ou 10 µL, en fonction du volume mort de chaque colonne ; température du four à colonne maintenue à 25°C, détection UV à 263 nm. L'élution des OVTXs a été réalisée en mode gradient. Sachant que les colonnes testées présentaient des volumes morts différents, il a fallu adapter les débits, de manière à conserver un rapport volume mort/débit constant. De même, pour que le retard gradient (exprimé en temps) soit le même pour toutes les colonnes, il a fallu ajouter un temps isocratique (x) au début du gradient (Tableau 6). Ce temps isocratique a été calculé en prenant en compte le volume de latence de la chaîne (0,69 mL) et le débit. Le gradient d'élution linéaire est accompli avec les phases mobiles suivantes H₂O (A) et ACN/H₂O 95/5 (v/v) (B), toutes deux contenant 0,2 % d'acide acétique, selon les indications de la Figure 32.

Tableau 6. Débits et temps isocratique utilisés pour chaque colonne testée.

Colonne	Gemini C ₁₈	Kinetex C ₁₈ -d _p = 2,6 µm	Kinetex C ₁₈ -d _p = 5 µm	Uptisphere C ₁₈ -TF	Polar avantage II	Synergi Fusion	Polaris Amide	PPF
Débit (mL.min ⁻¹)	0,252	0,200	0,924	0,245	0,120	1,142	1,246	0,205
Temps isocratique x (min)	3,0	2,3	5,0	2,9	0,0	5,2	5,2	5,4

**Figure 32.** Gradient linéaire d'élution utilisé pour sélectionner une colonne capable de séparer les OVTXs. x représente un temps isocratique utilisé avant le début du gradient.

La séparation entre les pics a été évaluée en calculant la résolution (R) de la manière suivante :

$$R = 1.18 \frac{t_{r2} - t_{r1}}{w_{1/2-2} + w_{1/2-1}}$$

ou t_{r1} et t_{r2} sont les temps de rétention respectifs du premier et du second pic ; $w_{1/2-2}$ et $w_{1/2-1}$ sont les largeurs de pics à mi-hauteur respectif du premier et du second pic.

4. Culture de souches d'*Ostreopsis cf. ovata*

4.1. Identification génétique des espèces d'*Ostreopsis cf. ovata*

Des études phylogénétiques ont été réalisées en collaboration avec Dr Nicolas Chomérat, du laboratoire Bretagne Ouest de l'Ifremer de Concarneau, sur les souches isolées durant cette thèse : OST-IFR-0.3 V et OST-IFR-0.1 Mo. La procédure est explicitée en Annexe 1.

4.2. Conditions de culture

Les différentes souches d'*Ostreopsis cf. ovata* ont été cultivées dans un milieu de culture L1 (cf. § 4.2.1) [205] constitué à partir d'eau de mer de Méditerranée filtrée sur 0,2 µm, dont la salinité était de 38 psu [140]. Ce milieu contient des métaux à l'état de traces, une solution de vitamines et 2 mL/L d'extrait de terre [206].

Pour le maintien des souches au laboratoire, le milieu était contenu dans des boîtes de culture dites « cell-bind » (Figure 33), c'est-à-dire traitées pour favoriser l'adhésion cellulaire des cellules. Les volumes de culture étaient de 60, 175 ou 350 mL selon l'expérience menée et correspondent à des boîtes de culture de 50, 175 et 225 cm² de surface d'adhésion des cellules respectivement. Ces boîtes ont été placées dans une chambre thermostatée à 22 °C, avec une alternance de lumière et d'obscurité d'une photopériode de 16 h jour / 8 h nuit, et dont le flux de photons maximal est de 420 µmol.m⁻².s⁻¹.

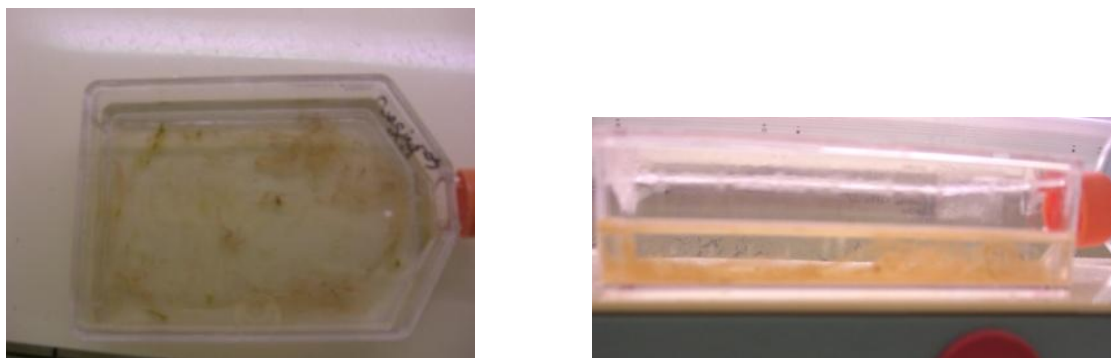


Figure 33. Boite de culture «Corning cell bind».

Régulièrement, tous les 20 à 30 jours environ, 10 mL de culture de cellules sont repiqués dans un milieu de culture « neuf », pour permettre une reprise de la croissance du nombre de cellules et les maintenir au laboratoire.

4.2.1. Milieu d'enrichissement de culture L1

Pour préparer le milieu d'enrichissement de culture L1, il faut tout d'abord filtrer 950 mL d'eau de mer de Méditerranée, puisée dans les fosses de Toulon. Les composés décrits dans le Tableau 7 sont ajoutés et le volume de culture est ajusté à 1 L, avant d'autoclaver le milieu.

Tableau 7. Préparation du milieu L1.

Composants	Solutions mères (concentration dans l'eau)	Quantités	Concentration molaires dans la solution finale
NaNO ₃	75,00 g L ⁻¹ d'H ₂ O	1 mL	8,82 x 10 ⁻⁴ M
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	5,00 g L ⁻¹ d'H ₂ O	1 mL	3,62 x 10 ⁻⁵ M
Solution d'éléments traces	Voir ci-dessous	1 mL	---
Solution de vitamines	Voir ci-dessous	0,5 mL	---

4.2.2. Solutions d'éléments traces

Les éléments traces, rassemblés dans le Tableau 8, sont ajoutés à 950 mL d'eau jusqu'à dissolution complète. Le volume est ensuite ajusté à 1 L, avant d'être autoclavé.

Tableau 8. Composition de la solution d'éléments traces utilisée pour la préparation du milieu L1.

Composants	Solutions mères (concentration dans l'eau)	Quantités	Concentration molaires dans la solution finale
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	---	4,36 g	1,17 x 10 ⁻⁵ M
FeCl ₃ · 6H ₂ O	---	3,15 g	1,17 x 10 ⁻⁵ M
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	178,10 g.L ⁻¹	1 mL	9,09 x 10 ⁻⁷ M
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	23,00 g.L ⁻¹	1 mL	8,00 x 10 ⁻⁸ M
CoCl ₂ · 6H ₂ O	11,90 g.L ⁻¹	1 mL	5,00 x 10 ⁻⁸ M
CuSO ₄ · 5H ₂ O	2,50 g.L ⁻¹	1 mL	1,00 x 10 ⁻⁸ M
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	19,9 g.L ⁻¹	1 mL	8,22 x 10 ⁻⁸ M
H ₂ SeO ₃	1,29 g.L ⁻¹	1 mL	1,00 x 10 ⁻⁸ M
NiSO ₄ · 6H ₂ O	2,63 g.L ⁻¹	1 mL	1,00 x 10 ⁻⁸ M
Na ₃ VO ₄	1,84 g.L ⁻¹	1 mL	1,00 x 10 ⁻⁸ M
K ₂ CrO ₄	1,94 g.L ⁻¹	1 mL	1,00 x 10 ⁻⁸ M

4.2.3. Solution de vitamines

Pour préparer la solution de vitamines, il faut d'abord dissoudre la thiamine dans 950 mL d'eau, puis ajouter les quantités de solutions mères indiqués dans le tableau ci-dessous, et ajuster enfin le volume à 1 L avec de l'eau. La solution est filtrée puis stérilisée par autoclave, avant d'être stockée au réfrigérateur ou au congélateur.

Tableau 9. Composition de la solution de vitamines.

Composants	Solutions mères concentration dans de l'eau de mer	Quantités	Concentration molaires dans la solution finale
Thiamine, · HCl (vit. B ₁)	---	200 mg	$2,96 \times 10^{-7}$ M
Biotine (vit. H)	0,1 g.L ⁻¹	10 mL	$2,05 \times 10^{-9}$ M
Cyanocobalamine (vit. B ₁₂)	1,0 g.L ⁻¹	1 mL	$3,69 \times 10^{-10}$ M

4.2.4. Préparation de l'extrait de terre

La terre doit être collectée à partir d'un environnement naturel riche en éléments nutritifs. Aucun fongicide, insecticide, engrais de jardin ou autres composé nocif ne doit être présent. La terre collectée ne doit pas être stockée ou traitée dans le laboratoire de culture des algues, car elle peut être une importante source de contamination par des micro-organismes indésirables. La terre utilisée doit être gardée au sec, à température ambiante et loin de la lumière. Pour préparer l'extrait de terre :

- Tamiser la terre préalablement séchée : une première fois à travers un tamis grossier et une seconde fois à travers une passoire fine (1 mm de maille).
- Mélanger 1 kg de terre dans 2 litres d'eau distillée.
- Autoclaver pendant 60 minutes à 121° C et laisser refroidir pendant la nuit.
- Filtrer à travers du coton absorbant emballé dans la tige d'un entonnoir en verre.
- Centrifuger à 5000 tr / min pendant 20 minutes dans des tubes de 45 mL en polyéthylène et recueillir le surnageant.
- Récupérer les surnageants dans une bouteille de 100 mL et filtrer la solution sur filtre à 0,22 µm.
- Diviser la solution totale dans des tubes de 15 mL.
- Congeler les tubes à - 4 ° C.

4.3. Suivi des souches

Pour avoir une bonne connaissance des souches d'*Ostreopsis cf. ovata* cultivées au laboratoire, après chaque repiquage, une partie des cellules, en phase stationnaire avancée, est conservée, d'une part pour le comptage des cellules, et d'autre part, pour l'extraction des toxines d'*Ostreopsis*.

Pour cela, les cellules sont d'abord délicatement décrochées du support et homogénéisées doucement à l'aide d'une pipette. Différents prélèvements ont alors été réalisés, tout d'abord pour le comptage cellulaire, ensuite pour l'extraction des toxines et enfin pour la réserve de la biomasse, pour les étapes de purification des ovatoxines.

4.3.1. Comptage cellulaire

Un premier échantillon est récolté pour estimer la densité cellulaire. Pour cela, un volume de 10 mL de culture homogénéisée est d'abord prélevé dans la boîte de culture.

Le comptage des cellules d'*Ostreopsis* cf. *ovata* est compliqué à cause de la production d'agrégats de mucus. Secouer vigoureusement la culture pour la rendre homogène pourrait affecter les cellules ; pour contourner ce problème, une méthode inspirée par Guerrini et al a été utilisée [207]. Pour dissoudre le mucus, une solution d'acide chlorhydrique (HCl) (800 mM) a été ajoutée à l'échantillon, afin d'obtenir une concentration finale de 4 mM, et l'échantillon a ensuite été homogénéisé.

Un volume de 5 mL est ensuite prélevé et dilué au $1/10^{\circ}$ dans de l'eau de mer filtrée, pour que les cellules soient comptées par un compteur de particule (Multisizer 3 Coulter counter, Beckman)

Les mesures ont été réalisées entre 3 et 60 μm et sous agitation. La détermination du nombre de cellules d'*Ostreopsis* a été réalisée dans la plage de taille comprise entre 20 et 60 μm (limite de taille d'*Ostreopsis*). Les résultats sont exprimés en concentration cellulaire (cellule.mL^{-1}). Chaque résultat donné est la moyenne de 3 comptages dont le coefficient de variation est inférieur à 10 %.

4.3.2. Extraction cellulaire

En parallèle au comptage cellulaire, un deuxième échantillon est récolté pour estimer la concentration toxinique. Pour cela, un volume de 10 mL homogénéisé de milieu de culture est prélevé dans la boîte de culture. Rappelons que l'extraction cellulaire n'est pas réalisée sur le même échantillon que le comptage, car l'acidification des cellules a un impact négatif sur la concentration toxinique.

L'échantillon est centrifugé à 6000 g pendant 15 minutes et à 4°C. Le surnageant est jeté et le culot est utilisé pour l'extraction. Pour cela, un volume de 1 mL ($4 \times 250 \mu\text{L}$) de MeOH/H₂O 1/1 (v/v) est utilisé pour rincer et transférer le culot dans un tube Eppendorf de 1,5 mL. Les cellules sont lysées grâce à une sonde à ultrasons, pendant 2×40 minutes, à 35 %

d'amplitude, avec 10 secondes de marche pour 5 secondes de pause, le tube étant refroidi dans un bain de glace. La sonde à ultrasons est utilisée car la paroi cellulaire cellulosique d'*Ostreopsis cf. ovata* est difficile à rompre. Cependant, pour ne pas détruire les molécules, 5 secondes de pause de sonication toutes les 10 secondes est nécessaire, ainsi que la glace pour éviter la surchauffe de l'échantillon. Dans ces conditions, 4 échantillons peuvent être traités en même temps.

Les extraits sont ensuite centrifugés, le surnageant, réajusté à 1 mL avec du MeOH/H₂O 1/1 (v/v), est stocké dans des flacons de 2 mL à -20 °C. Un aliquot de 300 µL est filtré au travers d'un filtre Nanosep de 0,2 µm et analysé en CL-SM/SM.

4.3.3. Conservation des culots cellulaires d'*Ostreopsis*

Toutes les cellules restantes ont été rassemblées, peu importe la provenance de la souche, et ont été stockées pour les travaux ultérieurs de purification des ovatoxines.

Pour cela, les cultures ont été rassemblées dans des pots à centrifugation de 1 L et ont été centrifugées à 3000 g pendant 1h. Les culots ont ensuite été rassemblés dans des tubes Falcon de 50 mL tarés et ont été centrifugés une seconde fois à 6000 g pendant 15 minutes. Le culot d'*Ostreopsis* est pesé et stocké à -20 °C pour les étapes de purifications ultérieures.

4.4. Cinétique de croissance

Une cinétique de croissance a été réalisée sur une souche d'*Ostreopsis* récoltée à Villefranche-sur-Mer, durant l'étude terrain de 2011 (souche OST-IFR-0.3 V, décrite dans le chapitre 4- 1), en s'inspirant de la méthode développée par Guerrini et al [207]. Dans cette méthode, plusieurs boîtes de culture sont ensemencées de la même manière et les cellules sont cultivées en parallèle. À chaque moment de récolte, deux boîtes sont récoltées, la première destinée au comptage cellulaire et l'autre pour la détermination de la concentration toxinique.

L'ensemencement de chaque boîte de culture est réalisé dans un milieu de culture neuf à partir du même milieu de culture destiné au repiquage des cellules d'*Ostreopsis cf. ovata*. Les prélèvements homogénéisés sont répartis équitablement dans chaque boîte pour obtenir 14 boîtes « Corning cell bind » contenant 60 mL de culture. À t =3, 7, 10, 13, 17, 28 et 39 jours, deux boîtes différentes ont été traitées :

- la première était destinée au comptage cellulaire. Pour cela, toute la boîte a été acidifiée selon la méthode décrite précédemment, puis, après homogénéisation des milieux de culture acidifiés, trois prélèvements de 20 mL de culture ont été effectués afin d'obtenir

des résultats en triplicat. Les cellules ont été comptées avec le compteur de particule précédemment décrit.

- La seconde boîte de culture a été utilisée pour l'extraction cellulaire. Après l'homogénéisation des milieux de culture, trois prélèvements de 20 mL de culture ont été effectués pour effectuer l'extraction cellulaire. Chaque échantillon a été extrait et analysé en CL-SM/SM individuellement afin d'obtenir des résultats en triplicat.

Le taux de croissance (μ / jour) a été calculé à l'aide de la formule suivante [207] :

$$\mu = \frac{\ln N_1 - \ln N_0}{t_1 - t_0}$$

où N_0 et N_1 représentent la valeur de concentration cellulaire (nombre de cellules/mL) respectivement au temps t_0 et au temps t_1 . Le calcul du volume cellulaire a été réalisé en considérant que les cellules d'*Ostreopsis* en culture au laboratoire sont plus rondes que dans le milieu naturel, en utilisant l'équation du volume d'une sphère selon :

$$V = \frac{3}{4} \times \pi \times R^3$$

ou R est le rayon moyen des cellules obtenu lors du comptage cellulaire.

5. Études terrain 2011 et 2012

5.1. Échantillonnage *in situ* des cellules d'*Ostreopsis cf. ovata*

Les résultats des concentrations cellulaires planctoniques et épiphytes d'*Ostreopsis cf. ovata* récoltées durant tout l'été caractérise l'efflorescence annuelle de la microalgue. Les abondances des cellules d'*Ostreopsis cf. ovata*, à la fois sur les macroalgues et dans la colonne d'eau, ont été suivies en 2011 et 2012, chaque semaine de fin juin à fin août, à Villefranche-sur-Mer. Les caractéristiques des sites de prélèvement sont indiquées dans le chapitre 3-1.1. Les cellules sont récoltées en plongée palmes-masque-tuba (PMT).

Pour estimer l'abondance d'*Ostreopsis*, les cellules planctoniques de la colonne d'eau et les cellules épiphytes, proliférant sur des macroalgues, ont été récoltées et comptées. L'eau de mer est collectée avant la macroalgue, afin d'éviter toute resuspension des cellules épiphytes dans la colonne d'eau.

Pour quantifier les **cellules planctoniques** d'*Ostreopsis cf. ovata*, un volume d'eau de mer de 250 mL est récolté, dans un pot en plastique, à environ 0,3 mètre de la surface et en évitant de collecter trop près des macroalgues. Les échantillons d'eau ont été fixés dans une solution acide de Lugol (2 % v/v). Un volume de 50 mL d'eau de chaque point de prélèvement a été placé dans une colonne de décantation, le reste a été stocké à 4°C dans l'obscurité. Après 24 h, les cellules d'*Ostreopsis* ont été comptées à l'aide d'un microscope inversé. Les résultats sont exprimés en nombre de cellules par litre (cellule.L⁻¹). Les concentrations des points de prélèvement d'un même site sont moyennées afin de caractériser toute la zone.

Les **cellules épiphytes** ont été récoltées sur les macroalgues *Stypaucolon scoparium* et *Corallina elongata*. Ces dernières ont été soigneusement échantillonnées dans des pots en plastique de 250 mL, à la verticale du prélèvement de cellules planctoniques afin de ne pas décrocher les microalgues. Au retour au laboratoire, les échantillons de macroalgues ont été vigoureusement secoués, afin de détacher *Ostreopsis cf. ovata* de son support, et filtrés au travers un tamis pour séparer les microalgues des macroalgues (Figure 34). Les macroalgues sont rincées deux fois avec 100 mL d'eau de mer filtrée stérile, afin de récupérer un maximum de microalgues. L'abondance des cellules dans l'eau filtrée est évaluée par un comptage au microscope standard dans une chambre de 1 mL. Le poids des macroalgues est relevé afin de rapporter l'abondance d'*Ostreopsis* à la biomasse des macroalgues, en l'exprimant en nombre de cellules par gramme de poids frais de macroalgue (cells. g⁻¹ PF).

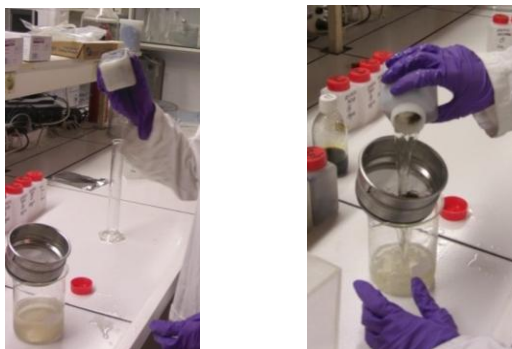


Figure 34. Séparation d'*Ostreopsis cf. ovata* des macroalgues.

5.2. Campagnes de prélèvement d'*Ostreopsis cf. ovata* et des produits de la mer

5.2.1. Prélèvements durant l'été 2011

Pendant l'été 2011, des échantillonnages ont été réalisés la dernière semaine du mois de juillet (semaine 30), au moment du pic de concentrations cellulaires d'*Ostreopsis cf. ovata*.

L'objectif de cette campagne était principalement d'évaluer la présence d'*Ostreopsis cf. ovata* à différents niveaux de profondeur de l'eau.

Pour l'évaluation du contenu toxinique cellulaire, des cellules d'*Ostreopsis cf. ovata* présentes à la fois dans la colonne d'eau et sur la macroalgue *Padina pavonica* ont été récoltées en plongée subaquatique sur les plages de Rochambeau (Villefranche-sur-Mer) et du Larvotto (Monaco) à -0,5, -1, -3 et -5 mètres de profondeur pour chaque point de prélèvement. Ces deux plages sont distantes d'environ 17 km, les conditions climatiques (température, ensoleillement) sont donc pratiquement les mêmes. Les concentrations toxiques n'ont pu être évaluées que pour les cellules benthiques. En effet, les quantités de cellules planctoniques récoltées n'étaient pas suffisantes pour permettre d'obtenir des concentrations en toxines supérieures à la limite de quantification.

Des oursins (*Paracentrotus lividus*) ont également été récoltés près de la plage de Rochambeau par PMT, afin d'évaluer le niveau d'accumulation des toxines d'*Ostreopsis cf. ovata* dans ces organismes. Un total de 10 oursins a été pêché, mesuré et disséqué : les tubes digestifs ont été séparés des gonades (organes destinés à la reproduction). Les tubes digestifs de ces 10 oursins ont été rassemblés, pesés et stockés à -20 °C afin d'être extraits ; les gonades ont subi le même sort.

Par ailleurs, nous avons cherché à évaluer les toxines dissoutes dans la colonne d'eau, en mettant en place des échantillonneurs passifs (en anglais « *Solid Phase Adsorption Toxin Tracking* » SPATT) (Figure 35). Ils sont destinés à capter et concentrer d'éventuelles toxines à l'état libre dans la colonne d'eau. Ces échantillonneurs sont constitués d'une phase stationnaire, ici du Diaion HP20, un polymère de styrène-divinylbenzène, contenue entre deux mailles de nylon de 60 µm de taille des pores, et maintenue par l'intermédiaire de deux anneaux de broderie. La méthodologie d'extraction mise en œuvre est décrite dans le chapitre 5.2.2. Brièvement, on dispose entre les deux mailles de nylon 3 g de résine, et on ferme le tout avec des anneaux de broderie. Le SPATT ainsi fermé est activé avec du MeOH pendant 2 h, avant d'être rincé abondamment avec de l'eau. Un total de 10 SPATTs a été installé en plein milieu de la zone de Rochambeau, entre -2 et -5 mètres, afin de mesurer la concentration de toxines libres en fonction de la profondeur. Les SPATTs n'ont pas été installés dans la zone qui se situe entre la surface de l'eau et 2 mètres de profondeur, pour éviter qu'ils soient arrachés par les vents, les baigneurs ou les bateaux. Ils n'ont pas pu être installés à Monaco non plus, à défaut des autorisations des autorités monégasques. Au bout d'une douzaine de

jours, les SPATTs ont été récupérés et stockés à -20°C avant les étapes d'extraction des toxines piégées et d'analyse en CL-SM/SM.



Figure 35. Disque de SPATT contenant de la résine Diaion HP20.

5.2.2. Prélèvements durant l'été 2012

Les échantillonnages ont été réalisés les deuxièmes et troisièmes semaines du mois de juillet de l'été 2012 (semaine 29 et 30), c'est-à-dire au moment du pic de concentration cellulaire dans l'eau et sur les macroalgues. L'objectif de cette campagne était principalement d'évaluer la répartition d'*Ostreopsis cf. ovata*, notamment en comparant deux zones, le site de Rochambeau, où le dinoflagellé prolifère abondamment, et le site du Lido, où la densité des cellules est moins importante.

Des cellules planctoniques et épiphytes d'*Ostreopsis* ont été récoltées sur ces deux sites à 0,5 mètres de profondeur pour en évaluer le contenu toxinique. Une variété de produits de la mer a également été récoltée afin d'étudier l'accumulation des toxines dans les différents tissus de ces organismes. À Rochambeau, des gastéropodes, des échinodermes et des poissons ont été pêchés près du rivage ou collectés par PMT, parmi lesquels :

- 10 faux-murex (*Starmonita haesmastera*) (Figure 36 -A),
- 2 × 10 oursins (*Paracentrotus lividus*) (Figure 36 -B),
- 21 saupes (*Sarpa salpa*) (Figure 36 -C),
- 2 mulets (*Mullus surmuletus*) (Figure 36 -D)
- 4 castagnoles (*Chromis chromis*) (Figure 36 -E).

Au Lido, seuls des échinodermes et des poissons ont été récoltés :

- 2 × 10 oursins (*Paracentrotus lividus*),
- 7 saupes (*Sarpa salpa*)
- 2 mulets (*Mullus surmuletus*)



Figure 36. (A) Faux murex (*Starmonita haesmastera*), (B) Oursin (*Paracentrotus lividus*), (C) Saupe (*Sarpa salpa*), (D) Mulet (*Mullus surmuletus*), (E) Castagnole (*Chromis chromis*) (<http://doris.ffesm.fr/>).

Enfin, des SPATTs ont été installés dans les zones de Rochambeau et du Lido, à 0,5 mètre et 1 mètre de profondeur, autrement dit, au niveau des cellules d'*Ostreopsis* cf. *ovata* et des organismes récoltés. Ils ont été nichés à l'abri des rochers pour éviter qu'ils soient arrachés (Figure 37). Les protocoles de fabrication et d'extraction sont les mêmes que pour la campagne de 2011.



Figure 37. Installation des SPATTs (entourés en rouge) dans la zone de Rochambeau, à 0,5 et 1 mètre de profondeur.

5.3. Traitement des échantillons prélevés durant les étés 2011 et 2012

5.3.1. Cellules d'*Ostreopsis* cf. *ovata*

Chacun des échantillons contenant des cellules d'*Ostreopsis* cf. *ovata* a été partagé en deux parties, pour avoir à la fois une information sur le contenu toxinique (extraction des cellules) et une information sur la concentration cellulaire pour chaque prélèvement. Le mode de prélèvement reste inchangé, seul le traitement des échantillons a été quelque peu modifié.

Les **cellules planctoniques** ont été récoltées dans de l'eau de mer dans un flacon en plastique de 250 mL, dont le contenu a ensuite été divisé en deux parties :

- un premier volume de 50 mL a été destiné à l'évaluation de la concentration cellulaire d'*Ostreopsis cf. ovata*. La méthode employée est celle utilisée habituellement au laboratoire d'Océanographie de Villefranche : une solution acide de Lugol (2 % v/v) est ajoutée et, après 24 h, les cellules sont comptées à l'aide d'un microscope inversé. Les concentrations sont exprimées en nombre de cellules par litre (cellule.L⁻¹).
- le restant de l'eau de mer a été filtré sur une membrane de nylon de 20 µm, afin de récupérer exclusivement les cellules phytoplanctoniques. Ces membranes ont été choisies pour permettre de retenir toutes les cellules d'*Ostreopsis*. Ce filtre a été soigneusement refermé pour éviter toute perte de cellules et a été conservé à -20 °C jusqu'aux étapes d'extraction et d'analyse CL-SM/SM.

Les **cellules épiphytes** récoltées avec de l'eau de mer ont été séparées de la macroalgue en secouant vigoureusement les pots de prélèvement ; la macroalgue a ensuite été rincée deux fois. L'eau de mer, ainsi récupérée, a été homogénéisée et séparée en deux parties équivalentes à l'aide d'un bac en plastique (Figure 38).

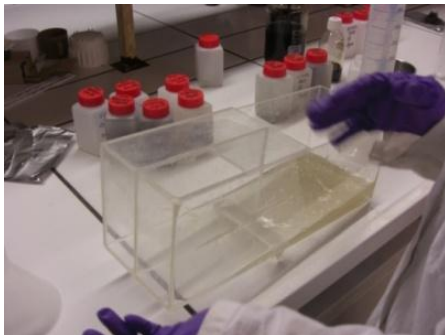


Figure 38. Séparation équitable du volume contenant les cellules épiphytes.

- une des deux parties a servi pour le comptage cellulaire à l'aide d'un microscope. Les macroalgues ont été pesées et les résultats sont exprimés en nombre de cellules par gramme de poids frais de macroalgue (cellule. g⁻¹ PF).
- l'autre partie a été filtrée sur une membrane de 20 µm. Le volume filtré est noté. Le filtre est ensuite soigneusement refermé pour éviter toute perte de cellules et est conservé à -20 °C jusqu'aux étapes d'extraction et d'analyse CL-SM/SM.

5.3.2. Traitement des produits de la mer

Chacun des organismes récoltés a été mesuré, disséqué et stocké à -20 °C, avant les étapes d'extraction et d'analyse en CL-SM/SM, pour la recherche des p-PLTX-OVTS.

Contrairement aux faux-murex, extraits et analysés en entier, les oursins et les poissons ont été disséqués.

L'évaluation des toxines dans les oursins ont porté sur deux séries d'une dizaine d'oursins :

- pour la première dizaine d'oursins, tous les tubes digestifs et toutes les gonades disséqués séparément, ont été respectivement rassemblés et extraits, afin d'obtenir une concentration moyenne en toxine, dans les tubes digestifs et dans les gonades, sur la dizaine d'oursins.
- pour la seconde série, les tubes digestifs et les gonades de chaque individu ont été extraits séparément, afin d'étudier la répartition individuelle des toxines dans chacun des organes.

De la même manière, pour les poissons, le tube digestif a été séparé du reste du corps et chaque partie a été extraite séparément. Tous les extraits ont été analysés en CL-SM/SM.

5.3.3. Traitement des SPATTs

Les anneaux des SPATTs ont été séparés et la résine a été transférée dans une colonne de verre de 6 mL pourvue de frittés en bas de colonne. La résine a tout d'abord été rincée avec 20mL d'eau, puis les toxines ont été éluées avec 20 mL de MeOH. L'extrait a été évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif, puis repris avec 0,5 mL de MeOH/H₂O 9/1 (v/v), et enfin analysé par CL-SM/SM.

5.4. Extraction des toxines à partir du matériel biologique récolté *in situ*

5.4.1. Extraction à partir des cellules d'*Ostreopsis*

Des prélèvements d'*Ostreopsis cf. ovata* dans la colonne d'eau et sur la macroalgue ont été récoltés *in situ* et conservés au congélateur, sur les membranes de nylon de 20 µm, ayant servi à la filtration afin d'en extraire les p-PLTX-OVTXs. Le protocole d'extraction a été adapté à partir de la méthode optimisée pour l'extraction des cellules d'*Ostreopsis cf. ovata* en culture.

Les cellules contenues sur le filtre ont été délicatement grattées à l'aide d'une spatule. Le filtre a été rincé avec un volume minimum du mélange MeOH/H₂O 1/1 (v/v) nécessaire pour récupérer toutes les cellules. Le mélange contenant les cellules d'*Ostreopsis* a été soniqué à l'aide d'une sonde à ultrasons, en utilisant le même protocole que celui décrit précédemment. Pour augmenter le seuil de détection et pour comparer les résultats, tous les échantillons ont été concentrés à 1 mL avec un évaporateur à flux d'azote. Les échantillons ont ensuite été

filtrés sur un filtre Nanosep de 0,2 µm avant d'être finalement analysés en CL-SM/SM. Les concentrations cellulaires ayant été déterminées, les résultats sont exprimés en pg/cellule.

5.4.2. Extraction à partir des produits de la mer

Les organismes récoltés et disséqués durant les campagnes de prélèvements ont fait l'objet d'une étape d'extraction des p-PLTX-OVTXs dans ces organismes, pour estimer le niveau d'accumulation. Le protocole d'extraction utilisé a été celui optimisé et décrit par Amzil et al. [14]. Il consiste tout d'abord à homogénéiser les différents tissus collectés en les mélangeant à l'aide d'une spatule, et d'en peser environ exactement 2 g avec une balance de précision. L'extraction est effectuée avec 3 × 3 mL de MeOH/H₂O 9/1 (v/v). Chaque extrait est ensuite centrifugé à 8000 g pendant 8 minutes. Les surnageants sont ensuite combinés et le volume est ajusté à 10 mL. Un aliquot de 300 µL est filtré au travers un filtre Nanosep et analysé en CL-SM/SM.

6. Test hémolytique

Au cours de la thèse, un test biologique basé sur l'hémolyse des hématies, provoquée par la PLTX, a été mis en place au laboratoire.

6.1. Préparation des solutions

Tous les échantillons analysés ont été dilués dans une solution de **tampon phosphate salin** (souvent abrégé **PBS**, de l'anglais *phosphate buffered saline*). Il s'agit d'un soluté physiologique contenant du chlorure de sodium (NaCl), du phosphate disodique, du phosphate monopotassique et un peu de chlorure de potassium (KCl). En général, la concentration de ces sels est la même que celle retrouvée dans les organismes vivants, afin de préserver l'isotonie de part et d'autre des cellules.

Pour préparer cette solution, des pastilles de **PBS** composées de phosphates disodiques et monopotassiques, de NaCl et de KCl (Interchim) ont été dissoutes dans de l'eau MilliQ (Millipore) autoclavée, à raison de 1 pastille pour 100 mL. Après reconstitution, les concentrations finales dans le tampon sont les suivantes : ions phosphates 0,01 M, NaCl 0,137 M et KCl 0,027 M. le pH est égal à 7,4. À cette solution ont été ajoutés de l'acide borique (0,5 mM H₃BO₃) et du chlorure de calcium (1 mM CaCl₂). Le pH a été mesuré. Il doit être compris entre 7,0 et 7,4.

L'**ouabaïne** (Sigma-Aldrich), pour l'analyse de la lyse non spécifique, a été mise en solution dans le tampon PBS à une concentration de 500 µM. Des précautions particulières doivent

être prises pour préparer cette solution car la ouabaine est sensible à la lumière, telles que peser dans l'obscurité et stockage dans des flacons ambrés.

La **saponine** (pour biologie moléculaire, Sigma-Aldrich), utilisée pour obtenir la lyse totale des hématies (témoin positif) a été préparée dans de l'eau autoclavée (stérile) à une concentration finale de 10 g/L. La solution doit être préparée délicatement car la saponine a tendance à mousser.

Ces trois solutions sont à préparer la veille des tests hémolytiques et ont été conservées à 4°C dans le noir avant d'être utilisées. Les produits proviennent de Sigma Aldrich.

6.1.1. Lavage du sang

Du sang de mouton est utilisé pour les tests hémolytiques. Il a été commandé chez Charles Rivers laboratoire (Lyon, France) sous un conditionnement de 8 mL avec du K3-EDTA comme anticoagulant. À la réception du sang, les hématies sont séparées du plasma, puis le lavage du sang est réalisé en conditions stériles afin de ne pas introduire de contaminations qui pourraient provoquer la lyse des cellules.

Pour laver le sang, un volume de 5 mL de sang est délicatement prélevé et transféré dans un tube Falcon de 50 mL. Lentement, un volume de 20 mL de PBS est ajouté, et le plus délicatement possible, la solution est homogénéisée en renversant le tube de haut en bas (Figure 39-A). La solution est ensuite centrifugée à 800 g pendant 8 minutes et à température ambiante, afin de séparer le plasma des hématies, qui forment le culot. Le surnageant est jeté dans une bassine d'eau de javel. Cette opération est répétée jusqu'à ce que le surnageant soit de couleur jaunâtre à limpide (Figure 39-B). À partir de ce culot, une solution appelée « sang-PBS » est préparée en diluant 0,5 % des hématies dans du PBS et une autre appelée « sang-ouabaine » est préparée en diluant 0,5 % des hématies dans la solution de ouabaine. La solution de sang-ouabaine est pré-incubée pendant 1 heure dans une étuve thermostatée à 37°C.



Figure 39. Lavage du sang. (A) homogénéisation du sang. (B) surnageant limpide.

6.1.2. Incubation du sang et des échantillons

Différents types d'échantillons sont préparés pour mener à bien un test hémolytique : une gamme d'étalonnage préparée à partir d'une solution étalon de PLTX de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Wako, Neuss, Allemagne), un témoin négatif (PBS), un témoin positif (saponine) et la série d'échantillons à analyser.

La gamme étalon de PLTX est préparée dans une solution de tampon (PBS) par dilutions successives, afin d'obtenir des solutions dont la concentration est comprise entre 500 et $0,06 \text{ ng.mL}^{-1}$. La dilution des échantillons à analyser est effectuée dans du PBS.

Tous les échantillons sont mis en contact avec les hématies de mouton dans des tubes Eppendorfs de 2 mL, à raison de $50 \mu\text{L}$ d'échantillon pour $950 \mu\text{L}$ de solution d'hématies. Chaque échantillon est analysé en triplicat, à la fois dans la solution de sang-PBS et dans la solution sang-ouabaine. Ils sont ensuite incubés pendant 4 h dans un incubateur thermostaté à 37°C et homogénéisés à 140 rpm.

6.1.3. Lecture des résultats du test hémolytique

À l'issue des 4 heures d'incubation, les échantillons sont centrifugés à 800 g pendant 8 minutes et $90 \mu\text{L}$ du surnageant sont transférés dans une microplaque 96 puits (VWR, Strasbourg, France). L'absorbance de l'hémoglobine est mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaques (TECAN Infinite 200) à une longueur d'onde de 415 nm.

Le pourcentage de lyse est calculé avec la formule suivante :

$$\% \text{ Lyse} = \frac{A - A_{min}}{A_{max} - A_{min}} \times 100$$

où A est l'absorbance de l'échantillon, A_{min} est l'absorbance du témoin négatif et A_{max} est l'absorbance du témoin positif.

Chapitre 3 – Distribution d'*Ostreopsis* cf. *ovata* dans la baie de Villefranche-sur-Mer et niveau de contamination dans les organismes marins

Les espèces du genre *Ostreopsis* prolifèrent depuis cette dernière décennie autour de la Méditerranée, avec une intensité et une distribution grandissantes. En France, des efflorescences d'*Ostreopsis* cf. *ovata* sont régulièrement observées sur le littoral méditerranéen, chaque été depuis 2006. Durant mes travaux de thèse, des études de terrains ont été réalisées dans la baie de Villefranche-sur-Mer, pendant les périodes estivales de 2011 et 2012, dans le but d'étudier la variation spatio-temporelle d'*Ostreopsis* cf. *ovata* et d'évaluer les niveaux de contamination des p-PLTX-OVTXs dans les produits de la mer, tels que les poissons ou les oursins.

1. Suivi *in situ* des efflorescences d'*Ostreopsis* cf. *ovata* en Méditerranée

1.1. Caractérisation des sites

La zone géographique choisie pour étudier cette microalgue comprend d'une part, la baie de Villefranche-sur-Mer (située près de Nice), et d'autre part, la plage du Larvotto à Monaco, où *Ostreopsis* cf. *ovata* prolifère tous les ans, du début du mois de juillet, à la fin du mois d'août [16, 208]. Villefranche-sur-Mer, nichée au fond de sa rade, jouit d'un climat très doux : de hautes falaises l'abritent des vents d'est, d'ouest et de nord. Le sud, ouvert au large est, malgré tout, protégé par l'étroitesse de la rade, sauf durant de rares mais spectaculaires coups de vent d'hiver. En résumé, elle rassemble les conditions préférentielles d'*Ostreopsis* cf. *ovata*, c'est à dire un fort ensoleillement et des températures estivales, comprises entre 20 et 30°C.

Dans la baie de Villefranche-sur-Mer, deux sites ont été étudiés : Rochambeau et Lido. Le site de Rochambeau (43° 41' 34.7" N/07° 18' 32.1" E) est connu pour avoir de fortes abondances d'*Ostreopsis* chaque année. Cette baie semi-fermée est caractérisée par une plage à fonds rocheux, constituée aussi bien de rochers naturels que de rochers appartenant à des constructions artificielles. Afin de caractériser la zone, trois points de prélèvement (A, B, C) situés à 0,5 mètre de profondeur et tout autour de la baie, ont été sélectionnés ; les concentrations cellulaires mesurées sont la moyenne de ces points. De plus, un autre point, où les prélèvements ont été effectués en profondeur et en triplicat est représenté par le symbole ▲. Au Lido (43° 41' 30.3" N/07° 19' 15.5" E), les cellules d'*Ostreopsis* sont beaucoup moins abondantes. C'est une baie semi-fermée caractérisée également par une plage à fond rocheux, dont les rochers sont exclusivement naturels. L'ensoleillement sur cette plage est moins important l'après-midi. Trois points de prélèvements situés tout autour de la baie sont également sélectionnés (1, 2, 3). Ces deux sites sont considérés comme comparables, car ils présentent les mêmes caractéristiques,

types de rochers, communautés macroalgales, exposition aux vagues... [16]. Non loin de Villefranche-sur-Mer, d'autres prélèvements ont également été effectués à Monaco, noté par le symbole ■, sur la plage du Larvotto ($43^{\circ} 44' 44.3''$ N/ $07^{\circ} 26' 04.1''$ E) (Figure 40). Cette plage est exposée aux vagues et est constituée de rochers artificiels.



Figure 40. Localisation de Villefranche-sur-Mer, de la plage de Rochambeau ($43^{\circ}41'34.83''$ N $7^{\circ}18'31.66''$ E) et du Lido ($43^{\circ} 41' 30.3''$ N/ $07^{\circ} 19' 15.5''$ E), et de la plage du Larvotto à Monaco ($43^{\circ} 44' 44.3''$ N/ $07^{\circ} 26' 04.1''$ E) Les points A, B, C ; 1,2,3 sont les points de prélèvement pour caractériser la zone ; ▲ et ■ sont les zones où trois prélèvements ont été faits en profondeur.

1.2. Suivi de la prolifération de cellules d'*Ostreopsis cf. ovata*

Tous les ans, le laboratoire d'Océanologie de Villefranche-sur-Mer (LOV, UMR CNRS 7093) participe à la surveillance de la rade, en effectuant des prélèvements de cellules d'*Ostreopsis cf. ovata*, dans la colonne d'eau et sur les macroalgues, tous les matins, durant la période estivale. Durant les étés 2011 et 2012, les cellules d'*Ostreopsis* ont été comptées afin de suivre l'évolution de la croissance de la microalgue (Figure 41).

Durant les étés 2011 et 2012, les efflorescences d'*Ostreopsis cf. ovata* ont débuté au début du mois de juillet jusqu'à fin août, avec des pics d'efflorescences, ou blooms, qui surviennent fin juillet. Ces périodes d'efflorescence sont celles généralement observées dans le nord de la mer Méditerranée [16, 152].

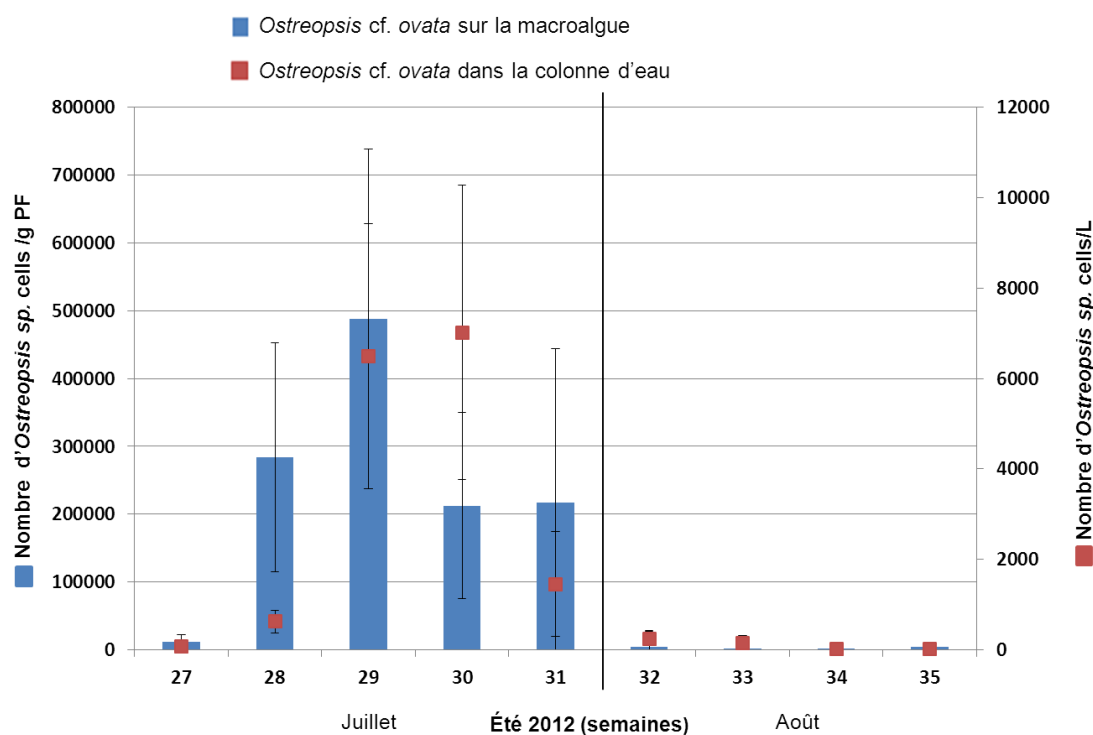
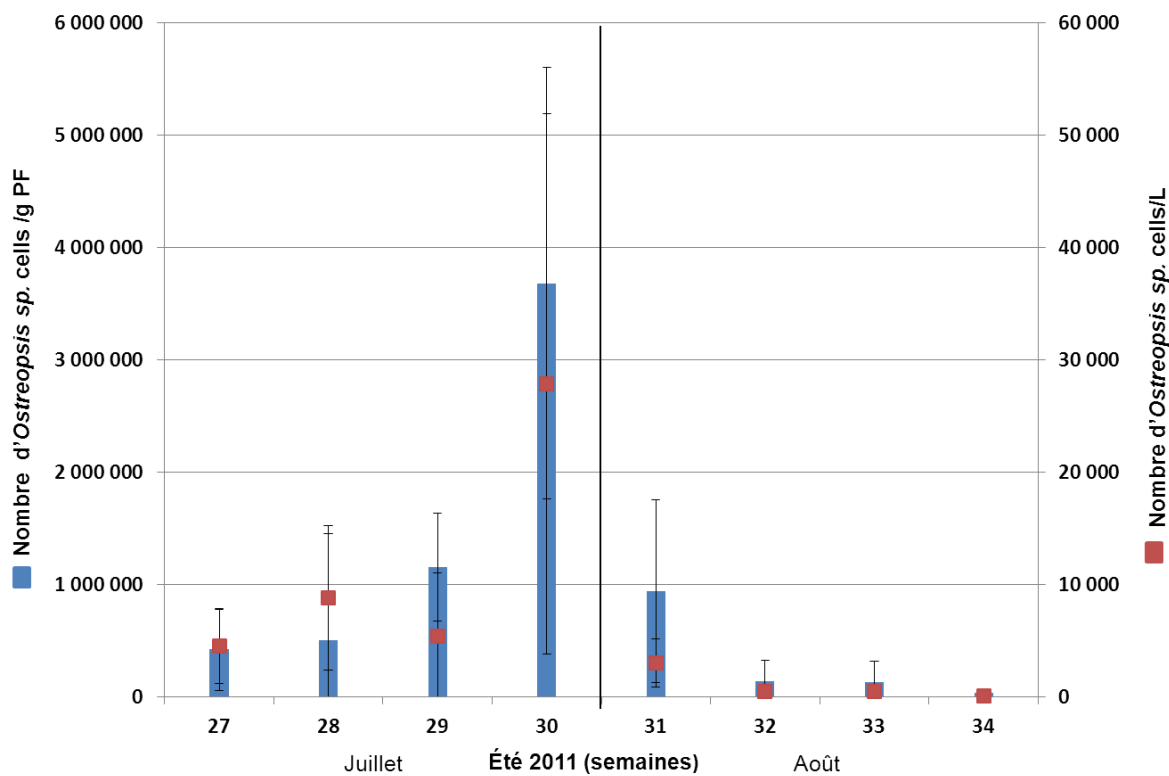


Figure 41. Concentrations cellulaires d'*Ostreopsis cf. ovata* dans la colonne d'eau (cellule.L⁻¹) et sur la macroalgue *Stypaucolon scoparium* (cellule.g⁻¹ de poids frais de macroalgues PF) observées à Villefranche-sur-Mer, sur la plage de Rochambeau, pendant les étés 2011 (A) et 2012 (B). Moyenne et écart-types des trois points de prélèvement (A,B,C).

L'année 2011 a été caractérisée par un important bloom, avec un pic de $2,8 \cdot 10^4$ cellule.L⁻¹ pour l'abondance cellulaire planctonique (dans la colonne d'eau) et de $3,7 \cdot 10^6$ cellule.g⁻¹ de poids frais de macroalgue (PF) pour les cellules épiphytes obtenu pendant la semaine 30. Ces concentrations cellulaires sont dix fois plus importantes que celles observées pendant l'année 2012, qui a connu une abondance de cellules épiphytes maximale de $4,9 \cdot 10^5$ cells/g⁻¹ PF la semaine 29 et de $7,2 \cdot 10^3$ cellule.L⁻¹ dans la colonne d'eau en semaine 30. Après ces pics d'abondance, la concentration d'*Ostreopsis cf. ovata* diminue fortement.

Les concentrations de cellules planctoniques suivent la même tendance que celle des cellules épiphytes, mais malgré leur bonne corrélation, rapportée généralement dans la littérature, la relation entre les concentrations de ces deux types de cellules reste inexplicée [16]. Les exceptions observées début juillet 2011 (semaine 28) et fin juillet 2012 (semaine 30), c'est-à-dire quand les cellules épiphytes diminuent alors que les cellules planctoniques augmentent, correspondent à un fort coup de vent qui a dispersé les cellules benthiques dans la colonne d'eau.

La présence d'*Ostreopsis cf. ovata* a donc été confirmée dans cette zone les deux étés, comme les étés précédents, ce qui était le préalable pour des études supplémentaires.

2. Distribution verticale d'*Ostreopsis cf. ovata* : résultat de la campagne de 2011

La littérature indique que les cellules d'*Ostreopsis cf. ovata* prolifèrent dans les eaux peu profondes, et que la densité de cellules diminue avec la profondeur [13, 209]. Cependant, peu d'informations sont disponibles sur la production de toxines en fonction de la profondeur. C'est pourquoi, le profil toxinique a été étudié en fonction de la profondeur, dans les premiers mètres des zones balnéaires de Villefranche-sur-Mer et de Monaco. Les cellules d'*Ostreopsis cf. ovata* ont été récoltées pendant la seconde moitié du mois de juillet 2011 (semaine 30) sur les plages de Rochambeau et du Larvotto. Les concentrations cellulaires ont été mesurées à la fois sur la macroalgue (*Padina pavonica*) et dans la colonne d'eau à -0,5, -1, -3 et -5 mètre de profondeur.

2.1. Site de Villefranche-sur-Mer

À Villefranche-sur-Mer, les concentrations cellulaires planctoniques et benthiques ont été évaluées jusqu'à 5 mètres. En revanche, les profils toxiques des cellules benthiques n'ont été évalués que jusqu'à 3 mètres. En effet, à 5 mètres de profondeur, les quantités de cellules

récoltées n'étaient pas suffisantes pour permettre d'obtenir des concentrations en toxines supérieures à la limite de quantification (Figure 42).

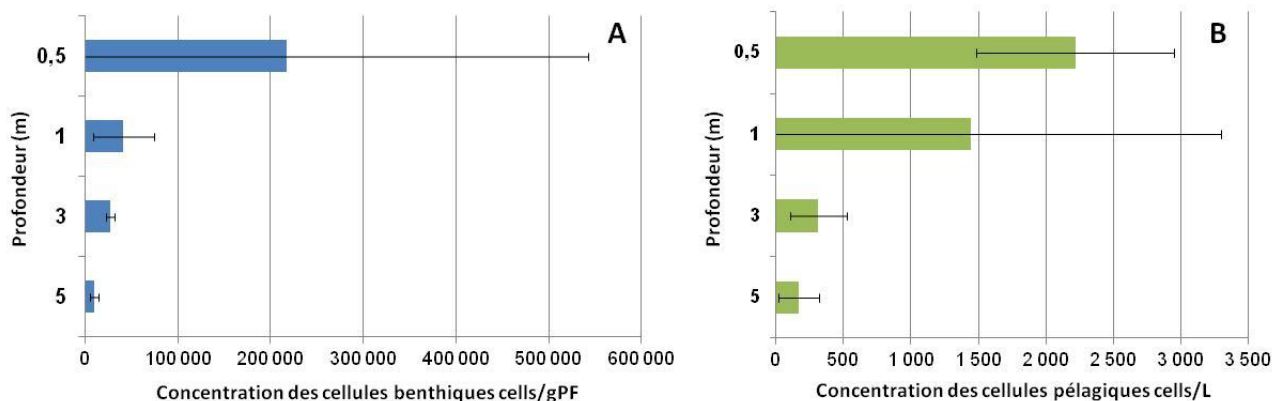


Figure 42. Étude de la prolifération de cellules d'*Ostreopsis cf. ovata* récoltées à Villefranche-sur-Mer en juillet 2011 (semaine 30) entre la surface et 5 mètres de profondeur : A- Prolifération des cellules benthiques sur la macroalgue *Padina pavonica*; B- Prolifération des cellules épiphytes récoltées à 5 cm de la macroalgue. Les résultats correspondent à la moyenne et écarts des trois points de prélèvement (▲) précédemment décrits.

Les résultats obtenus montrent que les concentrations cellulaires diminuent avec la profondeur, comme reporté dans la littérature [13, 152, 209], que ce soit sur la macroalgue ou dans la colonne d'eau. À 0,5 mètre, les concentrations en cellules benthiques atteignent $2,2 \cdot 10^5$ cellule.g⁻¹ de PF, puis sont réduites d'un facteur 5 jusqu'à $4,1 \cdot 10^4$ cellule.g⁻¹ de PF à 1 mètre de profondeur, puis diminuent encore à $2,7 \cdot 10^4$ cellule.g⁻¹ de PF à 3 mètres de profondeur pour atteindre finalement $9,9 \cdot 10^3$ cellule.g⁻¹ de PF à 5 mètres de profondeur. La densité cellulaire diminue de façon exponentielle avec la profondeur (Figure 43).

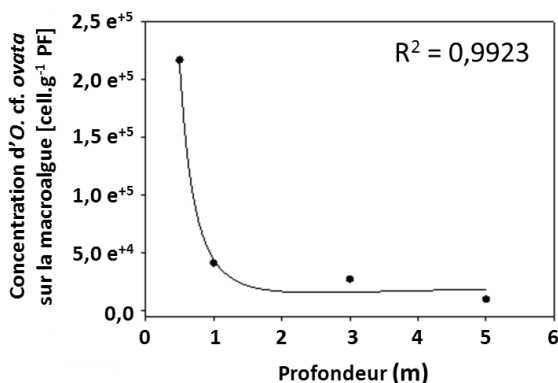


Figure 43. Corrélation entre les concentrations en cellules épiphytes d'*Ostreopsis cf. ovata* et la profondeur. Les relations statistiques sont détaillées en annexe 2.

Les cellules pélagiques suivent la même tendance, la concentration maximale est atteinte à 0,5 mètre de profondeur avec une concentration cellulaire de $2,2 \cdot 10^3$ cellule.L⁻¹ puis diminue régulièrement. Elle est de $1,5 \cdot 10^3$ cellule.L⁻¹ à 1 mètre de profondeur, de $3,1 \cdot 10^2$ cellule.L⁻¹ à 3 mètres de profondeur et enfin de $1,7 \cdot 10^2$ cellule.L⁻¹ à 5 mètres de profondeur.

De 0,5 à 3 mètres de profondeur, le contenu toxinique des cellules épiphytes diminue régulièrement (Figure 44), passant de $23,2$ pg.cellule⁻¹ à 0,5 mètre, à $12,0$ pg.cellule⁻¹ à 1 mètre et enfin à $8,5$ pg.cellule⁻¹ à 3 mètres de profondeur. Le profil toxinique quant à lui reste le même quelle que soit la profondeur. Le contenu toxinique des échantillons est dominé par l'OVTX-a (36 % - 50 %), suivie par l'OVTX-b (13 % - 17 %), la p-PLTX (15 % - 13 %), l'OVTX-e (12 % - 16 %), l'OVTX-c (8 % - 12 %), l'OVTX-d (2 % - 5 %), l'OVTX-h¹ (1 % - 3 %) et l'OVTX-f (0 % - 0,2 %).

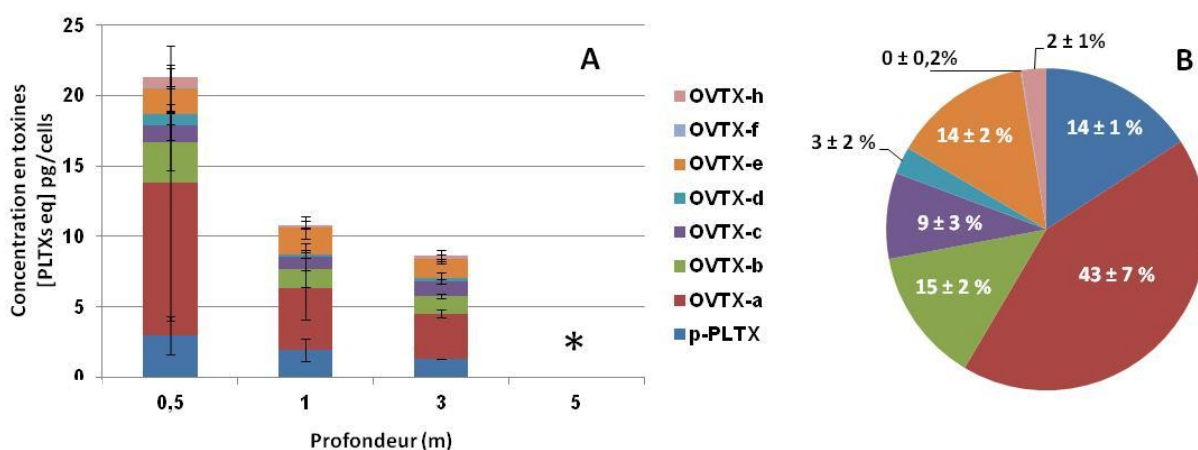


Figure 44. Concentration et profil toxaniques des extraits d'*Ostreopsis cf. ovata* récoltés à Villefranche-sur-Mer en juillet 2011 (semaine 30) entre la surface et 5 mètres de profondeur (▲). A : concentration en toxines par cellules (pg.cellule⁻¹) en fonction de la profondeur ; et B : moyenne du profil toxinique. * concentrations inférieures à la limite de détection. LD = 0,015 µg.mL⁻¹.

Par ailleurs, nous avons cherché à évaluer les toxines dissoutes dans la colonne d'eau, en mettant en place des échantillonneurs passifs (en anglais « *Solid Phase Adsorption Toxin Tracking* » SPATT) contenant une phase stationnaire Diaion HP20, un polymère de styrène-divinylbenzène, entre deux mailles de nylon de 60 µm de taille des pores, et maintenue par l'intermédiaire de deux anneaux de broderie. L'exploitation des résultats obtenus avec ces SPATTs, installés entre 2 et 5 mètres de profondeur, a montré qu'il n'est pas possible de détecter des toxines dissoutes dans l'eau : soit les toxines dissoutes sont à l'état de traces indétectables par notre système analytique (CL-SM) ; soit la nature de la résine contenue dans les SPATTs n'est pas adaptée

¹ L'OVTX-h est un analogue des ovatoxines qui est retrouvé dans nos échantillons. Elle n'a pas encore été décrite dans la littérature et sa description sera effectuée dans le chapitre 5.

pour concentrer les toxines d'*Ostreopsis*. Une étude préalable réalisée sur plusieurs phases stationnaires (OASIS HLB, Strata X, HP20) a montré qu'avec les résines HP20 on peut capter et récupérer jusqu'à 55% des toxines présentes dans l'eau [226]. On peut donc en conclure que les concentrations de toxines dans l'eau étaient trop faibles pour qu'on puisse les détecter.

2.2. Site de Monaco

À Monaco, de la même manière, les concentrations cellulaires et toxiques, ainsi que les profils toxiques, ont été évalués, de la surface jusqu'à 5 mètres (Figure 45). L'examen de la figure montre que la distribution verticale est quelque peu différente de celle de Rochambeau. En effet, les concentrations cellulaires ne suivent pas la même diminution progressive en fonction de la profondeur.

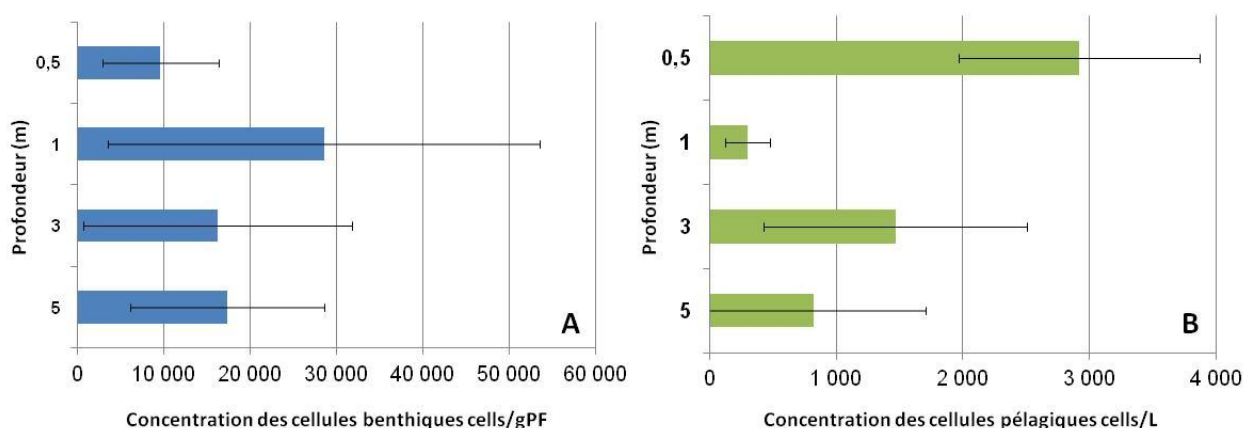


Figure 45. Étude de la prolifération des cellules d'*Ostreopsis cf. ovata* récoltées à Monaco en juillet 2011 (semaine 30) entre la surface et 5 mètres de profondeur : A- Prolifération des cellules benthiques sur la macroalgue *Padina pavonica*; B- Prolifération des cellules épiphytes récoltées à 5 cm de la macroalgue. Les résultats correspondent à la moyenne et écarts des trois points de prélèvement (■) précédemment décrits.

Les concentrations cellulaires sur la macroalgue étaient de $9,7 \cdot 10^3$ cellule.g⁻¹ à 0,5 mètre, puis triplent à 1 mètre pour atteindre une concentration de $2,9 \cdot 10^4$ cellule.g⁻¹ de PF. Les concentrations cellulaires diminuent ensuite régulièrement, à environ $1,6 \cdot 10^4$ cellule.g⁻¹ de PF à 3 mètres de profondeur mais restent du même ordre de grandeur à 5 mètres avec environ $1,7 \cdot 10^4$ cellule.g⁻¹ de PF. Les densités cellulaires pélagiques suivent une tendance inverse dans les premiers mètres ; la concentration cellulaire était la plus forte à 0,5 mètre de profondeur pour une concentration de $2,92 \cdot 10^3$ cellule.L⁻¹, suivie d'une chute d'un facteur 10 à 1 mètre de profondeur ($3,00 \cdot 10^2$ cellule.L⁻¹). La concentration cellulaire remonte ensuite à 3 mètres de profondeur avec $1,5 \cdot 10^3$ cellule.L⁻¹ puis diminue à 5 mètres avec $2,9 \cdot 10^3$ cellule.L⁻¹. Les variations observées sont certainement dues à la particularité de l'hydrodynamisme de cette plage qui est exposée aux

vents et aux vagues [12, 132]. En effet, la littérature rapporte que les cellules d'*Ostreopsis* sont sensibles à de fortes turbulences. À 0,5 mètre de profondeur, le vent disperse les cellules benthiques dans la colonne d'eau, c'est pour cette raison, qu'à cette profondeur, une forte densité cellulaire pélagique est observée, alors qu'elle est faible pour les cellules benthiques. À 1 mètre de profondeur, les cellules doivent être plus protégées des turbulences et c'est une tendance inverse qui est observée : les cellules benthiques prolifèrent rapidement au détriment des cellules pélagiques.

Les concentrations en toxines dans les cellules épiphytes présentent, elles aussi, une variation similaire à celles des concentrations cellulaires planctoniques (Figure 46). Les concentrations toxiques à 0,5 mètre ($19,6 \text{ pg.cellule}^{-1}$) triplent à 1 mètre de profondeur avec $58,8 \text{ pg.cellule}^{-1}$. Les concentrations toxiques diminuent ensuite régulièrement, passant de $17,9 \text{ pg.cellule}^{-1}$ à 3 mètres à $6,3 \text{ pg.cellule}^{-1}$ à 5 mètres de profondeur.

En fonction de la profondeur, les proportions des analogues d'ovatoxines varient avec une dominance d'OVTX-a (44 – 74 %) suivie par l'OVTX-b (<LD – 18 %), la p-PLTX (11 – 16 %), l'OVTX-e (7 – 13 %), l'OVTX-c (<LD – 8 %), l'OVTX-d (2 – 7 %), l'OVTX-h (<LD – 4 %) et enfin l'OVTX-f (<LD – 2 %). Il faut noter que, dans les échantillons récoltés à 5 mètres de profondeur, la concentration en toxines est tellement faible que certains analogues d'OVTXs sont en dessous de la limite de détection.

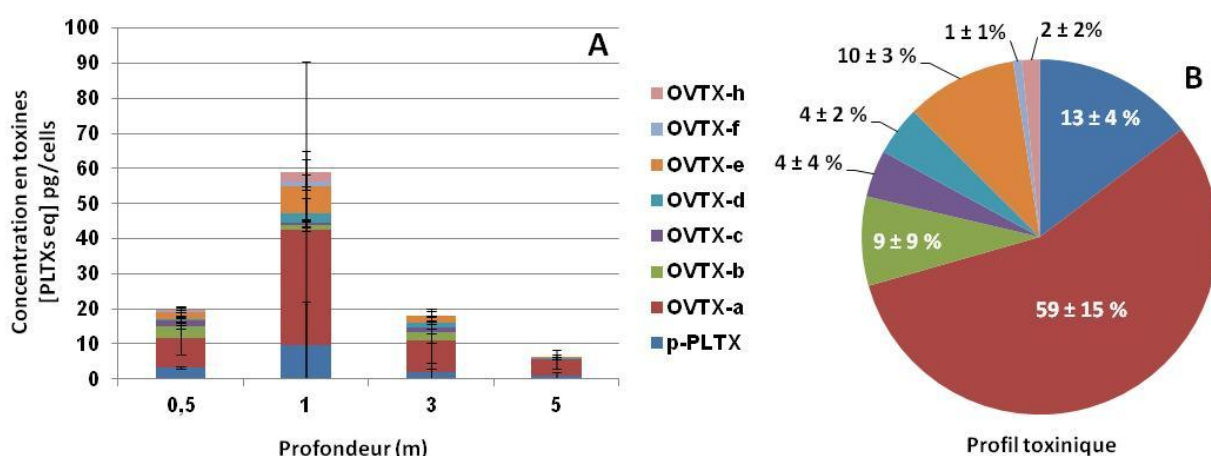


Figure 46. Extraits d'*Ostreopsis cf. ovata* récoltés à Monaco en juillet 2011 (semaine 30) entre la surface et 5 mètres de profondeur (■). A : concentration en toxines par cellule d'*Ostreopsis cf. ovata* (pg.cellule^{-1}) en fonction de la profondeur ; B : moyenne du profil toxinique d'*Ostreopsis cf. ovata*.

2.3. Comparaison des deux sites

La distribution verticale des cellules d'*Ostreopsis cf. ovata* est différente selon le site. Lorsque les conditions sont favorables au développement d'*Ostreopsis cf. ovata*, comme à Rochambeau, les cellules prolifèrent à la fois sur la macroalgue, avec de forte densité cellulaire, et dans la colonne d'eau. Avec la profondeur, les concentrations cellulaires diminuent régulièrement, et les cellules produisent de moins en moins de toxines, peut-être en lien avec la diminution de la luminosité. En effet, avec la profondeur, la luminosité diminue, contrairement à la température qui reste environ la même de la surface à 5 m. Cela corrobore ce qui est décrit dans la littérature, la croissance d'*Ostreopsis* étant fortement influencée par l'irradiance, à la fois en culture et en milieu naturel [13, 140, 209, 210]. Lorsque les conditions sont moins favorables à *Ostreopsis cf. ovata*, par exemple dans les premiers mètres d'un site plus exposé aux vagues, comme au Larvotto, les cellules sont beaucoup moins denses sur la macroalgue, à la faveur des cellules planctoniques, suggérant une dispersion des cellules benthiques dans la colonne d'eau. En revanche, elles produisent globalement plus de toxines par cellule. En effet, même si la production de toxine est comparable sur les deux sites à 0,5 m de profondeur (19,6 pg.cellule⁻¹ pour Monaco et 23,2 pg.cellule⁻¹ pour Villefranche-sur-Mer), la concentration toxinique est 5 fois plus élevée à Monaco qu'à Villefranche-sur-Mer à 1 m de profondeur (58,8 pg.cellule⁻¹ et 12,0 pg.cellule⁻¹ respectivement) et 2 fois plus élevée à 3 m de profondeur (17,9 pg.cellule⁻¹ et 8,5 pg.cellule⁻¹ respectivement).

La distribution verticale des cellules d'*Ostreopsis* dans ces zones est comparable à celle décrite dans la littérature, avec un fort développement de la surface jusqu'à 2 mètres de profondeur, suivie par une diminution significative jusqu'à 3 mètres [13, 152]. En revanche, à notre connaissance, c'est le premier travail qui fait l'état de l'évolution du profil toxinique des cellules d'*Ostreopsis cf. ovata* en fonction de la profondeur.

Il est rapporté dans la littérature qu'il est difficile de prévoir les endroits où *Ostreopsis cf. ovata* est susceptible de proliférer. Les données présentées ici montrent qu'il existe un risque pour les baigneurs nageant dans des zones abritées, préférées des cellules d'*Ostreopsis*, où elles vont proliférer à de fortes concentrations, mais aussi dans les zones plus exposées aux vents, car la production de toxines par les cellules d'*Ostreopsis* est alors favorisée. Par ailleurs, comme les produits de la mer se nourrissent de microalgues, nous avons cherché à évaluer leur niveau de contamination, lors des efflorescences d'*Ostreopsis cf. ovata* dans les zones touchées.

3. Niveaux d'accumulation des OVTXs par CL-SM/SM dans les produits de la mer

L'accumulation des ovatoxines dans les organismes marins est un problème récurrent dans le bassin méditerranéen. En effet, les toxines entrent dans la chaîne alimentaire et peuvent provoquer des intoxications néfastes pour le consommateur. Afin d'évaluer le niveau d'accumulation de ces toxines dans les produits de la mer du littoral français, une variété d'organismes marins, tels que des saupes, des mullets, des castagnoles, des oursins et des faux murex, a été récolté sur deux sites de Villefranche-sur-Mer, sur les sites de Rochambeau, où *Ostreopsis cf. ovata* prolifère régulièrement à de fortes densités et de Lido, où les concentrations cellulaires sont plus faibles.

Les organismes ont été récoltés fin juillet, à environ 0,5 mètre de profondeur, lorsque le nombre de cellules d'*Ostreopsis cf. ovata* était à son maximum d'abondance. Les densités cellulaires benthiques et pélagiques, ainsi que les concentrations toxiques ont été évaluées en parallèle dans les deux zones (Figure 47).

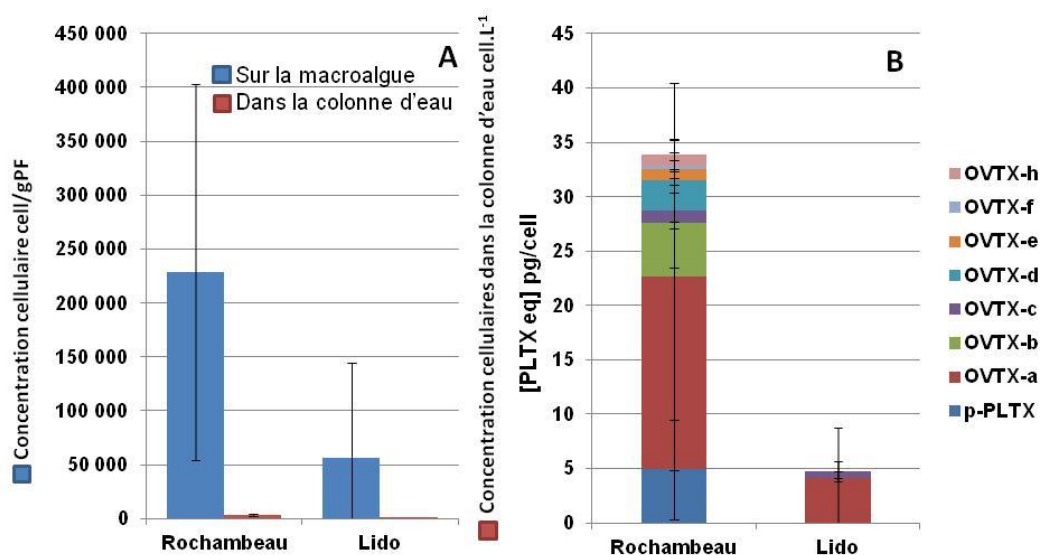


Figure 47. Comparaison des sites de Rochambeau et du Lido (été 2012) : A: concentrations cellulaires épiphytes (cellule.g⁻¹ PF) et pélagiques (cellule.mL⁻¹) ; B : Concentration toxique dans les extraits de cellules épiphytes (pg.cellule⁻¹). Échantillons prélevés à 0,5 m de profondeur. Les résultats correspondent à la moyenne et écarts des trois points de prélèvement A, B et C précédemment décrits.

Les résultats présentés dans la Figure 47 montrent la différence de prolifération d'*Ostreopsis cf. ovata* sur les deux sites. Les concentrations cellulaires atteignent $2,38.10^5$ cellule.g⁻¹ PF sur la macroalgue et $6,16.10^3$ cellule.L⁻¹ dans la colonne d'eau à Rochambeau, contre $6,40.10^4$ cellule.g⁻¹ PF sur la macroalgue et $5,53.10^2$ cellule.L⁻¹ dans la colonne d'eau au Lido. Les

productions toxiques étaient également différentes, avec une concentration totale en toxines de 32,8 pg.cellule⁻¹ pour les cellules benthiques de Rochambeau et de 3,75 pg.cellule⁻¹ pour les cellules benthiques du Lido. Ces deux sites montrent tous les deux la présence des cellules toxiques d'*Ostreopsis* cf. *ovata*, mais avec des différences d'abondances significatives ; Rochambeau est plus propice à la prolifération des cellules que le Lido.

Par ailleurs, les échantillonneurs passifs installés au Lido n'ont pas pu être récupérés, car ils ont disparus (probablement arrachés par les vents ou volés). Comme pour les SPATs de l'étude 2011, l'analyse des échantillonneurs passifs installés à Rochambeau entre 0,5 et 1 mètre de profondeur, a montré qu'ils présentaient des concentrations en toxines trop faibles pour qu'on puisse mettre en évidence la présence de toxines dissoutes dans l'eau.

Concernant l'évaluation des niveaux de contamination des produits de la mer, divers organismes, vivant dans ces zones d'études, ont été récoltés : des saupes, des mulets, des castagnoles, des oursins et des faux murex. Aucun organisme récolté au Lido n'a été trouvé contaminé, que ce soit au niveau du tube digestif ou dans les restes des chairs. À Rochambeau, ni les mulets, ni les faux-murex ne contenaient de toxines d'*Ostreopsis*. En revanche, dans les oursins et les saupes, une accumulation d'ovatoxine-a a été mise en évidence par analyse chimique en CL-SM/SM. En effet, 9 oursins sur 10 et 6 saupes sur 21 étaient contaminés (voir caractéristiques des espèces contaminées en annexe 3). Les différences d'accumulations peuvent être expliquées par le mode d'alimentation des différents organismes. En effet, parmi les espèces récoltées, les mulets et les faux-murex sont des espèces carnivores, alors que les oursins et les saupes sont des herbivores. Ils se nourrissent de macroalgues sur lesquelles prolifèrent *Ostreopsis* cf. *ovata* [190].

Les OVTXs ont été exclusivement retrouvées dans les tubes digestifs des oursins et des saupes. C'est en accord avec ce qui est rapporté dans la littérature [14, 190]. Les niveaux d'accumulation chez l'oursin sont compris entre 103 et 423 µg.kg⁻¹ de chair totale, avec une moyenne de 223 µg.kg⁻¹ de chair totale, ce qui révèle une forte variabilité individuelle dans l'accumulation des OVTXs dans les oursins. Pour les saupes, une forte variabilité individuelle dans la contamination est également notée, les niveaux d'accumulation étant compris entre 33 et 152 µg.kg⁻¹ de chair totale. Ces niveaux de contamination sont en accord avec ceux précédemment rapportés dans la littérature, à la fois par CL-SM [14, 20] pour les oursins et par le test hémolytique pour les saupes [190]. Par ailleurs, étant donné la variabilité interindividuelle du niveau de contamination, il serait plus judicieux de pratiquer l'analyse des toxines à partir d'un mélange de 10 individus d'oursins permettant de disposer d'une évaluation représentative de la contamination.

Aussi, pour les deux campagnes de prélèvement 2011 et 2012, une dizaine d'oursins a été récoltée et extraite ensemble. On remarque, de façon logique, que plus la concentration cellulaire épiphyte d'*Ostreopsis cf. ovata* est élevée, plus l'accumulation des ovatoxines dans la chair totale des oursins est importante (Tableau 10).

Tableau 10. Comparaison de la contamination des oursins en fonction de la prolifération cellulaire. (LD = 25 µg/kg)

Site	Année de prélèvement	Concentration PLTXs-eq (µg/kg de chair totale)	Concentration cellulaire sur la macroalgue (cells/g ⁻¹ PF)
Rochambeau	2011	1870	2 600 000
Rochambeau	2012	280	275 000
Lido	2012	< LD	60 400

Plus les concentrations d'*Ostreopsis cf. ovata* sont importantes, plus le risque d'accumulation dans les produits de la mer est important, et donc plus le risque pour le consommateur est élevé. L'analyse chimique en CL-SM/SM permet d'identifier et de quantifier formellement les toxines d'*Ostreopsis cf. ovata* impliquées, mais ne donne pas d'informations sur l'activité biologique des composés recherchés. C'est pourquoi, en complément de l'analyse chimique, nous avons mis en place le test hémolytique, basé sur le mécanisme d'action des toxines du groupe palytoxine, afin de ; i) comparer les résultats issus des deux méthodes ; ii) évaluer l'activité hémolytique des ovatoxines par comparaison à celle de la palytoxine.

4. Mise en place du test hémolytique, en complément de l'analyse CL-SM/SM.

4.1. Principe du test

Ce test est basé sur la capacité de la palytoxine à interagir avec la pompe Na⁺/K⁺-ATPase des cellules et notamment des hématies, la transformant en canal cationique non spécifique. Ceci provoque un déséquilibre ionique dans les cellules, notamment les hématies ; les ions Na⁺ entrent alors massivement dans la cellule, provoquant leur lyse. En se lysant, l'hémoglobine des hématies est alors relarguée dans le milieu extracellulaire et sa concentration peut être mesurée par un spectrophotomètre. Cependant, d'autres composés présents dans les échantillons peuvent également avoir un effet hémolytique sur les cellules de sang, liés à d'autres mécanismes que l'interaction avec la pompe Na⁺/K⁺-ATPase. C'est ce qu'on appelle l'effet matrice ou « lyse non

spécifique ». Pour s'affranchir de ces effets, les manipulations sont menées à la fois avec des solutions d'hématies (sang-PBS) et avec des solutions d'hématies prétraitées avec de la ouabaine (sang-ouabaine). La ouabaine est elle aussi capable d'interagir avec la pompe Na^+/K^+ -ATPase de certaines cellules et les bloquer, empêchant alors l'action de la PLTX, sans inhiber la lyse liée à la matrice. La comparaison des résultats de ces deux essais va permettre de mesurer l'action spécifique de la palytoxine, ou d'autres composés agissant sur la pompe Na^+/K^+ -ATPase sur les hématies. Cette expérience ne peut être réalisée que dans la mesure où l'ouabaine bloque effectivement les cellules choisies. C'est pour cette raison que des hématies de mouton ont été sélectionnées pour ce test, bien que les érythrocytes de souris soient bien plus sensibles à la PLTX [190]. En effet, dans la littérature, il est indiqué que les hématies de souris sont insensibles à la ouabaine, rendant difficile l'évaluation de la lyse non spécifique [211]. Les p-PLTX-OVXs contenues dans des échantillons peuvent être quantifiées à l'aide d'une gamme étalon de PLTX, la lyse des hématies est liée à la concentration en PLTX et au temps d'incubation, la courbe obtenue ayant la forme d'une sigmoïde. Un témoin positif est réalisé avec la solution de saponine, un tensioactif qui lyse totalement les cellules. Un témoin négatif, est réalisé avec la solution tampon (PBS), utilisée pour diluer les échantillons et les hématies. Le principe de fonctionnement du test est le suivant :

- Préparation des gammes et des échantillons dans du PBS
- Lavage du sang
- Préparation du sang-PBS et sang-Ouabaine à 0,5 % (concentration en hématies à environ 10^7 cellule.mL⁻¹)
- Pré-incubation du sang-ouabaine 1 h à 37°C
- Incubation des solutions d'hématies (sang-PBS et sang-ouabaine) avec les échantillons pendant 4 h à 37°C
- Centrifugation et transfert du surnageant dans une microplaque 96 puits
- Analyse en UV-visible à 415 nm pour doser l'hémoglobine relarguée

Dans un premier temps, nous avons cherché à optimiser les différentes étapes de ce test hémolytique pour qu'il puisse être pratiqué sur des matrices biologiques complexes, pouvant être à l'origine d'effet matrice. Une fois optimisé (protocole en chapitre 2-6), le test a ensuite été appliqué sur divers échantillons de terrain (phytoplancton, produits de la mer) ayant fait l'objet d'analyses chimiques par CL-SM/SM. Une étude de comparaison a également été menée entre les résultats des deux méthodes, en vue d'étudier la faisabilité d'utiliser le test hémolytique comme un test alternatif à l'analyse chimique.

4.2. Optimisation du test hémolytique

4.2.1. Détermination du temps d'incubation optimal

Dans la littérature, différents protocoles, réalisés à partir du sang de mouton, ont été décrits pour les tests hémolytiques et ne diffèrent principalement que par le temps d'incubation entre les hématies et les échantillons (4 ou 20 h) [188, 189].

Pour fixer le temps d'incubation le plus adéquat pour notre étude, des gammes d'étalonnages de PLTX ont été préparées ; deux dans une solution de sang-PBS et deux autres dans une solution de sang-ouabaïne. Ces solutions ont été incubées pendant 4 et 20 h (Figure 48).

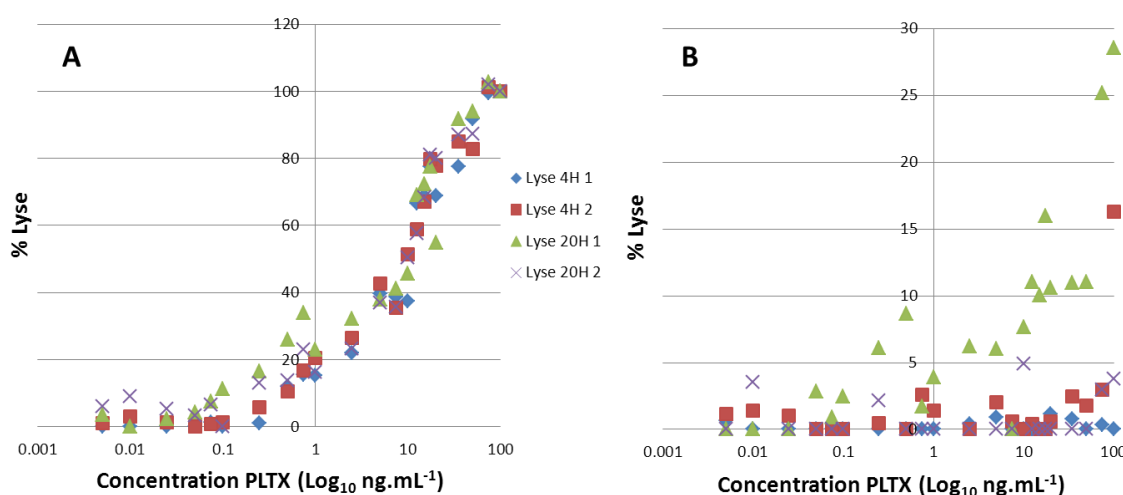


Figure 48. Pourcentage de lyse en fonction de la concentration en PLTX en fonction du temps d'incubation : temps d'incubation de 4 ou 20 h : A : dans du sang-PBS; B: dans du sang-ouabaïne

Avec du sang-PBS, le pourcentage de lyse des hématies reste le même, que le temps d'incubation soit de 4 h ou 20 h (Figure 48-A). Ces résultats nous ont permis de fixer le temps d'incubation à 4h pour une température de 37°C, puisque ce temps d'incubation permet d'avoir un temps d'analyse plus court. De plus, pour un temps d'incubation de 20 h, le risque d'observer la lyse retardée des hématies est plus important (Figure 48-B). En effet, la ouabaïne n'empêche pas la PLTX d'agir mais elle retarde son action, en conséquence, au bout de 20 h, le risque d'observer cet effet est beaucoup plus grand. Néanmoins, si le temps d'incubation de 4 h est dépassé, les conséquences sur les résultats obtenus seront minimales.

4.2.2. Détermination de la longueur d'onde de lecture

Le suivi de la lyse des hématies est assuré par la mesure de l'absorbance à 415 nm, ce qui permet de suivre l'hémoglobine relarguée dans le milieu extracellulaire. En effet, l'hémoglobine est une

protéine qui absorbe dans l'UV-visible. Cependant, elle a tendance à s'oxyder dans le milieu extracellulaire au cours du temps, changeant ainsi la longueur d'onde de son maximum d'absorption. Pour fixer la longueur d'onde optimale, et s'assurer qu'elle ne change pas au cours du temps de l'analyse, un balayage de longueur d'ondes entre 200 et 800 nm a été réalisé sur du sang totalement lysé. Plusieurs échantillons de sang lysé ont été analysés, à 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h. À chaque temps de la cinétique, l'échantillon est centrifugé à 800 g pendant 8 minutes, le surnageant est ensuite transféré dans une microplaque de 96 puits et analysé entre 200 et 800 nm. Le maximum d'absorption a été suivi dans le temps et fixé pour les analyses ultérieures. Le maximum d'absorption reste à 415 nm de 30 min à 4 h. Pendant ce laps de temps, aucun changement du spectre d'absorption n'est observé. La longueur d'onde d'analyse a donc été fixée à 415 nm.

4.2.3. Études supplémentaires

Différentes plages de **concentration de l'étalon PLTX** ont été testées, selon le protocole choisi, et ajustées afin d'obtenir une courbe sigmoïde complète, pour laquelle le pourcentage d'hématies lysées varie entre 0 et 100 % (Figure 49). La plage de concentration pour la préparation de la gamme de PLTX a finalement été fixée entre 0,06 et 500 ng.mL⁻¹. La partie linéaire de la courbe du pourcentage de lyse en fonction du logarithme de la concentration en PLTX étant alors comprise entre 1 et 125 ng.mL⁻¹, ce qui correspond à un pourcentage de lyse spécifique compris entre 3 et 87 %.

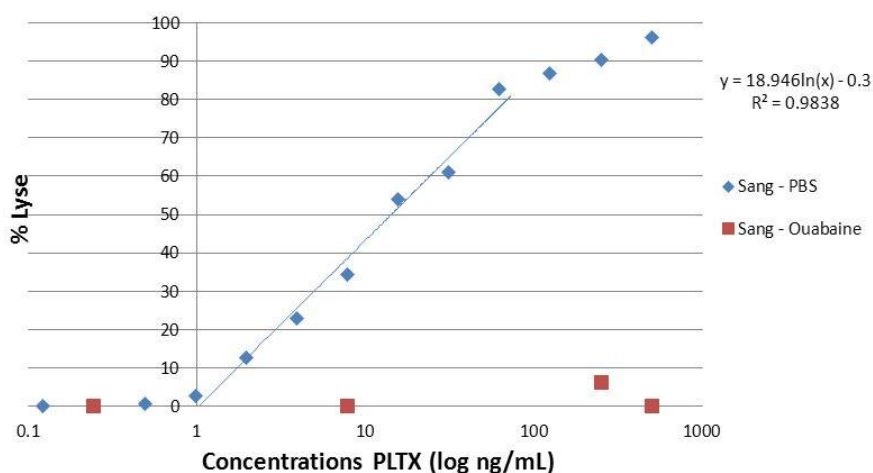


Figure 49. Courbe d'étalonnage de PLTX dans le sang-PBS et sang-ouabaine.

L'**absorbance de la microplaque** a été mesurée à vide à 415 nm dans le but de vérifier si celle-ci participe à l'absorbance de l'échantillon. La moyenne d'absorbance mesurée sur toute la plaque était de 0,1018 UA avec un faible coefficient de variation (0,86 %). Cette faible

absorbance indique que la microplaque n'absorbe que faiblement à cette longueur d'onde. Cependant, son absorbance doit être retranchée des absorbances des différentes solutions analysées.

Des **points de gammes d'étalonnage** de PLTX, préparés la veille dans du PBS, ont été analysés le jour d'après, afin de vérifier si les gammes d'étalonnage peuvent être préparées du jour pour le lendemain. Ces échantillons ont présenté un pourcentage de lyse plus faible que pour des échantillons frais. Tous les échantillons ont donc été préparés le jour J.

4.3. Évaluation des effets matrices

4.3.1. Évaluation des effets du solvant de dilution

Tous les échantillons analysés par le test hémolytique sont principalement des extraits d'organismes marins ou de phytoplancton. Ces matrices ont été extraites par différents solvants qui pourraient présenter un effet hémolytique, principalement des mélanges MeOH/H₂O 1/1 (v/v) et MeOH/H₂O 9/1 (v/v).

Pour vérifier que la présence de ces solvants dans les échantillons n'influe pas sur les résultats obtenus, ceux-ci ont été mis en présence de sang, comme un échantillon classique, selon le protocole établi. De l'eau et du méthanol purs, ainsi qu'une solution de PBS ont également été mis en présence de sang, pour vérifier l'influence de chaque solvant sur les résultats des tests hémolytiques. Les différents mélanges de solvants analysés sont :

- H₂O 100 %
- MeOH/H₂O 1/9 (v/v)
- MeOH/H₂O 1/1 (v/v)
- MeOH/H₂O 9/1 (v/v)
- MeOH 100 %
- PBS

Les résultats sont présentés en pourcentage de lyse (Figure 50).

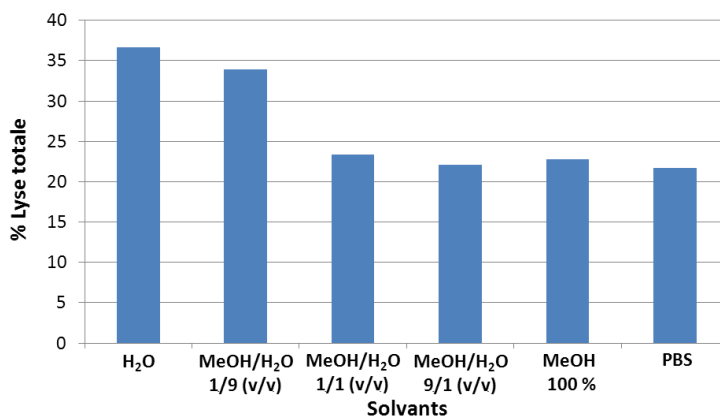


Figure 50. Pourcentage de lyse des hématies en fonction de la nature du solvant mis en présence de sang.

Les résultats montrent, sans surprise, que l'eau 100% ainsi que les mélanges majoritairement aqueux (MeOH/H₂O 1/9 (v/v)) sont les plus hémolytiques, provoquant environ 35 % de lyse. En effet, l'eau perturbe l'isotonie des cellules, qui ont alors tendance à se lyser. En revanche, les solvants avec une majorité de MeOH sont beaucoup moins nocifs pour les hématies, provoquant environ 22 % de lyse. Ces solvants ont été analysés comme s'ils s'agissaient « d'échantillons ». Or, rappelons que lors du test hémolytique, les échantillons de matrice biologique sont dilués au moins par 10 dans du PBS, ce qui diminue largement les effets observés avec les solvants testés. Par conséquent, les solvants utilisés pour la préparation des extraits des échantillons biologiques (MeOH/H₂O 1/1 (v/v) et MeOH/H₂O 9/1 (v/v)) peuvent donc être considérés comme ne participant pratiquement pas à la lyse des hématies et ne conduisent donc pas à des faux positifs.

Dans le cadre de ces travaux, le test hémolytique a été optimisé principalement pour évaluer le pouvoir hémolytique des ovatoxines, dont les étalons ne sont pas disponibles, par rapport à celui de la palytoxine. De plus, ce test pourrait être utilisé en routine pour évaluer l'accumulation de toxines du groupe des p-PLTX et OVTXs dans les produits de la mer, lors des efflorescences d'*Ostreopsis*, et pourrait donc représenter un test de screening dans le cadre de la surveillance de ces toxines. C'est pourquoi, les effets matrices dus aux échantillons biologiques doivent être évalués. Différents échantillons de matrice, préalablement analysés en CL-SM/SM pour vérifier l'absence de toxines, ont donc été analysés par le test hémolytique.

4.3.2. Effets matrices d'oursins dopés et non dopés.

La première matrice à avoir été analysée est le tube digestif d'oursins, qui concentre la totalité des toxines d'*Ostreopsis cf. ovata* [14, 15]. En effet, en Méditerranée, cet organisme, considéré comme une espèce sentinelle, est utilisé pour le suivi des p-PLTX-OVTXs dans les produits de

la mer, lors des proliférations estivales d'*Ostreopsis cf. ovata*. L'évaluation de l'effet matrice a été réalisée à partir d'un extrait de tube digestif d'oursin non contaminé, à trois dilutions différentes dans le PBS (1/5^e, 1/10^e, 1/20^e) et à trois concentrations de dopage d'étalon de PLTX différentes (25, 75 et 250 µg/kg). Ces concentrations ont été choisies car, d'après les essais préliminaires, elles correspondent à un pourcentage de lyse de 15 %, 50 % et 75 % respectivement, couvrant ainsi la gamme d'étalonnage, dans la partie linéaire. Les résultats de cette première investigation sont exprimés en pourcentage de lyse (Tableau 11). La quantification des échantillons a été réalisée à partir de l'équation de la partie linéaire de l'étalonnage de PLTX, qui possède un R² de 0,978.

Tableau 11. Pourcentage de lyse et concentration trouvées par le test hémolytique dans des extraits de tubes digestifs d'oursins, dilués et dopés. (* problème avec cet échantillon).

Dopage	Facteur de dilution de l'extrait de TD	Pourcentages de lyse		Concentration PLTX-eq (µg/kg)
		Sang-PBS	Sang Ouabaïne	
0 µg/kg	/ 5	13	13	0
	/ 10	5	0	0
	/ 20	3	0	0
25 µg/kg	/ 5	15	11	3,5
	/ 10	13	3	4,5
	/ 20	28	5	9
75 µg/kg	/ 5	36	24	5
	/ 10	34	15	7,5
	/ 20	64	13	39
250 µg/kg	/ 5	50	25	10
	/ 10	*	*	*
	/ 20	75	10	80

Les pourcentages de lyse des échantillons non dopés, ainsi que les échantillons incubés dans le sang-ouabaïne, nous informent que le tube digestif d'oursins induit des pourcentages de lyse faibles, laissant présager un faible effet matrice. En effet, toutes ces lyses sont supérieures à 0 % mais inférieures à 25 %. Les concentrations calculées par l'équation de la droite d'étalonnage sont significativement différentes du dopage appliqué au départ. De plus, on remarque que, plus l'échantillon est dilué, plus la concentration augmente (sans atteindre le niveau de dopage), ce qui suppose que la matrice empêche la PLTX d'agir. En effet, en diluant les échantillons d'extraits de TD, l'effet matrice diminue et la PLTX pourrait alors agir sur les hématies. Par ailleurs, les résultats montrent que la gamme de dilution n'était donc pas assez importante,

puisque l'on ne retrouve jamais les pourcentages de lyse escomptés, même avec les plus grandes dilutions. On peut également remarquer que plus le dopage est important, et plus la lyse provoquée est importante, ce qui montre que le test est potentiellement spécifique. D'autres essais ont donc été réalisés en augmentant la plage de dilution.

4.3.3. Effets matrices de tous les organismes récoltés à Villefranche-sur-Mer

Afin de fixer la plage de dilution qu'il sera nécessaire d'effectuer pour pouvoir détecter les p-PLTX-OVTXs dans les organismes marins, les échantillons des extraits ont été dilués par 10, 20, 40, 80 et 160, et analysés par le test hémolytique. Afin de comparer les effets matrices, ces essais ont été réalisés sur des extraits de poissons et de gastéropodes. Tous ces échantillons ont été analysés et identifiés comme non contaminés par CL-SM/SM. Les analyses ont été effectuées en double, la moitié des échantillons a été dopée à 75 µg/kg, correspondant à environ 50 % de lyse, et l'autre moitié n'a pas été dopée. Les organismes testés sont un faux murex et des poissons (saupe, mullet, castagnole). Les tubes digestifs (TD) et les restes de la chair (RC) ont été disséqués et analysés séparément (Figure 51). Par manque de sang, l'échantillon d'extrait d'oursins n'a pas pu être analysé. Les résultats de cette expérience sont exprimés en pourcentage de lyse et en concentration de PLTX, calculée à partir de la courbe d'étalonnage.

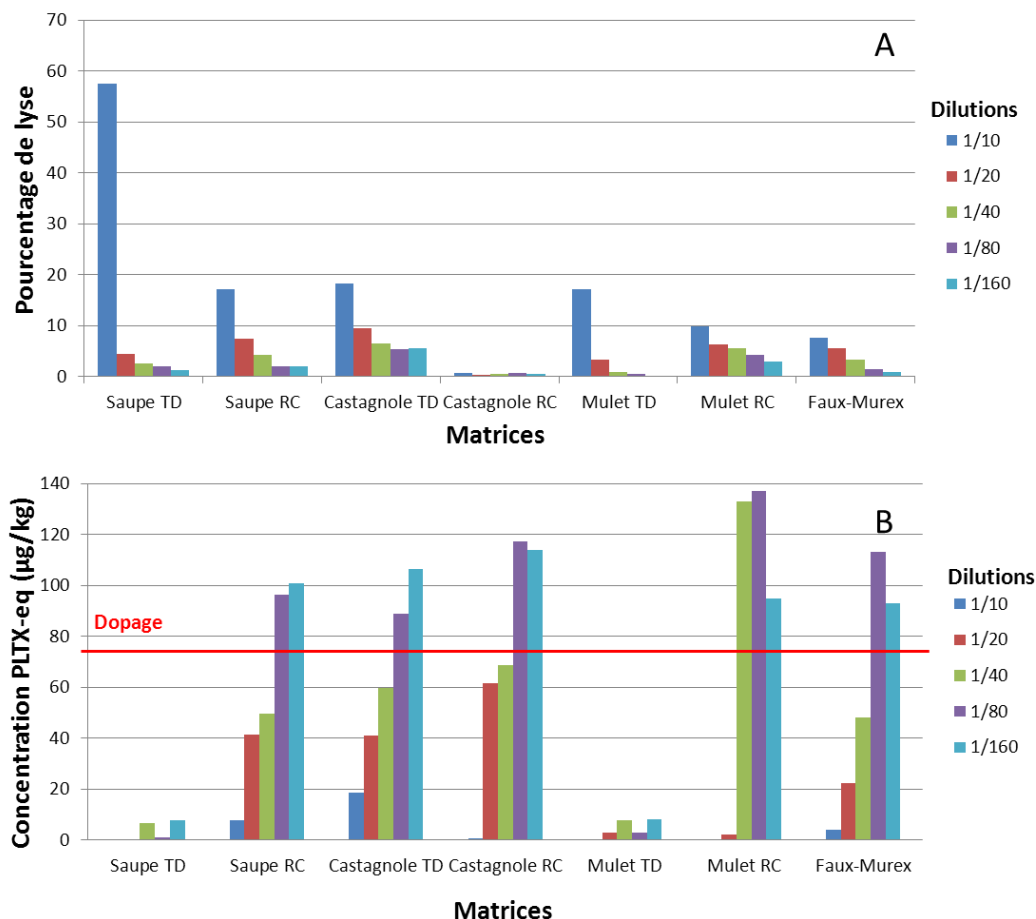


Figure 51. Analyse par le test hémolytique d'extraits de tubes digestifs (TD) et du reste des chairs (RC) de saupe, de mullet, de castagnole, ainsi qu'un faux murex, sur des extraits dilués par 10, 20, 40, 80 et 160 et dopés avec de la PLTX (75 µg/kg). A : Pourcentage de lyse (PBS) B : concentration en estimée PLTXs.

En analysant le graphique de la Figure 51-A, qui représente les pourcentages de lyse (sang-PBS) des matrices non contaminées, on voit qu'une dilution supérieure à $1/10^{\circ}$ suffit pour éliminer la lyse liée à la matrice. En revanche, à partir la Figure 51-B, on constate qu'il faut diluer au moins au $1/40^{\circ}$ pour obtenir des résultats proches de concentration en PLTX des dopages effectués.

Cependant, il faut remarquer que pour les tubes digestifs de saupe et des mullets, la lyse induite dans le sang-ouabaïne est très supérieure à la lyse dans le sang-PBS, quelle que soit la dilution, suggérant des interférences d'une nature inconnue entre les tubes digestifs de ces espèces et l'ouabaïne.

Excepté pour les tubes digestifs de saupes et de mullet, une dilution au $1/40^{\circ}$ des échantillons à analyser permet d'obtenir des résultats de concentrations du même ordre de grandeur que l'analyse par CL-SM/SM.

4.4. Niveaux de contamination des produits de la mer déterminés par le test hémolytique

Quelques échantillons ont été analysés par le test hémolytique pour permettre la comparaison directe avec l'analyse par CL-SM/SM. Parmi les organismes contaminés naturellement par les toxines d'*Ostreopsis cf. ovata*, quelques spécimens d'oursins et de saupes, à la fois leur tube digestif et les restes des chairs, ont été étudiés. En effet, ce sont les seules espèces qui ont été contaminées pendant les blooms d'*Ostreopsis cf. ovata* de 2012.

4.4.1. Matrices poissons : saupes

Les échantillons de saupes sont des extraits de tubes digestifs contaminés (TD n°1 ; 490 µg/kg, n°2 ; 305 µg/kg, n°3 ; 130 µg/kg), les extraits des restes des chairs des mêmes individus (RC n°1, n°2 et n°3), ainsi que deux extraits de tubes digestifs non contaminés (TD n°4, n°5). Les résultats sont donnés en concentration de toxines déterminés par le test hémolytique et comparés à ceux trouvés par l'analyse CL-SM/SM.

En accord avec l'analyse CL-SM/SM, les restes des chairs de poissons n'ont pas été trouvés contaminés par le test hémolytique. Concernant les tubes digestifs, l'effet matrice avec le sang-ouabaïne, précédemment évoqué, n'a pas permis de quantifier les toxines.

4.4.2. Matrice coquillages : oursins

En se basant sur les résultats d'analyse chimique en CL-SM/SM, les échantillons d'oursins testés sont des extraits de tubes digestifs contaminés (TD n°1 ; 112 ng.mL⁻¹, n°2 ; 78 ng.mL⁻¹, n°3 ; 54 ng.mL⁻¹), des extraits de gonades des mêmes animaux (G n°1, n°2 et n°3), ainsi que deux extraits de tubes digestifs trouvés non contaminés (TD n°4, n°5). Ces échantillons ont été analysés par le test hémolytique et les résultats sont présentés en Figure 52. Pour des raisons pratiques, les résultats sont exprimés en µg dans 0,2 g de chair d'oursins.

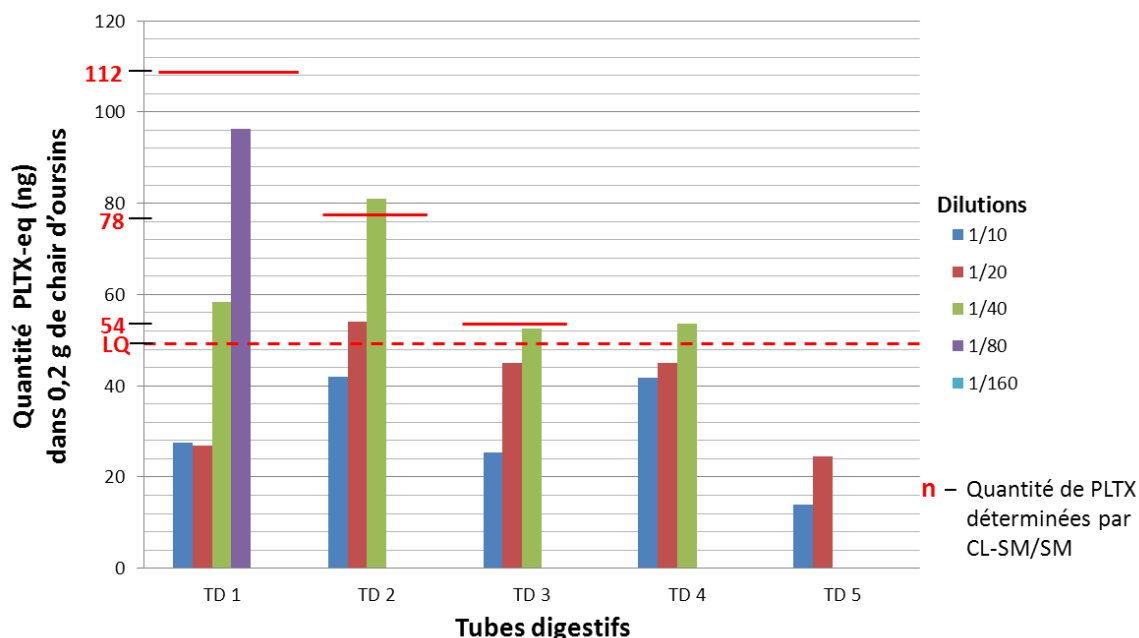


Figure 52. Analyse des tubes digestifs d'oursins (1 à 5) par le test hémolytique. Les traits en rouge sont les résultats des analyses des mêmes échantillons réalisées par CL-SM/SM. La limite en pointillé est la limite de quantification en CL-SM/SM.

Tout d'abord, les **gonades** analysées ne sont pas détectées comme contaminées (0% de lyse spécifique), à l'instar de l'analyse par CL-SM/SM. Elles ne présentent pas non plus d'effets matrice évidents (pas de lyse en présence de ouabaine pour des dilutions supérieures au $1/10^e$). Les résultats les concernant ne sont donc pas représentés.

Pour les **tubes digestifs**, les effets matrices se font sentir à une dilution au $1/10^e$, parfois au $1/20^e$. À partir d'une dilution au $1/40^e$, les effets matrice s'atténuent. Il faut remarquer que, comme lors de l'analyse des effets matrice, la dilution qui permet d'obtenir des résultats proches de la CL-SM/SM est d'autant plus importante que la concentration en PLTX dans les échantillons augmente. En effet, pour le TD n°1, il faut diluer au $1/80^e$ pour quantifier les échantillons, alors qu'il suffit de diluer au $1/40^e$ pour les tubes digestifs n°2 et 3.

Pour certains échantillons contaminés (TD n°1, 2 et 3), les valeurs obtenues par le test hémolytique sont très proches des valeurs obtenues en CL-SM/SM. La quantification des p-PLTX-OVTXs est donc possible dans des échantillons naturels par le test hémolytique. Une plage de dilution allant de $1/10^e$ à $1/160^e$ est néanmoins nécessaire pour l'analyse d'échantillons dont la concentration en toxine est inconnue.

Pour les TD n°4 et TD n°5, les résultats de lyse montreraient la présence de PLTX dans ces échantillons, alors qu'on se trouve en dessous de la limite de quantification en CL-SM/SM ($25 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$), ce qui permet de montrer le potentiel en terme de sensibilité du test hémolytique par

rapport à l'analyse chimique. Cependant, bien que le test hémolytique soit plus sensible que la CL-SM/SM, l'obligation de diluer les échantillons au moins par 40 pour pouvoir les quantifier correctement, diminue la limite de quantification du test hémolytique, ce qui le ramène à un niveau de quantification proche de la CL-SM/SM ($20 \mu\text{g.kg}^{-1}$). Ce test peut donc être utilisé en routine comme un test de screening d'échantillons, sans la complexité technique d'un spectromètre de masse. Les échantillons positifs peuvent alors faire l'objet d'une analyse de confirmation par CL-SM/SM pour identifier formellement et quantifier les p-PLTX-OVTVs en cause.

Sachant que les OVTVs représentent 90% du profil toxique des échantillons biologiques (phytoplancton, produits de la mer), les résultats positifs de ces échantillons sur test hémolytique suggèrent que les OVTVs présentent aussi un pouvoir hémolytique comme la PLTX, comme déjà évoqué dans la littérature [142]. Comme les structures chimiques de la PLTX et des OVTVs sont très voisines, il est fort probable que l'ovatoxine présente le même mécanisme d'action de celui de la PLTX : inhibition de la pompe sodium/ potassium (Na^+/K^+ -ATPase), responsable du maintien des gradients ioniques pour le bon fonctionnement des cellules (cellules nerveuses, cardiaques et musculaires). Cependant, la confirmation des effets biologiques des OVTVs nécessite de disposer de matériaux de référence d'ovatoxine (étalon non disponible) pour réaliser des études toxicologiques.

5. Conclusion

Les études terrain montrent qu'*Ostreopsis cf. ovata* prolifère régulièrement dans les eaux côtières françaises méditerranéennes, parfois à de fortes concentrations cellulaires. Ces cellules sont capables de produire des toxines jusqu'à 5 mètres de profondeur, bien que la production toxinique diminue avec la profondeur. Les sites où les proliférations cellulaires sont les moins abondantes, du fait de l'agitation de l'eau de surface, sont malgré tout potentiellement dangereux, puisque les cellules présentes dans ces lieux produisent plus de toxines. Par ailleurs, la présence de fortes abondances de cellules planctoniques d'*Ostreopsis cf. ovata* représente un risque pour les baigneurs car une intoxication est possible par inhalation, alors que de fortes abondances de cellules épiphytes représente un risque d'intoxication par contact [16].

Plus les concentrations d'*Ostreopsis cf. ovata* sont importantes, plus le risque d'accumulation dans les produits de la mer est important. Les organismes principalement touchés sont les espèces herbivores (oursins, saupes) qui broutent directement sur la macroalgue où prolifèrent les

cellules d'*Ostreopsis*. Malgré l'absence de régulation officielle au niveau des autorités européennes, l'autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) recommande une limite de 30 µg/kg d'équivalent PLTX de produits de la mer. Si on considère que les OVTXs sont aussi toxiques que la PLTX, cette limite est largement atteinte dans les échantillons prélevés en 2011 et 2012, notamment dans les échantillons d'oursins. Rappelons que la pêche aux oursins n'est pas autorisée durant les périodes estivales en Méditerranée (ouverture administrative de la pêche de novembre à mars). Cependant, le risque reste réel concernant la pêche sauvage.

Le test hémolytique peut être un outil de dépistage pour estimer l'accumulation des p-PLTX-OVTXs dans les produits de la mer, en particulier les oursins, dans le cadre de leur suivi estival en Méditerranée. Cependant, l'obligation de diluer les échantillons au moins par un facteur 40 entraîne une perte de sensibilité, conduisant à une limite de quantification des toxines proche de celle de la CL-SM/SM. Une confirmation de l'identité des composés responsable de la lyse observée doit cependant passer par une analyse chimique par CL-SM/SM, sur les échantillons révélés positifs par le test hémolytique.

La prolifération des cellules d'*Ostreopsis cf. ovata* représente un risque potentiel pour les baigneurs et les pêcheurs. À cause du manque d'étalons d'OVTXs purs, la toxicité de chaque toxine n'est pas connue et une réglementation les concernant ne peut pas être établie. L'obtention de toxines purifiées est donc nécessaire. La purification à partir des cellules d'*Ostreopsis cf. ovata* est plus simple à réaliser plutôt qu'à partir d'organismes contaminés. Pour cette raison, des cellules d'*Ostreopsis cf. ovata* ont été isolées et cultivées en laboratoire pour pouvoir obtenir des toxines purifiées.

Chapitre 4 – Cinétiques de croissance et de production de toxines au laboratoire

Rappelons que l'un des objectifs de la thèse est la purification des ovatoxines à partir d'extraits d'*Ostreopsis cf. ovata* en culture au laboratoire. Afin de disposer de grands volumes de cultures, il a fallu dans un premier temps maîtriser les conditions de culture pour cette espèce benthique, telles que la luminosité, la température, le milieu de culture... Dans la littérature, la croissance de cette microalgue est décrite dans certaines conditions de luminosité ($100 - 650 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) [138], de température (14 à 32°C) [212], de salinité (36-40 psu) [146]. Des études, réalisées auparavant au laboratoire, avaient permis de mettre en place la culture d'*Ostreopsis cf. ovata*, dans des conditions caractérisées par une forte irradiance ($420 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), une température de 22°C, une salinité de 38 psu, et l'utilisation du milieu de culture L1 + extrait de terre [140].

Par ailleurs, puisqu'il s'agit de cellules épiphytes, le choix des flacons de cultures semble important dans le cas d'*Ostreopsis* pour maintenir les souches au laboratoire. C'est pourquoi, les cellules d'*Ostreopsis cf. ovata* ont été mises en culture dans des boîtes de culture brevetées « Corning cell bind ». Le polymère de ces flacons a été traité afin d'augmenter la teneur en oxygène à l'interface entre les parois et le milieu de culture, ce qui améliore l'hydrophilicité et la mouillabilité, et favorisant ainsi l'adhésion cellulaire [140].

1. Description des souches d'*Ostreopsis cf. ovata* suivies

Les espèces cultivées au laboratoire sont des souches d'*Ostreopsis cf. ovata*, provenant du littoral Méditerranéen. Au début de cette thèse, six souches étaient cultivées au laboratoire, deux isolées à Morgiret (Iles du Frioul, au large de Marseille), deux isolées dans la baie de Villefranche-sur-Mer, une originaire du sud de l'Italie et une autre des Baléares, en Espagne, donnée gracieusement au laboratoire par Le Dr. Maria Grazia Giacobbe de l'Istituto per l'Ambiente Marino Costiero, du CNR de Messine (Tableau 12 ; Figure 53).

En plus de ces souches, lors des campagnes de prélèvement, effectuées durant des études terrain, deux autres souches ont été isolées (Tableau 12 ; Figure 53). La première en 2011 sur la plage de Rochambeau à Villefranche-sur-Mer. Elle a été nommée OST-IFR-0.3 V. La deuxième a été isolée en 2012 à Monaco, et a été appelée OST-IFR-0.1 Mo. Les cellules d'*Ostreopsis* ont été isolées du milieu naturel par la méthode de pipette capillaire [213] à partir des cellules présentes sur les macroalgues *Stypocaulon sp.* et *Acetybularia sp.* Après une croissance initiale en microplaques de 24 puits, le volume de culture a été augmenté progressivement, d'abord en microplaque de 6 puits, puis en boîte de culture « Corning cell bind » de 10 mL, puis de 50 mL, 175 mL et/ou 350 mL. Les cellules ont été maintenues en laboratoire dans les conditions de

culture préalablement définies (irradiance de $420 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, une température de 22°C , une salinité de 38 psu, et l'utilisation du milieu L1 + extrait de terre [140]). Tout au long de leur culture, le suivi des concentrations cellulaires et toxiques a été réalisé.

Tableau 12. Description des souches cultivées au laboratoire Phyc.

Souche	Provenance			Année d'isolement
	Plage	Pays	Localisation	
IFR-OST-0.1 M	Îles du Frioul (Calanque de Morgiret)	France	43° 16' 56" N / 05° 18' 15" E	2008
IFR-OST -0.2 M	Îles du Frioul (Calanque de Morgiret)	France	43° 16' 56" N / 05° 18' 15" E	2009
IFR-OST-0.1 V	Rochambeau (Villefranche-sur-Mer)	France	43° 41' 32" N / 07° 18' 20" E	2008
IFR-OST -0.2 V	Marinières (Villefranche-sur-Mer)	France	43° 42' 09" N / 07° 18' 12" E	2009
IFR-OST-0.3 V	Rochambeau (Villefranche-sur-Mer)	France	43° 41' 32" N / 07° 18' 20" E	2011
IFR-OST -0.1 Mo	Larvotto (Monaco)	Monaco	43° 44' 44" N / 07° 26' 04" E	2012
CNR-OST- Z1	Paguera (Îles Baléares)	Espagne	41° 51' 30" N / 03° 08' 48" E	2001
CNR-OST- A1	Gioia Tauro (Mer tyrrhénienne)	Italie	38° 26' 03" N / 15° 53' 09" E	2000



Figure 53. Localisation des isolats des cellules d'*Ostreopsis cf. ovata* (<https://www.google.fr/maps/>).

2. Identification taxonomique des souches isolées par analyse génétique moléculaire

Les souches d'*Ostreopsis* cultivées au laboratoire ont été identifiées par des analyses de génétique moléculaire, effectués par Dr Nicolas Chomérat, de l'Ifremer de Concarneau, et ont été comparées aux autres souches décrites dans le monde et insérés dans un arbre phylogénétique (Figure 54).

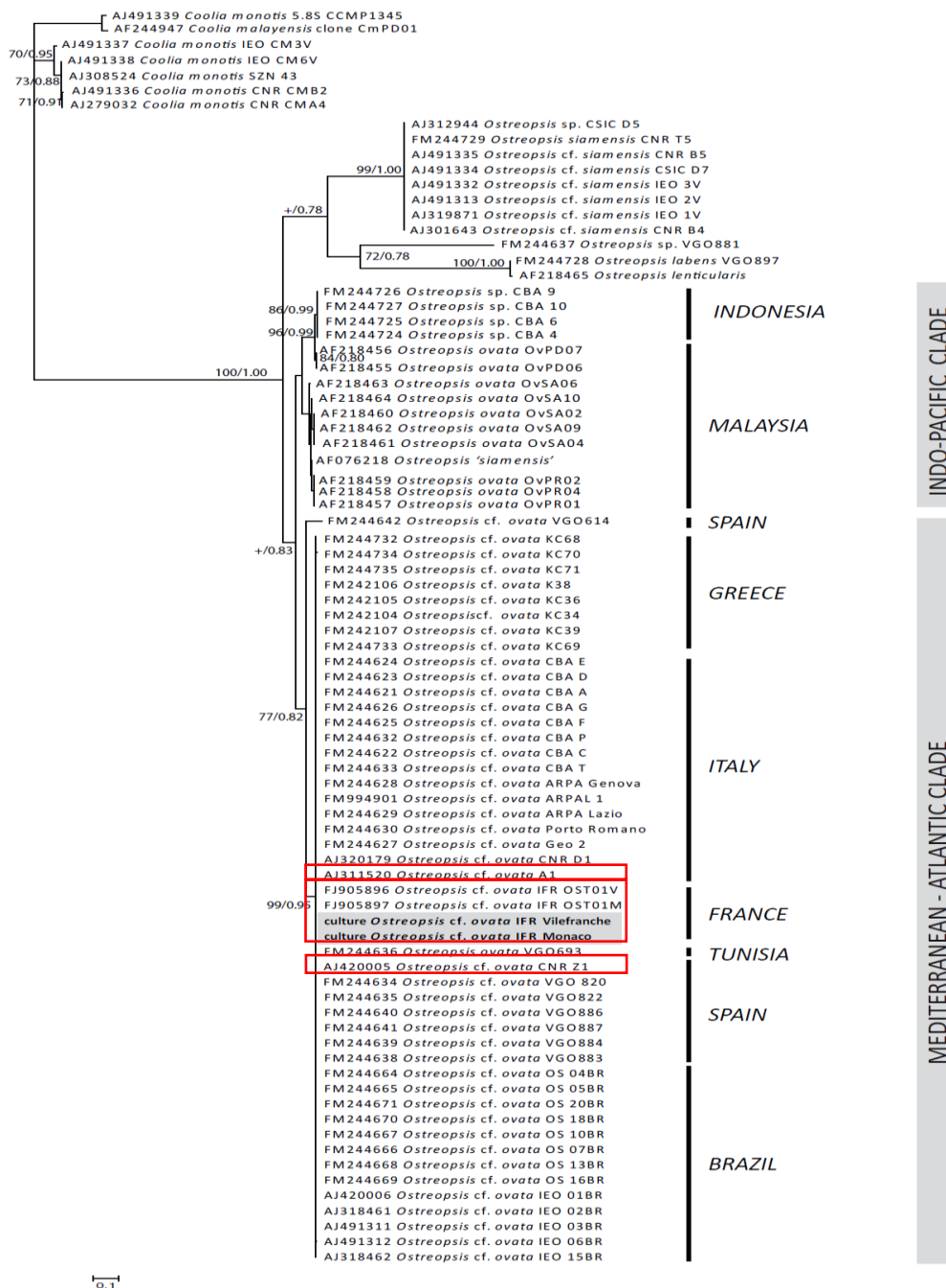


Figure 54. Arbre phylogénétique des souches d'*Ostreopsis cf. ovata*. Les souches cultivées au laboratoire sont encadrées en rouge.

Les analyses de génétique moléculaire utilisées ont été réalisées en utilisant les amorces de la région ITS-5,8S-ITS2 et du LSU partiel (D1-D3), qui ont déjà été utilisés pour l'identification génétique d'*Ostreopsis cf. ovata* dans la littérature [11]. Les séquences obtenues pour les souches de Monaco, IFR-OST-0.1 Mo (Genbank #KJ239219), et de Villefranche-sur-Mer, IFR-OST-0.3 V (Genbank #KJ239220), sont composés de 1272 paires de base et sont 100% identiques.

Dans l'arbre phylogénétique conçu par ITS-5,8S-ITS2, les séquences se regroupent avec les séquences d'autres *Ostreopsis cf. ovata* de France et de diverses régions de la Mer Méditerranée, spécifiquement d'Espagne et d'Italie, et de l'Océan Atlantique. Ils sont, en revanche, génétiquement différents du groupe Asiatique. Au moment de la première caractérisation moléculaire d'*Ostreopsis cf. ovata*, aucune donnée génétique de souches d'*Ostreopsis ovata* d'Asie n'était disponible, alors que c'est dans ces régions qu'elles ont été identifiées pour la première fois. Pour cette raison, les souches de Méditerranée sont désignées comme *Ostreopsis confer (cf.) ovata*.

3. Optimisation des conditions de culture

L'objectif principal de la culture d'*Ostreopsis cf. ovata* au laboratoire, dans le cadre de cette thèse, était avant tout d'obtenir de grandes quantités de biomasse, afin de récolter de grandes quantités de toxines, à des fins de purification. Les premières hypothèses qui ont été formulées et étudiées, étaient que de changer le milieu de culture permettrait de favoriser la production de biomasse et de toxines par rapport au milieu L1 + extrait de terre, classiquement utilisé au laboratoire.

3.1. Choix du milieu d'enrichissement

Afin de tester l'influence du milieu de culture, l'enrichissement de l'eau de mer a été réalisé soit par du milieu L1, soit par du milieu K (voir composition en annexe n°4). Les différences principales sont que l'enrichissement L1 a été créé pour la culture des algues côtières marines, tandis que l'enrichissement K convient plutôt au phytoplancton marin océanique, mais surtout qu'il y a 10 fois plus d'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) dans le milieu K que dans le milieu L1, ce qui permet de complexer les éléments traces ajoutés et de les relarguer régulièrement dans le temps. De plus, la nature du composé qui apporte le phosphore diffère entre les deux milieux (minérale ou organique) : NaH_2PO_4 pour le milieu L1 et du glycérophosphate ($\text{C}_3\text{H}_5(\text{OH})\text{PO}_4\text{Na}_2$) pour le milieu K. De plus, en accord avec la littérature, la

source de silice peut être supprimée de ces deux milieux car *Ostreopsis cf. ovata* n'utilise pas cet élément pour la formation de sa thèque [214].

Plusieurs boîtes de culture « Corning cell bind » de 175 mL ont étéensemencées à partir de la même souche de Villefranche-sur-Mer (IFR-OST-0.1 V) dans différents milieux de culture : milieux enrichis avec L1 ou K, avec ou sans extrait de terre, ainsi que pour différentes concentrations d'enrichissement (Tableau 13). En effet, certains auteurs diluent l'enrichissement apporté au milieu [151, 207].

Tableau 13. Enrichissements ajoutés au milieu de culture.

Enrichissements	
L1	K
L1 + extrait de terre	K + extrait de terre
[L1 + extrait de terre] /10	[K + extrait de terre] /10

Au bout de 17 jours, lorsque la culture se trouve en phase stationnaire, chaque culture a été récoltée, afin de mesurer la concentration cellulaire et toxinique. Au moment de cette expérience, seules les p-PLTX et OVTX-a étaient recherchées et quantifiées en CL-SM/SM. Lors des repiquages, bien que la souche d'origine ait été la même, les concentrations cellulaires de départ, dans chaque milieu testé, ont été quelles que peu différentes. C'est pourquoi les résultats présentés ici correspondent à la différence du nombre de cellules entre l'ensemencement de la culture et le moment de prélèvement (après 17 jours de culture) (Tableau 14).

Tableau 14. Comparaison entre les différents milieux de culture : accroissement cellulaire (cells.mL⁻¹), concentration toxinique à 17 jours de culture et rapport entre les concentrations de p-PLTX et d'OVTX-a.

Milieu	Accroissement cellulaire (cellules.L ⁻¹)	Concentration toxinique (pg.cellules ⁻¹)	Profil toxinique
			% [OVTX-a] / % [p-PLTX]
L1	+14 × 10 ⁶	49	94 / 6
L1 + ET	+ 17 × 10 ⁶	64	93 / 7
K	+ 2 × 10 ⁶	24	87 / 13
K + ET	+ 6 × 10 ⁶	50	93 / 7

Tout d'abord, lorsque l'enrichissement est le plus faible (L1/10 ou K/10), les cellules n'adhèrent pas et la croissance cellulaire a été très faible. Les concentrations cellulaires et toxiques n'ont donc pas pu être déterminées. Le Tableau 14 montre que le milieu L1 favorise la croissance

cellulaire de manière plus importante que le milieu K. De plus, le milieu L1 stimule la production de toxines par rapport au milieu K, puisque les concentrations toxiques sont globalement plus importantes, avec des valeurs de $49 \text{ pg.cellule}^{-1}$ pour le milieu L1 et de $24 \text{ pg.cellule}^{-1}$ pour le milieu K. Ces résultats sont cohérents avec ceux précédemment obtenus au laboratoire et décrits dans la littérature [140]. De plus, il faut noter que l'enrichissement le plus utilisé dans la littérature pour la culture d'*Ostreopsis cf. ovata* est le milieu f/2, dont le milieu L1 dérive. Par ailleurs, pour les deux milieux, l'ajout d'extrait de terre favorise à la fois la production de biomasse et de toxines. Curieusement, l'analyse du profil toxinique montre que le milieu K sans ajout d'extrait de terre a tendance à favoriser la production de p-PLTX par rapport à l'OVTX-a. Le milieu de culture le plus approprié est donc confirmé comme étant celui qui additionne le milieu L1 à l'extrait de terre.

3.2. Comparaison de la source azotée : nitrate et urée

Dans cet essai, la nature du composé azoté ajouté au milieu a été modifié, en remplaçant le nitrate (NO_3^-) du milieu L1, par de l'urée ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$). L'objectif de cette étude visait à favoriser la croissance des cellules planctoniques par rapport aux cellules épiphytes. L'utilisation de l'urée en remplacement des ions nitrates est inspirée d'une étude sur les conditions de culture d'un dinoflagellé (*Vulcanodinium rugosum*) producteur de toxines (pinnatoxines), dont les cellules planctoniques sont favorisées à 90 % lorsqu'il est cultivé en présence d'urée, alors qu'un enrichissement en nitrate favorise 90 % de cellules épiphytes [215]. De cette manière, trouver un support adéquat pour l'adhésion des cellules d'*Ostreopsis cf. ovata* ne serait plus nécessaire. De plus, limiter la formation de cellules épiphytes impliquerait une diminution de la production de mucus et ainsi faciliterait les comptages cellulaires et la récupération des toxines et leur purification.

Pour vérifier l'intérêt d'utiliser l'urée en remplacement des ions nitrates, des cellules d'*Ostreopsis* ont étéensemencées en parallèle dans 60 mL de milieu de culture dans des boîtes « Corning cell bind », soit avec du milieu L1 enrichi en nitrate, soit avec du milieu L1 enrichi en urée. La concentration en urée (3 g/L) ajoutée au milieu permet d'obtenir la même quantité d'azote dans les deux cas, afin de conserver un apport équivalent en azote. Cette expérience a été réalisée en duplicat, avec deux souches différentes d'*Ostreopsis* : IFR-OST-0.1 V et IFR-OST-0.3 V, afin de comparer le comportement d'une souche cultivée depuis plusieurs années dans les conditions de culture L1+ extrait de terre et celui d'une souche récemment cultivée dans ces conditions. Au bout de 21 jours, lorsque les cellules sont en phase stationnaire, chaque culture a

été récoltée afin de déterminer les concentrations cellulaires et toxiques. Ces concentrations ont été comparées afin de sélectionner le milieu favorisant la croissance cellulaire et la production toxinique (Figure 55).

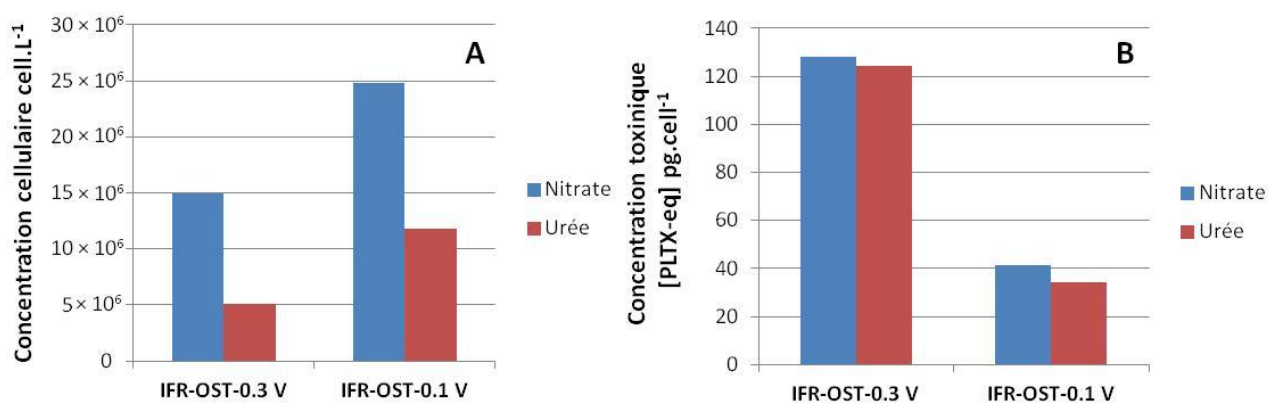


Figure 55. Concentrations cellulaires (A) et concentrations toxiques (B) des souches IFR-OST-0.3 V et IFR-OST-0.1 V après 21 jours de culture, en présence de nitrate ou d'urée.

Les concentrations cellulaires sont supérieures lorsque les cellules sont cultivées en présence de nitrates, plutôt qu'en présence d'urée. En effet, pour la souche IFR-OST-0.3 V, les concentrations cellulaires sont 3 fois plus importantes en présence de nitrates, et 2 fois plus importantes pour la souche IFR-OST-0.1 V, qu'en présence d'urée. En revanche, les concentrations en toxines sont du même ordre de grandeur, que les cellules soient cultivées en présence de nitrates ou d'urée. Les profils toxiques entre la p-PLTX et l'OVTX-a restent inchangés, avec respectivement 4 % de p-PLTX et 96 % d'OVTX-a, quelles que soient les conditions de culture et la souche cultivée.

Pour confirmer ces résultats et permettre aux cellules de s'adapter au nouveau milieu, un suivi sur plusieurs repiquages a été effectué. Pour cela, la souche de IFR-OST-0.3 V a été cultivée en parallèle, à la fois avec du nitrate ou de l'urée et repiquée pendant 3 mois. Tous les 20 à 25 jours, la densité cellulaire et la concentration toxinique ont été mesurées (Figure 56-A et -B).

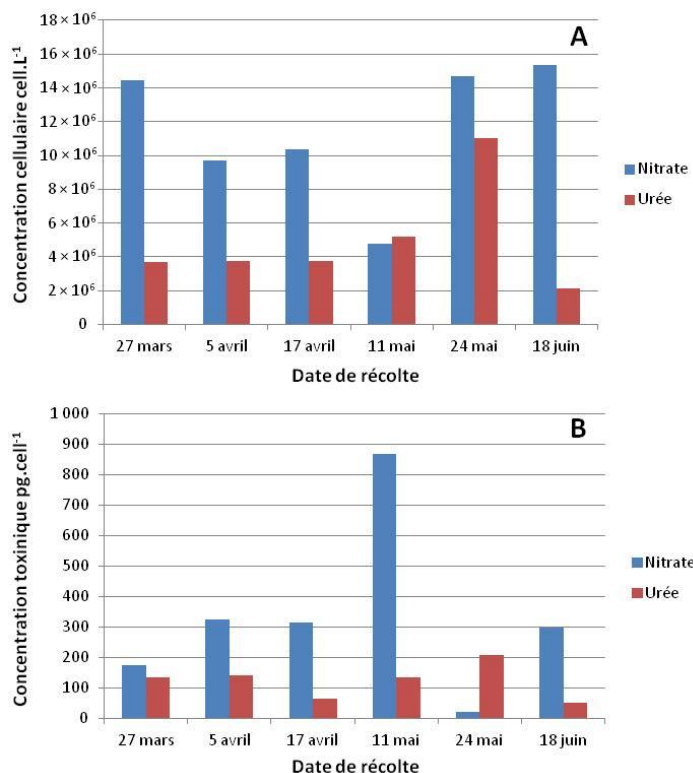


Figure 56. Suivi sur plusieurs repiquages de la souche de IFR-OST-0.3 V avec un enrichissement avec du nitrate ou avec de l'urée A : concentrations cellulaires d'*Ostreopsis cf. ovata* ; B : concentrations toxiques. * problème sur la quantification de l'échantillon.

Les résultats obtenus confirment les précédents. En effet, le rendement en biomasse et la concentration toxinique sont généralement plus importants lorsque la souche est cultivée en présence de nitrates comparée à l'urée (Figure 56-A).

Néanmoins, l'urée a influencé la production de cellules planctoniques, confirmant notre hypothèse de départ. En effet, les cellules adhéraient beaucoup moins au support en présence d'urée qu'en présence de nitrates. Autre fait intéressant, les profils toxiques quantitatifs diffèrent quelque peu, en fonction de l'apport en azote. D'une manière générale, lorsque les cellules passent du nitrate à l'urée, les pourcentages d'OVTX-a et d'OVTX-b diminuent en faveur de la p-PLTX, de l'OVTX-c, l'OVTX-d/e, et de l'OVTX-h. Le métabolisme de production des toxines n'est pas encore connu, la raison d'un changement dans les pourcentages de chaque toxine reste donc inexpliquée. En conclusion, l'urée n'améliore ni la production de biomasse, ni la production de toxines.

Les changements du milieu de culture n'ont permis de favoriser ni l'accroissement cellulaire, ni la production en ovatoxines. Le milieu de culture initial enrichi en L1, enrichie en nitrates + extrait de terre est donc confirmé comme étant le plus approprié pour la culture d'*Ostreopsis cf. ovata*.

4. Comparaison des souches d'*Ostreopsis cf. ovata*

Les souches monoclonales d'*Ostreopsis cf. ovata* ont été cultivées en chambre thermostatée durant trois années dans les mêmes conditions de culture optimisées, afin de les maintenir au laboratoire. Toutes les 3 à 4 semaines, les cellules ont été repiquées. À chaque repiquage, ces cellules ont été récoltées pour, d'une part, conserver le reste de la biomasse pour effectuer les essais d'isollements préparatifs de toxines, et d'autre part, mesurer la concentration cellulaire et doser la concentration en toxines. Le suivi des concentrations cellulaires et toxiniques a permis de comparer les souches entre elles. Les résultats de la Figure 57 correspondent à des cultures d'environ 20 à 24 jours, pour un volume de culture de 175 mL, dans des boîtes de culture « Corning cell bind ».

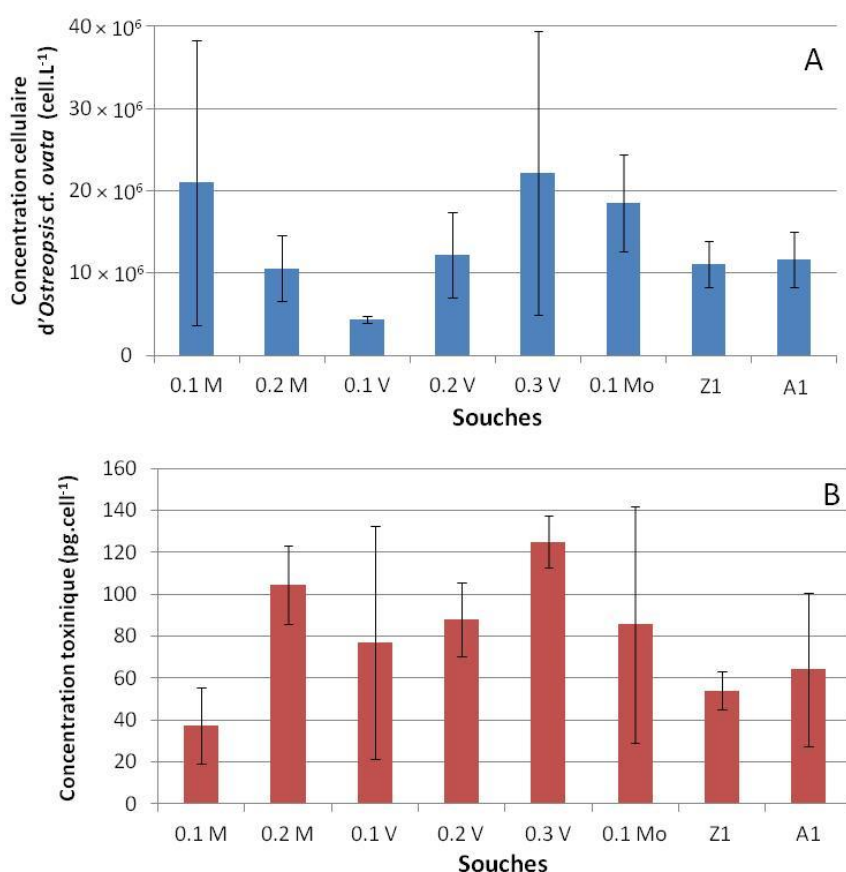


Figure 57. Moyenne et écart-type sur 3 années des concentrations cellulaires (A) et toxiniques (B) de chaque souche cultivée au laboratoire, pour un volume de culture de 175 mL et une période de récolte entre 20 et 24 jours de culture. 0.1 M = IFR-OST-0.1 M ; 0.2 M = IFR-OST-0.2 M ; 0.1 V = IFR-OST-0.1 V ; 0.2 V = IFR-OST-0.2 V ; 0.3 V = IFR-OST-0.3 V ; 0.1 Mo = IFR-OST-0.1 Mo ; Z1 = CNR-OST- Z1 ; A1 = CNR-OST- A1.

Les concentrations cellulaires moyennes varient entre $4,3 \times 10^6$ et $22,2 \times 10^6$ cellule.L⁻¹ entre les différentes souches. Ces concentrations sont du même ordre de grandeur que celles retrouvées dans la littérature [142, 207, 216]. Néanmoins, ces résultats sont des moyennes sur les 3 années, et les concentrations cellulaires varient énormément d'une fois sur l'autre. En effet, les temps de culture, ainsi que les concentrations cellulaires des inocula, n'ont pas toujours été rigoureusement les mêmes tout au long de la thèse. Néanmoins, à des fins de purification des toxines, seules les fortes quantités de cellules et de toxines étaient recherchées, ce qui est le cas, en fin de croissance cellulaire.

Les concentrations toxiques varient également, entre 37 et 125 pg.cellule⁻¹ en moyenne, en fonction des souches, la souche IFR-OST-0.3 V étant la plus productive en termes de toxines. Elles varient également beaucoup pour une même souche d'une fois sur l'autre, pour les mêmes raisons évoquées précédemment. Les concentrations toxiques les plus fortes correspondent souvent aux cinétiques de croissance les plus basses, et inversement ; cette corrélation inverse ayant déjà été observée dans la littérature [142, 149]. Il faut noter que les concentrations toxiques mesurées au laboratoire, pour un volume de culture de 175 mL et pour les différentes souches cultivées, sont du même ordre de grandeur que celles décrites généralement dans la littérature pour les souches méditerranéennes (20 à 130 pg.cellule⁻¹) (cultivées dans des volumes de culture de l'ordre du litre) [146], mais plus faibles que celles décrites pour les souches brésiliennes (468 pg.cellule⁻¹) [217].

Les principales toxines produites par les différentes souches sont les OVTX-a, -b, -c, -d, -e, et -h (*cf.* chapitre 5), ainsi qu'une p-PLTX, l'OVTX-a étant toujours la toxine majoritaire. L'OVTX-f a quant à elle toujours été retrouvée à une teneur inférieure à 2 %. La proportion de chaque analogue varie en fonction des souches (Figure 58). Parmi les différentes souches, celles de Morgiret produisent la plus forte proportion d'OVTX-a (72 % et 62 %), et présentent une faible teneur en OVTX-b (Figure 58-C, -D), les autres souches étant caractérisées par une teneur en OVTX-a voisine de 50 % et une teneur en OVTX-b voisine de 20 %. La souche IFR-OST-0.3 V diffère quel que peu de ce profil (Figure 58-B), l'OVTX-h étant présente à un pourcentage relativement plus important dans cette souche, (10 %) au détriment de l'OVTX-a (46 %).

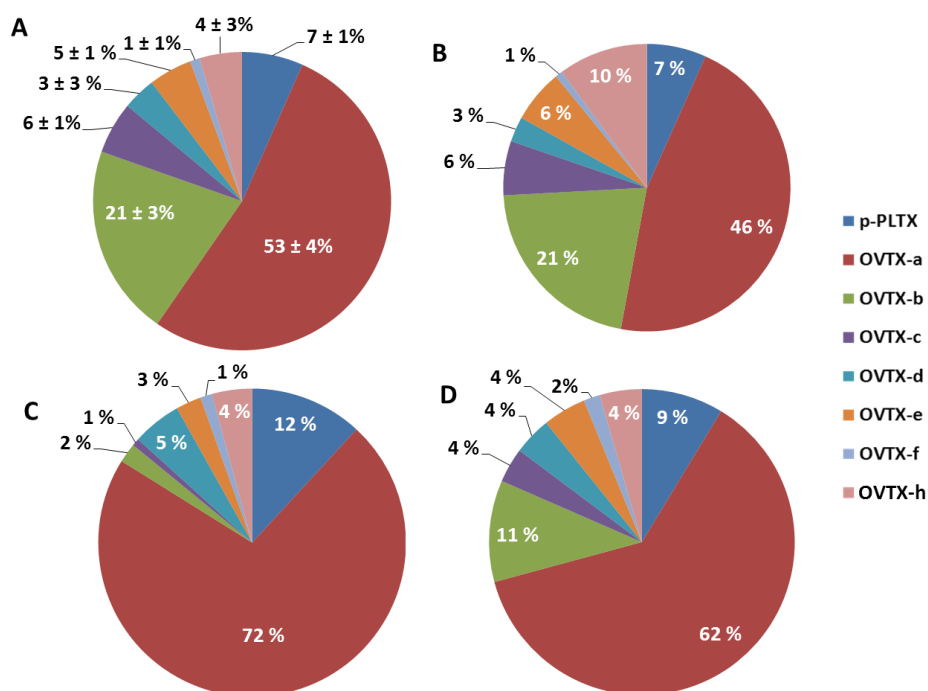


Figure 58. Profil toxinique des souches d'*Ostreopsis cf. ovata* : (A) Moyenne des souches IFR-OST-0.1 V, IFR-OST-0.2 V, IFR-OST-0.1 Mo, CNR-OST-Z1 et CNR-OST-A1 ; (B) IFR-OST-0.3 V ; (C) IFR-OST-0.1 M ; (D) IFR-OST-0.2 M.

Non seulement, la proportion des OVTXs varie en fonction de la zone géographique de récolte, par exemple entre Morgiret et Villefranche-sur-Mer, mais aussi en fonction de l'année de prélèvement, par exemple entre les souches de Morgiret de 2008 et de 2009. Ces différences ont déjà été rapportées dans la littérature pour d'autres souches d'*Ostreopsis cf. ovata* [23, 139, 207, 217].

De plus, la récolte de la biomasse dans ces conditions de culture (irradiance à $420 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, température de 22°C , salinité de 38 psu, et l'utilisation du milieu L1 + extrait de terre) a été théoriquement estimée à environ 10 mg de toxines pour l'équivalent de 10 L de culture, toutes souches et toutes surfaces de boîtes de culture confondues. Pour augmenter la biomasse récoltée, et donc la quantité de toxines extraites, des essais de culture sur plusieurs types de contenants de volume plus important ont été réalisés.

Par ailleurs, parmi les différentes souches récoltées et cultivées au laboratoire, la souche IFR-OST-0.3 V produit la plus grande quantité de cellules ($22,2 \times 10^6 \text{ cellule.L}^{-1}$) et de toxines ($125 \text{ pg.cellule}^{-1}$), et par ailleurs, produit une ovatoxine qui n'a pas encore été décrite dans la littérature, l'ovatoxine-h. C'est pourquoi, nous avons choisi de travailler sur cette souche.

5. Essais de cultures dans différents contenants de différents volumes

Ostreopsis cf. ovata est une espèce benthique qui est difficilement cultivable en laboratoire puisqu'elle nécessite un support pour pouvoir se développer. L'une des grandes difficultés des cultures d'*Ostreopsis sp.* est de trouver le matériau adéquat permettant de favoriser l'adhésion des cellules et ainsi de favoriser sa croissance. Des essais réalisés précédemment ont démontré qu'elles adhéraient sur les parois des boîtes « Corning cell bind ». Les souches sont donc maintenues au laboratoire dans ces boîtes de culture, traitées pour l'adhésion cellulaire, dont le volume est limité à 350 ml (225 cm² de surface d'adhésion) de culture au maximum. Pour pouvoir augmenter le volume de culture et obtenir un maximum d'extrait cellulaire pour la purification des toxines, il faut donc trouver un autre récipient de culture. Pour cela, plusieurs pistes ont été envisagées.

5.1. Culture en poche d'aquaculture

Le premier mode de culture envisagé était d'ensemencer les cellules d'*Ostreopsis cf. ovata* dans des poches d'aquaculture de 3 litres de capacité, disposées à l'horizontal. Ce dispositif, peu coûteux, composé de membranes en polyéthylène souple, offrirait aux cellules un maximum de surface de contact (environ 1 400 cm²), et la transparence du matériau permettrait de laisser passer la lumière nécessaire à la croissance de la microalgue.

Deux prototypes ont d'abord été réalisés afin de tester le procédé (Figure 59). Pour cela, deux poches, préalablement stérilisées à l'acide peracétique, ont étéensemencées dans 1 L de milieu L1, à partir de la même culture de départ (souche IFR-OST-0.1 V, la souche IFR-OST-0.3 V n'ayant pas encore été isolée au moment de cette expérience).

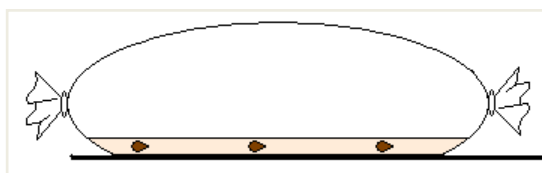


Figure 59. Schéma du prototype de la poche d'aquaculture utilisée pour la culture *Ostreopsis cf. ovata*.

La culture de chaque poche a été stoppée et récoltée à deux moments de culture différents : 18 et 24 jours. En effet, la cinétique de croissance dans ce type de contenant n'étant pas connue, l'objectif est de s'assurer d'avoir des quantités cellulaires et toxiniques importantes. Ces poches ont été placées dans une salle thermostatée à 22°C. La concentration cellulaire et la concentration

toxinique ont été mesurées à chaque récolte. Pour cela, les cellules ont été délicatement décrochées des parois des poches, homogénéisées et prélevées pour le comptage cellulaire et l'extraction des toxines (Tableau 15).

Tableau 15. Concentrations cellulaires et toxiques d'*Ostreopsis cf. ovata* après mise en culture dans 3 poches d'aquaculture.

	Jour de récolte	
	18 ^e	24 ^e
Concentration cellulaire (cellule.L ⁻¹)	9,437 × 10 ⁶	23,922 × 10 ⁶
Concentration [PLTXs]eq (pg.cellule ⁻¹)	40,2	33,9

Au bout de 18 jours, la densité cellulaire atteignait $9,4 \times 10^6$ cellule.L⁻¹ et la concentration toxinique était de 40 pg.cellule⁻¹; au bout du 24^e jour, la concentration cellulaire a augmenté, atteignant $24,0 \times 10^6$ cellule.L⁻¹, la concentration toxinique restant proche de celle obtenue à J18 (34 pg.cellule⁻¹). Ces deux points de cinétique ne permettent pas de savoir à quel stade de la croissance se trouvait la microalgue. Quoi qu'il en soit, avec la seconde poche, récoltée à J24, la production de toxines, estimée à environ 34 pg.cellule⁻¹, soit environ 4 fois moins que la production de toxines obtenue dans des boîtes « Corning cell bind », pour un volume de culture de 175 mL. Il faut noter qu'au moment de la réalisation de cette culture, seules la p-PLTX et l'OVTX-a étaient analysées en CL-SM/SM. Sachant que ces deux toxines comptent environ pour moitié du profil toxinique, on peut donc s'attendre au double de la concentration de toxines par cellule. Cette technique semble donc prometteuse, compte tenu de la forte concentration cellulaire obtenue, à la condition que la méthode de mise en culture soit optimisée pour augmenter la production de toxine.

Un autre essai a donc été réalisé dans une poche plus grande, pour augmenter encore plus la surface de contact, et de ce fait, augmenter la biomasse cellulaire. En revanche, l'augmentation du volume de culture a entraîné un changement de la nature de la paroi de la poche de culture, désormais en polycarbonate plus épais et plus rigide, avec une surface d'adhésion potentielle d'environ 2 800 cm² pour une capacité de 9 L de culture. Afin de permettre aux cellules (souche IFR-OST-0.1 V) de s'accrocher d'abord au support avant d'augmenter le volume de culture, cet essai a été réalisé en semi-continu, c'est-à-dire qu'un apport de milieu de culture neuf a été continuellement apporté aux cellules (Figure 60). En effet, il ne faut pas que l'inoculum de départ soit trop dilué, car les cellules ont moins de chance d'adhérer au substrat. Un apport régulier du

milieu de culture permettra à la microalgue de ne jamais être en déficit de nutriment. De plus, les échanges gazeux sont possibles grâce à la circulation d'air stérile injectée.

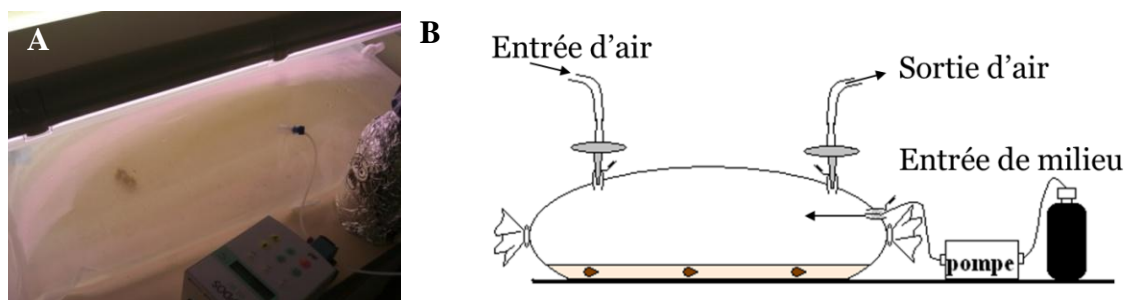


Figure 60. Photographie (A) et schéma (B) de la poche d'aquaculture en semi-continu.

Malgré toutes les précautions prises, et après plusieurs tentatives pour améliorer le processus, les cellules n'ont malheureusement pas adhéré sur les parois du plastique. Ce matériau plastique ne permet donc pas l'adhésion de la microalgue. Une autre hypothèse pourrait être que la lumière passe moins facilement au travers de ce matériau, un peu plus opaque, bien que les poches d'aquaculture soient conçues pour laisser passer la lumière. À défaut de pouvoir augmenter le volume de culture à environ 9 L, ce procédé a donc été abandonné.

En conclusion de ces essais, même si les premiers résultats en poche d'aquaculture étaient prometteurs, la culture reste limitée à 1 L de culture, que l'on peut obtenir facilement avec 3 boîtes de culture « Corning cell bind » de 350 mL (225 cm^2). L'avantage de la culture d'*Ostreopsis cf. ovata* avec ces trois boîtes est que la mise en culture est beaucoup plus simple, la production de biomasse et de toxines est assurée de façon plus certaine, et que ces trois boîtes prennent moins de place en chambre thermostatée que la poche d'aquaculture. De plus, les boîtes « Corning cell bind » permettent de produire une quantité de toxines plus forte, de $125 \text{ pg.cellule}^{-1}$ de toxines pour $22,2 \times 10^6 \text{ cellule.L}^{-1}$, contre $34 \text{ pg.cellule}^{-1}$ de toxines pour $23,9 \times 10^6 \text{ cellule.L}^{-1}$ dans des poches d'aquaculture. Pour augmenter les quantités de toxines récupérées, d'autres procédés ont donc été testés.

5.2. Flacons en verre

5.2.1. Le Fernbach, la bonbonne et l'erlenmeyer

Classiquement, les microalgues sont cultivées dans des ballons de culture. Pour une microalgue benthique, des récipients à fond plat peuvent être utilisés, comme un ballon de culture de forme

conique et à fond plat, appelé « Fernbach » (Figure 61-A)), un erlenmeyer ou une bonbonne (Figure 61-B).



Figure 61. Culture d'*Ostreopsis cf. ovata* (A) dans un Fernbach ; (B) dans un erlenmeyer de 6 L et dans une bonbonne de 5 L.

Le volume d'un Fernbach peut atteindre 1 800 mL et la surface d'adhésion (fond du flacon) est de 314 cm². Il est constitué de verre borosilicaté, permettant le passage d'un large spectre de lumière. L'avantage de ce type de flacon par rapport aux boîtes « Corning cell bind » est qu'il est réutilisable. Différents essais de culture ont été effectués dans ce type de flacons. Pour chaque culture, des cellules d'*Ostreopsis cf. ovata* de la souche IFR-OST-0.3 V ont étéensemencées dans un 1 L de milieu L1 + extrait de terre. Pour augmenter encore plus la surface de contact, mais aussi pour tester d'autres matériaux, des colliers de serrages ou des goupillons, ont été ajoutés au milieu de culture de quelques flacons Fernbach. Cinq essais de culture d'*Ostreopsis cf. ovata* en Fernbach ont été ainsi réalisés :

- deux cultures témoins (Figure 61).
- une culture en présence de colliers de serrage en polyamide (Figure 62 -A) ;
- une culture en présence de goupillons en poils de chèvre (Figure 62 -B) originellement prévus pour nettoyer la verrerie ; ces poils pourraient constituer une multitude d'accroches pour les cellules, tel qu'indiqué dans la littérature par Avendano-Herrera et al. [218] ;
- une culture en présence de toile Bultex en nylon (Figure 62 -C); en effet, lors de la campagne de prélèvement de 2011, nous avons noté que les cellules d'*Ostreopsis* se sont accrochées aux parois des SPATTs implantés en milieu naturel et fabriqués à partir de la même toile. Pour que la toile reste au fond du flacon, elle a été remplie de billes de verre.

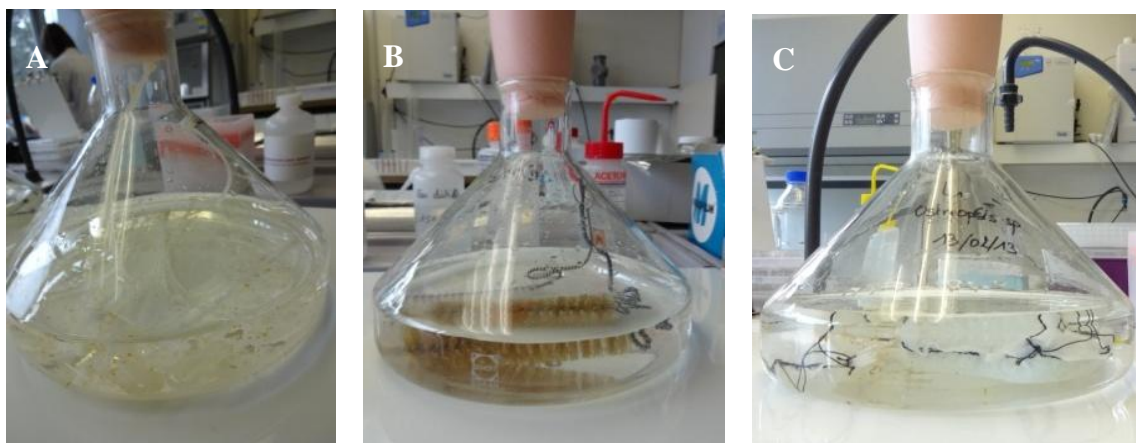


Figure 62. Mise en culture dans des Fernbachs : (A) avec des colliers de serrage ; (B) avec un goupillon ; (C) avec de la toile de nylon.

Après 21 jours de culture, lorsque les cellules étaient en phase stationnaire, des prélèvements ont été effectués. Pour cela, les cellules ont été délicatement décrochées de leur support et le mélange a été homogénéisé. La densité cellulaire et la concentration toxinique ont été mesurées et les modes de culture ont été comparés (en duplicat) (Figure 63).

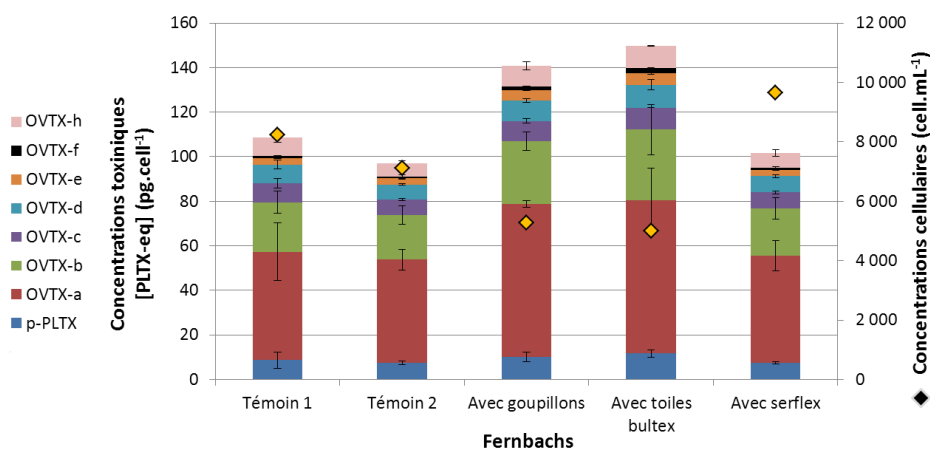


Figure 63. Concentrations cellulaires et toxiques pour chaque mode de culture réalisé en Fernbachs après 21 jours de culture d'*Ostreopsis cf. ovata*. Les témoins 1 et 2 sont des cultures simples, les autres ayant des objets dans le milieu de culture, des goupillons, des toiles bultex, des serflex. Les barres d'erreurs représentent les écarts types des duplicats.

Tout d'abord, les résultats de culture en Fernbach « témoins » montrent que le développement cellulaire est possible dans ce type de flaconnage. Cependant, les concentrations cellulaires, de $8,2 \times 10^6$ cellule.L⁻¹ pour le témoin n°1 et de $7,1 \times 10^6$ cellule.L⁻¹ pour le témoin n°2, sont inférieures aux concentrations cellulaires généralement observées pour cette souche cultivée en boîte « Corning cell bind » de 175 mL (environ $22,2 \times 10^6$ cellule.L⁻¹). Néanmoins, les

concentrations toxiques, à $108 \text{ pg.cellule}^{-1}$ pour le témoin n°1 et $97 \text{ pg.cellule}^{-1}$ pour le témoin n°2, sont du même ordre de grandeur que celles obtenues généralement pour cette souche ($125 \text{ pg.cellule}^{-1}$). Lorsque des goupillons ou de la toile de nylon sont ajoutés dans le flacon, les concentrations cellulaires diminuent à $5,2 \times 10^6 \text{ cellule.L}^{-1}$ et $5,0 \times 10^6 \text{ cellule.L}^{-1}$ respectivement. Ces matériaux ne favorisent donc pas l'adhésion cellulaire. En revanche, les concentrations toxiques ont augmenté pour ces cultures par rapport aux témoins, respectivement à $141 \text{ pg.cellule}^{-1}$ et $150 \text{ pg.cellule}^{-1}$. Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés dans la littérature, qui rapportent que lorsque la croissance cellulaire est favorisée, la concentration toxique diminue, et inversement [142, 149]. En revanche, pour la culture avec des colliers de serrage, une faible augmentation de la concentration cellulaire est observée, à $9,7 \times 10^6 \text{ cellule.L}^{-1}$, tout en conservant des concentrations toxiques du même ordre de grandeur ($101 \text{ pg.cellule}^{-1}$).

Le profil toxique, quant à lui, reste le même, quel que soit le mode de culture : il reste dominé par l'OVTX-a (47 %), puis l'OVTX-b (21 %), la p-PLTX (8 %), l'OVTX-h (7 %), l'OVTX-d (7 %), l'OVTX-c (7 %), l'OVTX-e (3 %) et l'OVTX-f (1 %). Ces profils sont quelques peu différents de ceux obtenus généralement pour cette souche. En effet, on observe que dans les flacons Fernbach, la production d'OVTX-d est favorisée (+ 4 %), aux dépens de l'OVTX-h (- 3 %) et de l'OVTX-e (-3 %).

Globalement, ce mode de culture permet de produire de grandes quantités de toxines par cellules, parfois même plus fortes que dans des boîtes « Corning cell bind » de 175 mL pour la même souche. Cependant, cette production est atteinte au détriment de la concentration cellulaire, qui est de 2 à 4 fois plus faible que pour la même souche cultivée, dans une boîte « Corning cell bind » de 175 mL. Néanmoins, ces résultats montrent que les souches d'*Ostreopsis cf. ovata* peuvent croître en flacon de verre, dans ces conditions de culture.

L'objectif étant d'augmenter encore le volume de culture d'*Ostreopsis cf. ovata*, une **bonbonne de 5 litres** a été utilisée, ainsi qu'un **erlenmeyer de 6 litres**, dans lesquels ont été ajoutés des colliers de serrage dans toute la hauteur, afin d'augmenter la surface de culture. Les cellules d'*Ostreopsis cf. ovata* de la souche IFR-OST-0.3 V ont étéensemencées dans un volume de 5 L de milieu L1 et dans un volume de 6 L, dans la bonbonne et dans l'erlenmeyer respectivement (Figure 61-B) ; les conditions de culture restant les mêmes. Après 15 jours de culture, des prélèvements ont été effectués afin de mesurer la densité cellulaire et la concentration toxique (Figure 64).

Il est à noter que lorsque les cellules commencent à mourir, ou lorsqu'elles sont dans des conditions qui ne leur sont pas favorables, elles se déforment et se décolorent. C'est ce qui a été observé pour cette culture, et c'est pour cette raison que les prélèvements ont été effectués précipitamment au bout de 15 jours. Néanmoins, l'observation des cultures au bout de 8 jours a montré la formation de mucilages autour des colliers de serrages.

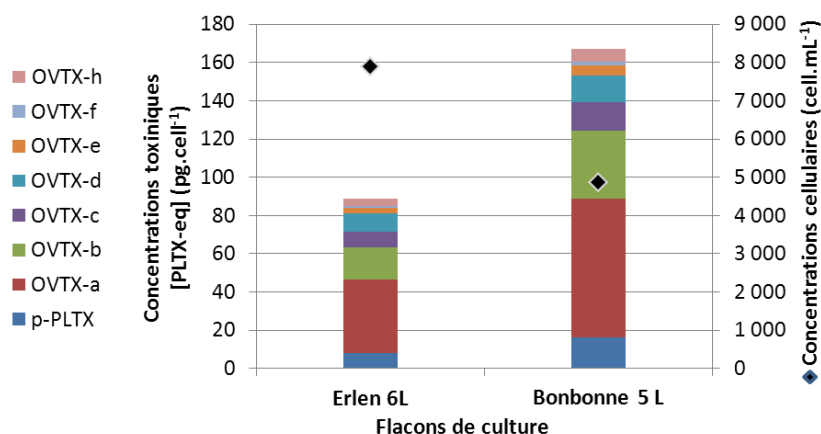


Figure 64. Concentrations cellulaires et toxiques des cultures effectuées dans un erlenmeyer de 6 L et dans une bonbonne de 5 L, après 15 jours de culture.

Dans l'erlenmeyer de 6 L, la concentration cellulaire a atteint $7,9 \times 10^6$ cellule.L⁻¹ pour une concentration toxinique de 89 pg.cellule⁻¹, tandis que dans la bonbonne de 5 L, la concentration cellulaire a atteint $4,9 \times 10^6$ cellule.L⁻¹ pour une concentration toxinique de 167 pg.cellule⁻¹. Ces faibles concentrations cellulaires associées à de fortes concentrations toxiques confirment que la culture n'est pas dans les meilleures conditions de développement, et doit être en situation de stress. De plus, la grande quantité de mucus produite rend la récupération de la biomasse difficile. En effet, après centrifugation des cultures, le mucus empêche les cellules de former un vrai culot et les cellules ont tendance à partir avec le surnageant. Cependant, la culture en bonbonne permet la production de plus fortes quantités de toxines que dans une boîte de culture « Corning cell bind » de 175 mL, pour la même souche, au détriment de la croissance cellulaire. Le profil toxinique quand à lui est toujours le même ; il reste dominé par l'OVTX-a (43 %), puis l'OVTX-b (20 %), l'OVTX-d (10 %), la p-PLTX (9 %), l'OVTX-c (9 %), l'OVTX-h (4 %), l'OVTX-e (3 %) et l'OVTX-f (1 %). Encore une fois, un peu plus d'OVTX-d est produite par rapport aux souches cultivées en boîtes « Corning cell bind ».

La mise en culture d'*Ostreopsis cf. ovata* en flacon de verre avait été préalablement testée au laboratoire mais sans succès. Les résultats présentés ici montrent, en revanche, que la culture

d'*Ostreopsis cf. ovata* est possible en flacon de verre. Cette différence de résultat est peut être due aux conditions de culture qui ont été optimisées au cours du temps et qui permettent désormais la culture en Fernbach. D'autres flacons en verre ont donc été testés, toujours dans le but d'augmenter la biomasse récoltée et de vérifier que l'augmentation du volume de culture ne modifiait pas la cinétique de croissance.

5.2.2. Le ballon de culture de 8 L

Le ballon de culture est le flacon de culture le plus couramment utilisé pour cultiver les microalgues. Pour *Ostreopsis cf. ovata*, des ballons de culture de 8 L ont été utilisés. Afin de ne pas devoir prématurément stopper la culture, comme pour les cultures dans l'erenmeyer et la bonbonne, plusieurs ballons de culture ont étéensemencés au même moment pour être récoltés à différents moments. Cependant, le nombre de ballons pouvant être utilisés en même temps, en raison de la place que prennent de tels flacons dans une chambre de culture. C'est pourquoi, seules 6 cultures d'*Ostreopsis cf. ovata* dans des ballons ont été réalisées, et le pas de temps entre deux récoltes est important, de 7 à 15 jours.

Les six ballons de 8 L, préalablement stérilisés, ont étéensemencés avec des cellules d'*Ostreopsis cf. ovata* de la souche IFR-OST-0.3 V dans un milieu L1 + extrait de terre. À J = 16, 21, 36, 43, 57 et 64 jours de culture des prélèvements ont été effectués, afin de mesurer la densité cellulaire, la concentration et le profil toxiques (Figure 65).

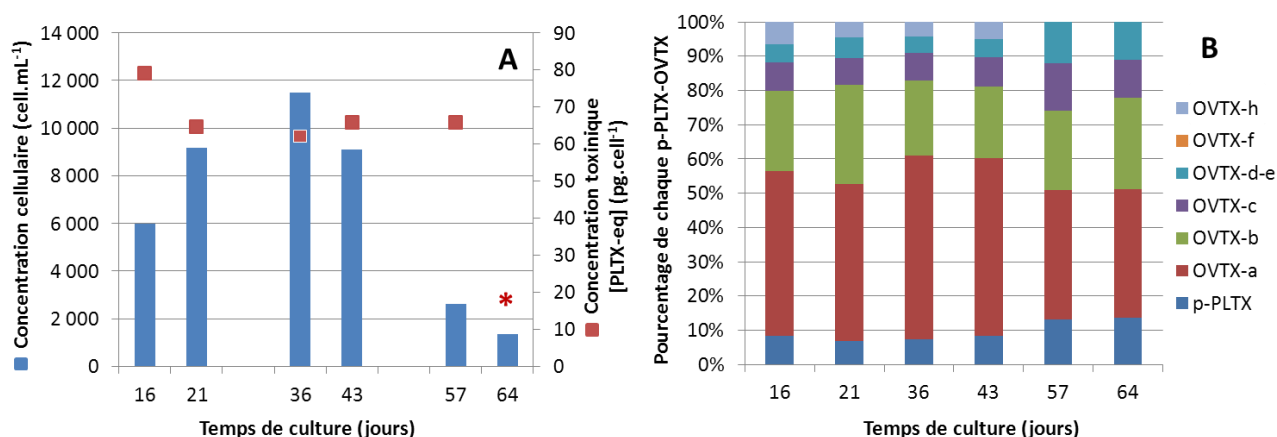


Figure 65. Culture d'*Ostreopsis cf. ovata* dans des ballons de culture de 8 L, en fonction du temps : A : concentrations cellulaires et toxiques ; B : profils toxiques. * concentration toxique au-dessous de la limite de détection.

L'observation des cultures a montré que les cellules se sont accrochées sur le fond, mais aussi sur les parois du ballon. Du 16^e au 36^e jour de culture, les concentrations cellulaires augmentent régulièrement, passant de $6,0 \times 10^6$ cellule.L⁻¹, à $9,2 \times 10^6$ cellule.L⁻¹ puis $11,5 \times 10^6$ cellule.L⁻¹. À partir du 43^e jour, en revanche, les concentrations cellulaires diminuent jusqu'à $9,1 \times 10^6$ cellule.L⁻¹, puis $2,6 \times 10^6$ cellule.L⁻¹ au 57^e jour, et enfin $1,3 \times 10^6$ cellule.L⁻¹ au 64^e jour. Dans les 20 premiers jours, les cellules doivent se trouver en phase de croissance exponentielle, puis aux alentours d'une trentaine de jours, la culture doit être en phase stationnaire, enfin, à partir d'une quarantaine de jours, les cellules sont en phase de senescence et meurent progressivement. À l'inverse, la production toxinique est stable entre le 16^e et le 57^e jour de culture, variant de 79 à 62 pg.cellule⁻¹. Au 64^e jour, la faible quantité de cellule n'a pas permis de quantifier la concentration toxinique associée.

En revanche, le profil toxinique n'est pas tout à fait le même tout au long de la culture (Figure 65-B). En effet, jusqu'au 43^e jour de culture, les profils restent stables, avec une majorité d'OVTX-a (50 %), puis OVTX-b (24 %), p-PLTX (8 %), OVTX-c (8 %), OVTX-d/e (5 %) et l'OVTX-h (5 %), l'OVTX-f n'étant pas détectée. Après une quarantaine de jours, les profils diffèrent quelque peu, avec une diminution du pourcentage d'OVTX-a (38 %), celle-ci étant encore majoritaire, et une augmentation des pourcentages de p-PLTX (13 %), OVTX-c (13 %), OVTX-d/e (11 %). Par ailleurs, le pourcentage d'OVTX-b reste pratiquement inchangé (25 %), alors que l'OVTX-h n'est plus détectée. Ces variations dans le profil toxinique apparaissent lorsque la croissance cellulaire commence à décliner. Les voies métaboliques impliquées dans les synthèses des p-PLTX-OVTXs n'ont pas encore été déterminées, les changements dans le profil toxinique ne peuvent donc pas être expliqués. On peut néanmoins supposer qu'il y a un changement de la production de toxines est fonction du stade de croissance de la cellule, ou bien qu'une transformation de certaines toxines en d'autres toxines a lieu au cours du temps, comme des oxydations par exemple.

Le ballon de culture de 8 L ne permet pas de produire autant de toxines, ni autant de cellules, que la culture de la même souche dans une boîte de culture « Corning cell bind » de 175 mL. Si les quantités de toxines produites dans des ballons de 8 L ne sont pas maximales dans un but de purification, l'augmentation de certaines toxines qui par ailleurs sont minoritaires, notamment la p-PLTX et l'OVTX-c, pourrait être un atout pour la purification des OVTXs.

5.3. Bilan

Différents contenants de culture ont été testés afin d'augmenter la production de biomasse et de toxines. Dans la plupart des cas, la souche IFR-OST-0.3 V a été utilisée, avec une vingtaine de jours de culture. Les bilans des concentrations cellulaires, des concentrations toxiques et des masses de toxines que l'on peut récupérer avec les différents modes de culture sont donc comparés avec cette souche en particulier. Tous les résultats sont regroupés dans le Tableau 16.

Tableau 16. Résumé des résultats obtenus pour la souche IFR-OST-0.3 V avec les différents modes de culture, en fonction de la surface et du volume de culture : concentrations cellulaires, quantité théorique de toxines que l'on pourrait obtenir avec 100 % de rendement d'extraction et de purification par récipient et estimation de quantité de toxines pour un volume de 10 L.

Mode de culture	Surface (cm ²)	Volume de culture (L)	Concentration cellulaire (cellule/L)	Concentration toxinique (pg.cellule ⁻¹)	Quantité de toxines estimées (mg)	Quantité estimée pour 1 L (mg)
Culture en poche	1400	1	$24,0 \times 10^6$	34	0,8	0,8
Fernbach (témoin)	314	1	$8,2 \times 10^6$	103	0,89	0,9
Fernbach (collier de serrage)	$314 + x^*$	1	$9,7 \times 10^6$	101	0,98	1
Erlenmeyer	$177 + x^*$	6	$7,9 \times 10^6$	89	4,2	0,7
Bonbonne	$189 + x^*$	5	$4,9 \times 10^6$	167	4,1	0,8
Ballon	$415 + y^{**}$	8	$11,5 \times 10^6$	62	5,7	0,7
Boîte « Corning cell bind »	175	0,175	$22,2 \times 10^6$	125	0,49	2,8

* x = surface de collier de serrage non connue

**y = surface de parois sur lesquelles les cellules ont adhérees non connue

D'une manière générale, la surface de contact semble le paramètre le plus important pour favoriser la croissance cellulaire. En effet, les concentrations cellulaires augmentent plus avec la surface qu'avec le volume de culture, avec une exception pour les cultures obtenues dans des boîtes « Corning cell bind », qui présentent la plus petite surface de culture (175 cm²) et une concentration cellulaire parmi les plus fortes. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que ces boîtes sont brevetées pour favoriser l'adhésion cellulaire. En revanche, la quantité de toxines

produites, estimée pour un volume de 1 L, reste du même ordre de grandeur quel que soit le mode de culture, à l'exception des cultures en boîtes « Corning cell bind » qui est environ 3 fois plus importante.

La culture en ballon de culture de 8 L ne permet pas d'obtenir des concentrations cellulaires et toxiques aussi élevées que lorsque la culture de la même souche est réalisée dans une boîte de culture « Corning cell bind » de 175 mL.

6. Cinétiques de croissance et de production des ovatoxines

L'obtention d'ovatoxines par extraction à partir des cellules d'*Ostreopsis cf. ovata*, suivie de la purification de ces extraits, nécessite la connaissance préalable de la croissance des cellules, afin de récolter la biomasse algale lorsque les concentrations cellulaires et toxiques sont les plus fortes. Pour cela, le suivi de la cinétique de croissance de la souche OST-IFR-0.3 V, isolée à Villefranche-sur-Mer en 2011, a été réalisé. Cette souche a été choisie, car elle produit une quantité de toxines plus importante que les autres souches (montré dans le §4).

Sachant qu'*Ostreopsis cf. ovata* est une microalgue benthique et qu'elle forme du mucus au cours de sa croissance, il est difficile de réaliser une cinétique de croissance sur la culture d'une seule boîte « Corning cell bind ». En effet, il est impossible d'homogénéiser le milieu, en vue d'un prélèvement, sans gêner la croissance des cellules. La stratégie adoptée a donc été celle décrite par Guerrini et al [207], qui consiste à mettre en culture en parallèle des boîtesensemencées avec 50 mL (25 cm² de surface d'adhésion potentielle) de la même culture de départ et de stopper la culture afin de les récupérer les cellules chacune à un moment différent. À chaque prélèvement, le comptage cellulaire et la détermination de la concentration toxinique ont été réalisés, permettant ainsi d'obtenir la courbe de cinétique de croissance. À chaque période de récolte, deux boîtes sont sélectionnées, pour pouvoir, d'une part, effectuer le comptage cellulaire, en acidifiant complètement l'une des deux boîtes, et d'autre part, pour la détermination de la concentration en toxines.

Les jours de récolte ont été choisis pour avoir un intervalle de prélèvement d'environ 3 ou 4 jours. À partir du 17^e jour, la phase stationnaire apparaît, c'est-à-dire que la densité cellulaire ne varie plus. Par conséquent, l'intervalle entre deux prélèvements a alors été augmenté à 10 jours pour s'assurer d'atteindre la phase de senescence, quand la densité cellulaire diminue. Les résultats sont donnés sous forme d'une cinétique de croissance. Les concentrations toxiques au temps t_0 n'ont pas été considérées, car elles correspondent au jour de l'inoculum, et donc à des

cellules déjà à un stade avancé (plus grosses que celles obtenues ensuite pendant la phase linéaire) (Figure 66).

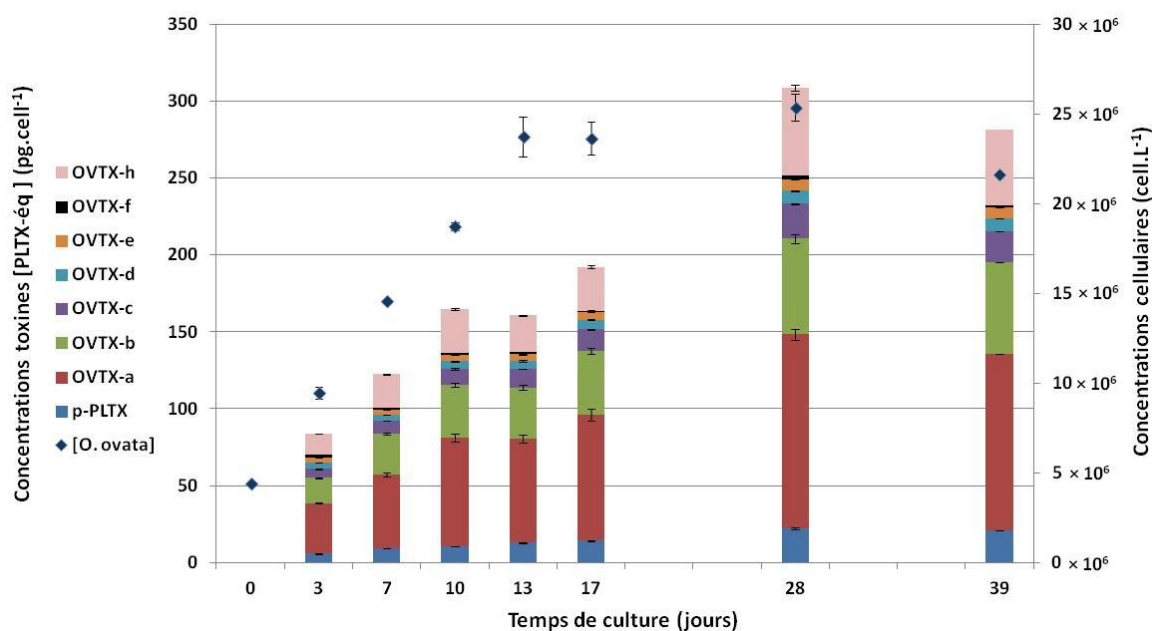


Figure 66. Concentrations cellulaires, profil toxinique et concentrations toxiques durant la croissance de la souche IFR-OST-0.3 V (trois répliquats ont été prélevés dans chaque boîte de culture, les barres d'erreurs représentent la déviation standard).

L'évolution de la concentration cellulaire dans le milieu de culture peut être divisée en trois phases : une phase linéaire du 3^e jour au 13^e jour, avec un taux de croissance maximal de $0,26 \text{ j}^{-1}$, puis une phase stationnaire, sur environ 15 jours, avec une densité cellulaire d'environ $25,0 \times 10^6 \text{ cellule.L}^{-1}$, et la troisième au 39^e qui indique le début de la phase de sénescence. Le contenu toxinique par cellule augmente de façon exponentielle (Figure 66) pendant la phase linéaire et la phase stationnaire, passant de 84 à $307 \text{ pg.cellule}^{-1}$, ce qui prouve que les cellules produisent des toxines durant toute la durée de la croissance cellulaire [151]. Après 28 jours de culture, une diminution des concentrations toxiques et cellulaires a été observée, sûrement à cause du relargage des toxines dans le milieu de culture. Cette diminution de concentration a déjà été rapportée dans la littérature [207].

Le profil toxinique reste constant pendant toute la cinétique avec environ 41 % d'OVTX-a, 21 % d'OVTX-b, 17 % d'OVTX-h, 7 % d'OVTX-c, 7 % de p-PLTX, 3 % d'OVTX-d, 3 % d'OVTX-e, et <1 % d'OVTX-f. Ces résultats sont contradictoires avec ceux de Nascimento qui suggère que le profil toxinique change au cours de la cinétique de croissance, et notamment durant la phase exponentielle [217].

Au cours de la cinétique, deux types de populations de cellules ont été observés : des petites cellules ($25\,391\ \mu\text{m}^3$), pendant la phase linéaire, et de plus grosses cellules ($36\,885\ \mu\text{m}^3$), pendant la phase stationnaire. Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés dans la littérature [207, 219]. Ces auteurs suggèrent que pendant la phase de croissance les petites cellules se multiplient rapidement pour coloniser leur substrat, ce qui limite leur croissance cellulaire, puis, lorsque la phase stationnaire est atteinte, les cellules grossissent et accumulent plus de toxines. Généralement, les cellules benthiques sont donc plus petites et colonisent les substrats, tandis que les cellules planctoniques sont plus grosses. Les deux populations peuvent néanmoins être observées tous au long de la cinétique.

Cette étude nous permet de conclure que lorsque qu'*Ostreopsis cf. ovata* est cultivée dans les boîtes « corning cell bind », les cellules doivent être récoltées entre 20 et 30 jours de culture, afin de récolter le maximum de biomasse, et d'effectuer l'extraction puis la purification des toxines.

7. Conclusion

La culture d'espèces benthiques est compliquée à réaliser en laboratoire car elle nécessite un support particulier sur lequel les cellules puissent s'accrocher, ainsi que des conditions de culture maîtrisées. Malgré les difficultés, des conditions de culture des cellules d'*Ostreopsis cf. ovata* au laboratoire, ont pu être mises au point, principalement en boîtes « Corning cell bind ».

Les souches cultivées au laboratoire proviennent de différentes zones géographiques, de Morgiret à Villefranche-sur-Mer pour la France, en passant par la Sicile et les îles Baléares, ce qui nous permet de comparer la production de biomasse et de toxines pour ces différentes souches et de conclure que les profils toxiques diffèrent d'une région à l'autre ainsi que d'une année sur l'autre.

Changer le milieu de culture n'a pas permis de favoriser la croissance d'*Ostreopsis cf. ovata* par rapport au milieu L1 + extrait de terre, préconisé suite à des travaux réalisés au laboratoire avant le début de la thèse, confirmant ainsi que ces conditions sont optimisées. Ces conditions de culture favorisent la prolifération cellulaire et la production toxinique, les concentrations toxiques obtenues (10 à $335\ \text{pg}\cdot\text{cellule}^{-1}$) étant parmi les plus élevées des cultures réalisées autour du bassin méditerranéen (20 à $130\ \text{pg}\cdot\text{cellule}^{-1}$) [146]. La forte irradiance ($420\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) et la température ($22\ ^\circ\text{C}$) semblent stimuler à la fois l'accroissement cellulaire et la production toxinique, comme déjà évoqué dans la littérature [16, 139, 149].

Pour certaines expériences, un changement dans les proportions des analogues d'ovatoxines a été observé (par exemple lors de l'expérience de culture en présence d'urée, ou avec la culture vieillissante en ballon de 8 L). Cependant, le métabolisme cellulaire et la raison de la production des toxines ne sont pas connus, ce qui ne permet pas d'expliquer l'origine de ces modifications. Ces modifications pourraient éventuellement être un atout pour la purification des toxines minoritaires (telles que la p-PLTX ou l'OVTX-c).

Plusieurs essais visant à augmenter le volume de culture d'*Ostreopsis cf. ovata* ont été réalisés sur différents supports. Ces essais montrent que la culture d'*Ostreopsis* peut être réalisée aussi bien dans des flacons en verre que sur des matériaux tels que le polyamide ou le polyéthylène. Le flacon qui permet la production de la quantité de biomasse et de toxines la plus importante reste cependant la boîte « Corning cell bind ». La méconnaissance du matériau utilisé pour la fabrication de ces boîtes, dont le volume de culture est limité à 300 mL, rend la transposition de ce mode de culture à grande échelle impossible, puisqu'elle est brevetée. Il faut noter que pour obtenir 10 L de culture d'*Ostreopsis cf. ovata* à des fins préparatives, il faut cultiver environ 60 boîtes de culture « Corning cell bind », sur une période d'environ 4 mois.

Tous ces essais ont permis d'obtenir de la biomasse algale renfermant des quantités de toxines plus ou moins importantes. Au cours de la thèse, environ 650 L de culture ont été obtenus au laboratoire, permettant la récolte d'environ 130 g de pâte d'algue destinée à la purification des OVTXs.

**Chapitre 5 – Purification des ovatoxines à partir
d'extraits d'*Ostreopsis cf. ovata***

L'objectif majeur de cette thèse est d'obtenir des ovatoxines purifiées à partir d'*Ostreopsis cf. ovata* en culture, sachant qu'elles représentent 90 % du profil toxinique de la microalgue. La grande similarité des ovatoxines, d'un point de vue structure chimique et propriétés physico-chimiques, rend très difficile leur séparation, et de ce fait, leur purification et leur isolement.

La plupart des auteurs utilise la chromatographie liquide en phase inverse pour l'analyse physico-chimique des ovatoxines, principalement des phases avec un greffon alkyle en C₁₈ ou en C₈ [118, 220], en particulier la phase Gemini C₁₈ [14, 22-24, 217]. D'autres auteurs utilisent des phases à interaction hydrophile (en anglais « Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography » (HILIC)) [113, 139]. L'ensemble de ces colonnes a été utilisé pour l'identification et la quantification des OVTXs, en association avec un spectromètre de masse (MS), permettant l'analyse des différents analogues d'ovatoxines, très proches structurellement, mais différenciables en l'absence d'une bonne résolution chromatographique, grâce aux différents rapports *m/z*. En effet, l'ensemble des colonnes décrites dans la littérature ne permet pas d'obtenir une séparation complète des OVTXs. Elles ne sont donc pas adaptées pour leur purification.

Si quelques protocoles ont été décrits dans la littérature pour la purification de la PLTX à partir de *Palythoa sp* [85, 221], ou pour l'obtention d'analogues, tels que les mascarenotoxines ou l'ostréocine-d à partir d'*Ostreopsis sp*. [118, 119], il n'existe que très peu de travaux décrivant la purification des ovatoxines. La purification de l'OVTX-a a été décrite dans la littérature. Celle-ci a été réalisée à partir d'une souche d'*Ostreopsis* produisant 77 % d'OVTX-a, sans produire d'OVTX-b et -c, deux ovatoxines éluées juste avant l'OVTX-a [26]. L'isolement des ovatoxines à partir d'une souche les produisant reste un challenge. Les protocoles de purification des PLTXs et analogues décrits dans la littérature sont généralement basés sur des prépurifications par extraction liquide-liquide, par extraction sur phase solide (SPE) et/ou par chromatographie flash, et en étape finale, l'utilisation de chromatographie liquide semi-préparative [26, 109, 114, 222, 223]. Néanmoins, très peu d'informations sont disponibles sur l'efficacité de ces purifications.

La stratégie mise en place durant dans cette thèse a consisté en l'extraction d'une quantité maximale de toxines, à partir de cultures d'*Ostreopsis cf. ovata*, suivie d'une pré-purification des extraits, afin d'obtenir une fraction concentrée en toxines d'intérêt (p-PLTX-OVTXs), et d'une purification finale par CL-SM-DAD, en utilisant des colonnes chromatographiques permettant d'obtenir une très bonne résolution.

A. Caractérisation des différentes ovatoxines dans les extraits d'*Ostreopsis cf. ovata* par CL-SMHR-QTOF

1. Identification des différentes ovatoxines

Avant d'envisager la purification des composés, la première étape a été d'identifier les toxines présentes dans l'extrait cellulaire de la microalgue. Les extraits d'*Ostreopsis cf. ovata* obtenus à partir des cellules en culture ont été analysés en chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse haute résolution (SM HR Q-TOF), en mode « full scan » et par dissociation induite par collision (fragmentation induite par un gaz inerte, en anglais *Collision Induced Dissociation* CID), en collaboration avec Manoëlla Sibat, du laboratoire Phycotoxine de l'Ifremer Centra Atlantique. Les toxines ont été analysées sur une colonne Kinetex C₁₈ (100×2,1 mm 1,7 μm), avec laquelle la séparation n'est pas complète mais suffisante pour obtenir les spectres de masse des OVTXs, en fonction de leur rapport *m/z* (Figure 67). À défaut d'étalon, leur identification par CL-SM/HR a pu être réalisée, par comparaison avec les spectres des OVTXs publiés dans la littérature [22, 23, 25]. Les formules élémentaires attribuées aux OVTX-a, -b, -c, -d, et -e extraites des souches françaises confirment qu'il s'agit d'ovatoxines très proches de celles décrites par Ciminiello et al [22] (Tableau 17), puisque les ions $[M+2H]^{2+}$, $[M+H+Ca]^{3+}$ et $[M-Fragment\ B - H_2O]^+$ des différentes OVTXs présentent les mêmes formules élémentaires, les erreurs en ppm étant généralement inférieurs à 10 ppm (annexe 5).

Tableau 17. Formules élémentaires, temps de rétention, et ions monoisotopiques (*m/z*) des OVTXs trouvées dans un extrait d'*Ostreopsis cf. ovata* de la souche française IFR-OST-0.3 V et déterminés par CL-HRSM-QTOF en mode positif *m/z* [100 – 1700].

	OVTX-a	OVTX-b	OVTX-c	OVTX-d	OVTX-e	
Formule élémentaire	C ₁₂₉ H ₂₂₃ N ₃ O ₅₂	C ₁₃₁ H ₂₂₇ N ₃ O ₅₃	C ₁₃₁ H ₂₂₇ N ₃ O ₅₄	C ₁₂₉ H ₂₂₃ N ₃ O ₅₃	C ₁₂₉ H ₂₂₃ N ₃ O ₅₃	
Ions moléculaires monoisotopiques	2646,4898	2690,5160	2706,5109	2662,4847	2662,4847	
Temps de rétention (min)	15,95	15,49	14,27	14,80	15,00	
<i>m/z</i>	$[M+2H]^{2+}$	1324,2505	1346,2653	1354,2627	1332,2471	1332,2488
	$[M+2H-H_2O]^{2+}$	1315,2469	1337,2589	1345,2441	1323,2442	1323,2287
	$[M+H+Ca]^{3+}$	896,1556	910,4952	916,1609	901,1480	901,1518
	$[M-Fragment\ B - H_2O]^+$	327,1904	371,2174	371,2165	327,1900	343,1861

L'ordre d'élution obtenu avec la colonne Kinetex C₁₈, utilisée pour l'analyse des OVTXs est le même que celui rapporté dans la littérature sur des phases stationnaires greffées en C₁₈ :

l'OVTX-c est éluee la première, suivie des OVTX-d et OVTX-e, de l'OVTX-b et de l'OVTX-a, toxine majoritaire. De plus, après l'OVTX-a, un autre composé est élué et semble être un nouvel analogue, en raison de ses fragmentations caractéristiques : l'ion [M-fragment B-H₂O]⁺ *m/z* 327,1, des ions dichargés et trichargés caractérisés par de multiples pertes d'eau, et un temps de rétention proche des OVTXs. De plus, il présente le même spectre UV que les autres ovatoxines, avec deux maxima d'absorption à 233 et 264 nm. Ce nouvel analogue a été nommé ovatoxine-h (OVTX-h). La lettre « h » lui a été attribuée car une nouvelle ovatoxine a été découverte dans une souche espagnole d'*Ostreopsis cf. ovata* par une équipe espagnole, qui l'a nommée OVTX-g (communication personnelle).

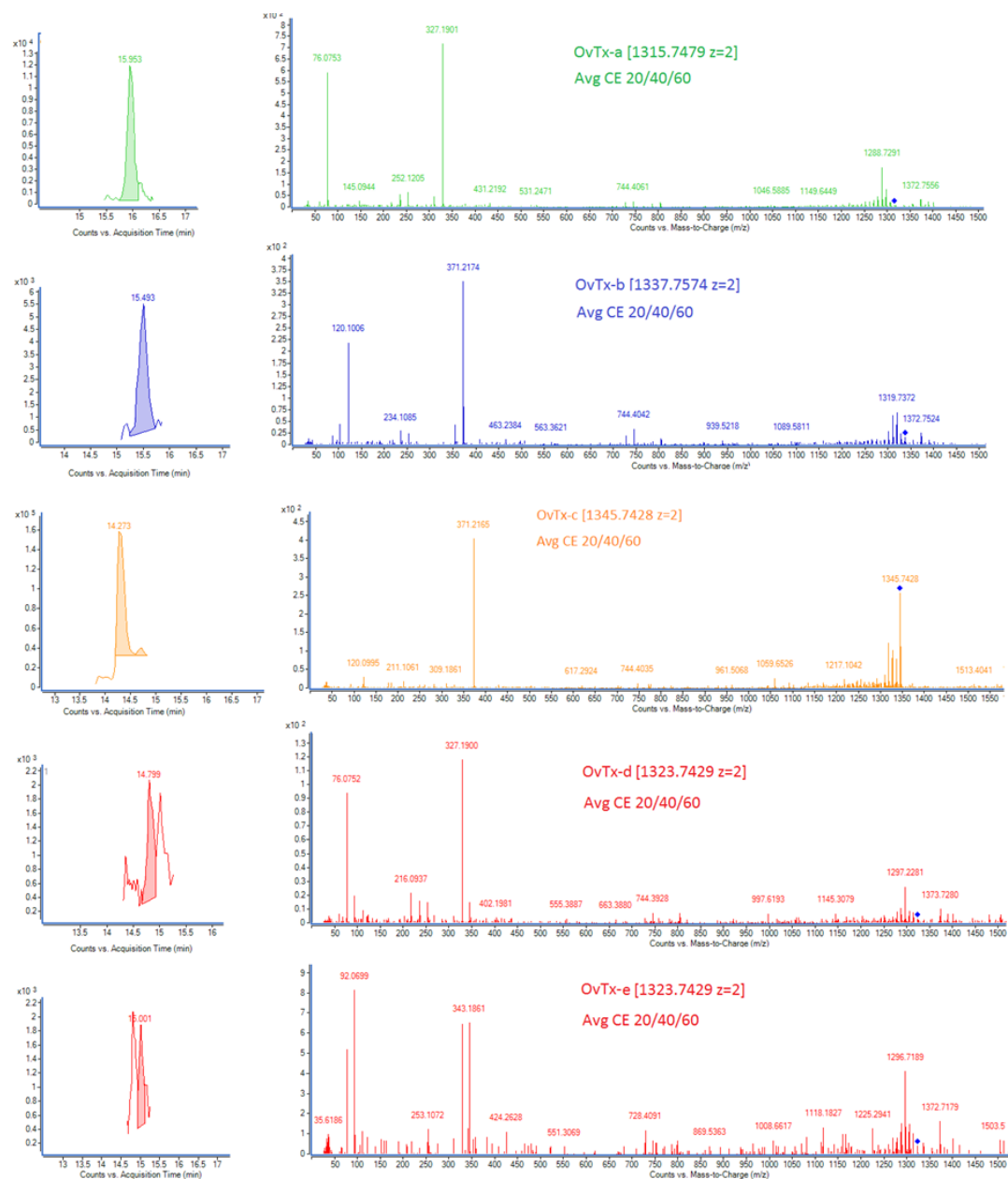


Figure 67. OVTXs détectées dans les extraits d'*Ostreopsis cf. ovata*. Les spectres SM HR QTOF ont été obtenus par fragmentation des ions di-chargés $[M+2H-H_2O]^{2+}$ des différentes OVTXs avec différentes énergies de collision : 20, 40 et 60 eV.

Par ailleurs, il faut noter qu'en plus de l'OVTX-g, une autre ovatoxine a été détectée lors des étapes de purification des extraits d'*Ostreopsis cf. ovata*. Il s'agit d'une ovatoxine éluée juste après l'OVTX-a (et avant l'OVTX-h) et possédant un spectre très semblable à l'OVTX-a. Sachant que des isomères des OVTXs ont déjà été rapporté dans la littérature [124], il pourrait s'agir d'un isomère de l'OVTX-a, nommée OVTX-a' dans cette thèse.

2. Caractérisation du nouvel analogue : l'ovatoxine-h

À défaut d'étalon, les attributions des formules élémentaires des OVTXs sont compliquées en raison de leur haut poids moléculaire, de la possibilité de multiples combinaisons pour les atomes de carbone, d'hydrogène, d'oxygène et d'azote, des pertes d'eau successives, et des adduits variés formés avec des cations mono- et divalents [23]. La détermination de la formule élémentaire de l'OVTX-h a été effectuée en considérant que son schéma de fragmentation est le même que celui des autres OVTXs décrites dans la littérature, et qu'elle forme les même adduits. La formule élémentaire déterminée pour l'OVTX-h est $C_{129}H_{225}N_3O_{51}$. Elle a été déduite à partir de la combinaison des informations tirées des profils isotopiques des ions di- et tri-chargés les plus abondants du spectre SM-HR de l'OVTX-h et des formules élémentaires déduites des ions les plus abondants :

- l'ion $[M+2H]^{2+}$ m/z 1317,7602 (ion monoisotopique m/z 1317,2569, $C_{129}H_{227}N_3O_{51}$, $\Delta = -3,45$ ppm),
- l'ion $[M+2H-1H_2O]^{2+}$ m/z 1308,7580 (ion monoisotopique m/z 1308,2519, $C_{129}H_{225}N_3O_{50}$, $\Delta = -1,15$ ppm),
- l'ion $[M+2H-2H_2O]^{2+}$ m/z 1299,7493 (ion monoisotopique m/z 1299,2474, $C_{129}H_{223}N_3O_{49}$, $\Delta = -3,77$ ppm),
- l'ion $[M+2H-3H_2O]^{2+}$ m/z 1290,7453 (ion monoisotopique m/z 1290,2434, $C_{129}H_{221}N_3O_{48}$, $\Delta = -3,77$ ppm),
- l'ion $[M+H+Ca]^{3+}$ m/z 891,4937 (ion monoisotopique m/z 891,1586, $C_{129}H_{226}N_3O_{51}Ca$, $\Delta = -1,19$ ppm),
- l'ion $[M+H+Ca-1H_2O]^{3+}$ m/z 885,4921 (ion monoisotopique m/z 885,1542, $C_{129}H_{224}N_3O_{50}Ca$, $\Delta = 0,97$ ppm),
- l'ion $[M+H+Ca-2H_2O]^{3+}$ m/z 879,4890 (ion monoisotopique m/z 879,1517, $C_{129}H_{222}N_3O_{49}Ca$, $\Delta = 3,15$ ppm).

À partir de cette étude, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'OVTX-h possède deux atomes d'hydrogène de plus et un atome d'oxygène de moins que l'OVTX-a. Une formule brute alternative ($C_{128}H_{221}N_3O_{52}$), correspondant à un CH_2 en moins par rapport à l'OVTX-a aurait également pu être proposée, à partir des ions majoritaires. Cependant, les différences de rapports m/z entre valeur expérimentale et théorique, correspondant aux ions caractéristiques, exprimés en

ppm pour chacun des ions des profils isotopiques déterminés pour cette formule sont supérieures à 10 ppm, elle a donc été rejetée (*cf.* annexe 6).

La détermination de la structure de l'OVTX-a a récemment été décrite dans la littérature. Elle a été effectuée par résonance magnétique nucléaire (RMN), en comparaison avec le spectre de la PLTX [26]. Cette étude a été complétée par de la SM-HR et a permis d'attribuer les fragmentations caractéristiques de la PLTX et de l'OVTX-a à plusieurs parties du squelette des molécules [25]. Afin d'identifier la région de la molécule où se trouvent les différences structurales entre l'OVTX-a et l'OVTX-h, des spectres de masse de ces deux ovatoxines après fragmentation SM² ont été acquis et analysés en parallèle par couplage de la CL-SM Q-TOF. Les informations structurales des deux toxines ont été obtenues, en fragmentant à la fois les ions précurseurs $[M+2H]^{2+}$ m/z 1317,7627, et $[M+H+Ca]^{3+}$ m/z 891,4935, pour l'OVTX-h, et les ions précurseurs $[M+2H]^{2+}$, m/z 1324,7543, et $[M+H+Ca]^{3+}$, m/z 896,1555, pour l'OVTX-a (Figure 68).

En accord avec l'étude de Ciminiello [25], différents types de fragments peuvent être observés dans le spectre de masse haute résolution (HR SM²). Tout d'abord, quelques fragments sont le résultat de la coupure simple de la molécule. Cette coupure aboutit à la formation d'ions mono- et di-chargés, correspondant soit au côté A de la molécule, contenant 2 N, soit au côté B de la molécule, contenant 1 N. Ces fragmentations peuvent être suivies par plusieurs pertes d'eau successives. D'autre part, deux coupures de la molécule peuvent être combinées, aboutissant à la formation de fragments internes. La plupart de ces ions sont des fragments présentant des adduits calcium, alors que d'autres sont des fragments protonés (Figure 69).

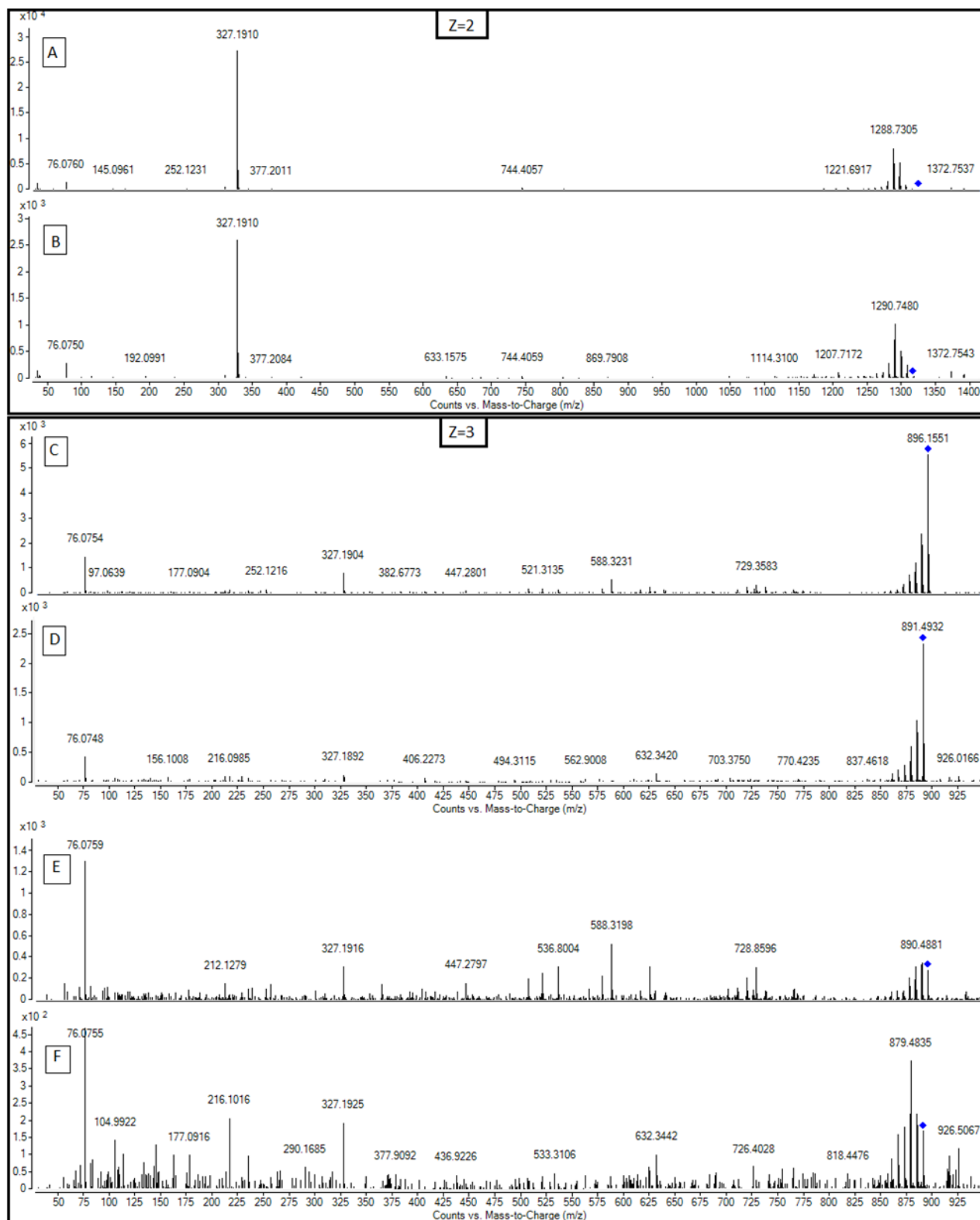


Figure 68. Spectres de masse HR CID SM² de l'ion dichargé [M+2H]²⁺ de (A) l'ovatoxine-a m/z 1324,7543 et de (B) l'ovatoxine-h m/z 1317,7627 à une énergie de collision de 20 eV et spectres HR CID SM² de l'ion trichargé [M+H+Ca]³⁺ de l'ovatoxine-a m/z 896,1549 à une énergie de collision de (C) 30 eV et (E) 40 eV et de l'ovatoxine-h m/z 891,4935 à une énergie de collision de (D) 30 eV et (F) 40 eV.

La comparaison entre les formules élémentaires des fragments de l'OVTX-h et de l'OVTX-a suggère que ces deux molécules possèdent le même squelette et permet de suggérer les parties de la molécule où se trouvent les différences structurales entre ces deux ovatoxines. Pour faciliter la comparaison, la numérotation des fragmentations qui a été choisie est la même que celle décrite par Ciminiello et al, [25] (Figure 69). Les résultats obtenus sont présentés dans les tableaux 18 et 19.

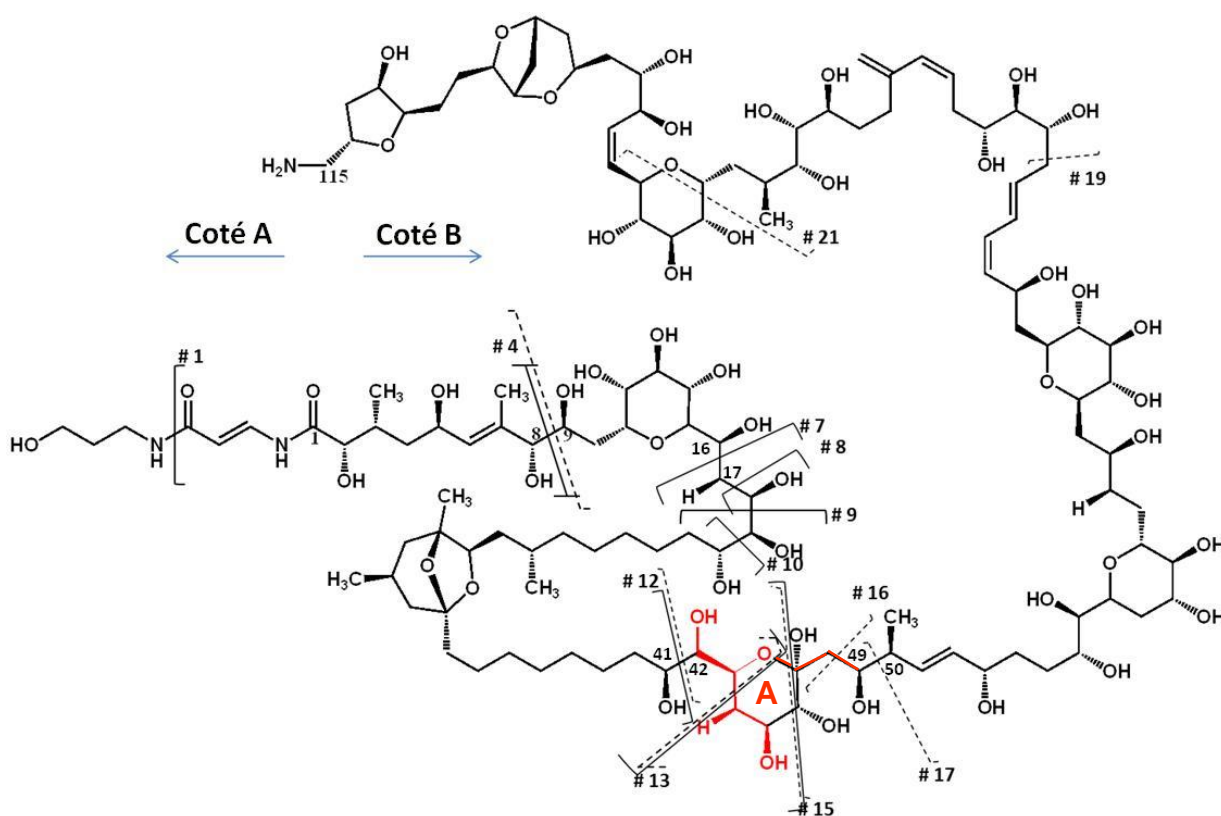


Figure 69. Structure de l'OVTX-a et ruptures obtenues en MS²HR CID pour l'OVTX-a et pour l'OVTX-h.

La numérotation des ruptures est la même que celle reportée dans la littérature [25]. Les lignes pleines correspondent aux ruptures qui ont généré deux fragments (du côté A et B de la molécule) ; les lignes en pointillé correspondent aux fragments internes. Les deux régions marquées en rouge désignent les parties de l'OVTX-h où les différences structurales sont suspectées, par comparaison avec l'OVTX-a.

Tableau 18. Attribution des fragments des cotés A et B issus des spectres HR CID SM² aux ruptures caractéristiques de l'OVTX-a et de l'OVTX-h.

Rupture [25]	OVTX-a						OVTX-h					
	<i>m/z</i>	Pertes d'eau	Charge des ions [♦]	Formule [♦]	DLR [♦]	Δ ppm [♦]	<i>m/z</i>	Pertes d'eau	Charge des ions [♦]	Formule [♦]	DLR [♦]	Δ ppm [♦]
# 4 / Coté A	327,1912 ^{a,b,c}	- 1 H ₂ O	1 +	C ₁₆ H ₂₇ O ₅ N ₂	4,5	-2,45	327,1911 ^a	- 1 H ₂ O	1 +	C ₁₆ H ₂₇ O ₅ N ₂	4,5	-2,75
# 4 / Coté B	1171,6305 ^a		2 +	C ₁₁₃ H ₁₉₅ O ₄₆ N ₂ Ca	17	-5,46	1164,6396 ^a		2 +	C ₁₁₃ H ₁₉₇ O ₄₅ N ₂ Ca	16	-1,07
# 12 / Coté A	536,8003 ^a		2 +	C ₅₂ H ₉₂ O ₁₈ N ₂ Ca	8	0,09	527,2916 ^a	- 1 H ₂ O	2 +	C ₅₂ H ₉₀ O ₁₇ N ₂ Ca	8	-3,17
	527,2896 ^a	- 1 H ₂ O		-6,96								
# 15 / Coté A	588,3217 ^a		2 +	C ₅₆ H ₁₀₀ O ₂₁ N ₂ Ca	8	-0,93	nd*					
# 16 / Coté A	625,3378 ^a		2+	C ₅₉ H ₁₀₆ O ₂₃ N ₂ Ca	8	-4,48	nd*					
# 16 / Coté B	737,8607 ^a		2+	C ₇₀ H ₁₁₇ O ₂₉ N ₂ Ca	13	-8,38	nd*					
	728,8589 ^a	- 1 H ₂ O		C ₇₀ H ₁₁₅ O ₂₈ N ₂ Ca		-3,70						
	719,8518 ^a	-2 H ₂ O		C ₇₀ H ₁₁₃ O ₂₇ N ₂ Ca		-6,24						
# 17 / Coté A	639,3346 ^a		2 +	C ₆₀ H ₁₀₆ O ₂₄ N ₂ Ca	9	-5,40	632,3446 ^a		2 +	C ₆₀ H ₁₀₈ O ₂₃ N ₂ Ca	8	-6,09
# 17 / Coté A	1390,7669 ^c		1 +	C ₆₉ H ₁₁₆ O ₂₇ N	12,5	4,72	1372,7534 ^c	- 1 H ₂ O	1 +	C ₆₉ H ₁₁₄ O ₂₆ N	12,5	-6,92
	1372,7629 ^c	- 1 H ₂ O		C ₆₉ H ₁₁₄ O ₂₆ N		-0,01						
# 19 / Coté B	804,4338 ^{b,c}		1 +	C ₃₉ H ₆₆ O ₁₆ N		-5,42	nd*					
# 21 / Coté A	1131,5913 ^a	- 1 H ₂ O	2 +	C ₁₀₇ H ₁₉₀ O ₄₅ N ₂ Ca		-19,46	nd*					
	1113,6230 ^b	- 3 H ₂ O		C ₁₀₇ H ₁₈₆ O ₄₃ N ₂ Ca		18,17						
# 21 / Coté B	406,2235 ^{a,c}		1 +	C ₂₂ H ₃₂ O ₆ N	7,5	1,33	406,2254 ^b		1 +	C ₂₂ H ₃₂ O ₆ N	7,5	6,01

[♦] Formule élémentaire des ions mono-isotopiques du profil isotopique(*m/z*), indiquée dans leur état de charge (1+, 2+, 3+), les doubles liaisons relatives (DLR), l'erreur (ppm).

* nd = non détecté;

^a : ions issus des spectres HR CID SM² : ion [M+H+Ca]³⁺ de l'ovatoxine-a (*m/z* 896,1549) et de l'ovatoxin-h (*m/z* 891,4935);

^b : ions issus des spectres HR CID SM² : ion [M+2H-H₂O]²⁺ de l'ovatoxine-a (*m/z* 1315,7479) et de l'ovatoxine-h (*m/z* 1308,7580);

^c : ions issus des spectres HR CID SM² : ion [M+2H]²⁺ de l'ovatoxine-a (*m/z* 1324,7543) et de l'ovatoxine-h (*m/z* 1317,7627).

Tableau 19. Attribution des fragments internes issus des spectres HR CID SM² aux ruptures caractéristiques de l'OVTX-a et de l'OVTX-h.

Rupture [25]	OVTX-a						OVTX-h					
	<i>m/z</i>	Pertes d'eau	Charge des ions [♦]	Formule [♦]	DLR [♦]	Δ ppm [♦]	<i>m/z</i>	Pertes d'eau	Charge des ions [♦]	Formule [♦]	DLR [♦]	Δ ppm [♦]
# 1 + # 4	234,1107 ^{a,b}		1 +	C ₁₃ H ₁₆ O ₃ N	6,5	-9,91	234,1131 ^{a,b}		1 +	C ₁₃ H ₁₆ O ₃ N	6,5	0,34
	216,1011 ^{a,b,c}	- 1 H ₂ O	1 +	C ₁₃ H ₁₄ O ₂ N	6,5	-6,25	216,1016 ^{a,c}	- 1 H ₂ O	1 +	C ₁₃ H ₁₄ O ₂ N	6,5	-3,93
# 4 + # 12	364,2005 ^a		2 +	C ₃₆ H ₆₄ O ₁₂ Ca	5	1,65	364,2063		2 +	C ₃₆ H ₆₄ O ₁₂ Ca	5	14,0
# 4 + # 13	394,2128 ^a		2 +	C ₃₈ H ₆₈ O ₁₄ Ca	5	2,66	nd*					
# 4 + # 15	416,2253 ^a		2 +	C ₄₀ H ₇₂ O ₁₅ Ca	5	1,08	nd*					
# 7 + # 12	521,3132 ^a		1 +	C ₂₈ H ₄₉ O ₆ Ca	4,5	-4,41	521,3124 ^a		1 +	C ₂₈ H ₄₉ O ₆ Ca	4,5	-5,95
# 9 + # 12	477,2835 ^a		1 +	C ₂₆ H ₄₅ O ₅ Ca	4,5	-12,15	477,2870 ^a		1 +	C ₂₆ H ₄₅ O ₅ Ca	4,5	-4,17
# 10 + #12	447,2779 ^a		1 +	C ₂₅ H ₄₃ O ₄ Ca	4,5	-1,79	447,2775 ^a		1 +	C ₂₅ H ₄₃ O ₄ Ca	4,5	-4,92

[♦] Formule élémentaire des ions mono-isotopiques du profil isotopique(*m/z*), indiquée dans leur état de charge (1+, 2+, 3+), les doubles liaisons relatives (DLR), l'erreur (ppm).

* nd = non détecté;

^a : ions issus des spectres HR CID SM² : ion [M+H+Ca]³⁺ de l'ovatoxine-a (*m/z* 896,1549) et de l'ovatoxin-h (*m/z* 891,4935);

^b : ions issus des spectres HR CID SM² : ion [M+2H-H₂O]²⁺ de l'ovatoxine-a (*m/z* 1315,7479) et de l'ovatoxine-h (*m/z* 1308,7580);

^c : ions issus des spectres HR CID SM² : ion [M+2H]²⁺ de l'ovatoxine-a (*m/z* 1324,7543) et de l'ovatoxine-h (*m/z* 1317,7627).

Tout d'abord, la rupture #4 (entre le C8 et le C9) génère un ion (m/z environ 327,2) du côté A de même composition élémentaire pour l'OVTX-a et l'OVTX-h. De même, la rupture # 17 (entre le C49 et le C50), génère également un ion (m/z environ 1372,7), du côté B, de même composition élémentaire. On peut donc en conclure que les différences structurales se situent entre le C9 et le C50. De plus, l'analyse des ions fragments complémentaires (#4-côté B et #17 côté-A) pour ces deux molécules montre que ces ions (m/z 1171,6 et 639,3 pour l'OVTX-a et m/z 1164,6 et 632,3 pour l'OVTX-h) diffèrent de 7 unités. Comme ce sont des ions dichargés, on peut donc émettre l'hypothèse que ces deux fragments diffèrent de 14 uma, correspondant à la perte d'un atome d'oxygène et l'addition de deux atomes d'hydrogène pour l'OVTX-h comparée à l'OVTX-a.

Les ions fragments internes issus des ruptures #4 + #12 (m/z environ 364,2) sont les mêmes pour l'OVTX-a et pour l'OVTX-h, suggérant qu'elles partagent la même structure entre C17 et C41. Ceci est confirmé pour les ions fragments internes issus des ruptures #7 + #12, #9 + #12 et #10 + #12 qui sont identiques pour les deux toxines. Toutes ces observations permettent de conclure que les différences structurales se trouvent entre C42 et C49.

Par ailleurs, la détermination du nombre de doubles liaisons relatives (DLR) pour les fragments #4 coté B et #17 coté A montre qu'il existe une différence pour ces fragments entre l'OVTX-a et l'OVTX-h (tableau 18). Connaissant la structure de l'OVTX-a, et compte tenu du fait que l'OVTX-h présente une double liaison relative de moins pour ces fragments, il est permis de suggérer que le cycle A de l'OVTX-a (Figure 69) présente une ouverture dans l'OVTX-h. Une étude complémentaire sera nécessaire pour élucider la structure complète de l'OVTX-h et confirmer nos hypothèses.

B. Méthodologie mise en œuvre pour la purification des extraits d'*Ostreopsis cf. ovata*

1. Étude préliminaire : vérification du relargage des toxines dans le milieu de culture

L'extraction et la purification des ovatoxines ont été envisagées à partir de cultures d'*Ostreopsis cf. ovata*. Certaines publications font état de 30 % de relargage des toxines dans le milieu, à la fin de la phase stationnaire de croissance [207]. Si de telles proportions de relargage de toxines sont observées dans nos cultures, cela nécessiterait de mettre au point une méthode d'extraction, à la fois à partir des cellules, mais aussi à partir du milieu de culture.

Le caractère amphiphile des toxines ajoutant une difficulté supplémentaire pour leur extraction, deux techniques ont été comparées pour déterminer la proportion de toxines relarguées dans le milieu : (i) l'extraction liquide-liquide, en utilisant le butanol (BuOH) comme solvant d'extraction, (ii) l'extraction solide-liquide utilisant une phase solide (SPE) constituée de résine HP20. La première technique est couramment décrite dans la littérature pour extraire les p-PLTX-OVTXs des milieux de culture, en réalisant 3 extractions successives d'un volume de culture par un volume équivalent de BuOH [21, 207]. Le butanol a été choisi car, d'une part, c'est un solvant non miscible à l'eau, et d'autre part, il est capable de solubiliser les p-PLTX-OVTXs. La seconde méthode a déjà été utilisée au laboratoire Phyc. pour récupérer d'autres toxines (azaspiracides) à partir de milieux de culture d'*Azadinium* [224]. De plus, les résines HP20 sont décrites comme étant adaptées pour l'extraction solide-liquide de grosses molécules, en raison de leur grande taille de pores (Tableau 19).

Tableau 19. Caractéristiques de la résine Diaion HP20 (données fournisseur).

Diaion HP20	
Nature de la phase	Polymère de styrène -divinylbenzène
Taille des particules	250-850 μm
Taille des pores	$\sim 260 \text{ \AA}$
Surface	$\sim 500 \text{ m}^2/\text{g}$

1.1. Efficacité de l'extraction liquide-liquide des OVTXs par le butanol

Dans un premier temps, la méthode d'extraction liquide/liquide par le BuOH a été testée sur une solution d'étalon de PLTX diluée dans du milieu de culture. Cette solution a été extraite plusieurs fois avec du butanol afin d'estimer l'efficacité de cette méthode.

La première vérification a été de contrôler que les rendements d'extraction sont suffisamment grands, lorsque l'on réalise trois extractions successives d'un volume de milieu de culture dopé avec de la PLTX par le même volume de butanol (BuOH). Les résultats obtenus ont permis de montrer qu'à la 4^{ème} et à la 5^{ème} extraction, les quantités de toxines récupérées sont très faibles, prouvant que trois extractions suffisent pour extraire la quasi-totalité des toxines de départ. Pour déterminer les rendements de récupération, deux concentrations de dopage du milieu de culture ont été testées. Pour cela le protocole suivi a consisté à utiliser deux solutions de milieu de culture auxquelles ont été ajoutées de la PLTX étalon, afin d'obtenir deux concentrations différentes (0,5 et 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) et de réaliser trois extractions successives avec le même volume de BuOH (Figure 70). Ces concentrations ont été choisies car elles correspondent à un compromis

entre des faibles concentrations de toxines relarguées que l'on s'attend à avoir dans le milieu [207] et des concentrations qui puissent être détectées. Les extraits ont été rassemblés, évaporés et repris avec le même volume de MeOH/H₂O 1/1 (v/v). Une aliquote a été filtrée sur Nanosep 0,2 µm et analysée en CL-SM/SM.

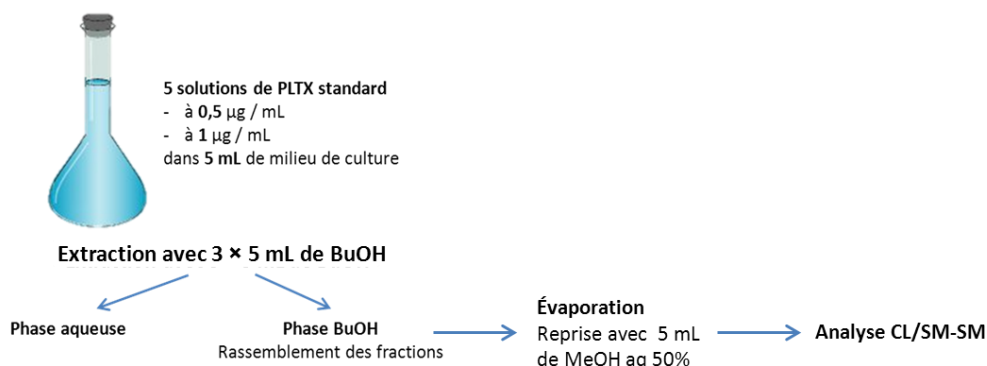


Figure 70. Protocole d'extraction liquide-liquide de la PLTX à partir du milieu de culture.

Ce protocole a été réalisé 5 fois, aux deux niveaux de concentrations, pour valider la répétabilité, et reproduit à deux jours d'intervalle, afin de tester la reproductibilité. Une moyenne des rendements de récupération des toxines sur les cinq répliques aux deux concentrations, différentes est présentée dans le Tableau 20.

Tableau 20. Moyennes des pourcentages de recouvrement obtenus par extraction liquide-liquide avec du butanol, coefficients de variations et recouvrement sur les 10 extractions réalisées sur les deux jours d'analyse.

Concentration	Jour	Moyenne (n=5)	Coefficient de variation (%)	Recouvrement (%)
1 µg.mL ⁻¹	J 1	0,564	20	56
	J 2	0,691	13	69
	Moyenne	0,620	19	62
	J1 +J2			
0,5 µg.mL ⁻¹	J 1	0,252	32	51
	J 2	0,308	12	62
	Moyenne J1 +J2	0,280	24	56
Bilan			20	60
Ciminiello [225]			<3,2	73-82
Guerrini [207]				45

Pour une concentration de dopage de 1 µg.mL⁻¹, la moyenne de recouvrement sur les deux jours est de 62 %, avec un coefficient de variation moyen de 19 %, tandis que pour une concentration

de dopage de $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, la moyenne de recouvrement sur les deux jours est de 56 %, avec un coefficient de variation moyen de 24 %. La récupération des toxines semble donc plus difficile pour de faibles concentrations. Globalement, la moyenne de récupération pour tous les échantillons est voisine de 60 % avec un coefficient de variation de 20 %. Ce taux de récupération est plus faible que celui décrit par Ciminiello (73-82%) [225] mais plus fort que celui décrit par Guerrini (45 %) [207]. De plus, les coefficients de variation sont bien plus forts que ceux indiqués par Ciminiello.

Quoi qu'il en soit, bien que cette méthode d'extraction ne permette d'obtenir que 60 % de récupération des toxines à partir du milieu de culture, l'objectif de cette étude préliminaire est de déterminer le taux de relargage des toxines dans le milieu de culture. Par conséquent, la détermination d'une valeur approximative suffit, à la condition que l'on tienne compte du pourcentage de récupération. Une autre technique d'extraction sur phase solide Diaion HP20 a tout de même été testée et comparée, dans le but d'utiliser éventuellement la méthode la plus performante pour l'extraction des OVTXs à partir du milieu de culture d'*Ostreopsis*.

1.2. Efficacité de l'extraction en phase solide sur résine HP20

1.2.1. Évaluation de la phase HP20

La première étape a consisté à évaluer la faisabilité de l'extraction sur phase solide HP20. Pour cela, 200 mg de résine ont tout d'abord été activés avec du méthanol durant toute une nuit, puis la résine a été transférée dans une colonne en verre de 6 mL et maintenue entre deux frittés en téflon, et enfin rincée avec de l'eau MilliQ. Une solution d'étalon de PLTX à $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a été chargée sur la résine. La fraction de chargement a été récupérée à la sortie de la colonne, afin de vérifier que toute la PLTX s'est adsorbée sur la résine. La résine a ensuite été rincée avec 2 mL d'eau MilliQ, la solution de rinçage étant récupérée à la sortie de la colonne en dix fractions de 200 μL , afin de vérifier que la PLTX chargée en tête de colonne n'est pas éluée avec le solvant de rinçage, et dans le cas contraire, le suivi a pour but de connaître le volume nécessaire à l'élué des toxines. Enfin, les toxines ont été éluées de la résine avec du MeOH 100 %, et de la même manière, l'éluât a été récupéré par fractions de 200 μL , afin de déterminer le volume de MeOH nécessaire pour éluer la totalité de la PLTX chargée en tête de colonne.

Tous les éluâts récoltés, ainsi que la solution d'étalon de PLTX ont été filtrés et analysés en CL/SM-SM, en parallèle de la manipulation (Figure 71).

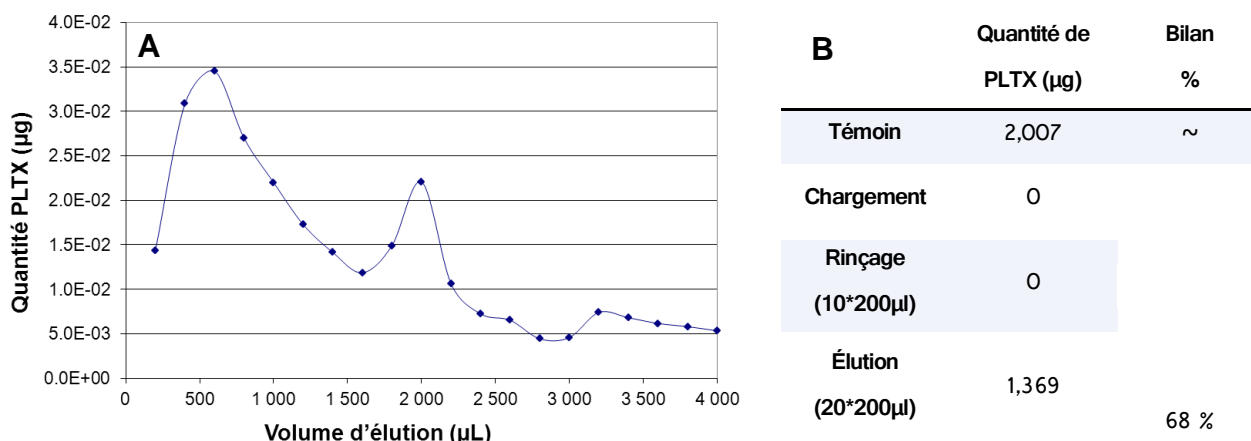


Figure 71. (A) Suivi de l'élution par du méthanol des PLTXs de la résine HP20 et (B) calcul des rendements pour chaque étape.

Tout d'abord, il faut noter que lors du chargement et du rinçage, aucune toxine n'a été récupérée dans l'éluât, ce qui signifie que la PLTX reste adsorbée sur la résine, lors de ces deux étapes. Lors de l'élution (Figure 71-A), il s'est avéré qu'un volume de 2 mL de MeOH n'était pas suffisant pour récupérer la totalité de la PLTX chargée en tête de colonne. Par conséquent, un volume supplémentaire de 2 mL a été utilisé pour l'élution, après que la résine ait été à sec pendant un instant. C'est pourquoi, un pic apparaît aux alentours de 2 mL. À partir de 3 mL, la quantité de PLTX présente dans l'éluât ne varie plus et reste au-dessous de la limite de quantification. Cependant, la quantité totale récupérée ne correspond qu'à 68 % de la quantité de dopage.

Dans cet essai, le rendement de récupération des toxines est supérieur à celui de l'extraction butanolique. Cependant, ce pourcentage de récupération reste inférieur à 100 %. Les raisons peuvent être multiples, telles que des pertes sur les parois de verre, efficacité du solvant d'élution...

1.2.2. Choix du solvant d'élution le plus adapté

Dans la seconde partie de la mise au point, l'objectif était de trouver le solvant permettant d'éluer le maximum de toxines. Sachant que les p-PLTX-OVTVs sont des molécules amphiphiles et qu'elles ne sont pas solubles dans le dichlorométhane ou le *n*-hexane, différents mélanges de MeOH-H₂O ont été testés : MeOH 100%, MeOH/H₂O 1/1 (v/v) et MeOH/H₂O 1/9 (v/v), sur trois colonnes indépendantes remplies avec de la phase HP20. Les colonnes ont été préparées de la même manière que précédemment, la phase a tout d'abord été activée, puis rincée avant d'être

introduite dans la colonne. La concentration en PLTX a été diminuée à $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et le volume d'élution augmenté à 4,5 mL, afin de pouvoir récupérer la totalité de la PLTX déposée en tête de colonne. Les trois colonnes remplies avec de la résine HP20 ont été éluées en parallèle pour tester les trois solvants d'élution.

Tous les éluats récoltés, ainsi qu'une aliquote de la solution d'étalon de PLTX de dopage, ont été filtrés et analysés en CL-SM/SM. D'après les résultats, le mélange MeOH/H₂O 1/9 (v/v) ne permet pas d'éluer les toxines de la résine. Ce mélange doit contenir un pourcentage d'eau trop important, et comme démontré lors du rinçage de la phase, l'eau ne permet pas d'éluer les toxines de la résine. Pour les deux autres solvants d'élution, les résultats sont présentés dans la Figure 72 et le Tableau 21.

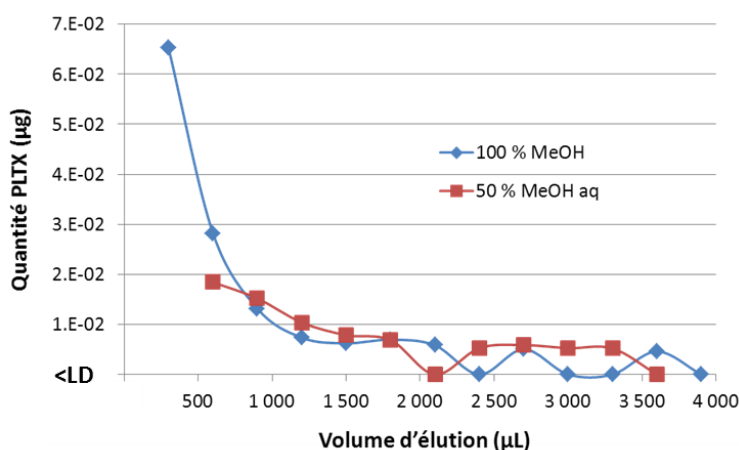


Figure 72. Suivi de l'élution de la PLTX à partir de la résine HP20 avec différents solvants d'élution : MeOH 100% et MeOH/eau 1/1 (v/v).

Tableau 21. Pourcentage de récupération des toxines à chaque étape de l'extraction liquide-solide (SPE) avec une résine HP20, pour les différents solvants d'élution testés (LD : $0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

Étape de l'extraction SPE		Récupération %
MeOH	Chargement / Rincage	< LD
	Élution	53
MeOH-eau 1/1 (v/v)	Chargement / Rincage	< LD
	Élution	29
MeOH-eau 1/9 (v/v)	Chargement / Rincage	< LD
	Élution	< LD

Les pourcentages de récupération des toxines sont de 53 % avec le MeOH 100 % et de 29 % avec un mélange MeOH/H₂O 1/1 (v/v). Cela indique que le MeOH, bien que ne permettant pas la récupération totale des toxines, est un solvant plus éluant que le mélange méthanol-eau. Ces résultats obtenus, montrant que le MeOH est le solvant le plus efficace pour éluer les analogues de PLTXs de la résine HP20, ont été confirmés ultérieurement [226].

Les données du Tableau 21 montrent d'une part que les toxines ne sont pas éluées au moment du chargement et du rinçage de la colonne, ce qui permet de dire que les toxines sont restées sur la colonne, mais aussi que la totalité de la PLTX déposée en tête de colonne n'est pas éluee. Cette perte peut être liée à la présence de groupements amines chargés positivement, et qui entraînerait des adsorptions de la PLTX sur les parois de la colonne et du fritté en verre peuvent être suspectées. C'est pourquoi, des essais ont été effectués afin d'évaluer l'impact de ces adsorptions potentielles.

1.2.3. Évaluation des adsorptions sur les parois

Pour évaluer s'il existe des adsorptions entre la PLTX et les parois de la colonne, différents types de colonnes, de matériaux différents, ont été testés et comparés : 1) une colonne en verre associée à un fritté en téflon, 2) une colonne de polypropylène associée à un fritté également en polypropylène, et 3) une colonne en verre avec fritté en téflon et un ajout de formiate d'ammonium au solvant de dilution de la PLTX. En effet, afin de limiter l'absorption des PLTXs sur les parois de la colonne en verre, une solution de formiate d'ammonium (1 %) a été ajoutée à la solution d'étalon de PLTX. Pour vérifier que le mécanisme de rétention de la PLTX sur la colonne est lié à une interaction avec la phase HP20, deux autres colonnes témoins ont également été testées, dans lesquelles seuls les frittés ont été introduits dans la colonne de verre. Dans la première colonne, les frittés sont accolés, dans la seconde ils sont distants de 1 cm.

Un total de cinq colonnes est donc testés : 1) une colonne en plastique, 2) une colonne en verre, 3) une colonne en verre pour laquelle la PLTX est en solution avec du formiate d'ammonium, et qui contiennent toutes les trois de la résine HP20 ; deux colonnes en verre sans résine : 4) une colonne avec les frittés accolés et 5) une colonne avec les frittés distants de 1 cm. Tous les éluats récoltés, ainsi qu'une aliquote de la solution étalon de PLTX sont filtrés et analysés en CL-SM/SM (Figure 73 : Tableau 22).

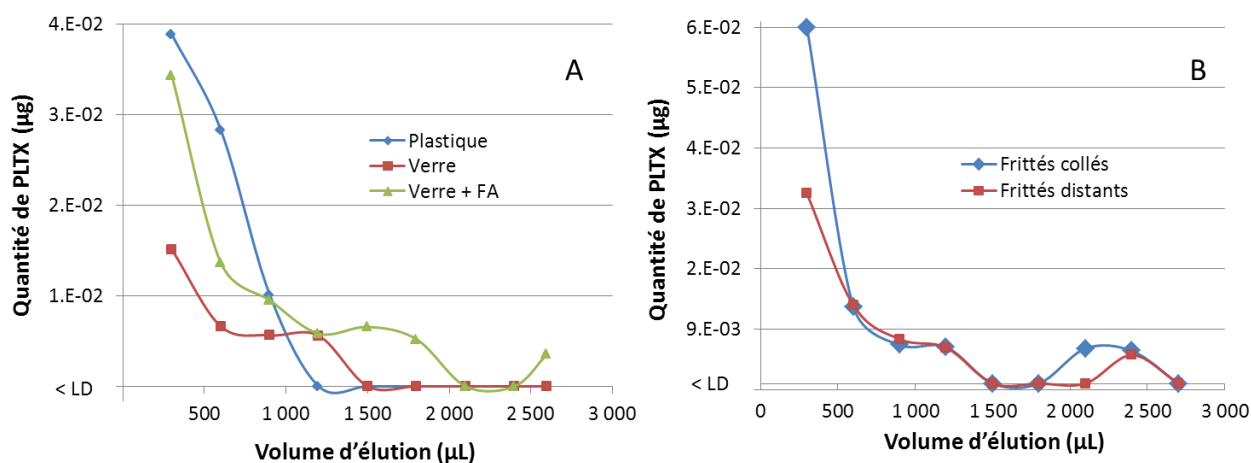


Figure 73. Suivi de l'éluion, par du MeOH, de la PLTX à partir : (A) de colonnes de différente nature, remplies avec de la résine HP20 et possédant des frités en téflon : colonne de verre, colonne de polypropylène et colonne de verre avec échantillon de PLTX additionné de formiate d'ammonium ; et (B) de colonnes de verre sans résine avec des frités de téflon accolés ou distants de 1 cm.

Tableau 22. Pourcentage de récupération de la PLTX à chaque étape (chargement, rinçage et éluion) sur tous les types de colonnes testés (plastique, verre, verre + solution de formiate d'ammonium (AF) et sans résine) (LD = 0,015 µg.mL⁻¹).

% Récupération					
	Plastique	Verre			
		+ Formiate d'ammonium	Frittés collés	Frittés distants	
Chargement	< LD	< LD	< LD	3	< LD
Rinçage	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
Éluion	26	11	26	55	34

Tout d'abord, les résultats ci-dessus montrent que la PLTX est totalement retenue lors des étapes de chargement et de rinçage, même lorsque les colonnes ne possèdent pas de résine HP20, les 3 % de toxines récupérées pour les frités collés étant considérés comme négligeables. Dans tous les autres cas, les concentrations en PLTX dans les éluâts de chargement et de rinçage sont inférieures à la LD (< 0,015 µg.mL⁻¹). Lorsqu'on compare les éluions dans les colonnes remplies de phase HP20 dont les parois sont en plastique ou en verre, on voit que la colonne en

verre retient une quantité plus importante de composé, puisque seulement 11 % de la PLTX déposée en tête de colonne est récupérée en sortie de colonne, comparés au 26 % pour la colonne en plastique. Le verre retient donc plus la PLTX que le plastique. Lorsque du formiate d'ammonium est ajouté à la solution de PLTX, une proportion plus importante de toxine est récupérée lors de l'élution, ce qui suggère qu'il y a bien des interactions entre la PLTX et le verre. Quand la résine est absente de la colonne, on note globalement une récupération plus importante, ce qui indique que la résine participe à la rétention de la PLTX. Quand les frittés sont distants, la PLTX peut interagir de façon plus importante avec les parois et est donc adsorbée de façon plus importante, ce qui explique que le pourcentage de récupération (34 %) soit moins important que lorsque que les frittés sont collés (55 %).

Les résultats montrent donc que la PLTX s'adsorbe sur les parois des colonnes en verre. L'efficacité de la résine HP20 pour extraire les p-PLTX-OVTXs d'une solution aqueuse et les récupérer totalement n'a donc pas pu être montrée de manière certaine. D'autres études ont par la suite confirmé que la résine HP20 n'est pas la phase la plus adéquate pour l'extraction des PLTX-OVTXs, les cinétiques d'adsorption et de désorption de cette résine étant plus lentes que celles obtenues avec d'autres phases stationnaires dédiées à l'extraction SPE (OASIS HLB et Strata X) [226].

Indépendamment de ces problèmes de perte d'OVTXs, l'utilisation du MeOH 100% permet d'obtenir un rendement d'extraction d'environ 55 %. Par conséquent, en se basant sur les rendements des deux types d'extraction (liquide-liquide et liquide-solide), la quantité d'ovatoxines relarguée dans le milieu de culture d'*Ostreopsis* pourra être estimée à partir du milieu de culture, qui était rappelés le, l'objectif de ces essais.

1.3. Application des deux types d'extraction au milieu de culture d'*Ostreopsis cf. ovata*

Une culture de 250 mL d'*Ostreopsis cf. ovata* (IFR-OST-0.1 V) de 21 jours a été filtrée sur un filtre de 20 µm, afin de séparer les cellules du milieu de culture. Ce dernier a ensuite été extrait avec les deux méthodes mises au point : l'extraction liquide-liquide avec du butanol et l'extraction liquide-solide sur une phase HP20. Le protocole détaillé est résumé en Figure 74.

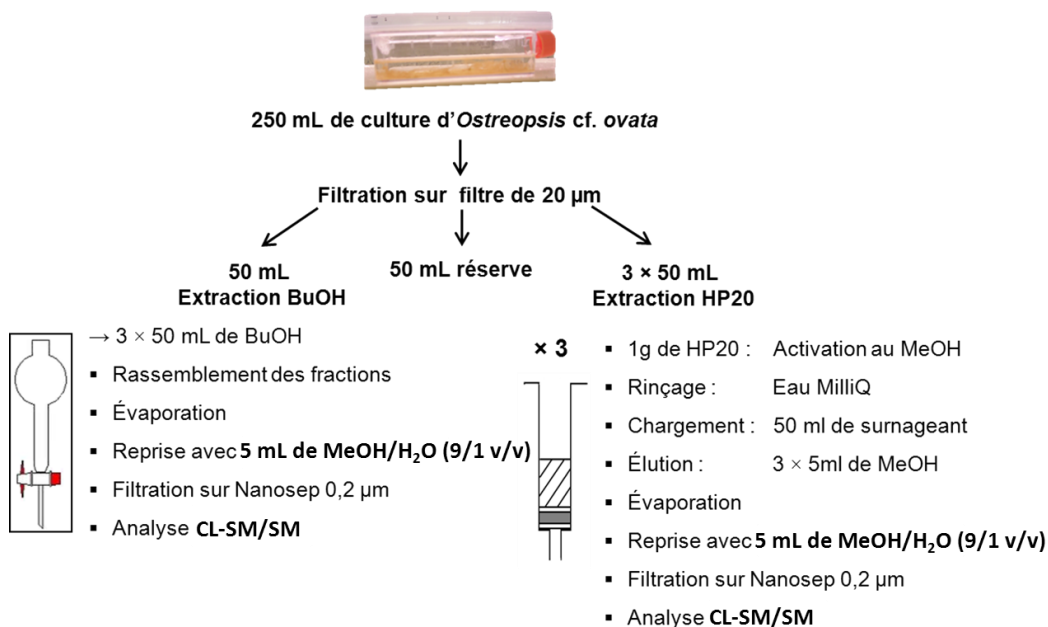


Figure 74. Protocole d'évaluation du relargage des toxines dans le milieu de culture.

Les résultats obtenus en CL-SM/SM ont été corrigés, pour tenir compte du rendement de récupération des toxines déterminés lors des études précédentes pour chaque méthode d'extraction (Tableau 23).

Tableau 23. Quantités et pourcentages de toxines récoltées avec chaque technique d'extraction.

Méthode d'extraction	Quantité (µg)	Estimation du % de PLTX relarguées dans le milieu
Éluion HP20-1	0,54	0,51
Éluion HP20-2	0,75	0,67
Éluion HP20-3	0,47	0,45
BuOH	0,70	0,67

Les résultats obtenus en utilisant la résine HP20, ou l'extraction avec le BuOH, montrent que le relargage des toxines dans le milieu de culture est très faible, avec des résultats de 0,61 µg en moyenne (soit 0,57 %) de toxines relarguées dans le milieu. Quoiqu'il en soit, tous les résultats montrent que le relargage est inférieur à 1 %, ce qui est considéré comme négligeable.

Ceci permet de conclure que les cellules d'*Ostreopsis cf. ovata* ne relarguent pratiquement pas de toxines dans le milieu de culture, notamment pendant la phase stationnaire, c'est-à-dire au moment où les cellules seront récoltées. Il n'est donc pas nécessaire de développer de méthode d'extraction des toxines à partir du milieu de culture. Par conséquent, la purification des ovatoxines a donc été effectuée uniquement à partir d'extraits cellulaires d'*Ostreopsis cf. ovata*,

obtenus après récupération des cellules d'*Ostreopsis* par centrifugation puis sonication de la pâte d'algue obtenue dans un mélange MeOH/H₂O 1/1 (v/v).

2. Mise au point d'une méthode de prépurification des extraits d'*Ostreopsis cf. ovata*

Lorsque que les parois des cellules d'*Ostreopsis* sont rompues par sonication, tout le contenu cellulaire est déversé dans le solvant d'extraction. Lors de la purification, il faudra donc éliminer la plus grande partie de ces composés présents dans les cellules. Ces molécules peuvent être tout aussi bien des molécules de haut ou de bas poids moléculaire et/ou de polarité différente. Ces différentes propriétés physico-chimiques ont été prises en compte pour élaborer une méthode de pré-purification de l'extrait d'*Ostreopsis*, en jouant à la fois sur les différences stériques et physico-chimiques.

2.1. Partition liquide-liquide

L'extraction liquide-liquide est une méthode d'extraction couramment décrite dans la littérature dans les étapes de purification des toxines, notamment en utilisant du dichlorométhane ou du *n*-hexane. Le *n*-hexane est souvent choisi pour éliminer les composés non-polaires, alors que le dichlorométhane (DCM) est principalement utilisé pour éliminer les composés moyennement polaires. Ces deux solvants sont non-miscibles au solvant d'extraction des cellules (MeOH/H₂O 1/1 (v/v)), et ne solubilisent pas les p-PLTX-OVTXs.

Afin de juger de la pertinence d'une extraction liquide-liquide, comme étape préalable de purification de l'extrait d'*Ostreopsis cf. ovata*, 10 mL d'extrait de microalgue, préparé à partir de 2 g de culot de pâte d'algues, a été séparé en deux parties équivalentes. À l'une des deux parties a été ajouté 0,2 % d'acide acétique, afin d'augmenter la protonation des p-PLTX-OVTXs et donc leur solubilité dans la phase hydro-méthanolique. Ces deux échantillons ont ensuite été extraits en parallèle, soit avec trois fois 3 mL de dichlorométhane, soit avec trois fois 3 mL de *n*-hexane. Les phases organiques ont ensuite été combinées. Chacune des phases obtenues (aqueuses et organiques) a été évaporée, pesée puis reprise dans du MeOH/H₂O 1/1 (v/v), avant d'être filtrée et analysée en CL-SM/SM. Ce protocole est résumé dans la Figure 75.

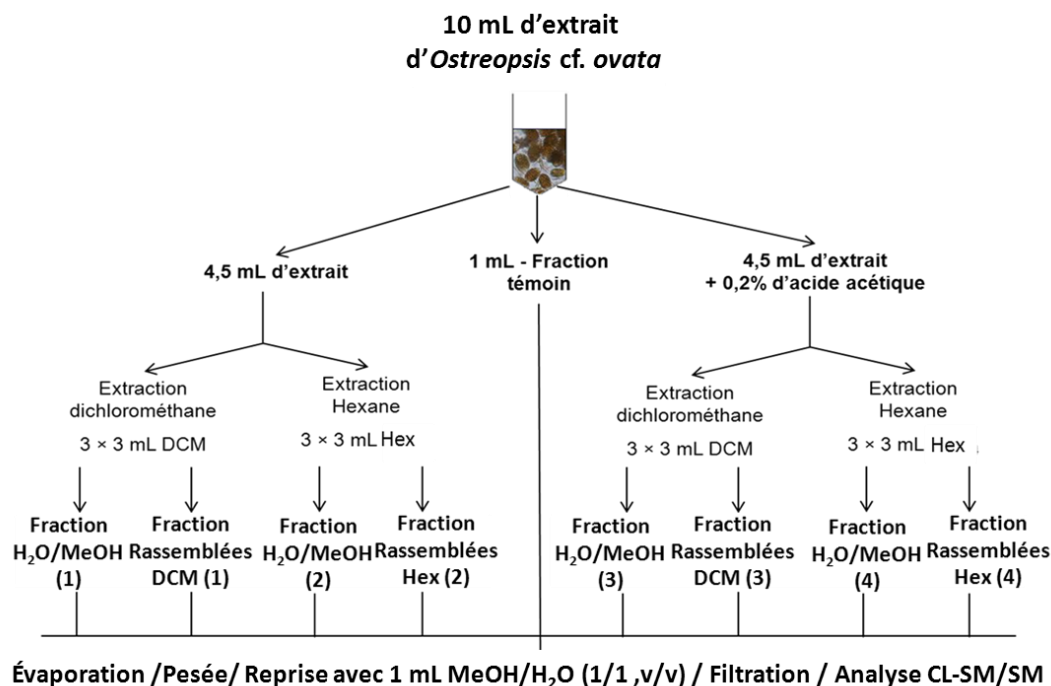


Figure 75. Protocole de purification d'un extrait d'*Ostreopsis cf. ovata* par extraction liquide/liquide.

Les résultats présentés dans le Tableau 24 représentent le pourcentage de toxines présentes dans chaque fraction récupérée ainsi que les bilans massiques obtenus (en %) pour chaque phase.

Tableau 24. Rendement en p-PLTX-OVTXs et bilans massiques de chaque fraction obtenue (aqueuse et organique), acidifiée et non acidifiée.

Fractions		Pourcentage de toxines	Bilan massique %
Extrait d'<i>Ostreopsis</i> non acidifié	MeOH/H ₂ O (1)	92	71
	Dichlorométhane (1)	0,8	0,5
	MeOH/H ₂ O (2)	78	92
	<i>n</i> -hexane (2)	2	2
Extrait d'<i>Ostreopsis</i> acidifié avec 0,2 % d'acide acétique	MeOH/H ₂ O (3)	76	108
	Dichlorométhane (3)	0,6	1
	MeOH/H ₂ O (4)	79	95
	<i>n</i> -hexane (4)	5	6

Tout d'abord, les résultats montrent que la majorité des toxines reste dans la phase hydro-méthanolique et n'est pratiquement pas extraite par la phase organique, qu'il s'agisse de DCM ou de *n*-hexane, confirmant notre hypothèse de départ. Par ailleurs, le bilan massique indique

également que la quasi-totalité des composés indésirables reste également dans la phase hydro-méthanolique. Cette méthode n'est donc pas appropriée comme première étape de purification. L'extraction liquide-liquide est pourtant une méthode utilisée dans la littérature comme étape de purification des OVTXs, mais l'efficacité de la méthode n'est pas démontrée.

L'extraction liquide-liquide à l'aide de dichlorométhane ou de *n*-hexane n'a donc pas été retenue comme première étape de purification de l'extrait d'*Ostreopsis cf. ovata*. D'autres méthodes ont donc été envisagées

2.2. Ultrafiltration

Les extraits d'*Ostreopsis cf. ovata* peuvent contenir des composés de haut et de faible poids moléculaire comme des protéines, des polysaccharides ou des sels. L'idée de cette expérimentation a été tout d'abord d'éliminer les grosses molécules de l'extrait, par filtration au travers de différentes membranes possédant des seuils de coupures différents : 100 000 Da, 10 000 Da et 5 000 Da. Avec un poids moléculaire avoisinant 2 680 Da, les p-PLTX-OVTXs devraient passer au travers de toutes les membranes sélectionnées. En guise de témoin, un filtre Nanosep de 0,2 μm , utilisé couramment avant une analyse de ces toxines en CL-SM/SM, a également été testé.

Un extrait d'*Ostreopsis cf. ovata* (5 mL) a été préparé à partir d'un culot de cellules (1 g). Chacun des filtres de seuil de coupure différents a été testés en triplicat, en filtrant à chaque fois environ 300 μL d'extrait. Les résultats présentés dans le Tableau 25 sont les moyennes des trois concentrations obtenues pour chaque seuil de coupure utilisé, ainsi que leur coefficient de variation.

Tableau 25. Pourcentages moyens en p-PLTX-OVTXs obtenus dans les filtrats pour chaque filtre ainsi que les coefficients de variations correspondants.

Filtre (seuil de coupure (Da))	Pourcentage de toxines récupérées	CV %
100 000	~ 100 %	5
10 000	~ 100 %	2
5 000	~ 63 %	9
0,2 μm	~ 100 %	7

Les résultats du Tableau 25 montrent que la filtration au travers des membranes présentant un seuil de coupure de 100 000 et 10 000 Da permet d'obtenir la totalité des toxines dans le filtrat. Les faibles quantités d'extrait mises en jeu dans ce test n'ont pas permis d'effectuer des bilans massiques. Cependant, l'analyse des chromatogrammes des filtrats, obtenus en CL couplée à la spectrométrie de masse basse résolution, en mode « full scan », a montré qu'il restait pratiquement autant de composés indésirables après passage au travers de ces membranes, par comparaison avec les chromatogrammes du témoin (filtre Nanosep de 0,2 µm). En revanche, l'analyse des chromatogrammes des filtrats, obtenus avec des membranes présentant un seuil de coupure de 5 000 Da, montrent l'élimination d'une grande quantité de composés indésirables. Cependant environ 37 % des toxines sont également perdues et ne passent pas au travers du filtre. La capacité de la palytoxine à former des dimères en solution aqueuse [227] peut expliquer pourquoi les p-PLTX-OVTXs ne passent pas totalement au travers d'un filtre dont le seuil de coupure est de 5 000 Da. De ce fait, l'ultrafiltration n'a pas été retenue comme étape de purification.

2.3. Prépurification des OVTXs à partir de l'extrait d'*Ostreopsis* par chromatographie d'exclusion stérique (Sephadex LH-20)

La phase chromatographique Sephadex LH-20 est une phase stationnaire composée d'un dextran hautement hydroxypropylé, avec laquelle les séparations sont obtenues principalement sur la base de l'exclusion stérique. La limite d'exclusion est autour de 5000 Da. Avec un poids moléculaire autour de 2680 Da, les p-PLTX-OVTXs devraient être partiellement exclues de la phase stationnaire. En fonction de la nature du solvant choisi, la phase stationnaire peut aussi permettre la séparation de composés par partition entre la phase stationnaire et la phase mobile.

2.3.1. Faisabilité sur des prises d'essais

Afin de tester le procédé, des études préliminaires ont été réalisées. Cette phase est fournie sous forme de poudre et doit être activée avant d'être utilisée. Compte tenu de la bonne solubilité des p-PLTX-OVTXs dans des mélanges hydro-méthanoliques et de la plus faible adsorption sur les parois de ces toxines lorsqu'elles sont solubilisées dans ce solvant (données non présentées dans ce mémoire), c'est le mélange MeOH/H₂O 1/1 (v/v) qui a au préalable été choisi pour activer la phase stationnaire, la rincer et éluer les composés. Par ailleurs, ce mélange a été choisi car c'est aussi celui dans lequel on extrait le contenu cellulaire d'*Ostreopsis cf. ovata*. La phase stationnaire activée (6 g) a été transférée dans une colonne de verre (34×1 cm), puis rincée avec le mélange MeOH/H₂O 1/1 (v/v). Un millilitre de solution, contenant 88 mg d'extrait

d'*Ostreopsis cf. ovata*, a été délicatement déposé en tête de colonne. Les composés ont ensuite été élués avec 30 mL de mélange MeOH/H₂O 1/1 (v/v), soit trois fois le volume d'exclusion (9 mL environ). À la sortie de la colonne, les échantillons ont été récoltés tous les 1 mL, filtrés et analysés en CL-SM/SM, afin de déterminer les quantités de toxines présentes dans chaque fraction (Figure 76).

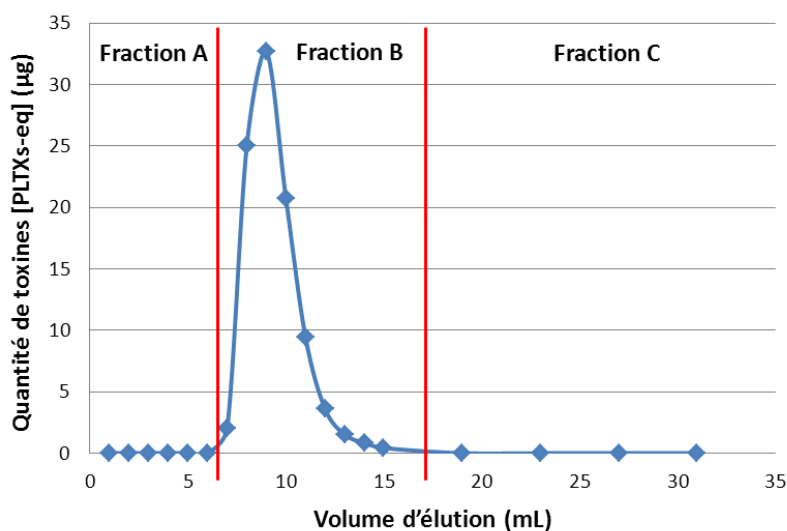


Figure 76. Quantités d'OVTXs totales en fonction du volume d'élué. Les barres rouges correspondent aux fractions rassemblées par la suite.

Tout d'abord, la Figure 76 montre que les p-PLTX-OVTXs sont effectivement partiellement exclues de la colonne, toutes les OVTXs étant concentrées entre 8 et 15 mL de volume d'élué. Il faut noter également que ces fractions étaient colorées, les p-PLTX-OVTXs ne sont donc pas éluées seules. Les résultats de quantification ont permis de cibler certaines fractions qui ont été regroupées ensemble : tout d'abord, les premières fractions éluées avant l'apparition des p-PLTX-OVTXs (fraction 1 à 6 = fraction A), puis toutes les ovatoxines ont été rassemblées ensemble (fraction 7 à 15 = fraction B) et enfin les fractions récoltées après l'élué des toxines (fractions 16 à 30 = fraction C).

Après rassemblement, les trois fractions obtenues ont tout d'abord été ré-analysées en CL-SM/SM, puis le bilan massique a été déterminé, après évaporation à sec et pesée. Les résultats pour chaque fraction sont donnés sous forme de bilan massique et de rendement en p-PLTX-OVTXs (Tableau 26).

Tableau 26. Rendement en p-PLTX-OVTXs et bilan massique de chaque fraction rassemblée.

	Fraction A	Fraction B	Fraction C
--	------------	------------	------------

Rendement en PLTX –OVTXs %	0	85 %	0
Bilan massique %	0,6 %	21,5	29,2

Tout d'abord, il faut noter que le rendement de récupération des toxines en sortie de colonne est de 85 % et que toutes les p-PLTX-OVTXs sont concentrées dans la fraction B. Le bilan massique montre que la fraction A contient moins de 1 % de la totalité des composés présents dans l'extrait, ce qui confirme que l'extrait présente une faible proportion de molécules de haut poids moléculaire. Les toxines sont majoritairement contenues dans la fraction suivante (fraction B), c'est-à-dire entre le volume d'exclusion et le volume mort de la colonne (ou volume de perméation totale), ce qui confirme que les toxines sont partiellement exclues de la colonne. Le bilan massique de la fraction B correspond à 21,5 % de la masse de l'extrait, autrement dit, environ 80 % des composés indésirables de l'extrait sont éliminés dans la fraction contenant les toxines. L'analyse en CL-SM de cette fraction, en mode « full scan » entre m/z [300 – 1450] en comparaison avec l'extrait brut, confirme que la plupart des composés indésirables sont éliminés (Figure 77). De plus, des composés indésirables présents au voisinage du temps de rétention des toxines ont également été en partie éliminés. Enfin, la fraction C contient 29 % de composés indésirables.

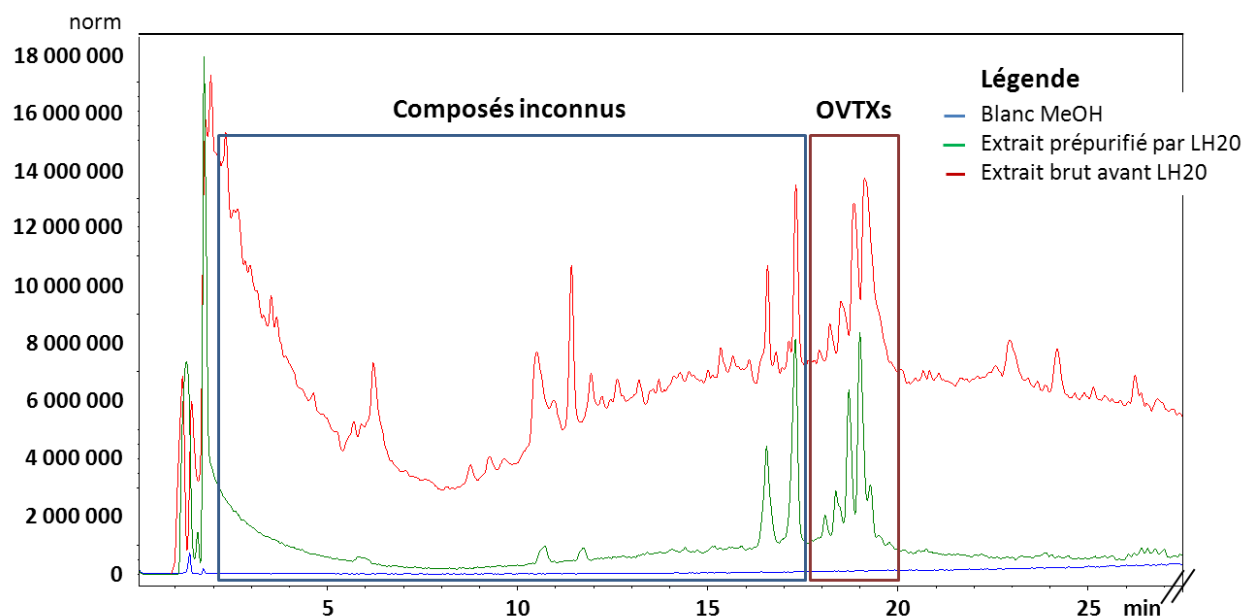


Figure 77. Comparaison du chromatogramme obtenu en CL/SM mode « full scan » de l'extrait brut (en rouge), de la fraction d'intérêt contenant les OVTXs après élution sur phase Sephadex LH-20 (en vert) et du blanc MeOH (en bleu).

Colonne : Kinetex C₁₈ (100×4,6 mm, 2,6 μm) Les séparations ont été effectuées avec un gradient linéaire d'élution. Solvant A : eau + 0,2 % d'acide acétique ; solvant B : acétonitrile/eau 95/5 (v/v) + 0,2 % d'acide acétique. Gradient d'élution : 20 à 40 % de B en 20 min. Débits : 0,7 mL/min. Volume d'injection : 20 μL. Détection : SM en mode positif et en mode « full scan » (m/z [300-1450]).

Il faut noter que le bilan massique des trois fractions montre que 50 % des composés de l'extrait déposé en tête de la colonne Sephadex LH-20 ne sont pas élués, ce qui prouve que ces composés présentent des interactions fortes avec la phase Sephadex LH-20. Par ailleurs, l'élution avec le mélange MeOH-H₂O 1/1 (v/v) ici utilisé était longue, du fait de la viscosité de la phase mobile. Quoi qu'il en soit, les résultats montrent que l'utilisation de la phase Sephadex LH-20 est prometteuse pour la concentration des ovatoxines à partir des extraits d'*Ostreopsis cf. ovata*. Néanmoins, un autre solvant d'élution moins visqueux, le MeOH 100%, a été également testé, dans le but de gagner du temps lors de l'étape de prépurification sur phase Sephadex LH-20.

Nota Bene : la fraction B a été utilisée ultérieurement pour la sélection d'une colonne CLHP capable de séparer les OVTXs et a été rebaptisée '**fraction a**'.

2.3.2. Optimisation de la méthode d'extraction sur phase Sephadex LH-20

Afin d'améliorer le processus de purification des OVTXs sur la phase Sephadex LH-20, et notamment la vitesse d'élution, deux solvants d'élution ont été comparés : le mélange MeOH/H₂O 1/1 (v/v) (précédemment testé), et le MeOH 100 %. Le MeOH a été choisi car il est

capable de solubiliser les OVTXs et qu'il est moins visqueux que les mélanges hydro-méthanoliques, ce qui permet d'éluer les composés plus rapidement.

Deux colonnes (50 × 1 cm) contenant chacune 10 g de phase Sephadex LH-20 ont donc été utilisées en parallèle ; la première a été conditionnée avec le mélange MeOH/H₂O 1/1 (v/v), la seconde avec du MeOH. Le protocole de préparation est similaire à celui décrit précédemment. Un extrait de 25 mL d'*Ostreopsis cf. ovata* a été homogénéisé et partagé en 3 parties, 5 mL constituent le témoin, 10 mL ont été utilisés pour l'élution avec du MeOH 100 %, et 10 mL ont été destinés à l'élution par un mélange MeOH/H₂O 1/1 (v/v). Avant dépôt en tête de colonne, les 10 mL d'extrait d'*Ostreopsis* ont été évaporés à sec et repris avec 1 mL de mélange MeOH/H₂O 1/1 (v/v). Après avoir rincé les colonnes avec chacun des solvants choisis pour l'élution, chaque échantillon a été déposé en haut de la colonne, puis l'élution a été réalisée. Les éluats sont récoltés tous les millilitres, filtrés, avant d'être analysés qualitativement en CL-SM en mode « full scan » et quantitativement en CL-SM/SM. Les quantités de toxines obtenues dans chaque fraction, en fonction des volumes d'élution, sont représentées dans la Figure 78.

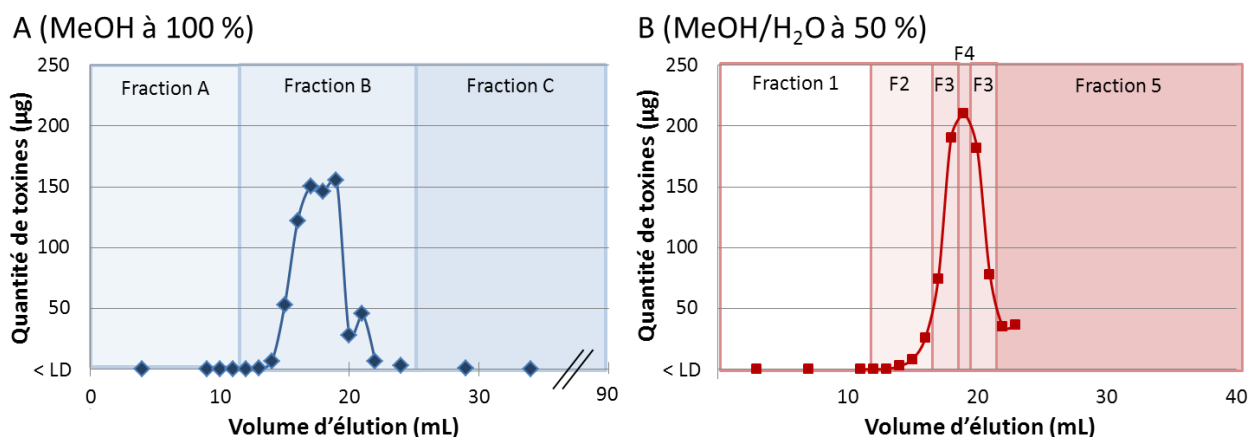


Figure 78. Quantité de toxines présentes dans chaque fraction en fonction du volume d'élution par (A) du MeOH 100 % et (B) un mélange MeOH/eau 1/1 (v/v). Les carrés de couleur correspondent aux fractions rassemblées par la suite.

Lors de l'élution avec le mélange MeOH/H₂O 1/1 (v/v), seuls 23 mL de phase mobile ont pu être élués, à cause de la très faible vitesse de migration du solvant le long de la colonne. Cette faible vitesse de migration de la phase mobile est due à la viscosité importante du mélange hydro-méthanolique, ce qui induit un très faible débit. En revanche, en ce qui concerne l'élution avec du MeOH 100 %, le débit était plus grand, ce qui a permis de réaliser l'élution jusqu'à son terme (80 mL). L'observation de la séparation des composés sur la colonne remplie avec de la phase Sephadex LH-20 a montré que l'on obtenait au cours de l'élution, des fractions de différentes

couleurs, une fraction de couleur jaunâtre dans les premiers volumes d'élution et une fraction de couleur verte dans les derniers volumes d'élution. Pour éluer tous les composés correspondant aux pigments de la microalgue, le volume d'élution a été augmenté à 90 mL. L'analyse des échantillons en CL-SM/SM a montré, dans les deux cas (MeOH et MeOH/H₂O 1/1 (v/v)), que les toxines sont éluées dans les premiers millilitres, entre 14 et 22 mL, soit entre le volume d'exclusion totale et le volume de perméation totale.

Pour estimer la quantité totale de toxines récoltées, et effectuer un bilan massique, les fractions ont été rassemblées afin de déterminer les quantités de p-PLTX-OVTXs, et de les analyser qualitativement par CL-SM en mode « full scan ». La comparaison des éluats MeOH 100 % a permis de regrouper trois fractions : (i) la **fraction A**, constituée des composés élués avant le début d'élution des toxines (de 0 à 13 mL) ; (ii) la **fraction B**, contenant les toxines (de 14 à 22 mL) ; (iii) la **fraction C**, comprenant les molécules éluées après les p-PLTX-OVTXs (de 23 à 90 mL). Lors de l'élution avec le mélange MeOH/H₂O 1/1 (v/v), 5 fractions ont été regroupées : (i) la **fraction 1** contenant les premières fractions éluées (de 0 à 12 mL) ; (ii) la **fraction 2**, contenant peu de toxines (de 13 à 16 mL) ; (iii) la **fraction 3** contenant une grande quantité de toxines ainsi que de nombreux composés inconnus (de 17 à 18 et de 20 à 21 mL) ; (iv) la **fraction 4** constituée d'une grande quantité de toxines et contenant moins de composés indésirables (fraction à 19 mL) ; et (v) la **fraction 5** contenant les composés élués après les toxines (de 22 à 23 mL). Un bilan massique et un rendement de purification ont été réalisés pour toutes les fractions (Tableau 27).

Tableau 27. Bilan massiques, rendement en toxines et estimation des teneurs en toxines pour chaque fraction rassemblée ainsi que le total de toxines récupérées pour chaque type d'élution.

	MeOH 100 %			MeOH / eau 1/1 (v/v)				
	Fraction A	Fraction B	Fraction C	Fraction 1	Fraction 2	Fraction 3	Fraction 4	Fraction 5
Bilan massique	0,3	3,8	25,8	0,8	2,2	2,7	0,6	19,3
%	Total : 29,8			Total : 25,6				
Rendement toxines %	0	74,3	0,6	0	3,8	54,6	21,9	7,4
	Total : 74,9			Total : 87,7				
Teneur en toxines %	0	20	0	0	2	20	36	0

Pour les 2 types d'éluants, les bilans massiques montrent que seulement 30 % environ de la masse d'extrait déposée en tête de colonne a été récupérée dans les fractions éluées. Concernant la récupération des toxines, l'élution avec le MeOH 100% a permis d'obtenir un rendement de 75 %, alors qu'il est de 88 % avec un mélange MeOH-H₂O 1/1 (v/v). Dans le cas du MeOH 100 %, la fraction B contient une proportion très importante de toxines (74,3 %) alors qu'elle ne représente que 3,8 % de la masse de départ. Ceci traduit une augmentation de la teneur en toxines d'un facteur 20 par rapport à l'extrait brut. Lors de l'élution avec un mélange MeOH-H₂O 1/1 (v/v), les fractions 3 et 4 contiennent respectivement 55 et 22 % de toxines alors qu'elles correspondent à 3 et 0,6 % de la masse de l'extrait brut. Autrement dit, on obtient pour chaque fraction une augmentation de la teneur en toxines d'un facteur 20 et 36 pour les fractions 3 et 4 respectivement.

Les rendements en toxines sont du même ordre de grandeur pour les deux solvants d'élution et sont voisins de ceux obtenus avec la première élution sur la phase Sephadex LH-20. Malgré les rendements relativement supérieurs avec du MeOH-H₂O 1/1 (v/v) par rapport au MeOH 100%, la grande viscosité de ce mélange entraîne un temps d'élution beaucoup trop long. Par conséquent, c'est le MeOH 100% qui a été retenu pour l'élution des toxines d'intérêt, lors de leur prépurification sur phase Sephadex LH-20, à partir des extraits de cultures d'*Ostreopsis cf. ovata*.

L'expérience acquise lors des différentes prépurifications sur phase Sephadex LH-20 a permis d'améliorer le protocole mis en œuvre. Tout d'abord, des essais de préparation d'échantillons ont mis en évidence l'importance de la filtration de l'extrait d'*Ostreopsis cf. ovata* sur filtre 0,45 µm, avant de le concentrer et de le déposer en tête de colonne. De plus pour augmenter la solubilité des toxines et diminuer leur adsorption sur les parois des tubes de collection, nous avons démontré qu'il fallait utiliser des tubes en plastique (polypropylène) et ajouter un volume d'eau équivalent au volume élué dans chaque tube.

Nota bene : i) la fraction 4 « éluat 19 ml, concentrée en toxines, rebaptisée '**fraction b**', a été utilisée pour les essais relatifs à la mise au point de conditions analytiques permettant de séparer les différentes ovatoxines (paragraphe 3.3) ; ii) la fraction 3, rebaptisée '**fraction c**' a été utilisée pour les premiers essais de purification finale par CL-SM/DAD (paragraphe 4.2).

2.3.3. Purification en masse

L'ensemble des différents essais effectués précédemment a permis de définir une procédure de prépurification des ovatoxines à partir d'extraits de cultures d'*Ostreopsis cf. ovata*. Afin

d'obtenir une quantité notable de toxines prépurifiées, cette procédure a été appliquée sur une prise d'essai plus importante, en utilisant une colonne de dimension adaptée (160 x 2 cm) remplie avec 60 g de phase Sephadex LH-20 (hauteur de remplissage 76 cm). La colonne a été conditionnée avec du MeOH 100%.

À partir de 20 g de pâte d'algues, 100 mL d'extrait d'*Ostreopsis cf. ovata* a été obtenu. Un volume de 45 mL de cet extrait a été filtré sur filtre 0,45 µm, concentré à 5 mL et déposé en tête de colonne. L'échantillon a ensuite été élué avec du MeOH. Après la récolte d'un volume de 50 mL, puis de 25 mL, et de 2 × 10 mL, quinze fractions de 5 mL ont été récoltées, puis trois fractions de 50 mL. Toutes ces fractions ont été récoltées dans des tubes en polypropylène gradués de 15 ou 50 mL. Un volume total de 410 mL a ainsi été récolté. Toutes les fractions ont été analysées qualitativement en CL-SM et quantitativement en CL-SM/SM (Figure 79).

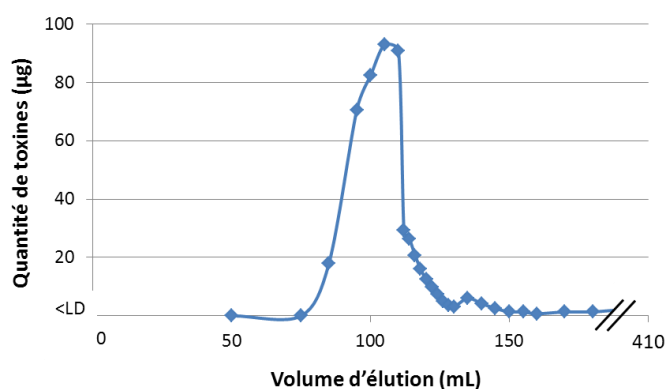


Figure 79. Quantités de toxines obtenues en fonction du volume d'élué.

Les toxines ont été éluées après environ 75 mL d'élué, et jusqu'à environ 150 mL, c'est-à-dire, entre le volume d'exclusion et le volume de perméation totale, comme montré précédemment. L'utilisation d'une colonne remplie de phase Sephadex LH-20 de 2 cm de diamètre (au lieu de 1 cm de diamètre), a permis de purifier 5 fois plus d'extrait. Les rendements élevés de récupération des toxines (80 %) obtenus grâce aux enseignements tirés des différents essais préliminaires et le fort pourcentage de composés indésirables éliminés (85 %) justifient le choix de cette procédure de prépurification.

Nota bene : la fraction d'intérêt (75 à 150 mL), rebaptisée 'fraction d', a été utilisée pour le fractionnement en CL-SM-DAD.

Cette procédure sur une colonne remplie avec 60 g de phase Sephadex LH-20 peut être résumée ainsi :

- l'extrait doit être concentré, sans être évaporé à sec, puis filtré sur 0,45 µm avant d'être déposé en tête de colonne ;
- l'élution est réalisée avec du MeOH 100 % ;
- les toxines doivent être récoltées dans des flacons en polypropylène, pour éviter les adsorptions sur les parois ;
- après la récolte des fractions, 100 % d'eau est ajoutée afin d'augmenter la solubilité des toxines.

La répétabilité des différents essais de prépurification réalisés ont permis de cibler l'élution des p-PLTX-OVTXs entre 75 et 150 mL. L'ensemble des étapes de prépurifications des toxines sur les phases Sephadex LH-20 à partir des extraits d'*Ostreopsis cf. ovata* a conduit à l'obtention de 4 fractions enrichies en toxines d'intérêt. Le Tableau 28 donne le récapitulatif de ces fractions et leur utilisation ultérieure, en particulier, pour les essais de mise au point des conditions expérimentales de séparation et de purification des différentes ovatoxines par CL-SM/DAD.

Tableau 28. Récapitulatif des différentes étapes de purifications sur phase Sephadex LH-20 effectuées à partir d'extraits d'*Ostreopsis cf. ovata* : masse de phase utilisée, volumes d'élutions des p-PLTX-OVTXs et utilisations des fractions d'intérêts obtenues.

Masse de phase (g)	Volume d'élution des toxines (mL)	Désignation de la fraction d'intérêt récoltée et utilisation ultérieure
6	[7 – 15]	Fraction a : essais de gradients sur les différentes colonnes HPLC testées
10	[12 – 22]	Fraction b : test du comportement chromatographique des OVTXS Fraction c : fractionnement CLHP sur une colonne analytique
60	[75 – 150]	Fraction d : fractionnement CLHP sur une colonne semi-préparative

3. Choix de colonnes HPLC pour la séparation et la purification des OVTXs

Le challenge de la purification des OVTXs est de pouvoir les séparer individuellement, puisqu'elles possèdent des propriétés physico-chimiques très voisines, notamment au niveau leur structures moléculaires. De plus, ce sont des molécules amphiphiles, du fait de leur longue chaîne carbonée et de nombreuses fonctions hydroxyles. En considérant toutes ces

caractéristiques, plusieurs phases stationnaires ont d'abord été testées, qui diffèrent en termes de sélectivité, de par la nature de leur greffage. Comme il a également fallu tenir compte de la solubilité des OVTXs dans des mélanges hydro-méthanoliques, notre choix a été limité à des phases stationnaires utilisées en CL en phase inverse. Notons qu'une phase stationnaire en mode HILIC n'a pas pu être envisagée, en raison de la faible solubilité des OVTXs dans les mélanges ACN/eau, préconisé avec ce type de phase stationnaire ; en effet, le MeOH aurait été un solvant trop éluant en mode HILIC.

3.1. Présentation et qualification des colonnes testées

3.1.1. Présentation des colonnes

Plusieurs colonnes ont été choisies en fonction des différents types d'interactions hydrophobes, dipolaires et/ou électrostatiques qu'elles pourraient présenter. Les colonnes choisies diffèrent par la structure des particules (poreuses ou pleines), leur mode de greffage (mono- ou polymérique), la nature du greffon : longues chaînes alkyles C₁₈, des chaînes C₁₈ avec des groupements polaires intercalés ou bien des groupements pentafluorophenyl (PFP).

Parmi les phases stationnaires testées, on dénombre :

- une phase **Gemini C₁₈**, phase la plus couramment utilisée dans la littérature pour la détection et la quantification des OVTXs, constitue notre phase stationnaire de référence ;
- la phase **Kinetex C₁₈** est une phase stationnaire récente, constituée de particules de silice pleines recouvertes d'un mince film de phase stationnaire poreuse greffée avec des groupements alkyles en C₁₈. Cette phase stationnaire est caractérisée par la technologie dite « core-shell » qui permet d'obtenir des pics plus fins qu'avec des colonnes remplies de silice poreuse, ce qui peut être déterminant pour la séparation des ovatoxines ;
- la phase **Uptisphere C₁₈-TF** est une phase stationnaire C₁₈ trifonctionnelle qui possède une sélectivité alternative par rapport aux phases C₁₈ existantes [228], ce qui peut permettre d'envisager la séparation de mélanges complexes de composés comme les OVTXs ;
- les phases **Acclaim Polar Advantage II (PA2)**, **Synergi RP Fusion** et **Polaris Amide C₁₈** possèdent un greffage C₁₈ avec un groupement fonctionnel polaire intercalé près du site de greffage, ce qui leur confère la possibilité de présenter à la fois des interactions polaires et hydrophobes ;

- la phase **Kinetex PFP** possède un greffage pentafluorophenyl. D'après le fabricant cette colonne pourrait permettre d'obtenir une sélectivité stérique pour séparer des isomères, mais aussi une grande sélectivité pour les composés cationiques, due au caractère électronégatif des atomes de fluor.

3.1.2. Qualification des colonnes

Toutes ces colonnes ont préalablement été qualifiées en utilisant un mélange de composés proposé par Engelhardt, pour un test simplifié de colonnes de phase inverse. L'hydrophobicité a été évaluée en calculant les facteurs de rétention du toluène (k_T) et de l'éthylbenzène (k_E). La sélectivité méthylénique a été évaluée en calculant la sélectivité entre l'éthylbenzène et le toluène ($\alpha_{E/T} = k_E/k_T$). L'activité silanolique (interactions potentielles avec des groupements silanols de la phase stationnaire) a été déterminée par l'injection d'une solution de dimethylaniline (DMA), en comparant l'asymétrie du pic de DMA à celle de l'éthylbenzène (As_{DMA}/As_E) et en calculant la sélectivité entre la DMA et le toluène ($\alpha_{DMA/T} = k_{DMA}/k_T$). Plus les valeurs de As_{DMA}/As_E et $\alpha_{DMA/T}$ sont grandes, et plus les phases stationnaires présentent d'activité silanolique et/ou d'interactions polaires. Enfin les volumes morts ont été calculés en déterminant les temps de rétention de la thiourée (Th). Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 29.

Tableau 29. Résultat de la qualification des différentes colonnes analysées par le test simplifiée d'Engelhardt [203].

Phases stationnaires et fournisseurs	Dimension des colonnes (mm×mm)	Tailles des particules (µm)	Tailles des pores (Å)	AS_{DMA}/AS_E^*	k_T^*	k_E^*	k_{DMA}^*	$\alpha_{E/T}^*$	$\alpha_{DMA/T}^*$
Colonnes de phase inverse									
Gemini (C₁₈) Phenomenex	150 × 2	3	110	0,97	4,54	7,82	3,13	1,72	0,69
Kinetex (C₁₈) Phenomenex	150 × 2,1	2,6	100	1,18	3,93	6,95	2,73	1,77	0,70
Kinetex (C₁₈) Phenomenex	150 × 4,6	5	100	1,08	3,73	6,53	2,62	1,75	0,70
Uptisphere C₁₈-TF Interchim	150 × 2,1	5	300	1,50	2,04	3,42	2,12	1,67	1,04
Colonnes en mode mixte									
Acclaim Polar Advantage II Dionex	100 × 2,1	2,2	120	1,04	3,74	6,11	2,88	1,64	0,77
Synergi fusion RP Phenomenex	150 × 4,6	4	80	1,08	4,25	7,33	3,20	1,72	0,75
Polaris C₁₈ amide Varian	150 × 4,6	5	200	1,06	1,32	2,00	1,15	1,52	0,88
Autres modes de greffage									
Kinetex PFP Phenomenex (PFP)	150 × 2,1	2,6	100	2,19	2,36	3,52	9,84	1,49	4,18

* k_T , k_E et k_{DMA} = facteurs de rétention du toluène (T), de l'éthylbenzène (E) et de la diméthylaniline (DMA); $\alpha_{E/T}$ = sélectivité entre l'éthylbenzène et le toluène; $\alpha_{DMA/T}$ = sélectivité entre la DMA et le toluène; AS_{DMA} et AS_E = asymétries du pic de DMA et de l'éthylbenzène

Les colonnes **Uptisphere C₁₈-TF**, **Polaris amide C₁₈** et **Kinetex PFP** ont présenté les facteurs de rétention les plus faibles pour le toluène (k_T) et l'éthylbenzène (k_E), ainsi que pour les sélectivités méthyléniques (k_E/k_T), ce qui montre leur faible caractère hydrophobe et leur faible sélectivité méthylénique, par comparaison aux autres colonnes C₁₈ testées (Tableau 29). Ces résultats étaient attendus pour les colonnes Polaris amide C₁₈ et Kinetex PFP car elles possèdent des fonctions permettant des interactions polaires. Le faible caractère hydrophobe de la colonne **Uptisphere C₁₈-TF** ne peut en revanche être attribué qu'à la faible densité de greffage, cette

colonne montrant une sélectivité méthylénique comparable aux autres colonnes C₁₈. En revanche, il doit être noté que, étonnamment, les deux autres colonnes C₁₈ possédant un groupement polaire intercalé (**Synergi Fusion RP** et **Acclaim polar Advantage II**) possèdent des caractères hydrophobes et des sélectivités méthyléniques proches des colonnes **Gemini C₁₈** et **Kinetex C₁₈**.

La comparaison du facteur d'asymétrie de la dimethylaniline (DMA) avec celui de l'éthylbenzène montre que les colonnes Uptisphere C₁₈-TF et Kinetex PFP possèdent une activité silanolique plus importante. Enfin, la forte valeur obtenue pour la sélectivité entre le toluène et la DMA pour ces deux colonnes et par comparaison aux autres colonnes C₁₈ montre que ces dernières présentent la possibilité d'interactions avec des groupements polaires plus importantes (déjà décrits par Lesellier [228]), notamment pour la colonne PFP.

Après avoir caractérisé ces différentes phases chromatographiques, une application a été menée sur une fraction d'ovatoxines prépurifiée, afin d'étudier et évaluer leur comportement sur ces différentes phases stationnaires.

3.2. Présélection par CL-UV de colonnes capables de séparer les OVTXs

La présélection de phases chromatographiques a été effectuée en comparant les analyses CL-UV d'un même extrait d'*Ostreopsis cf. ovata*, prépurifié par une phase Sephadex LH-20, obtenus sur chaque phases caractérisées. Le premier essai, réalisé avec la **fraction a**, a consisté caractériser le comportement chromatographique des OVTXs sur les différentes phases stationnaires testées, en utilisant des gradients d'élution de pentes différentes (gradients réalisés en 20, 30, 40 min). En effet, la modification de la pente des gradients d'élution a une influence sur les temps de rétention et la résolution des composés séparés sur une phase chromatographique donnée et peut permettre de mettre en évidence les mécanismes d'interactions des composés analysés avec les phases stationnaires.

Le gradient d'élution choisi est inspiré de celui décrit par Ciminiello et met en jeu un mélange d'eau et d'acétonitrile, tous deux contenant 0,2 % d'acide acétique [22]. Dans ces travaux, le pourcentage de solvant fort (acétonitrile) varie linéairement de 20 à 50 % en 20 minutes. Dans nos essais, le gradient linéaire a été réalisé en 20, 30 et 40 minutes, avant que la phase soit rincée avec 100 % d'acétonitrile et remise dans les conditions initiales (Figure 80). Ce test de pente de gradient a été effectué sur toutes les phases stationnaires étudiées. Les comportements chromatographiques observés ont été similaires sur toutes les colonnes, la Figure 81 en montre un exemple pour la colonne Kinetex PFP.

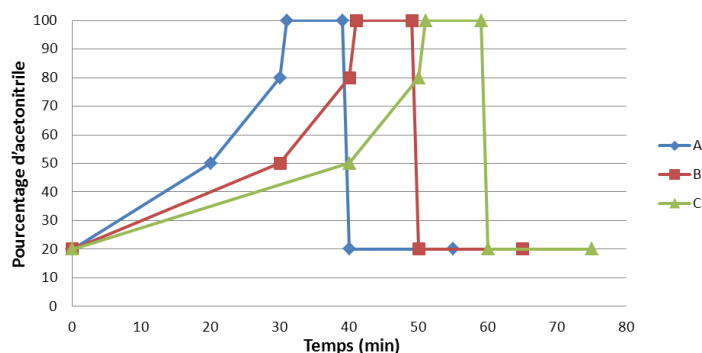


Figure 80. Gradients d'élution testés.

Solvant A eau + 0,2 % d'acide acétique, solvant B ACN/eau 95/5 (v/v) + 0,2 % d'acide acétique. Gradient linéaire : 20 à 50 % de B en (A) 20 min (B) 30 min, (C) 40 min puis 50 à 80 % de B en 10 min, 80 à 100 % de B en 1 min, 5 min à 100 % de B puis retour aux conditions initiales et équilibrage.

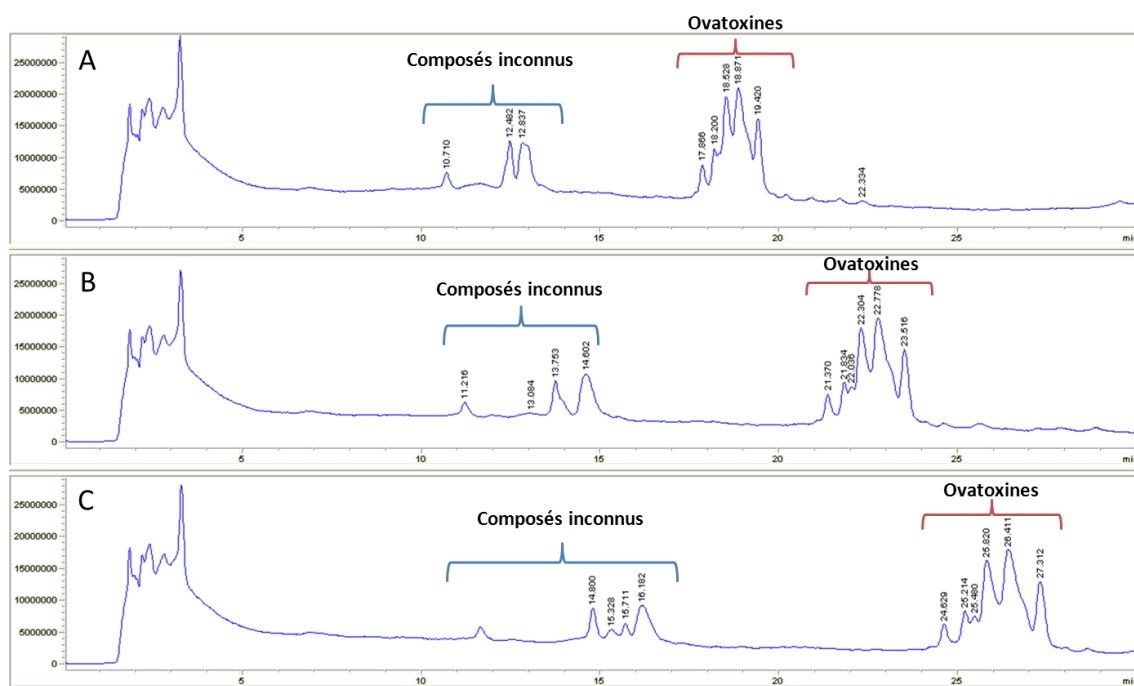


Figure 81. Comparaison des chromatogrammes obtenus de la **fraction a** en fonction des pentes des gradients.

Colonne Kinetex PFP (150×2,1 mm, 2,6 µm). Solvant A : eau + 0,2 % d'acide acétique ; solvant B : ACN/eau 95/5 (v/v) + 0,2 % d'acide acétique. Gradient d'élution : 20 à 50 % de B en : (A) 20 min ; (B) 30 min ; (C) 40 min. Débit : 0,2 mL·min⁻¹. Volume d'injection : 20 µL. Détection : SM en mode positif et en mode « full scan » m/z [300-1450].

Les résultats obtenus montrent que pour les huit phases stationnaires, la diminution de la pente de gradient (en changeant la durée du gradient de 20 à 40 min) entraîne une augmentation des temps de rétention, quelle que soit la colonne utilisée, et a clairement un impact sur la résolution des composés. Ces résultats montrent que l'hydrophobicité est donc le mécanisme principal régissant la rétention des OVTXs, montrant ainsi que les phases stationnaires apolaires, notamment C₁₈,

sont les plus à même de séparer les OVTXs. De plus, comme attendu, il est préférable de privilégier un gradient lent, en 40 min, pour obtenir la meilleure séparation des OVTXs. Ce gradient doit commencer à 20 % d'acétonitrile, afin de pouvoir séparer et éluer les composés inconnus avant les composés d'intérêt. Cependant, il faut noter qu'aucun composé d'intérêt n'est élué après 40 % d'ACN. Par conséquent, un gradient linéaire variant de 20 à 40 % est suffisant pour obtenir une bonne séparation des OVTXs. C'est ce gradient linéaire qui a donc été choisi pour comparer la séparation des OVTXs sur les huit phases stationnaires sélectionnées. Il faut noter que des essais en mode isocratique entre 30 et 35 % d'ACN n'ont pas permis d'aboutir à une séparation suffisante. La détection chromatographique a ici été réalisée à la fois en UV (DAD), à 263 nm, pour évaluer la séparation des toxines, mais aussi par SM, en mode « full scan », pour identifier les toxines et évaluer leur séparation des autres composés présents dans la **fraction b**. La Figure 82 représente le chromatogramme complet, obtenu en UV, pour la phase Uptisphere C₁₈-TF, avec un agrandissement de la partie correspondant aux toxines. La Figure 83, représente quant à elle, la comparaison de la séparation des toxines sur les huit colonnes testées.

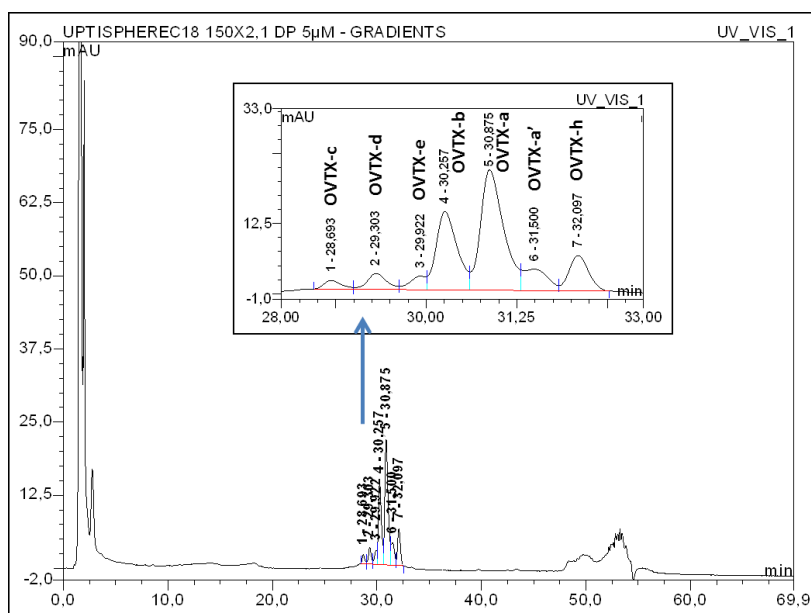


Figure 82. Chromatogrammes analytique de la fraction b.

Colonne Uptisphere C₁₈-TF (150×2,1 mm, 5 µm). Solvant A : eau + 0,2 % d'acide acétique ; solvant B : ACN/eau 95/5 (v/v) + 0,2 % d'acide acétique. Gradient linéaire : 20 à 40 % de B en 40 min, puis la colonne a été rincée pendant 7 min à 100 % avant de revenir aux conditions initiales. Débit : 0,245 mL.min⁻¹. Volume d'injection 2 µL. Détection : UV à 263 nm.

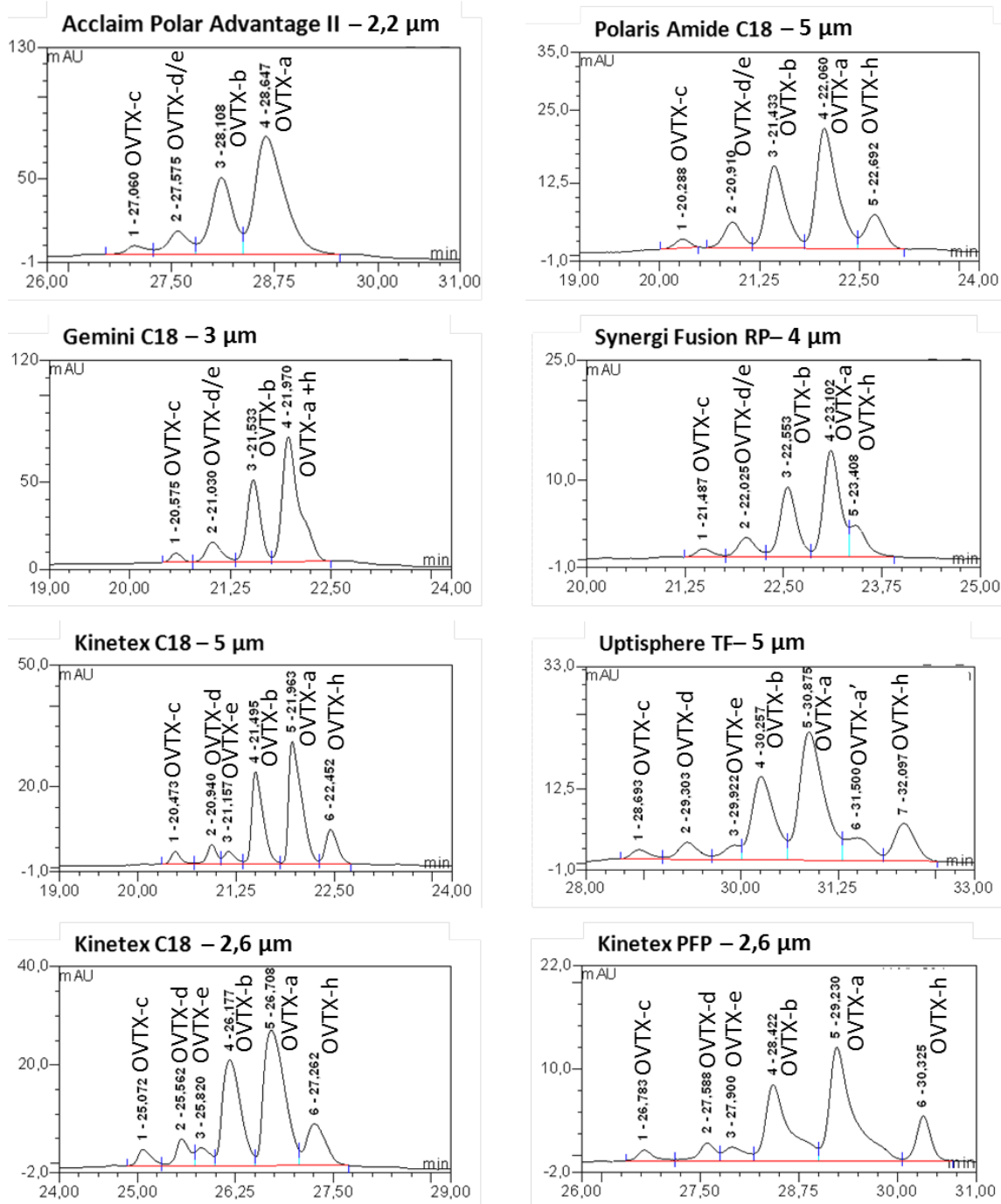


Figure 83. Comparaison des chromatogrammes de la **fraction b** obtenus avec huit colonnes différentes (Tableau 29).

Solvant A : eau + 0,2 % d'acide acétique ; solvant B : ACN/eau 95/5 (v/v) + 0,2 % d'acide acétique. Gradient linéaire : 20 à 40 % de B en 40 min. Les débits et volumes d'injection ont été adaptés à chaque colonne (cf. tableau 5, Chapitre 1,2.2). Détection : UV à 263 nm.

Les résolutions obtenues pour les différentes OVTXs avec les huit colonnes testées sont présentées dans le Tableau 30.

Tableau 30. Résumé des résolutions obtenues entre les pics qui ont pu être séparés sur les différentes colonnes. (*) pas de séparation entre l'OVTX-d et l'OVTX-e ; (**) épaulement de pics ; (***) mauvaise séparation entre l'OVTX-a et l'OVTX-a'.

Composés	Gemini C ₁₈	Kinetex C ₁₈ -d _p =2,6 µm	Kinetex C ₁₈ -d _p =5 µm	Uptisphere C ₁₈ -TF	Polar Advantage II	Synergi Fusion	Polaris Amide	Kinetex PFP
OVTX-c	2,28	2,35	3,28	2,04	0,98	2,10	2,53	3,51
OVTX-d	2,36 (*)	0,57	1,32	> 1,5	1,65 (*)	2,08 (*)	1,88 (*)	0,50
OVTX-e		0,71	1,89	< 0,5				0,80
OVTX-b	2,09	1,70	2,52	1,71	1,46	2,19	2,10	2,77 (**)
OVTX-a		1,72 (***)	2,55 (***)	< 0,5		< 0,5 (***)	2,11 (***)	4,33 (***)
OVTX-a'				> 1,5				
OVTX-h								

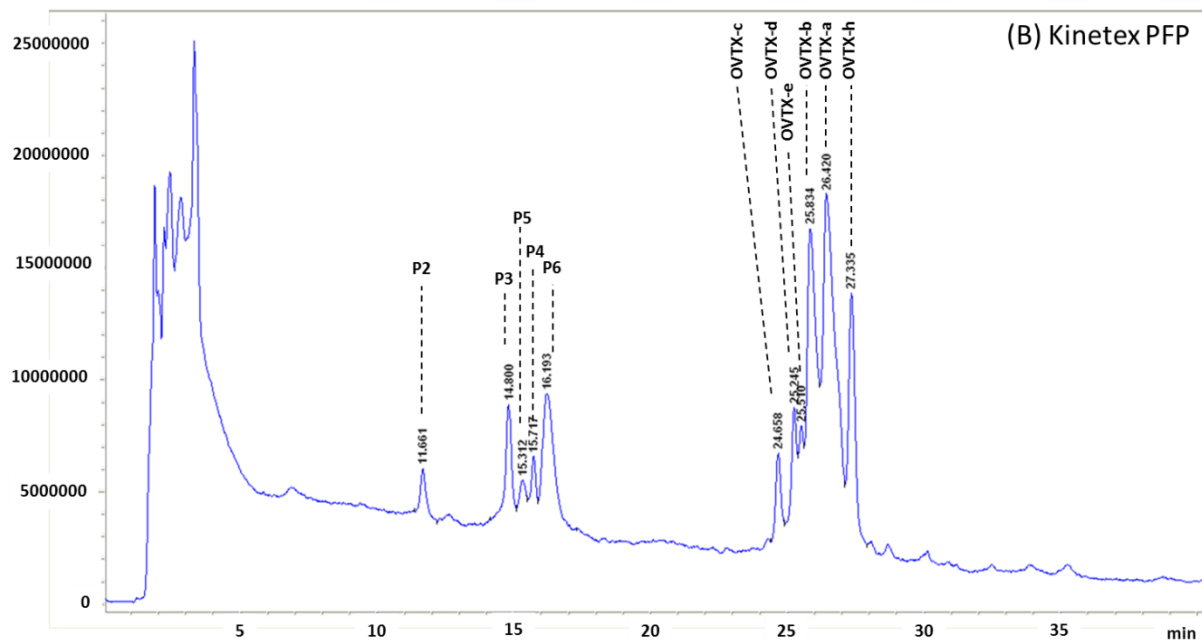
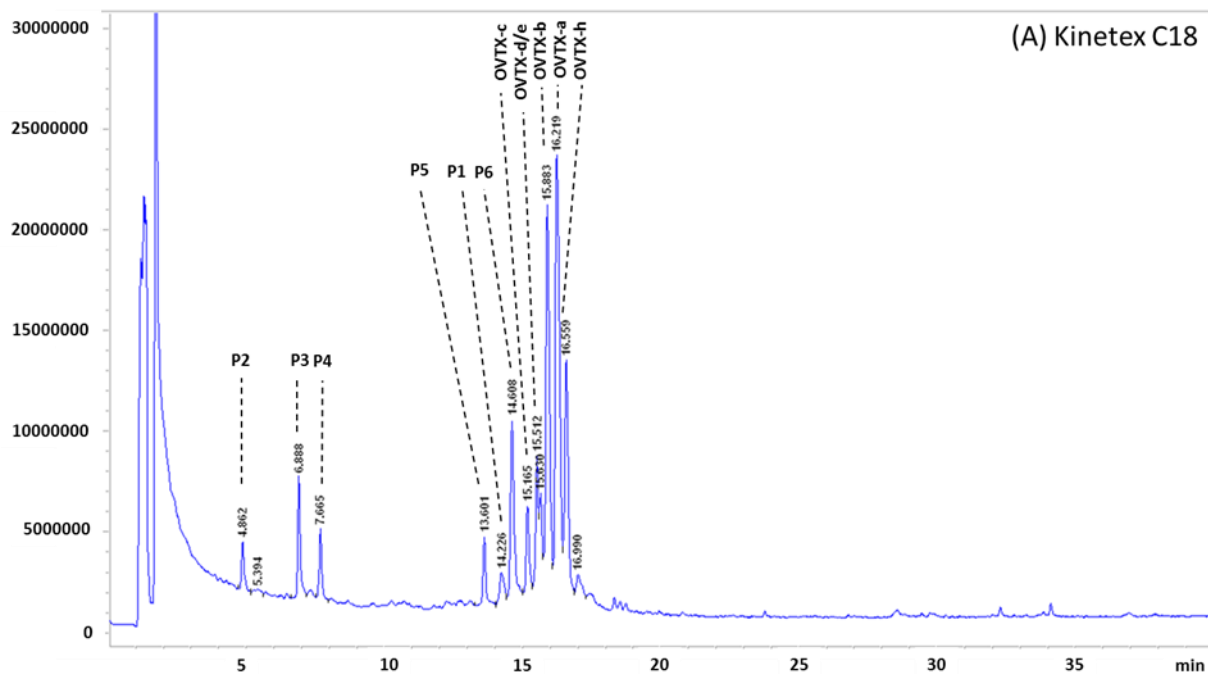
Chaque colonne CLHP testée présente un pouvoir de séparation des OVTXs plus ou moins grand. Ces colonnes possèdent différents types d'interactions (hydrophobe, polaire) mais, étonnamment, les OVTXs sont éluées dans le même ordre d'éluion, et ce quelle que soit la nature de la phase : OVTX-c, OVTX-d et OVTX-e, OVTX-b, OVTX-a et -a' et enfin l'OVTX-h. Ceci conforte l'hypothèse que les interactions hydrophobes sont les interactions majoritairement responsables de la rétention et de la séparation des OVTXs. Concernant la p-PLTX et l'OVTX-f, l'analyse de la fraction b par CL-UV n'a pas permis de les détecter, car elles sont présentes à l'état de trace

Sur les sept ovatoxines détectées dans la fraction b, toutes ne sont séparées passur chacune des phases testées. Les colonnes **Gemini C₁₈** et **Polar avantage II** ne permettent pas de séparer ni les OVTX-d et OVTX-e d'une part, ni les OVTX-a et OVTX-h d'autre part. Pour les colonnes **Synergi Fusion** et **Polaris Amide**, malgré des résolutions supérieures à 1,6, toutes les OVTXs ne sont pas bien séparées : l'OVTX-d et l'OVTX-e sont superposées, alors que l'OVTX-a et l'OVTX-h sont totalement (Polaris Amide) ou partiellement (Synergi Fusion) séparées. Les colonnes **Kinetex C₁₈** et **PFP** sont capables de séparer plus ou moins bien les **6 OVTXs** suivantes : OVTX-c, -d, -e, -b, -a, -h. Enfin, parmi les huit colonnes testées, seule l'**Uptisphere**

C₁₈-TF permet de séparer les **7 OVTXs** présentes dans la fraction b. De plus, même si les résolutions ne sont pas supérieures à 1,5, cette phase est capable de séparer les OVTX-a et -a' (isomère de l'OVTX-a) ainsi que les OVTX-d et -e, ce que les autres colonnes ne permettent pas d'obtenir. Les trois meilleures phases stationnaires sélectionnées pour leur pouvoir de séparation des OVTXs sont les colonnes Kinetex C₁₈, Kinetex PFP et Uptisphere C₁₈ TF.

3.3. Sélection par CL-SM d'une colonne permettant la meilleure séparation des OVTXs

L'avantage d'utiliser la détection à 263 nm est que ce mode de détection permet de détecter sélectivement les OVTXs présentes dans les fractions d'intérêt des extraits d'*Ostreopsis* prépurifiés sur la phase Sephadex LH-20. Avec les trois colonnes sélectionnées (Kinetex C₁₈, Kinetex PFP et Uptisphere C₁₈-TF), la même **fraction b** a été analysée en CL-SM en mode « full scan », afin de confirmer notre choix de colonnes, à la fois en termes de séparation des OVTXs entre elles, mais aussi vis-à-vis d'autres composés présents dans l'extrait. En effet, nous avons observé que des composés de nature inconnue, notés P1 à P6, étaient élués dans les mêmes fractions d'intérêt que les OVTXs (Figure 84). Leur spectre de masse montre que ces composés présentent des ions bi- et tri-chargés, accompagnés de nombreuses pertes d'eau, caractéristiques des OVTXs. Cependant, leur masse moléculaire est plus faible que celle des OVTXs. Ces composés n'ont pas encore été rapportés à ce jour dans la littérature. Leur spectre de masse est présenté en Annexe N°7.1 à 7.6.



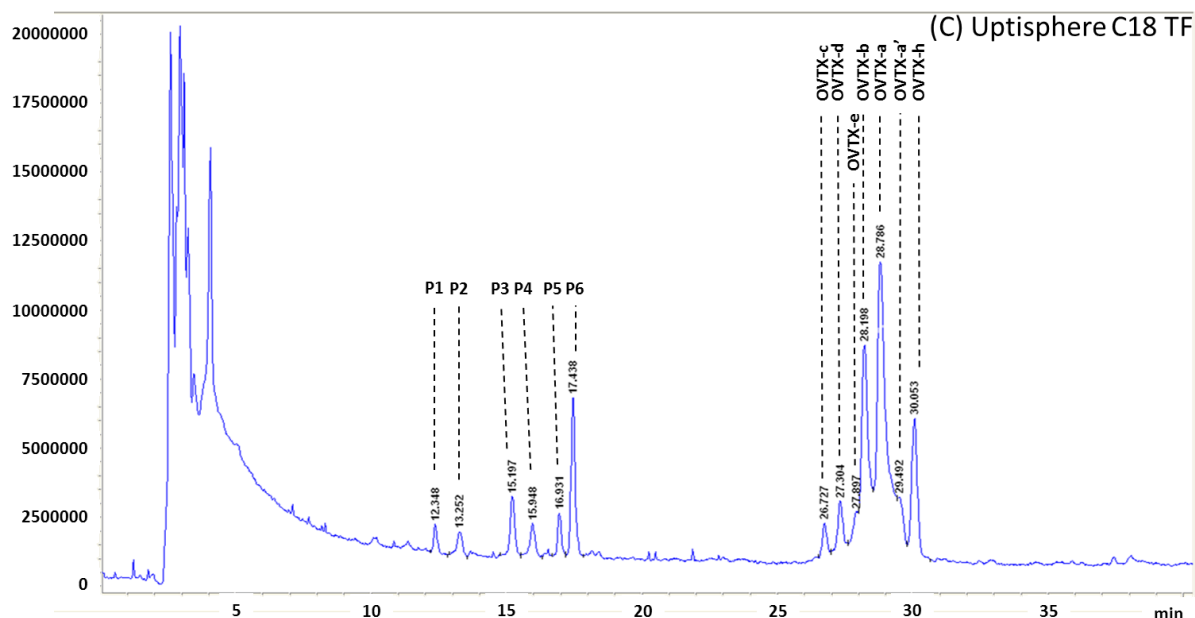


Figure 84. Comparaison des chromatogrammes d'une fraction de la fraction b avec les trois colonnes : (A) Kinetex C₁₈ (100×4,6 mm, 2,6 μm), (B) Kinetex PFP (150×2,1 mm, 2,6 μm) and (C) Uptisphere C₁₈-TF (250×4,6mm, 5μm).

Solvant A : eau + 0,2 % d'acide acétique ; solvant B : ACN/eau 95/5 (v/v) + 0,2 % d'acide acétique. Gradient d'élution : 20 à 50 % de B en 40 min. Les débits ont été adaptés à chaque colonne (A) 0,7 mL.min⁻¹, (B) 0,2 mL.min⁻¹, (C) 1 mL.min⁻¹. Volume d'injection : 20 μL. Détection : SM en mode positif et en mode « full scan » (*m/z* [300-1450]).

Les chromatogrammes obtenus pour les trois colonnes confirment les séparations précédemment obtenues pour les OVTXs avec la détection UV. Les pics obtenus avec la **Kinetex C₁₈** sont très fins, ce qui prouve l'efficacité de la technologie « core shell » et l'efficacité de cette colonne. L'autre avantage de cette colonne est que les composés sont élués à des temps de rétention plus faibles que pour les deux autres colonnes, permettant d'avoir un temps d'analyse plus court. Cependant, il faut noter que six composés inconnus (P1 à P6) sont également présents dans l'échantillon, trois d'entre eux présentant un temps de rétention très proche de ceux des ovatoxines. De ce fait, il serait plus difficile de purifier les OVTXs en chromatographie semi-préparative en utilisant cette phase stationnaire. La séparation avec la colonne **Kinetex PFP** ne semble pas meilleure qu'avec la colonne Kinetex C₁₈. En effet, bien qu'elle permette la séparation des composés inconnus des OVTXs, il n'y a qu'une faible séparation entre les OVTX-d, -e, et -b. De plus, seulement 5 composés inconnus sont observés, et ils ne sont pas bien séparés. Cela doit être dû au trop grand volume injecté avec cette colonne, volume qui n'est pas adapté à son faible volume mort. La colonne **Uptisphere C₁₈-TF** permet d'obtenir une séparation satisfaisante entre les ovatoxines, comparable à celle obtenue avec la détection UV.

Par ailleurs, avec cette colonne, les 6 composés inconnus (P1 à P6) sont également mieux séparés des OVTXs, mais aussi les uns des autres. Les spectres de masse des OVTXs ainsi que ceux des composés inconnus sont représentés en annexe 7.1 à 7.13.

Ces observations confirment les différences de sélectivité entre l'Uptisphere C₁₈-TF et les deux autres colonnes, notamment avec la colonne Kinetex C₁₈. Ceci doit être dû au mode de greffage (trifonctionnel) de la phase stationnaire. Avec cette colonne, les chaînes alkyle C₁₈ doivent être plus distantes les unes des autres, permettant une meilleure insertion des OVTXs entre les groupements C₁₈, menant à une plus forte interaction avec la phase stationnaire et à une meilleure sélectivité, d'où une meilleure séparation. Si la séparation des OVTXs est un challenge, la séparation des OVTX-d et -e en est un autre, car ces deux toxines sont des isomères. La colonne Uptisphere C₁₈-TF permet la séparation de ces deux composés, mais c'est au détriment de la séparation entre l'OVTX-e et l'OVTX-b.

Des essais visant à améliorer la séparation des OVTXs sur la colonne Uptisphere C₁₈-TF ont été effectués en jouant sur certains paramètres, comme le pourcentage d'acide acétique présent dans les phases mobiles (0,1 ou 0,2 %), la pente du gradient d'éluion, le pourcentage de solvant fort au début et à la fin du gradient. Cette étude a permis de confirmer le choix du pourcentage d'acide acétique, un pourcentage de 0,2 % permettant d'obtenir des pics plus fins et un temps de rétention plus court, pour une séparation équivalente. En effet, une augmentation du pH de la phase mobile, liée à une diminution du pourcentage d'acide, favorise les interactions entre le groupement amine chargé positivement des OVTXs et les groupements silanols ionisés de la phase stationnaire, ce qui provoque une augmentation des temps de rétention, un élargissement et une augmentation de l'asymétrie des pics, préjudiciables à une bonne séparation. De plus, la meilleure séparation a été obtenue avec un gradient variant de 20 à 40 % d'ACN en 40 minutes. Avec ces conditions, les chromatogrammes sont répétables.

L'analyse de ces résultats nous a permis de sélectionner la colonne Uptisphere C₁₈-TF pour la séparation des extraits d'*Ostreopsis*, comme première étape de chromatographie semi-préparative à des fins de purification des OVTXs. Les colonnes Kinetex C₁₈ et PFP permettent aussi d'obtenir une bonne séparation des OVTXs, notamment à des fins analytiques, mais à l'époque de nos travaux, ces phases stationnaires n'existaient pas avec des diamètres de particules adaptés à la chromatographie semi-préparative (diamètre de particule de 5 µm). C'est pourquoi ces deux phases stationnaires n'ont pas été retenues pour effectuer des essais de purification des OVTXs.

4. Essais de purification des ovatoxines par CL-DAD/SM

La phase stationnaire Uptisphere C₁₈-TF a été sélectionnée pour purifier les toxines. Deux types de colonnes ont été utilisés dans cette étude : une colonne analytique (250×4,6 cm, 5 μm) pour la mise au point du protocole et une colonne semi-préparative (250×10 cm, 5 μm) pour la séparation de plus grandes quantités d'OVTXs.

4.1. Ajustement des conditions aux colonnes analytique et semi-préparative

4.1.1. Tests de charge

Pour pouvoir purifier une grande quantité de composés, tout en réduisant le nombre d'étapes, il faut injecter la plus grande quantité et le plus gros volume possible d'échantillon, sans que cela n'impacte sur la séparation des composés. Deux boucles d'injection sont disponibles pour la chaîne de CL-SM/UV retenue pour la chromatographie semi-préparative : une boucle de 100 μL et une autre de 900 μL. La première a été utilisée pour les essais avec la colonne Uptisphere C₁₈-TF analytique (250×4,6 mm, 5 μm), la seconde avec la colonne Uptisphere C₁₈-TF semi-préparative (250×10 mm, 5 μm). La **fraction c** a été analysée en CL-SM en mode « full scan » sur la colonne analytique avec différents volumes d'injection : 20, 50 et 100 μL (Figure 85).

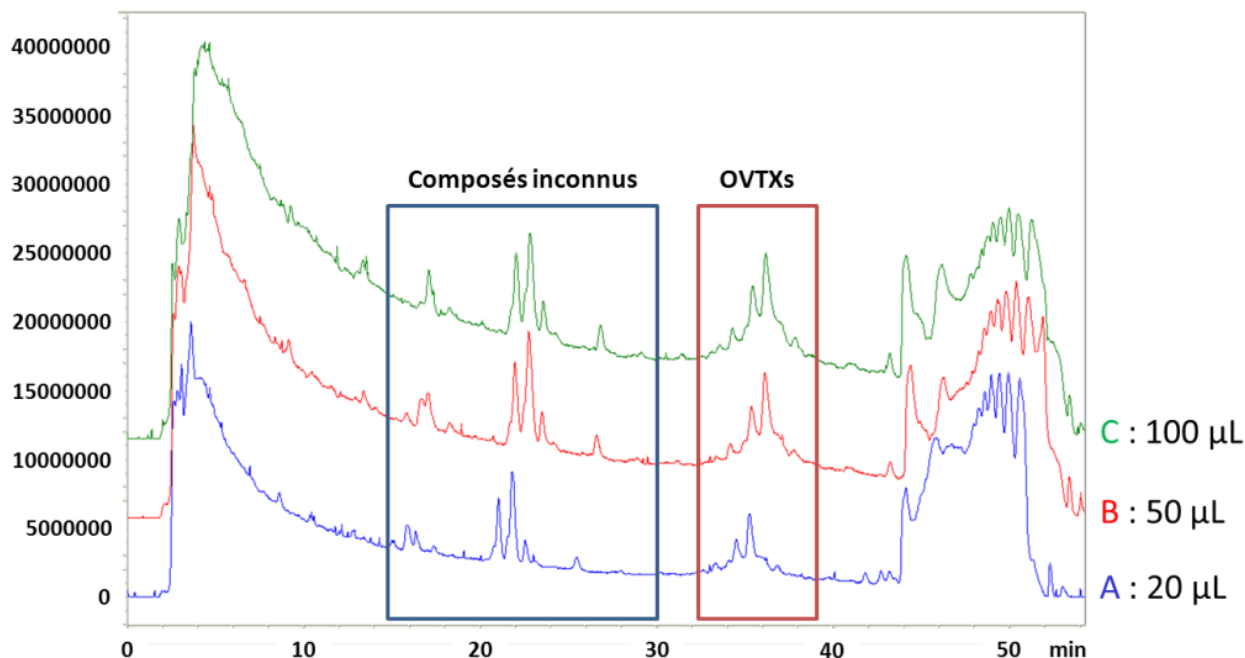


Figure 85. Comparaison des chromatogrammes de la **fraction c**, obtenus avec la colonne Uptisphere C₁₈-TF analytique (250×4,6 mm, 5 µm).

Solvant A : eau + 0,2 % d'acide acétique ; solvant B : ACN/eau 95/5 (v/v) + 0,2 % d'acide acétique. Gradient d'élution : 20 à 40 % de B en 40 min. Débit : 1 mL.min⁻¹. Volume d'injection : (A) 20 µL, (B) 50 µL, (C) 100 µL. Détection : SM en mode positif et en mode « full scan » (m/z [300-1450]).

Les chromatogrammes, obtenus avec la colonne analytique, montrent qu'en injectant des volumes de 50 ou 100 µL, on obtient une moins bonne séparation qu'avec 20 µL. Par conséquent, avec la colonne analytique, il faudrait limiter l'injection à 20 µL pour conserver une séparation suffisante pour les OVTXs. Cependant, les résultats obtenus avec des volumes de 50 et 100 µL ont été jugés acceptables pour la purification des OVTXs. Avec la colonne analytique, un volume de 100 µL peut donc être injecté pour le fractionnement des OVTXs. La colonne semi-préparative présente un volume mort environ 4 fois plus important que la colonne analytique, on peut donc envisager d'injecter un volume 4 fois plus important (400 µL).

4.1.2. Répétabilité des temps de rétention

Pour pouvoir programmer le collecteur de fractions, afin qu'il collecte les différentes ovatoxines aux temps de rétention voulus, il faut que les analyses soient répétables. Pour cela, la **fraction c** a été analysée sur la colonne Uptisphere C₁₈-TF analytique (250×4,6 mm, 5 µm) en injectant plusieurs fois un volume de 100 µL.

Dans ces conditions, la Figure 86 montre que l'analyse est répétable et que les temps de rétention des OVTXs ne changent pas d'une analyse à l'autre. De ce fait, les temps de collecte des OVTXs vont donc pouvoir être programmés sur le collecteur de fractions.

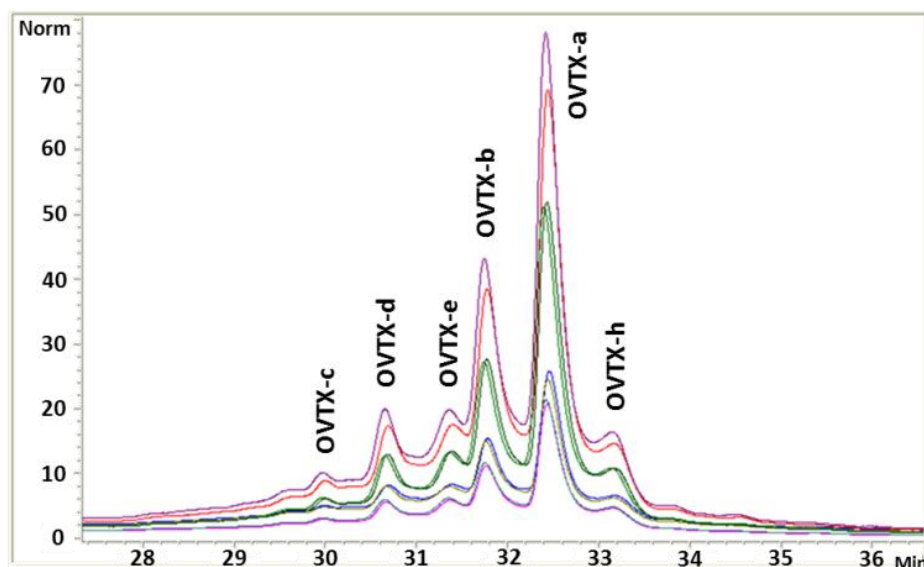


Figure 86. Comparaison des chromatogrammes de la **fraction c** ; injectée 8 fois.

Colonne Uptisphere C₁₈-TF (250×4,6 mm, 5 μm). Solvant A : eau + 0,2 % d'acide acétique ; solvant B : ACN/eau 95/5 (v/v) + 0,2 % d'acide acétique. Gradient d'élution : 20 à 40 % de B en 40 min. Débit : 1 mL.min⁻¹. Volume d'injection : 100 μL. Détection : UV à 263 nm.

4.2. Collecte des OVTXs après séparation sur une colonne analytique

Les premiers essais de purification ont été effectués sur la colonne Uptisphere C₁₈-TF analytique (250×4,6 mm, 5 μm) avec la **fraction c**. Les fractions ont été récupérées toutes les 20 secondes dans la partie du chromatogramme correspondant à l'élution des OVTXs (Figure 87). Plusieurs injections successives de 100 μL d'échantillon ont été effectuées, le suivi de la séparation étant assuré par le détecteur UV- à 263 nm. En effet, ce type de détecteur n'est pas destructif pour les échantillons et permet, de ce fait, de ne pas perdre de composés d'intérêt.

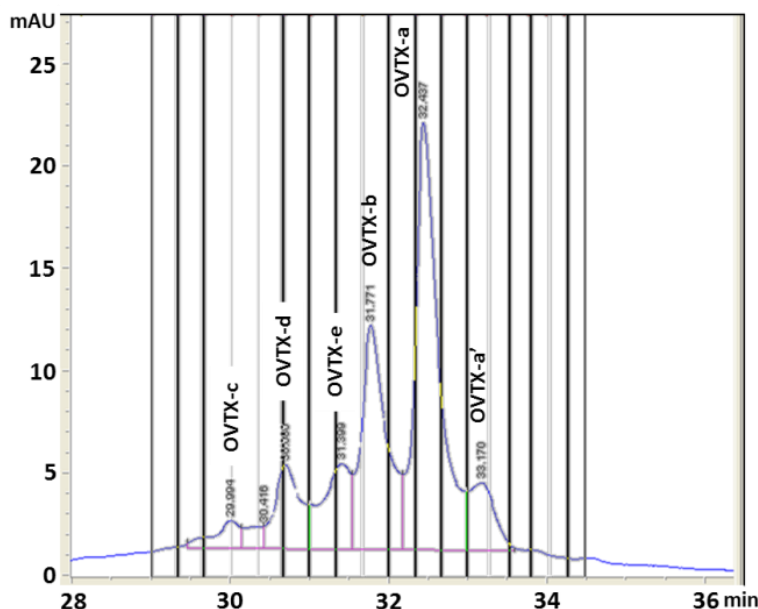


Figure 87. Chromatogramme montrant les différentes fractions récoltées par le collecteur de fractions.

Colonne Uptisphere C₁₈-TF (250×4,6 mm, 5 μm). Solvant A : eau + 0,2 % d'acide acétique ; solvant B : ACN/eau 95/5 (v/v) + 0,2 % d'acide acétique. Gradient d'éluion : 20 à 40 % de B en 40 min. Débit : 1 mL.min⁻¹. Volume d'injection : 100 μL. Détection : UV à 263 nm.

Comme les toxines prépurifiées étaient présentes en très faibles quantités, et étant donné les problèmes de dégradation et de perte des toxines lors des opérations d'évaporation à sec et de reprise, il était très difficile de réaliser un bilan massique pour chacune des fractions collectées. Par conséquent, le degré de pureté de chaque ovatoxine n'a pas pu être déterminé. Néanmoins, les proportions des différentes ovatoxines de chacune des fractions ont pu être estimées à l'aide des aires des pics obtenus par CL/UV à 263 nm. On obtient alors :

- une fraction A contenant majoritairement de l'OVTX-d (61 %) en association de l'OVTX-c (Figure 88-A) ;
- une fraction B contenant un mélange d'OVTX-b (58 %), d'OVTX-e (20 %), d'OVTX-d (14 %) et d'OVTX-c (3 %) (Figure 88-B) ;
- une fraction C contenant 100 % d'OVTX-b (Figure 88-C) ;
- une fraction D contenant 88 % d'OVTX-a (Figure 88-D).

L'analyse de ces mêmes fractions en spectrométrie de masse en mode « full scan » montre que les OVTXs sont majoritairement présentes dans ces extraits.

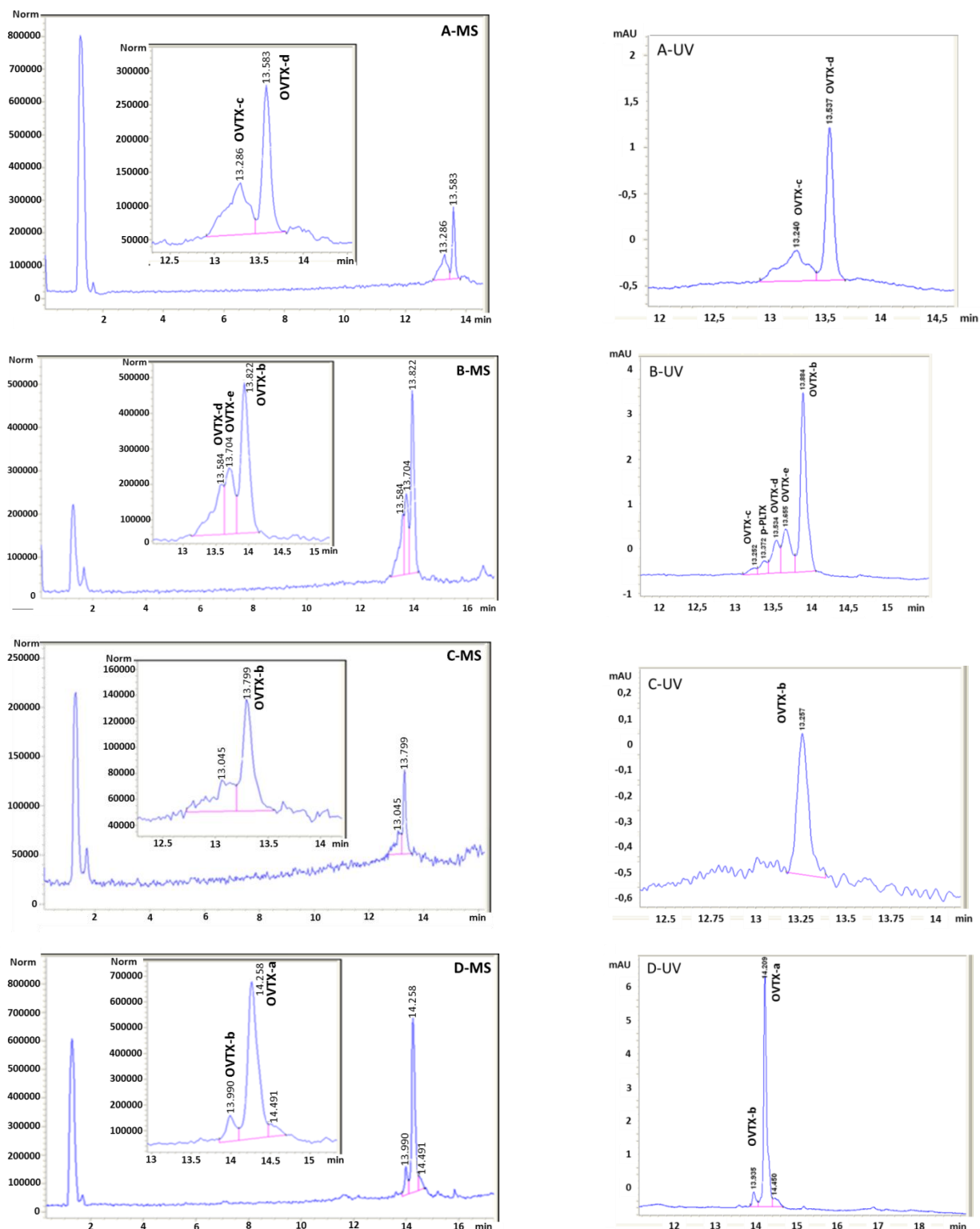


Figure 88. Comparaison des chromatogrammes des fractions obtenues après fractionnement des OVTXs.

Colonne Uptisphere C₁₈-TF, détectées à la fois en spectrométrie de masse (MSD : SM en mode positif et en mode « full scan » (m/z [300-1450]) et UV : détection UV (à 263 nm). Colonne Kinetex C₁₈ (100×4,6 mm, 2,1 μm). Solvant A : eau + 0,2 % d'acide acétique ; solvant B : ACN/eau 95/5 (v/v) + 0,2 % d'acide acétique. Gradient d'élution : 20 à 40 % de B en 20 min. Débit : 0,7 mL.min⁻¹. Volume d'injection : 20 μL.

Il est à noter que les pourcentages relatifs en toxines de départ des extraits avant fractionnement étaient de 54 % pour l'OVTX-a, 18 % pour l'OVTX-b, 7% pour l'OVTX-c, et 4 % pour l'OVTX-d/e. Le fractionnement a donc permis d'obtenir des fractions enrichies en p-PLTX-OVTXs et ne contenant que 2 ou 3 ovatoxines. Cependant, ces fractions doivent être fractionnées de nouveau pour obtenir des fractions encore plus pures. Cela pourrait être réalisé par exemple avec une colonne Kinetex C₁₈ ou une colonne PFP, pour améliorer la séparation des OVTX-e et OVTX-b notamment. Néanmoins, lorsqu'on compare la fraction enrichie en OVTX-a avec l'étalon de PLTX, analysé dans les mêmes, l'OVTX-a semble plus pure que la PLTX de référence (Figure 89). En effet, dans le chromatogramme de l'étalon de PLTX, seuls les pics aux temps de rétention 13,744 et 13,897 minutes correspondent aux ions caractéristiques de la PLTX.

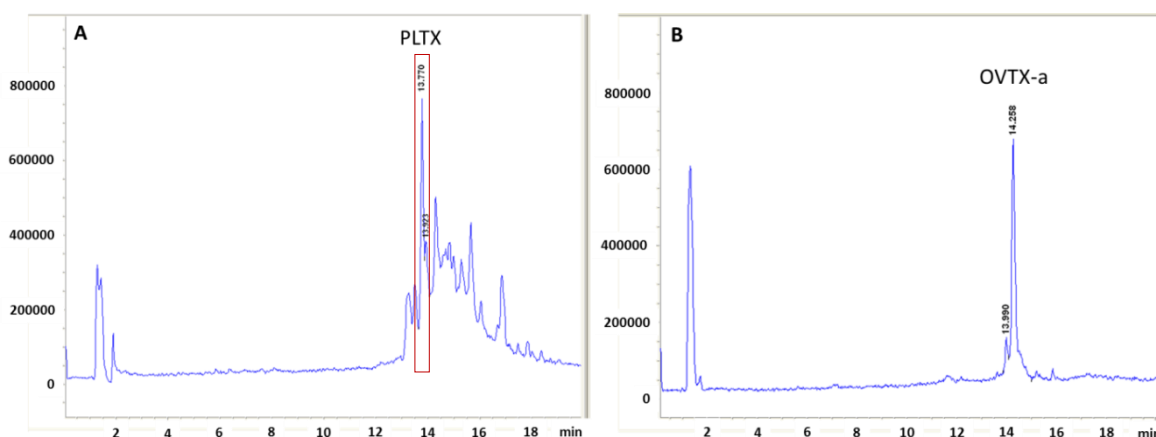


Figure 89. Comparaison des chromatogrammes (A) de l'étalon de PLTX ; (B) de la fraction d'OVTX-a obtenue après fractionnement.

Colonne Kinetex C₁₈ (100×4,6 mm, 2,1 μm). Solvant A : eau + 0,2 % d'acide acétique ; solvant B : ACN/eau 95/5 (v/v) + 0,2 % d'acide acétique. Gradient d'élution : 20 à 40 % de B en 20 min. Débit : 0,7 mL.min⁻¹. Volume d'injection : 20 μL. Détection : SM en mode positif « full scan » (*m/z* [300-1450]).

4.3. Collecte des OVTXs après séparation sur une colonne semi-préparative

Des essais préliminaires ont été réalisés avec la colonne Uptisphere C₁₈-TF semi-préparative. Pour ces essais, plusieurs injections successives de 400 μL de la **fraction d** ont été réalisées. Le suivi de la séparation a été assuré par le détecteur DAD à 263 nm. La collecte des fractions a été réalisée par le collecteur de fractions (Figure 90).

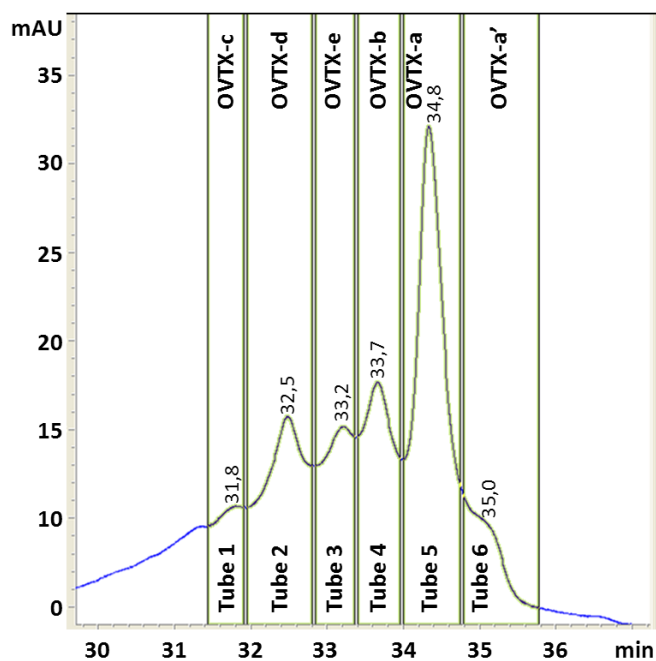


Figure 90 Chromatogramme montrant les différentes fractions récoltées par le collecteur de fraction.

Colonne Uptisphere C₁₈-TF (250×10 mm, 5 μm). Solvant A : eau + 0,2 % d'acide acétique ; solvant B : ACN/eau 95/5 (v/v) + 0,2 % d'acide acétique. Gradient d'éluion : 20 à 40 % de B en 40 min. Débit : 4 mL.min⁻¹. Volume d'injection : 400 μL. Détection : UV à 263 nm.

Les fractions ont été ensuite quantifiées par CL-SM/SM. À la suite de quoi, les fractions contenant majoritairement les mêmes OVTXs ont été rassemblées. Une aliquote a été analysée en CL-SM/SM, puis les échantillons ont été concentrés par évaporation. Le Tableau 31 rassemble les données de quantification des fractions injectées.

Tableau 31. Quantité de toxines et proportion des OVTXs dans la **fraction d** de départ puis, après fractionnement, après rassemblement des fractions contenant les mêmes OVTXs et après concentration des fractions par évaporation partielle.

Toxines	p-PLTX µg (%)	OVTX-a µg (%)	OVTX-b µg (%)	OVTX-c µg (%)	OVTX-d µg (%)	OVTX-e µg (%)	OVTX-f µg (%)	OVTX-h µg (%)	Total (Eq PLTX)
Quantité de toxines dans la fraction d									
	128 (12)	591 (56)	93 (9)	25 (2)	95 (9)	37 (4)	20 (2)	65 (6)	1054
Quantité de toxines après rassemblement des fractions									
Tube 2	23 (15)	20 (13)	8 (5)	8 (5)	86 (57)	6 (4)	0 (0)	0 (0)	152
Tube 3	14 (15)	17 (18)	11 (11)	6 (6)	27 (29)	20 (21)	0 (0)	0 (0)	94
Tube 4	25 (12)	38 (18)	58 (28)	11 (5)	54 (26)	15 (7)	4 (2)	4 (2)	209
Tube 5	44 (9)	285 (60)	26 (5)	4 (1)	94 (20)	1 (0)	4 (1)	18 (4)	476
Tube 6	10 (11)	58 (63)	0 (0)	0 (0)	19 (21)	0 (0)	0 (0)	4 (5)	90
Total	116 (11)	417 (41)	103 (10)	29 (3)	280 (27)	43 (4)	8 (0.8)	26 (2)	1021
Quantité totale de toxines après évaporation									
	168 (23)	311 (43)	55 (8)	34 (5)	127 (18)	17 (2)	11 (1.5)	2 (0)	723

Tout d'abord, il faut noter que la quantité d'OVTX-c présente dans le tube de récupération n°1 était trop faible pour permettre sa quantification. Dans le tube 2, l'OVTX-d récupérée voit son pourcentage augmenter de 9 à 57 %. Le tube 3 correspond à la récolte de l'OVTX-e. Compte tenu de la faible proportion de cette toxine dans la fraction de départ (4 %) et du fait qu'elle est éluée entre l'OVTX-d et l'OVTX-a (majoritaire dans l'extrait), il n'a pas été possible d'obtenir des teneurs supérieures à 21 %. Pour la même raison, dans le tube 4, correspondant à la récolte de l'OVTX-b, nous n'obtenons que 26 % de cette toxine, les autres toxines présentes étant l'OVTX-a (32 %) et l'OVTX-d (25 %). Le tube de récupération de l'OVTX-a (tube 5) a permis d'augmenter légèrement le pourcentage de cette toxine (de 56 à 60 %). Curieusement, la seconde toxine majoritaire dans cette fraction est l'OVTX-d (20 %), qui est éluée bien avant l'OVTX-a. Cette observation peut également être faite pour le tube 6 qui correspond à la récupération de l'OVTX-a', considérée comme un isomère de l'OVTX-a. En effet, dans cette fraction l'OVTX-a' est majoritaire (63 %), puis l'OVTX-d, éluée bien avant cette toxine (21 %), et l'OVTX-h (5 %) qui est éluée juste après.

L'analyse des résultats obtenus sur les différentes fractions montre, d'une part, que la quasi-totalité des toxines est récupérée lors du fractionnement et du rassemblement des fractions, alors que le profil toxinique est modifié. En effet, d'une manière générale, les proportions d'OVTX-d et de p-PLTXs sont augmentées au cours du processus de purification, au détriment de

l'OVTX-a. En revanche, pendant l'étape d'évaporation, on observe une perte de toxines, dont la quantité totale passe de 1021 μg à 723 μg . De plus, le pourcentage de p-PLTXs a encore augmenté, au détriment de l'OVTX-d ; la proportion d'OVTX-a en revanche n'ayant pas changé.

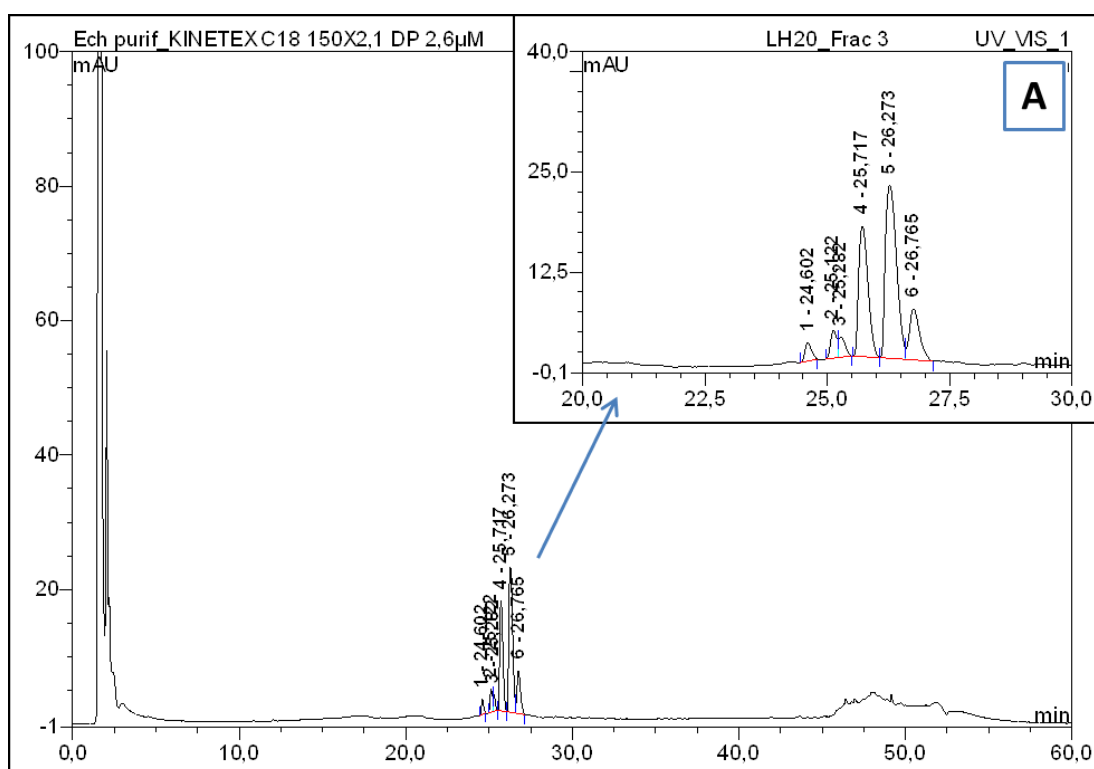
Sachant que les étapes de fractionnement, d'analyse des fractions, de rassemblement et d'évaporation ont duré plusieurs semaines, et sachant que l'OVTX-d possède un atome d'oxygène de plus que l'OVTX-a et un atome d'oxygène de moins que la p-PLTX, on peut donc supposer que, lorsque les toxines sont plus pures, il se produit une oxydation de l'OVTX-a en OVTX-d, puis une oxydation de l'OVTX-d en p-PLTX. Les toxines purifiées ne seraient donc pas très stables, alors que lorsqu'elles sont mélangées au contenu cellulaire, les concentrations respectives des toxines restent stables dans le temps. Cela peut peut-être expliquer pourquoi l'étalon de palytoxine n'est pas pur. Nous supposons que le fabricant rajoute des adjuvants qui stabilisent la palytoxine. Des études de stabilité sont donc nécessaires avant d'envisager la purification finale des ovatoxines.

5. Intérêt de l'acidification de la phase mobile

Tout au long de nos études, nous avons noté qu'acidifier les extraits d'*Ostreopsis cf. ovata* avait un impact négatif sur leur quantification. C'est d'ailleurs pour cette raison que deux prélèvements différents sont effectués lors de la récolte des cultures, un pour le comptage cellulaire, après acidification du milieu de culture, et un autre pour l'extraction des cellules, extraction effectuée en milieu non acidifié, contrairement à ce qui peut être décrit dans la littérature [24]. De plus, des problèmes de stabilité ont été mis en évidence au cours du processus de purification des OVTXs. Tous ces éléments laissent penser que l'acide utilisé dans la phase mobile pourrait entraîner une dégradation des OVTXs, après fractionnement des échantillons injectés sur une colonne semi-préparative et pendant l'étape d'évaporation des fractions. Pour contourner ce problème, une méthode de séparation chromatographique sans acidification des phases mobiles a donc été envisagée.

Pour cela, deux analyses chromatographiques ont été effectuées sur la **fraction b** : la première avec un gradient d'élution réalisé avec un éluant A constitué d'eau et un éluant B constitué d'ACN/eau 95/5 (v/v), tous deux contenant 0,2 % d'acide acétique, et la seconde avec les mêmes éluants, sans addition d'acide.

Ces essais ont tout d'abord été réalisés avec la colonne analytique Uptisphere C₁₈-TF. Cependant, nous avons observés qu'en absence d'acide acétique, les OVTXs sont totalement retenues sur la colonne, probablement par des interactions électrostatiques fortes entre le groupement amide chargé et les groupements silanols ionisés négativement (à pH acide, ces groupements silanols sont très faiblement ionisés). Pour confirmer cette hypothèse, les mêmes essais ont été réalisés avec la colonne Kinetex C₁₈, pour laquelle les essais de qualification de colonne ont montré qu'elle présentait moins d'interactions potentielles avec les groupements silanols (activité silanoliques plus faible). Les chromatogrammes, obtenus avec et sans acide acétique sont présentés dans les Figure 91 A et B.



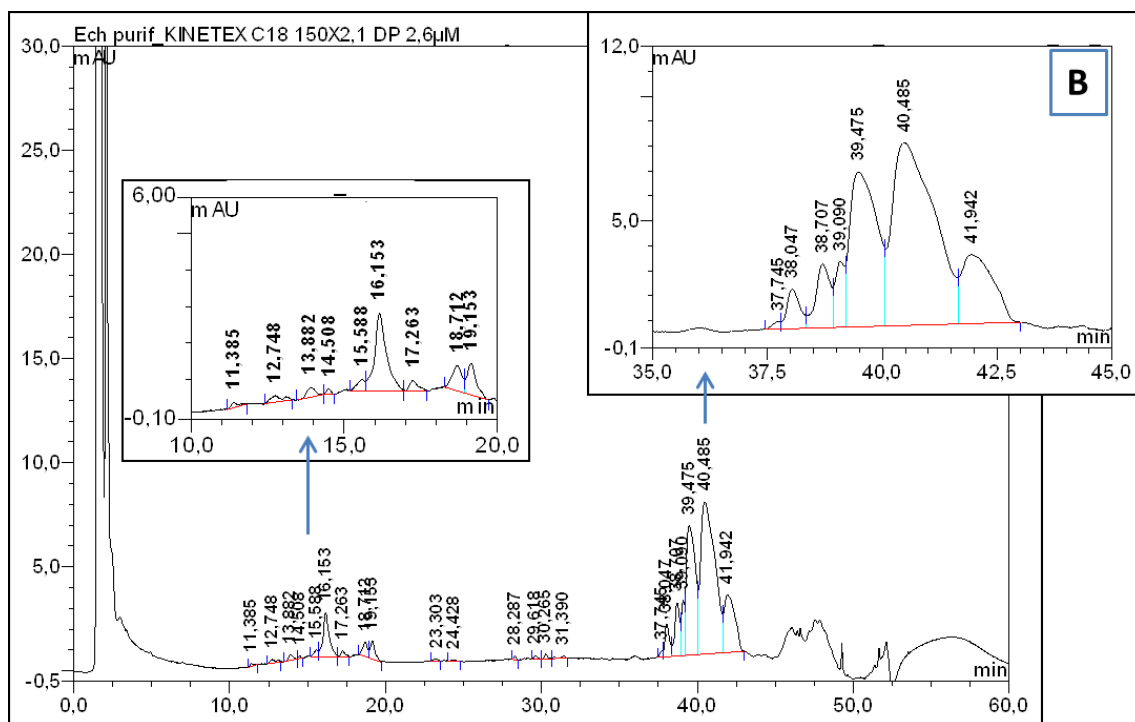


Figure 91. Comparaisons des chromatogrammes d'une **fraction b**.

Colonne Kinetex C₁₈ (150×2,6 mm, 2,1 μm). (A) : solvant A : eau + 0,2 % d'acide acétique ; solvant B : acétonitrile/eau 95/5 (v/v) + 0,2 % d'acide acétique ; (B) : solvant A : eau ; solvant B : ACN/eau 95/5 (v/v). Gradient d'éluion : 20 à 40 % de B en 40 min. Débit : 1 mL.min⁻¹. Volume d'injection : 2 μL. Détection : UV à 263 nm.

Les chromatogrammes obtenus montrent une augmentation des temps de rétention importante pour les OVTXs, de près de 13 minutes, lorsque l'acide acétique est éliminé de la phase mobile. Un étalement des pics est également observé, entraînant une perte importante de la résolution. De plus, lorsque la séparation des OVTXs est effectuée sans acide, on observe l'apparition de pics supplémentaires, correspondant à des composés présentant le même spectre UV que les OVTXs, à environ 16 min.

L'acidification de la phase mobile neutralise les groupements silanols, réduit les interactions avec les OVTXs et ainsi diminue les temps de rétention des OVTXs, ce qui laisse penser qu'il permet de diminuer les interactions électrostatiques entre les OVTXs et les silanols ionisés. En effet, lorsque l'acide acétique est supprimé de la phase mobile, la proportion de groupements silanols ionisés augmente, permettant une augmentation de l'interaction de ces groupements avec les groupements amines chargés positivement des OVTXs, augmentant ainsi leur rétention, la largeur et l'asymétrie des pics et diminuant leur séparation. L'acidification de la phase mobile est donc un élément favorable pour obtenir une bonne séparation des OVTXs en vue de la purification.

6. Conclusion

Quelques équipes ont proposé des techniques de purification à partir d'*Ostreopsis cf. ovata*, sans pour autant montrer leur efficacité [26, 109, 114, 222, 223]. Seule Ciminiello a réussi à purifier l'OVTX-a à partir d'une souche ne produisant quasiment que de l'OVTX-a [26]. Sachant qu'à l'heure actuelle, huit ovatoxines ont été mises en évidence dans des extraits d'*Ostreopsis cf. ovata* du pourtour méditerranéen, et sachant par ailleurs qu'une équipe japonaise a démontré que leurs souches présentaient des isomères des OVTXs décrites à partir des souches d'*Ostreopsis* méditerranéennes, le challenge est donc de trouver une méthode capable de purifier les OVTXs à partir d'une souche produisant toutes les OVTXs.

Ce challenge est d'autant plus important qu'une nouvelle ovatoxine, l'OVTX-h, a été détectée dans les souches françaises d'*Ostreopsis cf. ovata*, provenant de Villefranche-sur-Mer et cultivées au laboratoire Phycotoxines de l'IFEREMER de Nantes. Cette OVTX présente un atome d'oxygène de moins et 2 atomes d'hydrogène de plus que l'OVTX-a. Les parties de la molécule où se trouvent les différences structurales avec l'OVTX-a restent encore incertaines, une ouverture de cycle peut néanmoins être suspectée.

La stratégie de purification a été, tout d'abord, d'extraire les toxines uniquement à partir des culots cellulaires d'*Ostreopsis cf. ovata*. En effet, nous avons démontré que le relargage des toxines dans le milieu de culture, au moment de la récolte cellulaire, était négligeable. Les extraits sont ensuite prépurifiés sur une colonne remplie avec une phase chromatographique d'exclusion stérique, Sephadex LH-20. Cette étape permet d'éliminer 85 % des composés indésirables et de récupérer 80 % des toxines présentes dans l'extrait de départ. Néanmoins, plusieurs précautions sont à prendre lors de la séparation des composés sur la phase Sephadex LH-20 et de la récupération des toxines à partir des fractions d'intérêt :

- éviter l'évaporation totale de l'extrait d'*Ostreopsis* et préférer sa concentration, avant dépôt en tête de colonne ;
- solubiliser les extraits d'*Ostreopsis* dans un mélange MeOH/H₂O 1/1 (v/v) ;
- filtrer sur filtre 0,45 µm, puis déposer en tête de colonne ;
- éluer les composés avec du MeOH, moins visqueux que le MeOH/H₂O 1/1 (v/v) pour diminuer les temps d'élution ;

- rajouter un volume équivalent d'eau aux fractions obtenues en sortie de colonne, afin de diminuer les interactions entre les OVTXs et les parois des tubes et améliorer leur solubilité ;
- stocker les fractions dans des flacons en plastique (polypropylène) afin d'éviter les adsorptions.

En effet, lors du processus de purification des OVTXs, des problèmes de « stabilité » des solutions d'OVTXs ont été mis en évidence. En effet les OVTXs ont tendance à s'absorber sur les parois de flacons, notamment en verre. Des transformations de certaines OVTXs en d'autres OVTXs sont également suspectées. Par conséquent, avant d'envisager une méthode de purification finalisée des OVTXs, des études de stabilité sont nécessaires, notamment pour vérifier l'impact de solutions acides sur la dégradation et/ou la transformation des OVTXs.

Les fractions enrichies issues de l'étape de prépurification sur la phase Sephadex LH-20 ont permis de sélectionner trois phases stationnaires (Kinetex C₁₈, Kinetex PFP et Uptisphere C₁₈-TF) permettant d'obtenir une bonne séparation des OVTXs. Parmi ces trois phases sélectionnées, une phase a été retenue pour réaliser la purification des OVTXs : la phase Uptisphere C₁₈-TF.

Cette dernière permet de mieux séparer les OVTXs, notamment l'OVTX-d et l'OVTX-e, deux isomères difficiles à séparer ainsi que l'OVTX-a et l'OVTX-a'. Le fractionnement des OVTXs sur cette colonne a permis d'obtenir des fractions enrichies en OVTXs et contenant au maximum trois toxines à la fois. Une étape ultérieure de purification devra donc être envisagée pour obtenir des fractions qui contiennent des toxines pures. L'utilisation des phases Kinetex C₁₈ ou Kinetex PFP pourrait être envisagée pour le second fractionnement afin de séparer notamment l'OVTX-b et l'OVTX-e.

Pour résumer, le processus de purification peut être résumé par le schéma de la Figure 92 :

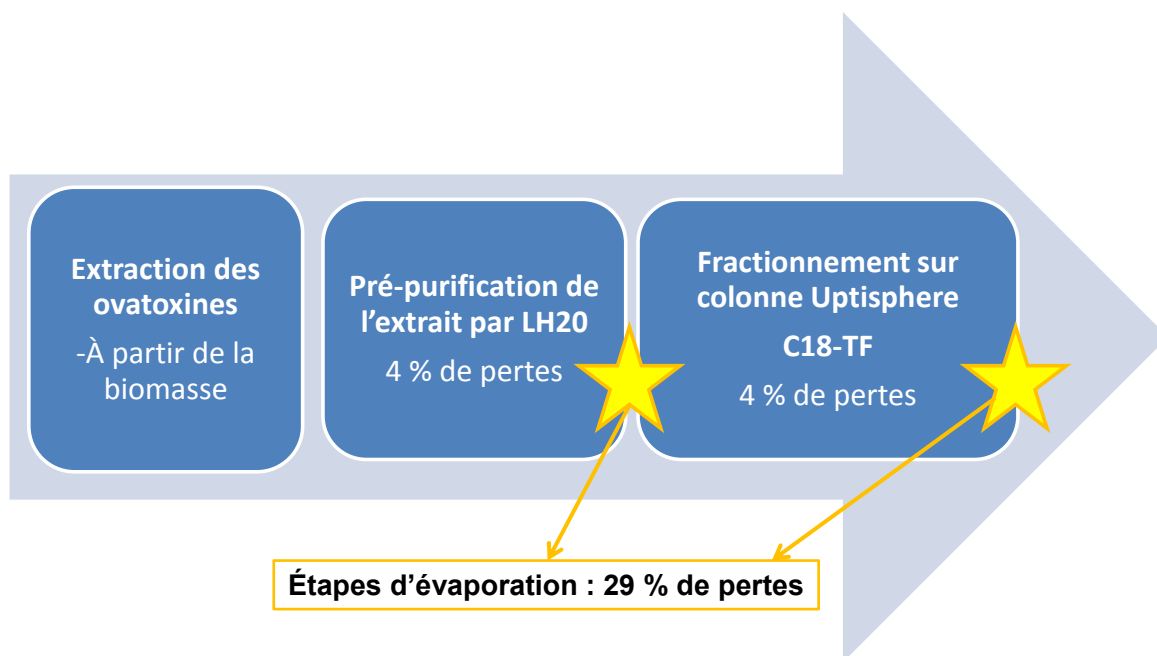


Figure 92. Processus de purification proposé, ainsi que les pertes en ovatoxines observées pour chaque étape.

Conclusion générale et perspectives

Les dinoflagellés du genre *Ostreopsis* sont connus dans les zones tropicales pour être à l'origine d'intoxications alimentaires, suite à l'accumulation de palytoxine dans les produits de la mer. Probablement en lien avec le changement climatique, *Ostreopsis spp.* est de plus en plus présent, depuis 2006, en Méditerranée nord occidentale. En France, c'est l'espèce *Ostreopsis cf. ovata* qui prolifère régulièrement sur le littoral méditerranéen, produisant, en plus de la palytoxine, huit autres toxines de structure proche, nommées ovatoxines-a, -b, -c, -d, -e, -f, -g et -h (OVTX-). Parmi ces toxines, seules les structures de la palytoxine et de l'ovatoxine-a sont connues et caractérisées par RMN. De plus, jusqu'à fin 2013, seul l'étalon non certifié de palytoxine était disponible pour la détermination de la concentration en OVTXs dans différents échantillons (phytoplancton, produits de la mer...). Or, la PLTX ne représente que 10% du profil toxinique d'*Ostreopsis cf. ovata*. C'est pourquoi, pour la quantification des ovatoxines, le résultat est exprimé en équivalent-palytoxine, en considérant que les OVTXs se fragmentent, en spectrométrie de masse (SM), de la même manière que la PLTX et qu'elles présentent le même facteur de réponse. Afin de déterminer des seuils d'alerte et de sécurité sanitaire à l'égard des toxines majoritairement impliquées en Méditerranée dans la contamination d'organismes, il est indispensable de disposer d'étalons d'ovatoxines et de matériaux de référence pour, développer et valider des méthodes de quantification applicables en routine, mais aussi pour mener des études toxicologiques permettant d'évaluer le risque de l'impact des OVTXs chez le consommateur, en comparaison avec les données acquises sur la PLTX. En effet, à l'heure actuelle, aux niveaux européen et international, il n'existe aucune réglementation régissant la gestion des produits de la mer vis-à-vis de la contamination par les toxines d'*O. ovata*.

Dans ce contexte, cette thèse avait trois objectifs :

- acquérir des données sur les niveaux d'accumulation de la p-PLTX et des OVTXs dans différents produits de la mer en Méditerranée, sur les côtes françaises.
- obtenir un grand volume de culture d'*Ostreopsis cf. ovata* afin d'utiliser la biomasse produite pour purifier les toxines.
- proposer un protocole de purification des OVTXs, afin notamment d'estimer leur toxicité sur des tests biologiques.

Les études terrains, effectués à Villefranche-sur-Mer en 2011 et 2012, montrent qu'*Ostreopsis cf. ovata* prolifère dans les eaux côtières françaises méditerranéennes, parfois à de fortes

concentrations cellulaires. Ces cellules sont capables de produire des toxines au moins jusqu'à cinq mètres de profondeur. La présence de fortes abondances de cellules planctoniques d'*Ostreopsis cf. ovata* représente donc potentiellement un risque pour les baigneurs. Les résultats de ces campagnes de prélèvement montrent également qu'il existe un risque pour le consommateur d'organismes marins capables d'accumuler les toxines d'*Ostreopsis* dans leurs tissus (oursins, saupes). Malgré l'absence de régulation officielle au niveau des autorités européennes, l'EFSA recommande une limite de 30 µg d'équivalent PLTX /kg de produits de la mer. Si on considère que les OVTXs sont aussi toxiques que la PLTX, cette limite a largement été dépassée dans certains échantillons prélevés en 2011 et 2012, notamment dans les échantillons d'oursins. Même si la pêche aux oursins n'est pas autorisée durant la période estivale en Méditerranée (ouverture administrative de la pêche de novembre à mars), le risque reste réel concernant la pêche « sauvage ».

Comme l'analyse chimique par CL-SM/SM est onéreuse et demande des compétences techniques particulières, le test hémolytique peut être proposé comme un outil de dépistage pour mettre en évidence une accumulation des p-PLTX-OVTXs dans les produits de la mer. Sachant que les OVTXs représentent 90% du profil toxinique des échantillons biologiques (phytoplancton, produits de la mer), les résultats obtenus avec le test hémolytique, pour des échantillons contaminés, suggèrent que les OVTXs présentent un pouvoir hémolytique similaire à la PLTX. En effet, comme les structures chimiques de la PLTX et des OVTXs sont très voisines, il est fort probable que les ovatoxines présentent le même mécanisme d'action de celui de la PLTX : inhibition de la pompe sodium/potassium (Na^+/K^+ -ATPase). Les mises au point réalisées par la suite au laboratoire, pour le test hémolytique, ont permis d'améliorer cette méthode, notamment en miniaturisant le test dans des plaques 96 puits permettant ainsi d'augmenter la sensibilité et de diminuer les effets matrice. Cependant, la confirmation des effets biologiques des OVTXs nécessite de disposer de matériaux de référence d'ovatoxines pour réaliser des études toxicologiques. C'est pourquoi, un des objectifs de la thèse était d'étudier la faisabilité d'isolement d'ovatoxines à partir d'extraits de cultures d'*Ostreopsis cf. ovata*.

La purification des ovatoxines à partir des cellules d'*Ostreopsis cf. ovata* est plus simple à réaliser plutôt qu'à partir d'organismes contaminés qui présentent des matrices plus complexes. Dans un premier temps, des études complémentaires d'optimisation des conditions de culture d'*Ostreopsis cf. ovata* ont été menées, à la fois sur des souches d'*Ostreopsis* déjà isolées et cultivées au laboratoire Phycotoxines ainsi que sur des nouvelles

souches, isolées lors des études terrains. Différents essais, visant à favoriser la production de toxines ou à augmenter le volume de culture, ont été effectués. Ils ont permis de montrer que nos conditions de culture (enrichissement avec du milieu L1 et de l'extrait de terre, température à 22°C, luminosité 420 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, boîte de culture « Corning cell bind »...) étaient optimisées, favorisant ainsi la production de biomasse et de toxines. En effet, ces conditions permettent d'obtenir des concentrations toxiques plus importantes que celles reportées dans la littérature pour les souches méditerranéennes. Par ailleurs un changement dans les proportions d'ovatoxines d'*Ostreopsis* cf. *ovata* a été observé dans certaines conditions. L'étude approfondie des conditions pour lesquelles le profil toxinique change pourrait permettre de mieux comprendre le métabolisme toxinique cellulaire.

Grâce aux pâtes d'algues d'*Ostreopsis* récoltées en culture, des essais d'extraction et de purification de toxines ont pu être réalisés, afin de tenter de mettre au point une méthode de purification des ovatoxines. Sachant qu'à l'heure actuelle, sept ovatoxines ont été décrites dans des extraits d'*Ostreopsis* cf. *ovata*, isolés en Méditerranée, le challenge est donc de trouver une méthode capable de purifier ces OVTXs. Ce challenge est d'autant plus important que nous avons mis en évidence la présence d'une nouvelle ovatoxine, l'OVTX-h, dans les souches françaises provenant de Villefranche-sur-Mer et cultivées au laboratoire Phycotoxines. Cette OVTX-h présente un atome d'oxygène de moins et 2 atomes d'hydrogène de plus que l'OVTX-a. Les parties de la molécule où se trouvent les différences structurales avec l'OVTX-a restent encore incertaines, une ouverture de cycle peut néanmoins être suspectée.

La stratégie de purification a été, tout d'abord, d'extraire les toxines à partir de culots cellulaires d'*Ostreopsis*. En effet, nous avons démontré que le relargage des toxines dans le milieu de culture, au moment de la récolte cellulaire, était négligeable. Les extraits cellulaires sont ensuite filtrés sur filtre 0,45 μm puis prépurifiés sur une colonne remplie avec une phase chromatographique d'exclusion stérique, Sephadex LH-20, l'élution étant réalisée avec du méthanol. Cette étape permet d'une part d'éliminer 85 % de composés indésirables et d'autre part de récupérer 80 % des toxines présentes dans l'extrait de départ. Ce protocole pourrait être encore amélioré avec l'utilisation d'une chaîne chromatographique « flash » pour automatiser la prépurification des extraits d'*Ostreopsis* et de mieux maîtriser les débits de phase mobile. La constance du débit d'élution permettrait d'automatiser le processus et de le rendre plus robuste. Les fractions enrichies en ovatoxines, issues de l'étape de prépurification sur la phase Sephadex LH-20, ont permis de sélectionner, parmi les huit phases

chromatographiques testées, la phase Uptisphere C18-TF pour réaliser la purification des OVTXs en CL-DAD/SM. En effet cette phase permet d'obtenir les meilleures séparations des OVTXs, notamment pour les OVTX-d et OVTX-e (deux isomères) et les OVTX-a et OVTX-a' (deux isomères également). Le fractionnement des sept ovatoxines présentes dans les cellules d'*Ostreopsis* (OVTX-a, -a', -b, -c, -d, -e, -h) sur cette colonne a permis d'obtenir des fractions contenant au maximum trois toxines à la fois. Une étape ultérieure de purification finale devra donc être envisagée. Lors des essais de sélection des colonnes, il s'est avéré que l'utilisation des phases Kinetex C₁₈ ou Kinetex PFP pourrait être envisagée, pour un fractionnement ultérieur, afin de séparer notamment l'OVTX-e de l'OVTX-b, d'autant de phases Kinetex « préparatives » sont désormais disponibles. Après leur isolement, les ovatoxines purifiées devront faire l'objet : i) d'études toxicologiques, afin de mieux apprécier le risque sanitaire ; ii) d'élucidation structurale en RMN. Les composés isolés en quantité notable serviront au développement et à la validation de méthodes physico-chimiques d'identification et de quantification des ovatoxines, ainsi que de méthodes biologiques alternatives pour le contrôle en routine de ces toxines dans différentes matrices (phytoplancton, produits de la mer...).

Lors du processus de purification, des problèmes de stabilité de ces toxines ont été mis en évidence. Ces dernières ont tendance à s'adsorber sur les parois de flacons en verre. C'est pourquoi, il est judicieux de : i) ne pas évaporer à sec les extraits enrichis en toxines ; ii) stocker les fractions d'intérêt dans des flacons en plastique (polypropylène). Par ailleurs, des transformations de certaines OVTXs en d'autres dérivés sont également suspectées. Par conséquent, avant d'envisager une purification en masse de ces toxines, des études de stabilité sont nécessaires, notamment pour vérifier l'impact de solutions acides sur la dégradation et/ou la transformation des OVTXs.

Pour améliorer la quantité de biomasse obtenue lors des cultures, l'utilisation de flacons Fernbach pourrait être une alternative économique à la culture en boîtes « Corning cell bind » sous réserve, au préalable, de laisser s'adapter les cellules sur ce type de support. Des études de stabilité sont également à envisager avant de poursuivre les mises au point des dernières étapes de purification. Ces études devront porter sur l'influence de différents facteurs tels que la température, le pH des solutions, la nature des différentes parois en contact avec les OVTXs, afin d'améliorer le protocole de purification et ainsi augmenter les rendements obtenus. Une étape intermédiaire pourrait être envisagée entre l'étape de prépurification par Sephadex LH-20 et l'étape de fractionnement, basée sur des interactions hydrophobes, afin

d'obtenir une fraction encore plus riche en ovatoxines, et ainsi faciliter leur séparation sur une phase chromatographique. Enfin, des phases stationnaires fortement désactivées devraient être utilisées afin de réduire l'interaction avec les silanols, et ainsi permettre l'utilisation de phases mobiles non (ou faiblement) acidifiées. Bien que n'ayant pas réussi à obtenir des fractions suffisamment pures en OVTXs, nos travaux de thèse ont permis d'acquérir des données qui, nous l'espérons, permettront d'aboutir à une méthode d'obtention des OVTXs pures et de contribuer à l'analyse de l'impact sanitaire, lié à la problématique *Ostreopsis* en Méditerranée nord occidentale.

Références

1. Anonymous: **The state of world fisheries and aquaculture**. In: *World review of fisheries and aquaculture*. 2012.
2. Daneshian M, Botana LM, Bottein M-YD, Buckland G, Campas M, Dennison N, Dickey RW, Diogene J, Fessard V, Hartung T, Humpage A, Leist M, Molgo J, Quilliam MA, Rovida C, Suarez-Isla BA, Tubaro A, Wagner K, Zoller O, Dietrich D: **A roadmap for hazard monitoring and risk assessment of marine biotoxins on the basis of chemical and biological test systems**. *Altex-Alternatives to Animal Experimentation* 2013, **30(4)**:487-545.
3. Ciminiello P, Forino M, Dell'Aversano C: **Seafood Toxins : Classes, Sources, and Toxicology**. In: *Handbook of Marine Natural Products*. Edited by E. Fattorusso WHG, O. Tagliatalata: Springer Netherlands; 2012.
4. Billard C, Fresnel J, Chrétiennot-Dinet MJ: **Les espèces productrices de phycotoxines marines et leur détection**. In: *Toxines d'algues dans l'alimentation*. Edited by Frémy JM, Lassus P. Plouzané, France: Ifremer - Afssa; 2001: 131-156.
5. Hallegraeff GM: **Harmful algae and their toxins : progress, paradoxes and paradigm shifts**. In: *Toxins and Biologically Active Compounds from Microalgae*. Edited by Rossini GP, vol. 1: CRC press, Taylor and Francis group; 2014.
6. Quod JP, Ten-Hage L, Molgo J, Benoit E, Turquet J, Bourdeau P: **La singularité des phycotoxines par rapport aux autres toxines marines**. In: *Toxines d'algues dans l'alimentation*. Edited by Frémy JM, Lassus P. Plouzané, France: Ifremer - Afssa; 2001: 231-247.
7. Brand LE: **Toxic harmful algal blooms: natural and anthropogenic causes**. In: *New trends in marine freshwater toxins*. Edited by Cabado AG, Vieities JM: Nova Science Publishers, Inc.; 2012.
8. Hallegraeff GM: **Ocean climate change, phytoplankton community responses, and harmful algal blooms: a formidable predictive challenge**. *Journal of Phycology* 2010, **46(2)**:220-235.
9. Munday R: **Palytoxin toxicology: Animal studies**. *Toxicon* 2011, **57(3)**:470-477.
10. Vila M, Garces E, Maso M: **Potentially toxic epiphytic dinoflagellate assemblages on macroalgae in the NW Mediterranean**. *Aquatic Microbial Ecology* 2001, **26(1)**:51-60.
11. Penna A, Vila M, Fraga S, Giacobbe MG, Andreoni F, Riobo P, Vernesi C: **Characterization of *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophyceae) isolates in the western Mediterranean Sea based on morphology, toxicity and internal transcribed spacer 5.8s rDNA sequences**. *Journal of Phycology* 2005, **41(1)**:212-225.
12. Mangialajo L, Bertolotto R, Cattaneo-Vietti R, Chiantore M, Grillo C, Lemee R, Melchiorre N, Moretto P, Povero P, Ruggieri N: **The toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis ovata*: Quantification of proliferation along the coastline of Genoa, Italy**. *Marine Pollution Bulletin* 2008, **56(6)**:1209-1214.
13. Totti C, Accoroni S, Cerino F, Cucchiari E, Romagnoli T: ***Ostreopsis ovata* bloom along the Conero Riviera (northern Adriatic Sea): Relationships with environmental conditions and substrata**. *Harmful Algae* 2010, **9(2)**:233-239.
14. Amzil Z, Sibat M, Chomerat N, Grossel H, Marco-Miralles F, Lemee R, Nezan E, Sechet V: **Ovatoxin-a and palytoxin accumulation in seafood in relation to *Ostreopsis cf. ovata* blooms on the French Mediterranean Coast**. *Marine Drugs* 2012, **10(2)**:477-496.

15. Brissard C, Herrenknecht C, Sechet V, Herve F, Pisapia F, Harcouet J, Lemee R, Chomerat N, Hess P, Amzil Z: **Complex toxin profile of french mediterranean *Ostreopsis cf. ovata* strains, seafood accumulation and ovatoxins prepurification.** *Marine Drugs* 2014, **12**(5):2851-2876.
16. Mangialajo L, Ganzin N, Accoroni S, Asnaghi V, Blanfune A, Cabrini M, Cattaneo-Vietti R, Chavanon F, Chiantore M, Cohu S, Costa E, Fornasaro D, Grosseil H, Marco-Miralles F, Maso M, Rene A, Maria Rossi A, Montserrat Sala M, Thibaut T, Totti C, Vila M, Lemee R: **Trends in *Ostreopsis* proliferation along the Northern Mediterranean coasts.** *Toxicon* 2011, **57**(3):408-420.
17. Tichadou L, Glaizal M, Armengaud A, Grosseil H, Lemee R, Kantin R, Lasalle J-L, Drouet G, Rambaud L, Malfait P, de Haro L: **Health impact of unicellular algae of the *Ostreopsis* genus blooms in the Mediterranean Sea: experience of the French Mediterranean coast surveillance network from 2006 to 2009.** *Clinical Toxicology* 2010, **48**(8):839-844.
18. Rhodes L, Towers N, Briggs L, Munday R, Adamson J: **Uptake of palytoxin-like compounds by shellfish fed *Ostreopsis siamensis* (Dinophyceae).** *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 2002, **36**(3):631-636.
19. Mebs D: **Occurrence and sequestration of toxins in food chains.** *Toxicon* 1998, **36**(11):1519-1522.
20. Aligizaki K, Katikou P, Milandri A, Diogene J: **Occurrence of palytoxin-group toxins in seafood and future strategies to complement the present state of the art.** *Toxicon* 2011, **57**(3):390-399.
21. Ciminiello P, Dell'Aversano C, Fattorusso E, Forino M, Tartaglione L, Grillo C, Melchiorre N: **Putative palytoxin and its new analogue, ovatoxin-a, in *Ostreopsis ovata* collected along the Ligurian coasts during the 2006 toxic outbreak.** *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 2008, **19**(1):111-120.
22. Ciminiello P, Dell'Aversano C, Dello Iacovo E, Fattorusso E, Forino M, Grauso L, Tartaglione L, Guerrini F, Pistocchi R: **Complex palytoxin-like profile of *Ostreopsis ovata*. Identification of four new ovatoxins by high-resolution liquid chromatography/mass spectrometry.** *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2010, **24**(18):2735-2744.
23. Ciminiello P, Dell'Aversano C, Dello Iacovo E, Fattorusso E, Forino M, Tartaglione L, Battocchi C, Crinelli R, Carloni E, Magnani M, Penna A: **Unique toxin profile of a Mediterranean *Ostreopsis cf. ovata* strain: HR LC-MSⁿ characterization of ovatoxin-f, a new palytoxin congener.** *Chemical Research in Toxicology* 2012, **25**(6):1243-1252.
24. Ciminiello P, Dell'Aversano C, Fattorusso E, Forino M, Magno GS, Tartaglione L, Grillo C, Melchiorre N: **The Genoa 2005 outbreak. Determination of putative palytoxin in Mediterranean *Ostreopsis ovata* by a new liquid chromatography tandem mass spectrometry method.** *Analytical Chemistry* 2006, **78**(17):6153-6159.
25. Ciminiello P, Dell'Aversano C, Dello Iacovo E, Fattorusso E, Forino M, Grauso L, Tartaglione L: **High Resolution LC-MSⁿ fragmentation pattern of palytoxin as template to gain new insights into ovatoxin-a structure. The key role of calcium in MS behavior of palytoxins.** *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 2012, **23**(5):952-963.
26. Ciminiello P, Dell'Aversano C, Dello Iacovo E, Fattorusso E, Forino M, Grauso L, Tartaglione L, Guerrini F, Pezzolesi L, Pistocchi R, Vanucci S: **Isolation and structure**

- elucidation of ovatoxin-a, the major toxin produced by *Ostreopsis ovata*. *Journal of the American Chemical Society* 2012, **134**(3):1869-1875.**
27. Hess P: **Phytoplankton and biotoxin monitoring programmes for the safe exploitation of shellfish in Europe.** In: *New trends in marine freshwater toxins*. Edited by Cabado AG, Vieites JM: Nova Science Publishers, Inc; 2011.
 28. Belin C, Soudant P, Amzil Z: **Surveillance des toxines lipophiles dans les coquillages. Analyse statistique et comparaison des résultats obtenus par deux méthodes d'analyse : les bioessais sur souris et les analyses chimiques par CL-SM/SM.** In.: Ifremer; 2009.
 29. Toyofuku H: **Joint FAO/WHO/IOC activities to provide scientific advice on marine biotoxins (research report).** *Marine Pollution Bulletin* 2006, **52**(12):1735-1745.
 30. Yasumoto T, Oshima Y, Yamaguchi M: **Occurrence of a new type of shellfish poisoning in Tohoku district.** *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 1978, **44**(11):1249-1255.
 31. Cembella AD: **Occurrence of okadaic acid, a major diarrhetic shellfish toxin, in natural populations of *Dinophysis spp.* from the eastern coast of north America.** *Journal of applied Phycology* 1989, **1**(4):307-310.
 32. Dickey RW, Bobzin SC, Faulkner DJ, Bencsath FA, Andrzejewski D: **Identification of okadaic acid from a caribbean dinoflagellate *Prorocentrum concavum*.** *Toxicon* 1990, **28**(4):371-377.
 33. Riobo P, E. L, Franco JM: **Chemical methods for detecting phycotoxins: LC and LC/MS/MS.** In: *New trends in marine freshwater toxins*. Edited by Cabado AG, Vieites JM: Nova Science Publishers, Inc.; 2012.
 34. Holmes MJ, Brust A, Lewis RJ: **Dinoflagellate toxins : an overview.** In: *Seafood and freshwater toxins : pharmacology, physiology and detection*. Edited by Botana LM, Third edition edn: CRC Press, Taylor and Francis group; 2014.
 35. Anonymous: **Marine biotoxins in shellfish – Okadaic acid and analogues, Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain.** *The EFSA Journal* 2008, **589**:1-62.
 36. Ito E, Terao K, McMahon T, Silke J, Yasumoto T: **Acute pathological changes in mice caused by crude extracts of novel toxins isolated from Irish mussels.** *Harmful Algae* 1997:588-589.
 37. Jauffrais T: **Écophysiologie des dinoflagellés du genre *Azadinium*, production toxinique et transfert trophique vers les mollusques bivalves.** Bibliothèque de l'université de Nantes: Université de Nantes; 2012.
 38. Kilcoyne J, Keogh A, Clancy G, LeBlanc P, Burton I, Quilliam MA, Hess P, Miles CO: **Improved isolation procedure for azaspiracids from shellfish, structural elucidation of azaspiracid-6, and stability studies.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2012, **60**(10):2447-2455.
 39. Louzao MC, Lago J., Ferreira M., Alfonso A: **Advances in knowledge of phycotoxins, new information about their toxicology and consequences on Europe legislation.** In: *New trends in marine freshwater toxins*. Edited by Cabado AG, Vieites JM: Nova Science Publishers, Inc.; 2012: 1-54.
 40. Campas M, Prieto-Simon B, Marty JL: **Biosensors to detect marine toxins: Assessing seafood safety.** *Talanta* 2007, **72**(3):884-895.

41. Paredes I, Rietjens IMCM, Vieites JM, Cabado AG: **Update of risk assessments of main marine biotoxins in the European Union.** *Toxicon* 2011, **58**(4):336-354.
42. Anonymous: **Marine biotoxins in shellfish – Azaspiracid group, Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain.** *The EFSA Journal* 2008, **723**:1-52.
43. Draisci R, Lucentini L, Giannetti L, Boria P, Poletti R: **First report of pectenotoxin-2 (PTX-2) in algae (*Dinophysis fortii*) related to seafood poisoning in Europe.** *Toxicon* 1996, **34**(8):923-935.
44. Dominguez HJ, Paz B, Daranas AH, Norte M, Franco JM, Fernandez JJ: **Dinoflagellate polyether within the yessotoxin, pectenotoxin and okadaic acid toxin groups: Characterization, analysis and human health implications.** *Toxicon* 2010, **56**(2):191-217.
45. Anonymous: **Marine biotoxins in shellfish – Pectenotoxin group, Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain.** *The EFSA Journal* 2009, **1109**:1-47.
46. Murata M, Kumagai M, Lee JS, Yasumoto T: **Isolation and structure of yessotoxin, a novel polyether compound implicated in diarrhetic shellfish poisoning.** *Tetrahedron Letters* 1987, **28**(47):5869-5872.
47. Ciminiello P, Dell'Aversano C, Forino M, Tartaglione L: **Marine toxins in Italy: the more you look, the more you find.** *European Journal of Organic Chemistry* 2014, **2014**(7):1357-1369.
48. Terao K, Ito E, Oarada M, Murata M, Yasumoto T: **Histopathological studies on experimental marine toxin poisoning —5. The effects in mice of yessotoxin isolated from *Patinopecten yessoensis* and of a desulfated derivative.** *Toxicon* 1990, **28**(9):1095-1104.
49. Barroso JM: **Commission regulation (UE) No 786/2013.** In: *Journal officiel de l'Union Européenne*. Edited by The European Commission, vol. 786/2013; 2013.
50. Otero A, Chapela M-J, Atanassova M, Vieites JM, Cabado AG: **Cyclic Imines: chemistry and mechanism of action: A review.** *Chemical Research in Toxicology* 2011, **24**(11):1817-1829.
51. MacKenzie L, Holland P, McNabb P, Beuzenberg V, Selwood A, Suzuki T: **Complex toxin profiles in phytoplankton and Greenshell mussels (*Perna canaliculus*), revealed by LC-MS/MS analysis.** *Toxicon* 2002, **40**(9):1321-1330.
52. Nezan E, Chomerat N: ***Vulcanodinium rugosum* gen. nov., sp. nov. (Dinophyceae): a new marine dinoflagellate from the French Mediterranean coast.** *Cryptogamie Algologie* 2011, **32**(1):3-18.
53. Rhodes L, Smith K, Selwood A, McNabb P, Munday R, Suda S, Molenaar S, Hallegraef G: **Dinoflagellate *Vulcanodinium rugosum* identified as the causative organism of pinnatoxins in Australia, New Zealand and Japan.** *Phycologia* 2011, **50**(6):624-628.
54. Hess P, Abadie E, Herve F, Berteaux T, Sechet V, Araoz R, Molgo J, Zakarian A, Sibat M, Rundberget T, Miles CO, Amzil Z: **Pinnatoxin G is responsible for atypical toxicity in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and clams (*Venerupis decussata*) from Ingril, a French Mediterranean lagoon.** *Toxicon* 2013, **75**(SI):16-26.
55. Selwood AI, Miles CO, Wilkins AL, van Ginkel R, Munday R, Rise F, McNabb P: **Isolation, structural determination and acute toxicity of pinnatoxins E, F and G.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2010, **58**(10):6532-6542.

56. Wiese M, D'Agostino PM, Mihali TK, Moffitt MC, Neilan BA: **Neurotoxic alkaloids: Saxitoxin and its analogs.** *Marine Drugs* 2010, **8**(7):2185-2211.
57. Anonymous: **Marine biotoxins in shellfish – Saxitoxin group, Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain.** *The EFSA Journal* 2009, **1019**:1-76.
58. Lefebvre KA, Robertson A: **Domoic acid and human exposure risks: A review.** *Toxicon* 2010, **56**(2):218-230.
59. Scholin CA, Gulland F, Doucette GJ, Benson S, Busman M, Chavez FP, Cordaro J, DeLong R, De Vogelaere A, Harvey J, Haulena M, Lefebvre K, Lipscomb T, Loscutoff S, Lowenstine LJ, Marin R, Miller PE, McLellan WA, Moeller PDR, Powell CL, Rowles T, Silvagni P, Silver M, Spraker T, Trainer V, Van Dolah FM: **Mortality of sea lions along the central California coast linked to a toxic diatom bloom.** *Nature* 2000, **403**(6765):80-84.
60. Anonymous: **Marine biotoxins in shellfish – Domoic acid : Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain** *The EFSA Journal* 2009, **1181**:1-61.
61. Anonymous: **Scientific opinion on marine biotoxins in shellfish – Emerging toxins: Brevetoxin group.** *The EFSA Journal* 2010, **8**(7):1677.
62. Wang D-Z: **Neurotoxins from marine dinoflagellates: A brief review.** *Marine Drugs* 2008, **6**(2):349-371.
63. Perez-Arellano JL, Luzardo OP, Brito AP, Cabrera MH, Zumbado M, Carranza C, Angel-Moreno A, Dickey RW, Boada LD: **Ciguatera fish poisoning, Canary Islands.** *Emerging Infectious Diseases* 2005, **11**(12):1981-1982.
64. Aligizaki K, Nikolaidis G: **Morphological identification of two tropical dinoflagellates of the genera *Gambierdiscus* and *Sinophysis* in the Mediterranean Sea.** *Journal of Biological Research-Thessaloniki* 2008, **9**:75-82.
65. Otero P, Perez S, Alfonso A, Vale C, Rodriguez P, Gouveia NN, Gouveia N, Delgado J, Vale P, Hiramama M, Ishihara Y, Molgo J, Botana LM: **First toxin profile of ciguateric fish in Madeira Arquipelago (Europe).** *Analytical Chemistry* 2010, **82**(14):6032-6039.
66. Satake M, Shoji M, Oshima Y, Naoki H, Fujita T, Yasumoto T: **Gymnocin-A, a cytotoxic polyether from the notorious red tide dinoflagellate, *Gymnodinium mikimotoi*.** *Tetrahedron Letters* 2002, **43**(33):5829-5832.
67. Satake M, Tanaka Y, Ishikura Y, Oshima Y, Naoki H, Yasumoto T: **Gymnocin-B with the largest contiguous polyether rings from the red tide dinoflagellate, *Karenia* (formerly *Gymnodinium*) *mikimotoi*.** *Tetrahedron Letters* 2005, **46**(20):3537-3540.
68. Igarashi T, Satake M, Yasumoto T: **Prymnesin-2: A potent ichthyotoxic and hemolytic glycoside isolated from the red tide alga *Prymnesium parvum*.** *Journal of the American Chemical Society* 1996, **118**(2):479-480.
69. Igarashi T, Satake M, Yasumoto T: **Structures and partial stereochemical assignments for prymnesin-1 and prymnesin-2: Potent hemolytic and ichthyotoxic glycosides isolated from the red tide alga *Prymnesium parvum*.** *Journal of the American Chemical Society* 1999, **121**(37):8499-8511.
70. Manning SR, La Claire JW: **Prymnesins: Toxic metabolites of the golden alga, *Prymnesium parvum carter* (Haptophyta).** *Marine Drugs* 2010, **8**(3):678-704.

71. Alcala AC, Alcala LC, Garth JS, Yasumura D, Yasumoto T: **Human fatality due to ingestion of the crab *Demania-reynaudii* that contained a palytoxin-like toxin.** *Toxicon* 1988, **26**(1):105-107.
72. Noguchi T, Hwang DF, Arakawa O, Daigo K, Sato S, Ozaki H, Kawai N, Ito M, Hashimoto K: **Palytoxin as the causative agent in parrotfish poisoning** In: *First Asia-Pacific Congress: 1988*; Sydney: Toxicon; 1988: 34-34.
73. Onuma Y, Satake M, Ukena T, Roux J, Chanteau S, Rasolofonirina N, Ratsimaloto M, Naoki H, Yasumoto T: **Identification of putative palytoxin as the cause of clupeotoxism.** *Toxicon* 1999, **37**(1):55-65.
74. Tognetto L, Bellato S, Moro I, Andreoli C: **Occurrence of *Ostreopsis ovata* (dinophyceae) in the Tyrrhenian Sea during summer 1994.** *Botanica Marina* 1995, **38**(4):291-295.
75. Monti M, Minocci M, Beran A, Ivesa L: **First record of *Ostreopsis cf. ovata* on macroalgae in the Northern Adriatic Sea.** *Marine Pollution Bulletin* 2007, **54**(5):598-601.
76. Belin C, Neaud-Masson N: **Cahier de procédures et de programmation REPHY 2012-2013.** In: *Ifremer, Nantes* 2012.
77. Belin C, Le Magueresse A, Leopold T: **Le phytoplancton toxique sur le littoral français. Résultats du réseau d'observation REPHY pour la période 2003-2012.** <https://domicile.ifremer.fr/var/envlit/storage/documents/parammaps/toxines.html>; 2014.
78. Frémy J.M., Ledoux M., Nézan E., Piclet G., Belvez H.: **Evolution de la présence des toxines paralysantes dans les coquillages lors de l'épisode toxique en Aber Wrac'h.** *Toxicorama* 1988, **1**(1):23-28.
79. Masselin P, Amzil Z, Abadie E, Carreras A, Chiantella C, Le Bec C, Nézan E, Truquet P: **Paralytic shellfish poisoning on the french mediterranean coast in autumn 1998 : Alexandrium tamarense (Dinophyceae) as causative agent.** In: *9th Int Conf Harmful algal blooms: 2000; Hobart, Tasmania*; 2000.
80. Belin C: **Le phytoplancton toxique sur le littoral français. Résultats du réseau de surveillance REPHY pour la période 2004-2008.** <http://envlit.ifremer.fr/var/envlit/storage/documents/parammaps/phytoplancton/index.html>; 2014.
81. Anonymous: **Qualité du Milieu Marin Littoral : Bulletin de la surveillance 2012.** In: *Département Finistère*. vol. 13 - 003: Ifremer; 2013.
82. Amzil Z, Fresnel J, Le Gal D, Billard C: **Domoic acid accumulation in French shellfish in relation to toxic species of *Pseudo-nitzschia multiseriata* and *P-pseudodelicatissima*.** *Toxicon* 2001, **39**(8):1245-1251.
83. Geiger M: **Évaluation d'une suite de bio-essais pour la détection et l'étude de composés lipophiles de micro-organismes marins issus de mollusques bivalves et de leur environnement.** *Thèse de Doctorat de l'Université de Nantes* 2013.
84. Selwood AI, Wilkins AL, Munday R, Shi F, Rhodes LL, Holland PT: **Portimine: a bioactive metabolite from the benthic dinoflagellate *Vulcanodinium rugosum*.** *Tetrahedron Letters* 2013, **54**(35):4705-4707.
85. Moore RE, Scheuer PJ: **Palytoxin: a new marine toxin from a coelenterate.** *Science (New York, NY)* 1971, **172**(3982):495-498.

86. Moore RE, Helfrich P, Patterson GML: **The deadly seaweed of Hana.** *Oceanus* 1982, **25**(2):54-63.
87. Ciminiello P, Dell'Aversano C, Fattorusso E, Forino M: **Palytoxins: A still haunting Hawaiian curse.** *Phytochemistry Reviews* 2010, **9**(4):491-500.
88. Walsh GE, L. BR: **A review of Hawaiian zoanthids with descriptions of three new species.** *Zoological Journal of the Linnean Society* 1971, **50**(2):161-180.
89. J. C, Christ WJ, Finan JM, Fujioka H, Kishi Y, Klein LL, Ko SS, Leder J, McWhorter WW, Pfaff KP, Yonaga M, Uemura D, Hirata Y: **Stereochemistry of palytoxin 4 : Complete structure.** *Journal of the American Chemical Society* 1982, **104**(25):7369-7371.
90. Klein LL, McWhorter WW, Ko SS, Pfaff KP, Kishi Y, Uemura D, Hirata Y: **Stereochemistry of palytoxin.1. C85-C115 segment.** *Journal of the American Chemical Society* 1982, **104**(25):7362-7364.
91. Ko SS, Finan JM, Yonaga M, Kishi Y, Uemura D, Hirata Y: **Stereochemistry of palytoxin .2. C1-C6, C47-C74, and C77-C83 segments.** *Journal of the American Chemical Society* 1982, **104**(25):7364-7367.
92. Fujioka H, Christ WJ, Cha JK, Leder J, Kishi Y, Uemura D, Hirata Y: **Stereochemistry of palytoxin.3. C7-C51 segment.** *Journal of the American Chemical Society* 1982, **104**(25):7367-7369.
93. Moore RE, Bartolini G, Barchi J, Bothnerby AA, Dadok J, Ford J: **Absolute stereochemistry of palytoxin** *Journal of the American Chemical Society* 1982, **104**(13):3776-3779.
94. Ishida Y, Takagi K, Takahashi M, Satake N, Shibata S: **Palytoxin isolated from marine coelenterates - the inhibitory action on (NA,K)-ATPase.** *Journal of Biological Chemistry* 1983, **258**(13):7900-7902.
95. Oku N, Sata NU, Matsunaga S, Uchida H, Fusetani N: **Identification of palytoxin as a principle which causes morphological changes in rat 3Y1 cells in the zoanthid *Palythoa aff. margaritae*.** *Toxicon* 2004, **43**(1):21-25.
96. Beress L, Zwick J, Kolkenbrock HJ, Kaul PN, Wassermann O: **A method for the isolation of the caribbean palytoxin (C-PTX) from the coelenterate (Zooanthid) *Palythoa caribaeorum*** *Toxicon* 1983, **21**(2):285-290.
97. Munday R: **Toxicology of Seafood Toxins: A Critical Review.** In: *Seafood and Freshwater toxins : Pharmacology, Physiology, and detection.* Edited by Botana LM. New York: CNC - Taylor & Francis Group; 2014.
98. Seemann P, Gernert C, Schmitt S, Mebs D, Hentschel U: **Detection of hemolytic bacteria from *Palythoa caribaeorum* (Cnidaria, Zoantharia) using a novel palytoxin-screening assay.** *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 2009, **96**(4):405-411.
99. Yasumoto T, Fukui M, Sasaki K, Sugiyama K: **Determinations of marine toxins in foods.** *Journal of Aoac International* 1995, **78**(2):574-582.
100. Gleibs S, Mebs D, Werding B: **Studies on the origin and distribution of palytoxin in a caribbean coral-reef.** *Toxicon* 1995, **33**(11):1531-1537.
101. Mahnir VM, Kozlovskaya EP, Kalinovskiy AI: **Sea anemone *Radianthus macrodactylus* - A new source of palytoxin** *Toxicon* 1992, **30**(11):1449-1456.

102. Moore RE, Bartolini G: **Structure of palytoxin**. *Journal of the American Chemical Society* 1981, **103**(9):2491-2494.
103. Uemura D: **Bioorganic studies on marine natural products - Diverse chemical structures and bioactivities**. *Chemical Record* 2006, **6**(5):235-248.
104. Inuzuka T, Uemura D, Arimoto H: **The conformational features of palytoxin in aqueous solution**. *Tetrahedron* 2008, **64**(33):7718-7723.
105. Katikou P, Vlamis A: **Palytoxin and analogs: Ecobiology and origin, chemistry and chemical analysis**. In: *Seafood and freshwater toxins: Pharmacology, physiology, and detection*. Edited by Botana LM, Third edn: CRC Press, Taylor & Francis group; 2014.
106. Armstrong RW, Beau JM, Cheon SH, Christ WJ, Fujioka H, Ham WH, Hawkins LD, Jin H, Kang SH, Kishi Y, Martinelli MJ, McWhorter WW, Mizuno M, Nakata M, Stutz AE, Talamas FX, Taniguchi M, Tino JA, Ueda K, Uenishi J, White JB, Yonaga M: **Total synthesis of palytoxin carboxylic acid and palytoxin amide** *Journal of the American Chemical Society* 1989, **111**(19):7530-7533.
107. Suh EM, Kishi Y: **Synthesis of palytoxin from palytoxin carboxylic acid**. *Journal of the American Chemical Society* 1994, **116**(24):11205-11206.
108. Katikou P: **Chemistry of palytoxins and ostreocins**. In: *Phycotoxins : Chemistry and Biochemistry*. Edited by Botana LM. Ames, Iowa, USA: Blackwell Publishing; 2007: 75-93.
109. Uchida H, Taira Y, Yasumoto T: **Structural elucidation of palytoxin analogs produced by the dinoflagellate *Ostreopsis ovata* IK2 strain by complementary use of positive and negative ion liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry**. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2013, **27**(17):1999-2008.
110. Ashton M, Rosado W, Govind NS, Tosteson TR: **Culturable and nonculturable bacterial symbionts in the toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis lenticularis***. *Toxicon* 2003, **42**(4):419-424.
111. Perez-Guzman L, Perez-Matos AE, Rosado W, Tosteson TR, Govind NS: **Bacteria associated with toxic clonal cultures of the dinoflagellate *Ostreopsis lenticularis***. *Marine Biotechnology* 2008, **10**(5):492-496.
112. Uemura D, Hirata Y, Iwashita T, Naoki H: **Studies on palytoxins**. *Tetrahedron* 1985, **41**(6):1007-1017.
113. Rossi R, Castellano V, Scalco E, Serpe L, Zingone A, Soprano V: **New palytoxin-like molecules in Mediterranean *Ostreopsis* cf. *ovata* (dinoflagellates) and in *Palythoa tuberculosa* detected by liquid chromatography-electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry**. *Toxicon* 2010, **56**(8):1381-1387.
114. Ciminiello P, Dell'Aversano C, Dello Iacovo E, Fattorusso E, Forino M, Grauso L, Tartaglione L, Florio C, Lorenzon P, De Bortoli M, Tubaro A, Poli M, Bignami G: **Stereostructure and biological activity of 42-hydroxy-palytoxin: A new palytoxin analogue from Hawaiian *Palythoa* subspecies**. *Chemical Research in Toxicology* 2009, **22**(11):1851-1859.
115. Lau CO, Tan CH, Khoo HE, Yuen R, Lewis RJ, Corpuz GP, Bignami GS: ***Lophozozymus pictor* toxin - A fluorescent structural isomer of palytoxin** *Toxicon* 1995, **33**(10):1373-1377.

116. Tindall DR, Miller DM: **2 potent toxins from *Ostreopsis lenticularis*, a dinoflagellate common to ciguatera endemic regions of the caribbean and tropical atlantic.** *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 1988, **2**(4):A375-A375.
117. Meunier FA, Mercado JA, Molgo J, Tosteson TR, deMotta GE: **Selective depolarization of the muscle membrane in frog nerve-muscle preparations by a chromatographically purified extract of the dinoflagellate *Ostreopsis lenticularis*.** *British Journal of Pharmacology* 1997, **121**(6):1224-1230.
118. Lenoir S, Ten-Hage L, Turquet J, Quod JP, Bernard C, Hennion MC: **First evidence of palytoxin analogues from an *Ostreopsis mascarenensis* (Dinophyceae) benthic bloom in Southwestern Indian Ocean.** *Journal of Phycology* 2004, **40**(6):1042-1051.
119. Ukena T, Satake M, Usami M, Oshima Y, Naoki H, Fujita T, Kan Y, Yasumoto T: **Structure elucidation of ostreocin D, a palytoxin analog isolated from the dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*.** *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 2001, **65**(11):2585-2588.
120. Ciminiello P, Dell'Aversano C, Dello Iacovo E, Fattorusso E, Forino M, Tartaglione L, Yasumoto T, Battocchi C, Giacobbe M, Amorim A, Penna A: **Investigation of toxin profile of Mediterranean and Atlantic strains of *Ostreopsis cf. siamensis* (Dinophyceae) by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry.** *Harmful Algae* 2013, **23**:19-27.
121. Usami M, Satake M, Ishida S, Inoue A, Kan Y, Yasumoto T: **Palytoxin analogs from the dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*.** *Journal of the American Chemical Society* 1995, **117**(19):5389-5390.
122. Nakajima I, Oshima Y, Yasumoto T: **Toxicity of benthic dinoflagellates found in coral-reef. 2. Toxicity of benthic dinoflagellates in Okinawa.** *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 1981, **47**(8):1029-1033.
123. Yasumoto T, Seino N, Murakami Y, Murata M: **Toxins produced by benthic dinoflagellates.** *Biological Bulletin* 1987, **172**(1):128-131.
124. Suzuki T, Watanabe R, Uchida H, Matsushima R, Nagai H, Yasumoto T, Yoshimatsu T, Sato S, Adachi M: **LC-MS/MS analysis of novel ovatoxin isomers in several *Ostreopsis* strains collected in Japan.** *Harmful Algae* 2012, **20**:81-91.
125. Lenoir S, Ten-Hage L, Turquet J, Quod JP, Hennion MC: **Characterisation of new analogues of palytoxin isolated from an *Ostreopsis mascarenensis* bloom in the southwestern Indian Ocean.** *African Journal of Marine Science* 2006, **28**(2):389-391.
126. Fukuyo Y: **Taxonomical study on benthic dinoflagellates collected in coral reefs.** *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 1981, **47**(8):967-978.
127. Faust MA, Morton SL, Quod JP: **Further SEM study of marine dinoflagellates: The genus *Ostreopsis* (Dinophyceae).** *Journal of Phycology* 1996, **32**(6):1053-1065.
128. Faust MA: **Three new *Ostreopsis* species (Dinophyceae): *O-marinus* sp nov., *O-belizeanus* sp nov., and *O-caribbeanus* sp nov.** *Phycologia* 1999, **38**(2):92-99.
129. Quod JP: ***Ostreopsis mascarenensis* sp-nov (Dinophyceae), a new toxic dinoflagellate from coral reefs in the southwest indian ocean** *Cryptogamie Algologie* 1994, **15**(4):243-251.

130. Honsell G, Bonifacio A, De Bortoli M, Penna A, Battocchi C, Ciminiello P, Dell'Aversano C, Fattorusso E, Sosa S, Yasumoto T, Tubaro A: **New insights on cytological and metabolic features of *Ostreopsis cf. ovata* Fukuyo (Dinophyceae): A multidisciplinary approach.** *Plos One* 2013, **8**(2):1-18.
131. Accoroni S, Romagnoli T, Pichierri S, Colombo F, Totti C: **Morphometric analysis of *Ostreopsis cf. ovata* cells in relation to environmental conditions and bloom phases.** *Harmful Algae* 2012, **19**:15-22.
132. Aligizaki K, Nikolaidis G: **The presence of the potentially toxic genera *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophyceae) in the north Aegean sea, Greece.** *Harmful Algae* 2006, **5**(6):717-730.
133. Selina MS, Orlova TY: **First occurrence of the genus *Ostreopsis* (Dinophyceae) in the Sea of Japan.** *Botanica Marina* 2010, **53**(3):243-249.
134. Lemee R: **Le développement des dinoflagellés toxiques du genre *Ostreopsis* sur le littoral de la Méditerranée nord occidentale : mise en évidence des zones à risque et première évaluation des impacts écologiques, sanitaires et socio-économiques.** In: *Medios 2*. Liteau, Agence de l'eau Rhône Méditerranée et Corse, Conseil général Alpes Maritime; 2010.
135. Zingone A, Siano R, D'Alelio D, Sarno D: **Potentially toxic and harmful microalgae from coastal waters of the Campania region (Tyrrhenian Sea, Mediterranean Sea).** *Harmful Algae* 2006, **5**(3):321-337.
136. Shears NT, Ross PM: **Blooms of benthic dinoflagellates of the genus *Ostreopsis*; an increasing and ecologically important phenomenon on temperate reefs in New Zealand and worldwide.** *Harmful Algae* 2009, **8**(6):916-925.
137. Bravo I, Vila M, Casablanca S, Rodriguez F, Rial P, Riobo P, Penna A: **Life cycle stages of the benthic palytoxin-producing dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata* (Dinophyceae).** *Harmful Algae* 2012, **18**:24-34.
138. Monti M, Cecchin E: **Comparative growth of three strains of *Ostreopsis ovata* at different light intensities with focus on inter-specific allelopathic interactions.** *Cryptogamie Algologie* 2012, **33**(2):113-119.
139. Scalco E, Brunet C, Marino F, Rossi R, Soprano V, Zingone A, Montresor M: **Growth and toxicity responses of Mediterranean *Ostreopsis cf. ovata* to seasonal irradiance and temperature conditions.** *Harmful Algae* 2012, **17**:25-34.
140. Sechet V, Sibat M, Chomerat N, Nezan E, Grossel H, Lehebel-Peron J-B, Jauffrais T, Ganzin N, Marco-Miralles F, Lemee R, Amzil Z: ***Ostreopsis cf. ovata* in the French Mediterranean coast: molecular characterisation and toxin profile.** *Cryptogamie Algologie* 2012, **33**(2):89-98.
141. Grezebyk D, Sechet V: **Toxicogénèse et physiologie cellulaire.** In: *Les toxines d'algues dans l'alimentation*. Edited by Ifremer. Plouzané, France: Ifremer - Afssa; 2001.
142. Pezzolesi L, Guerrini F, Ciminiello P, Dell'Aversano C, Dello Iacovo E, Fattorusso E, Forino M, Tartaglione L, Pistocchi R: **Influence of temperature and salinity on *Ostreopsis cf. ovata* growth and evaluation of toxin content through HR LC-MS and biological assays.** *Water Research* 2012, **46**(1):82-92.
143. Morton SL, Norris DR, Bomber JW: **Effect of temperature, salinity and light intensity on the growth and seasonality of toxic dinoflagellate associated with ciguatera.** *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 1992, **157**(1):79-90.

144. Rhodes L, Adamson J, Suzuki T, Briggs L, Garthwaite I: **Toxic marine epiphytic dinoflagellates, *Ostreopsis siamensis* and *Coolia monotis* (Dinophyceae), in New Zealand.** *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 2000, **34**(2):371-383.
145. Parsons ML, Preskitt LB: **A survey of epiphytic dinoflagellates from the coastal waters of the island of Hawai'i.** *Harmful Algae* 2007, **6**(5):658-669.
146. Pistocchi R, Guerrini F, Pezzolesi L, Riccardi M, Vanucci S, Ciminiello P, Dell'Aversano C, Forino M, Fattorusso E, Tartaglione L, Milandri A, Pompei M, Cangini M, Pigozzi S, Riccardi E: **Toxin levels and profiles in microalgae from the North-Western Adriatic Sea-15 years of studies on cultured species.** *Marine Drugs* 2012, **10**(1):140-162.
147. Ballantine DL, Tosteson TR, Bardales AT: **Population-dynamics and toxicity of natural populations of benthic dinoflagellates in southwestern Puerto-Rico.** *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 1988, **119**(3):201-212.
148. Hallegraeff GM, McCausland MA, Brown RK: **Early warning of toxic dinoflagellate blooms of *Gymnodinium catenatum* in southern Tasmanian waters.** *Journal of Plankton Research* 1995, **17**(6):1163-1176.
149. Graneli E, Vidyarthna NK, Funari E, Cumarantunga PRT, Scenati R: **Can increases in temperature stimulate blooms of the toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis ovata*?** *Harmful Algae* 2011, **10**(2):165-172.
150. Pistocchi R, Pezzolesi L, Guerrini F, Vanucci S, Dell'aversano C, Fattorusso E: **A review on the effects of environmental conditions on growth and toxin production of *Ostreopsis ovata*.** *Toxicon* 2011, **57**(3):421-428.
151. Vanucci S, Pezzolesi L, Pistocchi R, Ciminiello P, Dell'Aversano C, Dello Iacovo E, Fattorusso E, Tartaglione L, Guerrini F: **Nitrogen and phosphorus limitation effects on cell growth, biovolume, and toxin production in *Ostreopsis cf. ovata*.** *Harmful Algae* 2012, **15**:78-90.
152. Coahu S, Mangialajo L, Thibaut T, Blanfune A, Marro S, Lemee R: **Proliferation of the toxic dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata* in relation to depth, biotic substrate and environmental factors in the North West Mediterranean Sea.** *Harmful Algae* 2013, **24**:32-44.
153. Taniyama S, Mahmud Y, Terada M, Takatani T, Arakawa O, Noguchi T: **Occurrence of a food poisoning incident by palytoxin from a serranid *Epinephelus sp* in Japan.** *Journal of Natural Toxins* 2002, **11**(4):277-282.
154. Ito E, Yasumoto T: **Toxicological studies on palytoxin and ostreocin-D administered to mice by three different routes.** *Toxicon* 2009, **54**(3):244-251.
155. Ito K, Urakawa N, Koike H: **Cardiovascular toxicity of palytoxin in anesthetized dogs.** *Archives Internationales De Pharmacodynamie Et De Therapie* 1982, **258**(1):146-154.
156. Vick JA, Wiles JS: **Mechanisms of action and treatment of palytoxin poisoning.** *Toxicology and Applied Pharmacology* 1975, **34**(2):214-223.
157. Wiles JS, Vick JA, Christensen MK: **Toxicological evaluation of palytoxin in several animal species.** *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 1974, **12**(4):427-433.
158. Riobo P, Paz B, Franco JM, Vazquez JA, Murado MA, Cacho E: **Mouse bioassay for palytoxin. Specific symptoms and dose-response against dose-death time relationships.** *Food and Chemical Toxicology* 2008, **46**(8):2639-2647.

159. Fukui M, Murata M, Inoue A, Gawel M, Yasumoto T: **Occurrence of palytoxin in the trigger fish *Melichtys vidua*** *Toxicon* 1987, **25**(10):1121-1124.
160. Wachi KM, Hokama Y, Haga LS, Shiraki A, Takenaka WE, Bignami GS, Levine L: **Evidence for palytoxin as one of the sheep erythrocyte lytic factors in crude extracts of ciguateric and non-ciguateric reef fish tissue.** *Journal of Natural Toxins* 2000, **9**(2):139-146.
161. Taniyama S, Arakawa O, Terada M, Nishio S, Takatani T, Mahmud Y, Noguchi T: ***Ostreopsis* sp., a possible origin of palytoxin (PTX) in parrotfish *Scarus oviifrons*.** *Toxicon* 2003, **42**(1):29-33.
162. Ito E, Ohkusu M, Yasumoto T: **Intestinal injuries caused by experimental palytoxicosis in mice.** *Toxicon* 1996, **34**(6):643-652.
163. Sosa S, Del Favero G, De Bortoli M, Vita F, Soranzo MR, Beltramo D, Ardizzone M, Tubaro A: **Palytoxin toxicity after acute oral administration in mice.** *Toxicology Letters* 2009, **191**(2-3):253-259.
164. Munday R: **Toxicological requirements for risk assessment of shellfish contaminants: a review.** *African Journal of Marine Science* 2006, **28**(2):447-449.
165. Fujiki H, Suganuma M, Nakayasu M, Hakii H, Horiuchi T, Takayama S, Sugimura T: **Palytoxin is a non-12O-tetracanoylphorbol-13-acetate type tumor promoter in 2 stage mouse skin carcinogenesis.** *Carcinogenesis* 1986, **7**(5):707-710.
166. Yasumoto T, Yasumura D, Ohizumi Y, Takahashi M, Alcalá AC, Alcalá LC: **Palytoxin in 2 species of xanthid crab from the Philippines** *Agricultural and Biological Chemistry* 1986, **50**(1):163-167.
167. Gleibs S, Mebs D: **Distribution and sequestration of palytoxin in coral reef animals.** *Toxicon* 1999, **37**(11):1521-1527.
168. Rhodes LL, Smith KF, Munday R, Selwood AI, McNabb PS, Holland PT, Bottein M-Y: **Toxic dinoflagellates (Dinophyceae) from Rarotonga, Cook Islands.** *Toxicon* 2010, **56**(5):751-758.
169. Vale C, Ares IR: **Biochemistry of palytoxins and ostreocins.** . In: *Phycotoxines, chemistry and biochemistry*. Edited by Botana LM, Blackwell publishing, Ames, IA, USA edn; 2007: 95-118.
170. Hirata Y, Uemura D: **Toxic compounds of *Palythoa tuberculosa* (coelenterata), palytoxin and its analogs.** *Yakugaku Zasshi-Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* 1985, **105**(1):1-10.
171. Bellocci M, Sala GL, Prandi S: **The cytolytic and cytotoxic activities of palytoxin.** *Toxicon* 2011, **57**(3):449-459.
172. Artigas P, Gadsby DC: **Ion occlusion/deocclusion partial reactions in individual palytoxin-modified Na/K pumps.** In: *Na,K-ATPase and Related Cation Pumps: Structure, Function, and Regulatory Mechanisms*. Edited by P. L. Jorgensen, S. J. D. Karlish, Maunsbach AB, vol. 986; 2003: 116-126.
173. Artigas P, Gadsby DC: **Large diameter of palytoxin-induced Na/K pump channels and modulation of palytoxin interaction by Na/K pump ligands.** *Journal of General Physiology* 2004, **123**(4):357-376.

174. Habermann E, Chhatwal GS: **Ouabain inhibits the increase due to palytoxin of cation permeability of erythrocytes.** *Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology* 1982, **319**(2):101-107.
175. Ikeda M, Mitani K, Ito K: **Palytoxin induces a non selective cation channel in single ventricular cells of rats** *Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology* 1988, **337**(5):591-593.
176. Muramatsu I, Nishio M, Kigoshi S, Uemura D: **Single ion channels induced by palytoxin in guinea-pig ventricular myocytes.** *British Journal of Pharmacology* 1988, **93**(4):811-816.
177. Habermann E: **Palytoxin acts through Na⁺,K⁺-ATPase.** *Toxicon* 1989, **27**(11):1171-1187.
178. Rossini GP, Bigiani A: **Palytoxin action on the Na⁺,K⁺-ATPase and the disruption of ion equilibria in biological systems.** *Toxicon* 2011, **57**(3):429-439.
179. Frelin C, Vigne P, Breittmayer JP: **Palytoxin acidifies chick cardiac cells and activates the Na⁺/H⁺ antiporter** *The Federation of European Biochemical Societies Letters* 1990, **264**(1):63-66.
180. Ito K, Karaki H, Urakawa N: **Mode of contractile action of palytoxin on vascular smooth muscle.** *European Journal of Pharmacology* 1977, **46**(1):9-14.
181. Frelin C, Vanrenterghem C: **Palytoxin - Recent electrophysiological and pharmacological evidence for several mechanisms of action** *General Pharmacology* 1995, **26**(1):33-37.
182. Nagase H, Karaki H: **Palytoxin induced contraction and release of prostaglandins and norepinephrine in the aorta** *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1987, **242**(3):1120-1125.
183. Bellocci M, Ronzitti G, Milandri A, Melchiorre N, Grillo C, Poletti R, Yasumoto T, Rossini GP: **A cytolytic assay for the measurement of palytoxin based on a cultured monolayer cell line.** *Analytical Biochemistry* 2008, **374**(1):48-55.
184. Sala GL, Bellocci M, Rossini GP: **The cytotoxic pathway triggered by palytoxin involves a change in the cellular pool of stress response proteins.** *Chemical Research in Toxicology* 2009, **22**(12):2009-2016.
185. Canete E, Diogene J: **Comparative study of the use of neuroblastoma cells (Neuro-2a) and neuroblastoma x glioma hybrid cells (NG108-15) for the toxic effect quantification of marine toxins.** *Toxicon* 2008, **52**(4):541-550.
186. Espina B, Cagide E, Carmen Louzao M, Fernandez MM, Vieytes MR, Katikou P, Villar A, Jaen D, Maman L, Botana LM: **Specific and dynamic detection of palytoxins by in vitro microplate assay with human neuroblastoma cells.** *Bioscience Reports* 2009, **29**(1):13-23.
187. Ledreux A, Krys S, Bernard C: **Suitability of the Neuro-2a cell line for the detection of palytoxin and analogues (neurotoxic phycotoxins).** *Toxicon* 2009, **53**(2):300-308.
188. Riobo P, Paz B, Franco JM, Vazquez JA, Murado MA: **Proposal for a simple and sensitive haemolytic assay for palytoxin Toxicological dynamics, kinetics, ouabain inhibition and thermal stability.** *Harmful Algae* 2008, **7**(4):415-429.
189. Aligizaki K, Katikou P, Nikolaidis G, Panou A: **First episode of shellfish contamination by palytoxin-like compounds from *Ostreopsis* species (Aegean Sea, Greece).** *Toxicon* 2008, **51**(3):418-427.

190. Bire R, Trotereau S, Lemee R, Delpont C, Chabot B, Aumond Y, Krys S: **Occurrence of palytoxins in marine organisms from different trophic levels of the French Mediterranean coast harvested in 2009.** *Harmful Algae* 2013, **28**:10-22.
191. Bignami GS: **A rapid and sensitive hemolysis neutralization assay for palytoxin** *Toxicon* 1993, **31**(6):817-820.
192. Levine L, Fujiki H, Gjika HB, Vanvunakis H: **A radioimmunoassay for palytoxin** *Toxicon* 1988, **26**(12):1115-1121.
193. Bignami GS, Raybould TJG, Sachinvala ND, Grothaus PG, Simpson SB, Lazo CB, Byrnes JB, Moore RE, Vann DC: **Monoclonal antibody based enzyme linked immunoassays for the measurement of palytoxin biological samples** *Toxicon* 1992, **30**(7):687-700.
194. Garet E, Cabado AG, Vieites JM, Gonzalez-Fernandez A: **Rapid isolation of single-chain antibodies by phage display technology directed against one of the most potent marine toxins: Palytoxin.** *Toxicon* 2010, **55**(8):1519-1526.
195. Zamolo VA, Valenti G, Venturelli E, Chaloin O, Marcaccio M, Boscolo S, Castagnola V, Sosa S, Berti F, Fontanive G, Poli M, Tubaro A, Bianco A, Paolucci F, Prato M: **Highly Sensitive Electrochemiluminescent Nanobiosensor for the Detection of Palytoxin.** *Acs Nano* 2012, **6**(9):7989-7997.
196. Mereish KA, Morris S, McCullers G, Taylor TJ, Bunner DL: **Analysis of palytoxin by liqui-chromatography and capillary electrophoresis.** *Journal of Liquid Chromatography* 1991, **14**(5):1025-1031.
197. Hirata Y, Uemura D, Ueda K, Takano S: **Several compounds from *Palythoa tuberculosa* (coelenterata)** *Pure and Applied Chemistry* 1979, **51**(9):1875-1883.
198. Riobo P, Paz B, Franco JM: **Analysis of palytoxin-like in *Ostreopsis* cultures by liquid chromatography with precolumn derivatization and fluorescence detection.** *Analytica Chimica Acta* 2006, **566**(2):217-223.
199. Ciminiello P, Dell'Aversano C, Dello Lacovo E, Fattorusso E, Forino M, Tartaglione L: **LC-MS of palytoxin and its analogues: State of the art and future perspectives.** *Toxicon* 2011, **57**(3):376-389.
200. Ukena T, Satake M, Usami M, Oshima Y, Fujita T, Naoki H, Yasumoto T: **Structural confirmation of ostreocin-D by application of negative-ion fast-atom bombardment collision-induced dissociation tandem mass spectrometric methods.** *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2002, **16**(24):2387-2393.
201. Anonymous: **Training triple quadrupole.** In: *AB Applied Biosystem*. Edited by Sciex M; 2007.
202. Anonymous: **Scientific opinion on marine biotoxins in shellfish - Palytoxin group.** *The EFSA Journal* 2009, **7**(12):1393-1430.
203. Engelhardt H, Arangio M, Lobert T: **A chromatographic test procedure for reversed-phase HPLC column evaluation.** *LC GC-Magazine of Separation Science* 1997, **15**(9):856-865.
204. West C, Lesellier E: **Orthogonal screening system of columns for supercritical fluid chromatography.** *Journal of Chromatography A* 2008, **1203**(1):105-113.
205. Guillard RRL, Smith WL, Chanley MH: **Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates.** In: *Culture of Marine Invertebrates Animals*. Edited by Plenum Press: New York N, USA; 1975: 26-60.

206. Anderson R: **Algal Culturing Techniques: A Book for All Phycologists.**: Elsevier - Academic Press; 2005.
207. Guerrini F, Pezzolesi L, Feller A, Riccardi M, Ciminiello P, Dell'Aversano C, Tartaglione L, Dello Iacovo E, Fattorusso E, Forino M, Pistocchi R: **Comparative growth and toxin profile of cultured *Ostreopsis ovata* from the Tyrrhenian and Adriatic Seas.** *Toxicon* 2010, **55**(2-3):211-220.
208. Coahu S, Mangialajo L, Thibaut T, Blanfune A, Lemee R: **Development of the benthic toxic dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata* in the NW Mediterranean Sea.** *European Journal of Phycology* 2011, **46**(SI):55-55.
209. Coahu S, Lemee R: **Vertical distribution of the toxic epibenthic dinoflagellates *Ostreopsis cf. ovata*, *Prorocentrum lima* and *Coolia monotis* in the NW Mediterranean Sea.** *Cahiers De Biologie Marine* 2012, **53**(3):373-380.
210. Fraga S, Rodriguez F, Bravo I, Zapata M, Maranon E: **Review of the main ecological features affecting benthic dinoflagellate blooms.** *Cryptogamie Algologie* 2012, **33**(2):171-179.
211. Taniyama S, Mahmud Y, Tanu MB, Takatani T, Arakawa O, Noguchi T: **Delayed haemolytic activity by the freshwater puffer *Tetraodon sp* toxin.** *Toxicon* 2001, **39**(5):725-727.
212. Parsons ML, Aligizaki K, Bottein M-YD, Fraga S, Morton SL, Penna A, Rhodes L: ***Gambierdiscus* and *Ostreopsis*: Reassessment of the state of knowledge of their taxonomy, geography, ecophysiology, and toxicology.** *Harmful Algae* 2012, **14**(SI):107-129.
213. Hoshaw RW, Rosawski JR: **Methods for microscopic algae.** In: *Handbook of physiological methods.* Edited by Stein JR. Cambridge University Press, New York; 1973: 53-67.
214. Keller MD, Selvin RC, Claus W, Guillard RRL: **Media for the culture of oceanic ultraphytoplankton** *Journal of Phycology* 1987, **23**(4):633-638.
215. Rhodes L, Smith K, Selwood A, McNabb P, van Ginkel R, Holland P, Munday R: **Production of pinnatoxins by a peridinoid dinoflagellate isolated from Northland, New Zealand.** *Harmful Algae* 2010, **9**(4):384-389.
216. Yamaguchi H, Tanimoto Y, Yoshimatsu T, Sato S, Nishimura T, Uehara K, Adachi M: **Culture method and growth characteristics of marine benthic dinoflagellate *Ostreopsis spp.* isolated from Japanese coastal waters.** *Fish Sci* 2012, **78**(5):993-1000.
217. Nascimento SM, Correa EV, Menezes M, Varela D, Paredes J, Morris S: **Growth and toxin profile of *Ostreopsis cf. ovata* (Dinophyta) from Rio de Janeiro, Brazil.** *Harmful Algae* 2012, **13**:1-9.
218. Avendano-Herrera RE, Riquelme CE: **Production of a diatom-bacteria biofilm in a photobioreactor for aquaculture applications.** *Aquacultural Engineering* 2007, **36**(2):97-104.
219. Pezzolesi L, Guidi F, Guerrini F, Ciminiello P, Dell'Aversano C, Dello Iacovo E, Tartaglione L, Fattorusso E, Pistocchi R: **Influence of temperature on allelopathic interaction between *Ostreopsis cf. ovata* and *Coolia monotis*** *European Journal of Phycology* 2011, **46**(SI):119-120.

220. Suzuki T, Watanabe R, Matsushima R, Ishihara K, Uchida H, Kikutsugi S, Harada T, Nagai H, Adachi M, Yasumoto T, Murata M: **LC-MS/MS analysis of palytoxin analogues in blue humphead parrotfish *Scarus ovifrons* causing human poisoning in Japan.** *Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment* 2013, **30**(8):1358-1364.
221. Tubaro A, Del Favero G, Beltramo D, Ardizzone M, Forino M, De Bortoli M, Pelin M, Poli M, Bignami G, Ciminiello P, Sosa S: **Acute oral toxicity in mice of a new palytoxin analog: 42-Hydroxy-palytoxin.** *Toxicon* 2011, **57**(5):755-763.
222. Selwood AI, van Ginkel R, Harwood DT, McNabb PS, Rhodes LR, Holland PT: **A sensitive assay for palytoxins, ovatoxins and ostreocins using LC-MS/MS analysis of cleavage fragments from micro-scale oxidation.** *Toxicon* 2012, **60**(5):810-820.
223. Hwang BS, Yoon EY, Kim HS, Yih W, Park JY, Jeong HJ, Rho J-R: **Ostreol A: A new cytotoxic compound isolated from the epiphytic dinollagellate *Ostreopsis cf. ovata* from the coastal waters of Jeju Island, Korea.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2013, **23**(10):3023-3027.
224. Jauffrais T, Kilcoyne J, Sechet V, Herrenknecht C, Truquet P, Herve F, Berard JB, Nulty C, Taylor S, Tillmann U, Miles CO, Hess P: **Production and isolation of azaspiracid-1 and-2 from *Azadinium spinosum* culture in pilot scale photobioreactors.** *Marine Drugs* 2012, **10**(6):1360-1382.
225. Ciminiello P, Dell'Aversano C, Dello Iacovo E, Fattorusso E, Forino M, Tartaglione L, Rossi R, Soprano V, Capozzo D, Serpe L: **Palytoxin in seafood by liquid chromatography tandem mass spectrometry: investigation of extraction efficiency and matrix effect.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2011, **401**(3):1043-1050.
226. Zendong Z, Herrenknecht C, Abadie E, Brissard C, C. T, Mondeguer F, Sechet V, Amzil Z, Hess P: **Extended evaluation of polymeric and lipophilic sorbents for passive sampling of marine toxins.** *Toxicon* 2014, sous press:1-12.
227. Inuzuka T, Fujisawa T, Arimoto H, Uemura D: **Molecular shape of palytoxin in aqueous solution.** *Organic & Biomolecular Chemistry* 2007, **5**(6):897-899.
228. Lesellier E, Tchaplal A: **A simple subcritical chromatographic test for an extended ODS high performance liquid chromatography column classification.** *Journal of Chromatography A* 2005, **1100**(1):45-59.
229. Doyle JJ, Doyle JL: **A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue.** *Phytochemistry Bulletin* 1987, **19**:11-15.
230. Edgar RC: **Muscle: A multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity.** *BMC Bioinforma* 2004, **5**:113.
231. Ibis Biosciences: Carlsbad C, USA: **BioEdit.** In. Edited by windows vbsaef; 2011.
232. Hall TAB: **A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.** *Nucleic Acids Symp Ser* 1999, **41**:95-98.
233. Ronquist F, Huelsenbeck JP: **MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models.** *Bioinformatics* 2003, **19**:1572-1574.
234. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S: **Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods.** *Molecular Biology and Evolution* 2011, **28**(10):2731-2739.

235. Felsenstein J: **Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap.** *Evolution* 1985, **39**(4):783-791.

Annexes

1. Identification génétique des espèces d'*Ostreopsis cf. ovata*

1.1. Amplification ADN et séquençage

Des volumes d'environ 15 mL de culture provenant de Rochambeau (Villefranche-sur-Mer, France) et de Monaco, souches IFR-OST-0.3 V et IFR-OST-0.1 Mo respectivement, ont été récoltés en phase exponentielle et centrifugés (4300 g, 10 min). L'acide désoxyribonucléique (ADN) des cellules contenues dans le culot a été extrait en utilisant la méthode du CTBA (bromure de N-cétyl-N,N,N triméthylammonium) [229]. Les régions ITS (ITS1 et ITS2) et 28S de l'ADNr ont été amplifiées en utilisant une amorce oligonucléotide ITS-FW (5'-GTAGGTGAACCTGCGGAAGG-3'), et D3B (5'-TCGGAGGGAACCAGCTACTA-3'). L'ADN génomique a été amplifié par une réaction en chaîne par polymérase (de l'anglais « polymerase chain reaction » (PCR)) dans 25 µL contenant 1 µL d'ADN extrait, 6,5 µL d'eau ultra-pure, 2,5 µL de chaque amorce (10 µM) et 12,5 µL de PCR Master Mix 1X (Promega, Madison, WI, USA) lesquels incluent du Taq polymérase, dNTPs, MgCl₂ et un tampon de réaction. Les réactions de polymérisation en chaîne ont été effectuées dans un « Mastercycler Personal » (Eppendorf, Hambourg, Allemagne) comme suit : une étape de dénaturation initiale à 94°C pendant 2 min, suivie par 45 cycles, chacun se composant d'un chauffage à 94°C pendant 30 sec, puis à 54°C pendant 30°C, et 72°C pendant 4 min, et une étape élongation finale à 72°C pendant 5 min. Les produits de la PCR ont été visualisés dans un gel d'agarose 1% (v/v), excisés, et purifiés avec le "Wizard SV Gel" et "PCR Clean-up system" (Promega) selon les recommandations des fournisseurs. Puis ils ont été séquencés directement en utilisant le ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Les produits de séquençage ont été déterminés en utilisant un analyseur génétique automatisé 3130 (Applied Biosystems).

1.2. Alignement des séquences et analyses phylogénétiques

Les séquences obtenues pour les souches IFR-OST-0.1 Mo (Genbank #KJ239219) et IFR-OST-0.3 V (Genbank #KJ239220) sont composées de 1272 paires de base et sont 100 % identiques. La phylogénie moléculaire a été déduite à partir des deux matrices ITS1-5.8S-ITS2 et ITS1-5.8S-ITS2-partielles concaténée matrice LSU. Pour préparer la série de données, les deux séquences sont alignées avec 73 séquences d'*Ostreopsis* et 7 séquences de *Coolia*, récupérées sur Genbank en utilisant le logiciel MUSCLE [230]. L'alignement a été affiné à

l'œil en utilisant la version Bioedit 7.00 [231, 232]. L'évolution des modèles a été examinée avec jModeltest version 0.1.1. L'analyse « Bayesian Inference » (BI) a été effectuée en utilisant Mr Bayes version 3.1.2 [233]. L'analyse initiale Bayésienne a été effectuée avec un modèle GTR (nst = 6) avec des taux de invgamma et des fréquences fixes de nucléotide fixés à l'égalité. Chaque analyse a été effectuée en utilisant 4 chaînes Markov (MCMC), avec un million de cycles pour chaque chaîne. Les arbres ont été enregistrés dans un fichier tous les 100 cycles et les 2000 premiers arbres ont été jetés. Pour cette raison, un arbre consensus règle-majoritaire a été créé à partir des 800 arbres restant afin d'examiner les possibilités postérieures (pp) pour chaque « clade ». L'analyse « neighbor-joining » (NJ) a été effectuée avec un logiciel MEGA version 5.05 [234], avec une méthode Maximum Composite Likelihood. L'analyse Bootstrap (1000 pseudoreplicats) a été utilisée pour évaluer la robustesse relative des branches [235].

2. Relation statistique de l'abondance d'*Ostreopsis cf. ovata* en fonction de la profondeur

Régression non linéaire :

Équation : polynôme inverse du second ordre : $f = y_0 + \left(\frac{a}{x}\right) + \left(\frac{b}{x^2}\right)$

Coefficient de corrélation	Coefficient de variation	Coefficient de variation	Erreur standard
R	R ²	R ² ajusté	d'estimation
0,9961	0,9923	0,9768	14672,6894

Coefficient	Valeur	Erreur standard	t	P
y ₀	27 751,8472	19 006,5881	1,4601	0,3823
A	- 60 949,3960	50 731,9512	-1,014	0,4419
b	77 646,7708	22 434 ;7535	3,4610	0,1791

Tableau 32. Analyse de variance.

Variance	Degré de liberté	Somme des carrées	Moyenne des carrées
Expliquée	3	4 942 856 858,8602	16 476 189 528,9534
Résiduelle	1	215 287 813,1398	215 287 813,1398
Totale	4	49 643 856 400,0000	12 410 964 100,0000

Tableau 33. Moyenne des observations corrigées.

Variance	Degré de liberté	Somme des carrées	Moyenne des carrées	F	P
Expliquée	2	27580772486,8602	13790385243,4301	64,0556	0,0880
Résiduelle	1	215287813,1398	215287813,1398		
Totale	3	27796060300,0000	9265353433,333		

Tests statistiques :

Test de normalité (Shapiro-Wilk) : Passe P= 0,8162

Statistique (W) Niveau de signification = 0,0500

3. Caractéristiques des espèces contaminées

Organismes marins	Oursins (<i>Paracentrotus lividus</i>)	Saupes (<i>Sarpa salpa</i>)
Nombre d'organismes échantillonnés	n=10 (Diamètre sans épines de 4 à 5 cm)	n=21 (Longueur total de 7,1 à 9,8 cm)
Nombre d'organismes contaminés	9	6
	231 (4,5)	54 (7,8)
	213 (4)	85 (7,9)
Total des OVTXs trouvés	309 (4)	33 (7,7)
exprimés en [PLTX-eq] dans la	205 (4)	152 (7,1)
chair des organismes	103 (5)	19 (9,8)
contaminés (µg/kg)	191 (4,5)	54 (9,2)
(Taille des organismes (cm))	423 (4,5)	
	215 (4,5)	
	121 (4)	

4. Milieu d'enrichissement K

4.1. Préparation du milieu K (Keller and Guillard 1985, Keller *et al.* 1987)

Pour préparer ce milieu, filtrer tout d'abord 950 mL d'eau de mer, puis ajouter les composés aux concentrations décrites dans le tableau ci-dessous, et ajuster enfin le volume de culture à 1 L, avant d'autoclaver.

Tableau 34. Composition de l'enrichissement K.

Composants	Solutions mères	Quantités	Concentration molaires dans la solution finale
NaNO ₃	75,00 g / L d'H ₂ O	1 mL	8,82 x 10 ⁻⁴ M
NH ₄ Cl	2,67 g/ L d'H ₂ O	1 mL	5,00 x 10 ⁻⁵ M
Na ₂ b-glycerophosphate*	2,16 g/ L d'H ₂ O	1 mL	1,00 x 10 ⁻⁵ M
H ₂ SeO ₃	1,29 mg/ L d'H ₂ O	1 mL	1,00 x 10 ⁻⁸ M
Tris-base (pH 7.2)	121,10 g/ L d'H ₂ O	1 mL	1,00 x 10 ⁻³ M
Solution métaux traces	(voir plus bas)	1 mL	---
Solution de vitamines	(voir plus bas)	0,5 mL	---

4.2. Solution de métaux traces de l'enrichissement K

Pour préparer ces solutions, dissoudre des composants suivant dans 950 mL d'eau (chauffer si nécessaire) et ajuster le pH avec de l'hydroxyde de sodium, jusqu'à dissolution totale. Ajuster le volume à 1 L.

Tableau 35. Composition de la solution de métaux traces de l'enrichissement K.

Composants	Solutions mères	Quantités	Concentration molaires dans la solution finale
Na ₂ EDTA • 2H ₂ O	---	41,60g	1,11 x 10 ⁻⁴ M
FeCl ₃ • 6 H ₂ O	---	3,150 g	1,17 x 10 ⁻⁵ M
MnCl ₂ • 4H ₂ O	---	0,178 g	9,00 x 10 ⁻⁷ M
ZnSO ₄ • 7H ₂ O	23,00 g/ L d'H ₂ O	1 mL	8,00x 10 ⁻⁸ M
CoCl ₂ • 6 H ₂ O	10,00 g/ L d'H ₂ O	1 mL	5,00 x 10 ⁻⁸ M
Na ₂ MoO ₄ • 2H ₂ O	6,3 g/L d'H ₂ O	1 mL	2,60 x 10 ⁻⁸ M
CuSO ₄ • 5H ₂ O	2,50 g/ L d'H ₂ O	1 mL	1,00 x 10 ⁻⁸ M

5. Comparaison des données obtenues à partir des spectres CID obtenue par CL-SMHR des ovatoxines en CL- HRSM

Tableau 36. Attribution des fragments obtenus à partir des ruptures obtenues dans les spectres CID des OVTX-a, -b, -c, -d et -e des ions trichargés. Les formules élémentaires des ions mono-isotopiques (m/z) sont reportées dans leur état de charge (1+, 2+, 3+), et les différences entre les valeurs expérimentales et théoriques (exprimées en ppm).

Ion précurseur	CE (V)	Rupture	OVTX-a			OVTX-b			OVTX-c			OVTX-d			OVTX-e			
			Formule	m/z	Δ ppm	Formule	m/z	Δ ppm	Formule	m/z	Δ ppm	Formule	m/z	Δ ppm	Formule	m/z	Δ ppm	
$[M+H+Ca]^{3+}$	60	#4 + #12	$C_{36}H_{64}O_{12}Ca$	364,2005	1,88	$C_{36}H_{64}O_{12}Ca$	364,2007	1,33	$C_{36}H_{64}O_{12}Ca$	364,1939	18,12	$C_{36}H_{64}O_{12}Ca$	364,2029	-4,71	$C_{36}H_{64}O_{12}Ca$	364,7001	7,57	
				364,7001	7,57		364,7039	-2,85		364,7033	-8,77		364,7001	7,57				
		#10 + #12	$C_{25}H_{43}O_4Ca$	447,2776	2,53	$C_{25}H_{43}O_4Ca$	447,278	-0,89	$C_{25}H_{43}O_4Ca$	447,278	-0,89	$C_{25}H_{43}O_4Ca$	447,2795	-4,25	$C_{25}H_{43}O_4Ca$	448,2796	-2,68	
				448,2784	8,21		448,2775	2,01		448,2796	-2,68							
		20	$[M+H+Ca-3H_2O]^{3+}$	$C_{131}H_{222}N_3O_{50}Ca$	892,4721	14,34	$C_{131}H_{222}N_3O_{51}Ca$	892,8173	2,30	$C_{131}H_{222}N_3O_{51}Ca$	898,1478	3,55	$C_{131}H_{222}N_3O_{51}Ca$	898,4726	14,29	$C_{131}H_{222}N_3O_{51}Ca$	898,4726	14,29
					892,8173	2,30		898,1478	3,55		898,4726	14,29						
	$[M+H+Ca-2H_2O]^{3+}$		$C_{129}H_{220}N_3O_{50}Ca$	883,8086	5,02	$C_{131}H_{224}N_3O_{51}Ca$	898,4957	-8,10	$C_{131}H_{224}N_3O_{52}Ca$	904,1638	-10,27	$C_{129}H_{220}N_3O_{51}Ca$	889,1535	-9,95	$C_{129}H_{220}N_3O_{51}Ca$	889,1259	21,10	
				884,1518	-4,90		898,8198	3,42		889,4703	9,90		889,4797	-0,67				
				884,4843	-2,68		899,1495	8,70		890,1388	10,35		890,141	7,88				
				884,8166	-0,26		899,4922	-1,38		890,4916	-10,26		890,4916	-10,26				
				885,1425	9,41													
	$[M+H+Ca-1H_2O]^{3+}$		$C_{129}H_{222}N_3O_{51}Ca$	889,8164	0,16	$C_{131}H_{226}N_3O_{52}Ca$	904,4908	1,26	$C_{131}H_{226}N_3O_{53}Ca$	909,8145	9,98	$C_{129}H_{222}N_3O_{52}Ca$	895,1421	6,79	$C_{129}H_{222}N_3O_{52}Ca$	895,1408	8,24	
				890,1518	-0,91		904,824	2,65		910,1471	12,01		895,4751	8,41		895,4698	14,33	
				890,4877	-3,46		905,1543	7,23		910,4869	6,13		895,8032	15,49		895,8127	4,89	
				890,8008	-2,53		905,4881	7,04		910,8366	-11,51		896,1442	8,18		896,1529	-1,53	
	$[M+H+Ca]^{3+}$		$C_{129}H_{224}N_3O_{52}Ca$	895,82	0,07	$C_{131}H_{228}N_3O_{53}Ca$	910,4952	0,29	$C_{131}H_{228}N_3O_{54}Ca$	915,8269	0,22	$C_{129}H_{224}N_3O_{53}Ca$	901,148	4,11	$C_{129}H_{224}N_3O_{53}Ca$	901,1518	-0,11	
		896,1556		-1,21	910,8293		0,68	916,1572		4,75	901,4877		-1,72	901,4877		-1,72		
		896,489		-0,04	911,1643		0,07	916,4957		0,33	901,8216		-1,11	901,819		1,77		

			896,8206	3,14		911,4991	-0,31		916,8317	-2,25		902,1565	-1,60		902,1563	-1,38
						911,8281	5,67		917,1638	0,32		902,4856	4,33		902,4802	10,31

Tableau 37. Attribution des fragments obtenus à partir des ruptures obtenues dans les spectres CID des OVTX-a, -b, -c, -d et -e des ions dichargés. Les formules élémentaires des ions mono-isotopiques (m/z) sont reportées dans leur état de charge (1+, 2+, 3+), et les différences entre les valeurs expérimentales et théoriques (exprimées en ppm).

Ion précurseur	CE (V)	Rupture	OVTX-a			OVTX-b			OVTX-c			OVTX-d			OVTX-e					
			Formule	m/z	Δ ppm	Formule	m/z	Δ ppm	Formule	m/z	Δ ppm	Formule	m/z	Δ ppm	Formule	m/z	Δ ppm			
[M+2H-H ₂ O] ²⁺	30	#1 - coté A	C ₃ H ₁₀ O ₁ N ₁	76,0757	7,10	C ₅ H ₁₄ O ₂ N ₁	120,1016	7,08	C ₅ H ₁₄ O ₂ N ₁	120,1012	10,4078	C ₃ H ₁₀ O ₁ N ₁	76,0755	9,73						
		#4	C ₁₆ H ₂₇ O ₅ N ₂	327,1907	3,97	C ₁₈ H ₃₁ N ₂ O ₆	371,217	3,26	C ₁₈ H ₃₁ N ₂ O ₆	371,2166	4,34	C ₁₆ H ₂₇ O ₅ N ₂	327,1894	7,95	C ₁₆ H ₂₇ N ₂ O ₆	343,1857	3,53			
				328,1925	8,68		372,2194	5,83		372,2193	6,10		328,1928	7,77		344,1855	13,86			
														C ₁₆ H ₂₇ N ₂ O ₆	343,1857	3,53				
															344,1855	13,86				
		#17-coté B - H ₂ O	C ₆₉ H ₁₁₄ O ₂₆ N	1372,7495	9,77	C ₆₉ H ₁₁₄ O ₂₆ N	1372,7526	7,51	C ₆₉ H ₁₁₄ O ₂₆ N	1372,7608	1,54	C ₆₉ H ₁₁₄ O ₂₆ N	1372,7576	3,87	C ₆₉ H ₁₁₄ O ₂₆ N	1372,7482	10,72			
	1373,7633			2,15	1373,7538		9,07	1373,7791		-9,35										
	#17 - coté B	C ₆₉ H ₁₁₆ O ₂₇ N	1390,7669	4,72	C ₆₉ H ₁₁₆ O ₂₇ N	1390,7677	4,15	C ₆₉ H ₁₁₆ O ₂₇ N	1390,7596	9,97	C ₆₉ H ₁₁₆ O ₂₇ N									
			1391,7729	2,82		1391,7543	16,19		1391,7574	13,96										
	10	[M+2H-6H ₂ O] ²⁺	C ₁₂₉ H ₂₁₃ N ₃ O ₄₆	1270,2202	0,64							C ₁₂₉ H ₂₁₃ N ₃ O ₄₇	1278,7166	2,78						
				1270,7066	12,66								1279,22	1,43						
				1271,2211	2,57															
		[M+2H-5H ₂ O] ²⁺	C ₁₂₉ H ₂₁₅ N ₃ O ₄₇	1279,2244	1,48							C ₁₃₁ H ₂₁₉ N ₃ O ₄₉	1309,2365	0,27	C ₁₂₉ H ₂₁₅ N ₃ O ₄₈	1287,1936	23,43	C ₁₂₉ H ₂₁₅ N ₃ O ₄₈	1287,715	8,18
				1279,7205	5,84								1309,7268	8,96		1287,6862	30,47		1288,218	7,30
1280,2182				8,94							1310,2401		0,09	1288,228		-0,69				
[M+2H-4H ₂ O] ²⁺		C ₁₂₉ H ₂₁₇ N ₃ O ₄₈	1288,2297	1,46	C ₁₃₁ H ₂₂₁ N ₃ O ₄₉	1310,2368	6,02	C ₁₃₁ H ₂₂₁ N ₃ O ₅	1318,2392	2,23	C ₁₂₉ H ₂₁₇ N ₃ O ₄₉	1296,2282	0,64	C ₁₂₉ H ₂₁₇ N ₃ O ₄₉	1296,222	5,35				
			1288,729	3,30		1310,7392	5,47		0	1318,7407		2,37	1296,7288		1,48	1296,723	5,87			

				1289,2269	6,23		1311,2426	4,15		1319,2437	1,36		1297,2164	12,33		1297,226	5,08
				1289,7331	2,72					1319,7422	3,77						
		[M+2H-3H₂O]²⁺	C ₁₂₉ H ₂₁₉ N ₃ O ₄₉	1297,2328	3,13		1319,2474	1,95		1327,244	2,58		1305,2306	2,85		1305,229	4,46
				1297,7338	3,65		1319,7499	1,32		1327,7421	5,27		1305,7319	3,14		1305,726	7,88
				1298,2366	2,78	C ₁₃₁ H ₂₂₃ N ₃ O ₅₀	1320,2467	5,01	C ₁₃₁ H ₂₂₃ N ₃ O ₅₁	1328,2473	2,62	C ₁₂₉ H ₂₁₉ N ₃ O ₅₀	1306,2253	9,47	C ₁₂₉ H ₂₁₉ N ₃ O ₅₀	1306,231	5,03
				1298,737	2,82		1320,7472	5,91		1328,7492	2,45		1306,737	1,80		1306,733	4,94
							1321,245	8,84									
		[M+2H-2H₂O]²⁺	C ₁₂₉ H ₂₂₁ N ₃ O ₅₀	1306,2394	2,10		1328,2507	3,43		1336,2504	1,72		1314,2355	3,12		1314,233	5,10
				1306,7411	2,08		1328,7538	2,35		1336,7497	3,50		1314,7355	4,39		1314,735	4,54
				1307,2404	3,90	C ₁₃₁ H ₂₂₅ N ₃ O ₅₁	1329,2544	3,16	C ₁₃₁ H ₂₂₅ N ₃ O ₅₂	1337,2514	3,48	C ₁₂₉ H ₂₂₁ N ₃ O ₅₁	1315,2371	4,45	C ₁₂₉ H ₂₂₁ N ₃ O ₅₁	1315,233	7,65
				1307,738	7,02		1329,7604	-1,02		1337,7481	7,21		1315,7297	11,35		1315,73	11,27
				1308,2346	10,89												
		[M+2H-1H₂O]²⁺	C ₁₂₉ H ₂₂₃ N ₃ O ₅₁	1315,2422	3,97		1337,2523	6,15		1345,2443	10,18		1323,2448	0,06		1323,243	1,57
				1315,7459	2,43		1337,7552	5,24		1345,7482	8,52		1323,7398	5,11		1323,74	5,03
				1316,2497	0,82	C ₁₃₁ H ₂₂₇ N ₃ O ₅₂	1338,2589	3,72	C ₁₃₁ H ₂₂₇ N ₃ O ₅₃	1346,2481	9,84	C ₁₂₉ H ₂₂₃ N ₃ O ₅₂	1324,237	8,48	C ₁₂₉ H ₂₂₃ N ₃ O ₅₂	1324,242	4,41
				1316,751	0,17		1338,7676	-1,52		1346,749	10,41		1325,241	7,99			

6. Comparaison de l'OVTX-h avec l'OVTX-a : comparaison des différentes hypothèses

Tableau 38. Attribution des fragments obtenus à partir des ruptures obtenues dans les spectres CID des OVTX-a, -b, -c, -d et -e des ions dichargés. Les formules élémentaires des ions mono-isotopiques (m/z) sont reportées dans leur état de charge (1+, 2+, 3+), et les différences entre les valeurs expérimentales et théoriques (exprimées en ppm). a = abondance faible.

	OVTX-a : C ₁₂₉ H ₂₂₃ N ₃ O ₅₂ Précurseur : [M+2H] ²⁺ m/z 1324,7543		OVTX-h : C ₁₂₉ H ₂₂₅ N ₃ O ₅₁ Précurseur : [M+2H] ²⁺ m/z 1317,7627		OVTX-h : C ₁₂₈ H ₂₂₁ N ₃ O ₅₂ Précurseur : [M+2H] ²⁺ m/z 1317,7627	
Profile isotopique	m/z	Δ ppm	m/z	Δ ppm	m/z	Δ ppm
[M+2H] ²⁺	1324,2299 ^a	-17,22	1317,2569	-4,71	1317,2569	9,11
	1324,7267 ^a	-20,91	1317,7602	-3,45	1317,7602	10,36
	1325,2394 ^a	-12,56	1318,2599	-4,97	1318,2599	8,84
[M+2H - H ₂ O] ²⁺	1315,2406	-5,21	1308,2519	-4,51	1308,2519	9,40
	1315,7391	-7,60	1308,758	-1,15	1308,758	12,76
	1316,2432	-5,77	1309,2508	-7,91	1309,2508	6,00
[M+2H - 2 H ₂ O] ²⁺	1306,2312	-8,38	1299,2474	-3,93	1299,2474	10,08
	1306,7402	-2,79	1299,7493	-3,77	1299,7493	10,23
	1307,2467	0,92	1300,2508	-3,88	1300,2508	10,08
	1307,7467	-0,38	1300,7457	-9,11	a	a
[M+2H - 3 H ₂ O] ²⁺	1297,2351	-1,35	1290,2434	-2,98	1290,2434	11,12
	1297,7313	-5,59	1290,7453	-2,79	1290,7453	11,31
	1298,2364	-2,93	1291,2484	-1,70	1291,2484	12,39
	1298,717	-19,17	1291,7461	-4,76	1291,7461	9,33
[M+2H - 4 H ₂ O] ²⁺	1288,2223	-7,22	1281,2314	-8,23	1281,2314	5,96
	1288,7251	-6,32	1281,7373	-4,95	1281,7373	9,26

	1289,2297	-4,07	1282,24	-4,13	1282,24	10,05
	1289,7094 ^a	-21,09	a	a	a	a

Tableau 39. Attribution des fragments obtenus à partir des ruptures obtenues dans les spectres CID des OVTX-a, -b, -c, -d et -e des ions trichargés. Les formules élémentaires des ions mono-isotopiques (m/z) sont reportées dans leur état de charge (1+, 2+, 3+), et les différences entre les valeurs expérimentales et théoriques (exprimées en ppm). a = abondance faible.

Profile isotopique	OVTX-a : C ₁₂₉ H ₂₂₃ N ₃ O ₅₂ Précurseur : [M+H+Ca] ³⁺ m/z 896,1555		OVTX-h : C ₁₂₉ H ₂₂₅ N ₃ O ₅₁ Précurseur : [M+H+Ca] ³⁺ m/z 891,4935		OVTX-h : C ₁₂₈ H ₂₂₁ N ₃ O ₅₂ Précurseur : [M+H+Ca] ³⁺ m/z 891,4935	
	m/z	Δ ppm	m/z	Δ ppm	m/z	Δ ppm
[M+H+Ca] ³⁺	895,8196	-0,52	891,1586	-1,92	891,1586	11,52
	896,1543	-0,24	891,4937	-1,19	891,4937	12,38
	896,4883	-0,74	891,8285	-0,80	891,8285	12,90
	896,8234	-0,02	892,1631	-0,63	892,1631	12,82
	897,1552	-2,98	892,4962	-2,15	892,4962	11,43
[M+H+Ca - H ₂ O] ³⁺	889,8168	0,29	885,1542	-2,92	885,1542	10,77
	890,1502	-0,89	885,4921	0,97	885,4921	14,79
	890,4831	-2,64	885,8250	-0,78	885,8250	12,79
	890,8179	-2,24	886,1583	-2,08	886,1583	11,62
	891,1506	-4,21	886,4870	-8,57	886,4870	5,26
[M+H+Ca - 2 H ₂ O] ³⁺	883,8103	-3,08	879,1517	-1,78	879,1517	12,02
	884,1463	-1,33	879,4890	1,46	879,4890	15,25
	884,4816	-0,37	879,8246	2,76	879,8246	16,55
	884,8144	-2,23	880,1529	-4,23	880,1529	9,55
	885,1441	-7,60	a	a	a	a
[M+H+Ca - 3 H ₂ O] ³⁺	877,8092	-0,34	873,1446	-5,89	873,1446	8,00

	878,1406	-3,81	873,4846	0,46	873,4846	14,35
	878,4767	-1,94	873,8150	-4,17	873,8150	9,70
	878,8094	-3,93	874,1508	-2,63	874,1508	11,25
[M+H+Ca - 4 H ₂ O] ³⁺	871,8011	-5,59	a	a	a	a
	872,1384	-2,33	a	a	a	a
	872,4706	-4,91	a	a	a	a
	872,8076	-1,99	a	a	a	a

Tableau 40. Attribution des fragments obtenus à partir des ruptures obtenues dans les spectres CID des OVTX-a, -b, -c, -d et -e des fragments internes. Les formules élémentaires des ions mono-isotopiques (m/z) sont reportées dans leur état de charge (1+, 2+, 3+), et les différences entre les valeurs expérimentales et théoriques (exprimées en ppm). a = abondance faible. DLR : nombre de doubles liaisons relatives.

Fragments internes	OVTX-a				OVTX-h			
	Formule brute	lons du profil isotopique	Δ ppm	DLR	Formule brute	lons du profil isotopique	Δ ppm	DLR
#1-a	C ₃ H ₁₀ NO	76,0756	-7,89		C ₃ H ₁₀ NO	76,0756	-7,9	
#1+#4	C ₁₃ H ₁₆ O ₃ N	234,1099	-13,24	6,5	C ₁₃ H ₁₆ O ₃ N	234,1113	-7,3	6,5
#1+#4 - H ₂ O	C ₁₃ H ₁₄ O ₂ N	216,1011	-6,48		a	216,1008	-7,9	
#4+#12		364,2018	1,65		a	a	a	a
	C ₃₆ H ₆₄ O ₁₂ Ca	364,7008	-5,62	5	a	a	a	a
		365,2039	-1,78		a	a	a	a
#4+#12 - H ₂ O	C ₃₆ H ₆₂ O ₁₁ Ca	355,1954	-1,41		a	a	a	a
#4+#13	C ₃₈ H ₆₈ O ₁₄ Ca	394,2128	2,66	5	a	a	a	a
#4+#15	C ₄₀ H ₇₂ O ₁₅ Ca	416,2253	1,08	5	a	a	a	a
#4+#15 - H ₂ O	C ₄₀ H ₇₀ O ₁₄ Ca	407,2233	9,09		a	a	a	a
#7+#12 ³	C ₂₈ H ₄₉ O ₆ Ca	521,3132	-4,41	4,5	C ₂₈ H ₄₉ O ₆ Ca	521,3124	-5,9	4,5
#8+#12	C ₂₇ H ₄₇ O ₆ Ca	507,2949	-9,86	4,5	a	a	a	a

#9+#12	$C_{26}H_{45}O_5Ca$	477,2835	-12,15	4,5	$C_{26}H_{45}O_5Ca$	477,287	-4,8	4,5
#10+#12	$C_{25}H_{43}O_4Ca$	447,2779	-1,79	4,5	$C_{25}H_{43}O_4Ca$	447,2765	-4,9	4,5
		448,2777	-9,82		a	448,2797	-5,4	

7. Chromatogramme d'un extrait prépurifié sur une phase Sephadex LH-20 et spectres de masse « full scan » des composés d'intérêt obtenus en CL-SM.

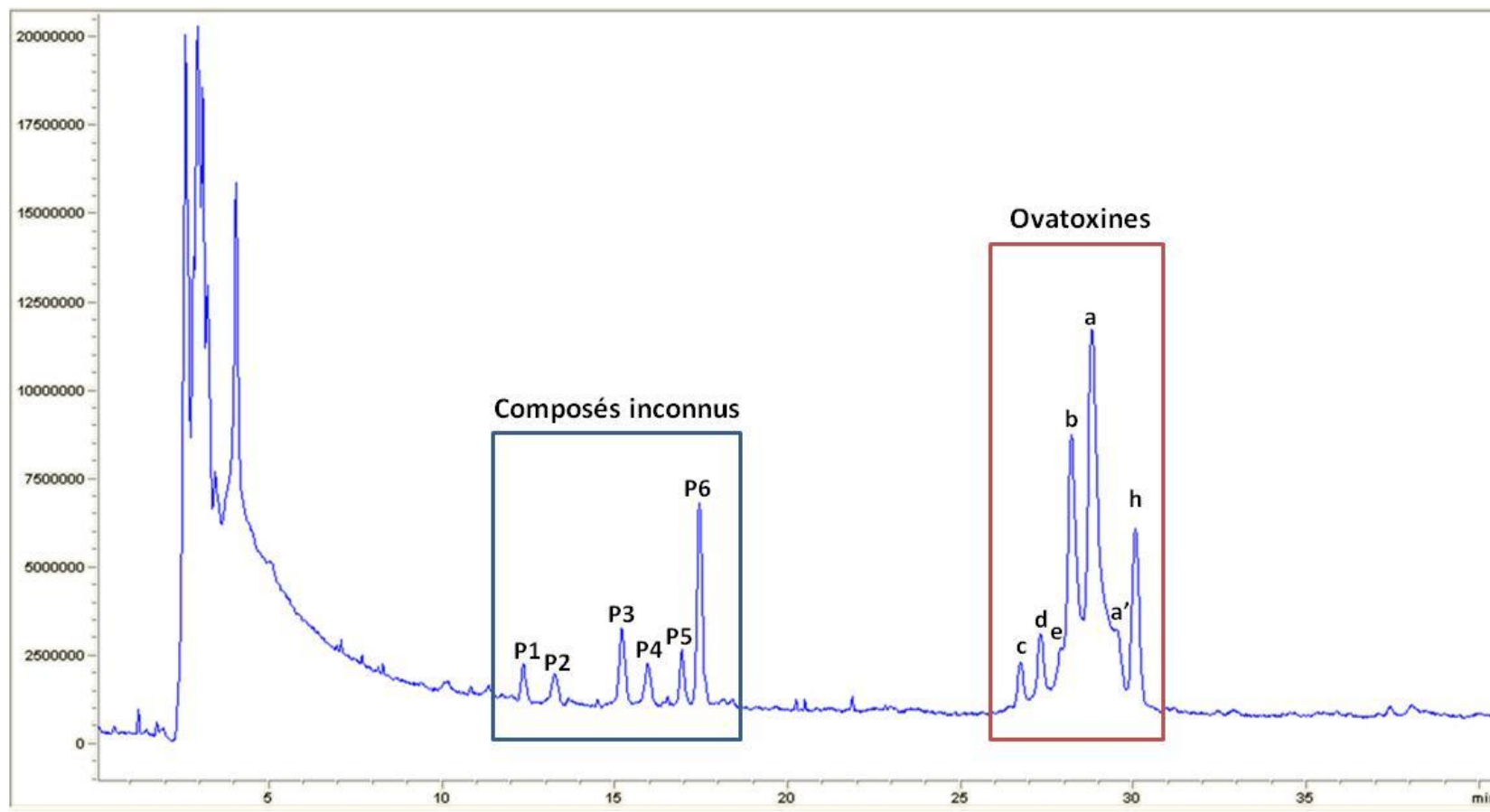


Figure 93. Chromatogramme de l'extrait prépurifié sur une phase Sephadex LH-20 (fraction a) sur Uptisphere C₁₈-TF (250×4,6mm, 5µm). La séparation a été effectuée avec un gradient linéaire d'élution pendant 40 min avec H₂O (éluant A) et ACN/eau 95% (éluant B) tous deux contenant 0,2 % d'acide acétique, de 20 à 50 % de B. Débit 1 mL/min. 20 µL de volume d'injection. La détection a été réalisée en SM « full scan » (m/z [300-1450]).

7.1. Spectre du composé inconnu P1

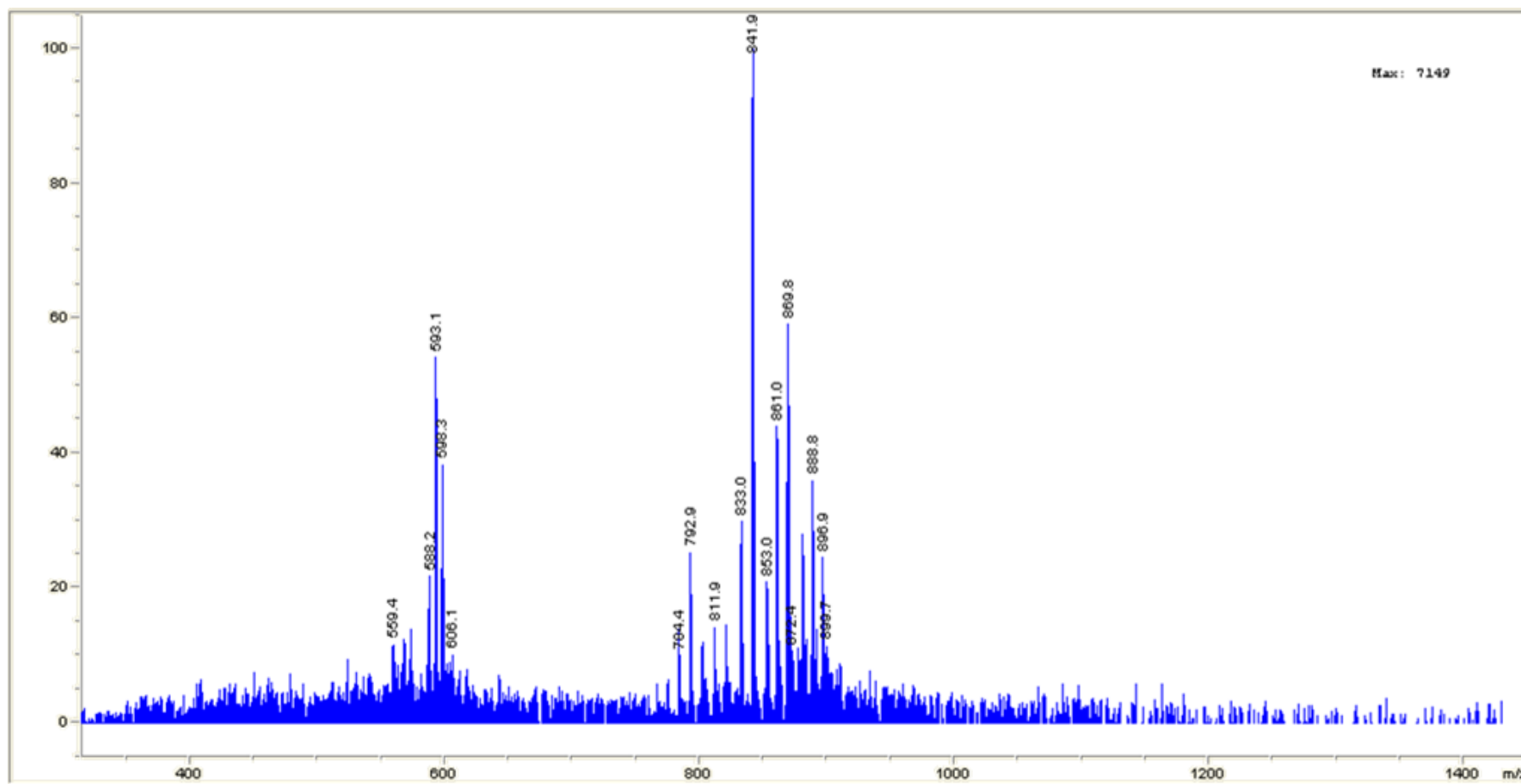


Figure 94. Extraction du spectre à 12,3 minutes.

7.2. Spectre du composé inconnu P2

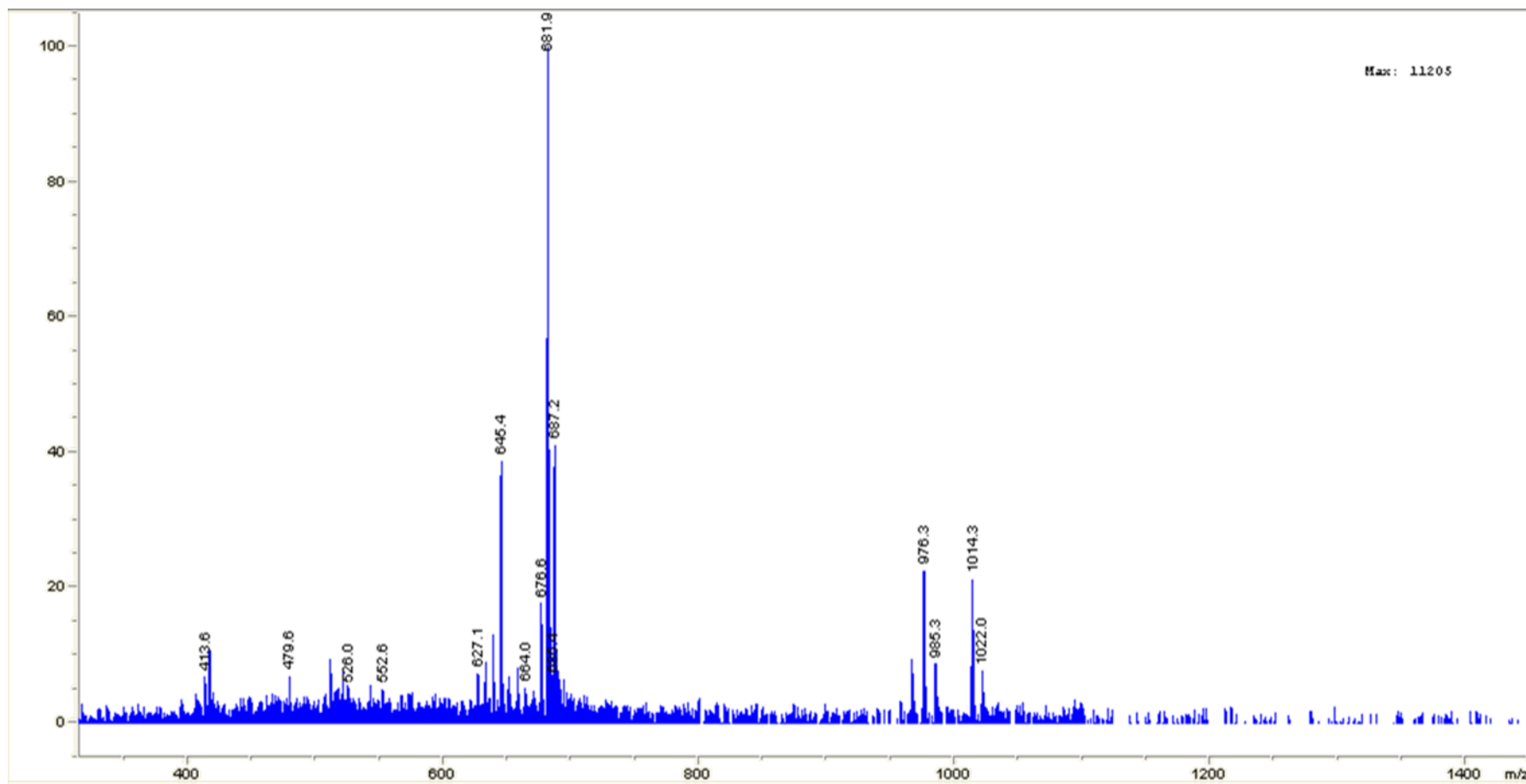


Figure 95. Extraction du spectre à 13,3 minutes.

7.3. Spectre du composé inconnu P3

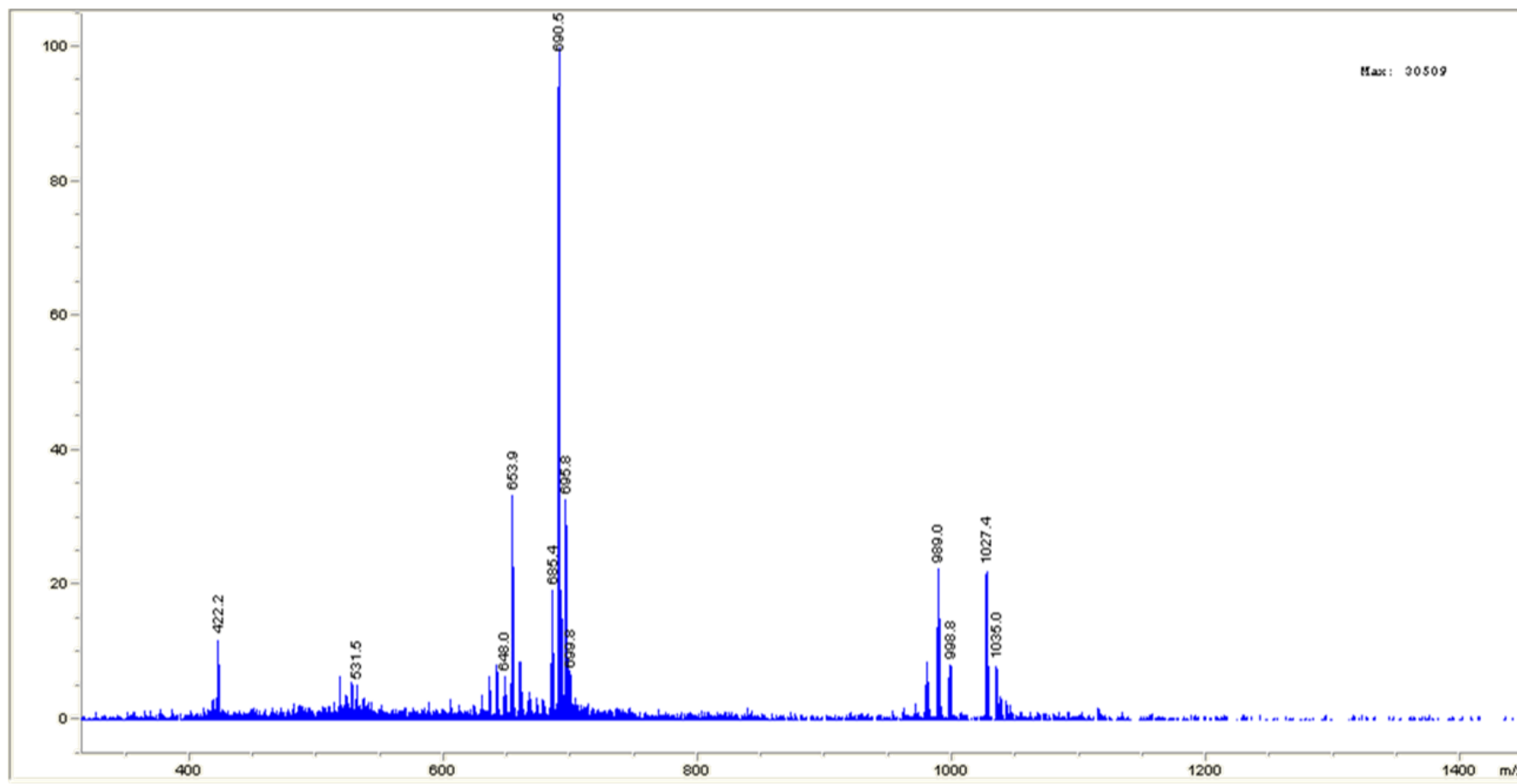


Figure 96. Extraction du spectre à 15,2 minutes.

7.4. Spectre du composé inconnu P4

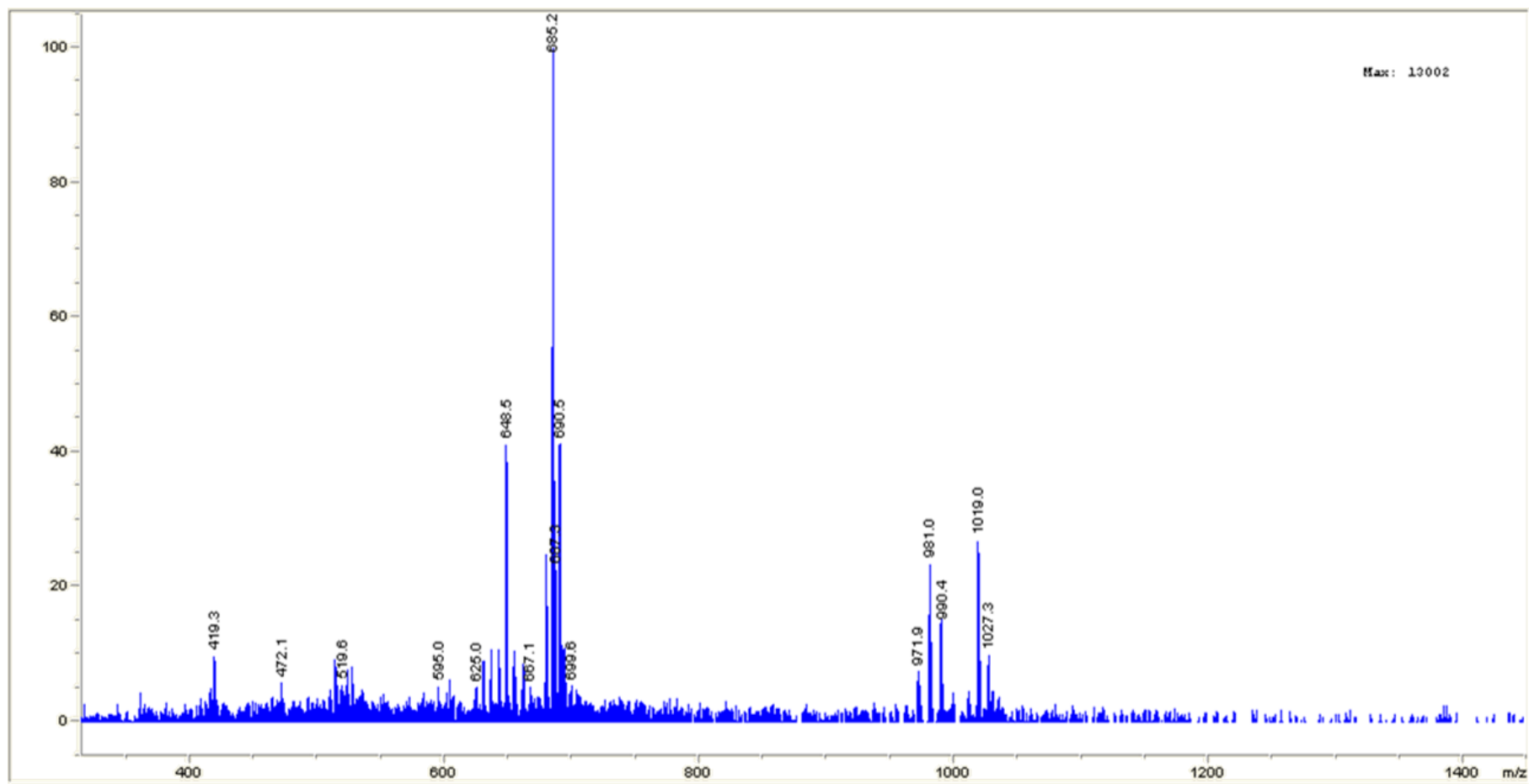


Figure 97. Extraction du spectre à 15,9 minutes.

7.5. Spectre du composé inconnu P5

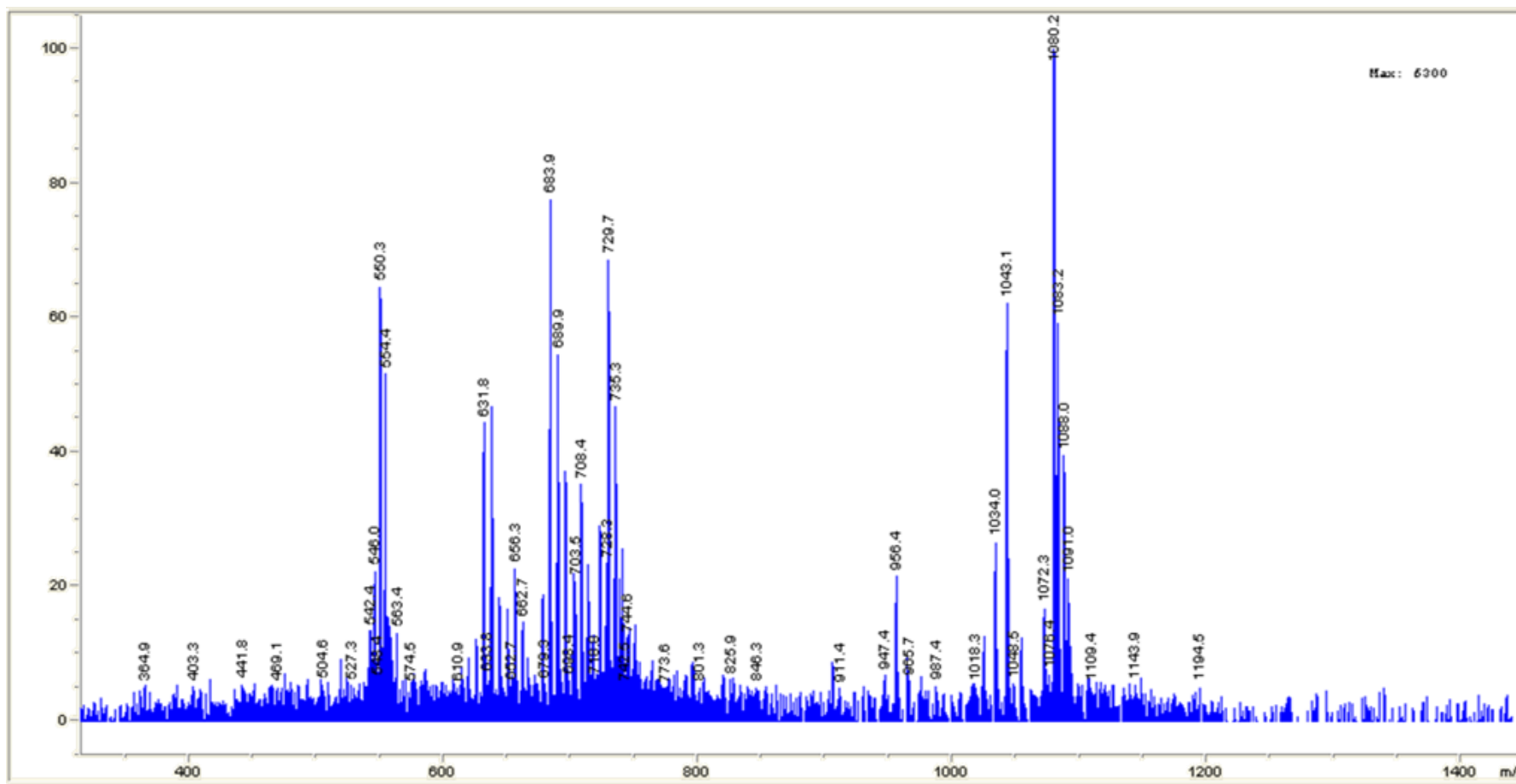


Figure 98. Extraction du spectre à 16,9 minutes.

7.6. Spectre du composé inconnu P6

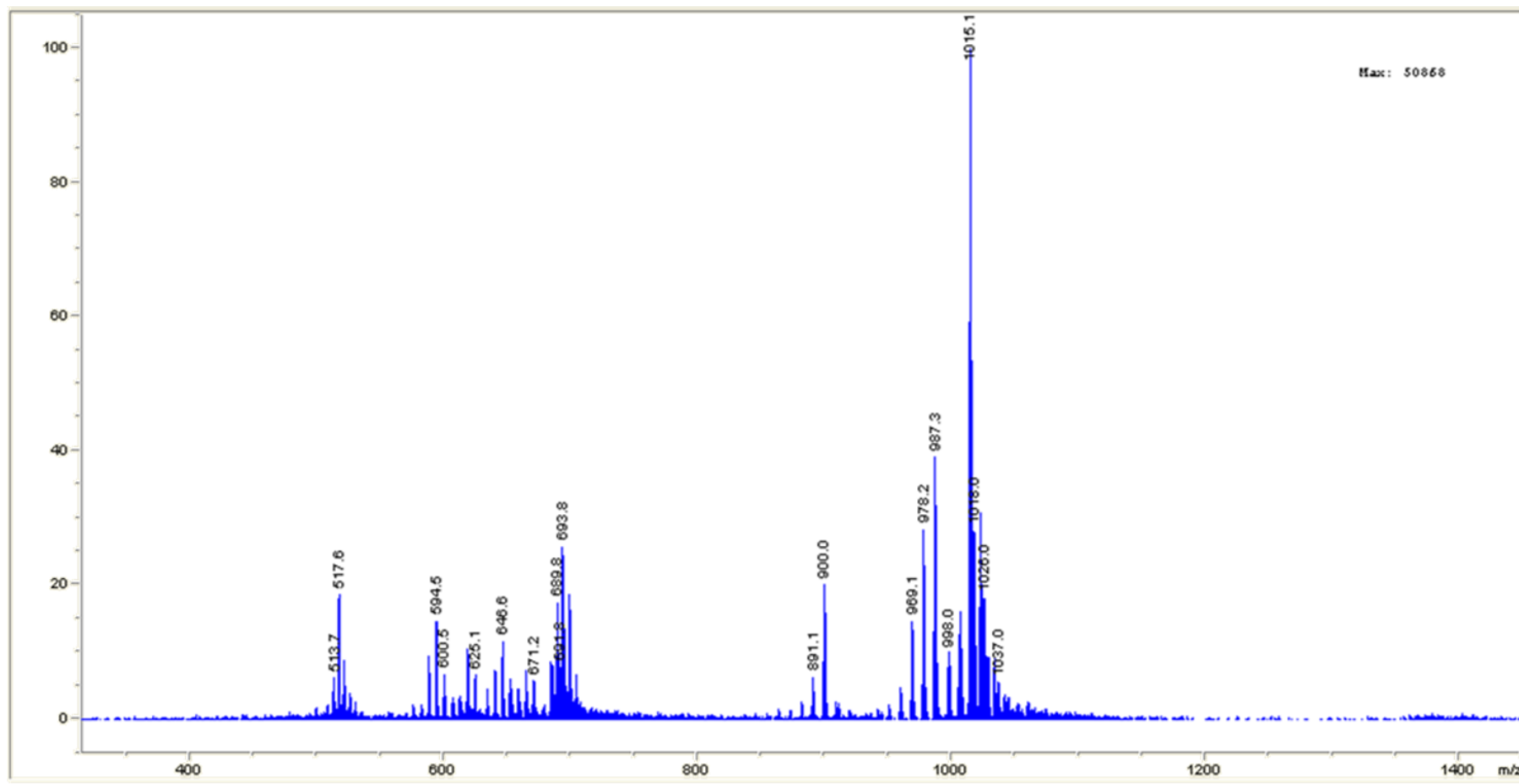


Figure 99. Extraction du spectre à 17,4 minutes.

7.7. Spectre de l'OVTX-c

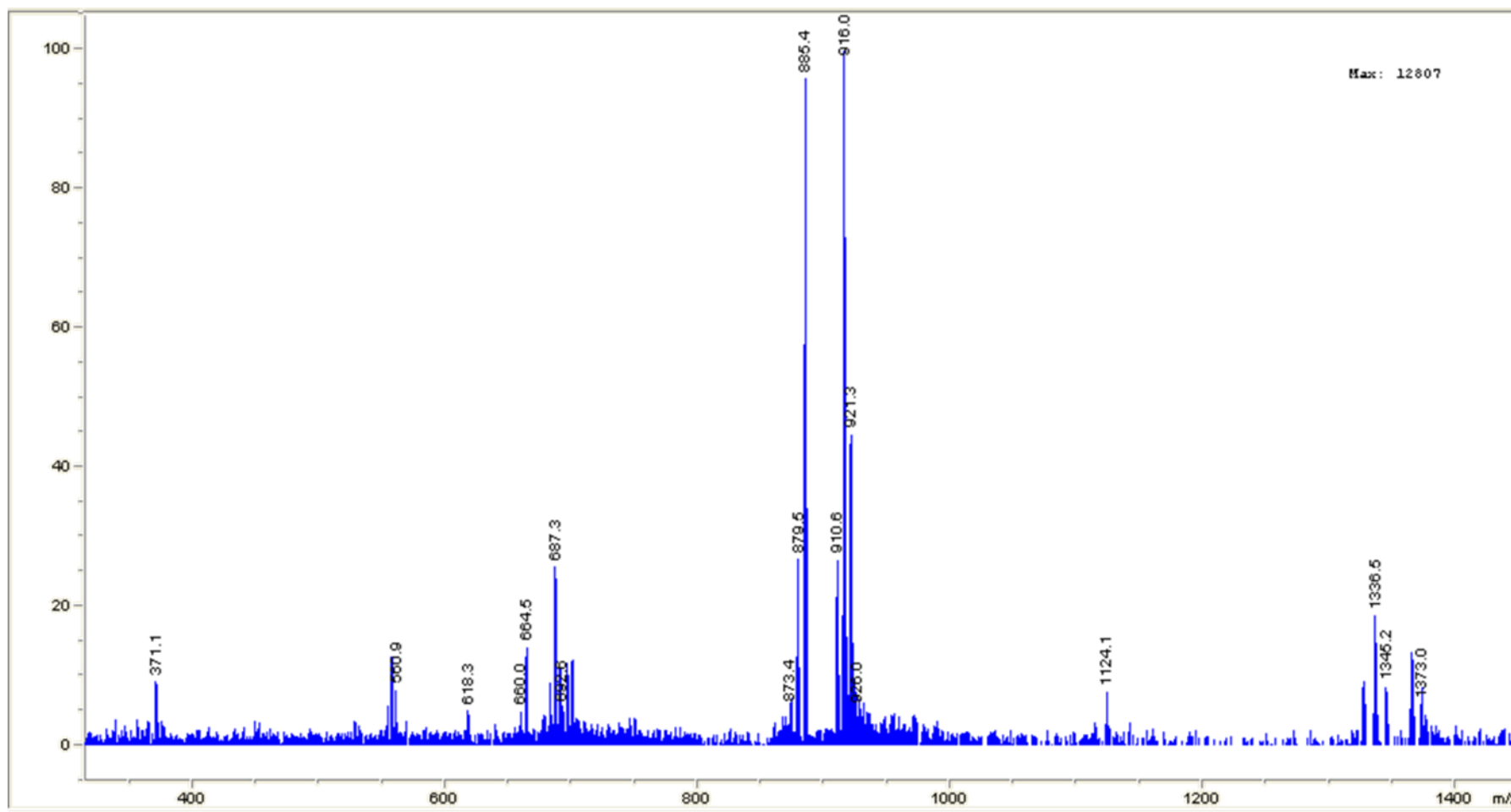


Figure 100. Extraction du spectre à 26,7 minutes.

7.8. Spectre de l'OVTX-d

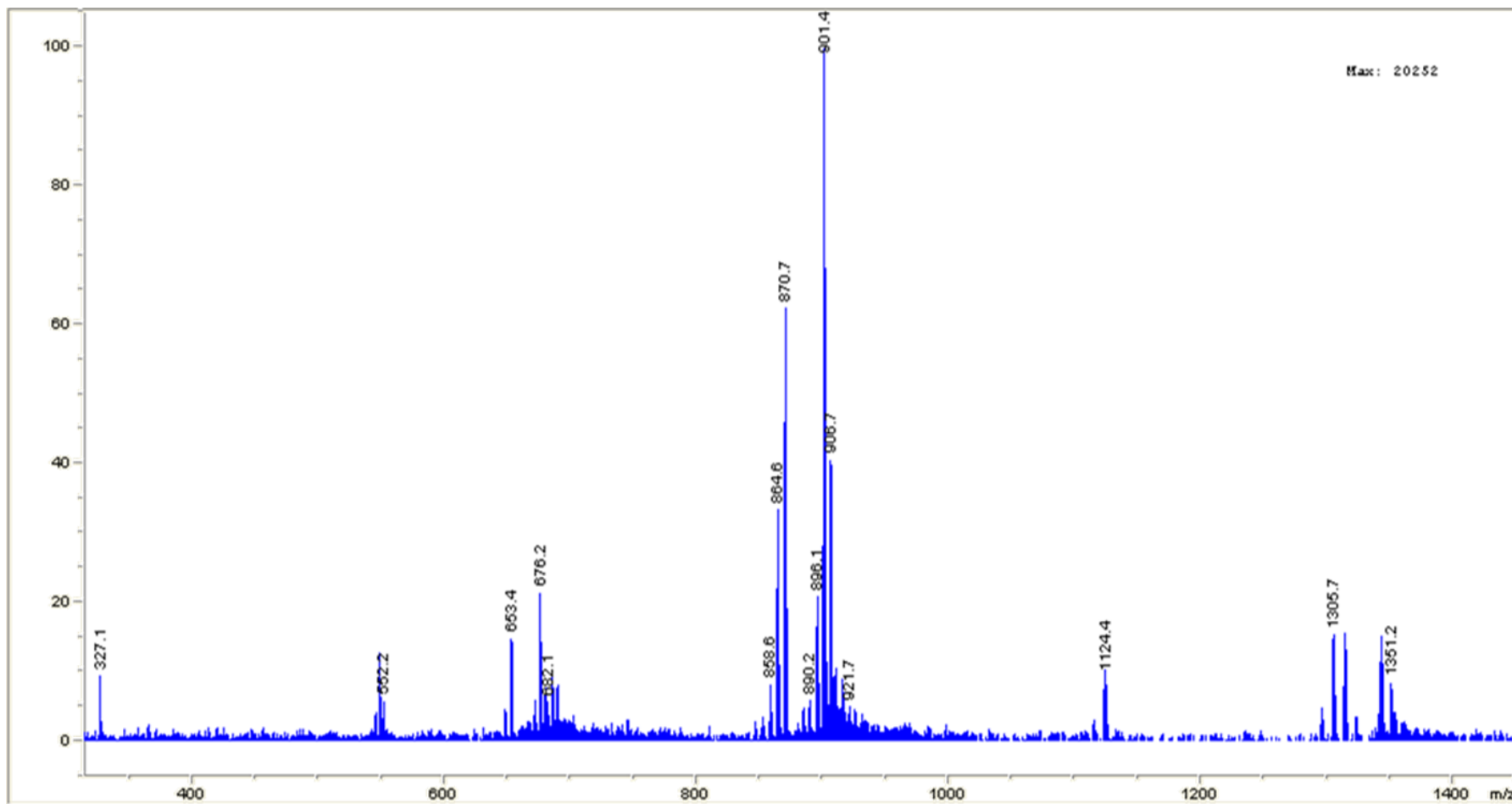


Figure 101. Extraction du spectre à 27,3 minutes.

7.9. Spectre de l'OVTX-e

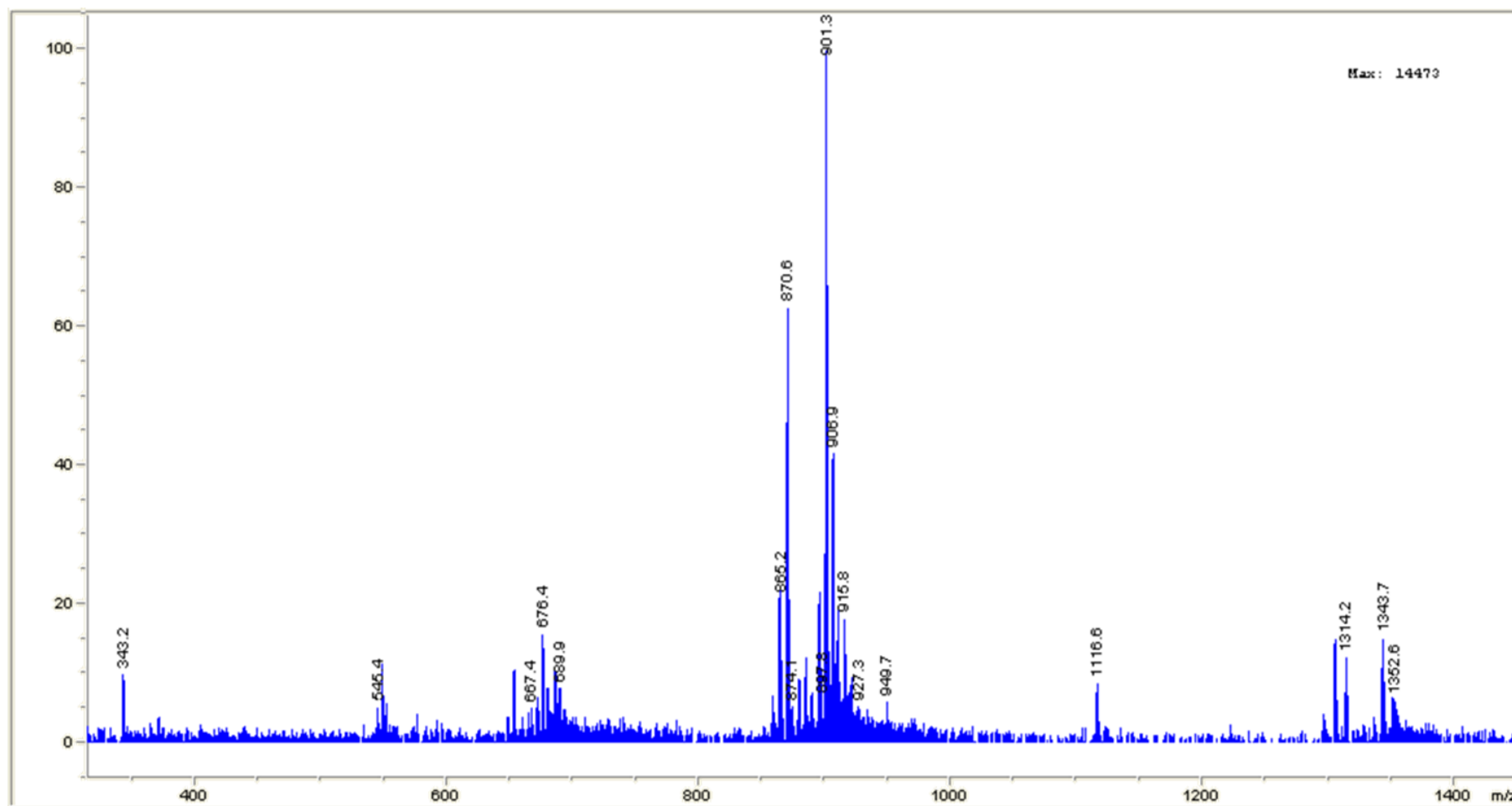


Figure 102. Extraction du spectre à 27,9 minutes.

7.10. Spectre de l'OVTX-b

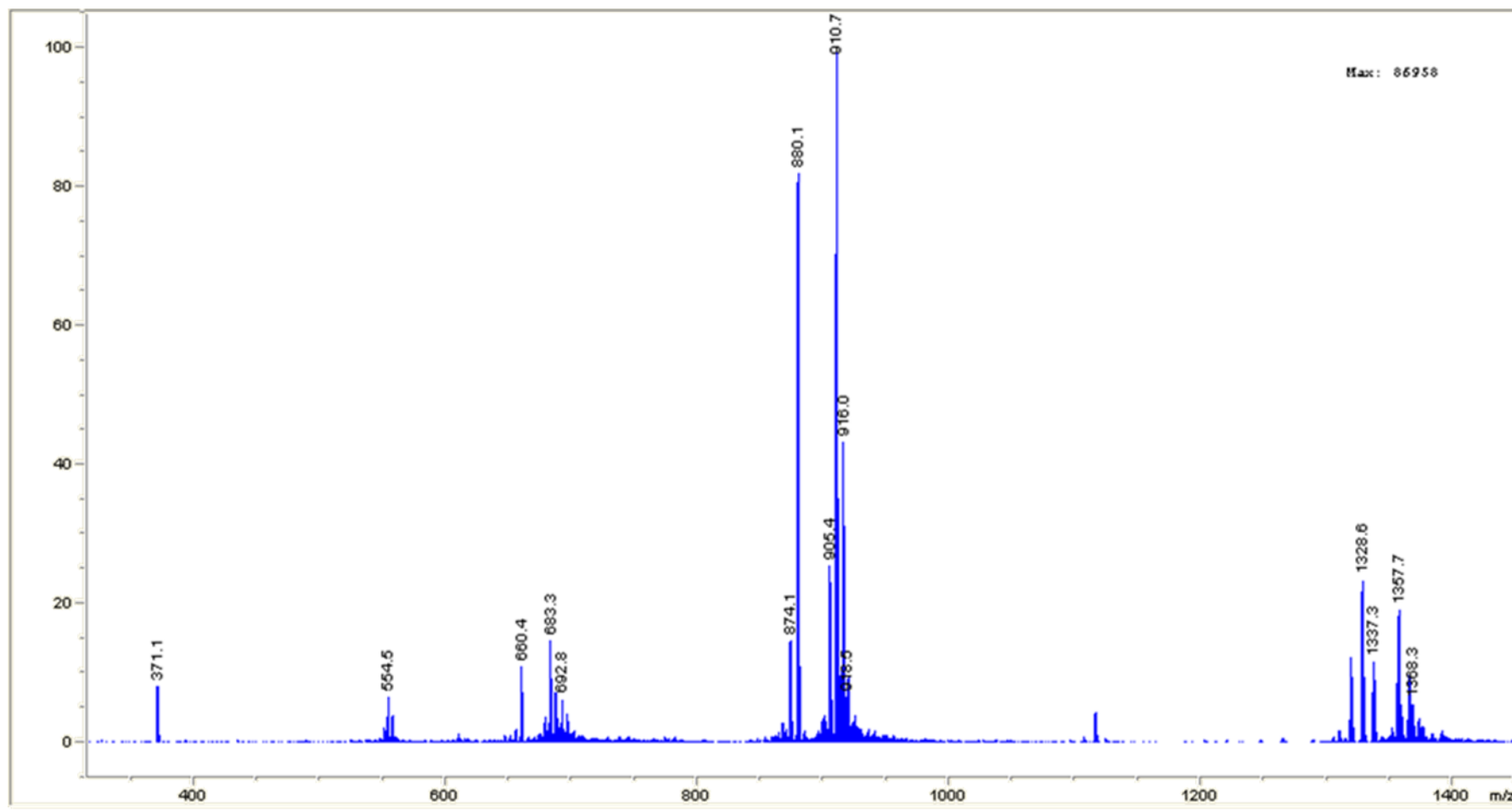


Figure 103. Extraction du spectre à 28,2 minutes.

7.11. Spectre de l'OVTX-a

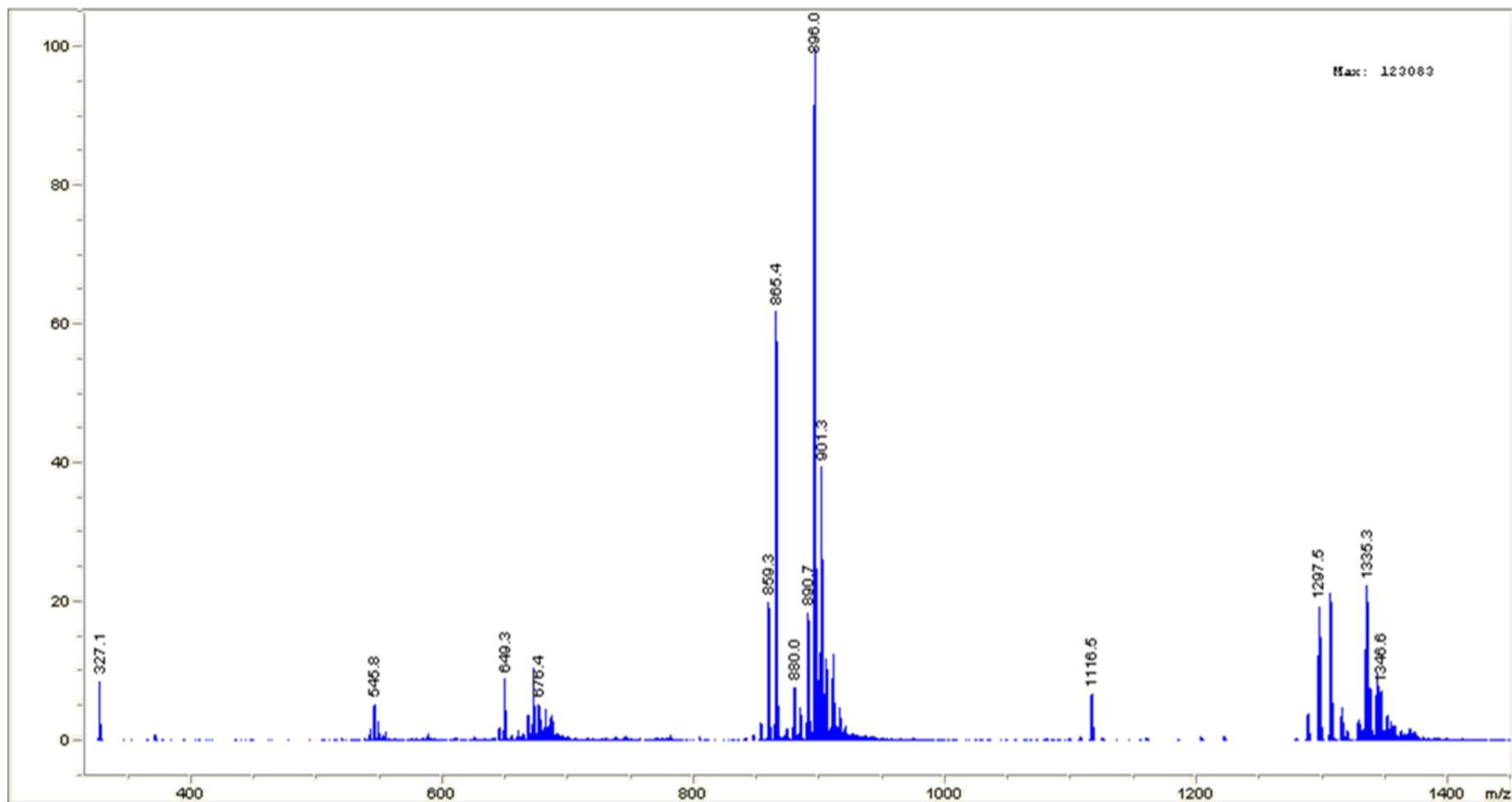


Figure 104. Extraction du spectre à 28,8 minutes.

7.12. Spectre de l'OVTX-a'

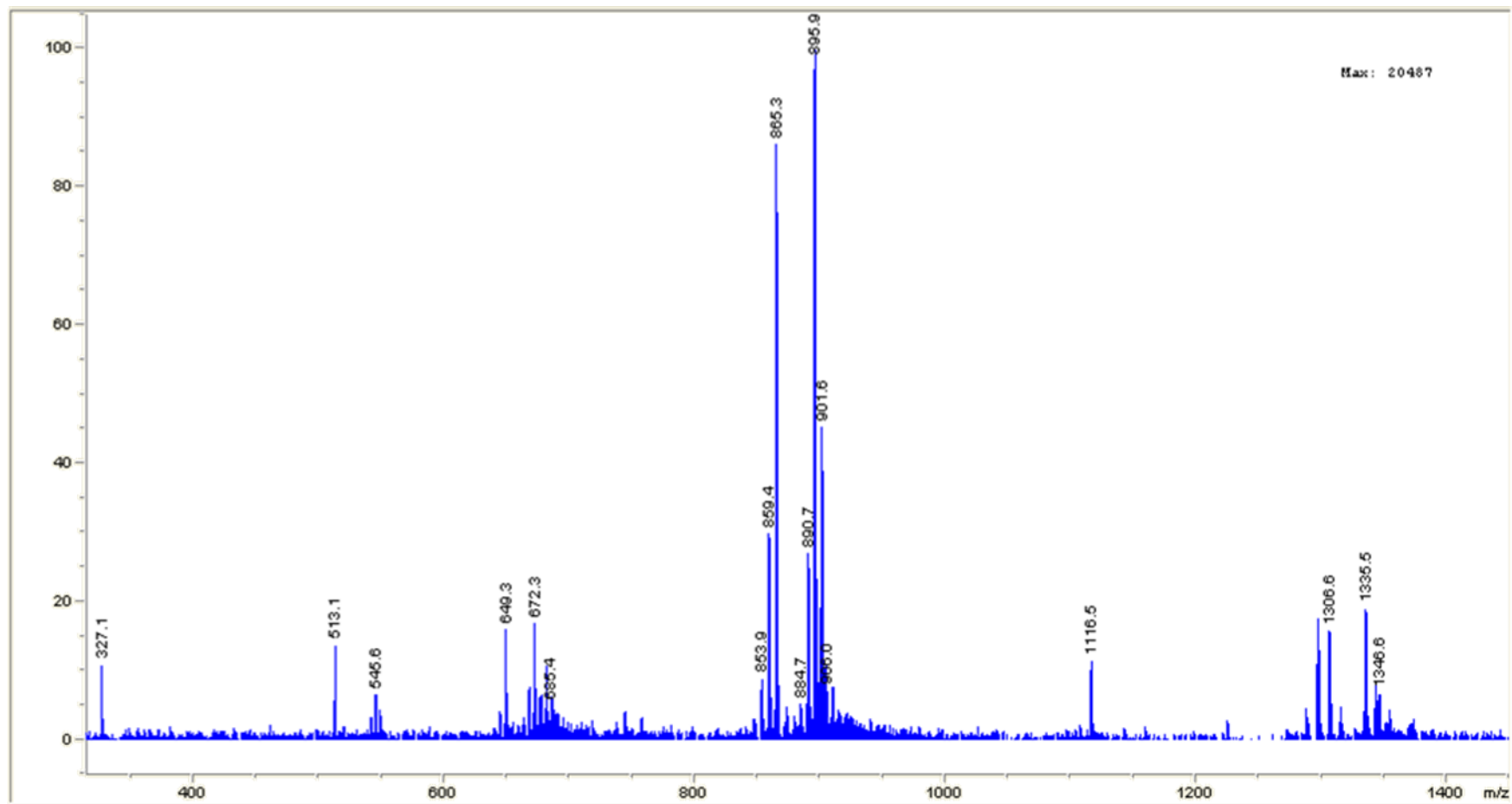


Figure 105. Extraction du spectre à 29,5 minutes.

7.13. Spectre de l'OVTX-h

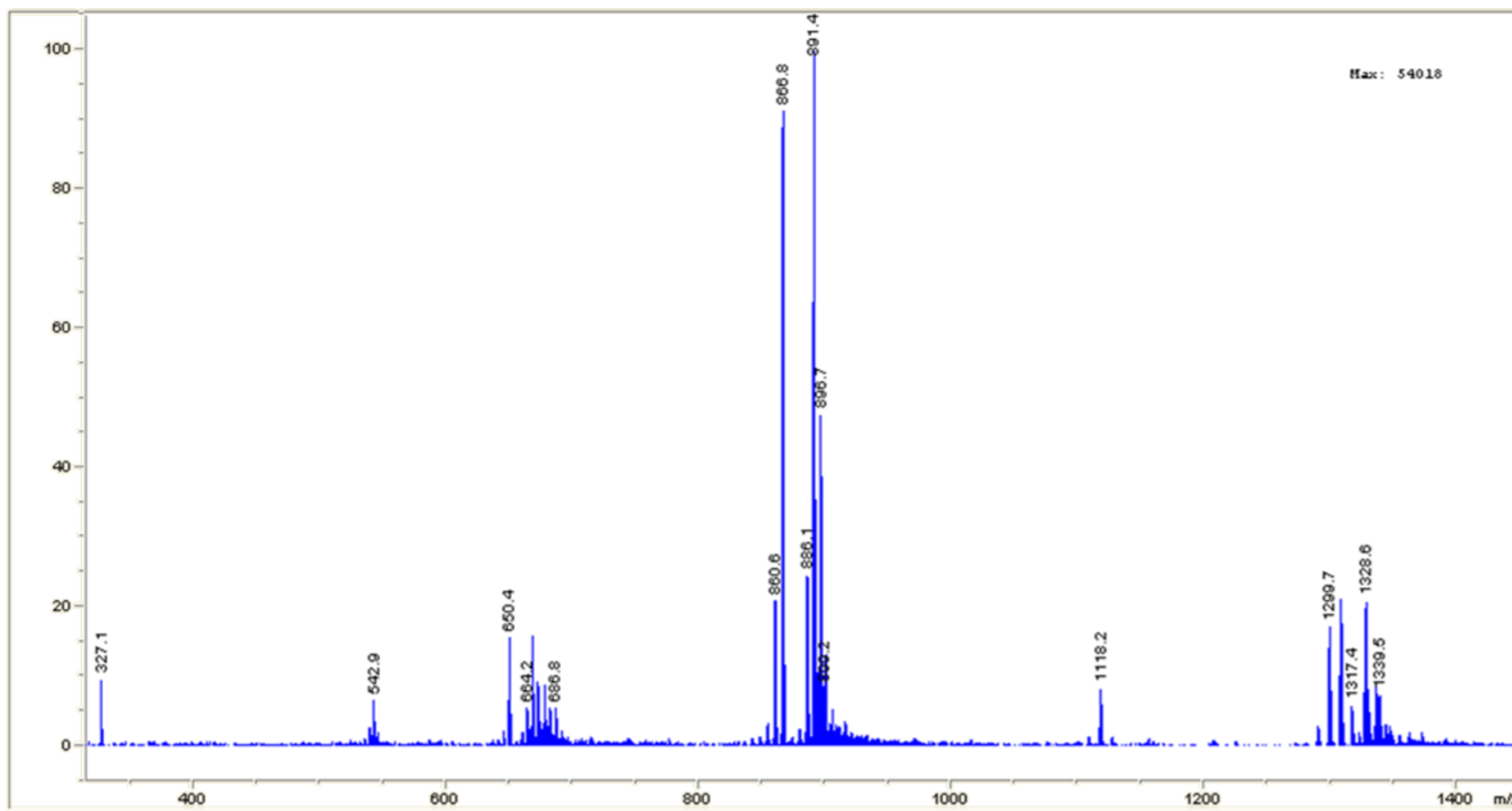


Figure 106. Extraction du spectre à 30,1 minutes.

Résumé

Les dinoflagellés du genre *Ostreopsis* sont connus dans les zones tropicales pour être à l'origine d'intoxications alimentaires, suite à l'accumulation de palytoxine dans les produits de la mer. Probablement en lien avec le changement climatique, *Ostreopsis* sp. est de plus en plus présent depuis 2006 en Méditerranée française. Dans le cadre de la thèse, les études terrain effectuées durant les étés 2011 et 2012, ont montré que : i) les souches d'*Ostreopsis* cf. *ovata* présentent un profil toxinique complexe composé de la palytoxine et surtout 90 % d'ovatoxines (OVTX-a, -b, -c, -d, -e). Un nouvel analogue (OVTX-h) a également été détecté ; ii) les concentrations cellulaires et toxiques d'*O. ovata* diminuent avec la profondeur ; iii) différents produits de la mer accumulent les toxines, pouvant présenter un risque réel pour les baigneurs et les consommateurs. Comme il n'existe pas d'étalon d'OVTXs, un des objectifs de la thèse a porté sur le développement d'une procédure de leur purification à partir des extraits d'*O. ovata*. Pour cela, des conditions optimales de culture ont été recherchées permettant une production maximale d'OVTXs (300 pg/cellule). Les différentes étapes d'extraction et de concentration développées ont permis d'obtenir une fraction très riche en toxines. La purification finale a été menée par chromatographie liquide/spectrométrie de masse/détection UV en utilisant une colonne Uptisphere C18-TF. Les travaux de thèse ont permis d'acquérir des données qui vont contribuer à l'analyse de l'impact sanitaire puisque actuellement, au niveau international, il existe très peu de données permettant d'établir des seuils d'alerte d'*Ostreopsis* sp. et de sécurité sanitaire.

Mots clés : *Ostreopsis ovata*, ovatoxines, purification, contamination des produits de la mer, chromatographie liquide/spectrométrie de masse.

Abstract

Dinoflagellates of genus *Ostreopsis* are known in tropical areas to provoke food intoxication, after palytoxin accumulation in seafood. Probably in link with climatic changes, *Ostreopsis* sp. is increasingly present in French Mediterranean since 2006. In the context of the PhD, the studies in natural environment, in summer 2011 and 2012, showed that: i) *Ostreopsis* cf. *ovata* strain presented a complex toxic profile, including palytoxin and especially ovatoxins (OVTX-a, -b, c, -d, -e). A new analog (OVTX-h) was detected; ii) cell and toxic concentrations decreased with depth; iii) different seafood accumulated toxins, which could represent real risk for bathers and consumers. Because there are no standards for OVTXs, one of the PhD goals was to develop a OVTXs purification protocol from *Ostreopsis* cf. *ovata* extracts. For this purpose, optimal culture conditions were investigated, allowing a maximal production of OVTXs (300 pg/cell). Different extraction and concentration steps developed had permitted to obtain a toxin rich fraction. Final purification was performed using liquid chromatography/mass spectrometry/ UV detection, using Uptisphere C₁₈-TF column. PhD researches have allowed to acquire data, which contribute to analysis of sanitary impact, since nowadays, at international level, there are just few data allowing to establish *Ostreopsis* sp. alert and sanitary security threshold.

Keys words: *Ostreopsis ovata*, ovatoxins, purification, seafood contamination, liquid chromatography / mass spectrometry.