

48613

L110-SEC-R

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

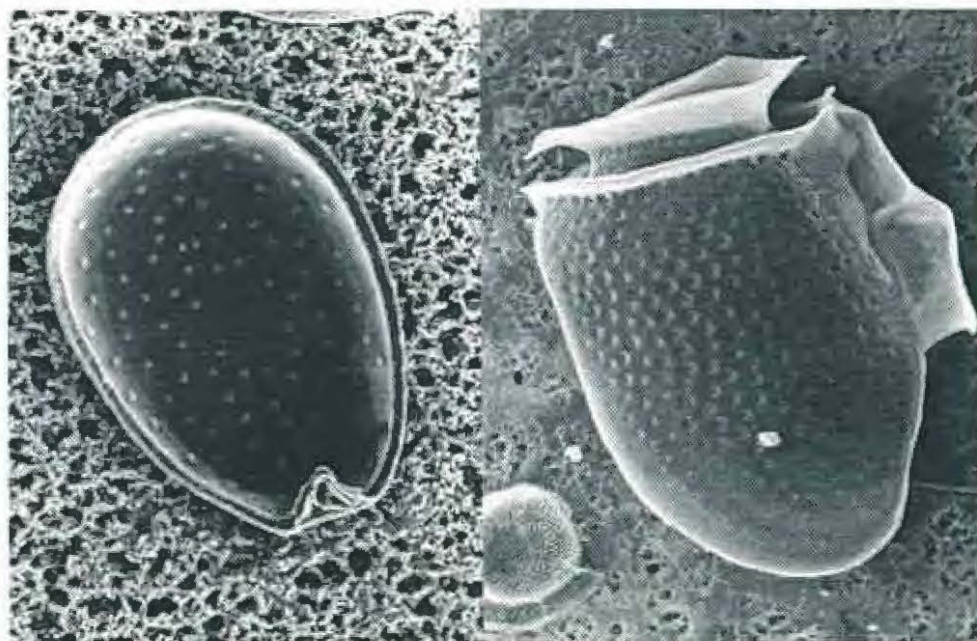
**Recherche d'acide okadaïque (et de ses dérivés) chez les
bactéries associées aux dinoflagellés responsables
d'intoxication diarrhéique, sur les côtes françaises**

par

Véronique SECHET⁽¹⁾, Michael QUILLIAM⁽²⁾ et Patrick LASSUS⁽¹⁾

⁽¹⁾ IFREMER, Laboratoire Phycotoxines et Nuisances, Nantes, France

⁽²⁾ Institute for Marine Biosciences, NRC, Halifax, Canada



IFREMER

R. INT. DEL / 97.06 / NANTES

IFREMER Bibliothèque de BREST



OEL09469

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

**Recherche d'acide okadaïque (et de ses dérivés) chez les
bactéries associées aux dinoflagellés responsables
d'intoxication diarrhéique, sur les côtes françaises**

par

Véronique SECHET⁽¹⁾, Michael QUILLIAM⁽²⁾ et Patrick LASSUS⁽¹⁾

⁽¹⁾ IFREMER, Laboratoire Phycotoxines et Nuisances, Nantes, France

⁽²⁾ Institute for Marine Biosciences, NRC, Halifax, Canada

R. INT. DEL / 97.06 / NANTES

FICHE DOCUMENTAIRE

Type de rapport : Rapport Scientifique et Technique	
Numéro d'identification du rapport : DEL/MP/RST/1997-06 Diffusion : libre Validé par : Pierre MAGGI, secrétaire du comité de lecture des rapports internes de la DEL Adresse électronique : – chemin UNIX : – adresse WWW :	date de publication septembre 1997 nombre de pages 42 bibliographie : Oui illustration(s) : Oui langue du rapport Français
Titre et sous-titre du rapport : Recherche d'acide okadaïque (et de ses dérivés) chez les bactéries associées aux dinoflagellés responsables d'intoxication diarrhéique, sur les côtes françaises. Titre traduit : Screening for okadaic acid (and its derivatives) in bacteria, associated with the dinoflagellates responsible for diarrhetic shellfish poisoning in French coastal waters.	
Auteur(s) principal(aux) : nom, prénom SECHET Véronique ⁽¹⁾ QUILLIAM Michael ⁽²⁾ LASSUS Patrick ⁽¹⁾	Organisme / Direction / Service, laboratoire ⁽¹⁾ IFREMER – DEL/MP, Nantes ⁽²⁾ Conseil National de Recherches Canada. Institut des Biosciences Marines – Halifax
Collaborateur(s) : nom, prénom	Organisme / Direction / Service, laboratoire
Organisme commanditaire : nom développé, sigle, adresse	
Titre du contrat :	n° de contrat Ifremer
Organisme(s) réalisateur(s) : nom(s) développé(s), sigle(s), adresse(s)	
Responsable scientifique :	
Cadre de la recherche : Programme :	Convention :
Projet :	Autres (préciser) :
Campagne océanographique : (nom de campagne, année, nom du navire)	

FICHE DOCUMENTAIRE

Résumé :

L'hypothèse de la toxinogénèse bactérienne autonome dans le cadre des efflorescences marines toxiques de type DSP a été examinée. 18 souches bactériennes isolées à partir de culture de *Prorocentrum lima* et 12 souches obtenues à partir de prélèvements dans le milieu marin de *Dinophysis sacculus* (Baie de Vilaine) et de *D. acuminata* (Concarneau) ont été cultivées en milieu liquide, milieu de Shiba, pauvre en phosphore inorganique. La nouvelle espèce de bactérie présumée toxique, *Roseobacter algicola*, isolée préalablement à partir de *P. lima*, au laboratoire "Phycotoxines et Nuisances", a également été testée.

Après extraction méthanolique et prépurification sur cartouches de silice, les résidus ont été estérifiés par le 9-antryldiazométhane afin d'être dosés par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) avec détection fluorimétrique. Aucune trace d'esters anthracènes d'AO ou de DTX-1 n'a été détectée dans les extraits de cultures bactériennes. Par contre un contaminant dont le pic d'éluion était superposé à celui du standard d'AO était présent dans tous nos échantillons. Ce composé, non toxique, que l'on retrouvait chez les bactéries témoins *Roseobacter litoralis* et *R. denitrificans*, était détecté en quantité importante dans les extraits de *R. algicola*.

L'absence des polyethers toxiques de type DSP dans les cultures de *R. algicola* a été vérifiée par les analyses en LC/MS effectuée par le Dr. Quilliam du Conseil National de Recherches du Canada.

Abstract :

We investigated the hypothesis of DSP autonomous bacterial toxigenesis during harmful algal blooms. 18 stains of bacteria isolated from cultures of *Prorocentrum lima* and 12 strains isolated from samples of *Dinophysis sacculus* (Vilaine bay) and *D. acuminata* (Concarneau) were grown in Shiba liquid medium, under phosphorus-limited conditions. The new species of bacterium, the putatively-toxic *Roseobacter algicola*, previously isolated from *P. lima* in the laboratory "Phycotoxins and Harmful Organisms" was also tested for DSP toxins.

After methanolic extraction and first step purification on silica cartridges, the residues were esterified with 9-anthryldiazomethane for fluorometric HPLC analyses. None of the bacterial cultures contained traces of OA and DTX-1. But an overlapping contaminant to the standard of OA was detected in all the samples, as well as in the bacterial references *Roseobacter litoralis* et *R. denitrificans*. This non toxic compound was present in large amount in the cultures of *Roseobacter algicola*.

The LC/MS analyses, conducted by Dr. Quilliam from the Canadian National Research Council, further verified that no toxic polyether toxins were synthesised by the cultures of *Roseobacter algicola*.

Mots-clés :

Intoxications diarrhéiques par les fruits de mer (IDFM), *Dinophysis sacculus*, *Dinophysis acuminata*, *Prorocentrum lima*, bactéries associées, *Roseobacter algicola*, CLHP, LC/MS.

Keywords :

DSP (Diarrhetic Shellfish Poisoning), *Dinophysis sacculus*, *Dinophysis acuminata*, *Prorocentrum lima*, associated bacteria, *Roseobacter algicola*, HPLC, LC/MS.

Commentaire :

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier nos collègues des laboratoires DEL côtiers de Concarneau et de la Trinité-sur-Mer grâce auxquels les prélèvements de Dinophysis ont pu être effectués.

Nous remercions également Pierre Masselin (DEL/PN) pour son assistance technique et Michelle Vrignaud pour la mise en page du rapport.

Sommaire

INTRODUCTION	6
I.- LES INTOXICATIONS DIARRHEIQUES	9
1. Structures moléculaires des toxines diarrhéiques	9
1.1. Acide okadaïque (OA) et dérivés (DTXn)	9
1.2. Pecténotoxines (PTXn)	11
1.3. Yessotoxines (YTXn)	11
2. Mode d'action des toxines diarrhéiques	11
2.1. Acide okadaïque et dérivés	11
2.2. Pecténotoxines et yessotoxines	16
3. Origines biogénétiques des toxines diarrhéiques	16
II.- MATERIELS ET METHODES	18
1. Cultures de <i>Prorocentrum lima</i>	18
2. Prélèvements d'échantillons naturels de <i>Dinophysis acuminata</i>	18
3. Isolement et culture sur milieux gélosés des bactéries associées à <i>Prorocentrum lima</i> et à <i>Dinophysis acuminata</i>	18
4. Extraction des cultures pour les tests souris	19
5. Extraction et purification des cultures pour l'analyse chimique.....	19
6. Dosage en chromatographie liquide à haute performance avec détection fluorimétrique de l'acide okadaïque et de ses dérivés.....	19
7. Expertise par dosage en spectrométrie de masse et chromatographie liquide (LC/MS.MS) de l'acide okadaïque et de ses dérivés	23
III.- RESULTATS ET DISCUSSION	23
IV.- CONCLUSION ET PERSPECTIVES	33
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	33

INTRODUCTION

La présence de cas de toxicité de type DSP (Diarrhetic Shellfish Poisoning) ou PSP (Paralytic Shellfish Poisoning) par les mollusques en l'absence de dinoflagellés dans le milieu naturel a conduit à des recherches sur l'influence des interactions procaryotes–algues unicellulaires, sur la dynamique des efflorescences à caractère toxique et la participation des bactéries dans la biosynthèse des "phycotoxines".

Les interactions bactéries–dinoflagellés restent un sujet relativement peu exploré par rapport à d'autres domaines de recherche sur la dynamique des efflorescences marines toxiques. Il est étonnant que les relations entre algues et bactéries associées n'aient pas reçu plus d'attention, vu les échanges importants entre ces deux compartiments trophiques au travers de la "boucle microbienne" (Azam *et al.*, 1983).

Les algues représentent la source principale de matière organique dissoute pour les bactéries hétérotrophes dans les zones eutrophes océaniques (Cole *et al.*, 1988 ; Painchaud & Therriault, 1989, Fuhrman, 1992). Les algues unicellulaires libèrent pendant leur croissance une grande partie des métabolites de la photosynthèse qui constituent la source principale de carbone pour les bactéries marines (Hagström *et al.*, 1979). La dégradation de la matière organique par les bactéries aboutit à la minéralisation qui fournit aux algues une quantité importante de sels nutritifs (Bloesch *et al.*, 1977). Elles fournissent également des vitamines (Raymont, 1963 ; Haines & Guillard, 1974). Une véritable symbiose existe donc entre les cellules phytoplanctoniques et les cellules bactériennes (Bell *et al.*, 1974 ; Azam & Hodson, 1981 ; Cole *et al.*, 1988). L'abondance des bactéries est généralement corrélée positivement avec la concentration algale (Kjelleberg *et al.*, 1993).

Les variations qualitatives et quantitatives de la masse de matière organique disponible au cours d'une efflorescence marine (Fuhrman *et al.*, 1980), n'entraînent pas forcément une évolution spatiale et temporelle corrélée avec la flore microbienne associée. En effet, les interactions procaryotes–dinoflagellés n'impliquent pas seulement des relations trophiques mais font également intervenir des processus d'inhibition et de stimulation (Berland *et al.*, 1974 ; Delucca *et al.*, 1978 ; Trick *et al.*, 1984).

Si l'on considère la relation spatiale des bactéries et des cellules algales, plusieurs situations sont possibles. Les bactéries peuvent être intracellulaires (Silva, 1978, 1982 ; Silva & Franca, 1985 ; Kodama *et al.*, 1988, 1989, Ogata *et al.*, 1990) ou extracellulaires (Fuhrman & Azam, 1982 ; Fukami *et al.*, 1981 ; Albright *et al.*, 1986 ; Tosteson *et al.*, 1989 ; Azam *et al.* 1992 ; Rausch de Traubenberg, 1993). Les bactéries extracellulaires peuvent être fixées sur les cellules algales ou libres dans la phycosphère, qui est une zone d'influence entre l'algue et la bactérie (Bell & Mitchell, 1972). Cette proximité spatiale permet à l'algue un certain degré de contrôle sur le nombre ou la diversité des bactéries associées via des mécanismes faisant intervenir des antibiotiques (Trick *et al.*, 1984), la sécrétion de radicaux hydroxyl toxiques pour les bactéries (Oda *et al.*, 1992).

Les bactéries produisent également des substances bioactives qui influent sur le métabolisme de l'algue. Un exemple intéressant est la découverte récente de deux composés synthétisés par les bactéries qui inhibent la fusion cellulaire (et donc par conséquent la formation de kystes) chez *Alexandrium catenella* (Sawayama *et al.*, 1989, 1991, 1993).

Les bactéries associées peuvent avoir une action stimulatrice ou inhibitrice sur la croissance du dinoflagellé, suivant le développement de l'efflorescence (Fukami *et al.*, 1991). Romalde *et al.*, (1990) ont déterminé la composition qualitative de la flore bactérienne associée aux efflorescences de *Gymnodinium catenatum* et *Mesodinium rubrum* ; la densité bactérienne et la diversité spécifique étaient toujours très basses en début de développement et augmentaient radicalement par la suite.

S'il est indiscutable que les interactions procaryotes–algues influencent la dynamique des efflorescences toxiques à des niveaux très variés, la participation des bactéries dans la biosynthèse des phycotoxines est une hypothèse beaucoup plus contestée, en raison de l'observation très souvent indirecte de la toxinogenèse bactérienne, de la non confirmation des résultats et enfin de certains résultats contredisant cette hypothèse (Hu *et al.*, 1993 ; Zhou & Fritz, 1993 ; Yasumoto & Murata, 1993).

Une éventuelle production de phycotoxines par les procaryotes requiert cependant notre attention étant donné les répercussions énormes que pourrait avoir ce phénomène dans des domaines allant de l'écologie des efflorescences marines à l'aquaculture et la santé publique.

De plus, une analyse de la littérature nous fournit des arguments décisifs pour la poursuite des travaux sur la production de phycotoxines par les procaryotes :

1*) la potentialité chez des organismes phylogénétiquement éloignés d'élaborer les mêmes toxines (Rausch de Traubenberg & Lassus, 1991) ;

2*) les importantes variations intraspécifiques de toxicité chez plusieurs espèces de microalgues (Ogata *et al.*, 1987 ; Tosteson *et al.*, 1989 ; Bomber *et al.*, 1989 ; Lee *et al.*, 1989 ; Ikawa *et al.*, 1989 ; Séchet, 1990) ;

3*) la présence de phénomènes toxiques en l'absence d'algues toxiques (Lee *et al.*, 1989 ; Ogata *et al.*, 1989 ; Karunasagar *et al.*, 1989 ; Kodama *et al.*, 1990, Marcaillou–Le Baut & Masselin, 1990) ;

4*) et la production de composés analogues aux phycotoxines par les bactéries présentes dans des organismes précédemment considérés comme la source de toxines (Simidu *et al.*, 1987 ; Yotsu *et al.*, 1987 ; Hwang *et al.*, 1989 ; Yasumoto & Murata, 1990 ; Tamplin, 1990).

La définition du rôle des procaryotes dans les phénomènes de toxicité associés aux efflorescences marines doit répondre aux questions suivantes :

Existe-t-il une toxinogenèse procaryotique autonome dans le cadre des efflorescences phytoplanctoniques marines ?

Par quels mécanismes l'interaction avec les procaryotes influence-t-elle la toxicité algale ?

Quelle est la spécificité de la relation procaryote–algue ?

Quelle est la nature spatio-temporelle de cette interaction ?

Nous nous limiterons dans cette étude préalable au problème de la toxinogenèse bactérienne autonome. Si cette dernière peut être démontrée, des recherches ultérieures seront alors menées sur les autres points.

Deux séries de travaux très intéressants ont démontré une synthèse autonome des phycotoxines par des procaryotes : la production de toxines paralytiques (PSP) par une cyanobactérie (Sasner *et al.*, 1984) et la synthèse de toxines paralytiques par une bactérie du genre *Moraxella* associée au dinoflagellé *Alexandrium tamarense* (Kodama *et al.*, 1988, 1989, 1990, Ogata *et al.*, 1990).

La production bactérienne de toxines ne représente cependant qu'une infime fraction de la toxicité du dinoflagellé hôte. Il n'a pas encore été déterminé si cette faible toxicité était due aux conditions de cultures, ou à l'isolement de la bactérie, privée de l'action stimulatrice possible de son association avec les cellules algales. Kodama *et al.*, (1990), ont cependant mesuré une production toxinique bactérienne plus élevée avec des milieux de cultures pauvres en matière organique.

La potentialité de ces micro-organismes, à induire les mêmes effets toxiques que les dinoflagellés auxquels ils sont associés, suggère indirectement une participation des procaryotes dans la production de toxines. Dès 1954, Bein a mis en évidence le pouvoir ichtyotoxique d'une bactérie isolée d'une efflorescence de *Gymnodinium breve*, le dinoflagellé responsable de mortalité massive de poissons sur les côtes de Floride (Baden *et al.*, 1981). Des résultats contradictoires furent obtenus avec des bactéries de la même espèce isolées à la suite d'une efflorescence de *G. breve* (Ray & Wilson, 1957).

Silva & Sousa (1981), par des expériences d'inoculations croisées ont pu montrer qu'un clone de *Pseudomonas sp.* isolé d'une culture toxique d'*Alexandrium tamarense* pouvait induire la toxicité d'autres dinoflagellés préalablement non toxiques. Ces résultats n'ont pas été encore confirmés et ne sont absolument pas extrapolables au milieu naturel, dans l'état actuel des connaissances. Mais il est à souligner que l'aptitude des bactéries à devenir des vecteurs de toxicité aurait des conséquences écologiques et toxicologiques majeures si elle existait dans le milieu naturel.

Les bactéries associées pourraient avoir un rôle stimulant sur la production de phycotoxines par les dinoflagellés. La concentration des toxines ciguatériques dans les cultures d'*Ostreopsis lenticularis* est positivement corrélée avec l'abondance d'une bactérie *Nocardia sp.*, elle-même non toxique (Tosteson *et al.*, 1986). Une production de toxines équivalentes dans des cultures axéniques et non axéniques de diverses espèces de dinoflagellés exclut le rôle de bactéries extracellulaires dans la production de toxines (Boczar *et al.*, 1988 ; Bomber *et al.*, 1989), mais n'exclut pas le rôle des bactéries intracellulaires chez les genres étudiés, *Protogonyaulax* (= *Alexandrium*) et *Gambierdiscus*.

Les travaux récents sur la spécificité de la relation algue – bactéries semblent indiquer que plusieurs espèces de bactéries peuvent influencer sur la toxicité d'une même espèce algale, c'est le cas pour la production d'acide domoïque dans les cultures axéniques de *Pseudonitzschia pungens*. A l'inverse, un clone bactérien unique peut stimuler la production de toxines chez plusieurs clones de cette diatomée (Bates *et al.*, 1993). A l'opposé, les travaux de Kodama *et al.*, (1990) et de Doucette et Trick (1995) ont montré que seuls deux clones de bactéries produisent des toxines paralytiques ou présentent une activité de blocage des canaux sodium.

Toutes ces études ont été réalisées en laboratoire mais des expériences récentes menées *in situ* ont donné des résultats radicalement différents : 171 des 481 souches de bactéries isolées au large d'Arctoe, en Ecosse, présentaient une activité inhibitrice des canaux sodium. Des expériences de contamination de moules par les suspensions de ces bactéries toxiques ont permis de détecter une accumulation importante chez les mollusques de toxines inhibitrices des canaux sodium, à un taux voisin à 100 ng équivalent tetrodotoxine par individu (Gallacher & Birkbeck, 1995). Ces résultats soulignent l'importance des recherches *in situ*.

Ce sont en effet des observations directes en mer qui ont conduit originellement les auteurs à s'interroger sur la source de la production des phycotoxines.

Ainsi, la présence d'efflorescences monospécifiques toxiques ou non toxiques a amené Silva à considérer la participation des bactéries dans les phénomènes de toxicité. De même des études *in situ* de phénomènes de toxicité font état de la contamination des mollusques en l'absence d'algues toxiques (Ogata *et al.*, 1987) et de la présence de toxines dans les fractions de tailles inférieures à celles des cellules algales (Kodama *et al.*, 1990, 1993).

Lors de périodes de contaminations par le DSP, en l'absence des dinoflagellés toxiques responsables, une toxicité importante fut mesurée dans les fractions contenant les matières en suspension (vases) et leur flore bactérienne associée (Séchet, 1990). Bien que ces observations ne constituent pas des preuves formelles de la production de toxines par les procaryotes, elles ont cependant permis de poser les hypothèses de recherche.

I - LES INTOXICATIONS DIARRHEIQUES

Les intoxications diarrhéiques par les fruits de mer contenant des phycotoxines ont été décrites pour la première fois au Japon en 1978 (Yasumoto *et al.*, 1978).

Des cas d'intoxications humaines similaires avaient cependant été répertoriés dès le début des années 1960 le long des côtes norvégiennes (Krogh *et al.*, 1985). Nous avons assisté lors de ces vingt dernières années à une augmentation globale de la fréquence, de l'intensité et de la distribution géographique des phénomènes de DSP dans le monde.

En France des intoxications alimentaires chez les consommateurs de moules lors des blooms de *Dinophysis* spp. ont été régulièrement répertoriées en Bretagne sud et en Normandie (Marcaillou-Le Baut *et al.*, 1985 ; Lassus, 1988, Belin *et al.*, 1989).

1. Structures moléculaires des toxines diarrhéiques

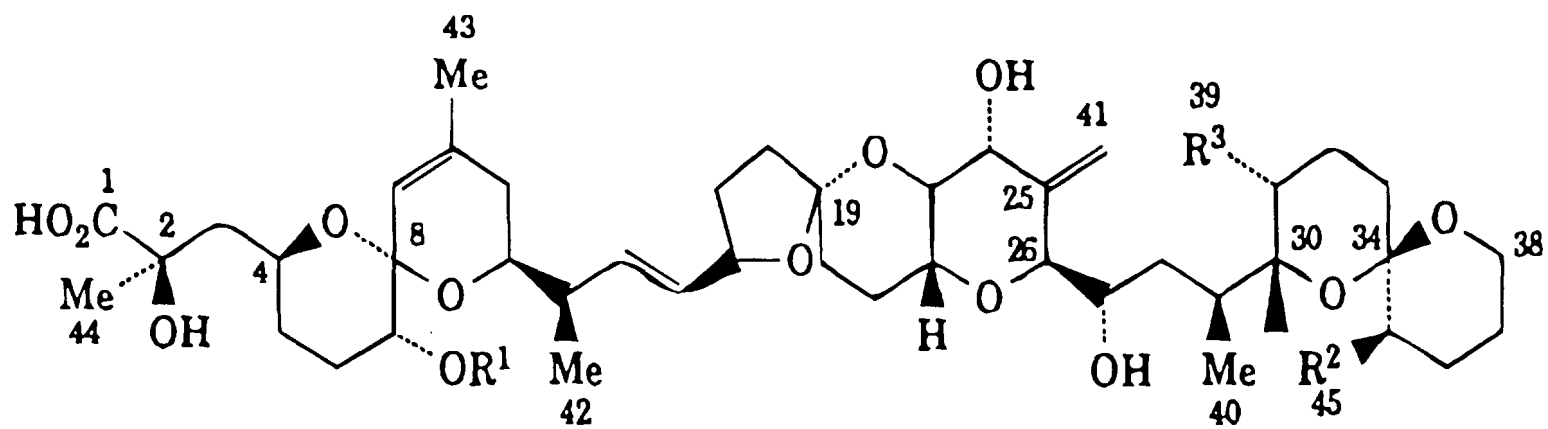
L'acide okadaïque a été isolé des éponges *Halichondria okadae* Kadota de la côte pacifique du Japon, et *H. melanodocia*, de Laufenfels échantillonnées au large de la Floride (Tachibana *et al.*, 1981).

Cette toxine et plusieurs de ses dérivés naturels ont ensuite été identifiés à partir d'une souche tahitienne de *Prorocentrum lima* (Murakami *et al.*, 1982) et de différentes espèces de dinoflagellés du genre *Dinophysis* responsables des intoxications diarrhéiques chez les consommateurs de mollusques contaminés (Murata *et al.*, 1982).

Les toxines polyéthérées impliquées dans les phénomènes de DSP sont divisées en trois groupes selon le squelette moléculaire de base et les groupements fonctionnels.

1.1. Acide okadaïque (OA) et dérivés (DTXn)

L'acide okadaïque OA est un acide monocarboxylique de formule moléculaire, $C_{44}H_{68}O_{13}$ (Fig. 1). Il est constitué d'un squelette de 38 atomes de carbone, de 17 centres asymétriques, de 4 groupements hydroxyl, de 6 groupements méthyle et de 3 types de chaînes oléfiniques. La dinophysistoxine-1, la toxine principale présente dans les moules japonaises contaminées, est un dérivé méthylé de l'AO (DTX-1 = 35-méthyl OA) (Murata *et al.*, 1982).



AO	:	$R^1 = H$	$R^2 = H$	$R^3 = Me$
DTX1	:	$R^1 = H$	$R^2 = Me$	$R^3 = Me$
DTX2	:	$R^1 = H$	$R^2 = Me$	$R^3 = H$
DTX3	:	$R^1 = \text{acyle}$	$R^2 = Me$	$R^3 = Me$

Figure 1 : L'acide okadaïque et ses dérivés

La famille des dinophysistoxine-3 (DTX3 = 7-O- acyle -35- méthyle OA), résulterait de l'acylation de la DTX-1 dans les glandes digestives des coquillages. Ces molécules sont de toxicité variable en fonction du degré d'insaturation de l'acide gras qui se fixe sur la chaîne acyle. Elles n'ont jamais été détectées dans les cellules de *Dinophysis fortii* (Yasumoto *et al.*, 1989).

Une dinophysistoxine-2 a été isolée de moules toxiques irlandaises (Hu *et al.*, 1993). Depuis cette molécule a pu être dosée dans des moules après des efflorescences de *Dinophysis acuta* (Carmody *et al.*, 1996) en Irlande, mais aussi en Espagne (Blanco *et al.*, 1995). Ce composé n'est pas un produit résultant du métabolisme des moules puisqu'il a également été détecté dans des extraits de culture de *Prorocentrum lima*.

Trois diols esters de l'acide okadaïque ont été identifiés dans des extraits de cultures de *Prorocentrum concavum* et de *Prorocentrum lima* (Hu & Marr, 1992). L'examen des concentrations cellulaires de l'AO et des esters dans des cultures de *P. concavum* ont montré que la concentration en AO diminuaient avec le temps, alors que celle des esters augmentait (Hu *et al.*, 1993).

1.2. Pecténotoxines (PTXn)

Les pecténotoxines (PTX) sont des polyéthers lactoniques ou macrolides (Fig. 2). Isolées à partir de *Pactinopecten yessoensis*, elles ont été identifiées comme : PTX1, PTX2, PTX3, PTX4, PTX6, PTX7 (Murata *et al.*, 1986 ; Yasumoto & Murata, 1990). Les structures de base de PTX4 et PTX7 n'ont pas encore été déterminées.

Parmi ces toxines, seule la PTX2 a été détectée dans les cellules de dinoflagellés japonais (Lee *et al.*, 1989). Le groupe méthyle du carbone 43 de la PTX2 subit probablement une série d'oxydation dans les glandes digestives des coquillages et donne ainsi naissance aux autres PTXn (Yasumoto *et al.*, 1989).

1.3. Yessotoxines (YTXn)

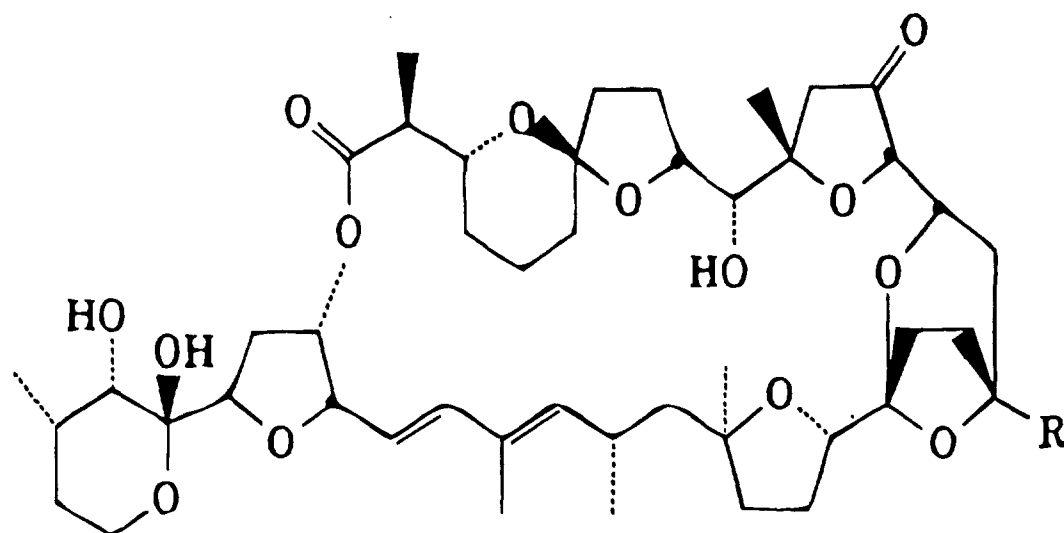
Ce groupe de polyéthers disulfatés comprend la yessotoxine (Fig. 3), de formule moléculaire, $C_{55}H_{80}O_{21}S_2Na_2$, et la 45-OH-YTX (Murata *et al.*, 1987). Ces composés présentent une configuration moléculaire proche des brevetoxines qu'elles soient de type 1 (Fig. 3 A) ou de type 2 (Fig. 3 B). Ces toxines ont été isolées de *Pactinopecten yessoensis* et de moules prélevées à Vikane, Norvège (Séchet, 1990). Elles n'ont jamais été détectées chez les différentes espèces de dinoflagellés échantillonnées lors des épisodes de contamination des coquillages.

2. Mode d'action

2.1. Acide okadaïque et dérivés

L'acide okadaïque est la toxine principale détectée dans les moules sur les côtes françaises. La synthèse totale de cette toxine fut réalisée en 1986 (Isobe *et al.*, 1986).

Figure 2 : Les pecténotoxines



pectenotoxine-1	(PTX1) :	R = CH ₂ OH
pectenotoxine-2	(PTX2) :	R = CH ₃
pectenotoxine-3	(PTX3) :	R = CHO
pectenotoxine-6	(PTX6) :	R = COOH

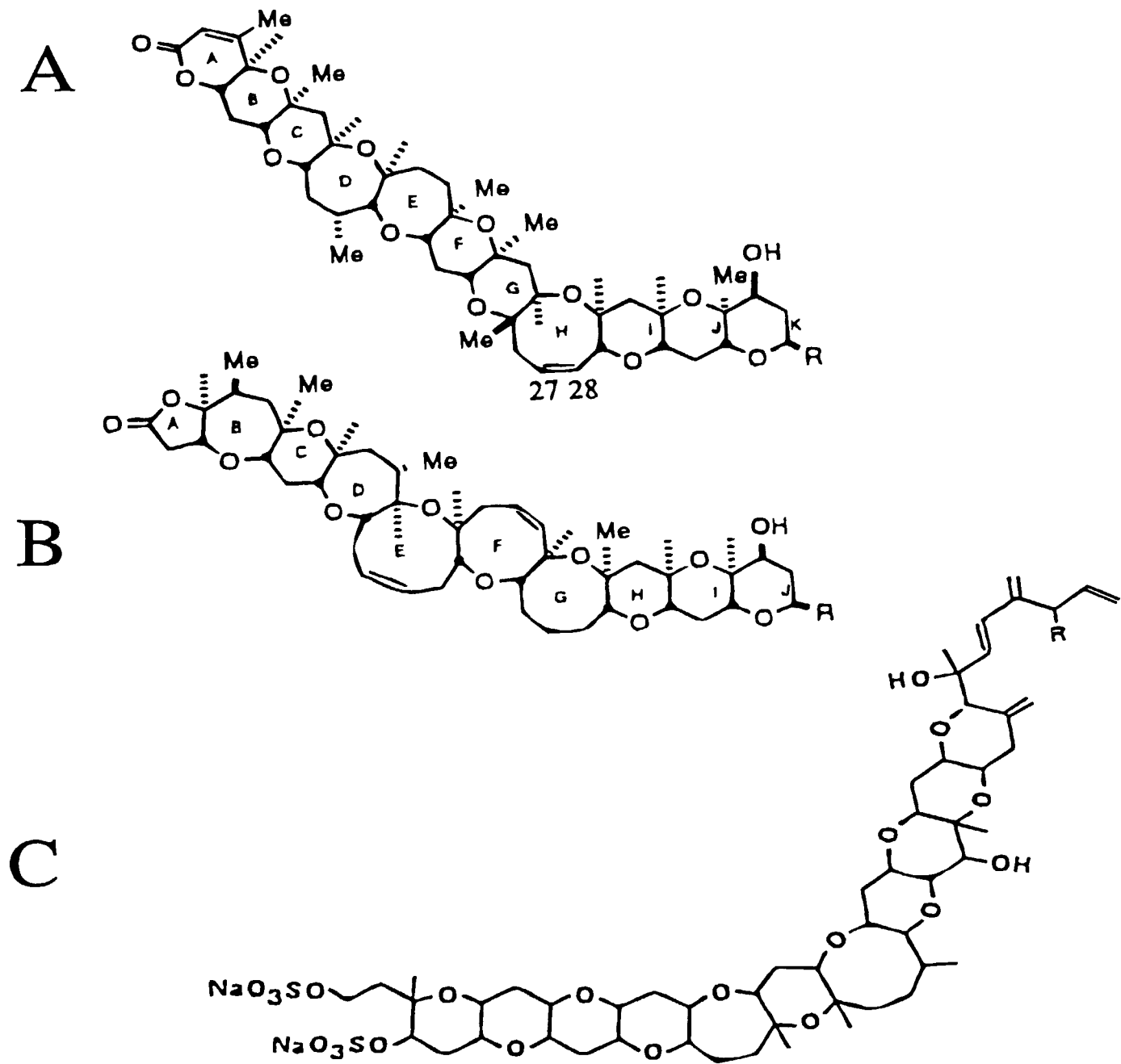


Figure 3 : Formules développées des brevétotoxines (A, B) et de la yéssotoxine (C).

Inhibition des protéines phosphatases

Depuis que la propriété d'inhibition des protéines phosphatases de l'AO a été découverte (Takai *et al.*, 1987), de nombreuses études biochimiques et pharmacologiques, utilisant l'OA comme indice des activités de phosphorylation/déphosphorylation ont été réalisées.

Les activités biologiques de l'acide okadaïque sont attribuées principalement à son effet inhibiteur des protéines phosphatases, affectant ainsi divers processus intracellulaires comme le métabolisme, la contractilité, la transcription génique, le maintien de la structure cytoplasmique, la transduction du signal, la division cellulaire ou le fonctionnement des canaux ioniques.

Dans les quatre groupes de protéines phosphatases (PPs) de la classification de Cohen, l'AO inhibe la PP2A à la concentration la plus faible ($k_i = 30\text{pM}$), puis la PP1 et enfin la PP2B à la concentration la plus élevée, il ne semble pas agir sur la PP2C.

Cytotoxicité

L'acide okadaïque est un cytoinhibiteur très puissant et son délai d'action est de 30 minutes à quelques heures (Amzil *et al.*, 1992). Il entraîne un blocage de la mitose dû à l'inhibition d'une protéine phosphatase 2A qui est impliquée dans la transition de la métaphase à l'anaphase (Vandre & Wills, 1992).

Micro-injecté dans l'ovocyte d'*Asterias rubens*, il provoque la reprise de la méiose ou maturation (50 % de maturation à $20\ \mu\text{M}$). Comme la 1-méthyladénine, l'hormone naturelle de la maturation, l'AO provoque l'apparition dans le cytoplasme du "M-Phase Promoting Factor" (M.P.F.) et la rupture de l'enveloppe nucléaire. La micro-injection de phosphoprotéine phosphatases 1 et 2A inhibe la maturation déclenchée par l'hormone. Cet effet est bloqué par la micro-injection conjointe d'acide okadaïque. L'augmentation du niveau de phosphorylation de certaines protéines spécifiques semble donc nécessaire et suffisante pour déclencher la transition G_2/M dans l'ovocyte d'étoile de mer (Pondaven *et al.*, 1989).

D'autres changements morphologiques induits par l'AO ont été observés sur différentes lignées cellulaires (Hamano *et al.*, 1985 ; Lucocq *et al.*, 1991). Ces modifications sont dues aux effets de l'AO sur le cytosquelette (les microtubules et les fibres notamment).

Ces modifications morphologiques cellulaires particulièrement prononcées sur les cellules de la lignée KB ont été exploitées pour développer un test de détection biologique de l'AO et de ses dérivés (Amzil *et al.*, 1992). Cette détection est basée sur la détermination de la concentration minimale active (CMA) qui induit un changement morphologique de la cellule. Cette méthode est spécifique des composés inhibiteurs des protéines phosphatases (AO, Calyculine). La limite de détection équivaut à 0,05 Unités Souris (1 U.S. = $4\ \mu\text{g}$ d'AO), (Yasumoto, 1981).

Effets diarrhéiques et cardiotoxiques

L'AO et la DTX-1 induisent une accumulation de fluide dans l'intestin grêle des souris en agissant sur la perméabilité vasculaire (Terao *et al.*, 1993). Les études histopathologiques ont montré une action similaire de l'AO, de la DTX-1 et de la DTX3 sur le tractus digestif des souris ou des rats.

Dans les quinze minutes suivant l'administration par voie orale des toxines, la portion supérieure de l'intestin grêle se détend, une partie des microvilli des cellules épithéliales absorbatives disparaissent et une portion du cytoplasme peut former d'éventuelles protubérances dans le lumen de l'intestin. Puis on assiste à une destruction de presque toutes

les cellules qui bordent les villi et de la desquamation de ces cellules de la *lamina propria*. La régénération des parties endommagées de l'intestin grêle intervient dans les 24 heures.

Ainsi la muqueuse du tractus digestif peut être un tissu cible pour l'AO (Suganuma *et al.*, 1992). Des effets importants sont obtenus principalement dans l'estomac glandulaire et le petit intestin suggérant une spécificité régionale dans le tractus gastrointestinal pour la promotion de la division cellulaire et des effets cytotoxiques (Yuasa *et al.*, 1994).

L'AO a également une propriété contracturante sur les muscles lisses, cette action intervenant dans le déclenchement des diarrhées, des douleurs abdominales et des vomissements. Cette action contracturante a été observée avec l'aorte de lapin ainsi qu'au niveau du muscle lisse de l'intestin grêle du cobaye (Shibata *et al.*, 1990).

L'AO provoque un effet inotrope positif sur le muscle cardiaque à des concentrations supérieures ou égales à 10 μM , accompagné d'une prolongation de la durée du potentiel d'action (Kodama *et al.*, 1986). Cet effet contracturant est dû à une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire par l'activation des canaux Ca^{2+} . L'augmentation du courant calcique est attribuée soit à une augmentation de la vitesse du courant (Mironov & Lux, 1991), soit à une augmentation de la probabilité d'ouverture (Wang *et al.*, 1993) ou de la disponibilité du canal (Neumann *et al.*, 1993).

L'AO potentialise les courants Ca^{2+} au niveau du muscle aortique (Ozaki & Haraki, 1989), du muscle cardiaque (Neumann *et al.*, 1993), de myocytes isolés (Hescheler *et al.*, 1988), dans le cas de neurones (Mironov & Lux, 1991), de cellules pituitaires (Chiavaroli *et al.*, 1992) et également pour des biomembranes lipidiques avec canaux calciques intégrés (Wang *et al.*, 1993).

Activité de promotion tumorale

L'AO et la DTX-1 sont des promoteurs tumoraux. Au contraire des esters de phorbol, du type 12-O-tetra decanoyl-phorbol-13 acetate (TPA) qui activent les protéines kinase C, l'AO inhibe la déphosphorylation des protéines, principalement au niveau des résidus serine et thréonine (Fujiki *et al.*, 1991).

Ces deux toxines peuvent entraîner l'accumulation des protéines phosphorylées, parmi lesquelles certaines sont impliquées dans la promotion tumorale (Sassa *et al.*, 1989). Les dernières études tendent à montrer que les promoteurs de type AO ou TPA sont en réalité des inducteurs de TNF- α (Komori *et al.*, 1993). Cette molécule agirait comme un promoteur tumoral endogène et pourrait donc être considérée comme un médiateur central de la promotion (Fujiki & Suganuma, 1994). De plus l'AO, en augmentant l'activité du facteur de transcription AP1 et de NF- κB , induirait l'expression du TNF- α (Hurme & Matikainen, 1993).

Les risques de promotion tumorale n'ont pas encore été réellement évalués chez les consommateurs de coquillages contaminés. Ces risques seraient évidemment plus sévères dans le cas d'intoxications chroniques.

Relation structure-activité

La relation structure-activité de l'AO a été étudiée par différents groupes de recherches. La modification du groupement carboxylique C1 ou du 24-OH réduit de façon importante l'activité de la molécule. La présence du groupement carboxylique libre de l'AO est nécessaire pour son activité inhibitrice vis-à-vis des protéines phosphatases (Hu & Marr, 1992).

D'autres changements structurels (i.e. : l'hydrogénation en C14 ou en C15 ou la réduction en C2) qui affectent la conformation pseudocyclique de la molécule formée par

l'interaction entre le C1 du groupement carboxyle et le C24 de la fonction hydroxyle, réduisent également l'activité de la molécule d'AO.

2.2. Pecténotoxines et yessotoxines

Les pecténotoxines et les yessotoxines ont été regroupées dans la même catégorie des toxines diarrhéiques que l'acide okadaïque et les dinophysistoxines. Elles ont cependant des activités biologiques différentes puisque les pecténotoxines et les yessotoxines ne sont pas diarrhéiques.

Des recherches histopathologiques ont révélé que les PTX1 et PTX2 sont hépatotoxiques. Elles induisent des nécroses rapides des hépatocytes suivies de l'apparition d'ascites et de l'accumulation de fluide au niveau du thorax et des cavités abdominales. L'action pathologique de la PTX1 ressemble à celle de la phalloïdine (Terao *et al.*, 1986).

Les yessotoxines peuvent causer des dommages sur le muscle cardiaque (Yasumoto, comm. personnelle).

3. Origines biogénétiques

C'est sur la côte pacifique du Japon qu'une espèce de dinoflagellés du genre *Dinophysis* a été identifiée pour la première fois comme l'organisme responsable des intoxications diarrhéiques (Yasumoto *et al.*, 1980). En 1982 Murata *et al.* déterminent la structure moléculaire de la dinophysistoxine-1, à partir de glandes digestives de moules contaminées par *Dinophysis fortii*.

Parallèlement, dans les pays européens certaines espèces de *Dinophysis* ou de *Prorocentrum* sont reconnues responsables d'intoxication de type DSP [Kat, 1979, 1983 ; Andresen Leitao (M. de Paz) *et al.*, 1983].

Sur les côtes françaises *Dinophysis acuminata* fut d'abord identifié comme l'espèce toxique (Marcaillou-Le Baut & Lassus, 1984), puis *D. sacculus*, la différenciation spécifique lors des contaminations n'étant pas très aisée (Lassus, P., 1988). Les essais de mise en culture de cet organisme se sont malheureusement révélés négatifs. L'obtention d'échantillons monospécifiques par filtrations successives à partir d'échantillons d'eau de mer contenant des *Dinophysis*, est difficile à obtenir en raison du faible nombre de cellules et de la présence d'autres espèces microalgales.

Il a fallu attendre de disposer d'une méthode de détection des toxines diarrhéiques très sensible pour étudier la composition toxinique des cellules phytoplanctoniques. Ceci a été réalisé en 1989, par chromatographie liquide à haute performance avec détection fluorimétrique (Lee *et al.*, 1989). L'AO a été identifié comme la seule toxine diarrhéique présente dans les cellules de *Dinophysis cf. acuminata*, prélevées dans le milieu naturel à Antifer (Normandie).

De nombreuses espèces de dinoflagellés suspectées toxiques ont été analysées pour leur composition toxinique. Des variations intra et inter spécifiques, saisonnières et géographiques ont été mesurées (Tableau 1).

Pour une même espèce et un même site d'échantillonnage, les teneurs en toxines des cellules fluctuent de façon importante dans des intervalles de temps très courts (Masselin *et al.*, 1992).

Espèce	Lieu	Date	Nombre de cellules	DTX-1 pg/cell.
<i>Dinophysis fortii</i>	Mutsu bay, Aomori	10/07/1989	333	34,70
<i>Dinophysis fortii</i>	Mutsu bay, Aomori	15/07/1989	100	46,36
<i>Dinophysis fortii</i>	Mutsu bay, Aomori	21/07/1989	89	54,86
<i>Dinophysis fortii</i>	Iwaizaki, Miyagi	20/06/1989	333	8,58
<i>Dinophysis fortii</i>	Iwaizaki, Miyagi	22/06/1989	333	12,64
<i>Dinophysis fortii</i>	Iwaizaki, Miyagi	27/07/1989	333	20,06
<i>Dinophysis fortii</i>	Iwaizaki, Miyagi	09/08/1989	333	16,18
<i>Dinophysis fortii</i>	3 miles off-shore	09/08/1989	300	8,02
<i>Dinophysis fortii</i>	Iwaizaki, Miyagi	22/08/1989	333	18,32
<i>Dinophysis fortii</i>	Iwaizaki, Miyagi	05/09/1989	333	7,42
<i>Dinophysis fortii</i>	3 miles off-shore	07/09/1989	111	18,35
<i>Dinophysis mitra</i>	Mutsu bay, Aomori	15/07/1989	100	23,19
<i>Dinophysis mitra</i>	Mutsu bay, Aomori	18/07/1989	100	33,39
<i>Dinophysis mitra</i>	Mutsu bay, Aomori	21/07/1989	50	26,26
<i>Dinophysis mitra</i>	Mutsu bay, Aomori	24/07/1989	100	17,52

Tableau 1 : Variations régionales et saisonnières de la teneur en AO et DTX-1 chez *D. fortii* et *D. mitra* sur les côtes japonaises (Séchet, 1990).

Prorocentrum lima est un organisme benthique souvent associé à la flore responsable des intoxications du genre ciguatera (Yasumoto *et al.*, 1980 ; Murakami *et al.*, 1982). Il prolifère principalement dans les zones tropicales mais a été également observé au large de Vigo, Espagne et en France, à l'île de Sein (Piclet, comm. pers.) et a été récemment identifié comme responsable des contaminations des coquillages sur la côte ouest canadienne.

La toxine principale détectée chez cette espèce est tantôt l'acide okadaïque (Tachibana *et al.*, 1981 ; Murata *et al.*, 1982), tantôt la DTX-1 pour la souche PL4V, Vigo.

Mais plusieurs dérivés de l'AO ont également été isolés de cette algue ; la DTX-1, la DTX2 (Hu *et al.*, 1993) ; l'acide desoxy-7 okadaïque (Yasumoto *et al.*, 1989) ; deux diols esters d'acide okadaïque (Hu & Marr, 1992), enfin un polyéther macrolide comportant un cycle azoté, le prorocentrolide (Torigoe *et al.*, 1988).

Contrairement aux *Dinophysis*, *P. lima* est facilement cultivé et maintenu toxique en laboratoire (Tomas & Baden, 1993).

II. – MATERIELS ET METHODES

1. Cultures de *Prorocentrum lima*

Deux souches pures de *Prorocentrum lima*, PL2V et PL4V, isolées au large de Vigo, côte Nord-Ouest de l'Espagne par le Dr Bravo (Instituto Español de Oceanografía, Vigo) ont été cultivées sur milieu "K" (Keller & Guillard, 1985) à la température de 18° C. L'intensité lumineuse était de 60 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ selon une photopériode de 16/8 (J/N).

2. Prélèvements d'échantillons naturels de *Dinophysis sp.*

Des prélèvements phytoplanctoniques ont été effectués au filet en baie de Vilaine et en baie de Concarneau lors des mois de juin et de juillet 1994. Les cellules de *Dinophysis sacculus* et *acuminata* ont été isolées sous microscope placé sous une hotte stérile à flux laminaire puis rincées plusieurs fois dans de l'eau de mer stérile avant d'être ensemencées sur boîtes de Marine Agar (Difco 2216) et d'eau de mer gélosée.

3. Isolement et culture sur milieux gélosés des bactéries associées à *Prorocentrum lima* et à *Dinophysis acuminata*

Les souches bactériennes isolées, sur Marine Agar ou eau de mer gélosée, à partir des cultures de *P. lima* et des échantillons de *Dinophysis* ont été ensemencées dans 500 ml de milieu liquide, Marine Broth (Difco 2216) ou milieu de Shiba (Fig. 4) et cultivées pendant 3 jours à 22°C.

NaCl	20.0 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	5.0 g
Na ₂ SO ₄	2.0 g
KCl	0.5 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.5 g
NaHCO ₃	0.2 g
Ferric citrate	0.1 g
Yeast extract	2.0 g
Polypeptone	1.0 g
Casamino acids	1.0 g
Glycerol	1.0 ml
Water	1.0 litre

≠ pH ajusté à 7.5 avant l' autoclavage

Figure 4 : Composition du milieu de croissance pour *Roseobacter*.

Etude préliminaire du profil phénotypique

La détermination des caractères physiologiques et biochimiques, dont le métabolisme respiratoire, les exo-enzymes, le profil nutritionnel, la résistance aux inhibiteurs a été réalisée par des tests traditionnels et des galeries d'identification rapide (API, Bio Mérieux).

Les quatre souches présumées toxigènes isolées dans le laboratoire "Phycotoxines et Nuisances" par Catherine Rausch de Traubenberg (Rausch de Traubenberg, 1993), à partir des cultures de *P. lima*, ont été également cultivées en milieu liquide et extraites pour l'analyse des toxines diarrhéiques (Tableau 2).

4. Extraction des cultures pour les tests-souris

Les cultures bactériennes ont été centrifugées (Fig. 5) à 5000 tpm pendant 27 min. Les culots ont été extraits au méthanol puis au méthanol 80 % avant d'être lavés à l'hexane puis extraits de nouveau au dichlorométhane. Toutes les phases; méthanol/eau (phase 1), dichlorométhane (phase 2), hexane (phase 3), ont été évaporées et reprises dans une solution 1% Tween 60 pour être injectées intrapéritonalement aux souris. Les toxines DSP ont été extraites des surnageants par le dichlorométhane, cette phase 4, après évaporation a également été reprise dans une solution à 1% de Tween 60.

5. Extraction et purification des cultures bactériennes pour l'analyse chimique

Après incubation, les cultures ont été centrifugées à 5 000 tpm à la température de 0 °C pendant 27 min. L'AO et la DTX-1 ont été extraits du surnageant par le dichlorométhane. Les culots bactériens ont été repris dans du méthanol, soniqués (50 % duty cycle, Vibra cell, Sonics & Materials INC, USA) pendant 15 min, puis centrifugés pendant 27 minutes. Les culots ont été réextraits deux fois de suite, les fractions recueillies ont été lavées à l'hexane puis évaporées.

La prépurification des extraits a été faite sur Sep-Pak de silice (chloroforme, chloroforme / méthanol 9:1, v/v).

6. Dosage en chromatographie liquide à haute performance avec détection fluorimétrique de l'acide okadaïque et de ses dérivés

Appareillage

Modèle d'échantillonneur automatique HP-1050, pompe Merck L 6200A, spectrofluorimètre Merck F-1050, logiciel HPLC chemstation 2D.

Le dosage chimique de l'AO et de la DTX-1 a été réalisé en chromatographie liquide à haute performance avec détection fluorimétrique, selon la méthode mise au point par Lee (Lee *et al.*, 1987 ; Séchet, 1990). Les toxines des acides gras polyéthérés, sont estérifiées par un réactif fluorescent, le 9-anthryldiazométhane (ADAM).

Les échantillons des différentes fractions à analyser, dinoflagellés ou micro-organismes associés, ont été extraits dans du méthanol, puis prépurifiés sur Sep-pak silice (Waters). Les résidus ont été repris dans du chloroforme et déposés sur cartouche Sep-pak au gel de silice. Après rinçage au chloroforme, les toxines ont été éluées par un mélange chloroforme/ méthanol 9:1. Evaporé sous courant d'azote, le résidu est estérifié dans une solution méthanolique à 0,2 % d'ADAM. La réaction d'estérification s'effectue en une heure, à l'obscurité, à 25°C. L'extrait estérifié est purifié sur cartouche Sep-pak, les solvants successifs sont hexane / chloroforme 1:1, v/v, chloroforme, chloroforme / méthanol 9:1, v/v (Fig. 5).

	Morphologie	Caractères cultureux		Enzymes		Métabolisme respiratoire	Croissance			Sensibilité aux antibiotiques
		Colonies sur MA	Bouillon (MB)	Présence	Absence		Températures (en °C)	Salinité	Oxygène	
Gf4	Bacille long et fin, 0,5 x 3-5 µm, 1 x L Gram négatif Mobile flagelles polaires	Petites (1,5 mm à 6 jours) beiges, lisses, contours réguliers, bombées opaques Pas de pigment diffusible Non luminescente Non envahissante	Trouble uniforme Pas de pigment	Oxydase Catalase Nitrate Réductase Phosphatase Alcaline Gélatinase Amylase (faible)	Agarase Tween estérases (Tween 20 et 80) Uréase Esculinase β-galactosidase Lécithinase Phospholipase Tributyrase Désoxyribonucléase Nitrite réductase Arginine déshydrolyase Lysine et Omithine décarboxylases	Alcalinisant (sur glucose)	4 20 37 Pas à 44	Pas à MNaCl<0,05	Aérobie stricte	<u>Sensible à :</u> Chloramphénicol Erythromycine O/129 <u>Résistant à :</u> Gentamycine Streptomycine Néomycine
Ff2 Ff3 MI4	Bacille court et épais 0,8 à 1,5 - 2 µm, 1 x L Gram négatif Non capsulé Non sporulé Mobile 1 à 2 flagelles sub-polaires	Petites (1,5 mm à 4 jours) beiges, brunissant à la périphérie, contours irréguliers, lisses bombées Pas de pigment diffusible Non luminescente Non envahissante	Trouble uniforme Pas de pigment	Oxydase Catalase Phosphatase Alcaline Amylase (faible) β-galactosidase Gélatinase Esculinase Uréase pour Ff2 uniquement	Agarase Tween estérase (Tween 20 et 80) Lécithinase Phospholipase Tributyrase Désoxyribonucléase Nitrate et nitrite Réductase Arginine déshydrolyase Lysine Décarboxylase	Oxydatif (sur glucose)	20 37 pas à 4 ni 44 Optimum à 25-30	Pas à MNaCl<0,05 Optimum à 20 g.l ⁻¹	Aérobie stricte	<u>Sensible à :</u> Chloramphénicol Erythromycine Kanamycine Novobiocine Pénicilline G Tétracycline Auréomycine <u>Résistant à :</u> Gentamycine

Tableau 2 : Caractères phénotypiques des souches Gf4, MI4, Ff2 et Ff3 (d'après Gauthier & Christen, 1993)

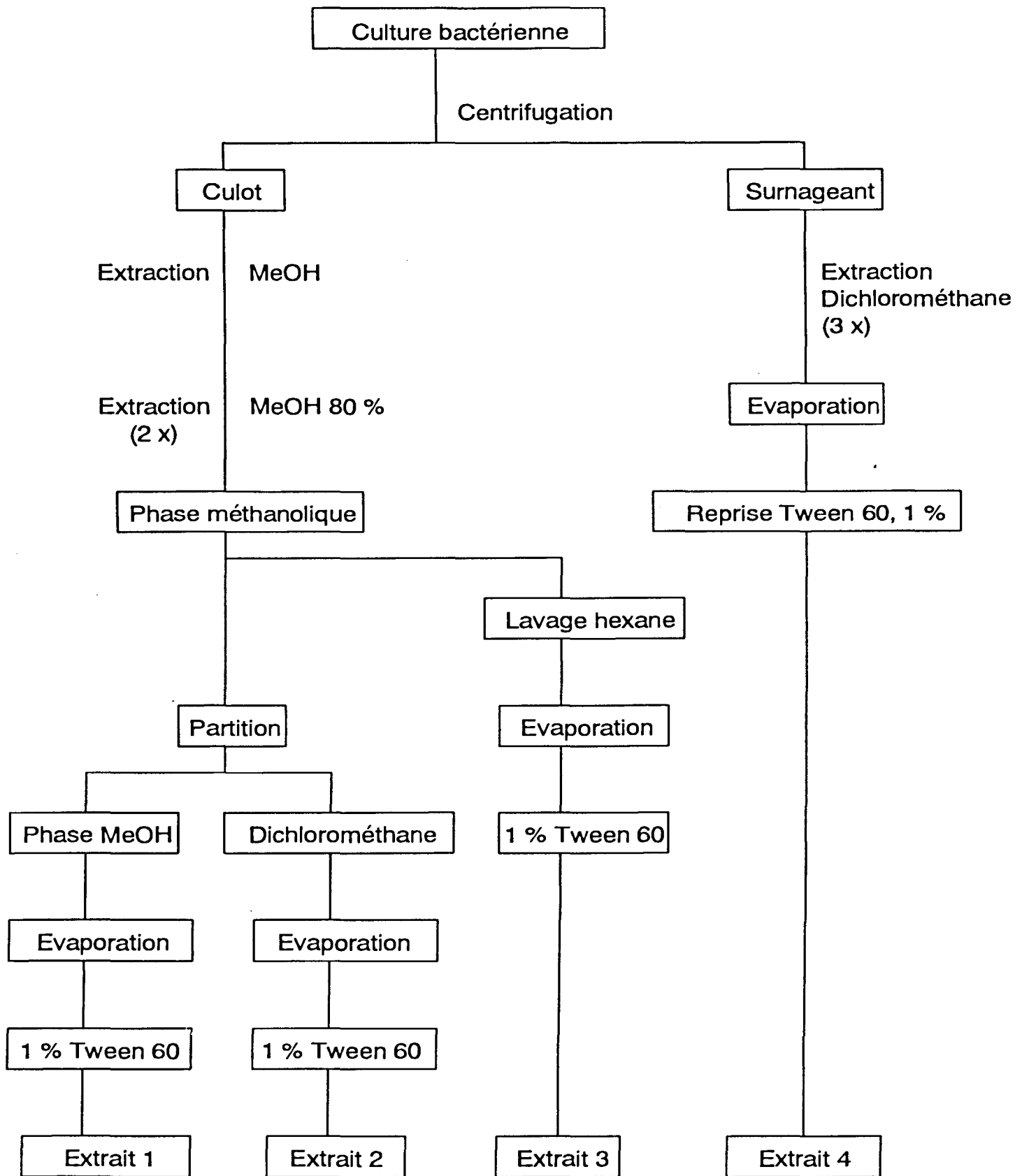


Figure 5 : Extraction des cultures bactériennes pour les tests-souris.

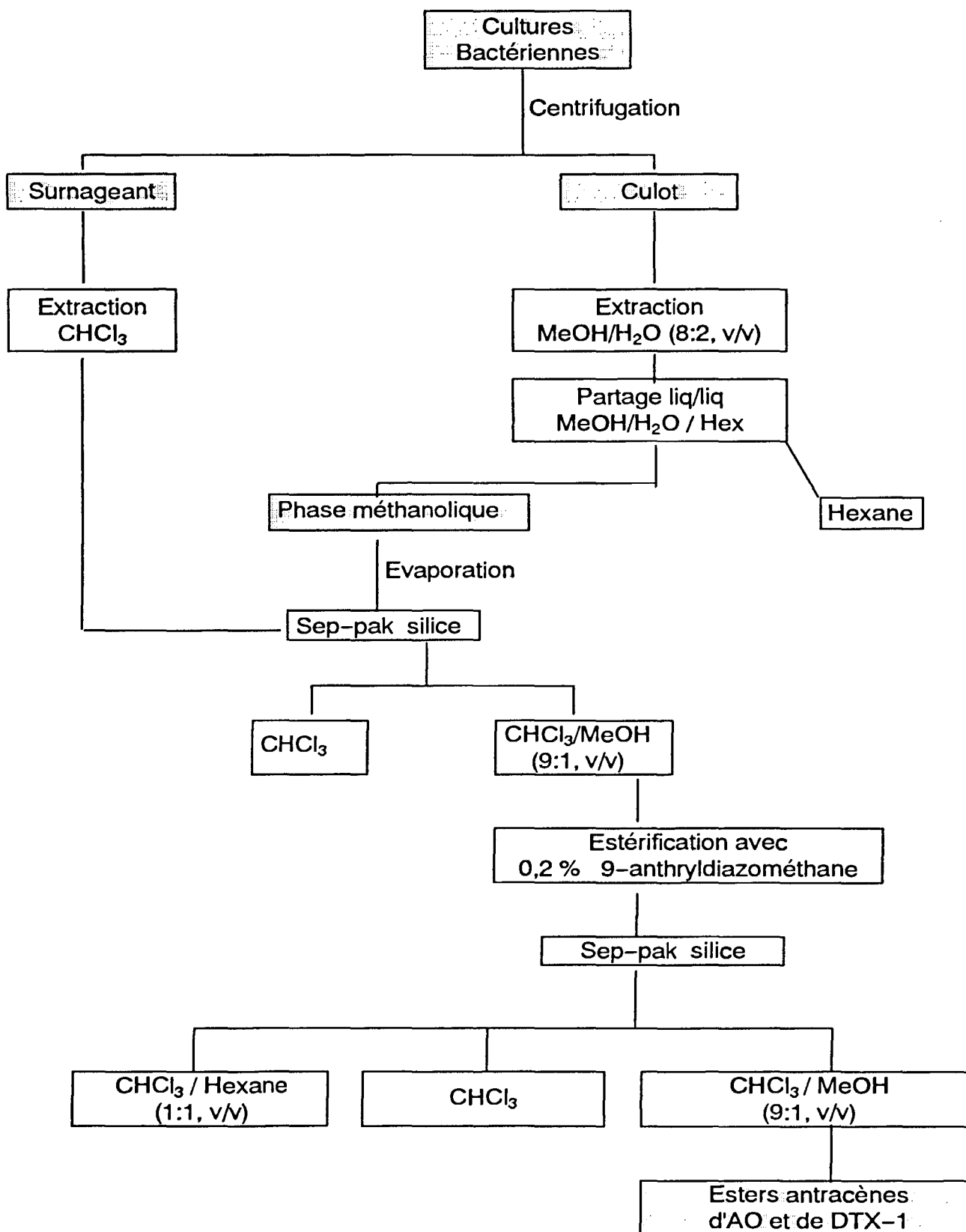


Figure 6 : Extraction de l'acide okadaïque et de la dinophysistoxine 1.

L'analyse chromatographique est réalisée en mode isocratique. Une colonne à phase inverse Lichrospher 4 μm (250 x 4 mm) est utilisée avec une thermorégulation à 25°C. La phase mobile est constituée d'acétonitrile, 8 v, eau distillée, 1v, méthanol, 1v. , le débit est réglé à 1,1 ml. mn⁻¹, (Masselin *et al.*, 1992). La longueur d'onde maximale d'excitation de l'ADAM et des esters méthyl-anthracènes de l'OA et de la DTX-1 est égale à 254 nm et la longueur d'onde maximale d'émission est égale à 412 nm.

7. Expertise par dosage en spectrométrie de masse et chromatographie liquide (LC/MS) de l'acide okadaïque et de ses dérivés

Ces analyses ont été conduites par le Dr M. Quilliam, du Conseil National de Recherches du Canada, Halifax.

Appareillage

→ Système de chromatographie liquide: Modèle HP1090M , système de pompe ternaire, injecteur à volume variable, un échantillonneur automatique réfrigéré, un logiciel HP79994 (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA)

→ Système LC-MS : Modèle HP 10090M de chromatographie liquide est couplé à un spectromètre de masse triple quadrupole (SCIEX, Thornhill ON, Canada) équipé d'une source d'ionisation à pression atmosphérique et d'une interface à pulvérisation ionique

Les fractions purifiées ont été analysées en LC/MS en mode positif en utilisant une colonne LC (2,1 mm id x 25 cm, 5 μm Vydac 201 TP octadecylsilica, Separations Group, Hesperia, CA) à température ambiante, dans des conditions isocratiques avec une phase mobile de méthanol aqueux 80 % contenant 0,1 % TFA. Le débit était de 0,3 ml/min et le volume d'injection de 5 μl . L'eluat de la colonne LC était fractionné par un diviseur de faible volume mort pour son introduction dans le spectromètre avec un débit de 30 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Les dosages ont été réalisés sur un appareil LC/MS SCIEX API-III équipé d'une interface pour pulvérisation ionique à pression atmosphérique. Le gaz utilisé était de l'air hautement purifié (ca 0.5 l/min). Le potentiel appliqué sur l'aiguille de l'interface était de 5 000V.

III. – RESULTATS ET DISCUSSION

Etude préliminaire des caractères phénotypiques

La détermination des caractères physiologiques et biochimiques, dont le métabolisme respiratoire, les exo-enzymes, le profil nutritionnel, la résistance aux inhibiteurs réalisée par des tests traditionnels et des galeries d'identifications rapides (API) (cf. Tableaux, 3, 4, 5), a permis d'isoler 18 espèces bactériennes isolées des cultures de *P. lima* et 12 à partir des prélèvements de *Dinophysis sacculus* et *acuminata*.

Tableau 3: Galerie API 50 CH, Etude du métabolisme des hydrates de carbone des microorganismes.

BANDE N°1	BANDE N°2	BANDE N°3	BANDE N°4	BANDE N°5
témoin	galactose	α -methyl-D mannoside	melibiose	D turanose
glycerol	glucose	α -methyl-D glucoside	saccharose/sucrose	D lyxose
erythritol	fructose	N acetyl glucosamine	trehalose	D tagatose
D arabinose	mannose	amygdaline	inuline	L fucose
L arabinose	sorbose	arbutine	melezitose	D fucose
ribose	rhamnose	esculine	raffinose	D arabitol
D xylose	dulcitol	salicine	amidon	L arabitol
L xylose	inositol	celiobiose	glycogene	gluconate
adonitol	mannitol	maltose	xylitol	2 keto gluconate
methyl-D xyloside	sorbitol	lactose	gentiobiose	5 keto gluconate

Tableau 4: Galerie API NE: Système d'identification des bacilles gram négatif non entérobactéries.

<i>Tests conventionnels</i>		<i>Tests d'assimilation</i>	
SUBSTRATS	REACTIONS/ENZYMES	SUBSTRATS	REACTIONS/ENZYMES
nitrate de potassium	réduction des nitrates en nitrites	glucose	assimilation
tryptophane	formation d'indole	arabinose	assimilation
glucose	fermentation	mannose	assimilation
arginina	arginine dihydrolase	mannitol	assimilation
urée	uréase	N-acétyl-glucosamine	assimilation
esculine	hydrolyse (b-glucosidase)	maltose	assimilation
gelatine	hydrolyse (protease)	gluconate	assimilation
p-nitro-phényl-bD-galactopyranoside	b-galactosidase	caprate	assimilation
tetraméthyl-p-phenylène diamine	cytochrome oxydase	adipate	assimilation
		malate	assimilation
		citrate	assimilation
		phényl-acétate	assimilation

Tableau 5: Galerie API 20 E: système d'identification Ortho-nitro-phényl-galactosides des enterobacteriaceae et autres bacilles gram-négatifs.

SUBSTRATS	REACTIONS/ ENZYMES	SUBSTRATS	REACTIONS/ ENZYMES
ortho-nitro-phenyl-galactoside	b-galactosidase	Glucose	fermentation/oxydation
arginine	arginine dihydrolase	mannitol	fermentation/oxydation
lysine	lysine décarboxylase	inositol	fermentation/oxydation
ornithine	ornithine décarboxylase	sorbitol	fermentation/oxydation
citrate de sodium	utilisation du citrate	rhamnose	fermentation/oxydation
thiosulfate de sodium	production d'H ₂ S	saccharose	fermentation/oxydation
urée	Uréase	melibiose	fermentation/oxydation
tryptophane	production d'indole	amygdaline	fermentation/oxydation
pyruvate de sodium	production d'acétoine	arabinose	fermentation/oxydation
gelatine de Kohn	gelatinase		

Ces bactéries sont toutes gram négatives, aérobies strictes. Elles se développent à des températures allant de 10 à 30 degrés Celsius. Des concentrations en sodium de 0.1 à 2M sont nécessaires à leur croissance. La caractérisation phénotypique sommaire nous a permis de distinguer, sans les identifier, les différentes souches pour l'étude de la toxigenèse. L'identification phénotypique et génétique des nouvelles souches bactériennes incriminées soit la très grande majorité, 80 %, a été résolument laissée en attente de la confirmation du caractère toxique de ces souches.

En effet, seules deux souches ont pu être identifiées par ces méthodes d'inventaires traditionnelles, comme appartenant aux genres *Pseudomonas*. La connaissance des bactéries marines reste faible par rapport à ce que nous savons sur d'autres organismes comme les algues ou les animaux marins. L'étude de cette diversité bactérienne en mer rencontre les difficultés usuelles de l'étude de ce milieu : difficulté de prélèvement, variabilité du milieu, effets climatiques importants, rôle peut-être majeur des phénomènes transitoires.

Analyse par chromatographie liquide à haute performance avec détection fluorimétrique

Les toxines diarrhéiques, AO et DTX-1, comportent une fonction carboxyle qui rend possible leur conversion en dérivés d'esters fluorescents pour l'analyse HPLC avec détection fluorimétrique (chromatogramme 1). Les travaux de Lee *et al.*, (1989) ont démontré que le 9-anthryldiazométhane convenait parfaitement pour cette estérification, leur méthode a depuis été adoptée par de nombreux laboratoires dans le monde entier.

Nous avons appliqué cette même méthode pour l'analyse HPLC avec détection fluorimétrique des extraits de cultures bactériennes. Une attention particulière a été portée à la prépurification sur Sep-pak silice de ces échantillons riches en acides gras afin de limiter la teneur des contaminants réactifs avec le 9-anthryldiazométhane.

36 souches bactériennes ont été analysées : les 18 espèces bactériennes isolées de cultures de *P. lima*, les 12 espèces isolées des prélèvements de *Dinophysis* et les 4 souches isolées préalablement dans le laboratoire et présumées toxigènes (Rausch de Traubenberg, 1993). Trois de ces dernières ont été identifiées comme appartenant à une même nouvelle espèce de *Roseobacter*, *R. algicola*. Deux souches de *Roseobacter*, *R. litoralis* et *Roseobacter denitrificans* gracieusement données à notre laboratoire par le Dr. Gauthier, INSERM Nice, ont donc été choisies comme témoins. **Aucun des extraits de cultures bactériennes ne présentait d'AO ou de DTX-1.**

Dans ces conditions d'expériences, nous avons par contre observé, pour tous les échantillons, un pic d'élution présentant un temps de rétention très proche de celui du standard d'AO (chromatogrammes 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8) qui pouvait être responsable de la prise en compte de faux positifs.

Cette substance est assez commune puisqu'elle était également présente chez les bactéries témoins *Roseobacter litoralis* (chromatogramme 6) et *denitrificans*. Ces bactéries marines aérobies, roses pigmentées, qui contiennent de la chlorophylle a (Shiba, 1991) et le cytochrome c-551 (Okamura *et al.*, 1984), appartiennent à la branche α des protéobactéries comme les souches MI4, Ff2 et Ff3 (Lafay *et al.*, 1995).

Ces résultats soulignent l'importance du contrôle des activités du gel de silice et de la phase mobile lors de l'analyse chimique des phycotoxines diarrhéiques par cette méthode HPLC.

La variabilité chimique des échantillons biologiques est également un facteur important qui doit être pris en compte dans cette méthode de dosage par HPLC. La DTX-3, par exemple, ne peut être analysée directement par HPLC comme un dérivé anthracène et doit être d'abord convertie en AO ou DTX-1 par hydrolyse alcaline (Yasumoto *et al.*, 1989). De même les diols esters des toxines diarrhéiques ne peuvent être analysés par cette méthode HPLC après dérivatisation au 9-anthryldiazométhane, mais peuvent être dosés par les techniques de spectrométrie de masse.

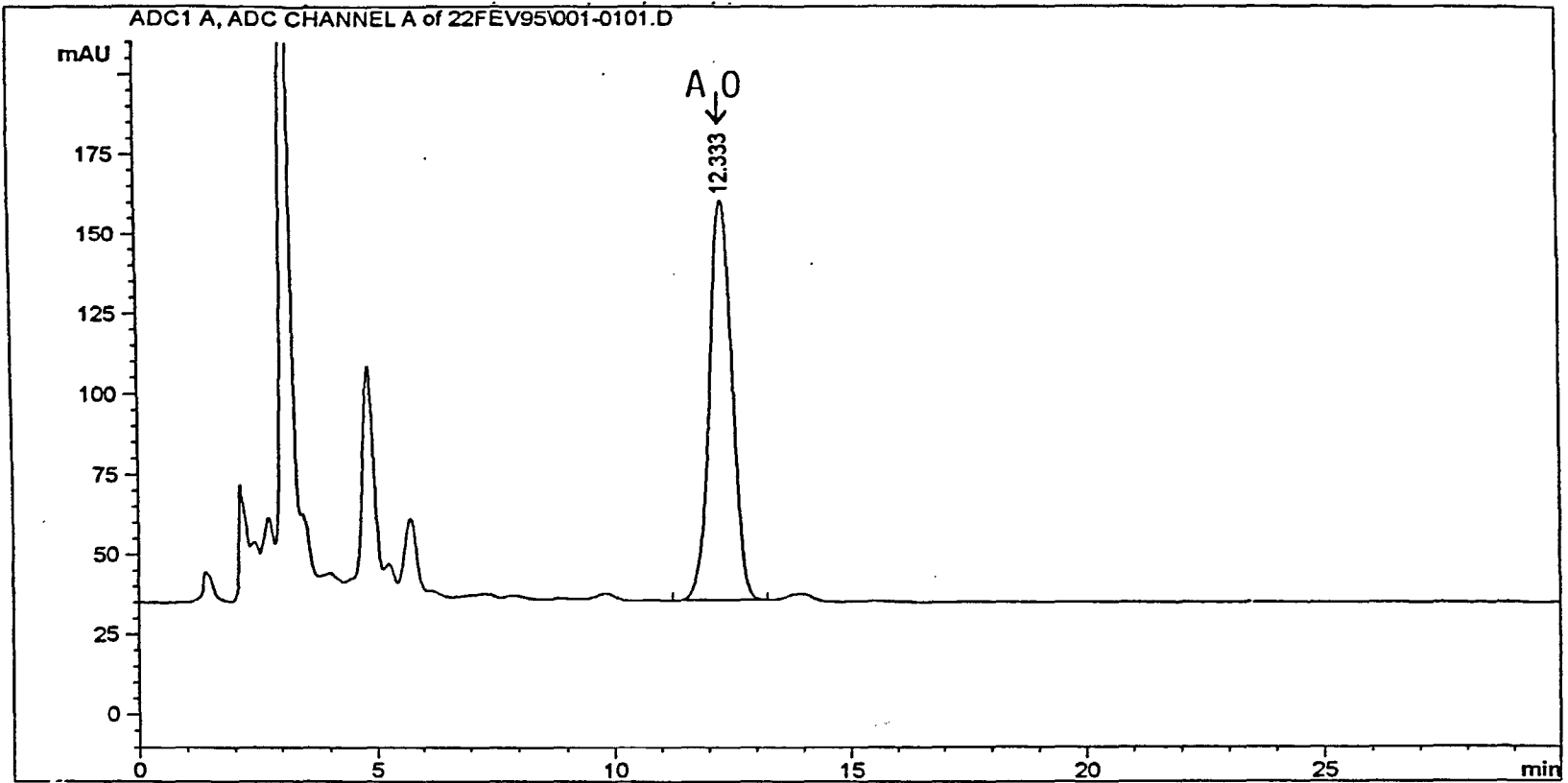
Confirmation des résultats sur la souche *Roseobacter algicola* par LC-MS

La combinaison de l'HPLC et de la spectrométrie de masse à émission ionique est pour l'instant la méthode d'analyse des toxines diarrhéiques phytoplanctoniques la plus sensible et la plus rapide (Pleasance *et al.*, 1992 ; Quilliam, 1995). En plus d'une très haute sensibilité et sélectivité, elle fournit en mode MS-MS des informations structurales utiles pour la confirmation des toxines et pour l'identification de dérivés ou de nouvelles toxines. **Elle nous a ainsi permis de vérifier l'absence de dérivés tels les diol - esters (masse moléculaire 929.7) de l'AO (masse moléculaire 805.7) et de la DTX1 (masse moléculaire 819.7) dans les extraits bactériens (chromatogrammes 9, 10).**

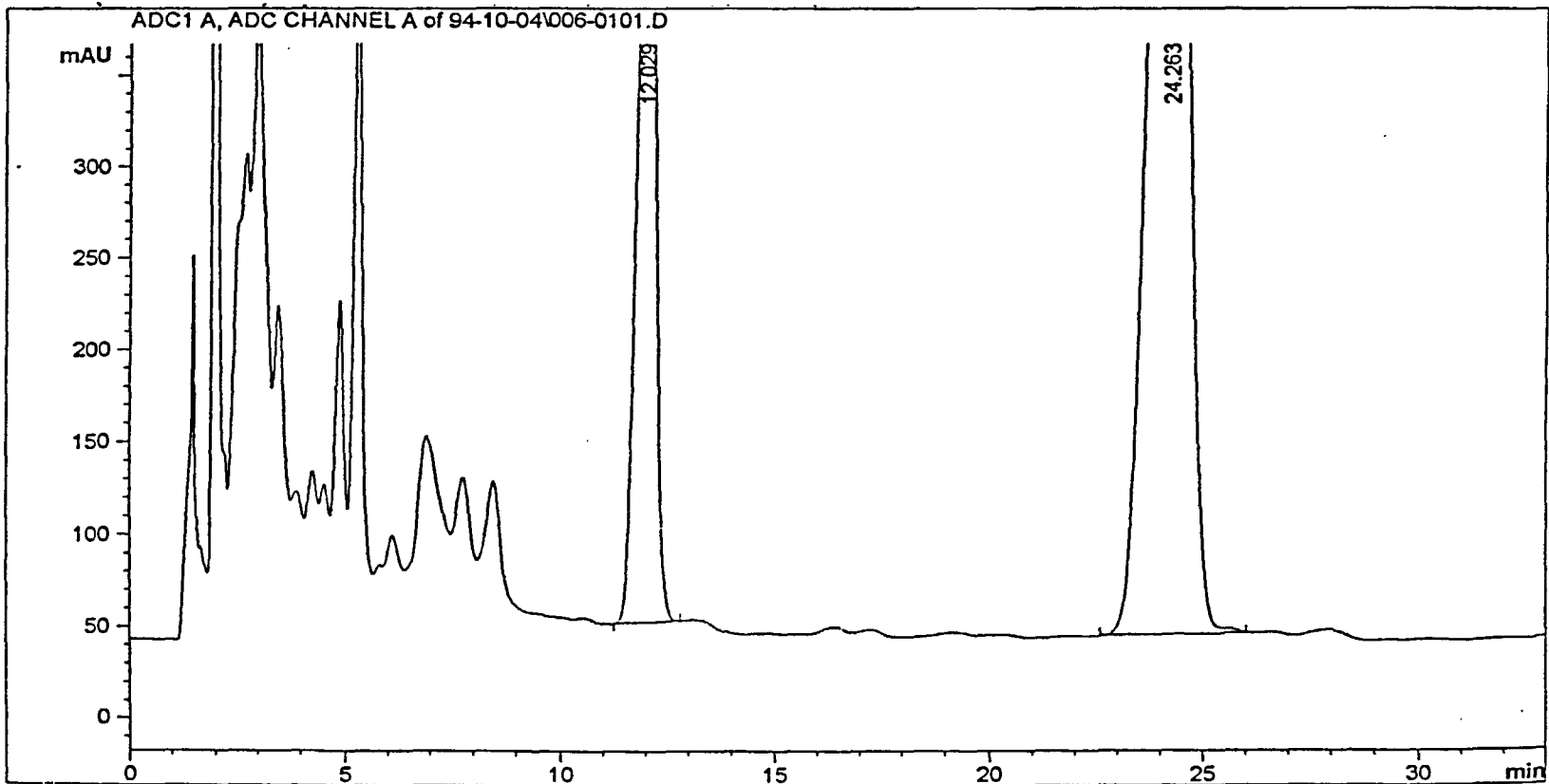
Tests biologiques sur les cultures bactériennes

Les fractions dichlorométhane des extraits bactériens, qui contiennent la substance contaminante, ont été injectées aux souris à des concentrations équivalentes à 7 unités souris d'acide okadaïque, c'est-à-dire 7 fois 4 µg d'AO (Yasumoto, T., 1981). Un extrait si concentré, en supposant que la substance contaminante présente une toxicité égale à celle de l'acide okadaïque, aurait dû induire des taux de mortalités élevés chez les souris. Or les tests sur les fractions des cultures bactériennes, notamment celles de *Roseobacter algicola* se sont tous révélés négatifs. **Cette substance contaminante, dont le pic d'élution se superpose à celui de l'AO lors des analyses HPLC (méthode de Lee *et al.*, 1987) n'a pas d'activité toxique sur les souris.**

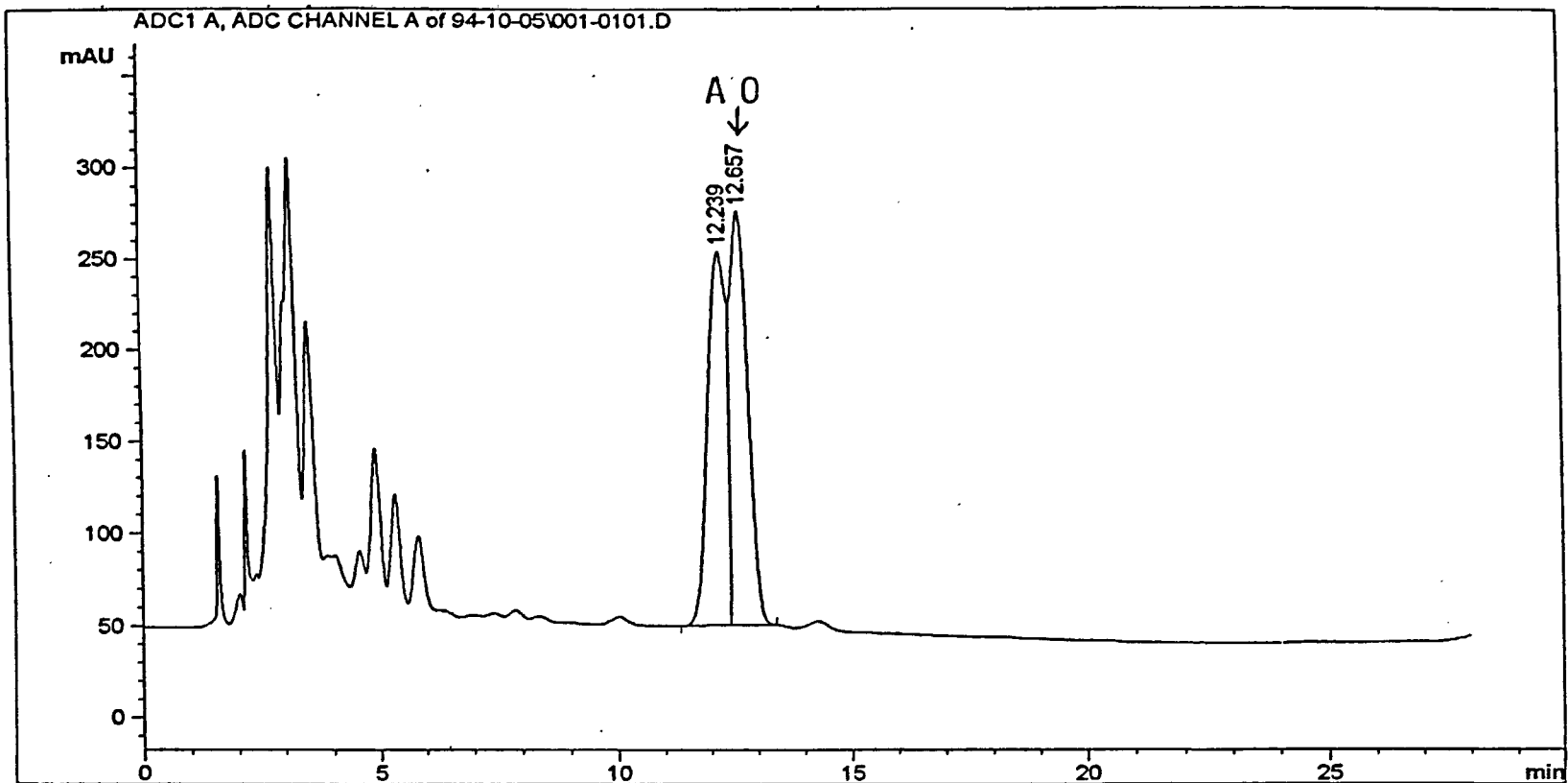
Les phases hexane et méthanol/eau ont également été testées et se sont elles aussi révélées non toxiques sur souris, il n'y avait donc pas non plus de substance toxique parmi les composés apolaires (phase hexane) ou ceux de forte polarité (phase méthanol/eau).



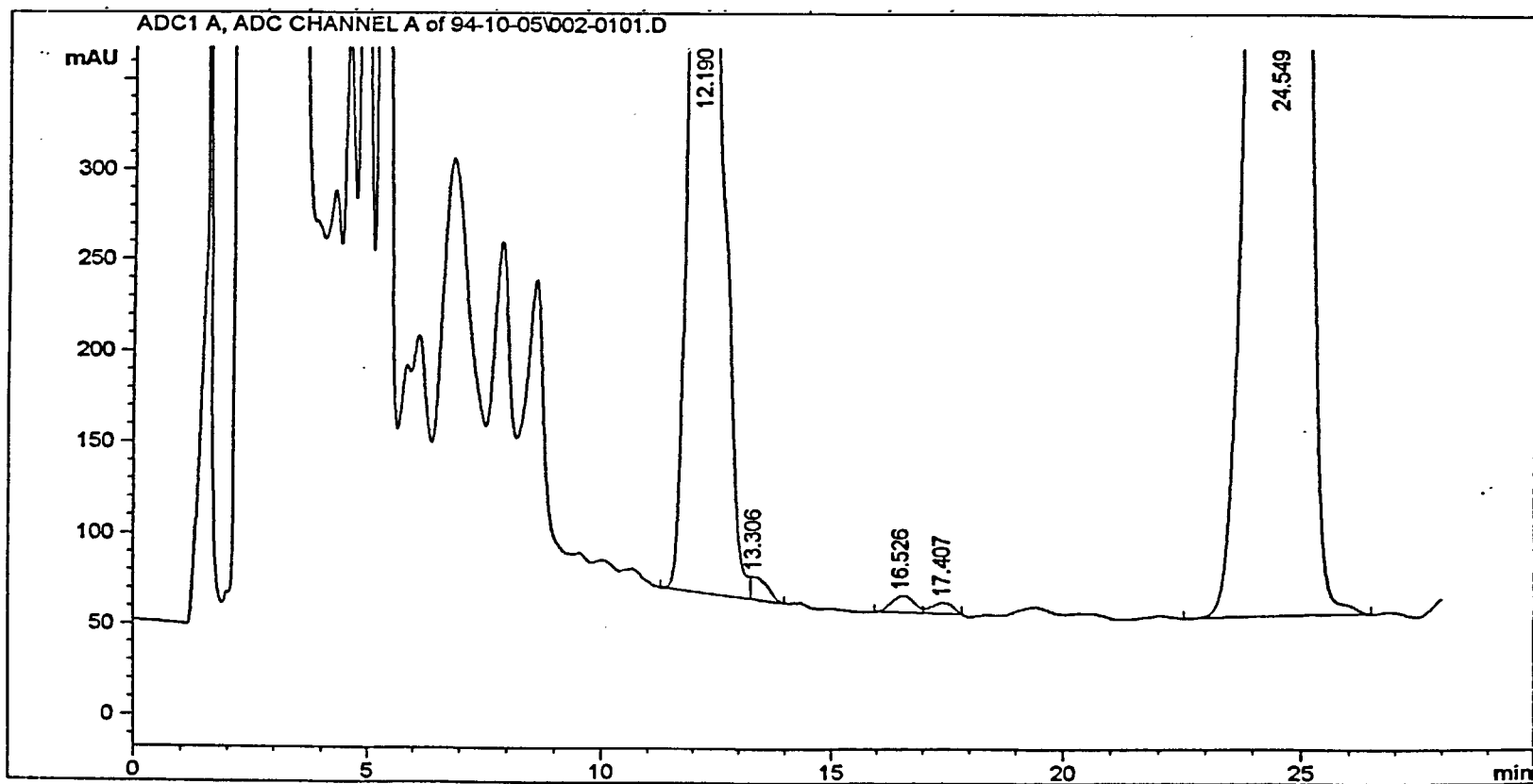
Chromatogramme 1 : Standard d'acide okadaïque (AO).



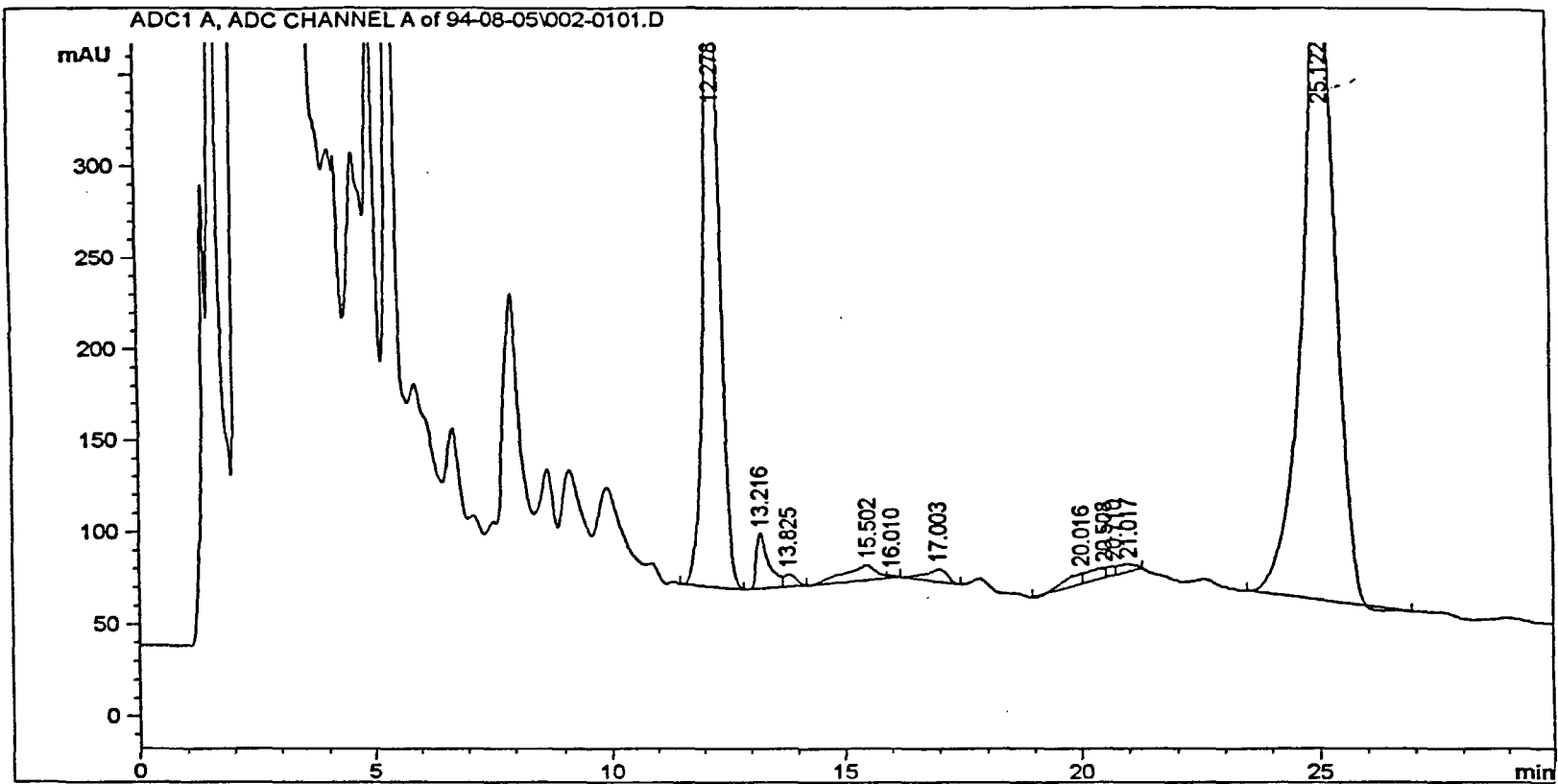
Chromatogramme 2 : Cultures de bactéries associées (5T₂) à *Dinophysis sacculus* (baie de Vilaine).



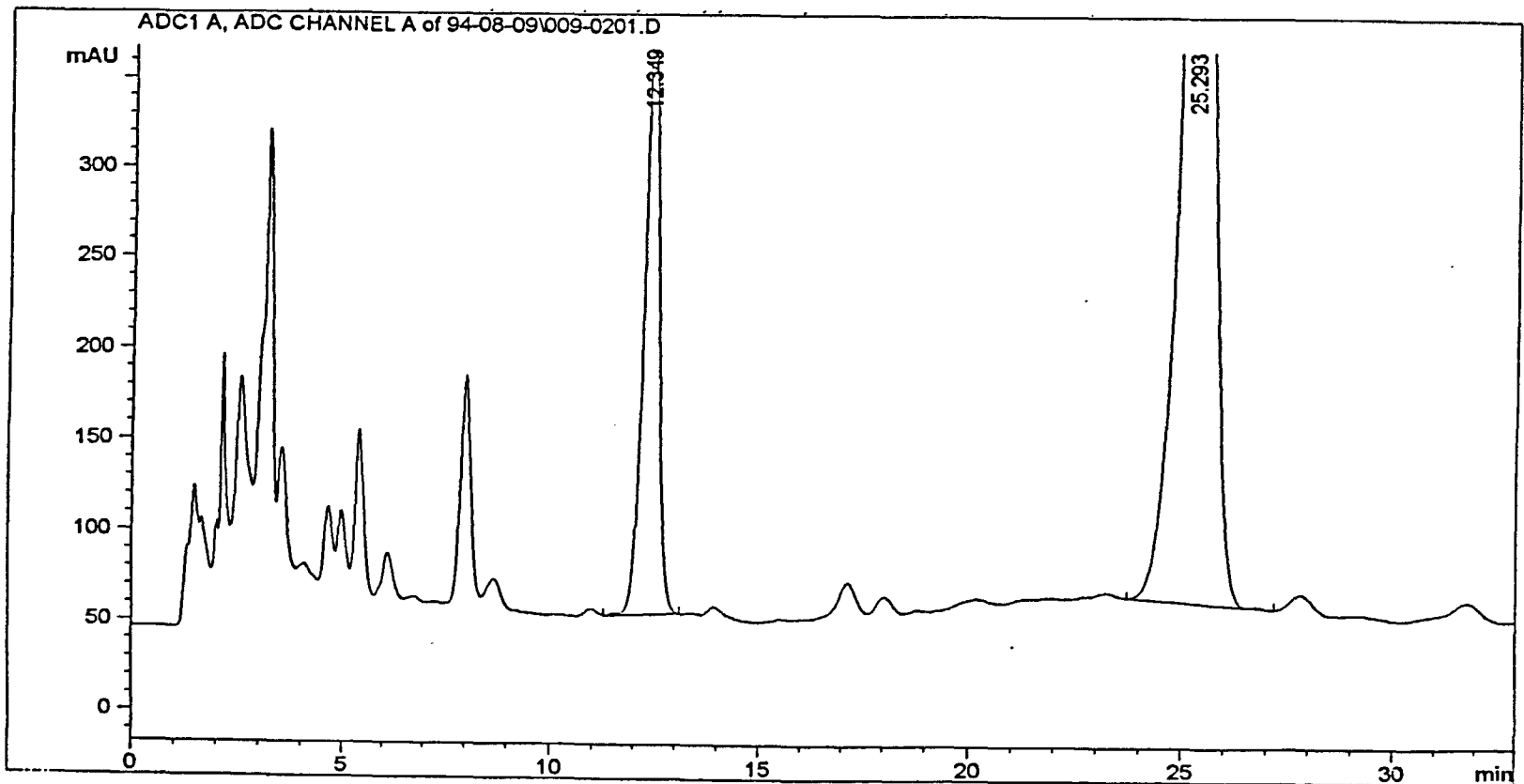
Chromatogramme 3 : Bactéries associées (5T₂) à *Dinophysis sacculus* (baie de Vilaine)
+ standard interne d'acide okadaïque.



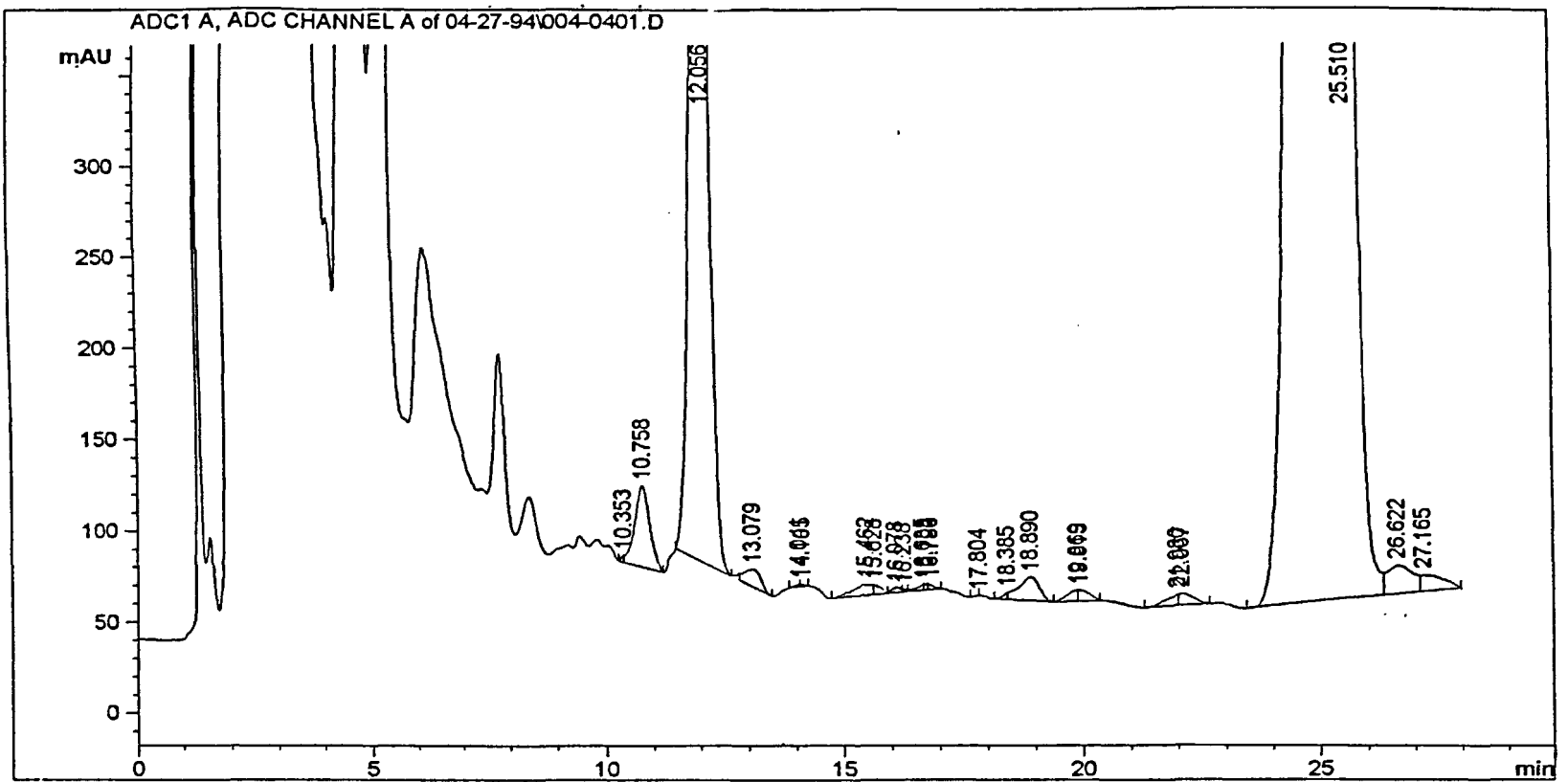
Chromatogramme 4 : Bactéries associées (1C₂) à *Dinophysis acuminata* (Concarneau).



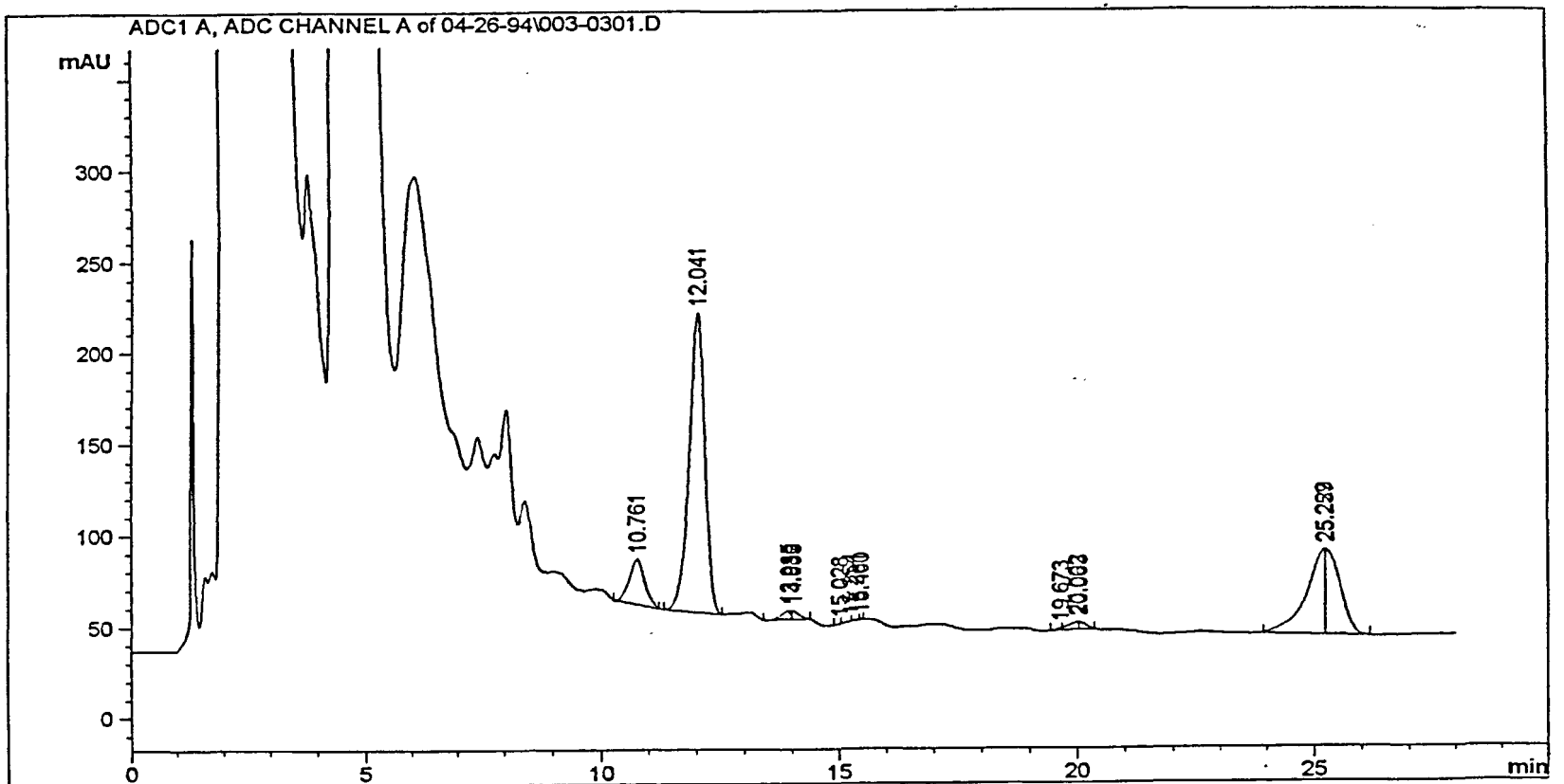
Chromatogramme 5 : Extraits de cultures de la souche bactérienne "Ff₃" isolée de *Procentrum lima*.



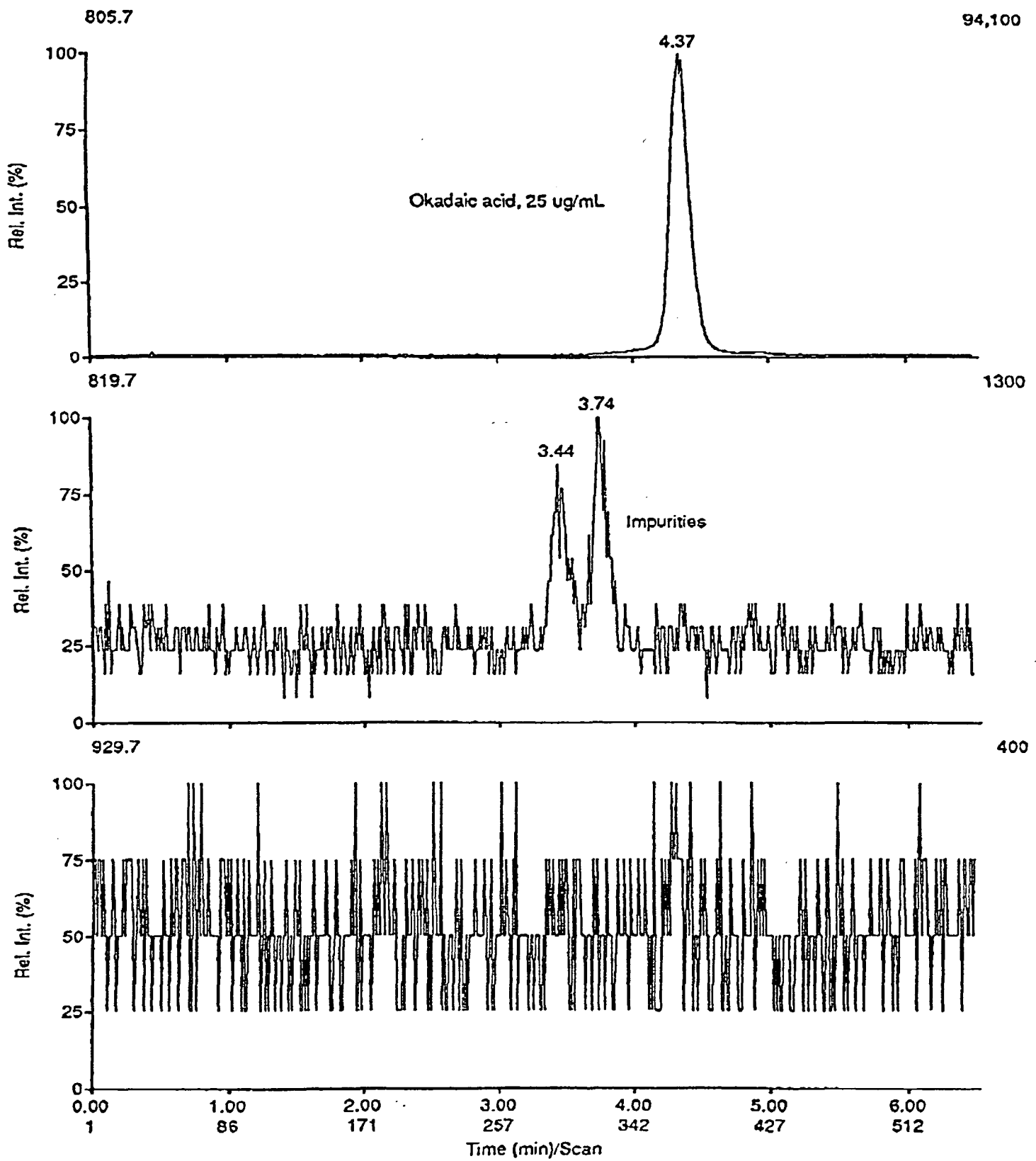
Chromatogramme 6 : Extraits de cultures de *Roseobacter litoralis*.



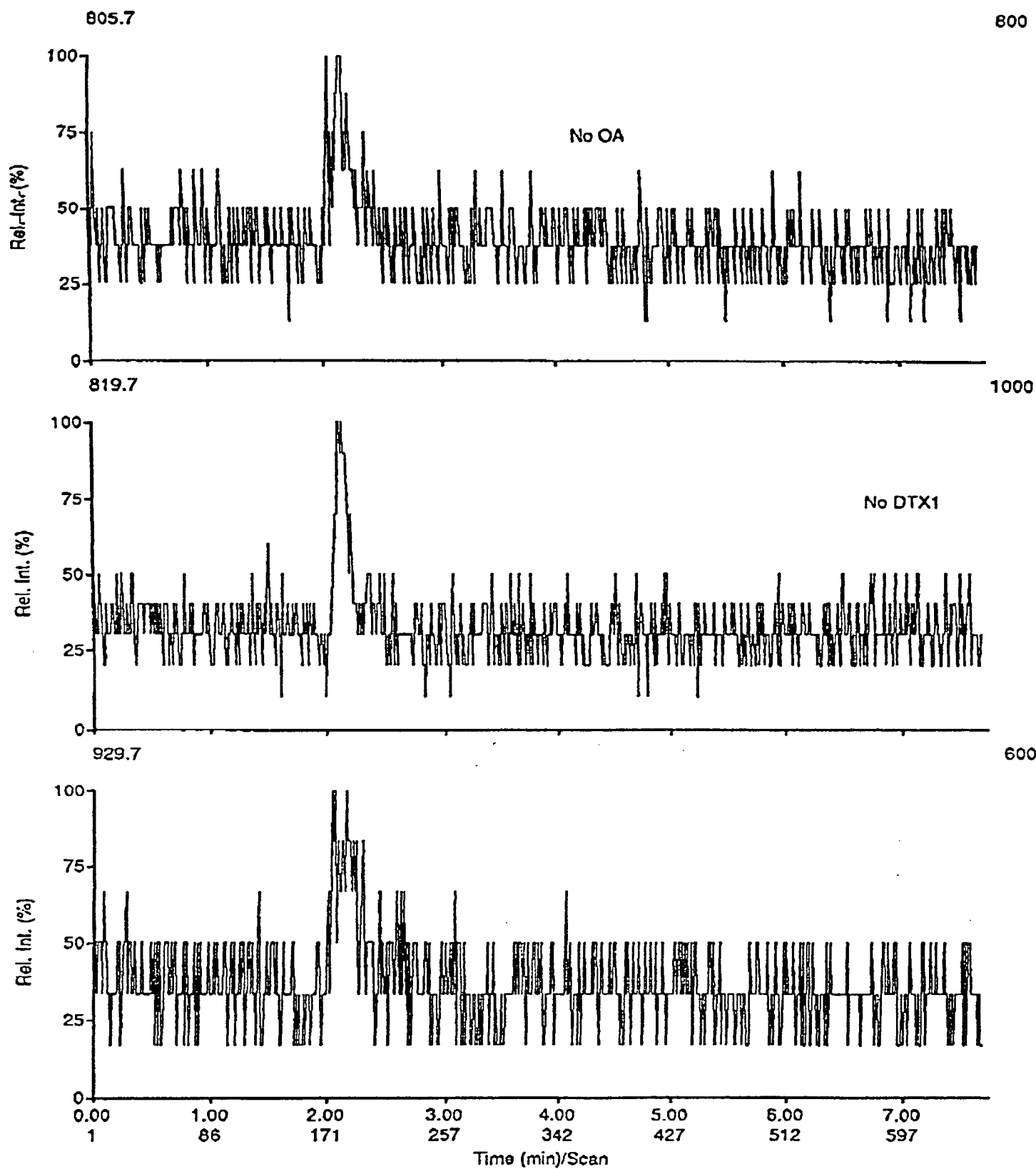
Chromatogramme 7 : Extraits de cultures de bactéries associées à *Prorocentrum lima* (PL4V, Vigo).



Chromatogramme 8 : Extraits de cultures de bactéries associées à *Prorocentrum lima* (PL2V, Vigo).



Chromatogramme 9 : LC-MS chromatogramme d'un standard d'AO.



Chromatogramme 10 : LC-MS chromatogramme : extrait purifié de culture de *Roseobacter algicola* (FF3).

IV. – CONCLUSION ET PERSPECTIVE

Les dosages par chromatographie liquide avec détection fluorimétrique des dérivés anthracènes de l'acide okadaïque et de la DTX-1 ont établi l'absence de ces polyéthers toxiques dans les extraits de cultures bactériennes provenant des micro-organismes associés à *Prorocentrum lima* (PL4V, PL2V), à *Dinophysis sacculus* (baie de Vilaine) et à *Dinophysis acuminata* (Concarneau). La toxicité de la souche *Roseobacter algicola* préalablement affirmée (Rausch de Traubenberg, 1993) n'a pas été retrouvée dans nos analyses.

Nos mesures ont par contre mis en évidence la présence d'un composé ayant une fonction carboxylique disponible, dont le pic d'éluion est très proche de celui de l'acide okadaïque. La faible discrimination entre ces deux pics peut être responsable de la prise en compte de faux positifs. La modification de la polarité de la phase mobile et l'utilisation de standard interne ont permis une meilleure sélection.

Ces résultats ont été confirmés et complétés par les analyses réalisées en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse à détection ionique. Cette méthode a en effet permis de vérifier l'absence des nombreux dérivés de l'acide okadaïque dont le groupement carboxyl est déjà bloqué dans une liaison ester qui ne peuvent dès lors être détectés par la méthode classique d'analyse par HPLC des phycotoxines diarrhéiques. La LC-MS est pour l'instant l'outil analytique le plus performant, il permet de quantifier de l'ordre du ppb la plupart des phycotoxines. En mode MS/MS il permet de démasquer les formes contaminantes et au contraire de détecter les formes isomères ou dérivées des toxines recherchées.

Ces travaux ont démontré l'absence d'une toxigenèse bactérienne autonome chez les bactéries analysées associées à *Prorocentrum lima*, *Dinophysis sacculus* et *D. acuminata* dans les conditions d'expériences. Ils s'inscrivent donc dans la lignée des résultats contestant l'hypothèse bactérienne dans le cas de la production des toxines DSP (Hu *et al.*, 1993 ; Yasumoto, comm. pers., Kodama, comm. pers.).

Quant à l'étude de la diversité microbienne associée aux efflorescences algales toxiques, elle pose, en plus des problèmes usuels de l'étude du milieu marin, des problèmes très spécifiques, parmi lesquels peuvent être cités, l'absence d'un concept d'espèce chez les bactéries, le manque d'efficacité des méthodes d'inventaires traditionnelles et finalement la capacité d'adaptation ou d'évolution rapide des organismes bactériens. Dans ces conditions, une étude de la biodiversité des bactéries associées aux dinoflagellés producteurs de DSP, doit à la fois développer des concepts permettant de représenter les communautés bactériennes et des méthodes permettant la mise en oeuvre de tels concepts. Ce travail, dans son ampleur, s'inscrit dans le cadre de programmes internationaux et interdisciplinaires, il dépasse les objectifs fixés de l'IFREMER pour ce projet puisque l'implication de bactéries dans le phénomène de production des toxines diarrhéiques n'a pas été confirmée.

Cependant, vues les répercussions cruciales sur la qualité du milieu et la salubrité des coquillages, d'une toxigenèse bactérienne de type DSP, l'analyse des cinétiques de production des toxines diarrhéiques par *Prorocentrum lima* sera faite sur des cultures rendues axéniques par traitement aux antibiotiques et comparée à celles renfermant une importante microflore.

Cette prochaine étude intégrera la mesure des nouveaux composés polaires, les DTX4 (Hu *et al.*, 1995), précurseurs de l'AO et des dinophysitoxines dans les cellules planctoniques, afin de définir le rôle des bactéries dans l'hydrolyse de ces esters trisulfatés en AO et en dinophysitoxines.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Albright, L., J., McCrae, S., K. & May, B., E., 1986. Attached and free-floating bacterioplankton in Howe Sound, British Columbia, a coastal marine fjord-embayment. *Appl. Environ. Microbiol.*, **51** (3), 614-621.
- Amzil, Z., Pouchus, Y., F., Le Boterff, J., Roussakis, C., Verbist, J., F., Marcaillou-Lebaut, C. & Masselin, P., 1992. Short-time cytotoxicity of mussel extracts : a new bioassay for okadaic acid detection. *Toxicon*, **30** (1), 1419-1425.
- Andresen Leitao (M. de Paz), Lassus, P., Maggi, P., Le Baut, C., Chauvin, J. & Truquet, Ph., 1983. Phytoplancton des zones mytilicoles de la baie de Vilaine et intoxication par les coquillages. *Rev. Trav. Inst. Pêches marit.*, **46** (3), 233-266.
- Azam, F. & Hodson, R., E., 1981. Multiphasic kinetics for D-glucose uptake by assemblage of natural marine bacteria. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **6**, 213-222.
- Azam, F., Fenchel, T., Field, J., G., Gray, J., S., Meyer-Reil, L., A. & Thingstad, F., 1983. The ecological role of water column microbes in the sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **10**, 257-263.
- Azam, F., Smith, D., C. & Carlucci, A., F., 1992. Bacterial transformation and transport of organic matter in the southern California Bight. *Prog. Oceanogr.*, **30**, 151-166.
- Baden, D., G., Mende, T., J., Lichter, W. & Wellham, L., 1981. Crystallisation and toxicology of T 34 : A major toxin from Florida's red tide organism (*Ptychodiscus brevis*). *Toxicon*, **19**, 455-459.
- Bates, S., S., Douglas, D., J., Doucette, G., J. & Leger, C., 1993. Effects of reintroducing bacteria on domoic acid production by axenic cultures of the diatom *Pseudonitzschia pungens f. multiseriis*. In : *Harmful Marine Algal Blooms*, Lassus, P., Arzul, G., Erard-Le Denn, E., Gentien, P., & Marcaillou-Le Baut, C. Eds., Lavoisier, Paris, 401-406.
- Bein, S., J., 1954. A study of certain chromogenic bacteria isolated from "red tide" water with a description of a new species. *Bull. Mar. Scien. Gulf Carribean*, **4**, 110-119.
- Belin, C., Berthomé, J.P. & Lassus, P., 1989. Dinoflagellés toxiques et phénomènes d'eaux colorés sur les côtes françaises : évolution et tendances entre 1975 et 1988. *Hydroécol. Appl.*, **1/2**, 3-17.
- Bell, W. & Mitchell, R., 1972. Chemotactic and growth responses of marine bacteria to algal extracellular products. *Bio. Bull.*, **143**, 265-277.
- Bell, W., H., Lang, J., M. & Mitchell, R., 1974. Selective stimulation of marine bacteria by algal extracellular products. *Limnol. Oceanogr.*, **19** (5), 833-839..
- Berland, B., R., Bonin, D., J. & Maestrini, S., Y., 1974. Etude expérimentale de l'influence de facteurs nutritionnels sur la production du phytoplancton de Méditerranée, Thèse de Doctorat, Université Aix-Marseille.

- Blanco, L., Fernandez, M., Marino, L., Reguera, B., Miguez, A., Maneiro, J., Cacho, E. & Martinez, A., 1995. From *Dinophysis spp.* toxicity to DSP outbreaks: a preliminary model of toxin accumulation in mussels. In : *Harmful Marine Algal Blooms*, Lassus, P., Arzul, G., Erard-Le Denn, E., Gentien, P., & Marcaillou-Le Baut, C. Eds., Lavoisier, Paris, 777–782.
- Bloesch, J., Stadelman, P. & Buher, H., 1977. Primary production, mineralisation and sedimentation in the eutrophic zone of two Swiss lakes. *Limnol. Oceanogr.*, **22**, 511–526.
- Boczar, B., A., Beitler, M., K., Liston, J., Sullivan, J., J. & Cattolico, R., A., 1988. Paralytic shellfish toxins in *Protogonyaulax tamarensis* and *Protogonyaulax catenella* in axenic culture. *Plant Physiol.*, **88**, 1285–1290.
- Bomber, J., W., Tindall, D., R. & Miller, D., M., 1989. Genetic variability in toxin potencies among seventeen clones of *Gambierdiscus toxicus* (Dinophyceae). *J. Phycol.*, **25**, 617–625.
- Carmody, E. P., Kevin, J. J. & Sean, K. S.; 1996. Dinophysistoxin-2: The predominant diarrhoeic shellfish toxin in Ireland. *Toxicon*, **34** (3), 351–359.
- Chiavaroli, C., Vacher, P. & Scheger, W., 1992. Modulation of Ca²⁺ influx by protein phosphorylation in single intact clonal pituitary cells. *European Journal of Pharmacology. Molecular Pharmacology Section*, **22è**, 173–180.
- Cole, J., J., Findlay, S. & Pace, M., L., 1988. Bacterial production in fresh and saltwater ecosystems: a cross system overview. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **43**, 1–10.
- Delucca, R. & Mc Cracken, M., O., 1978. Observation on interaction between naturally collected bacteria and several species of algae. *Hydrobiol.*, **55**, 71–75.
- Doucette, G., J. & Trick, C., G., 1995. Characterization of bacteria associated with different isolates of *Alexandrium tamarensis*. In : *Harmful Marine Algal Blooms*, Lassus, P., Arzul, G., Erard-Le Denn, E., Gentien, P., & Marcaillou-Le Baut, C. Eds., Lavoisier, Paris, 33–38.
- Fuhrman, J., A., Ammerman, J., W. & Azam, F., 1980. Bacterioplankton in the coastal euphotic zone : distribution, activity and possible relationships with phytoplankton. *Mar. Biol.*, **60**, 201–207.
- Fuhrman, J., A. & Azam, F., 1982. Thymidine incorporations as a measure of heterotrophic bacterioplankton production in marine surface waters : evolution and field results. *Mar. Biol.*, **66**, 109–120.
- Fuhrman, J., 1992. Bacterioplankton role in cycling of organic matter : the microbial food web. In : *Primary productivity and biogeochemical cycles in the sea*, P., G., Falkowski & A., D., Woodhead, Eds., Plenum Press, New York, 361–383.
- Fujiki, H., Suganuma, M., Yoshizawa, S., Nishiwaki, S., Winyar, B. & Sugimura, T., 1991. Mechanisms of action of okadaic acid class tumor promoters on mouse skin. *Environ. Health Perspect.*, **93**, 211–214.
- Fujiki, H. & Suganuma, M., 1994. Tumor necrosis factor- α , a new tumor promoter, engendered by biochemical studies of okadaic acid. *J. Biochem.*, **115**, 1–5.

- Fukami, K., Simidu, U. & Taga, N., 1981. Fluctuation of the communities of heterotrophic bacteria during the decomposition process of phytoplankton. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **55**, 171–184.
- Fukami, K., Nishijima, T., Murata, H., DOI, S. & Hata, Y., 1991. Distribution of bacterial influential on the development and the decay of *Gymnodinium nagasakiense* red tide and their effects on algal growth. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **57**(12), 2321–2326.
- Gallacher, S. & Birkbeck, 1995. Isolation of marine bacteria producing sodium channel blocking toxins and the seasonal variation in their frequency in the sea water. communication orale. In : *Harmful Marine Algal Blooms*, Lassus, P., Arzul, G., Erard-Le Denn, E., Gentien, P., & Marcaillou-Le Baut, C. Eds., Lavoisier, Paris, 445–450.
- Hagström, A., Larsson, U. & Normak, S., 1979. Frequency of dividing cells, a new approach to the determination of bacterial growth rates in aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**, 805–812.
- Haines, K., C. & Guillard, R. R., L., 1974. Growth of vitamine B₁₂ requiring marine diatoms with vitamine B₁₂ producing marine bacteria. *J. Phycol.*, **10**, 245–252.
- Hamano, Y., Kinoshita, Y. & Yasumoto, T., 1985. Suckling mice assay for diarrhetic shellfish poisoning toxins. In : *Toxic dinoflagellates*. Anderson, D., M., White, A., W. & Baden, D., G., Eds., Elsevier, New-York, 383–388.
- Hescheler, J., Mieskes, G., Rüegg, J.C., Takai, A. & Trautwein, W., 1988. Effects of a protein phosphatase inhibitor, okadaic acid, on membrane currents of isolated guinea-pig cardiac myocytes. *Pflügers Arch. Physiol.*, **412** : 248–252.
- Hu, T. & Marr, J., 1992. New diol esters isolated from cultures of the dinoflagellates *Prorocentrum lima* and *Prorocentrum concavum*. *J. Natural Products*, **55** (11), 1631–1637.
- Hu, T., deFreitas, S., W., Doyle, J., Jackson, D., Marr, J., Nixon, E., Pleasance, S., Quilliam, M., A., Walter, J., A. & Wright, J., L., C., 1993. New DSP toxin derivatives isolated from toxic mussels and the dinoflagellates, *Prorocentrum lima* and *Prorocentrum concavum*. In : *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*, Smayda, T., J. & Shimizu, Y., Eds., Elsevier Science Publishers, 507–512.
- Hu, T., Curtis, J.M., Walter, J. A. & J. L. C., Wright, 1995. Identification of DTX4, a new water-soluble phosphatase inhibitor from the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 597 – 599.
- Hurme, M. & Matikainen, S., 1993. Okadaic acid, a phosphatase inhibitor, enhances the phorbol ester-induced interleukin-1 β expression via AP-1 mediated mechanism. *Scand. J. Immunol.* **38**, 570–574.
- Hwang, D., F., Arakawa, O., Saito, T., Noguchi, T., Simidu, U., Tsukamoto, K., Shida, Y. & Hashimoto, K., 1989. Tetrodotoxin-producing bacteria from the blue-ringed octopus *Octopus maculosus*. *Mar. Biol.*, **100**, 327–332.
- Isobe, M., Ichikawa, Y. & Goto, T., 1986. Synthetic studies toward marine toxic polyethers (5) The total synthesis of okadaic acid. *Tetrahedron Lett.*, **27**, 963–966.

- Ikawa, M., Sasner, J., J., Mosley, S., P. & Schaper, T., D., 1989. Toxins and pteridines in cultures of the blue-green alga *Aphazinomenon flos-aqua*. In : *Mycotoxins and phycotoxins*' 88. Natori, S., Hashimoto, J. & Ueno, Y., Eds., Elsevier, New York, 383–390.
- Karunasagar, I., Segar, K. & Karusanagar, I., 1989. Incidence of PSP and DJSP in shellfish along the coast of Karnataka Bay (India). In : *Red Tides : biology, environmental science and toxicology*, Okaichi & Nemoto, Eds., Elsevier Science Publishers, 61–64.
- Kat, M., 1979. The occurrence of *Prorocentrum* species and coincidental gastrointestinal illness of mussel consumers. In : *Toxic Dinoflagellate blooms*. Taylor, D., L. & Seliger, H., H., Eds. Elsevier, North Holland, 215–222.
- Kat, M., 1983. *Dinophysis acuminata* blooms in the Dutch coastal area related to diarrhetic mussel poisoning in the Dutch Waddensea. *Sarsia*, **68**, 81–84.
- Keller, M. D. & Guillard, R., R., L., 1985. Factors significant to marine dinoflagellate culture. In : *Toxic dinoflagellates*. Anderson, D. M., White, A. W. & Baden D. G., Eds. Elsevier New York, 113 – 116.
- Kjelleberg, S., Flardh, K., B., G., Nystrom, T., Moriarty, D., J., W., 1993. Growth limitation and starvation of bacteria. In : *Aquatic Microbiology : An Ecological Approach* . Ford, T., E., Ed., Blackwell Scientific Publications, Cambridge, 289–320.
- Kodama, I., Kondo, N. & Shibata, S., 1986. Electromechanical effects of okadaic acid isolated from black sponge in guinea-pig ventricular muscles. *J. Physiol.*, **378**: 359–373.
- Kodama, M., Ogata, T. & Sato, S., 1988. Bacterial production of saxitoxin. *Agric. Biol. Chem.*, **52**, (4), 1075–1077.
- Kodama, M., Ogata, T. & Sato, S., 1989. Saxitoxin-producing bacterium isolated from *Protogonyaulax tamarensis*. In : *Red Tides : biology, environmental science and toxicology*, Okaichi & Nemoto, Eds., Elsevier Science Publishers, 363–366.
- Kodama, M., Ogata, T., Sakamoto, S., Sato, S., Honda, T. & Miwatani, T., 1990. Production of paralytic shellfish toxins by a bacterium *Moraxella* sp. isolated from *Protogonyaulax tamarensis*. *Toxicon* , **28** (6), 707–714.
- Kodama, M., Ogata, T., Sato, S. & Sakamoto, S., 1990. Possible association of marine bacteria with paralytic shellfish toxicity of bivalves. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **61**, 203–206.
- Kodama, M., Sato, S. & Ogata, T., 1993. *Alexandrium tamarensis* as a source of tetrodotoxin in the scallop *Pactinopecten yessoensis*. In : *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*, Smayda, T., J. & Shimizu, Y., Eds., Elsevier Science Publishers B. V., 401–406.
- Komori, A., Yatsunami, J., Sukanuma, M., Okabe, S., Abe, S., Sakai, A., Sasaki, K. & Fujiki H., 1993. Tumor necrosis factor acts as a tumor promoter in BALB/3T3 cell transformation. *Cancer Res.*, **53** : 1982 – 1985.
- Krogh, P., Edler, L., Graneli, E. & Nyman, U., 1985. Outbreak of diarrhetic shellfish poisoning on the west coast of Sweden. In: *Toxic dinoflagellates*. Anderson, D., M., White, A., W. & Baden, D., G., Eds., Elsevier, New York, 501–503.

- Lafay, B., Ruimy, R., Rausch de Trautenberg, C., Breitmayer, V. & Gauthier, M.J., 1995. *Roseobacter algicola* sp. nov., a new marine bacterium isolated from the phycosphere of the toxin-producing dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **45** (2), 290–296.
- Lassus, P., Bardouil, M., Berthomé, J.-P., Maggi, P., Truquet, P. & Le Dean L., 1988. Seasonal occurrence of *Dinophysis* sp., along the French coast between 1983 and 1984. *Aquat. Living. Res.*, **1**, 155–164.
- Lassus, P., 1988. *Plancton toxique et plancton d'eaux rouges sur les côtes européennes*. IFREMER, 111 pp.
- Lee, J.S., Yanagi, T., Kenma, R. & Yasumoto, T., 1987. Fluorometric determination of diarrhetic shellfish toxins by high-performance liquid chromatography. *Agric. Biol. Chem.* **51** (3) : 877–881.
- Lee, J., S., Murata, M. & Yasumoto, T., 1989. Analytical methods for determination of diarrhetic shellfish toxin. In : *Mycotoxins and phycotoxins' 88*. Natori, S., Hashimoto, J. & Ueno, Y., Eds., Elsevier, New York, 327–333.
- Lucocq, J., Warren, G. & Pryde, J., 1991. Okadaic acid induces golgi apparatus fragmentation and arrest of intracellular transport. *J. Cell. Sc.*, **100**, 753–759.
- Marcaillou–Le Baut, C., & Lassus, P., 1984. Intoxication diarrhéiques par les coquillages sur les côtes françaises en 1983. Implication de *Dinophysis acuminata* comme agent responsable. CIEM, C.M., E : 16.
- Marcaillou–Le Baut, C., Lucas, D. & Le Dean, L., 1985. *Dinophysis acuminata* toxin : status of toxicity bioassays in France. In : *Toxic dinoflagellates*. Anderson, D., M., White, A., W. & Baden, D., G., Eds., Elsevier, New York, 485–488.
- Marcaillou–Le Baut, C. & Masselin P., 1990. Recent data on Diarrhetic Shellfish Poisoning in France. In : *Toxic Marine Phytoplankton*, Granéli, et al., Eds., Elsevier Science Publishers, 487–492.
- Masselin, P., Lassus, P. & Bardouil, M., 1992. High performance liquid chromatography analysis of diarrhetic toxins in *Dinophysis* spp. from the French coast. *J. Appl. Phycology*, **4**, 385–389.
- Mironov, S.L. & Lux, H.D., 1991. Calmodulin antagonists and protein phosphatase inhibitor okadaic acid fasten the "run-up" of high voltage activated calcium current in rat hippocampal neurones. *Neurosci. Lett.*, **133**, 175–178.
- Murakami, Y., Oshima, Y. & Yasumoto, T., 1982. Identification of okadaic acid as a toxic component of a marine dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **48**, 69–72.
- Murata, M., Shimatani, M., Sugitani, H., Oshima, Y. & Yasumoto, T., 1982 Isolation and structural elucidation of the causative toxin of the diarrhetic shellfish poisoning. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **48**, 549–552.
- Murata, M., Sano, M., Iwashita, T., Naoki, H. & Yasumoto, T., 1986. The structure of pectenotoxin-3, a new constituent of diarrhetic shellfish toxins. *Agric. Biol. Chem.* , **50**, 2693.

- Murata, M., Kumagai, M., Lee, J., S. & Yasumoto, T., 1987. Isolation and structure of Yessotoxin, a novel polyether compound implicated in diarrhetic shellfish poisoning. *Tetrahedron Lett.*, **28**, 5869–5872.
- Neumann, J., Boknik, P., Herzig, S., Schmitz, W., Scholz, H., Gupta, R.C. & Watanabe, A.M., 1993. Evidence for physiological functions of protein phosphatases in the heart: evaluation with okadaic acid. *Am. J. Physiol.*, **265**, H257–H266.
- Oda, T., Akaike, T., Sato, K., Ishimaru, A., Takeshita, S., Muramatsu, T. & Maeda, H., 1992. Hydroxyl radical generation by red tide algae. *Arch. Biochem. Biophys.*, **294**, 38–43.
- Ogata, T., Kodama, M. & Ishimaru, T., 1987. Toxin production in the dinoflagellate *Protogonyaulax tamarensis*. *Toxicon*, **25** (9), 923–928.
- Ogata, T., Sato, S. & Kodama, M., 1989. Paralytic shellfish toxins in bivalves which are not associated with dinoflagellates. *Toxicon*, **27**, 1241–1244.
- Ogata, T., Kodama, M., Komaru, K., Sakamoto, S., Sato, S. & Simidu, U., 1990. Production of paralytic shellfish toxins by bacterial isolated from toxic dinoflagellates. In : *Toxic Marine Phytoplankton*, Graneli, E., Sundström, B., Edler, L., Anderson, D., Eds., Elsevier Science, Publisher, New York, 311–315
- Ozaki, H. & Haraki, H., 1989. Effect of marine sponge toxin, Okadaic acid, on smooth muscle contractibility. In : *Mycotoxins and phycotoxins' 88*. Natori, S., Hashimoto, J. & Ueno, Y., Eds., Elsevier, New-York, 445–452.
- Painchaud, J. & Therriault, J., C., 1989. Relationships between bacteria, phytoplankton and particulate organic carbon in the upper St. Lawrence estuary. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **56**, 301–311.
- Pleasance, S., Quilliam, M. & Marr, J. C., 1992. Ionspray mass spectrometry of marine toxins. IV. Determination of diarrhetic shellfish poisoning toxins in mussel tissue by liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass. Spectrom.*, **6**, 121–127.
- Pondaven, P., Meijer, L. & Bialojan, C., 1989. La micro-injection d'acide okadaïque, un inhibiteur de phosphoprotéine phosphatases, induit la maturation de l'ovocyte d'étoile de mer. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **309**(3), 563–569.
- Quilliam, M.A., 1995. Analysis of diarrhetic shellfish poisoning toxins in shellfish tissue by liquid chromatography with fluorimetric and spectrometric detection. *J. AOAC Int.*, in press.
- Rausch de Traubenberg, C. & Lassus, P., 1991. Dinoflagellate toxicity: are marine bacteria involved ? Evidence from the literature. *Marine Microbial Food Webs*, **5** (2), 205–226.
- Rausch de Traubenberg, C., 1993. Interactions entre un dinoflagellé et sa microflore bactérienne associée : rôle des bactéries dans la toxicité de *Procentrum lima* Ehrenberg (Dodge). Thèse de doctorat. Université de Nantes. 224 p.
- Ray, S., M. & Wilson, W., B., 1957. The effect of unialgal and bacteria-free cultures of *Gymnodinium brevis* on fish and notes on related studies with bacteria. Fisheries U. S. Fish and Wildlife Service , special report, **211**, Washington D. C., U. S..
- Raymont, J., E., G., 1963. Plankton and productivity in the oceans. Oxford Pergamon Press, 660 pp.

- Romalde, J., L., Toranzo, A., E. & Barja, J., L., 1990. Changes in bacterial populations during red tides caused by *Mesodinium rubrum* and *gymnodinium catenatum* in north west coast of Spain. *J. Appl. Bacteriol.*, **68**, 123–132.
- Sasner, J., J., Ikawa, M., Foxall, L., T., 1984. Studies on *Aphanizomenon* & *Microcystis* toxins. In : *Seafood Toxins*. Ragelis, Ed., 391.
- Sassa, T., Richter, W., W., Uda, N., Suganuma, M., Suguri, H., Yoshizawa, S., Hirota, M & Fujiki, H., 1989. Apparent "activation" of protein kinases by okadaic acid class tumor promoters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **159**(3), 939–944.
- Sawayama, S., Sako, Y. & Ishida, Y., 1989. Mating inhibitor from *Alcaligenes* sp. against a toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*. In: *Current topics in marine biotechnology*, Niyachi, Y., Karube, I. and Y; Ishida, Eds., Jap. Soc. Mar. Biotechnology, Tokyo, 181–184.
- Sawayama, S., Sako, Y., Ishida, Y., Niimura, K., Abe, A & Hiroishi, S., 1991. Purification and structure determination of the bacterial mating inhibitor for *Chlamydomonas reinhardtii* and *Alexandrium catenella*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **57** (2), 307–314.
- Sawayama, S., Sako, Y. & Ishida, Y., 1993. Bacterial inhibitors for the mating reaction of *Alexandrium catenella* (Dinophyceae). In : *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*, Smayda, T., J. & Shimizu, Y., Eds., Elsevier Science Publishers B. V., 177–181.
- Séchet, V., 1990. Toxification mechanism and toxin composition of Diarrhetic Shellfish Poisoning. Thèse de l'Université du Tohoku, Japon, 89 pp.
- Shiba, T., 1991. The genus *Roseobacter*. In : *The Prokaryotes Second Edition. A handbook on the Biology of Bacteria :Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*. Balows, A., Truper, H., G., Dworkin, M., Harder, W. and K.H., Schleifer, Eds., Springer-Verlag, 2156–2159.
- Shibata, S., Kodama, I. & Karaki, H., 1990. Effect of okadaic acid on smooth and heart muscle. *Jikken Igaku*, **8** (10), 1214–1219.
- Silva, E., S., 1978. Endonuclear bacteria in two species of dinoflagellates. *Protistologica*, **14**, 113–119.
- Silva, E., S. & Sousa, I., 1981. Experimental work on the dinoflagellate toxin production. In : Proc. Vth Intern. Congr. of Protozoology, Warsaw, 381–387.
- Silva, E., S., 1982. Relationship between dinoflagellate and intracellular bacteria. *Marine Algae in Pharmaceutical Science*, Vol. 2, Walter de Gruyter & Co., Berlin. New-York, 269–288.
- Silva, E., S. & Franca, S., 1985. The association dinoflagellate–bacteria: Their ultrastructural relationship in two species of dinoflagellates. *Protistologica*, **XXI** (4), 429–446.
- Simidu, U., Noguchi, T., Hwang, D., F., Shida, Y. & Hashimoto, K., 1987. Marine bacteria which produce tetrodotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 1781–1790.
- Suganuma, M., Tatematsu, M., Yastunami, J., Yoshizawa, S., Okabe, S., Uemura, D. & Fujiki, H., 1992. An alternative theory of tissue specificity by tumor promotion of okadaic acid in glandular stomach of SD rats. *Carcinogenesis*, **13** (10), 1841–1845.

- Tachibana, K., Scheuer, P., J., Tsukitani, Y., Kikuchi, H., Van Engen, D., Clardy, J., Gopichand, Y. & Schmitz, F., 1981. Okadaic acid, a cytotoxic polyether from two marine sponges of the genus *Halichondria*. *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 2469–2471.
- Takai, A., Bialojan, C., Troschka, M. & Rueegg, J-C., 1987. Smooth muscle myosin phosphatase inhibition and force enhancement by black sponge toxin. *F E B S Lett.*, **217**, 81–4.
- Tamplin, M., L., 1990. A bacterial source of tetrodotoxins and saxitoxins. In : *Marine Toxins : Origin, Structure and Molecular Pharmacology, ACS Symp. Ser.*, 418, Hall, S. & Strichartz, G., Eds., Amer. Chem. Soc., Washington, D. C., 78–85.
- Terao, K., Ito, E., Yanagi, T. & Yasumoto, T., 1986. Histopathological studies on experimental marine toxin poisoning. I. Ultrastructural changes in the small intestine and liver of suckling mice induced by dinophysistoxin-1 and pectenotoxine-1. *Toxicon*, **24**(11–12), 1141–1151.
- Terao, K., Ito, E., Ohkusu, M. & Yasumoto, T., 1993. A comparative study of the effects of DSP-toxins on mice and rats. In : *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*, Smayda, T., J. & Shimizu, Y., Eds., Elsevier Science Publishers, 581–586.
- Tomas, C., R. & Baden, D., G., 1993. The influence of phosphorus source on the growth and cellular toxin content of the benthic dinoflagellate *Prorocentrum lima*. In : *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*, Smayda, T., J. & Shimizu, Y., Eds., Elsevier Science Publishers B. V., 565–570.
- Torigoe, K., Murata, M. & Yasumoto, T., 1988. Prorocentrolide, a toxic nitrogenous macrocycle from a marine dinoflagellate, *Prorocentrum lima*. *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 7877–7878.
- Tosteson, T., R., Ballantine, D., L., Tosteson, C., G., Hensley, V. & Bardales, A., 1986. Associated bacterial flora, growth and toxicity of cultured benthic dinoflagellates *Ostreopsis lenticularis* & *Gambierdiscus toxicus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 137–141.
- Tosteson, T., R., Ballantine, D., L., Tosteson, C., G., Hensley, V. & Bardales, A., T., 1989. Associated bacterial flora, growth, and toxicity of cultured benthic dinoflagellates *Ostreopsis lenticularis* and *Gambierdiscus toxicus*. *Appl. Env. Microb.*, 137–141.
- Trick, C., G., Andersen, R., J. & Harrison, P., J., 1984. Environmental factors influencing the production of an antibacterial metabolite from a marine dinoflagellate, *Prorocentrum minimum*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **41**, 423–432.
- Vandre, D., D. & Wills, V., L., 1992. Inhibition of mitosis by okadaic acid : possible involvement of a protein phosphatase 2A in the transition from metaphase to anaphase; *J. Cell. Sci.*, **101**, 79–91.
- Wang, R., Maranda, L., Hargraves, P. E. & Shimizu, Y., 1993. Chemical variation of *Nitzschia pungens* as demonstrated by the co-occurrence of domoic acid and bacillariolides. In : *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*, Smayda, T., J. & Shimizu, Y., Eds., Elsevier Science Publishers, 637 – 641.
- Yasumoto, T., Oshima, Y., Sugawara, W., Fukuyo, Y., Oguri, H., Igarashi, T. & Fujita, N., 1980. Identification of *Dinophysis fortii* as the causative organism of diarrhetic shellfish poisoning. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* **46** (11) : 1405 – 1411.

- Yasumoto, T., Oshima, Y. & Yamaguchi, M., 1978. Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the Tohoku district. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **44** (11), 1249–1255.
- Yasumoto, T., 1981. Method for the bioassay of diarrhetic shellfish toxin; *Shokukin Eisei Kenkyu*, **31**, 515–522.
- Yasumoto, T., Murata, M., Lee, J-S. & Torigoe, K., 1989. Polyether toxins produced by dinoflagellates. In: *Mycotoxins and phycotoxins' 88*. Natori, S., Hashimoto, J. & Ueno, Y., Eds., Elsevier, New York, 375–382.
- Yasumoto, T. & Murata, M., 1990. Polyether toxins evolved in seafood poisoning. In : *Marine toxins : origin, structure and molecular pharmacology*. Hall, S. & Strichartz, G., Eds., *Am. Chem. Soc.*,
- Yasumoto, T. & Murata, M., 1993. Marine Toxins *Chem. Rev.*, **93**, 1897 – 1909.
- Yotsu, M., Yamazaki, T., Meguro, Y., Endo, A., Murata, M., Naoki, H. & Yasumoto, T., 1987. Production of tetrodotoxin and its derivatives by *Pseudomonas sp.* isolated from the skin of a puffer fish. *Toxicon*, **25** (2), 225–228.
- Yuasa, H., Yoshida, K., Iwata, H., Naganishi, H., Suganuma, M. & Tatematsu, M., 1994. Increase of labeling indices in gastrointestinal mucosae of mice and rats by compounds of the okadaic acid type. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **120**: 208–212.
- Zhou, J. & Fritz, L., 1993. Ultrastructure of two marine dinoflagellates, *Prorocentrum lima* and *Prorocentrum maculosum*. *Phycologia*, **32** (6), 444–450.