

# THÈSE

Pour obtenir le grade de  
Docteur

Délivré par l'**Université Montpellier**

Préparée au sein de l'école doctorale *SIBAGUE*

Spécialité : *Biologie des Populations et Ecologie*

Présentée par **Eric ABADIE**

**Etude de *Vulcanodinium rugosum*  
(Dinoflagellé producteur de  
pinnatoxines) se développant dans la  
lagune méditerranéenne  
de l'Ingril.**

Soutenue le 15 décembre 2015 devant le jury composé de

Mr Patrick BERREBI, DR, CNRS  
Mme Catherine ALAUME, Pr, UM  
Mme Nathalie SIMON, MC, UPMC  
Mr Rodolphe LEMEE, MC, UPMC  
Mr Raffaele SIANO, CR, IFREMER  
Mr Guy CHARMANTIER, Pr, UM  
Mr Mohamed LAABIR, MC, UM  
Mr Nicolas CHOMERAT, CR, IFREMER

Président du jury  
Examineur  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Directeur de Thèse  
Co-Directeur de Thèse



**A mon papa**

## Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier chaleureusement les Docteurs Nathalie Simon et Rodolphe Lemée d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs.

Je remercie également les membres examinateurs la Professeure Catherine Aliaume, le Professeur Guy Charmantier et les Docteurs Patrick Berrebi et Raffaele Siano pour le temps consacré à l'examen de cette thèse et pour leur amitié.

Ce travail de thèse n'aurait pas pu être réalisé sans le soutien et la confiance que m'a accordés mon Institut, l'Ifremer. Je tiens tout particulièrement à remercier Luc Drèves, mon Responsable d'Unité à l'époque de son implication et de son amitié.

Cette thèse a bénéficié de l'aide financière de l'Agence de L'Eau Rhône Méditerranée Corse, je remercie tout particulièrement Pierre Boissery de m'avoir fait confiance. De même, ces travaux ont été réalisés grâce au soutien financier de la Direction Générale de L'Alimentation du Ministère de l'Agriculture et de la Pêche. Je tiens à souligner également la contribution de la Fondation TOTAL dans le cadre du projet LAGUNOTOX.

**Une thèse est un parcours initiatique ô combien stimulant mais parsemé d'embûches, de doutes... Sans le soutien et l'amitié indéfectible de mon directeur de Thèse Mohamed Laabir, ce travail n'aurait jamais pu être mené à bien. Il a su me conseiller et me stimuler pour m'amener au bout de ce chemin et me permettre d'emprunter une nouvelle route tournée vers la Recherche.**

Je remercie aussi mon amie, Estelle Masseret qui a su m'accompagner et m'encourager tout au long de ces travaux malgré la distance et ses obligations déjà très prenantes. Merci pour son aide très précieuse dans la correction de ce manuscrit.

Je tenais aussi à remercier chaleureusement et amicalement le Dr Nicolas Chomérat mon co-directeur de thèse pour son aide et ses conseils tout au long de ce travail. Je n'oublierai pas l'hospitalité bretonne du laboratoire de Concarneau lors de mes différents passages. Merci Gwenaël !

Mon souhait d'évoluer vers des activités de recherche remonte à une dizaine d'année. Cette transition n'aurait pas pu se faire sans la collaboration privilégiée que j'ai noué avec le Laboratoire PHYC de l'Ifremer de Nantes. Je remercie les Dr Zouher Amzil et Philipp Hess pour leurs soutiens scientifique et amical. Leur participation à mon comité de thèse aura été précieuse.

La thèse est aussi une occasion de tisser des liens avec de nouveaux scientifiques. La collaboration très fructueuse avec les deux doctorants du laboratoire de PHYC, Zita Zendong et Damien Réveillon restera un excellent souvenir.

Merci à l'équipe Efflorescences Toxiques et Diversité Algale en particulier Yves Collos et à l'UMR ECOSYM pour l'accueil sur le site de Montpellier.

Un grand merci aussi à toute l'équipe du Laboratoire Environnement – Ressources du Languedoc-Roussillon de Sète pour leur amitié, leur soutien et leur patience ! Merci à Claude et Tom pour avoir su m'encourager et s'arranger de mes moments d'indisponibilité.

Mais par-dessus tout, cette aventure n'aurait pas été possible sans le soutien, les encouragements, la patience ...et bien plus encore de Mireille mon épouse qui m'accompagne depuis plus de 30 ans, de mes filles Audrey et Caroline et de ma maman.

# Table des matières

<b>Liste des publications période 2012-2015</b> .....	1
<b>Préambule</b> .....	4
<b>Introduction</b> .....	7
1. Les efflorescences de microalgues toxiques ou nuisibles .....	7
1.1 Problématique .....	7
1.2. Expansion des HABs.....	8
1.3. Déterminisme des efflorescences algales .....	11
1.4. Impacts des HABs sur les écosystèmes, l'économie et la santé humaine .....	13
2. Classification des phycotoxines.....	17
2.1. Classification selon les symptômes observés chez l'homme .....	17
2.2. Classification selon les familles de toxines .....	20
2.3. Méthodes d'analyses des toxines lipophiles.....	31
3. Les Dinoflagellés.....	34
3.1 Écologie et distribution des Dinoflagellés.....	36
3.2 Cycle de vie .....	37
4 Le dinoflagellé : <i>Vulcanodinium rugosum</i> .....	39
4.1 Taxonomie .....	39
4.2 Distribution géographique .....	45
5 Description de la zone d'étude : les lagunes Méditerranéennes .....	46
5.1 Généralité.....	46
5.2. Les lagunes en Languedoc-Roussillon .....	47
5.3. La lagune de l'Ingril.....	50
5.4 Les HAB dans les lagunes méditerranéennes .....	53
6. Objectifs de la thèse.....	57
<b>Chapitre I : <i>Vulcanodinium rugosum</i> et les pinnatoxines dans la lagune d'Ingril</b> .....	60
1. Cycle de vie de <i>Vulcanodinium rugosum</i> .....	60
2. Toxines et toxicité de <i>V. rugosum</i> .....	65
3. Développement de <i>Vulcanodinium rugosum</i> dans la lagune de l'Ingril.....	69
3.1. Origine de la mise en évidence de la contamination par les pinnatoxines .....	69
3.2 Mise en place de projets de recherche spécifiques aux pinnatoxines dans Ingril.....	70

<b>Chapitre II : Effet des facteurs environnementaux sur la biologie de <i>Vulcanodinium rugosum</i>, étude écophysologique</b> .....	75
1. Contexte et objectifs de l'étude .....	75
2. Résumé des articles.....	76
2.1. Croissance et production de toxines chez <i>Vulcanodinium rugosum</i> (Dinoflagellé se développant dans la lagune méditerranéenne d'Ingril) en fonction de la température et de salinité variables. ....	76
2.2. Effet des nitrates, ammonium et urée sur la croissance et la production de pinnatoxine G chez <i>Vulcanodinium rugosum</i> . ....	77
3. Article : Toxin and growth responses of <i>Vulcanodinium rugosum</i> to varying temperature and salinity conditions.....	79
1. Introduction .....	81
2. Materials and Methods.....	85
3. Results .....	88
4- Discussion and conclusion .....	96
4. Article : Effect of nitrate, ammonium and urea on growth and Pinnatoxin G production of <i>Vulcanodinium rugosum</i> . ....	110
1. Introduction .....	112
2. Results and Discussion.....	114
3. Experimental Section .....	121
Conclusions .....	124
<b>Chapitre III : Distribution spatio-temporelle de <i>Vulcanodinium rugosum</i> dans la lagune d'Ingril et principaux facteurs déterminant sa dynamique in situ</b> .....	132
1. Contexte et objectifs de l'étude .....	132
2. Résumé de l'article : Distribution spatio-temporelle de <i>Vulcanodinium rugosum</i> et principaux facteurs déterminant sa dynamique in situ .....	133
3. Article : Occurrence of the neurotoxic dinoflagellate <i>Vulcanodinium rugosum</i> in Mediterranean: What are the driving environmental factors of its dynamic ?.....	135
1. Introduction .....	137
2. Materials and methods.....	139
3. Results .....	141
4. Discussion .....	149
5. Conclusion.....	153
<b>Chapitre IV : Toxicité atypique due à la Pinnatoxine G (PnTX-G) produite par <i>Vulcanodinium rugosum</i>. Evaluation d'une méthode d'échantillonnage passif des des toxines lipophiles et des PnTX-G présentes dans la colonne d'eau</b> .....	162

1. Contexte et objectifs de l'étude .....	162
2. Résumé des articles.....	164
2.1 La pinnatoxine G responsable de toxicité atypique dans la moule <i>Mytilus galloprovincialis</i> , l'huitre <i>Crassostrea gigas</i> et la palourde <i>Venerupis decussata</i> de la lagune méditerranéenne de l'Ingril. ....	164
2.2. Evaluation des résines polymériques et lipophiliques pour l'échantillonnage passif des toxines marines .....	165
3. Article : Pinnatoxin G is responsible for atypical toxicity in mussels ( <i>Mytilus galloprovincialis</i> ) and clams ( <i>Venerupis decussata</i> ) from Ingril, a French Mediterranean lagoon.....	167
1. Introduction .....	169
2. Materials and methods.....	172
3. Results and discussion .....	178
4. Conclusions .....	189
4. Article : Extended evaluation of polymeric and lipophilic sorbents for passive sampling of marine toxins .....	199
1. Introduction .....	202
2. Materials and methods.....	206
3. results .....	213
4. Discussion and conclusion.....	223
<b>CHAPITRE V : Contamination des coquillages par <i>Vulcanodinium rugosum</i> et les pinnatoxines :</b> .....	236
<b>- Distribution spatiale de la pinnatoxine G dans les moules de cinq lagunes méditerranéennes françaises.....</b>	236
<b>- Impacts de <i>Vulcanodinium rugosum</i> sur la filtration de deux mollusques d'intérêt aquacole (<i>Crassostrea gigas</i> et <i>Mytilus galloprovincialis</i>) et viabilité de ce dinoflagellé après transit stomacal chez ces mollusques. ....</b>	236
1. Contexte des études .....	236
1.1 <i>Vulcanodinium rugosum</i> , pinnatoxines et contamination des mollusques.....	237
1.2 Survie des dinoflagellés toxiques au passage par le tractus digestif des mollusques, vecteurs de contaminations de nouvelles zones lagunaires.....	238
1.3 Objectifs des études .....	238
2. Distribution spatiale de la pinnatoxine G dans les moules de cinq lagunes méditerranéennes françaises .....	239
2.1 Matériels et méthodes.....	239
2.2 Résultats et discussion.....	244

3. Impact de <i>Vulcanodinium rugosum</i> sur la filtration de deux mollusques d'intérêt aquacole ( <i>Crassostrea gigas</i> et <i>Mytilus galloprovincialis</i> ) et viabilité de ce dinoflagellé après transit stomacal chez ces mollusques.....	246
3.1 Matériels et méthodes.....	246
3.2 Résultats.....	250
3.2.1. Evolution de la concentration de <i>V.rugosum</i> en présence des mollusques et taux de filtration .....	251
3.2.2. Détermination des propriétés de filtration de <i>Vulcanodinium rugosum</i> par les deux mollusques bivalves .....	252
3.2.3. Viabilité des cellules de <i>Vulcanodinium rugosum</i> après transit dans le tractus digestif chez les mollusques filtreurs.....	253
3.2.4. Mesure des toxines dans les tissus des deux mollusques .....	255
3.3 Discussion .....	257
4. Conclusion.....	259
<b>Conclusions générales et perspectives .....</b>	<b>264</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>272</b>
Résumé	291
Summary	291



## Liste des sigles

AERMC :	Agence de l'Eau Rhône Méditerranée Corse
ALCAT :	Action Ifremer ALexandrium CATenella
ANOVA :	Analyse de variance
ANR :	Agence Nationale de la Recherche
AO :	Acide Okadaïque
ASP :	Amnesic Shellfish Poisoning
AZA :	Azaspiracides
AZP :	AZaspiracid Poisoning
BMAALS :	Première étude en France du lien possible entre Sclérose Latérale Amyotrophique et la cyanotoxine BMAA
CE :	Commission Européenne
CFP :	Ciguatera Fish Poisoning
CIEM :	Conseil International pour l'Exploration de la Mer
CNRS :	Centre National de la Recherche Scientifique
DGAL :	Direction Général de l'ALimentation
DMENO :	Dose Minimale avec Effet Nocif Observé
DSP :	Diarrhetic shellfish poisoning
DTXs :	Dinophysistoxines
EC2CO :	Initiative structurante Écosphère Continentale et Côtière
ECOSYM :	Laboratoire Écologie des systèmes marins côtiers
ENSW :	Enriched Natural Sea Water
ETDA :	Efflorescence Toxique et Diversité Algale
EUROHAB :	European Science Initiative on Harmful Algal Blooms
FAO :	Food and Agriculture Organization of the United Nations
IOC :	The Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO
ISEM :	Institut des Sciences de l'Evolution de Montpellier

WHO :	World Health Organization
FAT :	Fast Acting Toxins
FISH :	Fluorescence In Situ Hybridization
GD :	Glande Digestive
GEOHAB :	Research Programme on the Global Ecology and oceanography of Harmful Algal Blooms
GYM :	Gymnodimine
HAB :	Harmful Algal Blooms
HT :	Hors Taxes
IFREMER :	L'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer
INVS :	Institut National de Veille Sanitaire
LAGUNOTOX :	LAGUNes méditerranéennes et risque d'espèces TOXiques émergentes
LC-MS/MS :	méthode de dosage chimique par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem
LD <sub>50</sub> :	Lethal Dose, 50%
LOAEL :	lowest-observed-adverse-effect level
LR-UE :	Laboratoire de Référence – Union Européenne
LSU rDNA :	Large Sub Unit ribosomal DNA
m/z :	rapport masse sur charge
MARBEC :	Unité mixte de Recherche MARine Biodiversity, Exploitation and Conservation
MBA-LOD :	Mouse Bioassay – Limite Of Detection
MICROTOXEM :	Etudes des espèces MICROalgales TOXiques EMergentes dans les lagunes du Languedoc-Roussillon.
N :P :	Rapport Azote sur Phosphore
N :Si :	Rapport Azote sur Silice
NH <sub>4</sub> :	Ammonium
NID/DIN :	Azote Inorganique Dissout
NO <sub>2</sub> :	Nitrite
NO <sub>3</sub> :	Nitrate
NSP :	Neurologic Shellfish Poisoning

ODE :	Département Océanographie et Dynamique de l'Environnement
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
PHYC :	Laboratoire PHYCotoxines Ifremer Nantes
PnTX-G :	Pinnatoxine G
PNUE :	Programme des Nations Unies pour l'environnement
PSP :	Paralytic Shellfish Poisoning
PST :	Paralytic Shellfish Toxins
PTX :	Pectenotoxines
PTX2 :	Pectenotoxine 2
PTX2sa :	Pectenotoxine 2 seco-acide
qPCR :	PCR (polymerase chain reaction) quantitative
REPHY :	REseau PHYtoplancton – phycotoxines de l'Ifremer
SLA :	Syndrome Latéral Amyotrophique
SMBT :	Syndicat Mixte de Bassin de Thau
SMNLR :	Service Maritime de Navigation du Languedoc-Roussillon
SPATT :	Solid-phase adsorption toxin tracking
SPX :	Spirolide
SPX 13desMe C :	Spirolide 13 desmethyl C
TN :	Total Nitrogen
TP :	Total Phosphorus
UE :	Union Européenne
UL :	Unité Littorale
UMR :	Unité Mixte de Recherche
YTX :	Yessotoxines

## Liste des publications période 2012-2015

### 1. Publications issues du travail de thèse (2012-2015)

#### Publiées :

Hess, P., **Abadie, E.**, Herve, F., Berteaux, T., Sechet, V., Araoz, R., Molgo, J., Zakarian, A., Sibat, M., Rundberget, T., Miles, C.O., Amzil, Z., **2013**. Pinnatoxin G is responsible for atypical toxicity in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and clams (*Venerupis decussata*) from Ingril, a French Mediterranean lagoon. **Toxicon** 75, 16-26

Zendong, Z., Herrenknecht, C., **Abadie, E.**, Brissard, C., Tixier, C., Mondeguer, F., Sechet, V., Amzil, Z., Hess, P., **2014**. Extended evaluation of polymeric and lipophilic sorbents for passive sampling of marine toxins. **Toxicon** 91, 57-68.

**Abadie, E.**, Kaci, L., Berteaux, T., Hess, P., Sechet, V., Masseret, E., Rolland, J., Laabir, M., **2015**. Effect of Nitrate, Ammonium and Urea on Growth and Pinnatoxin G Production of *Vulcanodinium rugosum*. **Marine Drugs** 13(9), 5642.

#### Soumise ou en préparation:

**Abadie, E.**, Muguet, A., Berteaux, T., Chomérat, N., Hess, P., Roque D'OrbCastel, E., Masseret, E., Laabir, M., Toxin and growth responses of *Vulcanodinium rugosum* to varying temperature and salinity conditions. **Journal of Plankton Research** Soumis le 23 novembre **2015**.

Zendong, Z., Bertrand, S., Herrenknecht, C., **Abadie, E.**, Jauzein, C., Lemée, R., Gouriou, J., Amzil, Z., Hess, P., Passive sampling and high resolution mass spectrometry for chemical profiling of French coastal areas with a focus on marine biotoxins. **Environmental Science & Technology** Soumis le 10 octobre 2015

**Abadie, E.**, Rhodes, L., Chomérat, N., Chiantella, C., Crottier, A., Laabir, M., 2015. Occurrence of the neurotoxic dinoflagellate *Vulcanodinium rugosum* in Mediterranean : What are the driving environmental factors of its dynamic ? En préparation. A soumettre à **Harmful Algae**, novembre 2015

## 2. Publications en rapport avec des projets de recherche auxquels j'ai collaboré durant ma thèse (2012-2015)

### 2.1. Collaborations avec l'équipe ETDA ex-ECOSYM (Action ALCAT IFREMER, FRB 2009 INVALEX, EC2CO 2010: Etude d'*Alexandrium catenella* dans la lagune de Thau et en Méditerranée)

- 1- Laabir, M., Collos, Y., Masseret, E., Grzebyk, D., **Abadie, E.**, Savar, V.r., Sibat, M., Amzil, Z., **2013**. Influence of Environmental Factors on the Paralytic Shellfish Toxin Content and Profile of *Alexandrium catenella* (*Dinophyceae*) Isolated from the Mediterranean Sea. **Marine Drugs** 11(5), 1583-1601.
- 2- Hadjadji, I., Frehi, H., Ayada, L., **Abadie, E.**, Collos, Y., **2014**. A comparative analysis of *Alexandrium catenella/tamarensis* blooms in Annaba Bay (Algeria) and Thau lagoon (France); phosphorus limitation as a trigger. **Comptes Rendus Biologies** 337(2), 117-122.
- 3- Laporte, M., Shao, Z., Berrebi, P., **Laabir, M.**, Abadie, E., Faivre, N., Rieuvilleneuve, F., Masseret, E., **2014**. Isolation of 12 microsatellite markers following a pyrosequencing procedure and cross-priming in two invasive cryptic species, *Alexandrium catenella* (group IV) and *A. tamarensis* (group III) (*Dinophyceae*). **Marine Pollution Bulletin** 83(1), 302-305.
- 4- Gowen, R.J., Collos, Y., Tett, P., Scherer, C., Bec, B., **Abadie, E.**, Allen, M., O'Brien, T., **2015**. Response of diatom and dinoflagellate lifeforms to reduced phosphorus loading: A case study in the Thau lagoon, France. **Estuarine, Coastal and Shelf Science** 162, 45-52.

### 2.2. Collaborations dans le Projet ANR BMAALS (2013-2015)

- 5- Masseret, E., Banack, S., Boumédiène, F., **Abadie, E.**, Brient, L., Pernet, F., Juntas-Morales, R., Pageot, N., Metcalf, J., Cox, P., Camu, W., the French Network on, A.L.S.C.D., Investigation, **2013**. Dietary BMAA Exposure in an Amyotrophic Lateral Sclerosis Cluster from Southern France. **PLOS ONE** 8(12), e83406.
- 6- Delzor A., Couratier P., Boumediene F., Nicol M., Druet-Cabanac M., Paraf F., Mejean A., Ploux O., Leleu J-P, Brient L, Lengronne M, Pichon V, Combes A, El Abdellaoui S., Bonnetterre V., Lagrange E., Besson G., Bicout D.J., Boutonnat J, Camu W., Pageot N, Juntas-Morales R, Rigau V., Masseret E., **Abadie E.**, Preux P-M, Marin B. (2014). Searching for a link between the L-BMAA neurotoxin and Amyotrophic Lateral Sclerosis: study protocol of the French BMAALS program. **BMJ Open**
- 7- Réveillon, D., **Abadie, E.**, Séchet, V., Brient, L., Savar, V., Bardouil, M., Hess, P., Amzil, Z., **2014**. Beta-N-Methylamino-l-Alanine: LC-MS/MS Optimization, Screening of Cyanobacterial Strains and Occurrence in Shellfish from Thau, a French Mediterranean Lagoon. **Marine Drugs** 12(11), 5441.
- 8- Réveillon, D., **Abadie, E.**, Séchet, V., Masseret, E., Hess, P., Amzil, Z., **2015**.  $\beta$ -N-methylamino-l-alanine (BMAA) and isomers: Distribution in different food web compartments of Thau lagoon, French Mediterranean Sea. *Marine Environmental Research* 110, 8-18.

**2.3. Collaboration dans le projet EC2CO GIGATOX (Identification chez *Crassostrea gigas*, de gènes marqueurs de contamination par les toxines produites par le dinoflagellé *Alexandrium catenella*)**

- 9- Rolland, J.-L., Medhioub, W., Vergnes, A., Abi-khalil, C., Savar, V., **Abadie, E.**, Masseret, E., Amzil, Z., Laabir, M., **2014**. A Feedback Mechanism to Control Apoptosis Occurs in the Digestive Gland of the Oyster *Crassostrea gigas* Exposed to the Paralytic Shellfish Toxins Producer *Alexandrium catenella*. **Marine Drugs** 12(9), 5035.

## Préambule

Les phénomènes liés aux efflorescences algales nuisibles ou toxiques (HABs) sont connus et étudiés depuis longtemps (Hallegraeff, 1993). Il est maintenant admis que ces blooms impactent de plus en plus les écosystèmes naturels et la santé humaine ce qui nécessite l'étude de leur déterminisme (Hallegraeff, 1993; Sournia et al., 1992). Ces dernières décennies, de nombreuses études ont mis en évidence l'accroissement des phénomènes HABs, en fréquence mais aussi dans leur aire de répartition au niveau mondial (Glibert, 2005; Maso & Garces, 2006; Sellner et al., 2003; Van Dolah, 2000). Ces efflorescences nuisibles ou toxiques impactent les écosystèmes naturels affectant négativement les espèces qui les peuplent (Poulson-Ellestad et al., 2014; Qiu et al., 2014). Ainsi les effets ichtyotoxiques sont régulièrement décrits et provoquent d'importants dégâts écologiques et économiques (Lundgren et al., 2015; Moestrup et al., 2014). Les biotoxines, métabolites secondaires secrétées par certaines espèces phytoplanctoniques impactent négativement l'aquaculture mais aussi peuvent avoir un effet sur la santé humaine à la suite de la consommation notamment des mollusques ayant bioaccumulé ces toxines.

Pour mieux comprendre le déterminisme de ces efflorescences de nombreuses études ont été initiées depuis plus de 15 ans, dans l'étang de Thau en associant des équipes de l'Université de Montpellier 2, du CNRS et de l'Ifremer dans le cadre de nombreux projets de recherche. Les travaux sur *Alexandrium catenella* ont permis d'apporter des connaissances significatives sur la dynamique de ce dinoflagellé dans son milieu aussi bien concernant les cellules végétatives que les kystes de résistance. Ces études ont abouti à une caractérisation de la croissance et de la toxicité de plusieurs souches et établi les constantes écophysiologiques en rapport avec la prise et l'assimilation des différentes sources nutritives minérales et organiques. Dans un travail collaboratif, j'ai apporté mes compétences dans les suivis *in situ* et dans les différentes analyses aux laboratoires.

En 2007, il a été mis en évidence, une toxicité atypique sur souris dans l'étang d'Ingril qui a permis d'identifier les pinnatoxines comme responsables des symptômes neurologiques observés (Hess et al., 2013). Ces pinnatoxines ont été mises en évidence depuis de nombreuses années (Chou et al., 1996). Cependant ce n'est que vers le début des années 2000, que des travaux conséquents ont été

entrepris sur ces toxines et sur la recherche de l'organisme producteur. Cette espèce, *Vulcanodinium rugosum*, a été formellement identifiée dans la lagune d'Ingril en 2010 (Nézan & Chomérat, 2011) alors qu'une contamination par la pinnatoxine G (PnTX-G) était aussi détectée en 2010. Grâce aux liens qui se sont renforcés avec les équipes de l'UMR ECOSYM et à ma connaissance des problématiques liées aux HAB, nous avons initié un travail de thèse pour mener des études sur l'organisme producteur *V. rugosum*. Ces travaux devaient nous permettre de déterminer les facteurs environnementaux influençant ses efflorescences mais aussi de mettre en évidence une possible expansion à d'autres écosystèmes. Ce travail a débuté effectivement en octobre 2011.

Cependant, il m'a été demandé de poursuivre mes activités au laboratoire. Ainsi l'activité de soutien au REPHY et la responsabilité technique de l'unité phytoplancton-phyco toxines (laboratoire accrédité) ont été maintenues. De plus avant mon engagement dans cette thèse, j'ai été sollicité pour participer à différents projets traitant des biotoxines sur l'étang de Thau. Ma participation active dans le projet ANR BMAALS (2013-2015) pour les expérimentations *in situ* et au laboratoire a permis la publication d'un article dans Plos One (cf. liste). Cette problématique concerne l'étude d'une cyanotoxine en relation avec un syndrome médical (SLA) a abouti à la mise en place à l'Ifremer de Nantes d'une thèse sur ce sujet (Damien Reveillon, Ifremer Nantes). J'ai là aussi activement participé aux expérimentations *in situ* et aux analyses notamment du phytoplancton. Ce travail de thèse touche à sa fin (soutenance fin 2015) et a débouché sur la publication de deux articles (cf. liste).

Plus spécifiquement dans le travail de ma thèse et de façon complémentaire j'ai aussi activement collaboré aux travaux de thèse de Z.Zendong (laboratoire ODE/UL/PHYC de l'Ifremer de Nantes). Les expérimentations *in situ* et au laboratoire (phytoplancton, analyse de toxines dans les coquillages...) ont abouti à la publication d'un article et à la soumission récente d'un deuxième (cf. liste).

L'ensemble de ces actions et travaux explique le fait que ma thèse a été réalisée en quatre ans.



Ce travail de thèse a été réalisé entre 2012 et 2015 au sein, du laboratoire Environnement – Ressources du Languedoc-Roussillon de l’Ifremer de Sète et de l’équipe Efflorescences Toxiques et Diversité Algale (ETDA) de l’UMR ECOSYM (maintenant MARBEC).

Pendant cette thèse, j’ai pu co-encadrer deux stagiaires M2 (Lamia Kaci et Alexia Muguet) qui ont contribué aux expérimentations au laboratoire sur *Vulcanodinium rugosum*.

Le financement des travaux réalisés dans ma thèse a été possible grâce au soutien financier, de l’Agence de l’Eau Rhône Méditerranée Corse (AERMC) dans le cadre du projet MICROTOXEM (Etudes des espèces MICROalgales TOXiques EMergentes dans les lagunes du Languedoc - Roussillon), de la Fondation TOTAL dans le cadre du projet LAGUNOTOX et à l’étude financée par la DGAL Direction Générale de l’Alimentation (« Contamination des mollusques bivalves par *Vulcanodinium rugosum*, producteur de Pinnatoxines »).

## Introduction

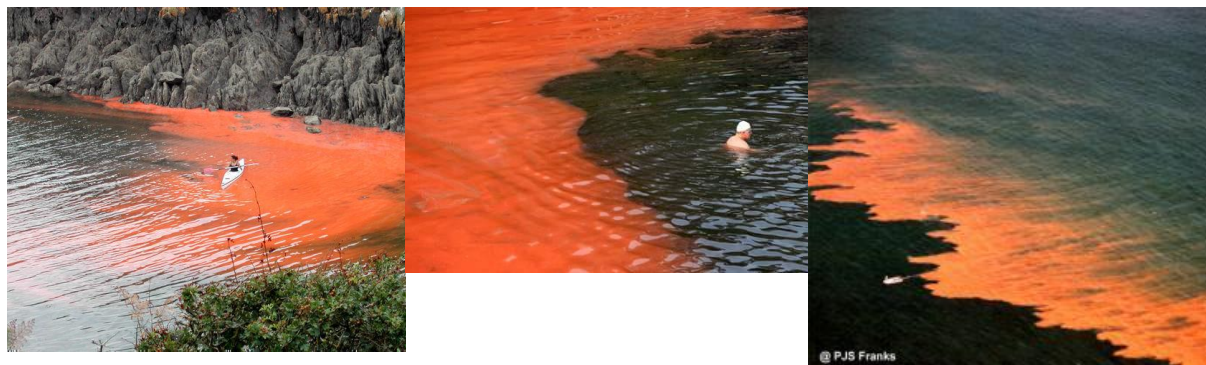
### 1. Les efflorescences de microalgues toxiques ou nuisibles

#### 1.1 Problématique

Le phytoplancton est constitué d'un ensemble hétérogène de microorganismes photosynthétiques appelés microalgues. Les cellules peuvent être solitaires ou groupées en colonies. Ces microorganismes phytoplanctoniques sont autotrophes, mais certaines espèces, principalement de la classe des dinoflagellés, peuvent être hétérotrophes ou mixotrophes (Burkholder et al., 2008; Jones, 1994; Nygaard & Tobiesen, 1993).

Ces efflorescences massives de microorganismes phytoplanctoniques qui ont lieu principalement en zones côtières, sont désignées sous le terme générique d'HABs pour Harmful Algal Blooms. Ces efflorescences sont généralement liées à des espèces phytoplanctoniques de la classe des dinoflagellés mais également de celle des diatomées ou des phytoflagellés. Les concentrations de ces organismes dans l'eau peuvent atteindre dans le cas d'efflorescences exceptionnelles,  $10^5$  à  $10^7$  cellules par litre (Figure 1) provoquant la coloration de la colonne d'eau. Ces phénomènes sont communément appelés « eaux colorées ou red tides en anglais ». Plusieurs études ont pu mettre en évidence l'augmentation de la fréquence des HABs, notamment le long des côtes européennes (Hallegraeff, 1993; Sournia et al., 1992). Les espèces responsables d'efflorescences nuisibles ou toxiques ne représentent qu'environ 5 % des 4000 espèces phytoplanctoniques marines (Zingone & Oksfeldt Enevoldsen, 2000). Smayda (Smayda, 1997a) a montré que les dinoflagellés représentaient la majorité de ces espèces nuisibles et toxiques. Il est estimé qu'ils représentent approximativement 90 % des espèces impliquées dans les HABs. Une de leur principale caractéristique est la capacité d'environ 40 % de ces espèces à produire des toxines (métabolites secondaires) le plus souvent responsables de symptômes neurologiques ou gastriques chez l'être humain suite à la consommation de fruits de mer et de poissons. De plus, plusieurs espèces de microalgues toxiques ont des impacts délétères importants sur les espèces marines (poissons, mammifères, oiseaux...) pouvant mener jusqu'à la mort des individus (Fire et al., 2015). Ces espèces phytoplanctoniques toxiques, et notamment les dinoflagellés, provoquent des dégâts sanitaires et économiques considérables sur la

biodiversité des écosystèmes aquatiques naturels mais également dans les fermes aquacoles de par le monde (Jakobsen et al., 2012; Lundgren et al., 2015).



A

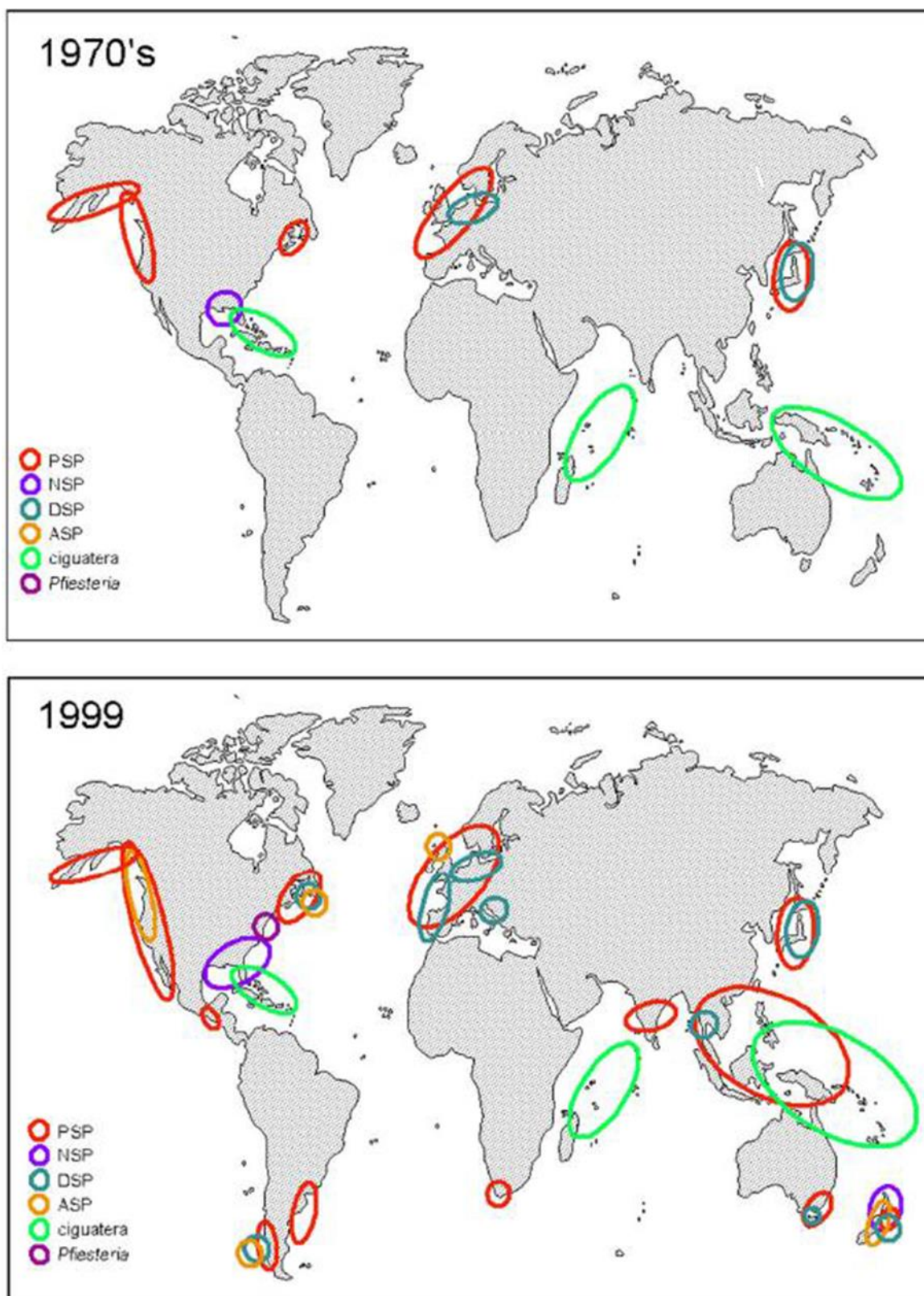
B

C

**Figure 1** : Illustrations de phénomènes d’eaux colorées causées par la prolifération massive de *Noctiluca scintillans* en Bretagne sud (A ©Cedre), en Australie (B © AFP) et en Californie (C Woods Hole Oceanographic Institution)

## 1.2. Expansion des HABs

De nombreuses études ces dernières années montrent l’accroissement des phénomènes des HABs, en terme de fréquence mais aussi en ce qui concerne les zones impactées et leur répartition au niveau mondial. (Glibert, 2005; Maso & Garces, 2006; Sellner et al., 2003; Van Dolah, 2000). Ces phénomènes impactant les écosystèmes naturels, et par voie de conséquence, les activités économiques humaines (fermes d’élevages de poissons, de mollusques et activités touristiques) font l’objet de nombreuses études mais aussi d’un suivi institutionnalisé de plus en plus pointu en Europe (REPHY en France dès 1984, EUROHAB en Europe dès 1999), et de manière plus générale dans les pays industrialisés (GEOHAB). Cependant, si l’augmentation des programmes de surveillance et de recherche sur les HABs peut expliquer en partie la détection plus fréquente de ces phénomènes, il n’en demeure pas moins que de nombreuses études démontrent l’expansion de ces phénomènes dans le monde (Figure 2).



**Figure 2:** Evolution de la distribution mondiale du nombre d'épisodes toxiques liés aux phycotoxines. Les secteurs encerclés indiquent les zones où les toxines ont été détectées à des niveaux suffisants pour observer un impact sur la santé humaine ou sur l'environnement. Adapté de Van Dolah (2000).

Plusieurs zones en Amérique du Nord, en Europe et en Asie ont fait l'objet d'études mettant en évidence l'augmentation dans le temps et l'espace de ces efflorescences nuisibles ou toxiques notamment liées aux genres *Alexandrium* (Anderson, 1995; Giacobbe et al., 2007; Vila et al., 2001b) et *Cochlodinium* (Kudela & Gobler, 2012).

Il existe de nombreuses causes pouvant expliquer l'expansion de ces espèces toxiques et nuisibles. L'activité maritime liée aux échanges mondiaux sans cesse en augmentation est régulièrement incriminée dans les phénomènes d'introduction d'espèces nuisibles dans les écosystèmes aquatiques *via* les eaux de ballasts des navires à la faveur d'un rejet de ces eaux chargées de cellules végétatives ou de kystes dans les zones portuaires (Burkholder et al., 2007; Drake et al., 2007, 2005; Garrett et al., 2014; Lilly et al., 2002). Les activités liées à l'ostréiculture et à la mytiliculture sont aussi suspectées d'être des vecteurs de dissémination des microalgues toxiques. En effet, la plupart des zones de production sont approvisionnées en naissains d'huîtres et de moules issues d'autres zones d'un même pays mais parfois provenant de zones très éloignées. De même, des quantités importantes de coquillages importés sont ré-immérgés dans les zones de production avant commercialisation. Des travaux ont montré que les bivalves pouvaient conserver dans leurs tractus digestif et même dans l'eau inter-valvaire des cellules ou des kystes temporaires de dinoflagellés toxiques à même de contaminer ces zones (Laabir et al., 2007; Laabir & Gentien, 1999; Minchin, 2007). Les activités anthropiques industrielles, portuaires, touristiques qui se sont développées depuis des décennies dans les zones côtières, et notamment, l'urbanisation massive des zones côtières, par l'apport de nombreux nutriments (azote, phosphore), ont contribué au déséquilibre des niveaux et ratios des nutriments minéraux et organiques dans les milieux naturels. L'eutrophisation est toujours suspectée d'être en partie responsable de l'augmentation des HABs (Anderson et al., 2002; Glibert et al., 2014; Glibert, 2005). Cependant, malgré ces études récentes ces relations semblent difficiles à confirmer (Glibert & Burkholder, 2006). Ainsi, Collos et al (2009) ont mis en évidence que l'émergence d'*Alexandrium catenella* dans l'étang de Thau n'était pas liée à l'eutrophisation mais à l'oligotrophisation progressive de la lagune.

### 1.3. Déterminisme des efflorescences algales

L'apparition, la dynamique, la récurrence des efflorescences algales sont intimement liées à l'association de nombreux paramètres abiotiques (température, salinité, oxygène, intensité lumineuse, hydrodynamisme, disponibilité des nutriments, turbidité) et biotiques (autotrophie, hétérotrophie, allélopathie, réseaux trophiques).

De nombreuses études *in situ* et en laboratoire ont mis en évidence l'importance de la température et de la salinité dans le développement et la prolifération de nombreuses espèces phytoplanctoniques, notamment chez les dinoflagellés ainsi que sur le maintien et le déclin de ces efflorescences (Laabir et al., 2011; Matsubara et al., 2007; Nagasoe et al., 2006; Yamaguchi & Honjo, 1989 ; Yamaguchi et al., 1991, 1997 ; Yamamoto et al., 2002). La température et la salinité impactent fortement les processus physiologiques de ces espèces nuisibles et toxiques notamment la production de toxines et leur croissance (Anderson et al., 2012b; Fu et al., 2008; Laabir et al., 2013a; Nagasoe et al., 2006; Pan et al., 1999; Xu et al., 2010). Chez un certain nombre d'espèces de dinoflagellés, la température influe aussi de façon prépondérante sur la formation de kystes de résistance, leur germination mais aussi leur capacité à inoculer en masse la colonne d'eau (Genovesi et al., 2009; Triki et al., 2014) ainsi que le développement des cellules végétatives qui en résultent (Laabir et al., 2011; Navarro et al., 2006). L'hydrodynamisme, et notamment, la turbulence agissent sur la formation et le déclin des HABs en limitant leur développement ou en provoquant leur dispersion (Smayda, 1997a). Laanaia et al. (2013) ont montré l'importance des fréquences et des caractéristiques (force, directions) du vent dans la remise en suspension des kystes dans la colonne d'eau, dans la prolifération d'*Alexandrium catenella* ; espèce récemment renommée *Alexandrium pacificum* (John et al., 2014) dans la lagune de Thau qui a lieu en période d'accalmie et dans le déclin des blooms en période de forte turbulence en relation avec la direction et l'intensité du vent.

La disponibilité en nutriments dans le milieu est jugée comme très importante pour assurer le développement et la prolifération des HABs. Cependant, le nombre d'études montrant une relation directe entre la concentration de ces nutriments et la prolifération des HABs sont peu nombreuses (Anderson et al., 2002; Glibert et al., 2014; Maso & Garces, 2006). Cette relation est certainement plus complexe. En milieu côtier, dans les eaux de transition et particulièrement dans les espaces confinés comme les lagunes, l'apport de nutriments comme l'azote ou le phosphore du aux activités humaines (agriculture, eaux usées) contribue à la modification des ratios N:P et N:Si qui influent sur les communautés phytoplanctoniques. Il a



été montré que le ratio N:P a son importance dans le développement des groupes phytoplanctoniques car il influence les mécanismes biochimiques des organismes (Klausmeier et al., 2004). Il a été mis en évidence un ratio N:P optimal compris entre 8.2 et 45 en fonction des conditions écologiques du milieu. L'équilibre communément admis de 17 serait plutôt à considérer comme une moyenne des espèces pour ce ratio. La plupart des océans et même la mer Méditerranée sont plutôt considérés comme oligotrophes (Béthoux et al., 1998) même si des zones semi-confinées peuvent apparaître comme mésotrophes à eutrophes. Les dinoflagellés, qui constituent majoritairement les espèces responsables des HABs, ont développé des adaptations à ces milieux pauvres en nutriments azotés ou en phosphore à l'instar des capacités à la mixotrophie (Burkholder et al., 2008) qui leur permettent d'assurer leur développement. Des études ont montré l'influence de la disponibilité des nutriments notamment azotés sur la croissance et la production de toxine d'espèces toxiques comme pour le genre *Alexandrium* (Collos et al., 2009, 2004, 2006, 2007; John & Flynn, 2000). L'impact de l'azote et du phosphore sur la prolifération de dinoflagellés benthiques peut différer d'une espèce à une autre. Une corrélation négative entre l'abondance d'*Ostreopsis in situ* et la concentration en nitrite et une corrélation positive avec la concentration en phosphates ont été mise en évidence par Cohu et al. (2013) ce qui démontre la complexité de la nutrition minérale et probablement organique chez cette espèce. Il a été mis en évidence une corrélation positive entre l'abondance de *Prorocentrum lima* et l'ammonium alors qu'une espèce proche *Prorocentrum emarginatum* ne semble pas être influencée par la concentration de nitrites *in situ* (Aissaoui et al., 2014). Le rôle des facteurs biotiques fait l'objet d'études de plus en plus nombreuses. Ainsi, la capacité allélopathique d'une espèce toxique (ici le pouvoir d'influencer négativement, à distance, le développement d'autres espèces) peut donner un avantage compétitif aux microalgues toxiques et promouvoir leur développement dans le milieu naturel (Chen et al., 2015; Wang et al., 2013; Xu et al., 2015). Au contraire, certaines espèces de macrophytes, telles que *Zostera marina* et *Zostera noltei* en raison de leur activité allélopathique peuvent inhiber des espèces responsables de HABs et sont donc susceptibles de limiter la prolifération de ces microalgues (Laabir et al., 2013b; Tang et al., 2015). La régulation des HABs est aussi liée à l'apparition de parasites spécifiques de certaines espèces (Fujimoto et al., 2013; Kim et al., 2012; Li et al., 2014; Velo-Suarez et al., 2013) qui peuvent expliquer la limitation mais aussi le déclin des efflorescences. Alves-de-Souza et al. (2015) ont montré que l'apport important de nutriments azotés (nitrates) n'est pas le seul facteur influençant le contrôle des blooms de dinoflagellés

par leurs parasites. Ainsi ces conditions eutrophes impactent les équilibres entre communautés planctoniques et donc sur l'efficacité des infections des parasites sur ces dinoflagellés.

#### 1.4. Impacts des HABs sur les écosystèmes, l'économie et la santé humaine

Les efflorescences de microalgues nuisibles et toxiques ont un impact extrêmement important sur les écosystèmes naturels, leur exploitation par l'Homme et sur la santé des populations qui se nourrissent de produits marins ou vivent à proximité de ces milieux (Anderson, 1995; Smayda, 1997b). Les impacts sur les écosystèmes peuvent apparaître de différentes façons. Ainsi, la prolifération massive de microalgues peut entraîner lors du déclin du bloom des phénomènes d'anoxie du milieu (minéralisation de la matière organique par des bactéries anaérobies) provoquant la mortalité massive d'organismes marins. Ces efflorescences massives peuvent aussi engendrer le colmatage des branchies des poissons par la formation de mucilages, entraînant ainsi des mortalités importantes des cheptels (cas de l'Haptophyte *Phaeocystis* en Manche Figure 3).



**Figure 3:** Prolifération de *Phaeocystis globosa* dans le Port de Boulogne, mai 2011 (©Ifremer - Alain Lefebvre)

La sécrétion par ces microalgues de métabolites secondaires à activité allélopathique peut impacter la composition des communautés planctoniques et ainsi structurer la diversité



planctonique (Poulson-Ellestad et al., 2014; Qiu et al., 2014). Mais un des effets les plus importants reste la production, par ces microorganismes, de toxines le plus souvent issues de métabolites secondaires qui provoquent des dommages importants soit sur les organismes marins soit sur les populations humaines qui se nourrissent des produits de la mer où vivent à proximité des côtes. De même, des travaux ont montré que ces toxines pouvaient avoir un effet néfaste sur le développement des larves de mollusques (Rolton et al., 2014), sur les hémocytes et l'hémolymphe (Hegaret et al., 2011), sur le système immunitaire, la respiration (Pierce & Henry, 2008) de l'huître creuse et même sur la digestion et les phénomènes d'apoptose (chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*) (Rolland et al., 2014)

L'accumulation des toxines dans le réseau trophique provoque des effets néfastes sur les organismes. L'impact sur la survie des larves de certaines espèces de poisson a été rapporté comme étant un effet direct ou par l'intermédiaire du zooplancton ayant accumulé les toxines (Mooney et al., 2010; Samson et al., 2008; Silva et al., 2013). Plus marquant, la mortalité d'oiseaux ou de mammifères marins ayant consommé des poissons contaminés par les biotoxines restent rares mais spectaculaires (Fire et al., 2015). La faune marine et particulièrement les poissons sont particulièrement affectés par des espèces de microalgues agressives surnommées « Fish Killer » et qui provoquent la mortalité des poissons suites à des nécroses importantes aboutissant dans certains cas à la quasi disparition des branchies (espèces appartenant aux genres *Karlodinium*, *Chattonella*, *Prymnesium*, *Luciella*, *Pfiesteria* et *Cochlodinium*) en Europe du Nord, Asie et Amériques (Aoki et al., 2015; Lim et al., 2014; Lundgren et al., 2015; Moestrup et al., 2014) (Figures 4 et 5). Au-delà de ces impacts négatifs sur la faune, certaines de ces espèces toxiques peuvent affecter l'être humain par contact de ces toxines avec des muqueuses. Par exemple, certaines espèces d'*Ostreopsis* produisent des composés toxiques (palitoxines, ovatoxines) comme *Ostreopsis ovata* (Tubaro et al., 2011) qui peuvent provoquer nécroses et gêne respiratoire. Les côtes méditerranéennes, en France, Italie et Espagne ont vu proliférer cette espèce benthique pendant ces dernières années, provoquant de nombreux cas d'intoxication par contact (Mangialajo et al., 2011). Cependant, les impacts les plus importants, d'un point de vue sanitaire et économique restent ceux liés à la présence de biotoxines dans les produits de la mer consommés par l'Homme (mollusques bivalves, poissons, tuniciers...). Ces toxines à l'origine de syndromes d'empoisonnement Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP), Paralytic Shellfish Poisoning (PSP), Amnesic Shellfish Poisoning (ASP), Neurologic Shellfish Poisoning (NSP) et Ciguatera Fish Poisoning (CFP), sont régulièrement détectées dans les écosystèmes naturels et sont responsables de

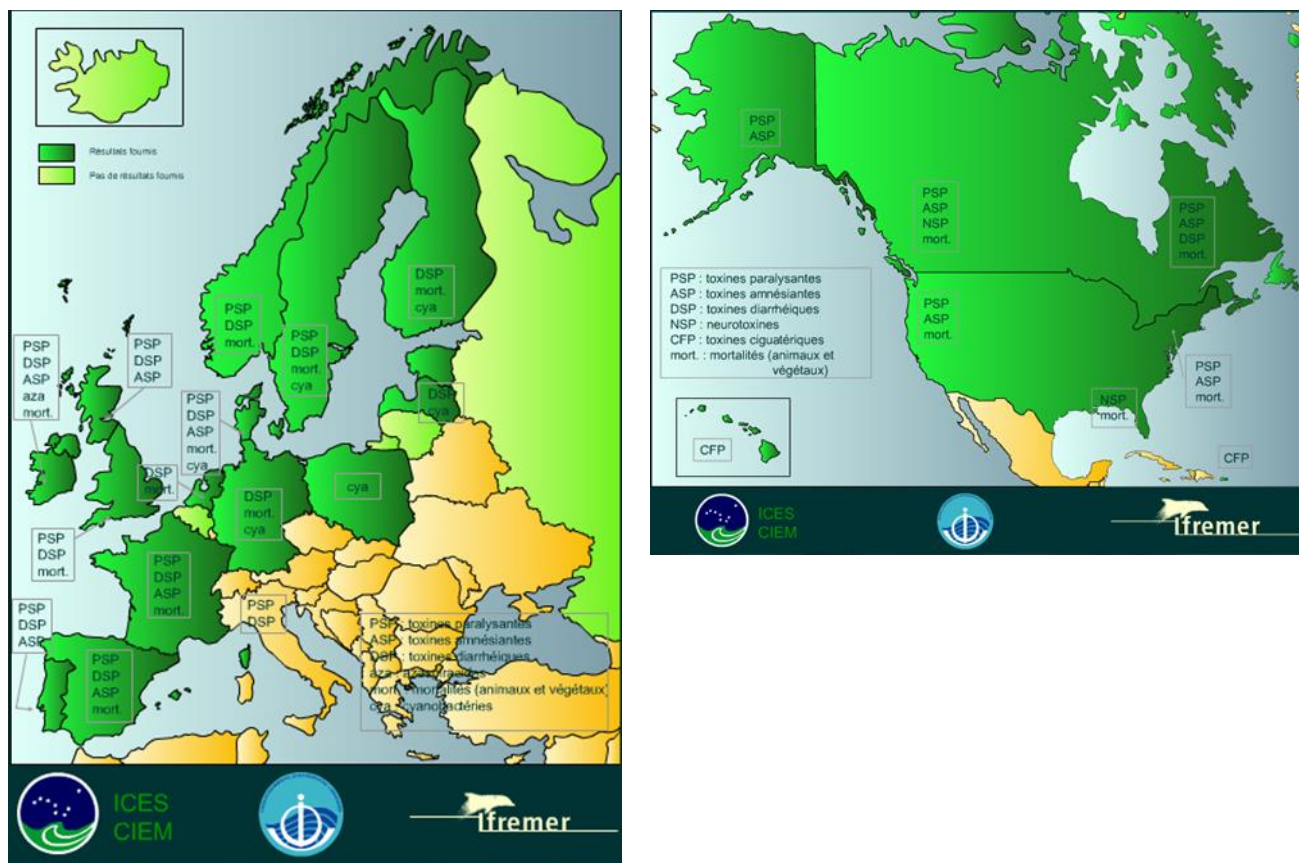
nombreuses pathologies des plus banales (gastroentérites), jusqu'à la mort de consommateurs provoquée par des neurotoxines paralytiques. Les toxines incriminées sont très fréquentes sur les côtes européennes et nord-américaines (Figure 6).



**Figure 4** : Mortalité de poisson dans la baie de Pamlico Caroline du Nord due à des lésions occasionnées par *Pfiesteria* (crédit photo : North Carolina State University)



**Figure 5** : Poisson chat présentant des nécroses occasionnés par *Pyrmnesium parvum* (Texas, crédit [tpwd.texas.gov](http://tpwd.texas.gov))



**Figure 6 :** Présence des phycotoxines en Europe et Amérique du Nord (1993-2002 données CIEM)

L'impact économique de ces efflorescences reste assez difficile à évaluer. Ainsi les pertes financières sont aussi bien représentées par la désaffection des touristes pour des zones touchées par des phénomènes d'eau colorée que des pertes considérables liées à la perte de cheptel d'espèces commerciales dans le cas de poissons en élevage. Néanmoins, pour certains pays il est possible d'estimer les coûts selon le type d'impact. Le plus simple est d'évaluer le coût des réseaux de surveillance mis en place par les états. Pour la France, le réseau de surveillance REPHY opéré par Ifremer, représente une dépense annuelle de l'ordre de 3 millions d'euros. En 2013, un rapport a estimé le coût d'une intoxication moyenne à DSP (200 malades, 2.6 morts) à 2.8 millions d'euros (Ami & Rochaix, 2013). Les données de ce rapport permettent de mesurer le coût de ces intoxication pour la société en l'absence de réseau de surveillance. Cependant malgré la présence de ces réseaux, les impacts sur les activités économiques (restriction de commercialisation pour les coquillages), destruction de cheptel représentent des sommes importantes. En France et donc pour la région Languedoc-

Roussillon, une étude a mis en évidence le nombre de jours de fermeture pour les zones de production conchylicole de 1984 à 2003 (Belin, 2004). La zone la plus touchée est l'étang de Salses-Leucate avec 1005 jours cumulés de fermeture ce qui représente la troisième zone la plus touchée en France sur cette période.

## 2. Classification des phycotoxines

Historiquement il est possible de classer les biotoxines ou phycotoxines selon deux critères :

- 1- Selon les effets de ces toxines sur l'être humain on parle de syndrome toxique ou d'empoisonnement (essentiellement causé par les fruits de mer)
- 2- Selon les propriétés et la structure chimique des toxines. Dans ce cas on précisera systématiquement la famille chimique à laquelle elles appartiennent.

### 2.1. Classification selon les symptômes observés chez l'homme

#### 2.1.1. *Diarrheic Shellfish Poisoning (DSP)*

Les symptômes diarrhéiques ont été identifiés dès 1961 au Pays Bas. L'agent causal a été identifié durant les épisodes successifs en 1971, 1976, 1979 et 1981 comme étant *Dinophysis spp.* Par la suite, le genre *Dinophysis* a été régulièrement relié à des épisodes d'empoisonnement dans de nombreuses zones côtières : Japon dès 1976, Espagne en 1981, France en 1983 (création du REPHY), Europe du Nord, Chili, Asie, Amérique du Nord. C'est le syndrome dont l'occurrence est la plus fréquente. *Dinophysis* est le genre principal en cause du syndrome diarrhéique. Les toxines les plus souvent impliquées sont l'acide okadaïque et ses dérivés (Dinophysistoxines). Les symptômes classiquement observés sont diarrhées, vomissement, douleurs abdominales et éventuellement céphalées, vertiges et tachycardie. Ces symptômes apparaissent en général 30 minutes à 12 heures après la consommation. L'évolution est le plus souvent favorable sans traitement mis à part la surveillance d'une déshydratation chez les personnes fragiles.

### 2.1.2. Amnesic Shellfish Poisoning (ASP)

Ce syndrome a été mis en évidence pour la première fois au Canada en 1987 dans l'île du Prince Édouard (Bates et al., 1989). Cette quasi unique intoxication répertoriée au monde a concerné 145 personnes dont 22 ont dû être hospitalisées pour des symptômes graves. Quatre d'entre elles sont décédées (personnes âgées de 71 à 84 ans). La toxine incriminée est l'acide domoïque produite par des diatomées du genre *Pseudonitzschia*. Les premiers signes d'intoxication apparaissent 24h après l'ingestion des produits contaminés sous forme de vomissements, nausées et douleurs abdominales. Après 48h, les premiers symptômes neurologiques apparaissent tels que la perte de mémoire à court terme, la confusion mentale, la désorientation, l'étourdissement, les céphalées, les vertiges, la somnolence et le coma agité avec convulsions. Les effets tardifs se traduisent essentiellement par la perte de mémoire sélective. En revanche, selon le degré de l'intoxication des séquelles irrémédiables peuvent apparaître telles que des lésions de type nécrotique ou une perte neuronale au niveau de l'hippocampe et des noyaux amygdaliens. L'acide domoïque est tout particulièrement présent dans les coquillages récoltés dans les eaux côtières européennes notamment en Bretagne et Manche.

### 2.1.3. Paralytic Shellfish Poisoning (PSP)

Cette intoxication a été détectée et décrite pour la première fois au XVII<sup>ème</sup> siècle. Environ 200 cas mortels entre 1689 et 1962 ont été répertoriés par Halstead (1967). C'est l'intoxication par biotoxines la plus dangereuse par sa toxicité aiguë. Des cas d'intoxications ont été décrits régulièrement à travers le monde depuis le début du XX<sup>ème</sup> siècle dont plusieurs avec des cas mortels (Canada, Japon, Asie, Amérique du Sud, Europe, Afrique du Nord, Amérique du Nord, Australie et Nouvelle Zélande). De nombreuses espèces du genre *Alexandrium* ainsi que des cyanobactéries sont productrices des toxines responsables de ce syndrome. La saxitoxine et ses dérivées sont associées à cette intoxication. La saxitoxine est répertoriée comme un des poisons le plus toxique jamais connu. Elle est d'ailleurs classée comme « arme biologique » en France et sa détention est soumise à déclaration et autorisation. Les symptômes associés à cet empoisonnement sont de plusieurs types en fonction du degré de sévérité. Ainsi à faible dose, les signes bénins sont essentiellement de la paresthésie buccale étendue parfois au cou, visage et aux extrémités des doigts et orteils. A

dose plus importante, les signes de cette intoxication sont nettement plus francs avec une paresthésie étendue aux membres, des troubles de la parole, une incoordination motrice ainsi que des difficultés respiratoires qui peuvent apparaître. Dans les cas ultimes, à très forte dose, une paralysie respiratoire est observée pouvant conduire au coma et à la mort. Il n'existe pas d'antidote. Seule une assistance médicale rapide (mise sous respirateur artificiel) est efficace.

#### 2.1.4. *Neurologic Shellfish Poisoning (NSP)*

Cette intoxication ne concerne pour l'instant que quelques régions du monde, le golfe du Mexique, la Floride, le Texas, la Caroline du Nord dans l'hémisphère nord et de la Nouvelle Zélande dans l'hémisphère sud. Cet empoisonnement a été décrit depuis très longtemps dès 1844. Cette intoxication est associée aux brevétoxines produites par *Karenia brevis* (*Gymnodinium breve*). Comme dans le cas d'autres empoisonnements, ces toxines impactent les humains consommateurs des animaux marins allant des invertébrés aux mammifères marins situés au sommet de la chaîne trophique (Flewelling et al., 2005; Steidinger et al., 1998). Les populations exposées à cette intoxication peuvent être atteintes par ingestion des fruits de mer, mais aussi par l'inhalation d'aérosol contenant des toxines. Les symptômes liés à cet empoisonnement dépendent de la voie de mise en contact avec la toxine. Par ingestion, des syndromes neurologiques et gastro-intestinaux apparaissent une à trois heures après ingestion. Il n'y a pas de cas mortel rapporté. La récupération est totale après 24 à 48h.

#### 2.1.5. *Ciguatera Fish Poisoning (CFP)*

Le syndrome ciguaterique a été observé depuis des siècles dans certaines zones tropicales. Peter Martyr de Anghera a décrit dès 1511 des cas dans les Antilles. Les zones endémiques sont essentiellement situées dans les régions insulaires tropicales et subtropicales des océans Indien et Pacifique et les zones tropicales des Caraïbes (document FAO : Report of the Joint FAO/IOC/WHO ad hoc Expert Consultation on Biotoxins in Bivalve Molluscs 2005). Si autrefois ce syndrome ne touchait que des populations locales indigènes, depuis le développement du tourisme et du commerce des poissons, le nombre de personnes exposées a significativement augmenté. Aujourd'hui avec 10000 à 50000 personnes annuellement

intoxiquées, ce syndrome présente l'occurrence la plus importante au niveau mondial. Cette intoxication est liée à la présence du dinoflagellé *Gambierdiscus toxicus* dans les massifs coralliens le plus souvent perturbés par des pressions anthropiques ou naturelles. Les ciguatoxines provoquent des symptômes gastro-intestinaux, neurologiques et cardiovasculaires. Bien que confiné jusqu'à présent dans des zones endémiques clairement identifiées, le risque ciguatérique pourrait atteindre les zones tempérées avec les changements climatiques en cours.

## 2.2. Classification selon les familles de toxines

Les phycotoxines font l'objet de très nombreuses études du fait de leur impact extrêmement négatif sur les écosystèmes mais surtout sur la santé humaine. L'augmentation des recherches en la matière a conduit ces dernières années à la découverte de nouvelles molécules toxiques, dont pour la plupart, la détection n'est pas réglementée du fait de l'absence de connaissance sur leur toxicité pour l'être humain.

En septembre 2004 à Oslo, un congrès organisé par la FAO réunissant un panel d'experts internationaux sur les biotoxines dans les bivalves marins a proposé une classification par groupe en fonction de leur structure et propriétés chimiques permettant notamment leur analyse.

Selon ces experts, les phycotoxines peuvent être classées en 8 groupes différents. Le tableau 1 synthétise ces 8 groupes ainsi que les limites réglementaires ou suggérées, les quantités maximales détectées dans les bivalves et les espèces soupçonnées ou identifiées comme productrices.

Dans ce document FAO (biotoxin report FAO WHO IOC 2005), les groupes associés aux toxines lipophiles et imines cycliques seront détaillés car ils sont directement liés aux travaux réalisés dans cette thèse.



Groupe de toxines	Limites réglementaires ou suggérées en mg/kg	Quantité maximale mesurée dans les bivalves en mg/kg	espèces incriminées
Azaspiracides (AZA)	0.16 - 3	1.4	<i>Azadinium spinosum</i>
Brevetoxines	0.8	40	<i>Karenia brevis</i>
Imines cycliques	0.1	2	<i>Karenia selliformis</i> (Gymnodimine)
			<i>Alexandrium ostensfeldii</i> (spirolide)
Acide Domoïque	20 - 200	1280	<i>Vulcanodinium rugosum</i> (pinnatoxines)
			<i>Prorocentrum spp</i> (prorocentrolide)
Acide Okadaïque (AO)	0.16 - 1	36	<i>Pseudonitzschia spp</i>
Pectenotoxines (PTX)	LD - 0.2	0.9	<i>Dinophysis spp</i>
			<i>Alexandrium spp</i>
Saxitoxines	0.8 - 10	800	<i>Gymnodinium catenatum</i> cynabactéries
Yessotoxines (YTX)	1 - 2	8	<i>Protoceratium reticulatum</i>

**Tableau 1** : Principaux groupes de toxines et espèces phytoplanctonique productrices (document FAO)

### 2.2.1. Les toxines lipophiles

Les toxines dites « lipophiles » sont constituées de plusieurs groupes de toxines précédemment cités. Elles ont été regroupées sous cette appellation car elles présentent des propriétés chimiques face aux solvants qui sont similaires et donc permettent leur analyse conjointe dans les mêmes échantillons. Ces molécules ont une affinité pour les solvants moyennement polaires comme le méthanol ou le dichlorométhane. Plusieurs de ces groupes font l'objet d'une réglementation Européenne qui est d'ailleurs parfois reprise dans le *Codex Alimentarius* (Le *codex Alimentarius* ou codex alimentaire est un programme commun de la FAO et de l'OMS qui est un recueil de normes, de codes d'usages, de directives et autres recommandations relatifs à la production et à la transformation agroalimentaires ; textes qui ont pour objet soit la sécurité sanitaire des aliments, soit la protection des consommateurs soit la préservation de l'environnement.).



Cette famille est constituée des groupes réglementés de l'acide okadaïque (AO) et des azaspiracides (AZA) qui sont aussi responsables d'un syndrome diarrhéique chez l'homme (AZP détecté pour la première fois en 1995). Les groupes des yessotoxines et des pectenotoxines ont été ajoutés, à l'exception de certains analogues, après les études démontrant une toxicité sur l'animal.

Les toxines lipophiles supplémentaires non réglementées, recherchées systématiquement aujourd'hui dans les échantillons de surveillance du REPHY en France, sont constituées des gymnodimines et des spirolides qui ont été rattachés par le groupe d'experts aux imines cycliques. Elles seront décrites dans le chapitre consacré à ce groupe.

### 2.2.1.1. Les azaspiracides (AZA)

Les azaspiracides sont un groupe de toxines identifiées pour la première fois en 1998 dans des moules de Killary en Irlande ayant provoqué le syndrome AZP (Satake et al., 1998). Le dinoflagellé producteur de cette toxine a été formellement identifié : *Azadinium spinosum* (Tillmann et al., 2009). Initialement le dinoflagellé hétérotrophe *Peridinium crassipes* avait été suspecté d'être l'agent causal. Cependant, il n'a jamais été mis en évidence de clone en culture capable de produire des azaspiracides.

La figure 7 représente la structure de l'AZA-1 (Amzil et al., 2008). On estime aujourd'hui à environ 32 analogues différents dont des artéfacts. Depuis leur découverte, ces toxines ont été observées largement dans le monde notamment en Europe, Afrique, Amérique et Japon.

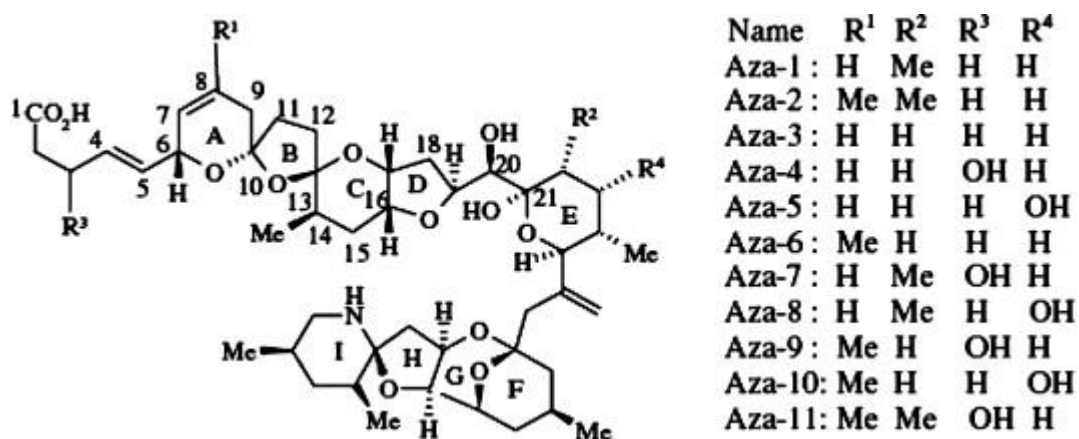
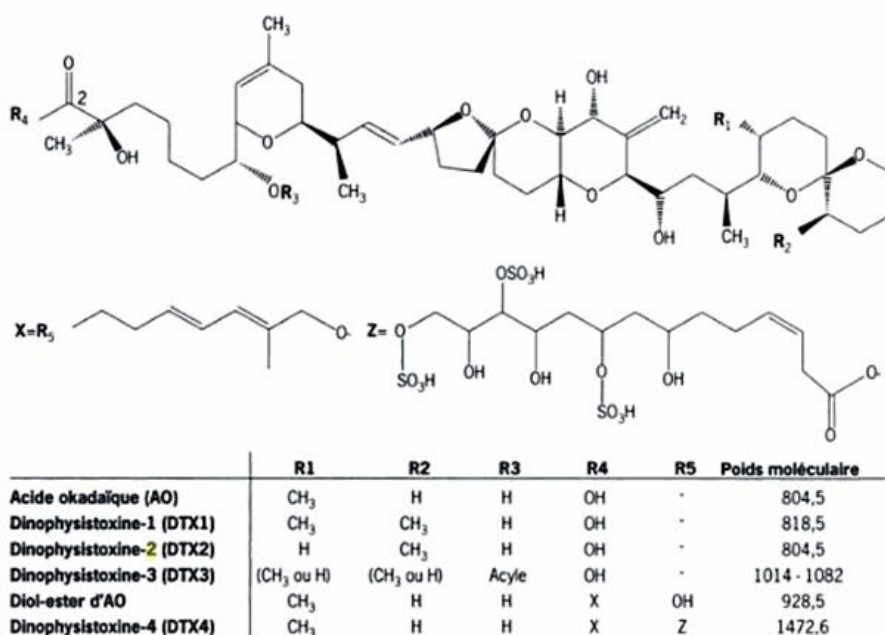


Figure 7 : structure chimique des azaspiracides d'après Amzil et al (2008)

La toxicité de ces composées, outre le syndrome AZP décrit chez l'homme, a été testée par gavage sur rat et par voie intrapéritonéale sur souris. A forte dose (250 à 450 µg/kg de poids corporel pc) les rats intoxiqués par gavage ont présenté des troubles gastro-intestinaux, pulmonaires et hépatiques graves ayant dans certains cas abouti à la mort de l'animal. Pour des doses plus faibles (de 5 à 20 µg/kg pc) et pendant plusieurs semaines d'exposition, il a été observé plusieurs cas mortels mais aussi des tumeurs pulmonaires et hépatiques. Ces toxines sont donc supposées être des promoteurs tumoraux. Chez l'Homme, les observations d'intoxication par voie orale ont montré une LOAEL (Lowest-Observed-Adverse-Effect Level ou DMENO pour Dose Minimale avec Effet Nocif Observé) comprise entre 23 et 86 µg/kg pc pour une toxicité aiguë (document FAO). Le groupe d'experts a donc proposé une référence de toxicité aiguë de 0.04 µg/kg pc pour une personne de 60 kg avec un facteur de sécurité de 10.

#### 2.2.1.2. L'acide okadaïque (AO) et les dinophysistoxines (DTX)

Les intoxications liées à ce groupe de toxines ont été largement décrites depuis les années 1970. Les structures de l'acide okadaïque et des dinophysistoxines (DTXs) sont présentées dans la figure 8 d'après Fremy et Lassus (Frémy & Lassus, 2001).



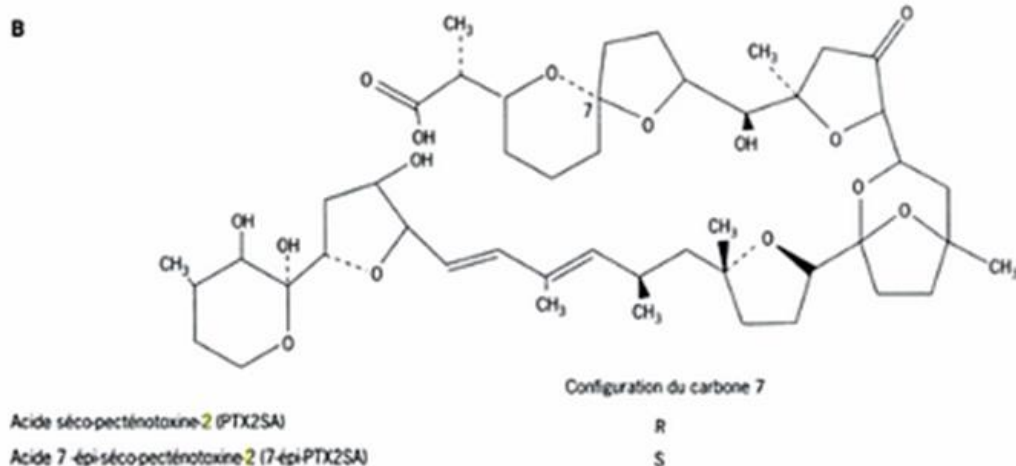
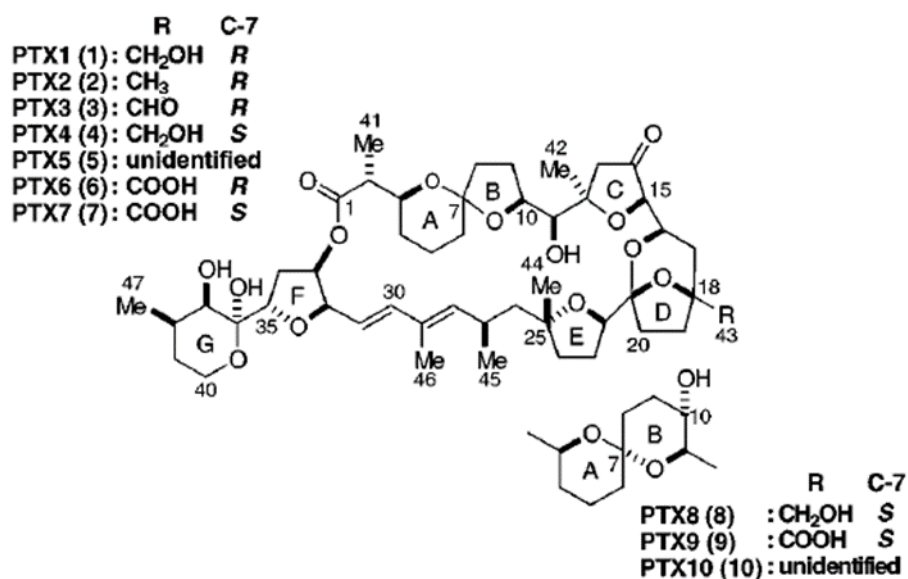
**Figure 8** : structure de l'AO et des DTXs

L'AO et les DTXs sont des polyéthers d'acide gras qui s'accumulent dans les glandes digestives des bivalves qui consomment les microalgues productrices (*Dinophysis spp.* et *Prorocentrum spp.*). Les agents responsables de ces contaminations sont mondialement observés.

La toxicité chez l'animal a été évaluée par voie orale et par voie intrapéritonéale. Ainsi on observe que la dose toxique par voie intrapéritonéale est 3 à 6 fois plus élevée que par voie orale pour l'AO et les DTX-1 et 3 (document FAO). Les données disponibles concernant leur activité potentielle comme promoteur tumorale ne sont pas assez nombreuses pour conclure et ce risque n'a donc pas été pris en compte pour l'évaluation des risques. Chez l'Homme, les observations d'intoxication par voie orale ont montré une LOAEL de 1 µg/kg pc pour une toxicité aiguë (document FAO : 2005 ). Le groupe d'experts a donc proposé une référence de toxicité aiguë de 0.33 µg/kg pc pour une personne de 60 kg avec un facteur de sécurité de 3.

#### 2.2.1.3. Les Pectenotoxines (PTX)

Les pectenotoxines sont des polyéthers comme les DTXs. Ces toxines ont été identifiées au Japon dans les glandes digestives du bivalve *Patinopecten yessoensis* (Yasumoto et al., 1985). Leur structure est présentée figure 9 (Sasaki et al., 1998) et selon Fremy et Lassus (2001) pour les structures seco-acide.



**Figure 9** : structure des pectenotoxines Sasaki et al (1998) et Frémy et Lassus (2001)

Les pectenotoxines 1 et 2 sont les seules toxines de cette famille à avoir été détectées dans les dinoflagellés *Dinophysis spp.*. Les autres analogues des pectenotoxines sont suspectés d'être issus de la biotransformation des PTX-1 et 2 dans les glandes digestives des bivalves.

La toxicité sur animal a surtout été démontrée par voie intrapéritonéale à des doses très variables : PTX -1, PTX-2, PTX-3, PTX-11, 219-411 µg/kg; PTX -4, PTX-6, 500-770 µg/kg; PTX-7, PTX-8, PTX-9, PTX-seco acid, >5,000 µg/kg. La toxicité aigüe des PTX-2 and PTX-2 seco acid est > 5,000 µg/kg dans la souris. Des études récentes auraient montré l'absence

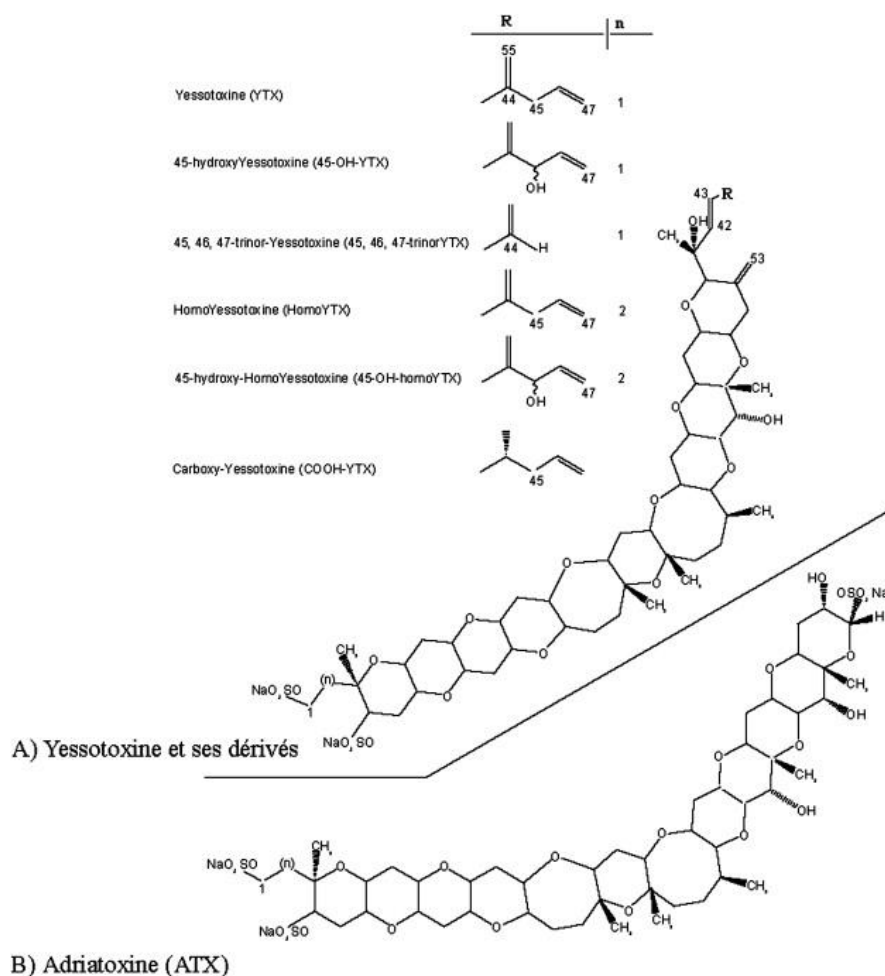
d'un caractère diarrhéique des pecténotoxines. Au vu de ces résultats, il n'a pas été établi de référence de toxicité aigüe.

#### 2.2.1.4. Les Yessotoxines

Les yessotoxines sont des polyéthers lipophiles constitués d'hétérocycles oxygénés. Ces polyéthers possèdent une structure rigide en échelle. Ces toxines ont été isolées au Japon en 1986, dans les glandes digestives du bivalve *Palinoproctus yessoensis* (Yasumoto et al., 1985). Ces toxines sont détectées dans de nombreux bivalves dans le monde et notamment en Norvège (Daiguji et al., 1998), en Italie (Ciminiello et al., 1997), au Japon, au Chili et en mer Adriatique (Satake et al., 1997).

Ces toxines ont été attribuées classiquement au dinoflagellé *Protoceratium reticulatum* mais aussi plus récemment au dinoflagellé *Lingulodinium polyedrum* (Howard et al., 2008)

La structure chimique des yessotoxines est présentée dans la figure 10 d'après Amzil et al (Amzil et al., 2008)



**Figure 10** : Structure chimique des yessotoxines d'après Amzil et al (2008)

Les analogues hydroxylés retrouvés uniquement dans les coquillages seraient issus de la biotransformation (oxydation) des yessotoxines par le métabolisme des bivalves (Satake et al., 1997). Seules la yessotoxine et les analogues, Homo YTX, 45-OH YTX, Homo 45-OH YTX, sont réglementés en Europe.

La toxicité aiguë sur animal a été expérimentée sur 9 analogues de la YTX. Parmi ces analogues, 7 présentent une toxicité équivalente à la YTX avec une LD50 comprise entre 100 et 750 µg/kg pc. Pour les deux autres, ils présentent une toxicité plus faible puisqu'aucune toxicité n'a pu être mise en évidence jusqu'à une dose de 5000 µg/kg pc. La toxicité par voie orale des YTX n'a pas montré d'effet jusqu'à une dose de 50 mg/kg pc et en tout état de cause aucun effet n'a été démontré à une dose de 5 mg/kg de pc. En l'absence de donnée sur l'Homme, et en se basant sur le modèle animal et en appliquant un facteur de protection de 100 le groupe d'experts a proposé une référence de toxicité aiguë de 5 µg eq YTX/kg pc et malgré l'absence de données incriminant les YTX dans des intoxications humaines. En

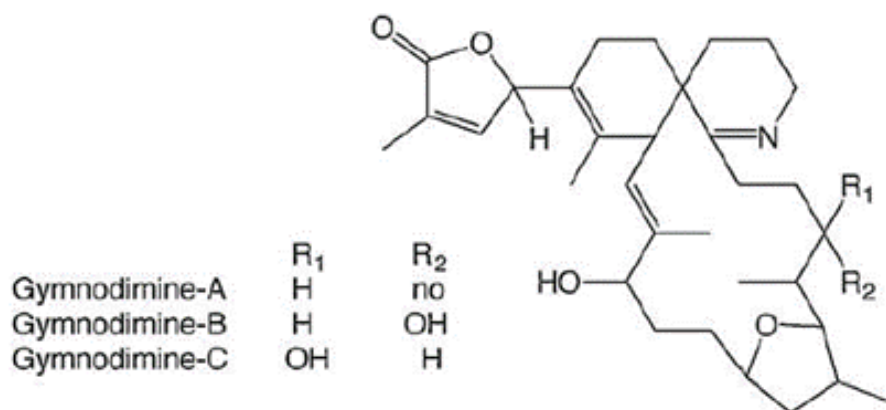
Europe pour les YTX réglementées, la limite a été fixée à 3750 µg eq YTX/kg de chair de coquillage.

### 2.2.2. Les imines cycliques

Les imines cycliques sont des phycotoxines à caractère lipophile dont la structure chimique contient un groupement polyéther macrocyclique. Ce groupe de biotoxines regroupe plusieurs toxines ayant des propriétés notamment toxiques, similaires. Ce groupe est composé des gymnodimines, des spiroïdes, des pinnatoxines, des ptériatoxines et des prorocentrolides (Molgó et al., 2007). La présence de ces composés a été mise en évidence de façon indirecte. Ces molécules présentent une toxicité aiguë sur souris (par voie intrapéritonéale) très importante. Du fait de ce mode d'action ces toxines ont été surnommées « toxines à action rapide » ou FAT (Fast Acting Toxins). Ainsi lors de l'injection des extraits de coquillages, pour la recherche des toxines lipophiles, ces substances provoquent la mort extrêmement rapide des souris surtout à forte dose. Cette action sur les souris provoque des interférences avec le test officiel par bio essai pour la détermination de la toxicité des bivalves (Hess et al., 2013). A faible dose les souris récupèrent sans séquelle visible. Les essais de toxicité aiguë par voie orale ont montré des effets moins importants que par voie intrapéritonéale. A ce jour, dans la majorité des pays, les imines cycliques ne sont pas réglementées car il est difficile de relier leur toxicité sur animal à l'homme.

#### 2.2.2.1. Les Gymnodimines

La gymnodimine a été pour la première fois extraite, isolée et identifiée à partir d'extrait actif d'huître de Nouvelle Zélande (*Tiostrea chilensis*) concomitamment à un bloom de *Karenia selliformis* anciennement dénommée *Gymnodinium cf mikimotoi* (Seki et al., 1995). Sa structure C<sub>32</sub>H<sub>45</sub>NO<sub>4</sub> (PM 507) est schématisé figure 11.



**Figure 11** : structure des gymnodimines A, B et C

Comme le montre la figure 12, les gymnodimines B et C (GYM-B et GYM-C) diffèrent de la GYM-A par la présence d'un groupement hydroxyle.

La toxicité sur animal a été testée sur la gymnodimine. La LD<sub>50</sub> mesurée par voie intrapéritonéale est de 100 µg/kg pc. Elle augmente de façon conséquente par voie orale : 755 µg/kg pc par gavage et 7500 µg/kg pc par nourrissage de souris à jeun.

Il est important de signaler qu'aucune intoxication humaine n'a été rapportée à ce jour. Ceci explique le fait que de nombreux pays notamment appartenant à l'Union Européenne, n'ont pas réglementé ces toxines. En France, ces toxines sont systématiquement recherchées dans les échantillons de coquillages du réseau REPHY.

#### 2.2.2.2. Les spirolides

Les spirolides sont des toxines macrocycliques classées dans les FAT de par leur activité neurotoxique sur les souris par voie intrapéritonéale. Elles ont été mises en évidence pour la première fois en 1991 dans des coquillages au Canada. En 1995, Hu et al. (1995), a pu identifier les formes actives (A,B,C et D) dérivées de la formule C<sub>42</sub>H<sub>63</sub>NO<sub>7</sub> (PM 693,5) et les formes inactives (E et F).

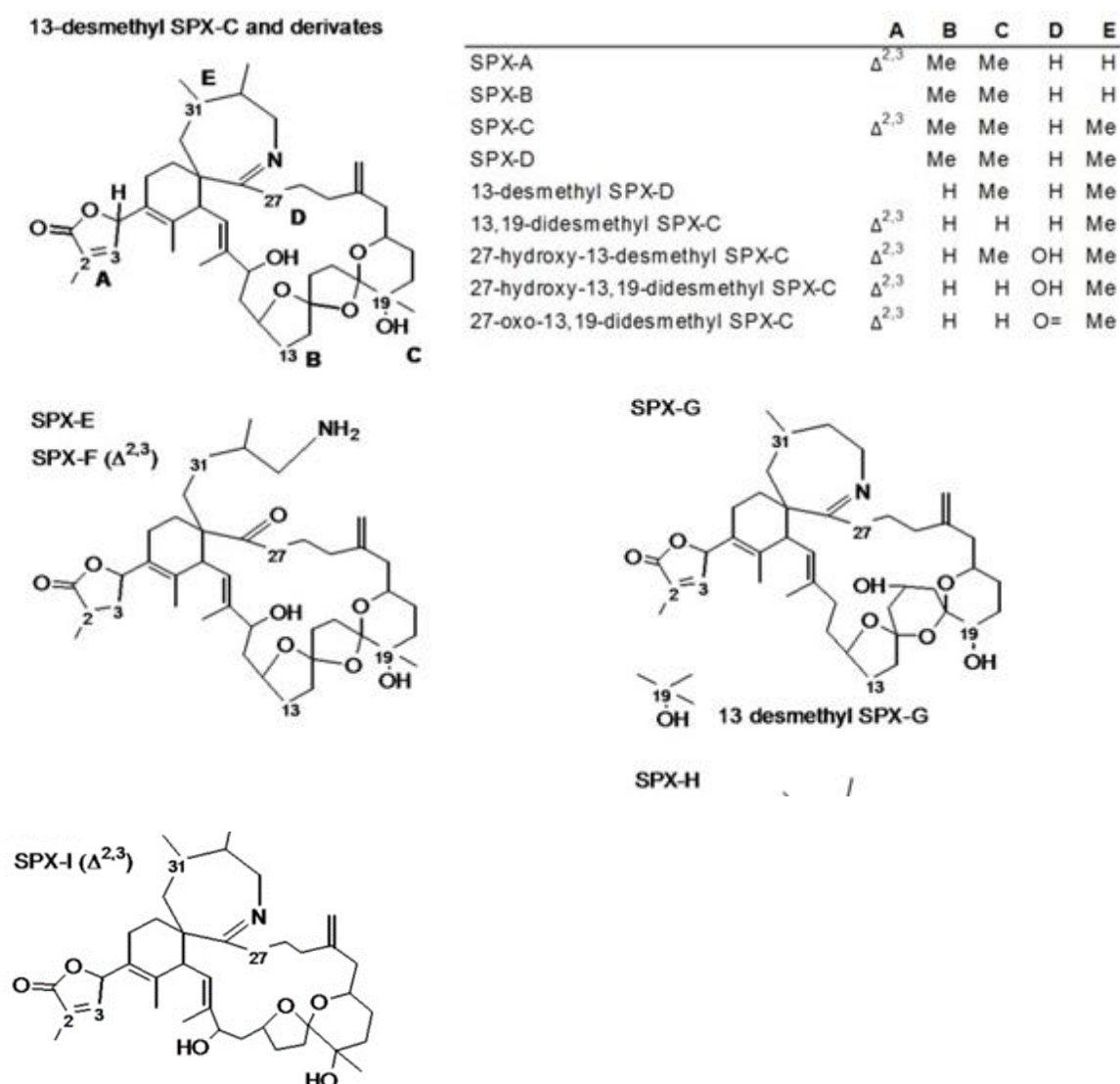
Les structures des formes actives diffèrent entre elle par la substitution d'un hydrogène par un méthyle. Les formes inactives présentent dans leur structure un cycle imine ouvert. On peut donc supposer que la toxicité de ces composés est liée à la présence d'un cycle imine. Par ailleurs, les formes inactives ne sont retrouvées que dans les extraits de coquillages.



L'hypothèse principale reste donc la biotransformation des formes actives dans les glandes digestives des coquillages pour donner ces formes inactives.

Les spirolides dans les coquillages ont été reliés à la présence dans le milieu naturel du dinoflagellé *Alexandrium ostenfeldii* (Ciminiello et al., 2007).

Ces FATs ont été décrites pour la première fois en Méditerranée en 2007 à partir d'un extrait de moules prélevées au nord de la Mer Adriatique sur les côtes italiennes. Ciminiello et ses co-auteurs ont pu isoler et décrire un profil toxinique très complexe incluant les analogues 13-desmethyl SPX-C, 13,19-didesmethyl SPX-C, 27-hydroxy-13,19-didesmethyl SPX-C (jamais décrit jusqu'ici), 27-hydroxy-13-desmethyl SPX-C and 27-oxo-13,19-didesmethyl SPX-C (Ciminiello et al., 2010a, 2007, 2010b).



**Figure 12** : structures des spirolides (Garcia-Altare et al., 2014)

La toxicité sur animal a été testée pour la spirolide desmethyl C. Les LD<sub>50</sub> pour une exposition par injection intrapéritonéale, par voie orale, par gavage et par nourrissage, de souris à jeun, sont de 6.5, 157, 500 et jusqu'à 1050 µg/kg pc pour des souris nourris *ad libitum*. Ces valeurs confirment la forte toxicité de ce composé.

En l'absence de preuve d'intoxication chez l'homme, ces toxines ne sont pas réglementées. Elles sont comme pour les gymnodimines, systématiquement recherchées dans le cadre du REPHY en France.

Les pinnatoxines qui font partie de ce groupe seront traitées dans le chapitre 5 spécifiquement consacré au dinoflagellé producteur de pinnatoxines, *Vulcanodinium rugosum*.

### 2.3. Méthodes d'analyses des toxines lipophiles

Les toxines lipophiles (anciennement associées au syndrome diarrhéique DSP) présentent de par leur structure chimique une affinité pour les solvants organiques moyennement polaire tels que le méthanol, l'acétone ou le dichlorométhane. Les méthodes d'analyses décrites ci-dessous doivent être en mesure de détecter *a minima* les toxines lipophiles réglementées qui ont été associées à des empoisonnements.

*Les toxines lipophiles réglementées* : sont constituées de l'acide okadaïque (AO) et des dinophysistoxines (DTXs), des azaspiracides (AZAs constitués des congénères 1, 2 et 3), des pectenotoxines (PTX1 et 2) et des yessotoxines (YTXs, constituées de la yessotoxine et des analogues, Homo YTX, 45-OH YTX, Homo 45-OH).

*Les toxines lipophiles non réglementées* : sont essentiellement constituées des imines cycliques (FATs) et dont la toxicité aiguë importante sur souris a été mise en évidence. On retrouve ainsi les gymnodimines, les spirolides, et des congénères non toxiques des pectenotoxines (notamment seco-acide) et des yessotoxines.

#### 2.3.1. Le bioessai sur souris

Le bioessai sur souris est une méthode basée sur l'extraction des toxines lipophiles à partir d'un échantillon de glandes digestives ou de chair totale de bivalves par des solvants

moyennement polaires (Figure 13). En France, la méthode d'analyse utilisée est adaptée du protocole développé par Yasumoto en 1984 (Yasumoto et al., 1984). Cette méthode présente une bonne performance pour la mise en évidence d'une toxicité globale. C'est le seul test qui permet en routine la détection de toxicité nouvelle (si les souris y sont sensibles), ce qui a été le cas pour les imines cycliques. Ce test donne une réponse qualitative au seuil de salubrité et des indications sur la nature des toxines par l'observation des symptômes des souris. En revanche, cette technique analytique pose des problèmes de spécificité et de sensibilité aux souris ( $LD_{50}$  très différents en fonction des toxines) mais aussi impose des exigences logistiques (approvisionnement en souris, coût...). De plus il a souvent été reproché à cette technique de tester la toxicité par voie intrapéritonéale alors que l'Homme est exposé par voie orale.

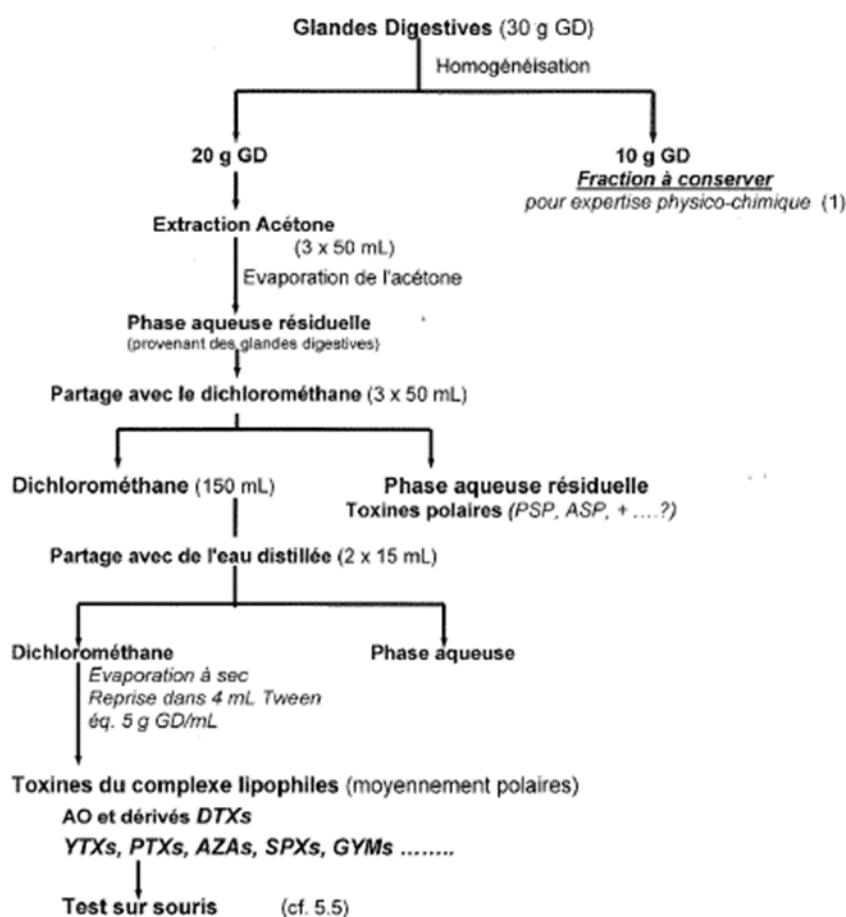


Figure 13 : Protocole de bioessai sur souris réalisé à l'Ifremer (document PHYC)

Suite à ces problèmes récurrents d'interprétations des résultats et la multiplication de « faux » positifs c'est-à-dire des bioessais positifs et des résultats d'analyse chimique inférieurs au seuil sanitaire, la commission Européenne a décidé de modifier sa réglementation. Ainsi, à partir de 2011, la Commission a imposé comme méthode de référence, la méthode de dosage chimique par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS).

### *2.3.2. Méthode de dosage chimique des toxines lipophiles par LC-MS/MS*

La structure réglementaire au sein de l'Union européenne (UE) comporte toute une série de réglementations relatives au contrôle des toxines lipophiles. Ainsi, l'annexe III, section VII, chapitre V du Règlement (CE) n°853/2004 et le règlement n°786/2013 fixent les quantités limites de toxines lipophiles dans les mollusques bivalves avant leur mise sur le marché pour la consommation humaine : pour l'acide okadaïque, les dinophysistoxines et les pecténotoxines pris ensemble, 160 µg eq. acide okadaïque par kilogramme ; pour les azaspiracides, 160 microgrammes d'équivalent-azaspiracides par kilogramme et pour les yessotoxines, 3,75 milligramme d'équivalent-yessotoxines par kilogramme.

Pour ce qui est des méthodes, le règlement (CE) n°15/2011 de la Commission modifiant le règlement (CE) n°2074/2005 en ce qui concerne les méthodes d'analyse reconnues des biotoxines marines dans les mollusques bivalves vivants, établit la méthode du Laboratoire de Référence pour les phycotoxines de l'Union Européenne (LR-UE), basée sur la LC-MS/MS comme méthode de référence pour la détection des biotoxines dans les mollusques bivalves.

La méthode s'applique aussi aux toxines non réglementées suivantes :

<b>Groupe de toxines</b>	<b>Toxines recherchées</b>
Groupe de la Gymnodimine (GYM)	GYM
Groupe des Pecténotoxines (PTX)	PTX2sa
Groupe des Spirolides (SPX)	SPX 13desMe C, SPXA,SPXB, SPXC, SPXD

Cette méthode est basée sur le couplage entre la chromatographie liquide et la spectrométrie de masse en tandem. Le principe de la chromatographie est basé sur la séparation des

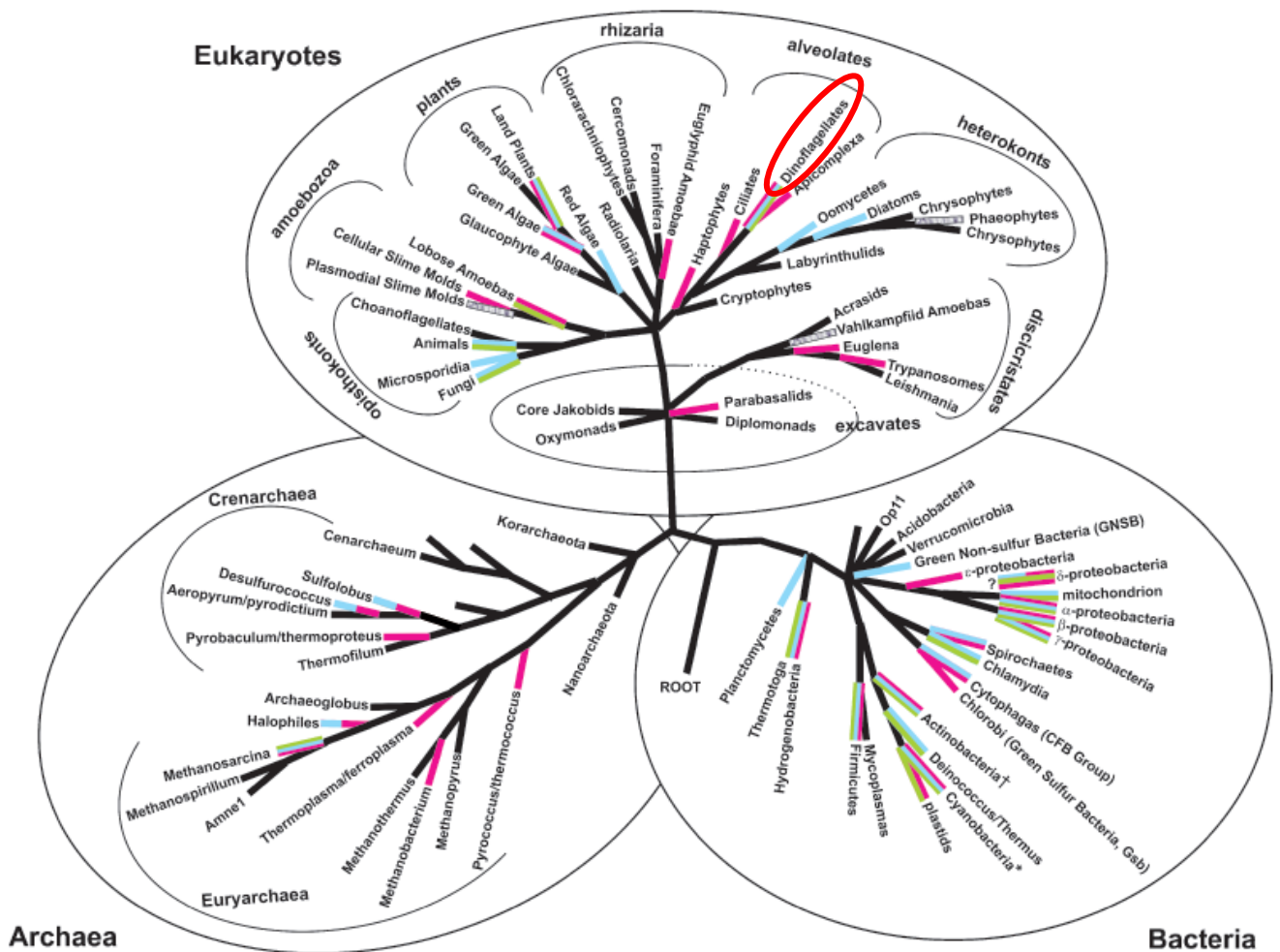
composés par une phase mobile liquide à travers une phase stationnaire solide. Les temps de rétention des molécules dépendent de l'affinité vis-à-vis des deux phases.

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse qui permet de détecter, d'identifier et de quantifier (si on dispose d'étalons de référence) des molécules par détermination de leur masse et de caractériser leur structure chimique. Son principe réside dans la séparation de molécules chargées en phase ionisée (ions) en fonction de leur rapport masse/charge ( $m/z$ ).

Cette technique présente de nombreux avantages par rapport au bioessai. Elle est spécifique et sensible pour les toxines connues, elle permet la détermination du profil toxinique (pour les toxines connues), elle donne une réponse qualitative et/ou quantitative et sa limite de détection est très inférieure au bio-essai. Sa mise en œuvre est plus courte que le bio-essai. Par contre elle ne permet pas en routine la détection d'une nouvelle toxine et exige une qualification élevée du personnel. Son coût est sensiblement supérieur au bioessai.

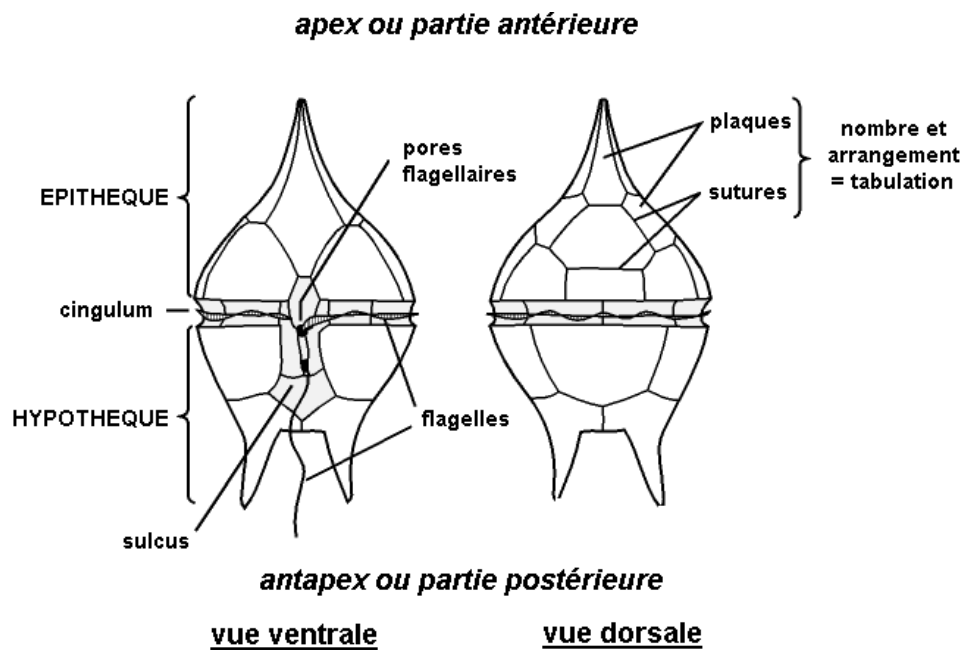
### 3. Les Dinoflagellés

Des traces fossiles de Dinoflagellés ont été retrouvées dans des couches sédimentaires remontant à plus de 400 millions d'années (Steidinger & Walker, 1984). Ce groupe d'organismes est donc très ancien. Au sein des dinoflagellés, qui appartiennent au groupe des Alvéolobiontes (Figure 14), les Dinophyceae appartiennent à une classe d'algues parmi la plus primitive, ce qui explique que les espèces qui y sont rattachées ont une distribution mondiale. Les dinoflagellés sont constitués de multiples organismes eucaryotes en majorité biflagellés et dont la morphologie, l'organisation cellulaire et l'écologie sont extrêmement variables. On estime aujourd'hui que ce groupe très diversifié contient environ 2300 espèces décrites (Gomez, 2012). Ces microorganismes sont unicellulaires et possèdent deux flagelles qui peuvent être placés différemment selon les espèces (figure 15).



**Figure 14** : Arbre phylogénétique du vivant d'après Wolfe-Simon (Wolfe-Simon et al., 2005). Le cercle rouge indique l'embranchement des dinoflagellés.

La présence de flagelles est un élément important pour ces microorganismes car ils leur permettent de se déplacer et donc de rechercher dans la colonne d'eau les strates nutritivement intéressantes ou de se diriger vers leurs proies (Sheng et al., 2010). Certaines de ces espèces possèdent une thèque (dinoflagellé armé) composée de plaques celluloseuses qui, par leur nombre, leur arrangement, représente un élément majeur de leur identification (Dodge, 1995; Faust, 1996; Lee et al., 2015; Okolodkov & Dodge, 1997; Taylor, 1975).



**Figure 15** : Morphologie classique d'un dinoflagellé à thèque de type péridinôïde (d'après B. Quéguiner)

### 3.1 Écologie et distribution des Dinoflagellés

Ce phylum étant relativement ancien (Steidinger & Walker, 1984), les dinoflagellés sont largement distribués dans les écosystèmes marins et d'eau douce à travers le monde. L'immense majorité de ces espèces est distribuée dans les eaux marines. Un grand nombre de ces espèces montre aussi une sensibilité à l'agitation du milieu. C'est une des raisons qui explique que de nombreuses espèces de dinoflagellés (notamment le genre *Alexandrium*) sont présentes dans les estuaires, lagunes et ports. Etant donné leur grande diversité, il n'est pas étonnant que leur écologie soit aussi très variée. Ainsi, une grande variété d'espèces est planctoniques (Burkholder et al., 2006; Taylor et al., 2008), mais on observe de nombreuses espèces benthiques qui utilisent plusieurs types de substrat pour ce développer.

Ces espèces ont adapté leur mode de nutrition en fonction des conditions qu'elles ont pu rencontrer. Ainsi, on trouve un grand nombre d'espèces autotrophes (51 % décrites contenant un ou plusieurs chloroplastes). Aujourd'hui, une majorité de ces espèces sont décrites comme hétérotrophes (Gomez, 2012). Cependant, la présence de chloroplastes n'implique pas une autotrophie exclusive et de nombreuses études ont montré que la mixotrophie est très

répandue chez les Dinoflagellés (Burkholder et al., 2008; Jeong et al., 2004; Jones, 1994, 2000).

Comme décrit précédemment, les Dinoflagellés sont majoritairement associés aux HABs. Ainsi, il a été démontré que ces espèces, et donc ces phénomènes, étaient en expansion (Glibert, 2005; Maso & Garces, 2006; Sellner et al., 2003; Van Dolah, 2000), ce qui indique leur facultés d'adaptation particulièrement remarquables.

## 3.2 Cycle de vie

### 3.2.1 Reproduction asexuée et sexuée

Malgré l'absence de données complètes sur toutes les espèces, on estime qu'une part importante de ces organismes présente deux phases distinctes dans leur cycle de vie.

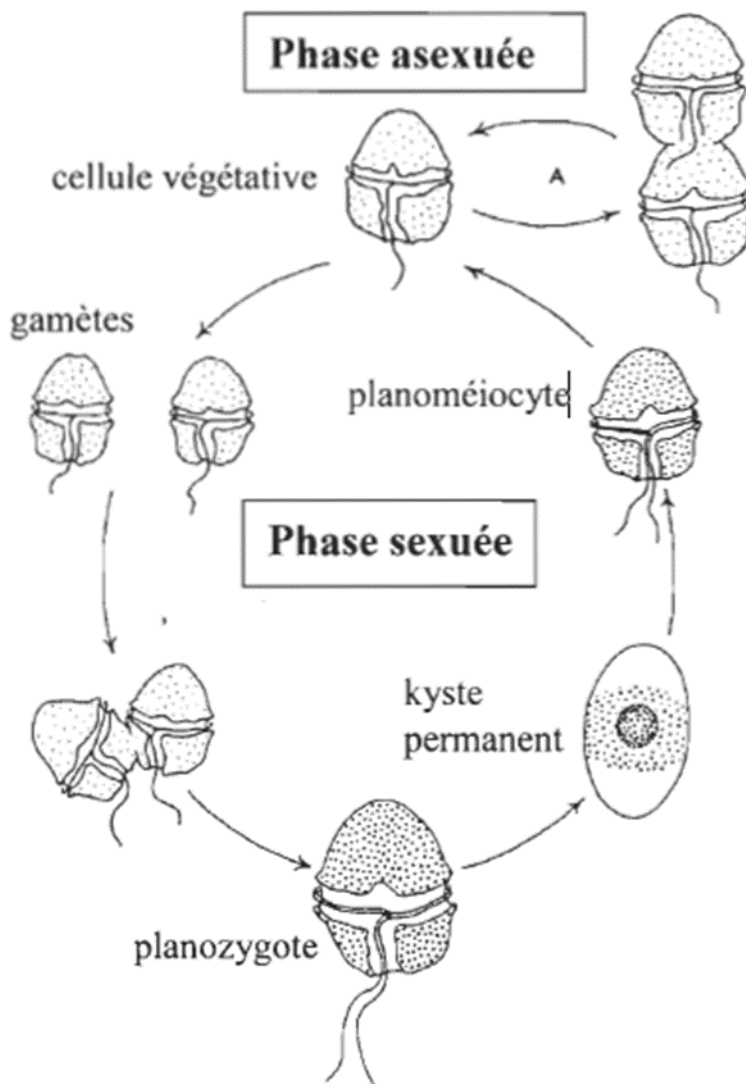
La multiplication asexuée commence toujours par une phase haploïde. Chez certaines espèces, la cellule se divise le long d'une suture prédéterminée entre les plaques de la thèque pour produire deux cellules filles qui héritent de la moitié de la thèque, du moins temporairement : c'est le processus de desmochisis (Figueroa et al., 2007).

D'autres espèces font appel à un autre processus de multiplication au cours duquel la cellule mère évacue sa thèque (ecdysis), puis sédimente sous forme de kyste temporaire : c'est l'eleutheroschisis. Cette cellule peut alors se diviser pour donner 2, 4 ou 6 cellules filles haploïdes. Ce processus a été observé chez plusieurs espèces du genre *Alexandrium* tel que *Alexandrium peruvianum* (Figueroa et al., 2008).

La reproduction sexuée reste une étape très importante dans le cycle de vie des dinoflagellés (Figure 16). En effet, c'est par ce processus que l'organisme va produire des planozygotes par la production de gamètes qui ont fusionné. Le plus souvent ces planozygotes se transforment en kystes de résistance. Cette phase sexuée est caractérisée par le passage du stade haploïde à un stade diploïde. Comme toute reproduction sexuée, un des intérêts reste le brassage génétique qui en résulte. Cependant des études récentes ont pu montrer que certains dinoflagellés étaient capables de produire des kystes de résistance asexués comme *Scrippsiella hangoei* (Kremp and Parrow, 2006). La reproduction sexuée est souvent initiée par des facteurs abiotiques liés aux changements brusques des conditions environnementales



(température, agitation du milieu...) mais aussi par le changement des conditions nutritives (limitation en nutriments à la fin du bloom). Plusieurs travaux ont montré que la fusion de gamètes et la production de planozygote pouvait intervenir à n'importe quelle phase de la croissance de l'organisme (Persson et al., 2008).



**Figure 16** : Cycle de vie simplifié des dinoflagellés (Fritz et al., 1989)

Le cycle de vie des Dinoflagellés reste en partie mal connu car il est délicat d'isoler des souches monoclonales du milieu naturel, de les maintenir en culture et de reconstituer *in vitro* les conditions environnementales complexes. En effet, il est communément admis que le kyste de résistance est issu de la reproduction sexuée alors que le kyste temporaire serait issu d'une phase asexuée. Cependant, des études récentes ont montré que chez plusieurs espèces,

le planozygote pouvait se diviser et redonner des formes végétatives ou même former des kystes temporaires diploïdes. De même, il a été montré que des cellules végétatives ont réussi à former des kystes de résistances haploïdes (Figuerola et al., 2008; Kremp & Parrow, 2006). Il importe donc de bien étudier le cycle de vie (phases asexuée et sexuée) de chaque espèce ses stratégies de croissance, son écologie et ses facultés d'adaptation et de dissémination.

### 3.2.2 Inoculation de la colonne d'eau et récurrence des efflorescences

Une fois la reproduction sexuée terminée, le kyste de résistance entre dans une phase de dormance obligatoire dont la durée est spécifique à chaque espèce (Anderson & Keafer, 1987). La germination du kyste de résistance ne pourra débuter qu'à la fin de la période de dormance. A ce moment-là, ce sont les conditions environnementales du milieu qui vont influencer sur la germination : température seuil, salinité, intensité lumineuse (Rengefors & Anderson, 1998).

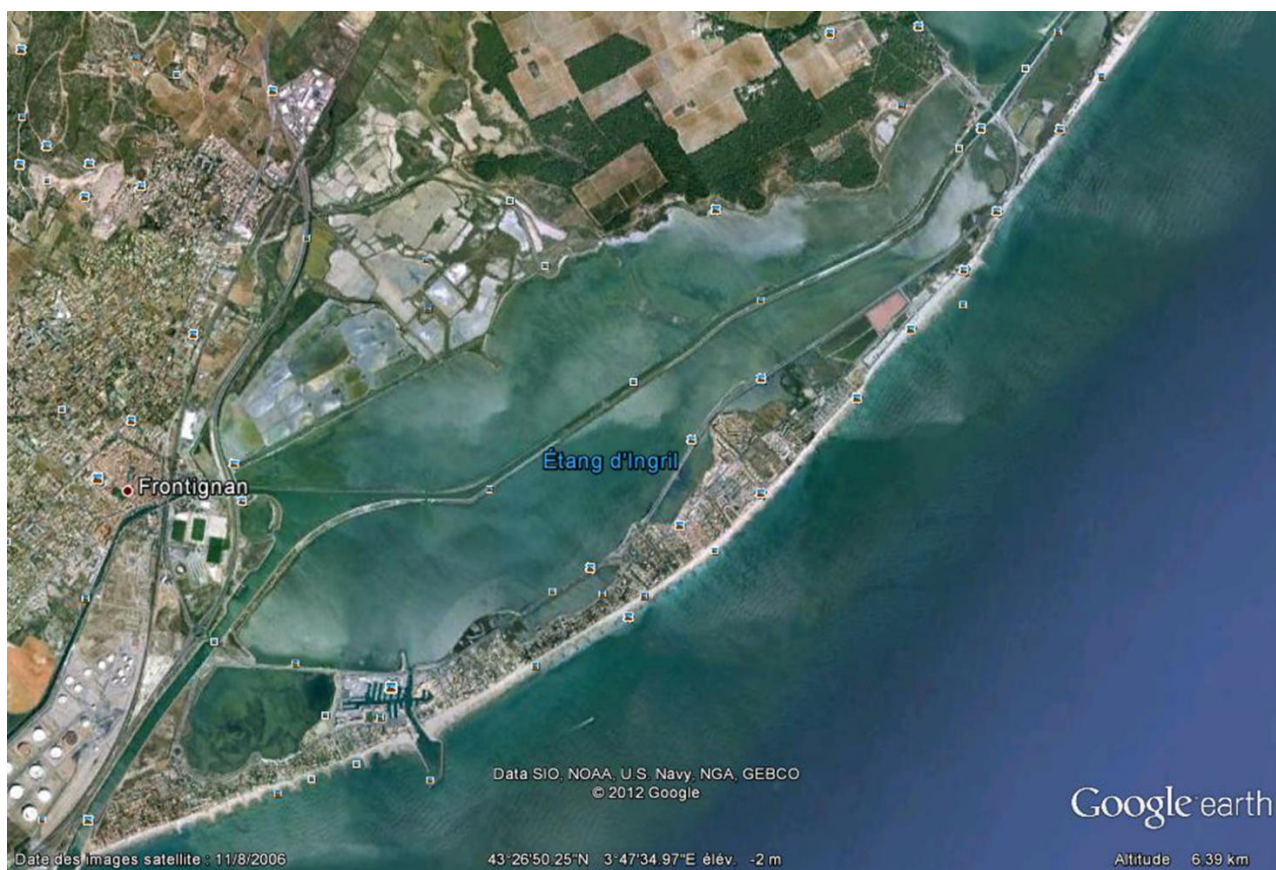
La stratégie de germination des kystes est caractéristique d'une espèce (Ishikawa & Taniguchi, 1994, 1996, 1997). Il a été décrit 3 types de germination : continue, synchrone et sporadique. Le mode de germination continue peut expliquer qu'une espèce est détectée tout au long de l'année mais avec des pics d'abondance. Le mode sporadique est caractérisé par la germination lorsque les conditions sont favorables (facteurs abiotique, quantité de kystes). Le mode synchrone explique la présence quasi-systématique d'un pic de germination au même moment chaque année. Cette germination est indépendante des conditions du milieu. Ces différents modes représentent des stratégies très différentes entre les espèces.

## 4 Le dinoflagellé : *Vulcanodinium rugosum*

### 4.1 Taxonomie

En 1984, le réseau de surveillance REPHY a été organisé et déployé sur les côtes françaises pour permettre la détection des espèces nuisibles et toxiques et l'évaluation de la toxicité des produits de la mer. Le REPHY est un réseau national auquel participent neuf unités littorales

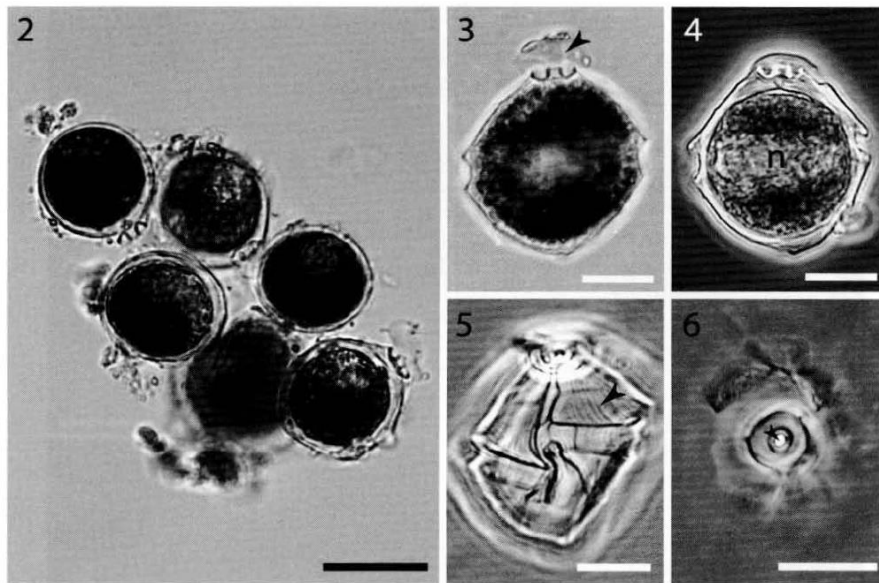
« Environnement Ressources » réparties sur treize implantations réparties le long du littoral français et un laboratoire de recherche sur le phytoplancton et les phycotoxines (ODE/UL/PHYC) à Nantes. Ces laboratoires ont pour objectifs d'observer l'ensemble des espèces phytoplanctoniques des eaux côtières, de recenser les événements tels que les eaux colorées, les efflorescences exceptionnelles et les proliférations d'espèces toxiques ou nuisibles pour la faune marine et les consommateurs de coquillages, et de rechercher, d'identifier et quantifier les phycotoxines dans les coquillages. C'est dans le cadre de ce réseau de surveillance qu'en 2006, le REPHY a mis en évidence une toxicité sur les souris (communication interne), de type neurotoxique, à partir d'extraits de moules de l'étang d'Ingril (Figure 17), situé à l'est de l'étang de Thau. Cette toxicité s'est avérée non liée aux toxines réglementées (PSP et DSP) car les expertises réalisées par le laboratoire PHYC n'ont pas mis en évidence ces toxines.



**Figure 17** : Etang d'Ingril (Mer Méditerranée, France)

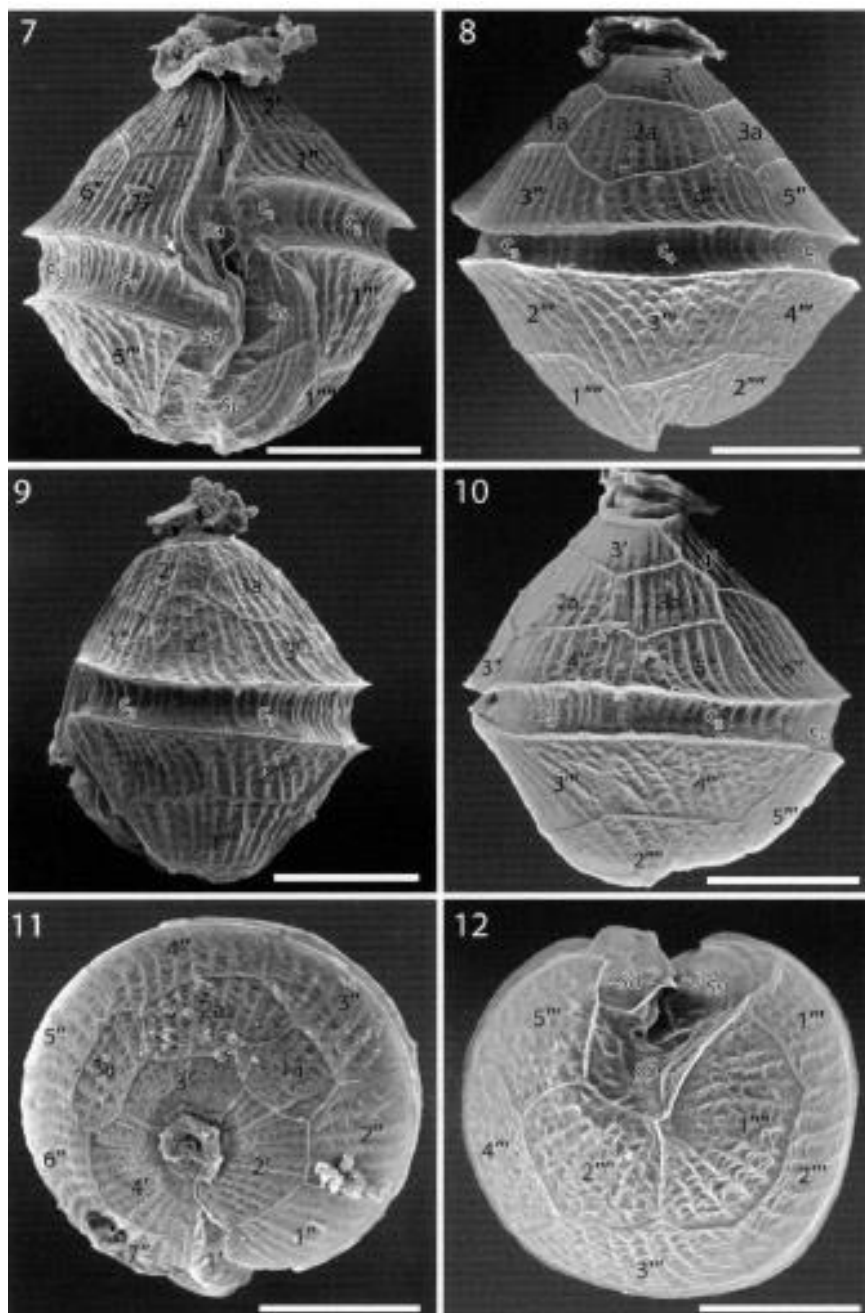
Les observations des échantillons d'eau n'ont permis l'identification d'aucune espèce productrice de neurotoxines connue. En 2009 une équipe IFREMER du laboratoire Environnement Ressources de Concarneau a réussi à isoler et à décrire, à partir d'échantillon d'eau de l'Ingril, une nouvelle espèce appartenant à un nouveau genre : *Vulcanodinium rugosum* (Nézan & Chomérat, 2011). Pour parvenir à cette identification, Nézan et Chomérat (2011) ont effectué des analyses morphologique et phylogénétique (Figures 18 à 21). L'étude morphologique a mis en évidence une épithèque particulière qui est un élément caractéristique des cellules mobiles. Les cellules présentent une forme biconique à ronde, subcirculaire en vue apicale, avec une longueur et une largeur comprise entre 24 et 30  $\mu\text{m}$ . L'épithèque (thèque supérieure) est de forme conique à hémisphérique, tronquée à l'apex. L'hypothèque (thèque inférieure) est de forme trapézoïdale à hémisphérique, elle aussi tronquée à l'apex. Le cingulum est large, descendant de 1.5 à 2 fois sa propre largeur. Le sulcus présente une forme sigmoïde, antérieurement étroite et postérieurement plus large jusqu'à atteindre l'antapex. La formule des plaques est : Po, X, 4', 3a, 7'', 6c, 6s, 5''', 2'''''. L'apex se distingue par une matrice muqueuse extrudée. La première plaque apicale (1') est étroite. Les trois plaques intercalaires antérieures (3a) sont contiguës. La plaque sulcale postérieure n'atteint pas le cingulum. La surface de la theque est couverte de stries longitudinales, de réticulations croisées optionnelles et trouées par des pores. Le noyau est allongé et situé dans la région équatoriale (Figure 18,4 n).

Les analyses phylogénétiques ont été réalisées sur un fragment partiel du gène codant pour l'ARN ribosomique présent dans la grande sous-unité du ribosome (LSU rDNA) de 635 paires de bases, correspondant aux domaines D1-D2 et excluant la zone hypervariable. Le résultat de ces analyses est présenté dans l'arbre phylogénétique Figure 21.

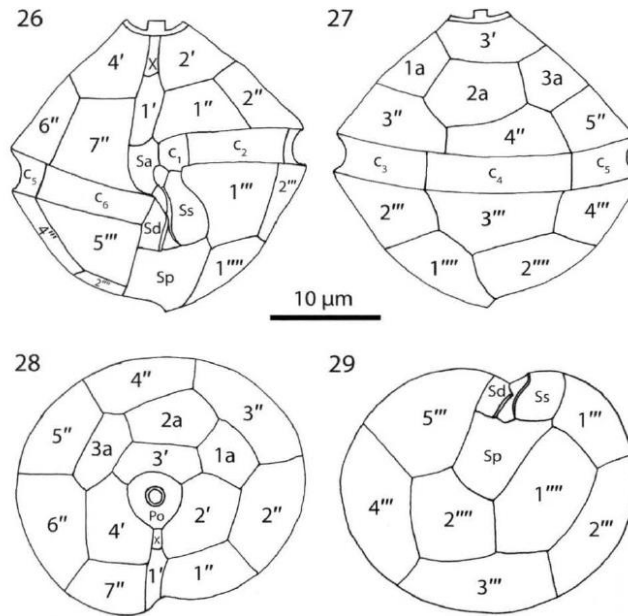


**Figure 18** : Observations en microscopie photonique de *Vulcanodinium rugosum* . 2. Amas de cellules. 3. Cellule isolée montrant la matrice muqueuse (tête de flèche). 4. Cellule avec le noyau visible (n). 5. Thèque montrant les stries longitudinales (tête de flèche). 6. Détail de la plaque du pore apical Po dissociée de la thèque. Le pore apical est indiqué par une tête de flèche. 2-4. Cellules fixées au Lugol. 4-6. Images en contraste de phase. Fig. 2. Echelle = 20  $\mu\text{m}$  . Figs 3-6. Échelle = 10  $\mu\text{m}$  (Nézan et Chomérat 2011).

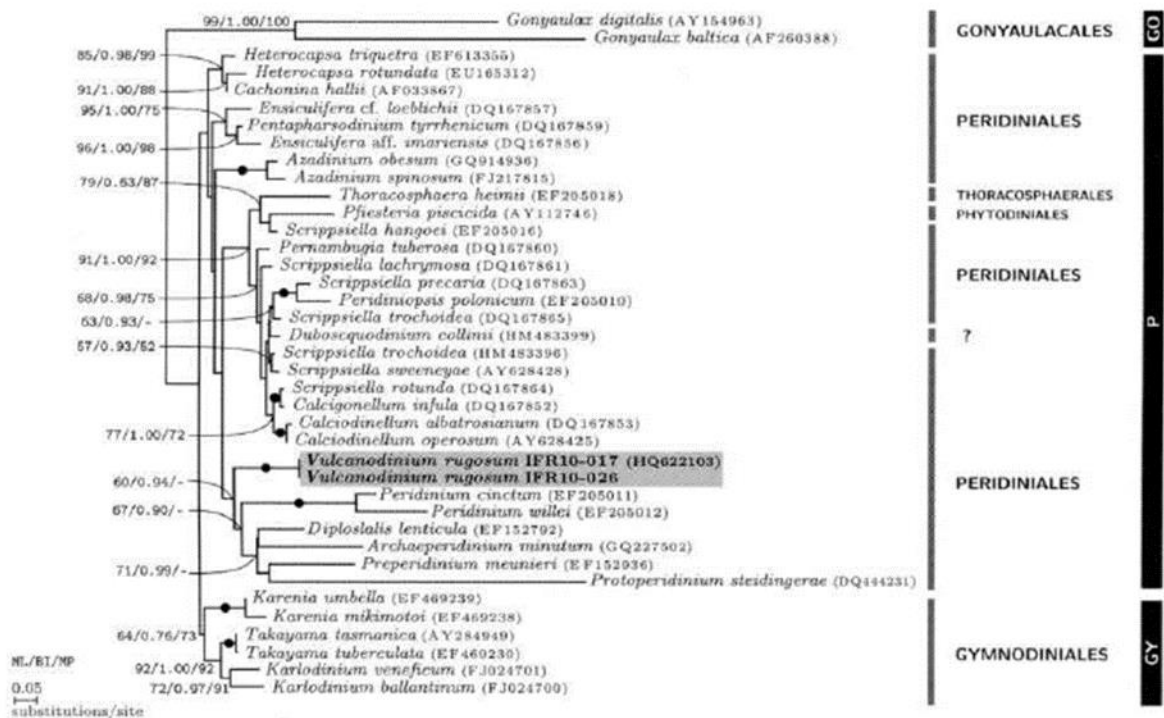




**Figure 19** : Observations en microscopie électronique à balayage de *Vulcanodinium rugosum*. 7. Vue ventrale. 8. Vue dorsale. 9. Vue latérale gauche. 10. Vue latérale droite. 11. Vue apicale. 12. Vue antapicale. Figs 7- 12, échelle = 10  $\mu\text{m}$  (Nézan et Chomérat 2011).



**Figure 20 :** Dessins montrant la morphologie et l'arrangement des plaques thécales de *Vulcanodinium rugosum*. 26 : vue ventrale. 27 : vue dorsale. 28 : vue apicale. 29 : vue antapicale. (Nézan & Chomérat, 2011)



**Figure 21 :** Phylogénie de *Vulcanodinium rugosum* et des espèces apparentées, établie à partir d'une matrice de données LSU rDNA (39 taxons. 635 caractères). (Nézan & Chomérat, 2011)

## 4.2 Distribution géographique

Un dinoflagellé à thèque de type péridiniöide a été suspecté d'être responsable de la production de pinnatoxines (PnTX) en Nouvelle-Zélande (Rhodes et al., 2010), des neurotoxines isolées chez le bivalve *Pinna muricata Linnaeus* au Japon dans les années 1990 (Chou et al., 1996). Ce dinoflagellé a été formellement identifié et décrit en 2011 tout d'abord dans des échantillons d'eau de l'Ingril (Nézan & Chomérat, 2011) et sa capacité à produire la pinnatoxine G (PnTX-G) a été confirmée. Rhodes et al. (2011b) ont démontré, sur des cultures, que cet organisme était bien le producteurs de pinnatoxines retrouvées dans les coquillages de Nouvelle Zélande.

Après avoir été détecté en Nouvelle Zélande (Rangaunu Harbor), en France (lagune d'Ingril), ce dinoflagellé a été observé dans des échantillons de sédiments et de macrophytes de l'île d'Okinawa au Japon (Smith et al., 2011) et sa description correspond à *V.rugosum*. Dans le même temps cet organisme a aussi été signalé dans les eaux Australiennes (Franklin Harbour) en 2011 et 2012 (Munday et al., 2012; Rhodes et al., 2011a). En 2013, *V. rugosum* a été observé dans les eaux du l'océan Pacifique au Mexique (Hernandez-Becerril et al., 2013). En 2012, Zeng et al. (2012) ont identifié *V. rugosum* dans le sud de la Mer de Chine à partir d'échantillon de sédiments. Bien que le dinoflagellé n'ait pas été observé, *V. rugosum* est suspecté d'être à l'origine de la contamination par les pinnatoxines dans les coquillages des côtes norvégiennes (Rundberget et al., 2011) et canadiennes (McCarron et al., 2012).





**Figure 22** : Présence de pinnatoxines et/ou de *Vulcanodinium rugosum* dans le monde. Les couleurs des symboles sur la carte indiquent quelle pinnatoxine (PnTX- A-H) est détectée dans les cellules de *V. rugosum* dans la zone géographique étudiée (ronds), seulement dans les coquillages (carrés), seulement dans les SPATT (Solid Phase Adsorption Toxin Tracking) (triangles). L'étoile, marque la présence de cellules de *V. rugosum* mais aucune analyse de pinnatoxine n'a été réalisée (Abadie et al., 2015b).

La figure 22 synthétise ces données géographiques. La vaste répartition mondiale de ce dinoflagellé toxique témoigne de ses facultés remarquables d'adaptation et légitime les études initiées dans ce travail de thèse pour comprendre sa biologie et son écologie.

## 5 Description de la zone d'étude : les lagunes Méditerranéennes

### 5.1 Généralité

Situées à l'interface entre mer et bassins versants, les lagunes côtières sont souvent présentées comme des écosystèmes fortement productifs (de 200 à 400  $\text{g.cm}^{-2}.\text{a}^{-1}$  selon Nixon) (Nixon & Lee, 1981) et qui subissent d'importantes fluctuations environnementales. Ces espaces naturels ont été décrits comme des réservoirs d'une biodiversité remarquable (Cognetti & Maltagliati, 2000; Costanza et al., 1998). Ces écosystèmes jouent un rôle de filtre et de

tampon en piégeant une large fraction des apports naturels ou anthropiques issus des bassins versants (Denant et al. 1991). Un accroissement des forçages physiques, chimiques et biologiques y est partout constaté : les lagunes côtières font parties des zones les plus sensibles et les plus durement touchées par l'anthropisation (PNUE 2007). Zones d'interface et de transition, les écosystèmes lagunaires sont l'objet de nombreuses sollicitations, associées à la richesse et à la diversité des potentialités qu'elles offrent. Les zones côtières et donc les espaces lagunaires sont les zones les plus fortement urbanisées qui font face à un accroissement constant de populations. Cette anthropisation importante affecte parfois le fonctionnement écologique de ces milieux par l'apport de rejets urbains ou agricoles mal maîtrisés (phénomène d'eutrophisation, contaminations chimiques industrielles) et par la destruction des habitats naturels. Depuis quelques années, de nombreuses études sont menées pour évaluer l'impact des changements globaux sur le fonctionnement de ces écosystèmes sensibles. Les lagunes, de par leur fonctionnement particulier, sont régulièrement confrontées à des épisodes d'efflorescences phytoplanctoniques associés à des espèces de dinoflagellés toxiques (Hattenrath et al., 2010; Sournia & Birrien, 1995) ou de diatomées (Douglas & Bates, 1992) qui affectent les usages de ces milieux. Ce phénomène mondial impacte les côtes européennes ainsi que les espaces côtiers méditerranéens (Penna et al., 2005; Sournia et al., 1991).

## 5.2. Les lagunes en Languedoc-Roussillon

Dans la région du Languedoc-Roussillon, les lagunes, communément désignées sous le terme d'étangs, couvrent près de 40000 hectares (Figure 23). Il y a plus de 20000 ans, sous l'effet d'un réchauffement climatique, le niveau marin s'est élevé par paliers recouvrant progressivement la plateforme continentale émergée. Au cours de sa remontée, la mer aurait refoulé les matériaux déposés sur la plateforme continentale, conduisant à la formation d'une barre sableuse émergée isolant au fur et à mesure des étendues d'eau de mer, et à l'origine du cordon littoral actuel. Des fleuves tels que l'Aude, l'Orb et l'Hérault ont aussi contribué à la formation du cordon littoral en apportant des matériaux fins (limons argileux ou sableux). En revanche, les crues des fleuves ont provoqué la montée des eaux lagunaires, et sous leur pression, des brèches se sont formées dans les cordons littoraux constituant des graus naturels. Certaines lagunes profondes françaises méditerranéennes correspondent à des

dépressions d'origine tectonique comme c'est le cas des étangs de Thau, Diana et Urbino, ces deux derniers étant situés en Corse.

En Languedoc-Roussillon, le climat de type méditerranéen, est caractérisé par des étés chauds et secs, et par des hivers doux. Les précipitations, généralement automnales, sont irrégulières et induisent une alimentation en eau des lagunes selon un régime cévenol caractérisé par des crues soudaines et fortes des affluents. Ces épisodes favorisent les apports d'eau douce par lessivage des sols du bassin versant. Sporadiques et volumineux, ils sont responsables de la variation rapide de la salinité, des apports en matière organique, en éléments nutritifs, en oligoéléments et en contaminants chimiques.



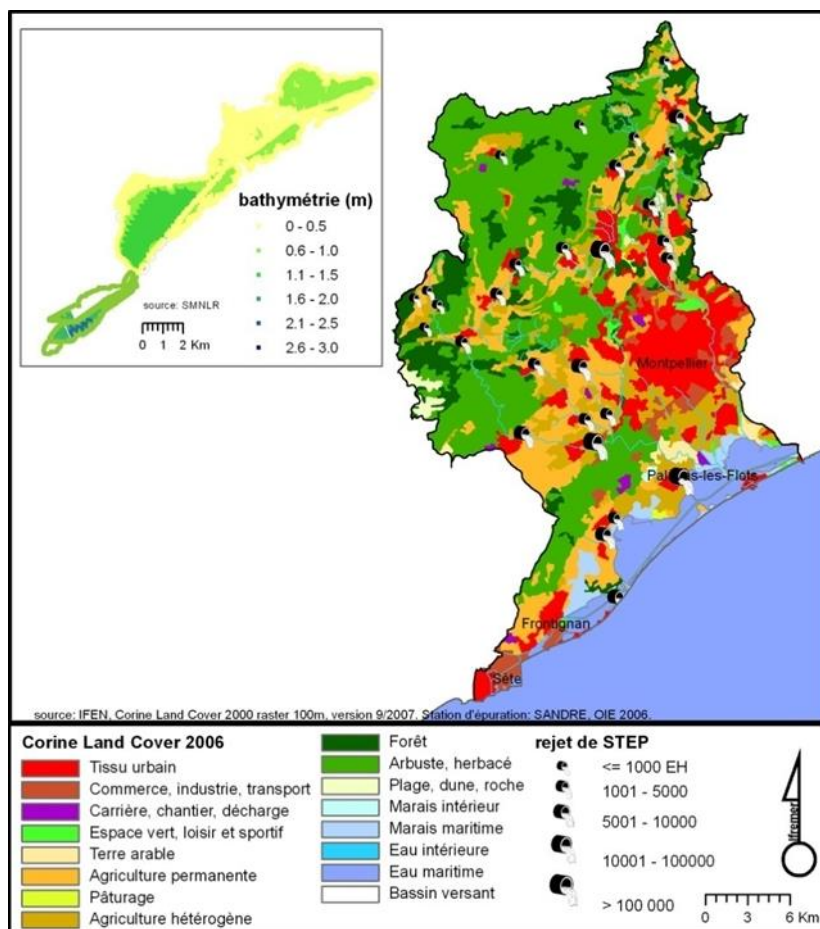
Figure 23 : Carte des lagunes du Languedoc-Roussillon (rapport Réseau de Suivi Lagunaire)

### 5.3. La lagune de l'Ingril

#### 5.3.1. Caractéristiques hydromorphologiques

L'étang d'Ingril fait partie d'un complexe de lagunes surnommées « étangs palavasiens ».

Ces étangs palavasiens ne formaient au XVII<sup>ème</sup> siècle qu'une seule et même lagune s'étendant de l'actuel bassin de Thau à l'ouest, à l'actuel étang de l'Or à l'est (SMNLR, 1991). Depuis les années 1970, les aménagements réalisés pour « assainir » les zones humides périphériques, faciliter les échanges et le commerce, et ouvrir le littoral héraultais au tourisme de masse, ont profondément modifié la configuration et le fonctionnement de cet hydrosystème. De nombreuses voies de communications, routières mais aussi fluviales, sont venues empiéter sur cet espace naturel qui a été progressivement parcellisé. Finalement, il reste aujourd'hui de cette grande lagune un chapelet de huit étangs principaux, reliés notamment par le canal du Rhône à Sète et de nombreux petits étangs secondaires souvent très confinés. Ce chapelet s'étend sur 25 km le long du littoral Héraultais, entre Frontignan et Carnon. Parmi les étangs de première ligne, c'est-à-dire situés entre le lido et le canal du Rhône à Sète (Ingril Sud, Pierre-Blanche, Prévost et Grec), l'Ingril et le Prévost sont les seuls qui possèdent un grau (communication directe avec la mer), ce qui leur confère un caractère marin prononcé. Les étangs de seconde ligne (Ingril Nord, Vic, Arnel et Méjean-Pérols), sont situés entre le canal du Rhône à Sète et le continent. Ils réceptionnent en premier lieu les apports du bassin versant c'est pourquoi leurs eaux sont souvent plus saumâtres. Le bassin versant des étangs palavasiens couvre environ 600 km<sup>2</sup>, avec à l'est, les sous-bassins versants du Lez et de la Mosson, et à l'ouest, celui du massif de la Gardiole, lequel alimente plusieurs résurgences karstiques (Figure 24). Malgré ces différences, eaux douces et eaux de mer sont redistribuées sur l'ensemble du chapelet par un réseau complexe de buses et de passes étangs/canal ou étang/étang (Derolez et al., 2014).



**Figure 24** : Bathymétrie des étangs palavasiens et occupation des sols sur leur bassin versant (Derolez et al., 2014)

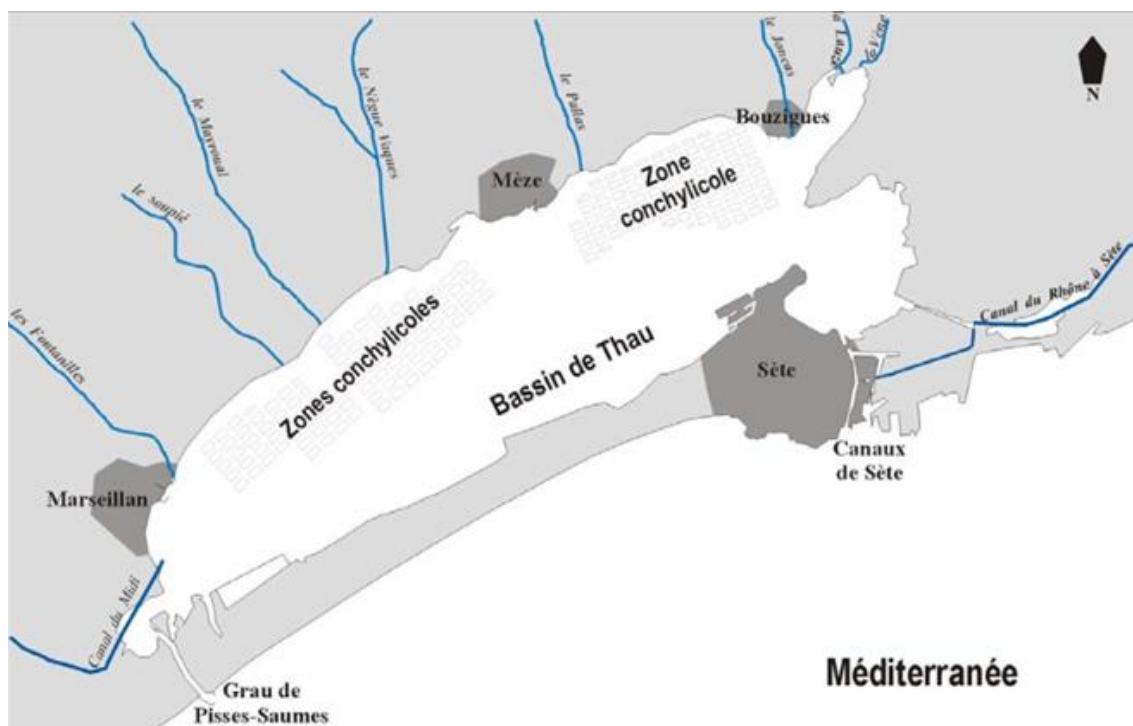
### 5.3.2. Activité conchylicole dans la lagune de Thau limitrophe de la lagune de l'Ingril

Dans la lagune de Thau et ses alentours, l'activité conchylicole existait depuis l'époque romaine. Mais c'est à partir de 1860 que s'est installée une véritable culture des coquillages puis en 1880, il y a eu mise en place de structures flottantes destinées au grossissement des coquillages dans les canaux de Sète. La dégradation de la qualité sanitaire du milieu a entraîné en 1907 le déplacement des parcs dans la lagune au large de Bouzigues. A partir de 1922, l'activité conchylicole s'intensifie. Seize hectares sont alors consacrés à l'élevage de coquillages. Ce développement s'étend vers Mèze entre 1945 et 1951, puis vers Marseillan entre 1951 et 1957. C'est en 1972, qu'on assiste au remembrement de l'ensemble des concessions conchylicoles (Deslous-Paoli et al., 1998).



**Figure 25** : Tables conchylicoles dans la lagune de Thau et huîtres creuses *Crassostrea gigas* élevées sur cordes (photos Ifremer)

Aujourd'hui, les tables d'exploitations conchylicoles (Figures 25 et 26) occupent 1/5 de la surface de la lagune de Thau et se répartissent en 3 secteurs d'activités qui comptent environ 2800 tables d'élevages exploitées par environ 800 producteurs. Même s'il reste difficile de connaître les chiffres exacts, on estime qu'environ 13000 tonnes d'huîtres (*Crassostrea gigas*) et 3000 tonnes de moules (*Mytilus galloprovincialis*) sont commercialisées chaque année. La production sur le bassin de Thau représente environ 10% de la production nationale et 90% de la côte méditerranéenne avec un chiffre d'affaires direct estimé à 35 millions d'euros (données fournies par le Syndicat Mixte du Bassin de Thau, SMTB).



**Figure 26** : Zones conchylicoles dans la lagune de Thau (Gangnery, 2003).



#### 5.4 Les HAB dans les lagunes méditerranéennes

L'ensemble des côtes françaises est concerné par la problématique des efflorescences microalgales toxiques. Cent douze zones font l'objet d'une surveillance dans le cadre du REPHY (Ifremer), dont 39 sont sur les côtes méditerranéennes. Cela représente, sur l'ensemble du territoire métropolitain, 189 points de prélèvements distincts échantillonnés régulièrement toute l'année avec une fréquence de prélèvement de mensuelle à hebdomadaire définie en fonction de la zone. A ces points de surveillance régulière, 244 points supplémentaires sont identifiés pour être activés en cas d'alertes. En 2014, cela représentait 3188 analyses d'échantillons d'eau. Ce réseau de surveillance, mis en place en 1984 après un épisode d'empoisonnement à DSP en Bretagne, permet de détecter rapidement les zones contaminées qui, si la contamination par les biotoxines dépasse le seuil sanitaire, peuvent alors faire l'objet d'une suspension de la commercialisation des coquillages, prononcée par l'Administration (Préfecture de Département) sous la forme d'arrêtés préfectoraux. Ces suspensions concernent la vente des coquillages exploités, mais peuvent aussi, dans certains cas, interdire leur ramassage sur les gisements naturels. Les durées de fermeture de ces zones d'exploitation ou de pêche, sont variables et dépendent de la dynamique des efflorescences et de la décontamination naturelle des coquillages. Les suspensions sont levées par arrêté préfectoral, quand les résultats montrent l'absence de risque pour le consommateur. Au cours de ces dix dernières années, les restrictions de commercialisation ont, en majorité, concerné les toxines lipophiles (anciennement dénommées diarrhéiques-DSP). L'étang de Salses-Leucate en Languedoc-Roussillon et les étangs de Diana et Urbino en Corse, ont été les principaux secteurs méditerranéens français impactés. En ce qui concerne les toxines paralysantes (PSP), l'étang de Thau est la zone méditerranéenne principalement concernée par cette contamination. L'étang de Leucate a connu un bref épisode à *Alexandrium minutum* toxique en 2007 mais la toxicité mesurée a toujours été inférieure au seuil de sécurité sanitaire.

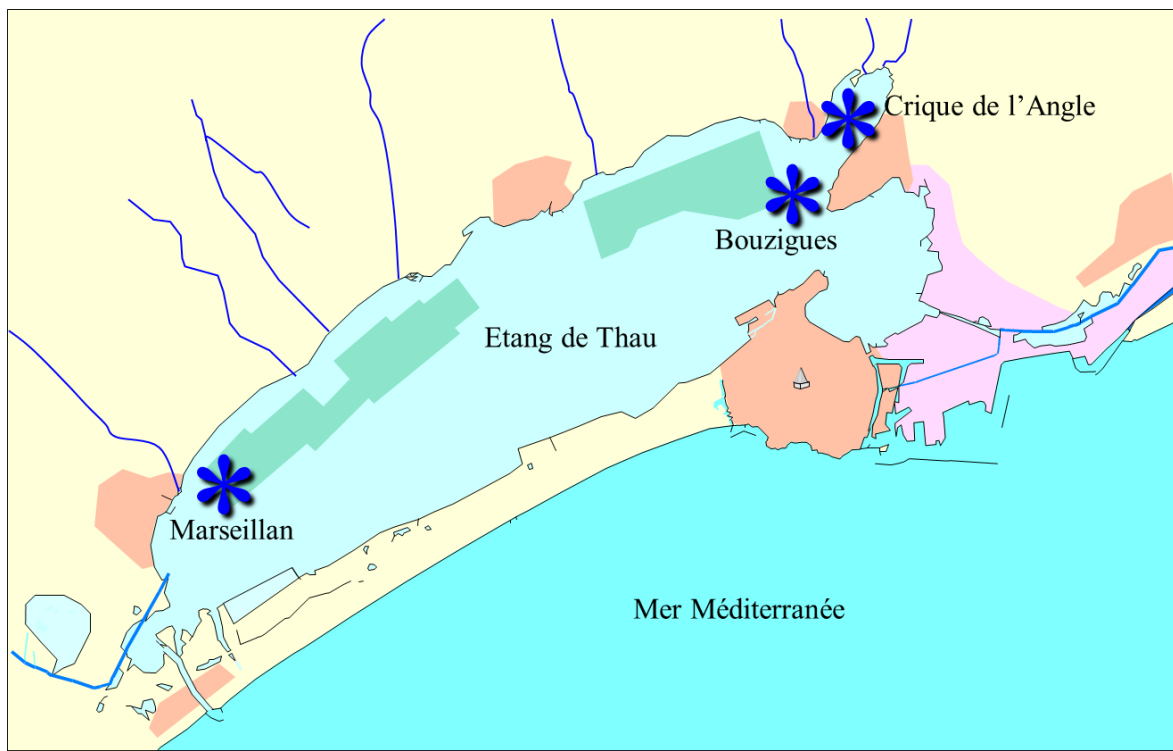
Dans les lagunes méditerranéennes françaises, l'existence d'espèces potentiellement toxiques est connue depuis de très nombreuses années. Plus récemment, il a été constaté que certaines



espèces de dinoflagellés ont été responsables d'efflorescences importantes dans certaines lagunes du Languedoc-Roussillon. L'étang de Thau est la seule zone sur le littoral méditerranéen français à être régulièrement confrontée à des proliférations de l'espèce *A. catenella* (toxines paralysantes PST). Cette espèce peut synthétiser jusqu'à six toxines différentes (Laabir et al., 2013a). Ces développements apparaissent principalement en période printanière et automnale (Laanaia et al., 2013) (Figure 27). La première efflorescence d'*A. catenella/tamarensis* s'est produite en 1998 bien qu'un bloom d'une espèce d'*Alexandrium* ait été observé dans l'étang de Thau en 1995. Aucun test n'avait été réalisé car cette efflorescence (environ 20000 cellules/L) avait été attribuée à *Alexandrium tamarensis* réputé non toxique à l'époque (C. Chiantella, com. pers.). En 1999 et 2000, les contaminations par les toxines PST ont été faibles. En novembre 2001, cette espèce a de nouveau provoqué, comme en 1998, une crise importante. Les concentrations en toxines PST ont été importantes, de l'ordre de 5000 µg équivalent saxitoxine/kg de chair dans les palourdes, et pour la première fois, elles ont dépassé le seuil autorisé dans les huîtres creuses d'élevages. Par ailleurs, aucune contamination n'a été mise en évidence entre 2000 et 2002. En 2003 le niveau de contamination des huîtres a doublé par rapport à celui de 2001, tandis qu'en 2004, malgré un niveau élevé de contamination des moules, les huîtres élevées sur tables n'ont pas dépassé un maximum de 520 µg équivalent saxitoxine/kg de chair au point REPHY Bouzigues (Figure 28).



**Figure 27** : Vue aérienne d'une prolifération massive d'*Alexandrium catenella* (automne 2004) ayant entraîné une coloration rouge de l'eau de surface de la crique de l'Angle dans la lagune de Thau. Photo A. Vaquer 2004.



**Figure 28** : Localisation des points de suivi REPHY dans l'étang de Thau

En octobre 2005, le début d'un bloom automnal a été observé mais en raison des conditions météorologiques qui se sont dégradées, il n'y a pas eu d'efflorescence nuisible pour l'activité conchylicole. Les genres toxiques *Dinophysis* et *Pseudo-nitzschia* sont également présents dans les lagunes. Si aucune toxicité ASP (toxines amnésiantes) n'a été détectée jusqu'à aujourd'hui dans les milieux naturels, une toxicité DSP (toxines diarrhéiques) a été observée pour la première fois dans l'étang de Thau sur des moules en octobre 2005. Les principaux taxons accompagnants (en abondances dominantes) sont les diatomées des genres *Chaetoceros*, *Skeletonema*, *Leptocylindrus*, *Nitzschia*, *Thalassiosira*, *Coscinodiscus*, *Thalassionema*, *Rhizosolenia*, *Pseudo-nitzschia*. Les principaux dinoflagellés accompagnants sont *Scrippsiella*, *Prorocentrum* sp., *Gymnodinium*, *Gonyaulax* et *Peridinium*. Depuis peu, d'autres espèces (i.e. *Prorocentrum rhathymum* et *Coolia monotis*), encore faiblement abondantes, sont observées de plus en plus fréquemment.

L'étang de Thau est la plus importante zone conchylicole du sud de la France : 20 % de la surface de l'étang sont ainsi concernés par l'élevage d'un stock d'huîtres estimés à environ 25000 tonnes (Souchu et al., 2001). On estime qu'environ 2000 emplois directs sont

concernés par la conchyliculture dans le département de l'Hérault. En 2012, la production ostréicole méditerranéenne française était évaluée à 6044 tonnes et la production mytilicole à environ 17000 tonnes, le tout pour un chiffre d'affaire (HT) d'environ 61 millions d'euros. La conchyliculture représente aussi un héritage culturel important, qui contribue à la définition d'une identité locale forte directement liée à l'attrait touristique de la région. L'étang de Thau est par ailleurs un haut site de conservation de la biodiversité marine : on y rencontre 100 des 500 mollusques méditerranéens, et de très nombreuses espèces de macrophytes autochtones (163 espèces) et également 36 espèces exotiques (Verlaque, 2001). Tous ces éléments (valeur économique, écologique, patrimoniale, etc.) démontrent l'importance des mesures de conservation et de gestion que les autorités locales mettent en place et animent. Depuis le début des années 2000, près de 4 M€ sont ainsi investis annuellement.

Ainsi les travaux entrepris dans ce projet de thèse sont axés sur l'amélioration des connaissances d'une espèce toxique émergente dont les impacts sur ces lagunes méditerranéennes pourraient être importants dans les années à venir.

## 6. Objectifs de la thèse

Les teneurs en pinnatoxines décelées dans la lagune d'Ingril sont les plus importantes rapportées à ce jour dans le monde. Malgré l'absence de donnée toxicologique sur l'homme, le risque est patent au regard de la très forte toxicité sur l'animal. Ainsi, l'acquisition de connaissances sur la biologie et l'écologie de cette espèce et sa production de toxines devient cruciale. Les objectifs de la thèse ont donc été fixés en ce sens.

**Objectif 1** : Caractéristiques écophysiologiques et toxiniques de *V. rugosum*.

Nous allons étudier l'influence des facteurs abiotiques majeurs (température, salinité, sources azotées) sur la croissance de *V. rugosum* et la production de pinnatoxine G à l'aide d'expérimentations au laboratoire. L'intérêt de ces études écophysiologiques est de décrire la modulation de la croissance et de la production toxinique en vue de mieux comprendre leur déterminisme *in situ* et à terme de mettre en place des modèles simples prédictifs de l'avènement des efflorescences.

**Objectif 2** : Distribution spatiale et temporelle de *V. rugosum* dans la lagune de l'Ingril.

La nécessité d'une étude *in situ* dans l'étang d'Ingril apparaît comme une étape incontournable pour suivre la dynamique des efflorescences de *V. rugosum*. En effet, l'espèce y a été identifiée pour la première fois en France. Nous mettrons en place une méthodologie spécifique aux dinoflagellés benthopélagiques en associant à la fois la recherche des cellules dans la colonne d'eau, et sur les macrophytes, sur un cycle annuel pour déterminer les abondances de cette espèce (cellules végétatives et kystes temporaires) dans plusieurs endroits de la lagune. Le suivi des paramètres abiotiques habituels devrait nous aider à confronter les résultats *in situ* à ceux issus des expérimentations *in vitro* afin de mettre en évidence les facteurs clés modulant la dynamique de *V. rugosum* dans son milieu naturel et la production de pinnatoxine G, et par voie de conséquence les niveaux de contamination des mollusques filtreurs.

**Objectif 3** : Le cycle de vie de *V. rugosum*

L'espèce émergente *V. rugosum* a été identifiée récemment. Ainsi les données disponibles sur son écologie et son cycle de vie sont encore limitées. Des travaux devront être menés pour améliorer les connaissances sur la biologie de cette espèce, sa multiplication végétative et sa reproduction sexuée.

**Objectif 4** : Présence de *V. rugosum* et contamination des moules dans la lagune de l'Ingril.

Les pinnatoxines produites par *V. rugosum*, ont été formellement identifiées dans des échantillons de mollusques remontant à 2009. Pour autant, aucun suivi complet annuel de cette contamination, n'a été jusqu'à présent réalisé dans la lagune de l'Ingril. Ainsi, il a été prévu au cours de cette thèse, de suivre l'évolution pendant 12 mois, des concentrations en pinnatoxines dans les moules de l'étang d'Ingril. Parallèlement la recherche de *V. rugosum*, selon le protocole REPHY, sera réalisée. Ces expérimentations devront nous aider à mieux comprendre la dynamique de contaminations des bivalves filtreurs dans des conditions naturelles. En même temps en collaboration avec Zita Zendong et Philipp Hess des échantillonneurs passifs (SPATT) ont été installés dans l'Ingril afin de tester l'efficacité de plusieurs résines adsorbantes notamment par rapport aux pinnatoxines.

**Objectif 5** : Distribution des pinnatoxines dans les moules récoltées dans cinq lagunes languedociennes et description des voies de dissémination de *V. rugosum*.

Les données disponibles montrent bien que la lagune d'Ingril est un site particulièrement touché par la contamination des pinnatoxines et de *V. rugosum*. Comme souvent, lorsque l'on découvre un nouvel organisme toxique et que les crises sont récurrentes et importantes, la question de sa propagation à des écosystèmes proches en particulier à vocation conchylicole très importante comme l'étang de Thau, se pose avec acuité. Cette thèse devra nous permettre d'évaluer le risque d'expansion de cette espèce à travers le suivi des pinnatoxines dans des lagunes languedociennes proches, reliées physiquement, ou par des échanges conchylicole. Les concentrations en pinnatoxines seront suivies pendant un an dans la chair de moules sauvages de cinq lagunes. En parallèle, des expérimentations au laboratoire devront permettre d'évaluer la survie de *V. rugosum* dans le tractus digestifs des coquillages (huîtres et moules). Ainsi nous pourrons tester et valider l'hypothèse de la propagation de cette espèce par transfert de coquillages en étudiant les interactions entre *V. rugosum* et les mollusques bivalves.

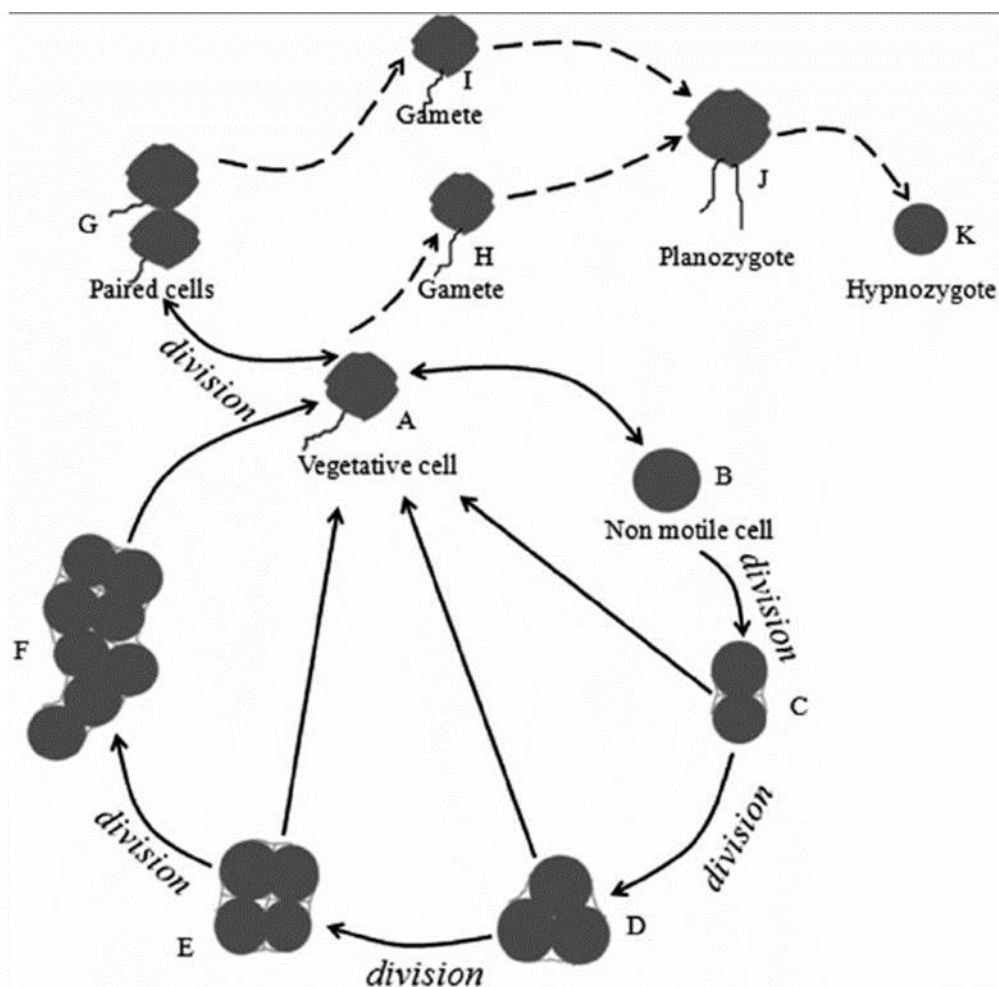
## Chapitre I : *Vulcanodinium rugosum* et les pinnatoxines dans la lagune d'Ingril

*Vulcanodinium rugosum* a été décrit pour la première fois par Nézan et Chomérat (2011). Cependant malgré plusieurs études menées sur cette espèce, son cycle de vie n'a toujours pas été complètement élucidé. Dans un premier temps, nous ferons le point sur les connaissances actuelles, par la suite nous présenterons nos travaux.

Cette espèce est identifiée comme productrice de pinnatoxines (Hess et al., 2013; Rhodes et al., 2011a, 2011b, 2010; Selwood et al., 2014; Smith et al., 2011). Dans ce chapitre, après un rapide bilan des connaissances acquises sur ces neurotoxines, nous développerons les travaux de recherches dans le cadre de ma thèse sur cet organisme évoluant dans la lagune de l'ingril et sur les pinnatoxines produites.

### 1. Cycle de vie de *Vulcanodinium rugosum*

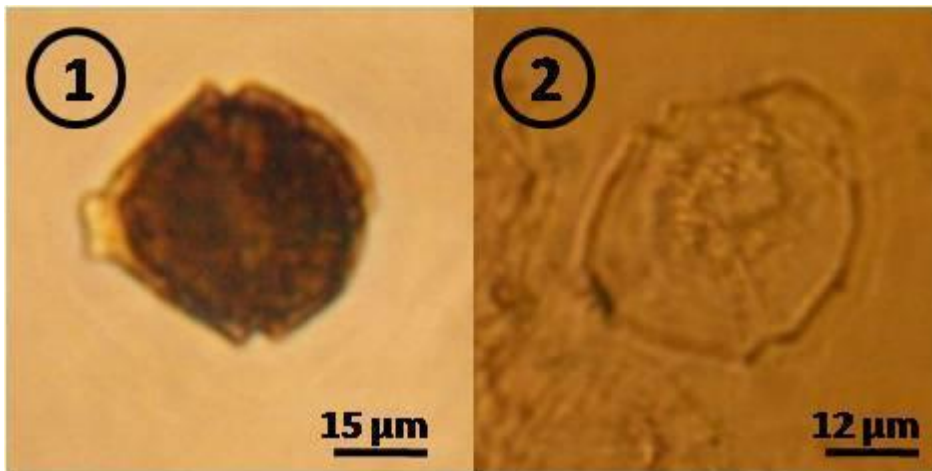
*Vulcanodinium rugosum* est un dinoflagellé récemment décrit (Garrett et al., 2014; Hernandez-Becerril et al., 2013; Nézan & Chomérat, 2011) et appartenant à un nouveau genre. Comme pour la quasi-totalité des espèces appartenant au groupe des dinoflagellés, *V. rugosum* est supposé avoir deux phases distinctes : une phase de multiplication végétative (reproduction asexuée) et une phase sexuée. La phase asexuée, correspondrait à la phase pélagique lorsque les cellules sont présentes dans la colonne d'eau. La phase de reproduction sexuée, étape très importante dans le cycle de vie des dinoflagellés aboutit à la formation d'un planozygote qui donne un kyste de résistance. Cette phase est marquée par la transition d'une phase de vie haploïde ( $n$  chromosomes) vers une phase diploïde ( $2n$  chromosomes). Pour *V. rugosum*, les études rapportant les différentes étapes de son cycle sont rares. En 2012, Zeng et al. (2012) ont proposé un cycle incomplet mettant en évidence l'existence d'un cycle pélagique, d'une reproduction sexuée hypothétique et d'un cycle benthique non mobile (Figure 29). Les deux cycles sont étroitement liés mais les facteurs environnementaux et/ou physiologiques contrôlant le passage de l'un à l'autre ne sont pas encore connus.



**Figure 29** : Diagramme du cycle de vie de *Vulcanodinium rugosum* : phases confirmées (lignes pleines) et hypothétiques (lignes en pointillées). A : cellule végétative. B : kyste temporaire ou cellule non motile. C: deux cellules filles non mobiles. D: trois cellules filles non mobiles. E : quatre cellules filles non mobiles. F : huit cellules filles non mobiles. G : cellules appariées juste divisées. I et H : deux gamètes. J : planozygote. K : hypnozygote proposé par Zeng et al. (2012).

En complément des observations faites par Zeng et al. (2012), nos travaux réalisés au laboratoire sur des cultures de la souche IFR-VRU-01, isolée en 2010 par Nézan et Chomérat de l'eau de la lagune de l'Ingril et maintenue dans la souchothèque, ont permis d'observer chez *V. rugosum* (Figure 30), la formation de gamètes et un début de fusion (Figure 31) devant donner un planozygote. Malheureusement, il n'a pas été possible de le mettre en évidence. Comme dans l'étude de Zeng et al. (2012), il n'a pas été possible d'obtenir (ou d'observer) de kyste de résistance de *V. rugosum*. Cependant, nous avons observé l'émergence d'une cellule végétative à partir d'un kyste temporaire (Figure 32) et déterminé les différentes étapes de division des kystes temporaires (Figure 33).

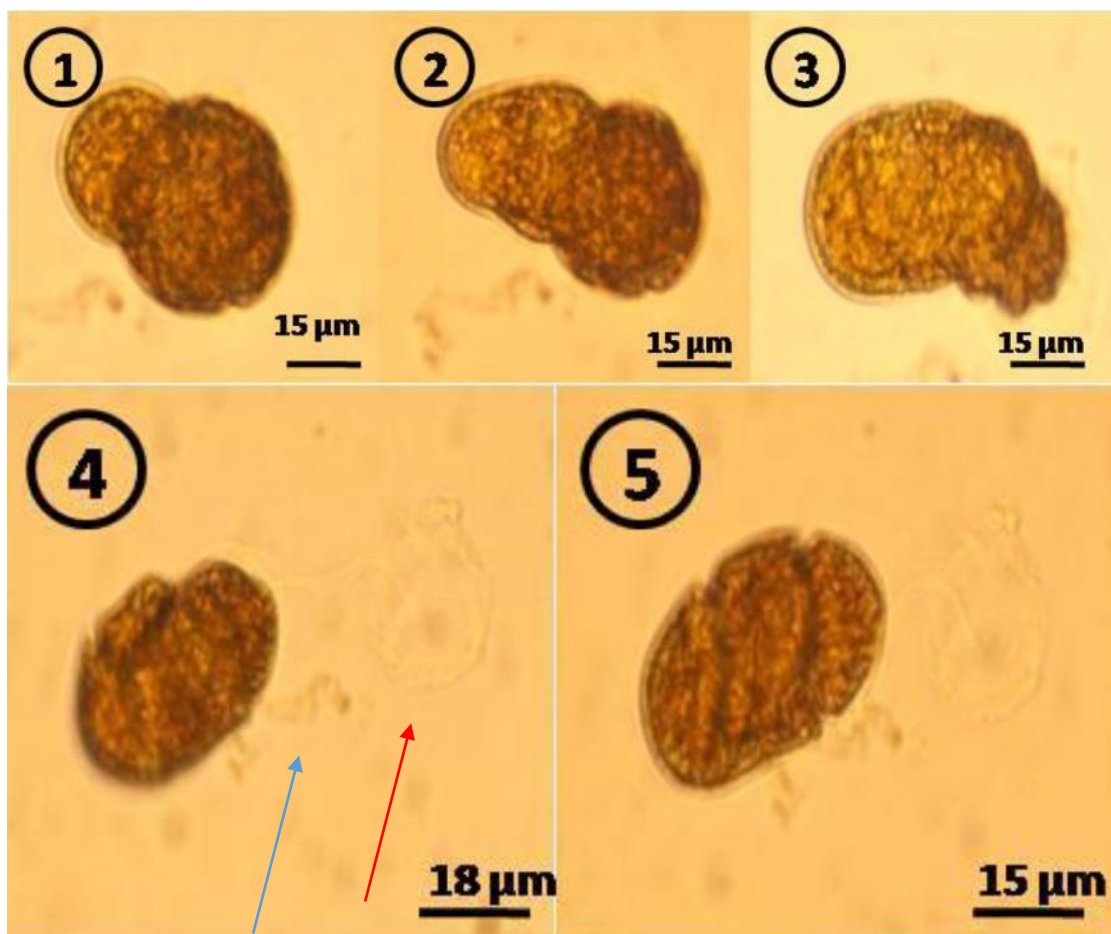




**Figure 30** : Cellule végétative mobile (1) et thèque vide (2)



**Figure 31** : Gamètes de *V. rugosum* avant conjugaison (1) et en cours de conjugaison (2)



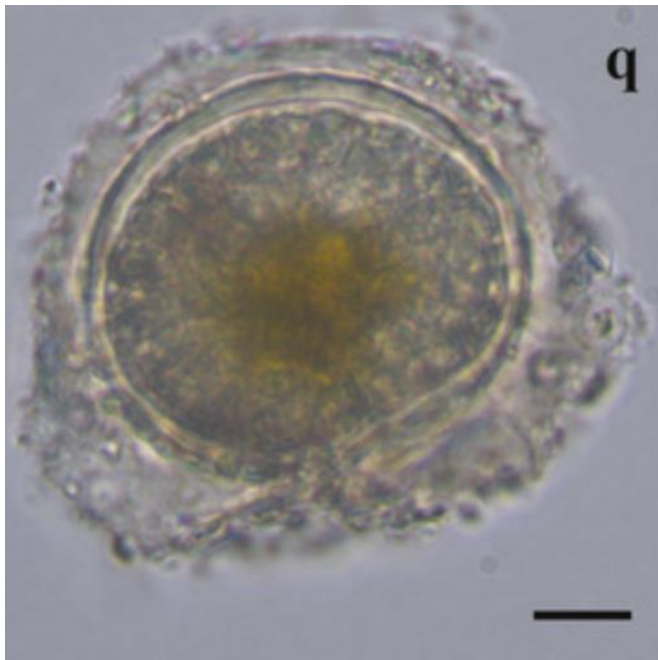
**Figure 32 :** *V. rugosum*, séquence temporelle de la fusion de deux cellules par anisogamie. Nous pouvons observer la thèque vide (flèche rouge) et le flagelle (flèche bleue) de la cellule qui a fusionné (4 et 5).



**Figure 33 :** *V. rugosum*, division d'un kyste temporaire (1), donnant deux cellules filles non mobiles(2) dont une se divise (3) et une autre probablement a germé pour donner une cellule végétative (4).

A ce jour, aucun travail ne fait état de la description formelle du kyste de résistance de *V. rugosum* dans des cultures maintenues au laboratoire. Nous ne disposons pas de description

qui permet d'affirmer si cette nouvelle espèce est homothallique ou hétérothallique. La seule présence du kyste de résistance, mis en évidence à ce jour, l'a été dans des échantillons de sédiment de la Baie de Fangar sur la côte méditerranéenne Espagnole par Satta et al. (2013) (Figure 34). L'absence de kyste dans nos cultures monoclonales et sa description dans un environnement naturel, laisse à penser que c'est une espèce hétérothallique.



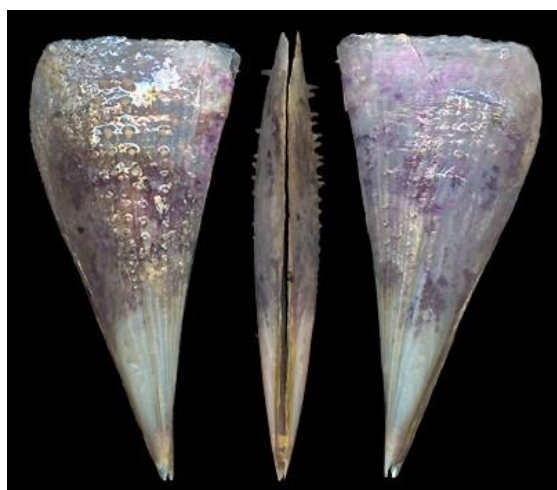
**Figure 34** : Kyste de résistance de *Vulcanodinium rugosum* isolé de sédiments de la Baie de Fangar (Satta et al., 2013). Echelle 10  $\mu\text{m}$

La formation de kystes de résistance qui peut intervenir à la fin de la reproduction sexuée reste une étape importante pour réussir à survivre aux conditions environnementales défavorables grâce au brassage chromosomique qui augmente la diversité génétique intraspécifique. Ces kystes, qui se trouvent dans le sédiment constitueront alors une réserve d'individus à  $2n$  chromosomes (banque de kystes), qui germeront et donneront des cellules végétatives ( $n$  chromosomes après méiose) lorsque les conditions environnementales redeviennent favorables. Les kystes représentent aussi une source de dissémination de l'espèce par transfert de sédiments, de coquillages mais également par les eaux de ballast des bateaux (Garrett et al., 2014). L'identification des formes de résistance et la connaissance de

leurs aires de répartition sont donc importantes afin de prévenir les risques de dissémination et de contamination.

## 2. Toxines et toxicité de *V. rugosum*

Les pinnatoxines, de par leur structure chimique et leur action toxique sur la souris par voie intrapéritonéale, sont classées comme FATs (Fast Acting Toxins) et positionnées dans le groupe des imines cycliques. Les pinnatoxines, comme la quasi-totalité des toxines des dinoflagellés, sont des métabolites secondaires. Ces métabolites sont formées à partir de métabolites dits primaires résultant du métabolisme de la cellule (Flynn & Flynn, 1995). Ces toxines ont été identifiées pour la première fois à partir d'extrait du bivalve *Pinna muricata* (Pinne rare-épine) (figure 35, A) récolté sur l'île d'Okinawa au Japon (Chou et al., 1996; Takada et al., 2001; Uemura et al., 1995). En 2006, les ptériatoxines A, B et C ont été isolées à partir d'extrait du bivalve *Pteria penguin* (Huître ailée pingouin) (Figure 35, B) et dont la structure chimique est proche des pinnatoxines (Hao et al., 2006).



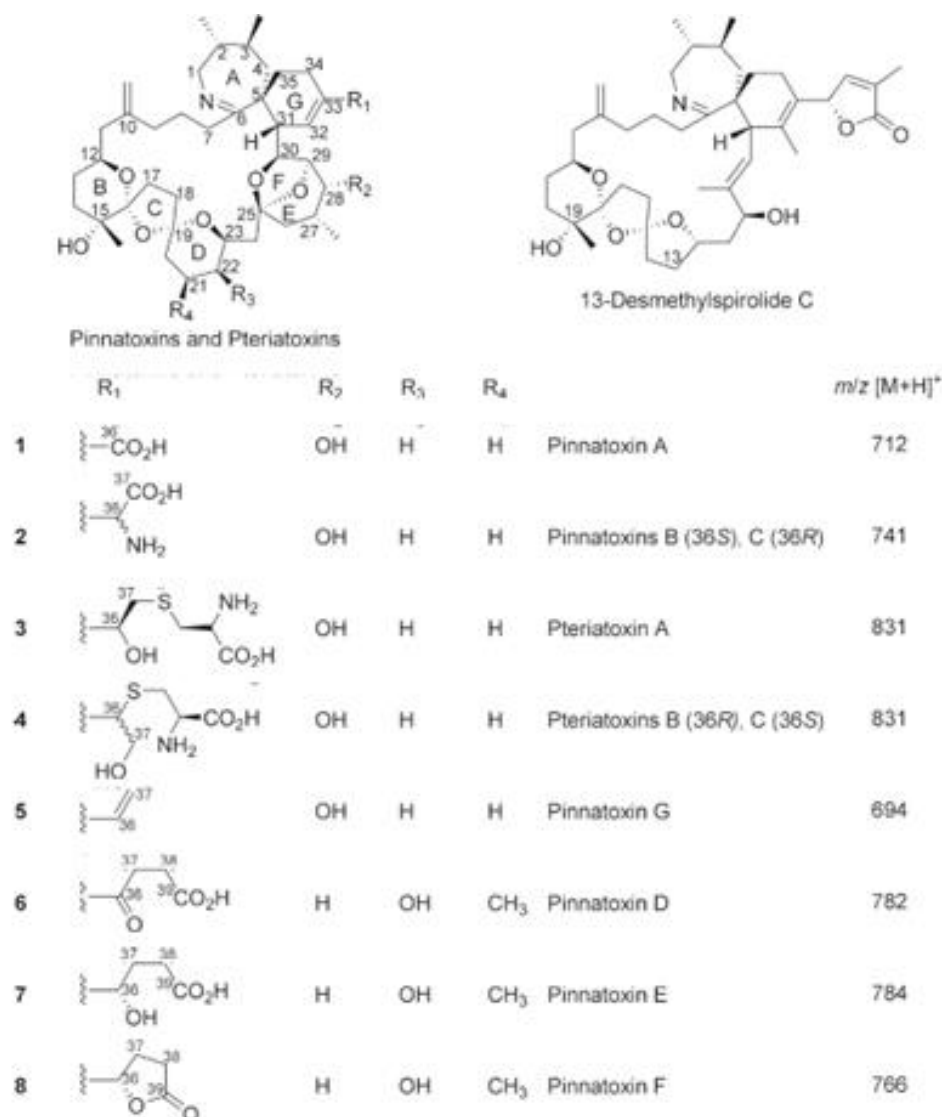
A



B

**Figure 35** : *Pinna muricata* (A) et *Pteria penguin* (B) Linnaeus, 1758 (photos idscaro.net).

La figure 36 présente la structure chimique des pinnatoxines (A à F), des ptériatoxines (B et C) en comparaison avec la 13-desméthylspirolide C (Selwood et al., 2010).



**Figure 36** : structure des pinnatoxines, ptériatoxines et de la 13-desméthylspirolide C.

Les pinnatoxines après avoir été découvertes au Japon, en Australie (Selwood et al., 2010), en Chine et en Nouvelle Zélande (Rhodes et al., 2010), notamment dans des huîtres, ont été observées dans des moules récemment en Europe plus spécifiquement en Norvège (Rundberget et al., 2011) et en Amérique du Nord (McCarron et al., 2012). En France, la pinnatoxine G a été détectée pour la première fois en 2011 sur des échantillons de moules naturelles récoltées en 2010 dans le cadre du REPHY. Cependant, à l'exception de la lagune d'Ingril (Languedoc-Roussillon, France), les valeurs observées restent faibles (de 3 à 7 µg/kg de chair de mollusques).

Comme il a été observé précédemment pour les autres imines cycliques, *V. rugosum* montre une toxicité importante sur les souris par voie intrapéritonéale (Munday et al., 2012). La forte

toxicité intrinsèque de ces toxines est caractérisée par de faibles LD<sub>50</sub> par voie intrapéritonéale sur les souris, à savoir, de 57, 13 et 48 µg/kg pour les pinnatoxines E, F et G, respectivement. Ces valeurs sont relativement similaires à celles mesurées pour les spirolides. A ce jour, aucun évènement d'empoisonnement humain incriminant les pinnatoxines n'a pu être mis en évidence.

Le tableau 2 synthétise les résultats de toxicité ainsi que les valeurs de toxines observées dans les souches de *V. rugosum* répertoriées mondialement ainsi que les conditions de culture.



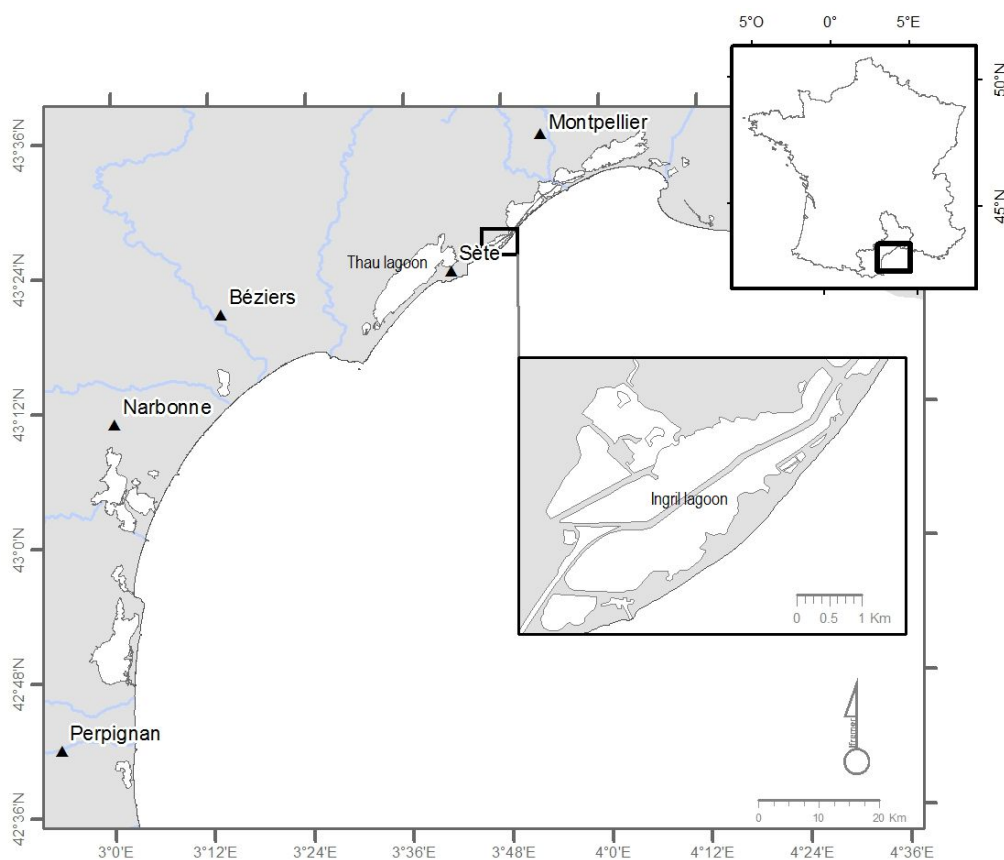
Strain and studied area	Temperature (°C)	Salinity	Irradiance ( $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	Culture medium	Detected toxins (amount in $\text{pg cell}^{-1}$ )	Toxicity (LD 50 mice)	Reference
<b>Mediterranean waters</b>							
IFR-VRU-01(Ingril lagoon France)	25 - 30	30 - 35	100	ENSW	PnTX-G (0.14 - 0.36 ) Portimine		This study, Abadie et al. (2015)
IFR-VRU-01(Ingril lagoon France)	18	38	200	L1	PnTX-G (4.7)		Hess et al. (2013)
<b>Pacific waters</b>							
CAWD163 (Rangaunu harbour NZ)	25	**	70-100	K	PnTX-E (0.8) PnTX-F (5.1)		Rhodes et al. (2010)
CAWD166 (Rangaunu harbour NZ)	25	**	70-100	K	PnTX-E (3.7) PnTX-F (20.1)		Rhodes et al. (2010)
CAWD167 (Rangaunu harbour NZ)	25	**	70-100	K	PnTX-E (1.4) PnTX-F (8.4)		Rhodes et al. (2010)
CAWD168 (Rangaunu harbour NZ)	25	**	70-100	K	PnTX-E (0.8) PnTX-F (4.6)	IP 1.33 mg/kg gavage 2.33 mg/kg	Rhodes et al. (2010)
CAWD170 (Rangaunu harbour NZ)	25	**	70-100	K	PnTX-E (2.4) PnTX-F (13.6)		Rhodes et al. (2010)
CAWD171 (Rangaunu harbour NZ)	25	**	70-100	K	PnTX-E (0.5) PnTX-F (3.5)		Rhodes et al. (2010)
CAWD178 (Rangaunu harbour NZ)	25	**	70-100	K	PnTX-E (0.4) PnTX-F (2.3)		Rhodes et al. (2010)
** (Rangaunu harbour NZ)	*	**	*	K	Portimine	IP : 1570 $\mu\text{g/kg}$	Selwood et al. (2013)
CAWD188 (Ishigakijima Island Okinawa Japan)	*	**	**	K	PnTX-G (11.9)		Kirsty et al. (2011)
CAWD190 (Ishigakijima Island Okinawa Japan)	*	**	**	K	PnTX-G (15)		Kirsty et al. (2011)
G65 (South China Sea)	20	**	90	f2	new PnTX (20)		Zeng et al. (2012)
CAWD198 (South China Sea)	25	**	100	K	PnTX-H	IP 67 $\mu\text{g/kg}$ gavage 163 $\mu\text{g/kg}$	Selwood et al. (2014)
** (Laz aro Cardenas Michoacan Mexico)	18-20	**	90-167	L1SE	**		Hernandez-Becerril et al. (2013)
<b>Indian Ocean</b>							
CAWD180 (Franklin harbour Australia)	25			K	PnTX-G (87) PnTX-E (10) PnTX-F (41) PnTX-A (1.3)		Rhodes et al. (2011)
CAWD180 (Franklin harbour Australia)	25			K	PnTX-G (13)		Rhodes et al. (2011)
CAWD183 (Franklin harbour Australia)	25	**	**	K	PnTX-G	IP Fed : 48.0 $\mu\text{g/kg}$ IP Fasted : 42.7 $\mu\text{g/kg}$	Munday et al. (2012)
** Unavailable data    NZ (New Zealand)    IP (Intra-Peritoneal)							

**Tableau 2 :** Liste des souches monoclonales de *Vulcandonium rugosum* en culture isolées dans différents écosystèmes marins, conditions de culture (température, salinité, luminosité et type de milieu de culture), type de toxines détectées et toxicité (LD<sub>50</sub>).

### 3. Développement de *Vulcanodinium rugosum* dans la lagune de l'Ingril

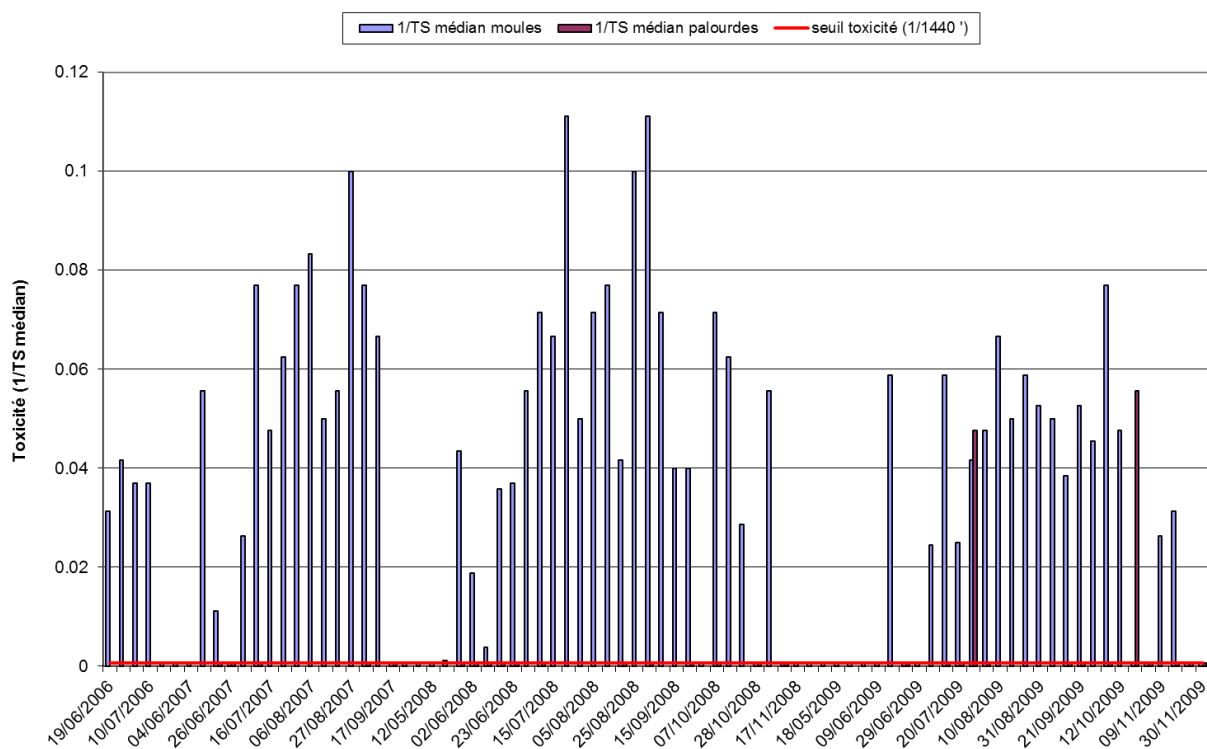
#### 3.1. Origine de la mise en évidence de la contamination par les pinnatoxines

Dans le cadre du réseau REPHY, en juin 2006, des bioessais sur souris ont été réalisés sur des échantillons de moules de la lagune d'Ingril (Figure 37) lors d'une alerte à présence de *Dinophysis acuminata*, espèce productrice de toxines lipophiles (DSP). La méthode utilisée était issue du protocole mis au point par Yasumoto et modifiée pour éviter les interférences avec d'éventuelles toxines de type PSP (Yasumoto et al., 1984). Les temps de survie des souris observés pendant la période de contamination étaient compris entre 27 et 32 minutes avec des symptômes neurologiques. Ils étaient différents de ceux observés lors des épisodes à toxines PSP. Ce phénomène toxique de 2007, a été observé pendant 4 semaines consécutives (Figure 38).



**Figure 37** : Lagune marine d'Ingril (Languedoc-Roussillon, France) (Abadie et al., 2015a).





**Figure 38** : Variations annuelles des épisodes de toxicité atypique dans la lagune de l’Ingril mesurés grâce à des tests sur des souris de 2006 à 2009. La toxicité est exprimée par l’inverse du temps de survie médian (les barres bleues représentent la toxicité dans les moules, les barres bordeaux représentent la toxicité dans les palourdes et le trait rouge représente le seuil de toxicité).

Du fait de la présence de cette toxicité atypique, il a été décidé de pratiquer en 2007, dès le début du mois de juin, des bioessais sur souris pour suivre un éventuel épisode de contamination et ce même en l’absence d’espèces phytoplanctoniques potentiellement toxiques (dérogation au protocole REPHY). Le bioessai sur souris réalisé le 4 juin 2006 a été déclaré « négatif » car deux des trois souris avaient survécu. Cependant la troisième était morte en 124 minutes en présentant des symptômes neurologiques. La semaine suivante, les trois souris mouraient en moins de 20 minutes. Le phénomène a perduré jusqu’au 10 septembre 2007. Au cours de cette période, aucune espèce phytoplanctonique toxique connue et répertoriée en France pouvant expliquer ce phénomène n’a pu être mise en évidence.

### 3.2 Mise en place de projets de recherche spécifiques aux pinnatoxines dans Ingril

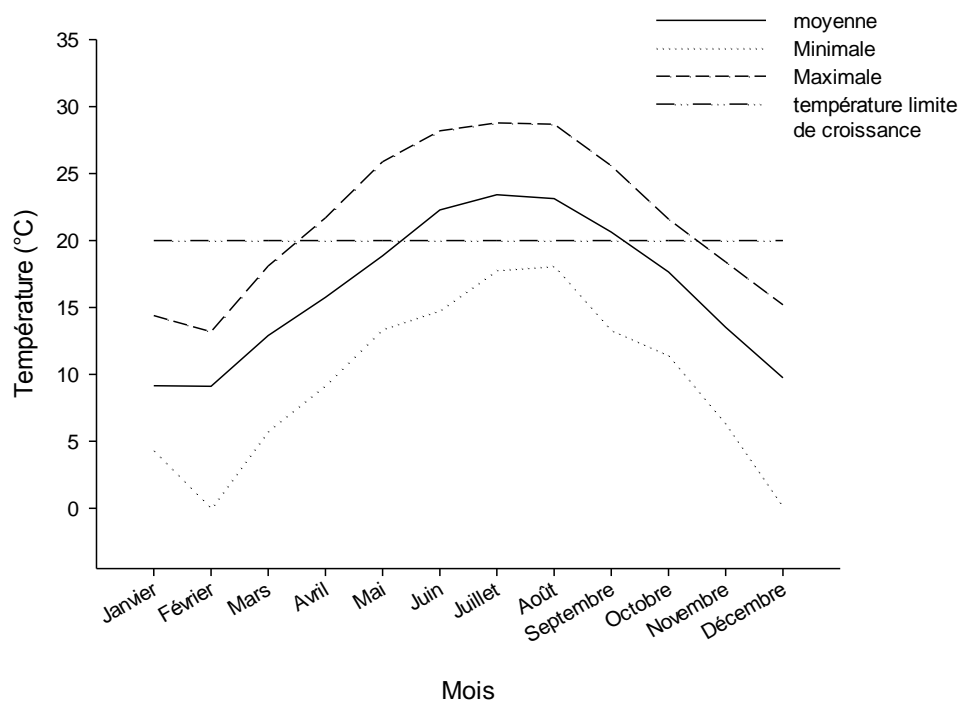
#### 3.2.1. Suivi de la toxicité atypique des souris et mises en évidence de la pinnatoxine G dans les moules.

Ce phénomène de toxicité atypique ayant été à nouveau détecté en 2007, en partenariat avec le laboratoire Ifremer PHYC de Nantes, un suivi systématique de la toxicité a été instauré dès 2008. Les résultats des années suivantes (2008 et 2009) n'ont fait que confirmer le phénomène et montrer sa récurrence. En effet, en 2008 cette toxicité a été détectée du 19 mai au 4 novembre et pour 2009 du 15 juin au 17 novembre. Les bioessais sur souris ont été arrêtés au 1<sup>er</sup> janvier 2010 suite à la mise en place de la nouvelle méthode officielle par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS).

Les valeurs maximales observées ont été respectivement de 261, 1244, 568 et 631 µg/kg pour 2009, 2010, 2011 et 2012, confirmant ainsi le caractère récurrent et important du phénomène toxique dans cette lagune (Hess et al., 2013). Ces concentrations maximales observées en France étaient largement supérieures aux valeurs maximales rapportées dans les coquillages de Norvège, Canada et Nouvelle Zélande où ces valeurs étaient comprises entre 100 et 200 µg/kg de chair de coquillage.

L'analyse des pinnatoxines à Ingril a alors montré clairement que la Pinnatoxine G était l'analogue présent le plus abondant accompagné d'un faible pourcentage de la Pinnatoxine A (connu pour être un métabolite de la Pinnatoxine G produit par le coquillage). La comparaison de l'accumulation des toxines chez les moules et les palourdes a démontré que les moules accumulaient toujours la Pinnatoxine G de manière préférentielle, et que ce bivalve restait donc l'espèce sentinelle par excellence.

Le début du phénomène semblait être limité par des températures de l'eau inférieures à 20 °C. En général, cette température était atteinte au mois de mai (Figure 39). Nos travaux sur l'écophysiologie de cette microalgue ont confirmé que cette température seuil de 20 °C était la température limite basse de croissance de *V. rugosum* en culture (Abadie et al., 2015b). Par contre l'allongement du phénomène alors que les eaux sont redevenues fraîches (inférieures à 20 °C entre les mois septembre et octobre) laisse à penser que la décontamination naturelle des moules serait très lente.



**Figure 39** : Variations temporelles de la température de l'eau dans la lagune d'Ingril – donnée REPHY 2000-2013

### 3.2.2. Suivi des pinnatoxines et de *Vulcanodinium rugosum* pendant la saison estivale 2013

#### 3.2.2.1. Matériels et méthodes

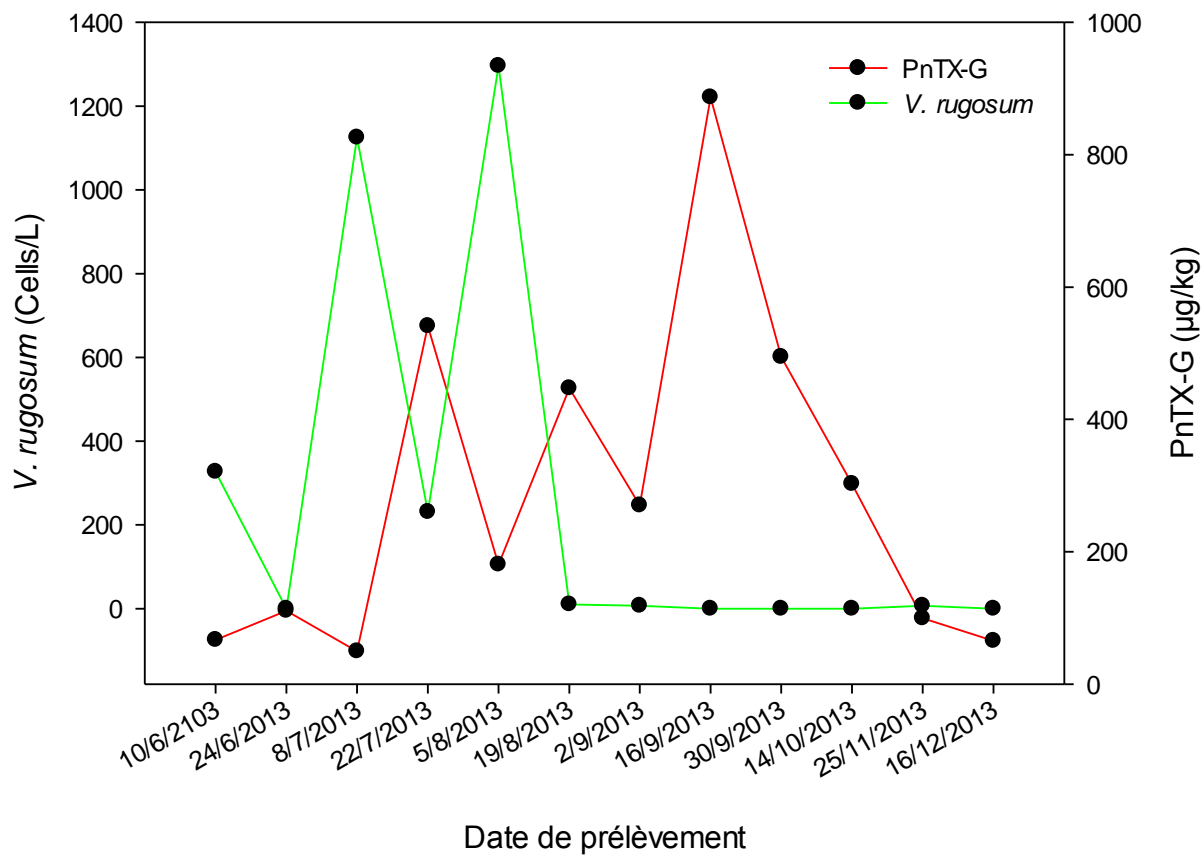
En 2013, la lagune de l'Ingril a fait l'objet d'un suivi hors protocole REPHY à la demande de la Direction Générale de l'Alimentation (DGAL-Ministère de l'Agriculture et des Pêcheries). De juin à décembre 2013, des échantillons de moules ont été collectés dans la lagune au point Port des Pauvres, tous les quinze jours de juin à septembre puis mensuellement jusqu'en décembre. Les analyses de pinnatoxines ont été effectuées conformément au protocole décrit par Hess et al. (2013). Des échantillons d'eau ont été prélevés selon le mode opératoire du REPHY (flacon plastique d'1 L) pour déterminer l'abondance cellulaire de *V. rugosum* (Utermöhl, 1931).

### 3.2.2.2. Résultats et discussion

Les résultats montrent que la pinnatoxine G (PnTX-G) a été mise en évidence dans les moules pendant toute la période de prélèvement et qu'elle a atteint ponctuellement des valeurs très importantes avec une valeur maximale de 887  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de chair en septembre 2013 (Figure 40), ainsi, ce phénomène a pu être considéré comme pérenne au niveau de cette lagune. Le réseau de veille sanitaire (Institut National de Veille Sanitaire) informé de ces résultats, n'a pas détecté d'intoxication particulière dans le périmètre habité de cette lagune. Mais, la ressource en moules étant très limitée, cette absence d'effet sur l'Homme était peut-être simplement due à l'absence de consommation des moules dans les environs.

Le suivi de la concentration en *V. rugosum* (figure 40) a montré qu'il y avait eu deux épisodes d'efflorescences de *V. rugosum* pendant l'été 2013, le 8 juillet et le 5 août avec des concentrations maximales de 1125 et 1296 cellules/L. Ces densités maximales de *V. rugosum* ont été enregistrées juste avant l'observation des concentrations maximales en pinnatoxine G dans la chair des moules échantillonnées à cette période.

Le suivi de *V. rugosum* a été réalisé dans la colonne d'eau, nous n'avons donc pas pris en compte les cellules benthiques. Cependant, nous avons pu mettre en évidence la relation entre le développement de *V. rugosum* dans la colonne d'eau et les pics de PnTX-G dans la chair des moules échantillonnées de juillet et août 2013. En revanche, la forte valeur mesurée en septembre 2013 n'a pu être reliée à une abondance élevée de ce dinoflagellé. Une floraison ponctuelle a pu se produire entre les deux dates de prélèvement (2 et le 16 septembre) ou bien il peut y avoir eu des floraisons locales (patchs locaux) au niveau de zones non échantillonnées, les cellules étant ensuite dispersées par le vent. Ces résultats ont confirmé les observations des années précédentes et ont permis de définir une période à risques située entre les mois de juin et de septembre.



**Figure 40** : Variations temporelles des concentrations en *V. rugosum* et des teneurs en PnTX-G de juin à décembre 2013 dans la lagune d'Ingril.

## Chapitre II : Effet des facteurs environnementaux sur la biologie de *Vulcanodinium rugosum*, étude écophysiological

### 1. Contexte et objectifs de l'étude

Les objectifs principaux de ces études écophysiologicals ont été de déterminer 1- quels sont les effets combinés de deux paramètres environnementaux majeurs, la température et la salinité et 2- les formes organique (urée) et inorganiques de l'azote (nitrates et ammonium) sur le développement et la production de pinnatoxine G chez le dinoflagellé *V. rugosum* isolé dans la lagune d'Ingril. Les résultats issus de ces expérimentations peuvent nous aider à mieux comprendre l'influence de ces facteurs de forçage clés dans le déterminisme de son développement en milieu naturel.

1- La température et la salinité sont des facteurs environnementaux connus pour être de forts déterminants de la distribution des microorganismes. En effet, la température agit sur le métabolisme, la structure des molécules ainsi que sur la stabilité des membranes, essentielle à l'intégrité cellulaire. La salinité agit sur l'osmolarité des cellules et nécessite une osmorégulation permanente donc consommatrice d'énergie. Ainsi, la distribution spatio-temporelle des microorganismes marins dépend entre-autres, de leur capacité d'acclimatation aux variations de ces deux paramètres. Cette capacité à supporter une certaine fenêtre de variations d'un facteur est appelée fenêtre de tolérance, au sein de laquelle on peut définir une fenêtre optimale qui correspond à la gamme de valeurs pour laquelle la croissance du microorganisme est peu impactée par les variations.

Pour cette étude, les gammes de températures et salinités ont été choisies en fonction des conditions environnementales enregistrées dans la lagune d'Ingril pendant la période 2000-2013 par le réseau REPHY.

2- La disponibilité en nutriments et leur nature sont considérées comme des éléments clés pouvant expliquer le développement et la prolifération des HABs dans un écosystème marin donné. Cependant, le nombre d'études montrant une relation directe entre la concentration de ces nutriments et la prolifération des HABs sont peu nombreuses (Anderson et al., 2002; Glibert et al., 2014; Maso & Garces, 2006). Cette relation est complexe car de nombreux

paramètres biotiques et abiotiques interviennent en même temps. Il est cependant admis que les dinoflagellés ont développé des adaptations physiologiques à la vie dans des milieux pauvres en nutriments azotés et/ou en phosphore telle que leur propension à être mixotrophes (Burkholder et al., 2008). L'impact des éléments nutritifs sur la prolifération de dinoflagellés benthiques est certainement spécifique car proche du sédiment et donc des processus biogéochimiques qui s'y déroulent. Très peu d'études ont abordé l'écophysiologie des dinoflagellés benthiques (Cohu et al., 2013) . Concernant *Vulcanodinium rugosum*, à notre connaissance aucune étude écophysiologique n'a été conduite à ce jour.

## 2. Résumé des articles.....

### 2.1. Croissance et production de toxines chez *Vulcanodinium rugosum* (Dinoflagellé se développant dans la lagune méditerranéenne d'Ingril) en fonction de la température et de salinité variables.

**Résumé.** Le dinoflagellé *Vulcanodinium rugosum* responsable de la production de la pinnatoxine G (responsable des toxicités atypiques) a été cultivé dans de l'eau de mer naturelle enrichie en nutriments (milieu ENSW). Nous avons testé au laboratoire l'influence de la température et de la salinité sur la croissance, la production de toxines et la concentration en chlorophylle *a* chez une souche de *V. rugosum* (IFR-VRU-01) isolée dans la lagune de l'Ingril en 2010. Ces facteurs environnementaux abiotiques ont été testés en combinaison associant 5 températures (15, 20, 25, 30 et 35°C) et 5 salinités (20, 25, 30, 35 et 40) et une irradiance de 100  $\mu\text{moles/m}^2 \text{ s}$ . Nos résultats ont montré que *V. rugosum* peut se développer avec une température comprise entre 20 et 30°C et une salinité entre 20 et 40. La combinaison optimale pour la croissance ( $0.39 \pm 0.11 \text{ d}^{-1}$ ) consiste en une température de 25 °C et une salinité de 40. Les résultats montrent que la température est le facteur le plus important influençant la croissance de *V. rugosum*. Le contenu cellulaire en pinnatoxine G (PnTX-G) mesuré par chromatographie liquide et spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) est plus élevé en phase stationnaire de croissance pour une température située entre 25 et 30°C ( $0.36 \pm 0.19 \text{ pg PnTX-G cellule}^{-1}$  à 30°C). Le contenu en chlorophylle *a* est plus élevé pendant la phase stationnaire à une température de 30°C ( $64.4 \pm 23.4 \text{ pg cellule}^{-1}$ ). Nos résultats suggèrent que *V. rugosum* est une espèce thermophile ce qui expliquerait son développement *in situ* dans la lagune d'Ingril, qui est peu profonde) de juin à septembre et les

concentrations les plus élevées en PnTX-G trouvées dans les moules pendant cette période. Les caractéristiques de plasticité écophysiological de *V. rugosum* mises en évidence grâce à cette étude, suggèrent que cette espèce est capable de se répandre dans les lagunes méditerranéennes. Les taux de croissance relativement élevés ainsi que les concentrations en PnTX-G observés à une température importante 30°C suggèrent que ce dinoflagellé peut être responsable de blooms sur les côtes Méditerranéennes au cours des prochaines décennies à la faveur de l'augmentation de température liée au changement climatique.

Mot clés : *Vulcanodinium rugosum*; Lagune de l'Ingril, conditions de croissance, température, salinité, toxines.

## 2.2. Effet des nitrates, ammonium et urée sur la croissance et la production de pinnatoxine G chez *Vulcanodinium rugosum*.

**Résumé.** A ce jour, peu d'informations concernant la biologie et la physiologie de *Vulcanodinium rugosum* ont été publiées. Nous avons étudié les caractéristiques de croissance et de toxicité de *V. rugosum* (souche IFR-VRU-01) isolée en juin 2010 dans la lagune d'Ingril. Cette souche est cultivée dans l'eau de mer naturelle enrichie en nutriments, en présence différentes formes d'azote organique (l'urée) et deux formes d'azote inorganique (les nitrates et l'ammonium) à une température de 25°C et une lumière de 100  $\mu\text{moles}/\text{m}^2 \text{ s}$ . Nos résultats montrent que *V. rugosum* utilise indifféremment les trois formes d'azote indiquant que cette espèce est osmotrophe ce qui peut donc contribuer à sa croissance dans un milieu pauvre en éléments nutritifs inorganiques. Il n'y a pas de différence significative (Anova,  $P=0.856$ ) entre le taux de croissance de *V. rugosum* cultivé avec l'ammonium ( $0.28 \pm 0.11 \text{ d}^{-1}$ ), l'urée ( $0.26 \pm 0.08 \text{ d}^{-1}$ ) et nitrate ( $0.24 \pm 0.01 \text{ d}^{-1}$ ). Les concentrations en chlorophylle *a* et en pinnatoxine G sont cependant significativement moins élevées pour les cultures maintenues avec de l'urée comme source d'azote ( $P < 0.027$ ) ce qui suggère que les formes azotées présentes dans le milieu naturel au moment des blooms, influent sur le contenu cellulaire en toxines et donc sur la toxicité mesurée dans les mollusques qui auront ingéré ces microalgues. Le taux de croissance relativement faible de *V. rugosum* ( $\leq 0.28 \text{ d}^{-1}$ ) et sa capacité à produire continuellement des kystes temporaires pourraient expliquer pourquoi cette espèce est observée à de faibles densités ( $\leq 20\,000 \text{ cells L}^{-1}$ ) en milieu naturel.



Mot clés : *Vulcanodinium rugosum*; Lagune de l'Ingril, conditions de croissance, toxicité, ammonium, nitrate, urée

3. Article : Toxin and growth responses of *Vulcanodinium rugosum* to varying temperature and salinity conditions

## **Toxin and growth responses of *Vulcanodinium rugosum* to varying temperature and salinity conditions**

Eric Abadie<sup>1\*</sup>, Alexia Muguet<sup>1</sup>, Tom Berteaux<sup>1</sup>, Nicolas Chomérat<sup>2</sup>, Philipp Hess<sup>3</sup>,  
Emmanuelle Roque D'OrbCastel<sup>1</sup>, Estelle Masseret<sup>4</sup>, Mohamed Laabir<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>IFREMER, Laboratoire Environnement Ressources du Languedoc-Roussillon, Centre for Marine Biodiversity, Exploitation and Conservation (MARBEC), CS30171 Sète CEDEX 03, France.

<sup>2</sup>IFREMER, Laboratoire Environnement Ressources de Bretagne Occidentale, Place de la Croix, 29900 Concarneau, France

<sup>3</sup>IFREMER, Unité Littorale, Laboratoire Phycotoxines (UL/PHYC), Rue de l'Ile d'Yeu BP 21105 44311 Nantes CEDEX 3, France.

<sup>4</sup>Université de Montpellier, Center for Marine Biodiversity, Exploitation and Conservation (MARBEC), IRD, Ifremer, CNRS, Université de Montpellier, Place E. Bataillon, CC93, 34095 Montpellier cedex 5, France.

\*Corresponding author : [Eric.abadie@ifremer.fr](mailto:Eric.abadie@ifremer.fr)

Article soumis : Journal of Plankton research le 23 novembre 2015

## ABSTRACT

*Vulcanodinium rugosum*, a widely distributed new described species produces pinnatoxins, potent neurotoxins. IFR-VRU-01, a *V. rugosum* strain isolated from a French Mediterranean lagoon (Ingril) in 2010 and identified as the causative dinoflagellate contaminating mussels in Ingril with Pinnatoxin-G (PnTX-G) was grown on an enriched natural seawater medium. We tested the influence of the temperature and the salinity on the growth, PnTX-G production and chlorophyll *a* of this harmful dinoflagellate. These environmental factors were tested in combination associating five temperatures (15, 20, 25, 30 and 35 °C) and five salinities (20, 25, 30, 35 and 40) under an irradiance of 100  $\mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Results showed that *V. rugosum* can grow at a temperature and a salinity ranging from 20 to 30 °C and 20 to 40, respectively. The optimal combination for growth ( $0.39 \pm 0.11 \text{ d}^{-1}$ ) was a temperature of 25 °C and salinity of 40. Altogether, the temperature was the most important factor modulating *V. rugosum* growth. PnTX-G cell content measured by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) showed high amounts at the stationary phase of growth and for temperatures of 25 °C and 30 °C ( $0.36 \pm 0.19 \text{ pg PnTX-G cell}^{-1}$  in stationary phase at 30 °C). Chlorophyll *a* content was high ( $64.4 \pm 23.4 \text{ pg cell}^{-1}$ ) at stationary phase of growth and at a temperature of 30 °C. Results from our laboratory experiments suggest that *V. rugosum* is a thermophile and an euryhaline species which could explain why this dinoflagellate developed in situ only from June to September with the highest concentrations of PnTX-G found in mussels in summer season. The highlighted eco-physiological characteristics of *V. rugosum* could promote the expansion of this species in other lagoons and confined areas showing fluctuating environmental conditions. The registered high growth rate and high PnTX-G amount at temperatures up to 30 °C suggested that this dinoflagellate may be responsible of blooms in the coming decades in favor to the expected increase of the temperature in Mediterranean related to climate change.

**Keywords:** *Vulcanodinium rugosum*; Ingril lagoon; growth conditions, temperature, salinity, toxin production

## 1. Introduction

Many dinoflagellate species are responsible of Harmful Algal Blooms (HABs) events with negative impact on economic activity and human health (Smayda, 1997a). The monitoring network “REPHY” (French monitoring network on phytoplankton and phycotoxins) implemented in 1984 highlighted the increase in frequency of HAB species blooming and their spread along French coastal areas. In French Mediterranean lagoons, *Alexandrium catenella*, producing paralytic shellfish toxins, have been often associated to shellfish intoxications and farms closure in Thau lagoon (Abadie, 1999a; Genovesi et al., 2007; Laabir et al., 2011; Lilly et al., 2007) with high cell concentrations *in situ* reaching  $14 \times 10^6 \text{ cell L}^{-1}$  in 2004. In 2007 in Ingril lagoon (Mediterranean, France), mussels showed an atypical toxicity. Mice death symptoms could not be due to lipophilic toxins (okadaic acid, dinophysistoxins, yessotoxins, azaspiracides...) but were related to neurotoxins (Hess et al., 2013). This atypical toxicity has been observed in this lagoon during several years. In 2010 the mouse bioassay has been replaced by a liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analytical method allowing the detailed measurement of lipophilic toxins in shellfish which attested definitively that the above mentioned lipophilic toxins could not be incriminated. The fast acting atypical toxicity corresponded to a toxic imine group, Pinnatoxins causing the observed mice death of mussels in Ingril. These neurotoxins first isolated from *Pinna muricata* (Chou et al., 1996; Uemura et al., 1995) were described as potent shellfish poisons. A new dinoflagellate was found in Japanese waters and described as pinnatoxins producer (Smith et al., 2011). In 2010, a dinoflagellate species was isolated in Ingril lagoon and identified as a new species named *Vulcanodinium rugosum* (Nézan & Chomérat, 2011). This species was suspected to be the producer of Pinnatoxins and thus responsible of the observed atypical toxicity of mice. Recent studies showed clearly that Pinnatoxin accumulation in shellfish is related to the presence of *V. rugosum in situ* (Rhodes et al., 2011b; Zeng et al., 2012). In Ingril lagoon, pinnatoxin G (PnTX-G) was found in mussels and clams at high level ranging from 37 to  $459 \mu\text{g PnTX-G kg}^{-1}$  in mussels and from 17 to  $95 \mu\text{g PnTX-G kg}^{-1}$  in clams (Hess et al., 2013). These authors showed that *V. rugosum* (an isolated strain from Ingril named IFR-VRU-01) grown in culture produced PnTX-G ( $4.7 \text{ pg cell}^{-1}$ ).

The development of HAB species and resulting blooms are controlled by complex biotic and abiotic factors. Among them, water temperature and salinity are believed to influence greatly the biology and physiology of dinoflagellates and thus their population dynamic. Laboratory and environmental studies stressed the role of the temperature and in a less extent the salinity in modulating the growth of harmful algal species, and therefore in the formation and decline of blooms (Laabir et al., 2011; Matsubara et al., 2007; Nagasoe et al., 2006; Yamaguchi & Honjo, 1989; Yamaguchi et al., 1991; Yamaguchi et al., 1997; Yamamoto et al., 2002). Temperature and salinity fluctuations could impact many physiological processes in HABs, such photosynthesis, toxin production and growth (Anderson et al., 2012b; Fu et al., 2008; Laabir et al., 2013a; Nagasoe et al., 2006; Pan et al., 1999; Xu et al., 2010). The temperature strongly influences the dynamics of HABs by regulating the rate of dormant cells formation, their excystment and then the ability to inoculate the water column (Genovesi et al., 2009; Triki et al., 2014) and growth of resulting vegetative cells (Laabir et al., 2011; Navarro et al., 2006). Studies found that salinity was correlated to cell toxin concentration (Band-Schmidt et al., 2014; Giacobbe et al., 1996; Grzebyk et al., 2003; Hwang & Lu, 2000; Kim et al., 2004; Laabir et al., 2011; Navarro et al., 2006; Parkhill & Cembella, 1999; Wang & Hsieh, 2005). However, most of these studies were performed on planktonic dinoflagellates as *Alexandrium* species whereas few studies were done on benthic dinoflagellates (Kibler et al., 2012; Yoshimatsu et al., 2014). At our knowledge, no studies have investigated the effects of the temperature and the salinity on the growth and toxin production of *V. rugosum*. Data on environmental factors driving the toxin content in benthic or benthic/pelagic dinoflagellates from various geographic regions and particularly from the Mediterranean Sea are still scarce. In Ingril, the rain pattern is characterized by strong inter-annual variability (200–1000 mm/year), the temperature and the salinity varied widely in function of the season and water depth, for example they ranged from 0 to 29 °C and from 17 to 42, respectively during 2000–2013 time period (Rephy monitoring program). These variations are dramatically enhanced because of the low depth of the water column in this lagoon. Also, Ingril is connected to Thau (an important economically lagoon with 10 000 tons of oysters and mussels produced annually generating ca. 40 million \$) which is quite similar to Ingril in regards to the environmental characteristics including temperature and salinity.

This work aimed to determine the effects of varying salinity and temperature conditions tested in combination, on the growth and toxin production of *V. rugosum* strain (IFR-VRU-01)

isolated in a Mediterranean lagoon and grown in nutrient replete laboratory culture. This would bring the needed information on the physiology of this dinoflagellate to better understand its population dynamic in natural environment.

Table 1: Summary of *Vulcanodinium rugosum* presence in various marine ecosystems, culture conditions, detected toxins and toxicity are specified when available.

Strain and studied area	Temperature (°C)	Salinity	Irradiance ( $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	Culture medium	Detected toxins (amount in $\mu\text{g cell}^{-1}$ )	Toxicity (LD 50 mice)	Reference
<b>Mediterranean waters</b>							
IFR-VRU-01 (Ingril lagoon France)	25 - 30	30 - 35	100	ENSW	PnTX-G (0.14 - 0.36)	Portimine	This study, Abadie et al. (2015)
IFR-VRU-01 (Ingril lagoon France)	18	38	200	L1	PnTX-G (4.7)		Hess et al. (2013)
<b>Pacific waters</b>							
CAWD163 (Rangaunu harbour NZ)	25	**	70-100	K	PnTX-E (0.8) PnTX-F (5.1)		Rhodes et al. (2010)
CAWD166 (Rangaunu harbour NZ)	25	**	70-100	K	PnTX-E (3.7) PnTX-F (20.1)		Rhodes et al. (2010)
CAWD167 (Rangaunu harbour NZ)	25	**	70-100	K	PnTX-E (1.4) PnTX-F (8.4)		Rhodes et al. (2010)
CAWD168 (Rangaunu harbour NZ)	25	**	70-100	K	PnTX-E (0.8) PnTX-F (4.6)	IP 1.33 mg/kg gavage 2.33 mg/kg	Rhodes et al. (2010)
CAWD170 (Rangaunu harbour NZ)	25	**	70-100	K	PnTX-E (2.4) PnTX-F (13.6)		Rhodes et al. (2010)
CAWD171 (Rangaunu harbour NZ)	25	**	70-100	K	PnTX-E (0.5) PnTX-F (3.5)		Rhodes et al. (2010)
CAWD178 (Rangaunu harbour NZ)	25	**	70-100	K	PnTX-E (0.4) PnTX-F (2.3)		Rhodes et al. (2010)
** (Rangaunu harbour NZ)	*	**	*	K	Portimine	IP : 1570 $\mu\text{g/kg}$	Selwood et al. (2013)
CAWD188 (Ishigakijima Island Okinawa Japan)	*	**	**	K	PnTX-G (11.9)		Kirsty et al. (2011)
CAWD190 (Ishigakijima Island Okinawa Japan)	*	**	**	K	PnTX-G (15)		Kirsty et al. (2011)
G65 (South China Sea)	20	**	90	f2	new PnTX (20)		Zeng et al. (2012)
CAWD198 (South China Sea)	25	**	100	K	PnTX-H	IP 67 $\mu\text{g/kg}$ gavage 163 $\mu\text{g/kg}$	Selwood et al. (2014)
** (Lazaro Cardenas Michoacan Mexico)	18-20	**	90-167	L1SE	**		Hernandez-Becerril et al. (2013)
<b>Indian Ocean</b>							
CAWD180 (Franklin harbour Australia)	25			K	PnTX-G (87) PnTX-E (10) PnTX-F (41) PnTX-A (1.3)		Rhodes et al. (2011)
CAWD180 (Franklin harbour Australia)	25			K	PnTX-G (13)		Rhodes et al. (2011)
CAWD183 (Franklin harbour Australia)	25	**	**	K	PnTX-G	IP Fed : 48.0 $\mu\text{g/kg}$ IP Fasted : 42.7 $\mu\text{g/kg}$	Munday et al. (2012)
** Unavailable data	NZ (New Zealand)	IP (Intra-Peritoneal)					

## 2. Materials and Methods

### *a. Vulcanoidinium rugosum: origin and culture*

IFR-VRU-01 strain of *Vulcanodinium rugosum* was used. This strain was isolated from Ingril Lagoon (French Mediterranean coast) in 2010 by Nézan (Nézan & Chomérat, 2010) (Figure 1). IFR-VRU-01 was shown to produce PnTX-G (Hess et al. 2013). The non-axenic culture of *V. rugosum* was maintained at temperature of 25 °C, a salinity of 35 and an irradiance of 100  $\mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$  in an Enriched Natural Sea Water medium (ENSW) (Harrison et al., 1980) in MARBEC laboratory (Montpellier, France).

As described in Rhodes et al. (2011b), *V. rugosum* life cycle shows typical motile vegetative cells and unornamented non-motile cells (30–32  $\mu\text{m}$  diameter). For each experiment testing the effect of the temperature and the salinity, the flasks were inoculated only with healthy motile cells. Our microscopic observations showed clearly that the cultures were dominated largely by motile cells (> 90 %) until the stationary phase when non motile cells appeared and settled onto the flask wall. Growth rate was calculated for the exponential phase only based on motile cells counts. PnTX-G and Chlorophyll *a* (Chl *a*) were measured at the exponential phase and at the beginning of the stationary phase when motile cells still dominate.



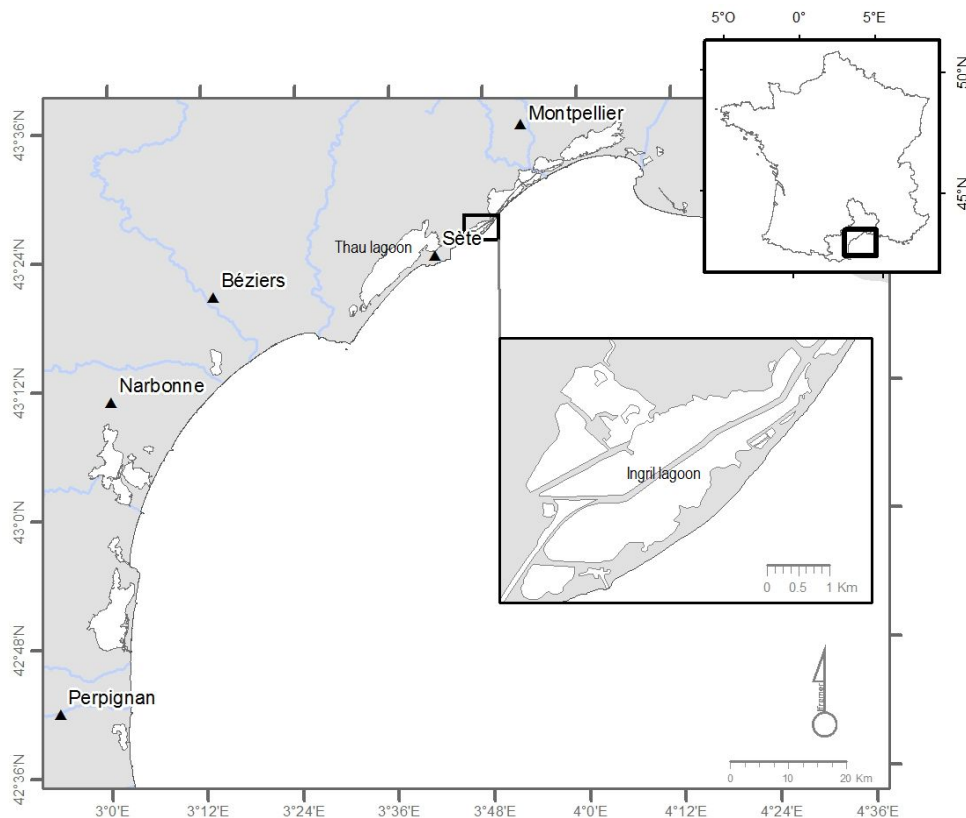


Figure 1: Ingril lagoon (French Mediterranean coast)

### ***b. Experimental conditions***

Seventy five 250 mL-flasks (Cellstar® Cell Culture Flasks, Greiner Bio-One) were inoculated to obtain a final concentration of 400 cells of *V.rugosum* mL<sup>-1</sup> into 200 ml. Flasks have been filled with ENSW medium at different salinities in triplicate. These salinities have been calculated to obtain final salinity of 20, 25, 30, 35 and 40. For each salinity triplicate flasks were placed in an incubator with varying temperatures (15, 20, 25, 30 and 35 °C). Cultures were maintained under an irradiance of 100  $\mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$  using cool white fluorescent lights under a 12:12h light:dark cycle. Culture chamber temperatures were monitored all over the experiment by a temperature probe (Proges Plus 22L). Light irradiance was controlled using a PAR sensor (PQS 1 KIPP ZONEN). Salinity of each medium was checked during the experiment.

### ***c. Cell concentration and growth rate measurements***

Cell concentration of each replicate was followed every two days during thirty days. After a gentle homogenization to avoid any stress of the studied dinoflagellate, 1350  $\mu\text{L}$  aliquot of culture were taken out sterilely with a micropipette and counted with a Nageotte device (cell counting chamber) under an inverted photonic microscope. In accordance with Guillard (Guillard, 1973), the growth rate ( $\mu$ ; expressed in  $\text{day}^{-1}$ ) was calculated from the slope of a linear regression over the entire exponential phase of growth by the least square fit of a straight line to the data after logarithmic transformation;  $\mu = (\text{Ln}(N_1) - \text{Ln}(N_0)) / (T_1 - T_0)$  in units of  $\text{day}^{-1}$  where  $N_1$  and  $N_0$  were the cell density at time  $T_1$  and  $T_0$ , respectively, during the linear portion of exponential phase growth.

#### *d. Chlorophyll a analysis*

Concentration measurements of chlorophyll *a* were realized for each flask when the cultures were in exponential and stationary phases. For Chl *a* determination, 15 mL of culture were taken out and filtered on a 25 mm-diameter GF/F Whatman filter at a low pressure (< 100 mbar) to avoid cell lysis. Filters were put into 12 mL-PolyPropylen-tubes, and stored at -20 °C. Extraction was made with 5 mL of 90% acetone, crushing filters with an ultrasonic rod (Vibra cell™ 7518, 130 Watt - 50 kHz). The mix was centrifuged at 2750 g and 4 °C during 30 minutes. Supernatant was analyzed by spectrofluoremetry (Perkin Elmer, LS50B) using the method described by Neveux (Neveux, 1993). Pigment concentration was expressed in  $\text{pg cell}^{-1}$ , using the cell concentration obtained by counting cells on the same day as sampling for chemical analyses.

#### *e. Pinnatoxin G measurement*

For toxin analyses, we took a 10 ml sample in each culture at the exponential and stationary growth phases. The samples were centrifuged (3000 g, 15 min, 4 °C) and the supernatant removed carefully. Methanol (100 %, 2 mL) was added to the remaining pellet and the sample stored at -20 °C until extraction of toxins (Rhodes et al., 2010). Extraction of Pinnatoxins (Figure 2) was carried using three consecutive sonication steps for 10 min each, followed by filtration of extracts over a 0.2  $\mu\text{m}$  membrane (Whatman Mini-UniPrep™). The filtered extracts were stored at -24 °C until quantification. Quantification of PnTX-G was carried out using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), using external calibrants over the range from 0.5 to 100  $\text{ng mL}^{-1}$ . A C8 column (Phenomenex) was

used at 25 °C for analysis (injection volume 5  $\mu$ L). The analysis was conducted at a flow rate of 0.8 mL min<sup>-1</sup> (Hess et al., 2013).

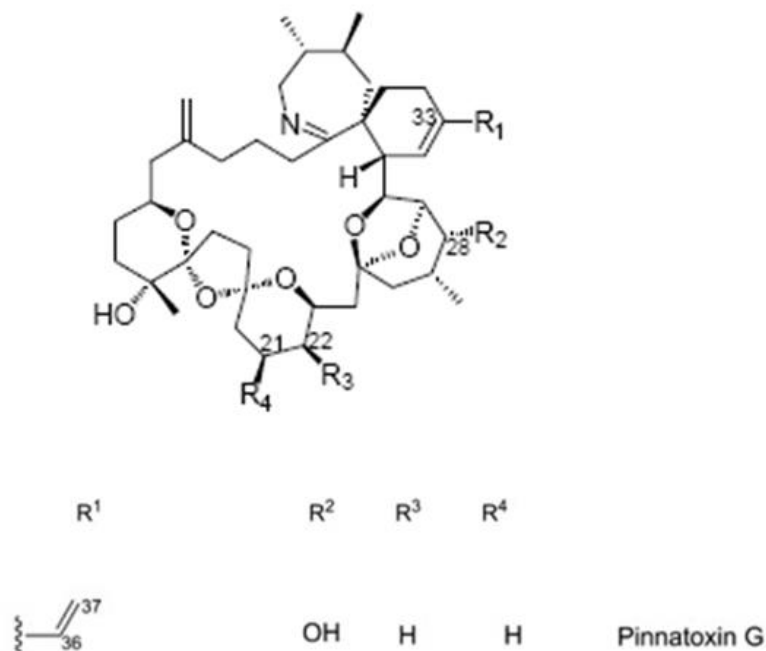


Figure 2 : Chemical structure of pinnatoxin G

### *f. Statistics*

For each set of data, differences between means were analyzed by Student test or ANOVA test (Sigmaplot 12.5). Values were expressed for each condition as the mean (m) of the triplicate and Standard

## 3. Results

### *3.1. Influence of Environmental factors on the growth*

#### *3.1.1 Temperature*

In this study we observed that the temperature was the most important factor modulating the growth of *V. rugosum* (Figures 3, 4). This dinoflagellate could grow at temperatures ranging from 20 to 30 °C. At the highest temperature tested, 35 °C, *V. rugosum* was not able to grow. *V. rugosum* did not grow at 15 °C whatever medium's salinity. *V. rugosum* growth was

clearly temperature dependent. At 20 °C this dinoflagellate showed the lowest growth rate (0.10 d<sup>-1</sup>) and maximum reached cell density (cell yield) was also the lowest one (maximum 1311 cell mL<sup>-1</sup>) in comparison to culture grown at 25 °C and 30 °C. The optimal temperatures for *V. rugosum* growth were 25 and 30 °C with the maximum cell density of 3585 cell mL<sup>-1</sup> and 4252 cell mL<sup>-1</sup> and a maximum growth rate of 0.39 d<sup>-1</sup> and 0.2 d<sup>-1</sup>, respectively. The maximum cell density was reached earlier at 30 °C at all salinities tested.

### 3.1.2 Salinity

The influence of the salinity was less important than the temperature. The most favorable salinity conditions ranged between 25 and 40 at temperatures of 25 °C and 30 °C. For these conditions growth rate ranged between 0.21 and 0.39 d<sup>-1</sup> and cell density between 1952 and 4252 cell mL<sup>-1</sup> (Figures 4, 5). At salinity 20, we only observed a cell growth at 30 °C ( $\mu = 0.19 \text{ d}^{-1}$ ) but with a low cell yield (1422 cell mL<sup>-1</sup>). We observed a linear correlation between growth rates and salinity for temperature 25 °C and salinity between 30 and 40 ( $r^2=0.627$   $p=0.011$   $\mu = -0.327 + (0.0177 \times \text{Salinity})$ ).

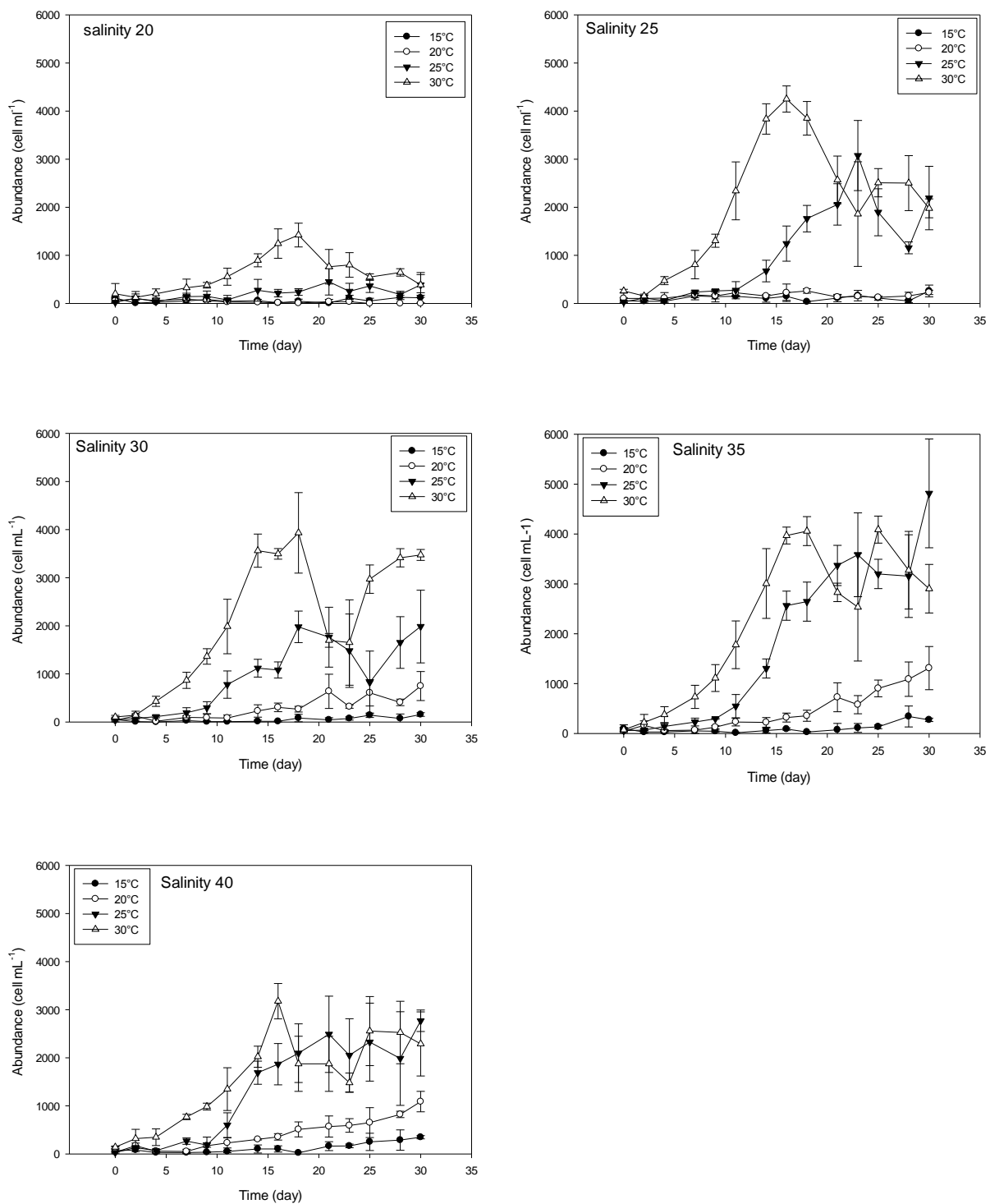


Figure 3 : *V. rugosum* growth at temperatures and salinities ranging from 15 to 30 °C and 20 to 40, respectively

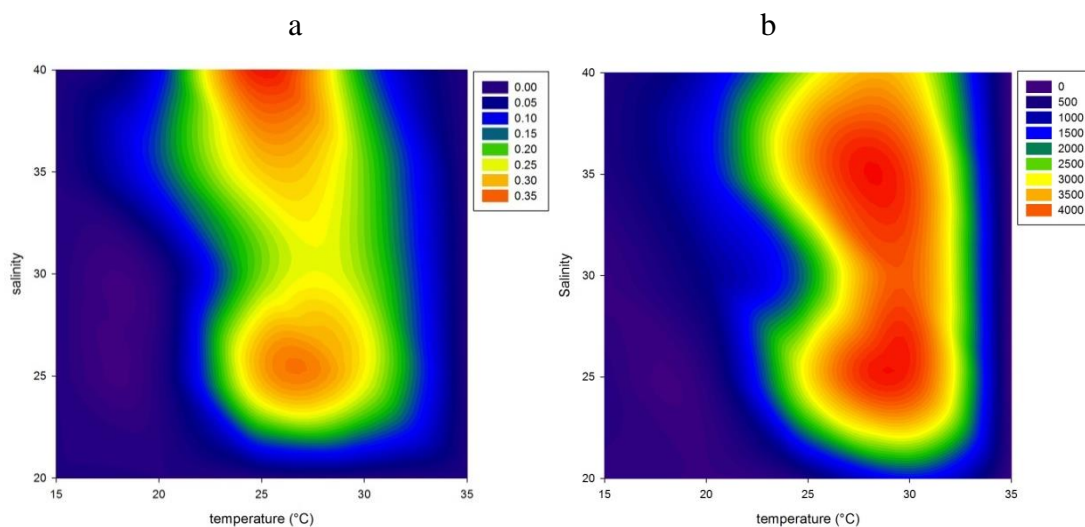


Figure 4 a,b : *Vulcanodinium rugosum* growth rate in day<sup>-1</sup> (a) and cell yield in cell/mL (b) in relation to salinity and temperature.

### 3.2 Influence of environmental factors on PnTX-G production

*V. rugosum* could not grow at 15 and 35 °C. At 20 °C the exponential and stationary phases were not distinguishable. For those reasons only toxin content of cells grown at 25 °C and 30 °C was analyzed for the all salinities tested. PnTX-G concentrations were culture conditions dependent. The lowest concentration ( $0.08 \pm 0.03$  pg cell<sup>-1</sup>) was found for a temperature of 30 °C and salinity 25 (exponential phase) and the highest ( $0.36 \pm 0.19$  pg cell<sup>-1</sup>) for a temperature of 30 °C and salinity 30 (stationary phase). PnTX-G concentrations for a temperature of 25 °C and exponential phase seemed to decrease in relation with salinity ( $0.17$  pg cell<sup>-1</sup> at salinity 25 to  $0.12$  pg cell<sup>-1</sup> at salinity 40) (Figure 5). For the stationary phase, PnTX-G concentration seems to vary in function of salinity. For a temperature of 25 °C, PnTX-G cell content increased between salinity 25 and 30 ( $0.13$  to  $0.31$  pg cell<sup>-1</sup>) and decreased for salinity 35 and 40 ( $0.12$  and  $0.16$  pg cell<sup>-1</sup>; Figure 6). For a temperature of 30 °C we observed a similar toxin content variation in function of salinity ( $0.10$  to  $0.36$  pg cell<sup>-1</sup> between salinity 20 and 30;  $0.20$  and  $0.22$  pg cell<sup>-1</sup> for salinity 35 and 40). Differences between toxin content determined at different growth phases were more visible for a temperature of 30 °C (salinity > 20) than at 25 °C (difference only for salinity 30). In general, PnTX-G cell content was lower during exponential phase than during stationary phase ( $p < 0.05$ ) particularly at 30 °C (Figure 6).

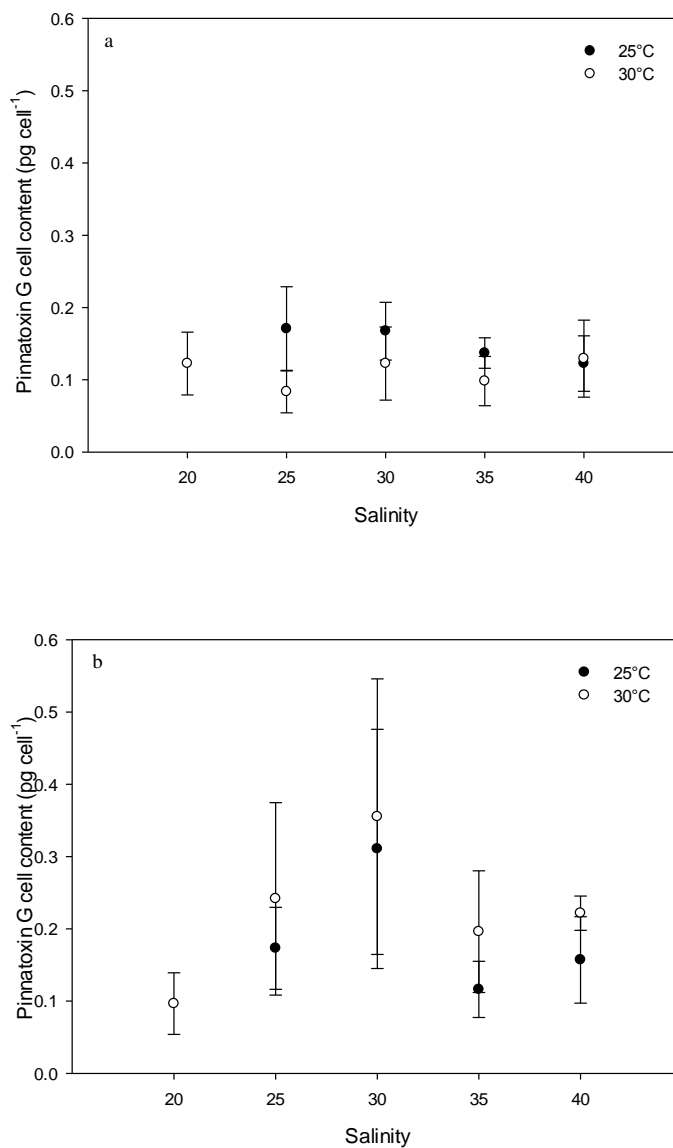


Figure 5a,b : Pinnatoxin G cell content at the exponential (a) and stationary (b) growth phases for *Vulcanodinium rugosum* cultures grown at temperatures of 25 and 30 °C.

### 3.3 Influence of environmental factors on Chlorophyll pigments production

Pigment concentrations were measured only in cultures grown at 25 °C and 30 °C and for all of the tested salinities (except salinity 20 for a temperature of 25 °C due to lack of growth).

Chlorophyll pigments production depended on the growth phase, the temperature and the salinity. For exponential phase of growth we observed higher chlorophyll *a* concentrations at 25°C compared with a temperature of 30°C (Figure 6, ANOVA  $p=0.033$  ;  $37.8 \pm 7.8$  pg cell<sup>-1</sup> for salinity 25 to  $22.4 \pm 2.3$  pg cell<sup>-1</sup> for a salinity 40 for a temperature of 25 °C and  $19.9 \pm 5.9$  pg cell<sup>-1</sup> for a salinity 25 to  $25.5 \pm 12.9$  pg cell<sup>-1</sup> for a salinity 40 for a temperature of 30 °C).

For stationary phase no significant difference was found between Chl *a* concentrations at the temperatures tested ( $29.9 \pm 5.6$  pg cell<sup>-1</sup> at a salinity 35 to  $57.3 \pm 7.64$  pg cell<sup>-1</sup> at a salinity 25 for a temperature of 25 °C and  $41.6 \pm 15.2$  pg cell<sup>-1</sup> at a salinity 35 to  $64.4 \pm 23.4$  pg cell<sup>-1</sup> at a salinity 25 for a temperature of 30 °C). Chl *a* content was higher at stationary phase ( $p < 0.002$ ). When measured at exponential phase of growth, Phaeopigment concentration was higher for cultures grown at 25 °C in comparison to those grown at 30°C ( $p < 0.001$ ) at all salinities tested. At stationary phase, these differences were only observed for salinities of 25 and 30 (Figure 7  $p < 0.016$ ).



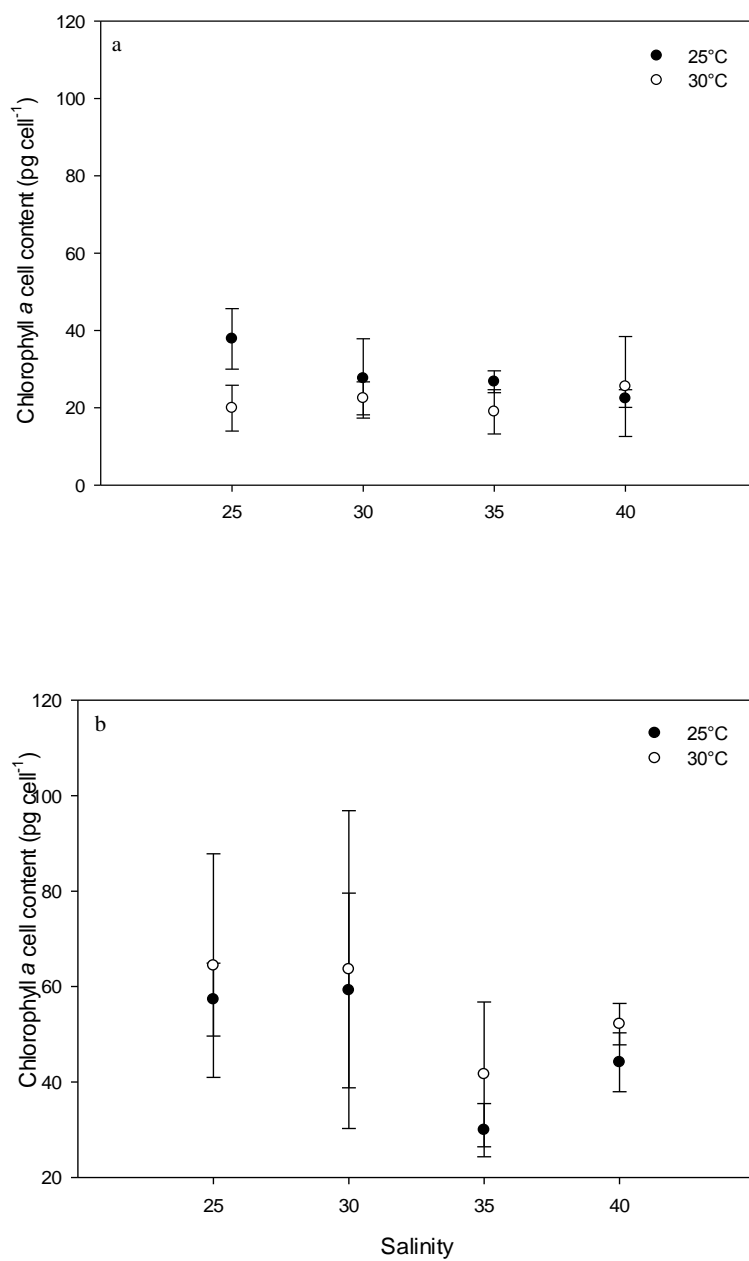


Figure 6a,b : Chlorophyll *a* content in *Vulcanodinium rugosum* cells harvested in exponential (a) and stationary (b) phases at temperatures of 25 and 30 °C

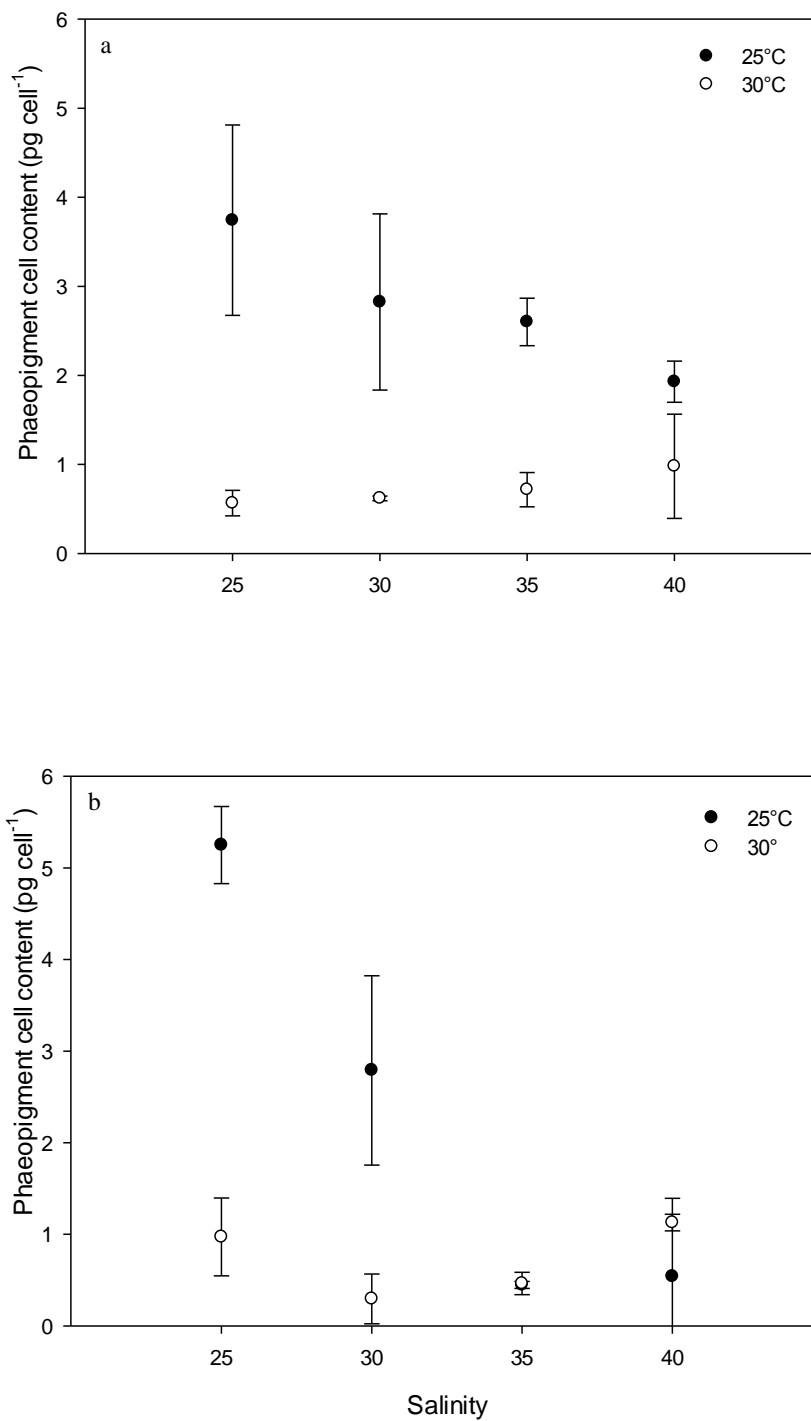


Figure 7a,b : *Vulcanodinium rugosum* phaeopigment *a* content for cultures grown at 25 and 30 °C and salinities ranging from 25 to 40 determined during exponential (a) and stationary (b) growth phases.

## 4- Discussion and conclusion

### 4.1 Temperature modulates the growth of *V. rugosum*

To our knowledge, this is the first time that growth rates for *Vulcanodinium rugosum* have been determined for an extensive range of two main environmental parameters, the temperature and the salinity tested in combination. Results showed that *V. rugosum* from the Mediterranean Ingril lagoon couldn't grow at temperatures  $\leq 15^{\circ}\text{C}$  and  $\geq 35^{\circ}\text{C}$ . At  $20^{\circ}\text{C}$ , this dinoflagellate could develop but at a relatively low rate ( $0.13\text{ d}^{-1}$ ) and with a long lag phase (18 days) when the salinity was  $\geq 30$ . This dinoflagellate registered the higher growth rates and maximum cell densities when it was grown at  $25^{\circ}\text{C}$  ( $0.21$  to  $0.39\text{ d}^{-1}$ ) and  $30^{\circ}\text{C}$  ( $0.16$  to  $0.26\text{ d}^{-1}$ ) and when salinities ranged from 25 to 40 which suggest that this species is rather thermophile. For comparison, *Alexandrium catenella* from Thau lagoon could grow at a temperature and a salinity ranging between 15 to  $27^{\circ}\text{C}$  and 31 to 40, respectively (Aguilera-Belmonte et al., 2013; Etheridge & Roesler, 2005; Grzebyk et al., 2003; Laabir et al., 2013a). The optimal temperature and salinity for *V. rugosum* growth were close to the values reported for some benthic or benthic-pelagic dinoflagellates as *Gambierdiscus sp.* (Kibler et al., 2012; Yoshimatsu et al., 2014) and *Ostreopsis* from Thailand which showed high growth rates ( $0.47$  to  $0.56\text{ d}^{-1}$ ) at a temperature and a salinity ranging between  $25^{\circ}\text{C}$  to  $30^{\circ}\text{C}$  and 25 to 35, respectively (Tawong et al., 2015). *V. rugosum* from Ingril showed growth values lower than those of *A. catenella* isolated from Thau lagoon which reached up to  $1.0\text{ d}^{-1}$ . *V. rugosum* growth rate was more close to those of *Ostreopsis spp.* ( $0.17\text{ d}^{-1}$  (Pistocchi et al., 2011)  $0.34\text{ d}^{-1}$  (Guerrini et al., 2010) and  $0.49\text{ d}^{-1}$  (Morton et al., 1992) and *Prorocentrum lima* ( $0.34\text{ d}^{-1}$  (Vale et al., 2009)). The linear regression between growth rate and salinity found for *V. rugosum* was not usually described for other dinoflagellates. This relationship have been shown either for *Gambierdiscus* (Kibler et al., 2012) and *Prorocentrum donghaiense* ((Xu et al., 2010).

### 4.2 Worldwide distribution of *V. rugosum* and related toxins

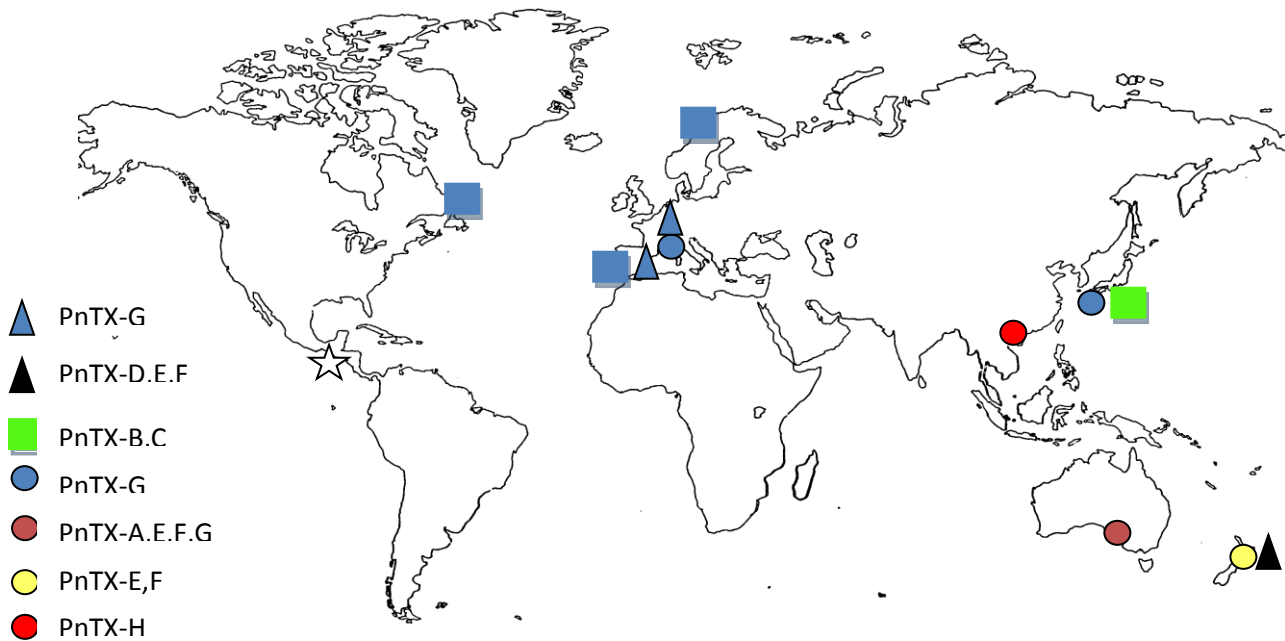


Figure 8. Detected pinnatoxins and/or *Vulcanodinium rugosum* over the world. Symbols presented below are plotted in different colors to indicate which pinnatoxin (PnTX A-H) was found. Pinnatoxins were detected in *V. rugosum* cells isolated in the studied area (circle), only in shellfish (square), only in spatt (triangle). *V. rugosum* cells were identified in the studied area but no toxin analysis was performed (star)

Recent works showed that *V. rugosum* is widely distributed around the world suggesting that it could be considered as a cosmopolitan species (Hernandez-Becerril et al., 2013; Hess et al., 2013; Munday et al., 2012; Rhodes et al., 2010; Smith et al., 2011; Zeng et al., 2012) (Figure 8, Table 1). Natural or human assisted dispersion (water ballast, shellfish translocation...) or development of endemic populations could explain this geographic distribution (Hallegraeff, 1993). Further studies have to focus on the phylogeny of *V. rugosum* isolated strains to better understand the geographic distribution of this probably expanding harmful dinoflagellate. Concerning the toxins produced by this dinoflagellate, the recorded data showed an important toxin diversity varying in function of the strains colonizing each marine system. In Pacific, PnTX-E and F dominated in the strains originating from New Zealand (CAWD163-178), whereas PnTX-G was the only toxin detected in Japanese strains (CAWD188, 190), the Chinese strain CAWD198 contains only PnTX-H. The Australian strains contain PnTX-G and

H (CAWD180, 183) (Table 1 and references therein). (Selwood et al., 2013) highlighted the presence of Portimine, a new cyclic imine in a *V. rugosum* strain isolated from Northland New Zealand. For Indian Ocean, pinnatoxins A, E, F and G were found in two strains (CAWD180 and CAWD183) isolated from Franklin harbour, Australia. In contrast, the strain IFR-VRU-01 from Mediterranean waters have been shown to produce only PnTX-G (Hess et al., 2013). As it was suggested for *Alexandrium* (Anderson et al., 1990; Pan et al., 1999), the production of toxins in *V. rugosum* could be fixed genetically for each clonal strain. In addition, pinnatoxins were found in passive sampling device (SPATT) and shellfish in various marine ecosystems but *V. rugosum* cells were not reported in the related studies. In the Mediterranean waters (Catalonia, Spain) PnTX-G was detected in SPATT (Garcia-Altres et al., 2014). This passive sampling method revealed the presence of PnTX-E and F and traces of PnTX-A, D and G in New Zealand waters (MacKenzie et al., 2011). PnTX-B and C were detected in the Okinawan bivalve *Pinna muricata* (Takada et al., 2001). PnTX-G was detected in different shellfish species from Eastern Canadian coast and Norway (McCarron et al., 2012; Rundberget et al., 2011). *V. rugosum* was identified in Mexican waters but no toxin analyses were performed (Hernandez-Becerril et al., 2013). Interestingly, summarized data related to toxin analyses of *V. rugosum* cultures maintained in different laboratories (Table 1, Figure 8) showed that PnTX-G was the main pinnatoxin form in Mediterranean and Atlantic waters. The Asian and Pacific waters are characterized by higher pinnatoxin diversity as all the PnTX analogues were detected in related ecosystems (PnTX-A, E, F, G and H). PnTX B and C were found only in the Okinawan (Japan) bivalve *Pinna muricata*. Surprisingly, these PnTXs (B and C) were not found in mussels and clams from Ingril lagoon (unpublished data) whereas PnTX-A was present in these mollusks at non-quantifiable traces (Hess et al., 2013). Altogether these data matched (Selwood et al., 2010) suggestion about the biotransformation of the algal metabolites PnTXs-E, -F and -G into shellfish metabolites PnTXs A, B, C and D. LC-MS/MS quantification of PnTXs revealed an important variability in *V. rugosum* cell content (PnTX-E : 0.4-10 pg cell<sup>-1</sup>, PnTX-F : 2.3-41 pg cell<sup>-1</sup>, PnTX-G : 0.14-87 pg cell<sup>-1</sup>) directly related to the analyzed strain. Pinnatoxins exhibit fast acting toxicity when injected intraperitoneally (i.p.) into mice (Munday et al., 2012). The intrinsic toxicity of PnTXs is indicated by low LD<sub>50s</sub> i.p. in mice. LD<sub>50s</sub> values varied substantially in function of *V. rugosum* strain and the intracellular toxin injected (CAWD167 – PnTX-E and F : 1.33 mg kg<sup>-1</sup>, CAW183 – PnTX-G : 42.7-48 µg kg<sup>-1</sup>, CAWD198 – PnTX-H : 67 µg kg<sup>-1</sup>) (Table 1).

#### 4.3 Does culture conditions influence *V. rugosum* toxin cell content?

Nutrient concentrations and ratios, temperature, salinity may influence cell toxin content on some dinoflagellate species (Etheridge & Roesler, 2005; Hamasaki et al., 2001; Laabir et al., 2013a; Lee et al., 2012; Leong et al., 2004; Lim et al., 2010; Xu et al., 2012). The only work dealing with *V. rugosum* ecophysiology was that of Abadie et al. (2015a) which showed that PnTX-G cell content was significantly lower with urea as a nitrogen source in comparison to nitrate and ammonium based cultures. IFR-VRU-01 strain which was isolated in Ingril and used for our laboratory experiments produces only PnTX-G with a minimum amount of 0.08 pg cell<sup>-1</sup> and a maximum of 0.36 pg cell<sup>-1</sup>. These values are particularly low in comparison to those previously founded for PnTX-G cell concentration in *V. rugosum* strains developing in Pacific and Indian oceans, 11.9 pg cell<sup>-1</sup> for CAWD188 (Smith et al., 2011) and 87 pg cell<sup>-1</sup> for CAWD180 (Rhodes et al., 2011a). These differences seem to be not related to culture conditions (temperatures and salinities varied from 25 to 30 °C and 30-35, respectively) but to the geographic origin of the cultivated. This clearly shown when we examined results from Table 1. In this study, our values of PnTX-G cell content (max of 0.36 pg cell<sup>-1</sup>) in IFR-VRU-01 strain from Ingril were rather low when compared to the toxin content amounts determined for the same strain by Hess (Hess et al., 2013) (4.7 pg.cell<sup>-1</sup>) in 2012. One can suppose that the PnTXs cell content could decrease with culture age as IFR-VRU-01 strain was isolated in 2010 and maintained in laboratory throughout successive culturing. Similarly, it has been shown that some dinoflagellate species as *Alexandrium minutum* became less toxic after prolonged culturing (Hansen et al., 2003). Hence, *Alexandrium lusitanicum* (taxonomic synonym of *A. minutum*) lost completely its toxicity in culture (Martins et al., 2004). Our data showed that PnTX-G production was less dependent to the temperature and the salinity than the growth phase. *V. rugosum* cell toxin content was lower during exponential phase compared to that observed during the stationary phase for the temperatures tested ( $p = 0.012$ ). This could be explained by the increase of energy allocated to toxin synthesis instead cell division together with the increase of cell size often correlated to the increase of toxin cell content. Similarly, (Guerrini et al., 2010) showed that toxin content in two strains of *Ostreopsis ovata* were higher at stationary phase. In contrast, toxin content was higher in exponential phase in *Alexandrium sp.* and *Pyrodinium bahamense* (Gedaria et al., 2007; Navarro et al., 2006). We observed a moderate decrease in toxin content in the exponential phase at 25°C when salinity increased from 25 to 40.

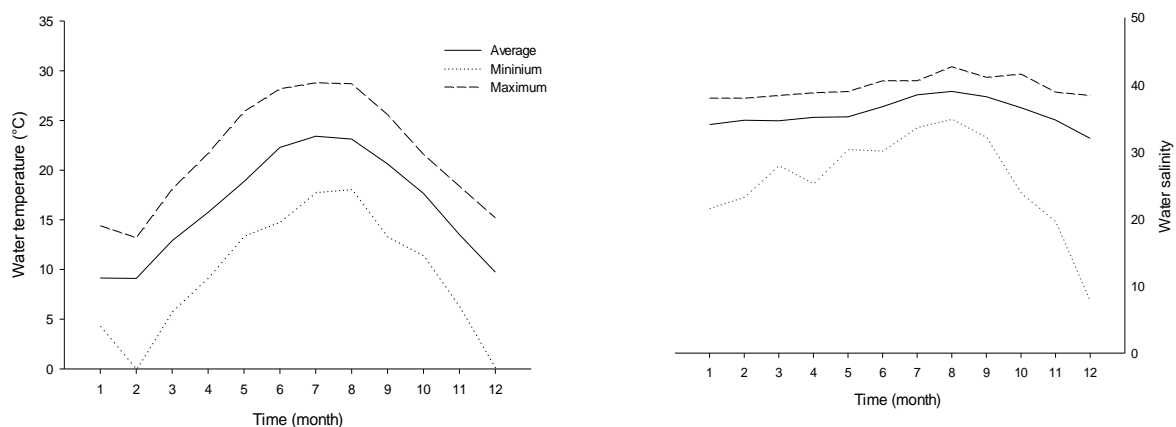


Figure 9: temperature and salinity –REPHY monitoring 2000-2013

#### 4.4 Conclusion

Laboratory data on the ecophysiology of *V. rugosum* suggest that this dinoflagellate could develop in the summer season. *In situ* monthly average temperature in Ingril (REPHY monitoring 2000-2013 ; Figure 9) was  $> 20$  °C between May and September whereas monthly average salinity ranged between 32 and 39 (with a very important monthly variation).

In 2013, maximum cell density of *V. rugosum* was observed in summer season from June to September (Abadie et al. in preparation), this confirmed growth results from our laboratory experiments. The PnTX-G concentration was high in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) between June and September 2013. *V. rugosum* has been shown in this study to be an euryhaline organism which suggest that this harmful species could expand in other Mediterranean lagoons and confined water systems.

Some studies suggest relationships between shellfish toxicity and large-scale patterns of climate variability. For example, there was an attempt to explain the increase of *Alexandrium* blooming in Puget sound basin due to the installation of El Nino which increased the water column temperature and stratification more suitable to dinoflagellates (Moore et al., 2010) . Moore (Moore et al., 2009) suggested that aspects of the local climate (daily to seasonal timescales), such as the air temperature and the stream flow could be more important in

determining oceanographic variability in Puget Sound rather than large-scale climate variations like ENSO (interannual to interdecadal timescales). However, no significant correlations were identified (Moore et al., 2009) for *Alexandrium* in Puget sound marine system. It is undeniable that marine ecosystems are facing a global temperature increase (Hiscock et al., 2004; Hoegh-Guldberg & Bruno, 2010; Philippart et al., 2011; Wernberg et al., 2012) . For example, 2014 was ranked as the warmest year since the beginning of weather records in France. South western Mediterranean Lagoons are characterized by relatively low depth of their water column (e.g. Ingril Lagoon : 0-1.7 m) which signify that the water temperature could increase more rapidly and remain a longer time in favor of any warming. Our data showed that *V. rugosum* is thermophile as other benthic dinoflagellates and its growth mainly driven by temperature which suggest that this dinoflagellate may be responsible of blooms in the coming decades in favor to the expected increase of temperature in Mediterranean related to climate change.

#### **CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare that there are no conflicts of interest.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

This work was supported by LAGUNOTOX project funded by Fondation TOTAL. We would also to thank l'Agence de l'Eau Rhone Méditerranée Corse (AERMC) for their financial help. Thanks to IRD (Institut National pour la Recherche et le Développement) funding Mr. Mohamed Laabir stay in Tunisia.



## REFERENCES

- Abadie, E., Kaci, L., Berteaux, T., Hess, P., Sechet, V., Masseret, E., Rolland, J., Laabir, M., 2015. Effect of Nitrate, Ammonium and Urea on Growth and Pinnatoxin G Production of *Vulcanodinium rugosum*. *Marine Drugs* 13(9), 5642.
- Abadie, E.A., Z; Belin, C; Comps, MA; Elziere-Papayanni, P; Lassus, P; Le Bec, C; Marcaillou-Le Baut, C; Nezan, E; Poggi, R, 1999. Contamination de l'etang de Thau par *Alexandrium tamarense*. Episode de novembre a decembre 1998.
- Aguilera-Belmonte, A., Inostroza, I., Carrillo, K.S.e., Franco, J.M., RiobÃ³, P., GÃ³mez, P.I., 2013. The combined effect of salinity and temperature on the growth and toxin content of four Chilean strains of *Alexandrium catenella* (Whedon and Kofoid) Balech 1985 (Dinophyceae) isolated from an outbreak occurring in southern Chile in 2009. *Harmful Algae* 23(0), 55-59.
- Anderson, D.M., Cembella, A.D., Hallegraeff, G.M., 2012. Progress in Understanding Harmful Algal Blooms: Paradigm Shifts and New Technologies for Research, Monitoring, and Management. *Annu. Rev. Mar. Sci.* 4, 143-176.
- Anderson, D.M., Kulis, D.M., Sullivan, J.J., Hall, S., Lee, C., 1990. Dynamics and physiology of saxitoxin production by the dinoflagellates *Alexandrium spp.* *Marine Biology* 104(3), 511-524.
- Band-Schmidt, C.J., Bustillos-Guzman, J.J., Hernandez-Sandoval, F.E., Nunez-Vasquez, E.J., Lopez-Cortés, D.J., 2014. Effect of temperature on growth and paralytic toxin profiles in isolates of *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) from the Pacific coast of Mexico. *Toxicon* 90(0), 199-212.
- Chou, T., Haino, T., Kuramoto, M., Uemura, D., 1996. Isolation and structure of pinnatoxin D, a new shellfish poison from the Okinawan bivalve *Pinna muricata*. *Tetrahedron Letters* 37(23), 4027-4030.
- Etheridge, S.M., Roesler, C.S., 2005. Effects of temperature, irradiance, and salinity on photosynthesis, growth rates, total toxicity, and toxin composition for *Alexandrium fundyense* isolates from the Gulf of Maine and Bay of Fundy. *Deep-Sea Research Part II-Topical Studies in Oceanography* 52(19-21), 2491-2500.

- Fu, F.-X., Zhang, Y., Warner, M.E., Feng, Y., Sun, J., Hutchins, D.A., 2008. A comparison of future increased CO<sub>2</sub> and temperature effects on sympatric *Heterosigma akashiwo* and *Prorocentrum minimum*. *Harmful Algae* 7(1), 76-90.
- Garcia-Altare, M., Casanova, A., Bane, V., Diogène, J., Furey, A., de la Iglesia, P., 2014. Confirmation of Pinnatoxins and Spirolides in Shellfish and Passive Samplers from Catalonia (Spain) by Liquid Chromatography Coupled with Triple Quadrupole and High-Resolution Hybrid Tandem Mass Spectrometry. *Marine Drugs* 12(6), 3706.
- Gedaria, A.I., Luckas, B., Reinhardt, K., Azanza, R.V., 2007. Growth response and toxin concentration of cultured *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* to varying salinity and temperature conditions. *Toxicon* 50(4), 518-529.
- Genovesi, B., Laabir, M., Masseret, E., Collos, Y., Vaquer, A., Grzebyk, D., 2009. Dormancy and germination features in resting cysts of *Alexandrium tamarense* species complex (*Dinophyceae*) can facilitate bloom formation in a shallow lagoon (Thau, southern France). *Journal of Plankton Research* 31(10), 1209-1224.
- Genovesi, B., Mouillot, D., Vaquer, A., Laabir, M., Pastoureaud, A., 2007. Towards an optimal sampling strategy for *Alexandrium catenella* (*Dinophyceae*) benthic resting cysts. *Harmful Algae* 6(6), 837-848.
- Giacobbe, M.G., Oliva, F.D., Maimone, G., 1996. Environmental Factors and Seasonal Occurrence of the Dinoflagellate *Alexandrium minutum*, a PSP Potential Producer, in a Mediterranean Lagoon. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 42(5), 539-549.
- Grzebyk, D., Bechemin, C., Ward, C.J., Verite, C., Codd, G.A., Maestrini, S.Y., 2003. Effects of salinity and two coastal waters on the growth and toxin content of the dinoflagellate *Alexandrium minutum*. *Journal of Plankton Research* 25(10), 1185-1199.
- Guerrini, F., Pezzolesi, L., Feller, A., Riccardi, M., Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Tartaglione, L., Iacovo, E.D., Fattorusso, E., Forino, M., Pistocchi, R., 2010. Comparative growth and toxin profile of cultured *Ostreopsis ovata* from the Tyrrhenian and Adriatic Seas. *Toxicon* 55(2-3), 211-220.
- Guillard, R.R.L., 1973. Division rates. *Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements* 1, 289-311.
- Hallegraeff, G.M., 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia* 32(2), 79-99.
- Hamasaki, K., Horie, M., Tokimitsu, S., Toda, T., Taguchi, S., 2001. Variability in Toxicity of the Dinoflagellate *Alexandrium Tamarense* Isolated from Hiroshima Bay, Western

- Japan, as a Reflection of Changing Environmental Conditions. *Journal of Plankton Research* 23(3), 271-278.
- Hansen, G., Daugbjerg, N., Franco, J.M., 2003. Morphology, toxin composition and LSU rDNA phylogeny of *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) from Denmark, with some morphological observations on other European strains. *Harmful Algae* 2(4), 317-335.
- Harrison, P.J., Waters, R.E., Taylor, F.J.R., 1980. A broad-spectrum artificial seawater medium for coastal and open ocean phytoplankton. *Journal of Phycology* 16(1), 28-35.
- Hernandez-Becerril, D.U., Rodriguez-Palacio, M.C., Lozano-Ramirez, C., 2013. Morphology and life stages of the potentially pinnatoxin-producing thecate dinoflagellate *Vulcanodinium rugosum* from the tropical Mexican Pacific. *Bot. Marina* 56(5-6), 535-540.
- Hess, P., Abadie, E., Herve, F., Berteaux, T., Sechet, V., Araoz, R., Molgo, J., Zakarian, A., Sibat, M., Rundberget, T., Miles, C.O., Amzil, Z., 2013. Pinnatoxin G is responsible for atypical toxicity in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and clams (*Venerupis decussata*) from Ingril, a French Mediterranean lagoon. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 75.
- Hiscock, K., Southward, A., Tittley, I., Hawkins, S., 2004. Effects of changing temperature on benthic marine life in Britain and Ireland. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 14(4), 333-362.
- Hoegh-Guldberg, O., Bruno, J.F., 2010. The Impact of Climate Change on the World's Marine Ecosystems. *Science* 328(5985), 1523-1528.
- Hwang, D.F., Lu, Y.H., 2000. Influence of environmental and nutritional factors on growth, toxicity, and toxin profile of dinoflagellate *Alexandrium minutum*. *Toxicon* 38(11), 1491-1503.
- Kibler, S.R., Litaker, R.W., Holland, W.C., Vandersea, M.W., Tester, P.A., 2012. Growth of eight Gambierdiscus (Dinophyceae) species: Effects of temperature, salinity and irradiance. *Harmful Algae* 19(0), 1-14.
- Kim, D.-I., Matsuyama, Y., Nagasoe, S., Yamaguchi, M., Yoon, Y.-H., Oshima, Y., Imada, N., Honjo, T., 2004. Effects of temperature, salinity and irradiance on the growth of the harmful red tide dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* Margalef (Dinophyceae). *Journal of Plankton Research* 26(1), 61-66.
- Laabir, M., Collos, Y., Masseret, E., Grzebyk, D., Abadie, E., Savar, V.r., Sibat, M., Amzil, Z., 2013. Influence of Environmental Factors on the Paralytic Shellfish Toxin Content

- and Profile of *Alexandrium catenella* (*Dinophyceae*) Isolated from the Mediterranean Sea. *Marine Drugs* 11(5), 1583-1601.
- Laabir, M., Jauzein, C., Genovesi, B., Masseret, E., Grzebyk, D., Cecchi, P., Vaquer, A., Perrin, Y., Collos, Y., 2011. Influence of temperature, salinity and irradiance on the growth and cell yield of the harmful red tide dinoflagellate *Alexandrium catenella* colonizing Mediterranean waters. *Journal of Plankton Research* 33(10), 1550-1563.
- Lee, T.C.-H., Kwok, O.-T., Ho, K.-C., Lee, F.W.-F., 2012. Effects of different nitrate and phosphate concentrations on the growth and toxin production of an *Alexandrium tamarense* strain collected from Drake Passage. *Marine Environmental Research* 81, 62-69.
- Leong, S.C.Y., Murata, A., Nagashima, Y., Taguchi, S., 2004. Variability in toxicity of the dinoflagellate *Alexandrium tamarense* in response to different nitrogen sources and concentrations. *Toxicon* 43(4), 407-415.
- Lilly, E.L., Halanych, K.M., Anderson, D.M., 2007. Species boundaries and global biogeography of the *Alexandrium tamarense* complex (*Dinophyceae*). *Journal of Phycology* 43(6), 1329-1338.
- Lim, P.-T., Leaw, C.-P., Kobiyama, A., Ogata, T., 2010. Growth and toxin production of tropical *Alexandrium minutum* Halim (*Dinophyceae*) under various nitrogen to phosphorus ratios. *Journal of Applied Phycology* 22(2), 203-210.
- MacKenzie, L.A., Selwood, A.I., McNabb, P., Rhodes, L., 2011. Benthic dinoflagellate toxins in two warm-temperate estuaries: Rangaunu and Parengarenga Harbours, Northland, New Zealand. *Harmful Algae* 10(6), 559-566.
- Martins, C.A., Kulis, D., Franca, S., Anderson, D.M., 2004. The loss of PSP toxin production in a formerly toxic *Alexandrium lusitanicum* clone. *Toxicon* 43(2), 195-205.
- Matsubara, T., Nagasoe, S., Yamasaki, Y., Shikata, T., Shimasaki, Y., Oshima, Y., Honjo, T., 2007. Effects of temperature, salinity, and irradiance on the growth of the dinoflagellate *Akashiwo sanguinea*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 342(2), 226-230.
- McCarron, P., Rourke, W.A., Hardstaff, W., Pooley, B., Quilliam, M.A., 2012. Identification of Pinnatoxins and Discovery of Their Fatty Acid Ester Metabolites in Mussels (*Mytilus edulis*) from Eastern Canada. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60(6), 1437-1446.

- Moore, S.K., Mantua, N.J., Hickey, B.M., Trainer, V.L., 2009. Recent trends in paralytic shellfish toxins in Puget Sound, relationships to climate, and capacity for prediction of toxic events. *Harmful Algae* 8(3), 463-477.
- Moore, S.K., Mantua, N.J., Hickey, B.M., Trainer, V.L., 2010. The relative influences of El Niño-Southern Oscillation and Pacific Decadal Oscillation on paralytic shellfish toxin accumulation in northwest Pacific shellfish. *Limnology and Oceanography* 55(6), 2262-2274.
- Morton, S.L., Norris, D.R., Bomber, J.W., 1992. Effect of temperature, salinity and light-intensity on the growth and seasonality of toxic dinoflagellates associated with ciguatera. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 157(1), 79-90.
- Munday, R., Selwood, A.I., Rhodes, L., 2012. Acute toxicity of pinnatoxins E, F and G to mice. *Toxicon* 60(6), 995-999.
- Nagasoe, S., Kim, D.-I., Shimasaki, Y., Oshima, Y., Yamaguchi, M., Honjo, T., 2006. Effects of temperature, salinity and irradiance on the growth of the red tide dinoflagellate *Gyrodinium instriatum* Freudenthal et Lee. *Harmful Algae* 5(1), 20-25.
- Navarro, J.M., Munoz, M.G., Contreras, A.M., 2006. Temperature as a factor regulating growth and toxin content in the dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Harmful Algae* 5(6), 762-769.
- Neuveux, J.L., F., 1993. Spectrofluorometric assay for chlorophylls phaeopigments using the least squares approximation technique. *Deep-Sea research* 40, 1747-1765.
- Nézan, E., Chomérat, N., 2011. *Vulcanodinium rugosum* gen. nov., sp. nov. (Dinophyceae): a new marine dinoflagellate from the French Mediterranean coast. *Cryptogamie Algologie* 32(1), 3-18.
- Pan, Y., Cembella, A.D., Quilliam, M.A., 1999. Cell cycle and toxin production in the benthic dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Marine Biology* 134(3), 541-549.
- Parkhill, J.P., Cembella, A.D., 1999. Effects of salinity, light and inorganic nitrogen on growth and toxigenicity of the marine dinoflagellate *Alexandrium tamarense* from northeastern Canada. *Journal of Plankton Research* 21(5), 939-955.
- Philippart, C.J.M., Anadon, R., Danovaro, R., Dippner, J.W., Drinkwater, K.F., Hawkins, S.J., Oguz, T., O'Sullivan, G., Reid, P.C., 2011. Impacts of climate change on European marine ecosystems: Observations, expectations and indicators. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 400(1-2), 52-69.

- Pistocchi, R., Pezzolesi, L., Guerrini, F., Vanucci, S., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., 2011. A review on the effects of environmental conditions on growth and toxin production of *Ostreopsis ovata*. *Toxicon Palytoxin-group toxins* 57(3), 421-428.
- Rhodes, L., Smith, K., Selwood, A., McNabb, P., Molenaar, S., Munday, R., Wilkinson, C., Hallegraeff, G., 2011a. Production of pinnatoxins E, F and G by scrippsielloid dinoflagellates isolated from Franklin Harbour, South Australia. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 45(4), 703-709.
- Rhodes, L., Smith, K., Selwood, A., McNabb, P., Munday, R., Suda, S., Molenaar, S., Hallegraeff, G., 2011b. Dinoflagellate *Vulcanodinium rugosum* identified as the causative organism of pinnatoxins in Australia, New Zealand and Japan. *Phycologia* 50(6), 624-628.
- Rhodes, L., Smith, K., Selwood, A., McNabb, P., van Ginkel, R., Holland, P., Munday, R., 2010. Production of pinnatoxins by a peridinioid dinoflagellate isolated from Northland, New Zealand. *Harmful Algae* 9(4), 384-389.
- Rundberget, T., Aasen, J.A.B.s., Selwood, A.I., Miles, C.O., 2011. Pinnatoxins and spirolides in Norwegian blue mussels and seawater. *Toxicon* 58(8), 700-711.
- Selwood, A.I., Miles, C.O., Wilkins, A.L., van Ginkel, R., Munday, R., Rise, F., McNabb, P., 2010. Isolation, Structural Determination and Acute Toxicity of Pinnatoxins E, F and G. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(10), 6532-6542.
- Selwood, A.I., Wilkins, A.L., Munday, R., Shi, F., Rhodes, L.L., Holland, P.T., 2013. Portimine: a bioactive metabolite from the benthic dinoflagellate *Vulcanodinium rugosum*. *Tetrahedron Letters* 54(35), 4705-4707.
- Smayda, T.J., 1997. Harmful Algal Blooms: Their Ecophysiology and General Relevance to Phytoplankton Blooms in the Sea. *Limnology and Oceanography* 42(5), 1137-1153.
- Smith, K.F., Rhodes, L.L., Suda, S., Selwood, A.I., 2011. A dinoflagellate producer of pinnatoxin G, isolated from sub-tropical Japanese waters. *Harmful Algae* 10(6), 702-705.
- Takada, N., Umemura, N., Suenaga, K., Chou, T., Nagatsu, A., Haino, T., Yamada, K., Uemura, D., 2001. Pinnatoxins B and C, the most toxic components in the pinnatoxin series from the Okinawan bivalve *Pinna muricata*. *Tetrahedron Letters* 42(20), 3491-3494.

- Tawong, W., Yoshimatsu, T., Yamaguchi, H., Adachi, M., 2015. Effects of temperature, salinity and their interaction on growth of benthic dinoflagellates *Ostreopsis spp.* from Thailand. *Harmful Algae* 44, 37-45.
- Triki, H.Z., Daly-Yahia, O.K., Malouche, D., Komaha, Y., Deidun, A., Brahim, M., laabir, M., 2014. Distribution of resting cysts of the potentially toxic dinoflagellate *Alexandrium pseudogonyaulax* in recently-deposited sediment within Bizerte Lagoon (Mediterranean coast, Tunisia), pp. 172-181.
- Uemura, D., Chou, T., Haino, T., Nagatsu, A., Fukuzawa, S., Zheng, S.Z., Chen, H.S., 1995. Pinnatoxin-A - A toxic amphoteric macrocycle from the Okinawan bivalve *Pinna muricata*. *Journal of the American Chemical Society* 117(3), 1155-1156.
- Vale, P., Veloso, V., Amorim, A., 2009. Toxin composition of a *Prorocentrum lima* strain isolated from the Portuguese coast. *Toxicon* 54(2), 145-152.
- Wang, D.-Z., Hsieh, D.P.H., 2005. Growth and toxin production in batch cultures of a marine dinoflagellate *Alexandrium tamarense* HK9301 isolated from the South China Sea. *Harmful Algae* 4(2), 401-410.
- Wernberg, T., Smale, D.A., Thomsen, M.S., 2012. A decade of climate change experiments on marine organisms: procedures, patterns and problems. *Global Change Biology* 18(5), 1491-1498.
- Xu, J., Ho, A.Y.T., He, L., Yin, K., Hung, C., Choi, N., Lam, P.K.S., Wu, R.S.S., Anderson, D.M., Harrison, P.J., 2012. Effects of inorganic and organic nitrogen and phosphorus on the growth and toxicity of two *Alexandrium* species from Hong Kong. *Harmful Algae* 16, 89-97.
- Xu, N., Duan, S., Li, A., Zhang, C., Cai, Z., Hu, Z., 2010. Effects of temperature, salinity and irradiance on the growth of the harmful dinoflagellate *Prorocentrum donghaiense* Lu. *Harmful Algae* 9(1), 13-17.
- Yamaguchi, M., Honjo, T., 1989. Effects of temperature, salinity and irradiance on the growth of the noxious red tide flagellate *Gymnodinium nagasakiense* (Dinophyceae). *Nippon Suisan Gakkaishi* 55(11), 2029-2036.
- Yamaguchi, M., Imai, I., Honjo, T., 1991. Effects of temperature, salinity and irradiance on the growth-rates of the noxious red tide flagellates *Chattonella antiqua* and *C.marina* (Raphidophyceae). *Nippon Suisan Gakkaishi* 57(7), 1277-1284.
- Yamaguchi, M., Shigeru, I., Nagasaki, K., Matsuyama, Y., Uchida, T., Imai, I., 1997. Effects of temperature and salinity on the growth of the red tide flagellates *Heterocapsa*

- circularisquama* (Dinophyceae) and *Chattonella verruculosa* (Raphidophyceae). Journal of Plankton Research 19(8), 1167-1174.
- Yamamoto, T., Oh, S.J., Kataoka, Y., 2002. Effects of temperature, salinity and irradiance on the growth of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) isolated from Hiroshima Bay, Japan. Fish. Sci. 68(2), 356-363.
- Yoshimatsu, T., Yamaguchi, H., Iwamoto, H., Nishimura, T., Adachi, M., 2014. Effects of temperature, salinity and their interaction on growth of Japanese Gambierdiscus spp. (Dinophyceae). Harmful Algae 35(0), 29-37.
- Zeng, N., Gu, H., Smith, K.F., Rhodes, L.L., Selwood, A.I., Yang, W., 2012. The first report of *Vulcanodinium rugosum* (Dinophyceae) from the South China Sea with a focus on the life cycle. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research 46(4), 511-521.



4. Article : Effect of nitrate, ammonium and urea on growth and Pinnatoxin G production of *Vulcanodinium rugosum*.

## **Effect of nitrate, ammonium and urea on growth and Pinnatoxin G production of *Vulcanodinium rugosum*.**

Eric Abadie<sup>1</sup>, Lamia Kaci<sup>1</sup>, Tom Berteaux<sup>1</sup>, Philipp Hess<sup>2</sup>, Véronique Sechet<sup>2</sup>,  
Estelle Masseret<sup>3</sup>, Jean Luc Rolland<sup>4</sup>, Mohamed Laabir<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Ifremer, Laboratoire Environnement Ressources du Languedoc Roussillon, Center for Marine Biodiversity, Exploitation and Conservation (MARBEC), CS30171 Sète cedex 3, France;

E-Mails: kaci\_lamia@hotmail.fr (L.K.); tom.bertheaux@ifremer.fr (T.B.)

<sup>2</sup> IFREMER, Département ODE/UL/PHYC), Rue de l'Île d'Yeu BP 21105 44311 Nantes CEDEX 3, France; E-Mails: philipp.hess@ifremer.fr (P.H.);  
veronique.sechet@ifremer.fr (V.S.)

<sup>3</sup> Center for Marine Biodiversity, Exploitation and Conservation (MARBEC), Université de Montpellier, CNRS, IRD, Ifremer, Place E. Bataillon, CC93, 34095 Montpellier cedex 5, France; E-Mails: estelle.masseret@univ-montp2.fr (E.M.); mohamed.laabir@univ-montp2.fr (M.L.)

<sup>4</sup> Ifremer, UMR 5244, IHPE, Université de Perpignan, Université de Montpellier, Place Eugène Bataillon CC 80, F-34095 Montpellier Cedex; E-Mail:  
jean.luc.rolland@ifremer.fr (J.L.R.)

\* Author to whom correspondence should be addressed. (eric.abadie@ifremer.fr)

Tel.: +33(0)499573286

External Editor : Dr. Andrea Bourdelais

*Received: 9 May 2015 / Revised: 24 July 2015 / Accepted: 17 August 2015 / Published: 2 September 2015*

---

---

**Abstract:** *Vulcanodinium rugosum*, a recently described dinoflagellate species producing a potent neurotoxin (pinnatoxin G), has been identified in French Mediterranean lagoons and was responsible for recurrent episodes of shellfish toxicity detected by mouse bioassay. Until now, the biology and physiology of *V. rugosum* have not been fully investigated. We studied the growth characteristics and toxicity of a *V. rugosum* strain (IFR10-017), isolated in the Ingril lagoon in June 2009 (North-Western French Mediterranean Sea). It was cultivated in Enriched Natural Sea Water (ENSW) with organic (urea) and inorganic (ammonium and nitrate) nitrogen, at a temperature of 25°C and irradiance of 100  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ . Results showed that ammonium was assimilated by cells more rapidly than nitrate and urea. *V. rugosum* is thus an osmotrophic species using urea. Consequently, this nitrogen form could contribute to the growth of this dinoflagellate species in the natural environment. There was no significant difference (Anova,  $P=0.856$ ) between the growth rate of *V. rugosum* cultivated with ammonium ( $0.28 \pm 0.11 \text{ d}^{-1}$ ), urea ( $0.26 \pm 0.08 \text{ d}^{-1}$ ) and nitrate ( $0.24 \pm 0.01 \text{ d}^{-1}$ ). However, the production of chlorophyll *a* and pinnatoxin G was significantly lower with urea as a nitrogen source (Anova,  $P<0.027$ ), suggesting that nutritional conditions prevailing at the moment of the bloom could determine the cellular toxicity of *V. rugosum* and therefore the toxicity measured in contaminated mollusks. The relatively low growth rate ( $\leq 0.28 \text{ d}^{-1}$ ) and the capacity of this species to continuously produce temporary cysts could explain why cell densities of this species in the water column are typically low ( $\leq 20\,000 \text{ cells/L}$ ).

**Keywords:** *Vulcanodinium rugosum*, Pinnatoxin G, Ingril lagoon, growth, nitrogen source

---

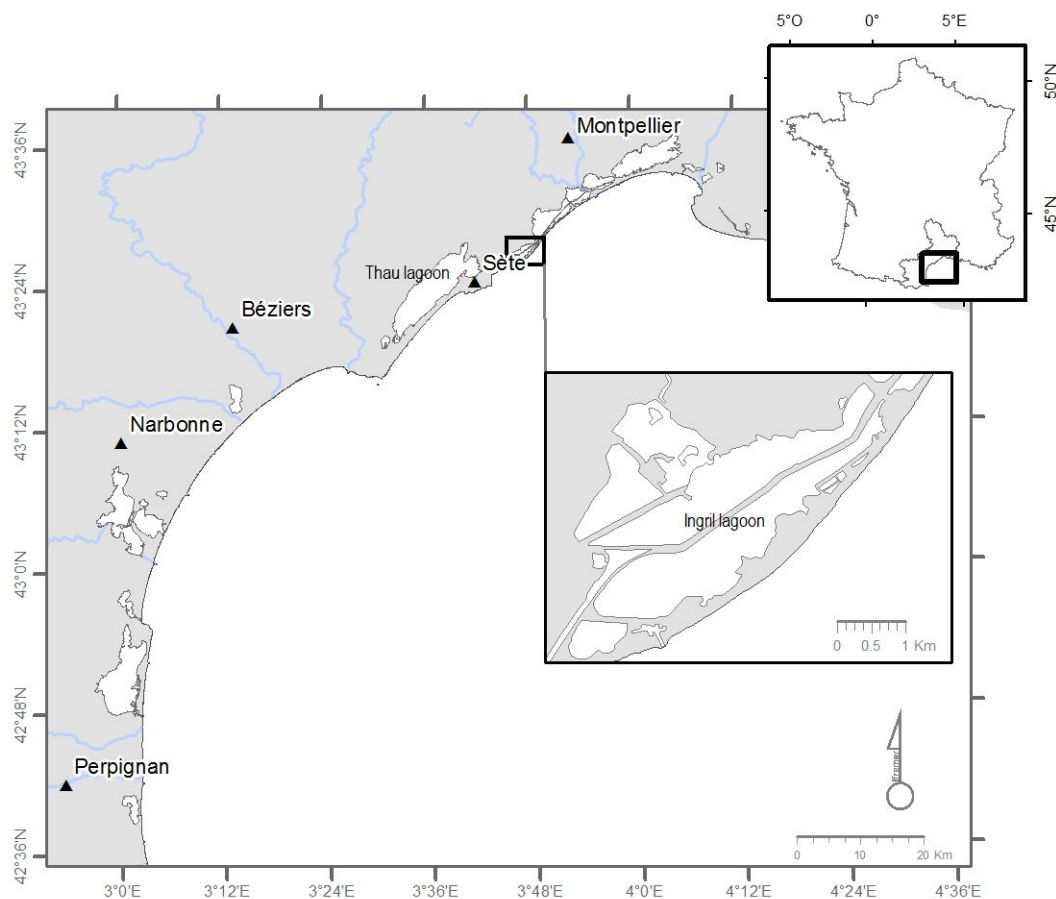
## 1. Introduction

Many photosynthetic microorganisms are able to develop massive blooms when environmental conditions are favorable. Some microalgal species are harmful and could produce toxins negatively affecting the functioning of the ecosystem and human health. These blooms are commonly called Harmful Algal Blooms (HABs) (Smayda, 1997a). Various gastric or neurological syndromes are observed in humans following the consumption of contaminated shellfish (Zingone & Oksfeldt Enevoldsen, 2000)-(Glibert, 2005). Toxins can accumulate in the tissues of many species of bivalve mollusks (oysters, mussels), birds and marine mammals (Shumway et al., 2003). HABs can have negative impacts on shellfish aquaculture, fish farming and tourism. The exponential increase in the number of HABs in the world may be a result of growing exploitation of coastal waters for aquaculture, inducing an enrichment in organic matter, transfer through ballast water or via translocation of mollusks (Bolch & de Salas, 2007)-(Laabir & Gentien, 1999) and nutrient enrichment (Burkholder et al., 2008).

Pinnatoxins were first characterized in the bivalve *Pinna muricata* Linnaeus in Japan (Takada et al., 2001). Pinnatoxins E and F were detected in Pacific oysters in 2007 in Rangaunu harbor, Northland and New Zealand, whereas pinnatoxins E, F, and G were found in the digestive gland of *Crassostrea gigas* from South Australia (Selwood et al., 2010). However, the causative organism producing these toxins was unknown. Rhodes et al. (Rhodes et al., 2010) isolated and cultured non-motile cells of an unidentified dinoflagellate present in New Zealand, responsible for the production of pinnatoxins. Soon after, from water samples collected from the Ingril lagoon, a morphologically very similar taxon was described by Nezan and Chomérat (Nézan & Chomérat, 2011) as *Vulcanodinium rugosum*. A phylogenetic study based on Large Sub Unit ribosomal DNA (LSU rDNA) sequences confirmed that this taxon was new and belonged to the order of Peridiniales. A new species was proposed, *V. rugosum*, currently placed in the order of Peridiniales. This species was responsible for an unusual toxicity observed in the Ingril Lagoon (Figure 1) with particularly high concentrations of toxins for several months (Hess et al., 2013). This study also clarified that *V. rugosum* produces pinnatoxin G (PnTX-G) in culture. Toxicity tests performed on mice with extracts of shellfish fed with *V. rugosum* cells revealed the presence of this pinnatoxin causing neurological symptoms (Selwood et al., 2010)-(Rhodes et al., 2011a). The presence of this species was subsequently confirmed in Australia, New Zealand, Japan, Hawaii, China,

and the Tropical Mexican Pacific (Garrett et al., 2011; Rhodes et al., 2011a)-14-(Smith et al., 2011)-(Hernandez-Becerril et al., 2013; Selwood et al., 2014). Strains isolated from different areas do not necessarily produce the same analogues. Strains from Australia and New Zealand produce pinnatoxins E and F (Rhodes et al., 2011a; Rhodes et al., 2010). Some Australian strains additionally produce pinnatoxin G, while the Japanese strains so far appear to exclusively produce pinnatoxin G (Rhodes et al., 2011b), as is the case with the French strain for the type species (Hess et al., 2013).

Nutrients are among the most important factors controlling phytoplankton growth. Nitrogen (N) and phosphorus (P) play a crucial role in the growth and development of these micro-organisms. Eutrophication could be responsible for some HAB events (Anderson et al., 2002)<sup>3</sup>-(Glibert, 2005). Nutrient concentrations and ratios may influence cell growth as well as the toxicity of the micro-organisms (Leong et al., 2004)-(Lee et al., 2012)-(Lim et al., 2010)-(Xu et al., 2012). Many dinoflagellates species use mixotrophy which may give them a competitive advantage in marine ecosystems receiving organic input (Burkholder et al., 2008). The use of dissolved organic matter (osmotrophy) and/or predation (phagotrophy) could be an important mode of nutrition for protists in oligotrophic ecosystems (Jones, 1994)-(Jones, 2000) or eutrophic estuaries (Nygaard & Tobiesen, 1993)-(Jeong et al., 2004). For instance, a bloom of *Cochlodinium* sp. acquired an estimated ~55%–62% of its N supply from urea (Kudela et al., 2008). The importance of urea relative to the total dissolved organic nitrogen was 3-25 % in the Thau lagoon, France (Collos et al., 2007) and in the same range in a shallow eutrophic bay in Japan (Mitamura & Saijo, 1975). Collos et al. (Collos et al., 2007) showed that nitrate and nitrite contributed 0.1%–14% and 0.1%–5% respectively of growth requirements of *Alexandrium catenella* in the Thau lagoon, whereas ammonium and urea were the main N sources fueling growth of this harmful dinoflagellate (30%–100% and 2%–59%, respectively). Until now no data on the effect of the nutrients on the physiology of *V. rugosum* had been available. This study aims to investigate the effect of different nitrogen sources, including inorganic nitrogen (nitrate, ammonium) and organic nitrogen (urea), on the morphology, growth, and toxicity of *V. rugosum* developing in the Ingril lagoon, a Mediterranean lagoon close to Thau, in the northwestern French Mediterranean Sea.



**Figure 1.**Ingril, a French Mediterranean lagoon.

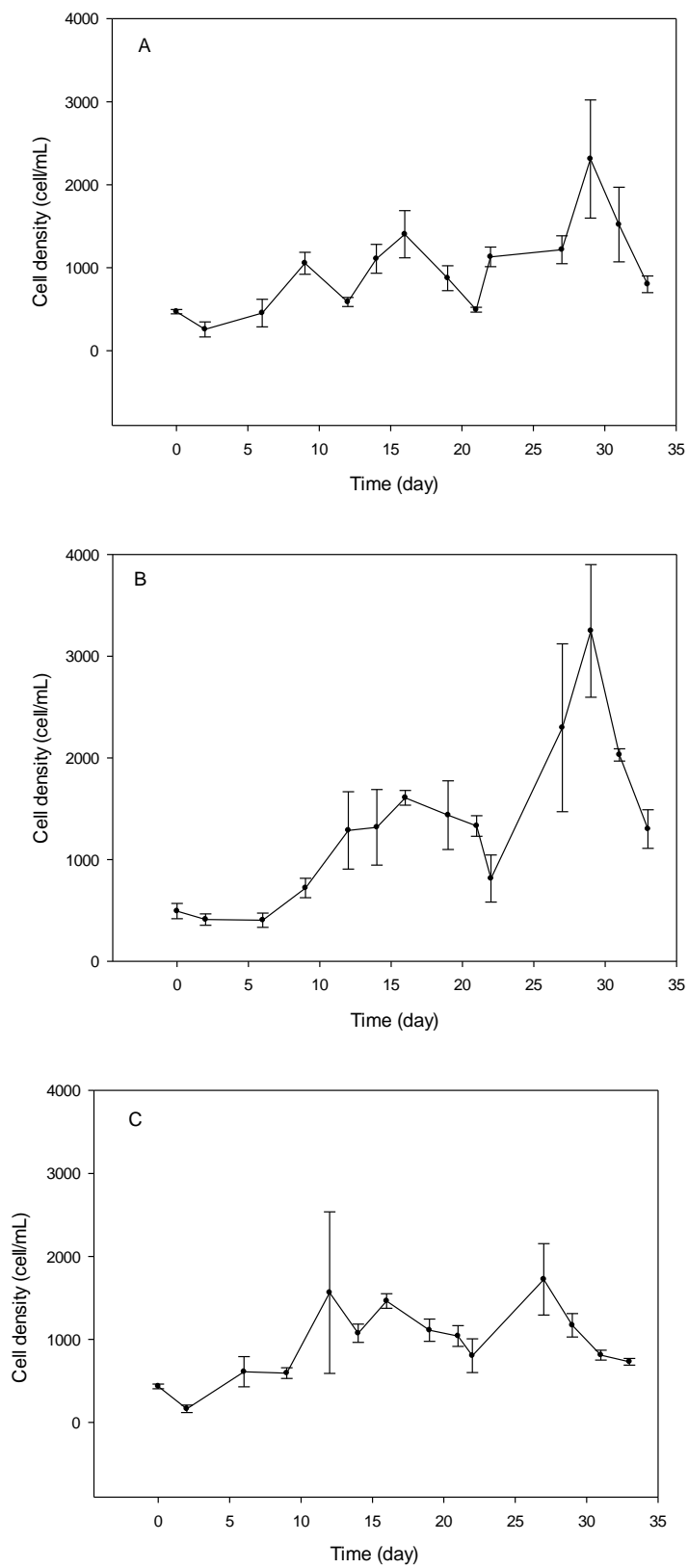
## 2. Results and Discussion

### 2.1. Cell growth

For *V. rugosum* cultures grown with nitrate as the nitrogen source, the initiation phase was ca. 2 d, whereas it was 6 d for cultures grown with urea or ammonium. There was no significant difference (Anova,  $P=0.856$ ) between the growth rate of *V. rugosum* cultivated with ammonium ( $0.28 \pm 0.11 \text{ d}^{-1}$ ), urea ( $0.26 \pm 0.08 \text{ d}^{-1}$ ) or nitrate ( $0.24 \pm 0.01 \text{ d}^{-1}$ ) as nitrogen source. For nitrate and ammonium, a rapid growth phase started on day 21 or 22 of the experiment, lasted for 5 d, and ended at the day 27 or 28, immediately followed by a significant drop in cell density (Fig. 2A,B). For cultures grown on urea, we observed a significant increase in cell density from day 2 to day 12, reaching  $1500 \text{ cells ml}^{-1}$ , followed by a progressive decrease in cell density. Then, we observed an increase of cell density from day 22 to day 27, with a maximum cell concentration of  $1750 \text{ cells/mL}$  (Fig 2C). This evolution

was followed by a sharp decrease in cell concentration, as was observed for the other cultures grown with nitrate and ammonium.

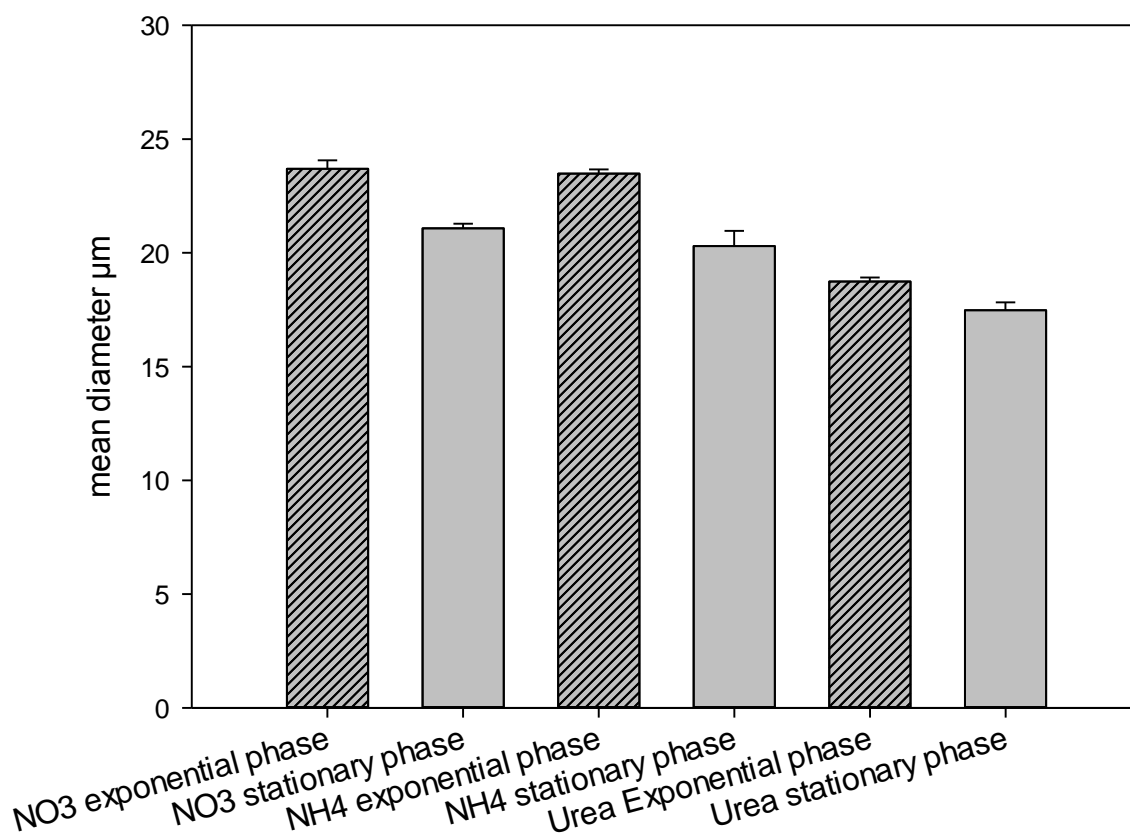
In many ecosystems, and particularly in those with strong anthropogenic inputs, nutrients may vary quantitatively and qualitatively, depending on the degree of eutrophication or oligotrophication, thus influencing the development of dinoflagellates (Collos et al., 2007)-(Burkholder et al., 2008; Collos et al., 2009). Until now, data on the growth characteristics, nutritional preferences, and toxicity of *V. rugosum* had not been available. Yet, such studies are required to understand the relationship between environmental parameters, e.g. nutritional factors prevailing in the environment, on one hand, and the growth and toxicity of this harmful dinoflagellate on the other. Here, we investigated the influence of inorganic (nitrate and ammonium) and organic (urea) dissolved nitrogen on the biology and toxin content of *V. rugosum*. This study showed that this dinoflagellate developing in the Ingril lagoon exhibited a low growth rate with all nitrogen sources and a temperature and irradiance of 25 °C and 100  $\mu\text{mol} / \text{m}^2 \text{s}^{-1}$  (0.24-0.28  $\text{d}^{-1}$ ) compared to *Alexandrium catenella* growing in similar environmental conditions in the Thau lagoon (0.4-1  $\text{d}^{-1}$ ) (Laabir et al., 2011)-(Laabir et al., 2012). Nevertheless, the average growth rate of *V. rugosum* was closer to those found for benthic species such as *Ostreopsis sp.* (0.17-0.49  $\text{d}^{-1}$ ) (Pistocchi et al., 2011)-(Guerrini et al., 2010)-(Morton et al., 2009) and *Prorocentrum lima* (0.34  $\text{d}^{-1}$ ) (Vale et al., 2009). Maximum cell concentration (cell yield) reached in the laboratory did not exceed 3000 cells/mL for *V. rugosum*. This behavior appeared to be coherent with the low cell abundances (maximum of 20 000 cells/L) of *V. rugosum* measured in the water column in the Ingril lagoon during a monthly survey performed from April 2012 to May 2013 (Abadie et al. in preparation).



**Figure 2.** Growth curves of *Vulcanodinium rugosum* grown with nitrate (A), ammonium (B); and urea (C) as nitrogen sources.

## 2.2. Cell morphometry

For all nitrogen sources tested, the average cell diameter was larger at the exponential growth phase ( $23.7 \pm 0.37 \mu\text{m}$ ,  $23.5 \pm 0.18 \mu\text{m}$ , and  $18.7 \pm 0.18 \mu\text{m}$  for nitrate, ammonium and urea, respectively) than that at the stationary phase ( $21 \pm 0.21 \mu\text{m}$ ,  $20.3 \pm 0.67 \mu\text{m}$ , and  $17.5 \pm 0.37 \mu\text{m}$  for nitrate, ammonium and urea, respectively). There was no significant difference in average size between cells from cultures using ammonium compared to those grown using nitrate (one way ANOVA,  $P=1$ ). However, the average diameter of cells grown with urea was significantly lower (Anova,  $p<0.001$ ) than that of cells growing on nitrate and ammonium (Fig 3).

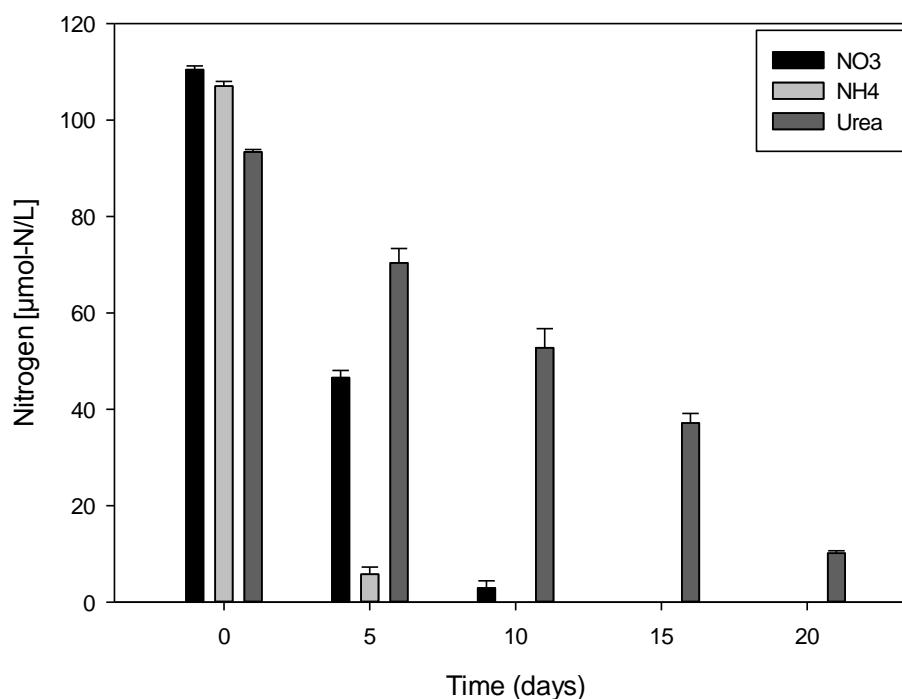


**Figure 3.** Mean diameter of *Vulcanodinium rugosum* cells grown on nitrate, ammonium and urea, measured at exponential and stationary phases of growth,  $n \geq 30$ .



### 2.3. Variation of nitrogen concentration in cultures

Ammonium concentration in cultures decreased rapidly until exhaustion after only one week (Figure 4). The initial concentration corresponds to the concentration of nitrogen in the inoculated media at the beginning of the experiment. Complete depletion in nitrate in culture media was observed after 12 days of culture. Ammonium was used up even more rapidly with concentrations not exceeding 5  $\mu\text{mol-N/L}$  at day 6. *V. rugosum* was able to absorb urea as a nitrogen source and is thus an osmotrophic dinoflagellate. Urea concentration in cultures decreased progressively to ca. 10  $\mu\text{mol-N/L}$  after 20 days. Nitrogen uptake was estimated, taking into consideration the decrease in nitrogen concentration and increase in cell densities in cultures over time. Ammonium, nitrate, and urea were absorbed at a mean rate of 38.75, 18.74 and 5.46  $\mu\text{mol-N } 10^{-6} / \text{cell d}$ , respectively.



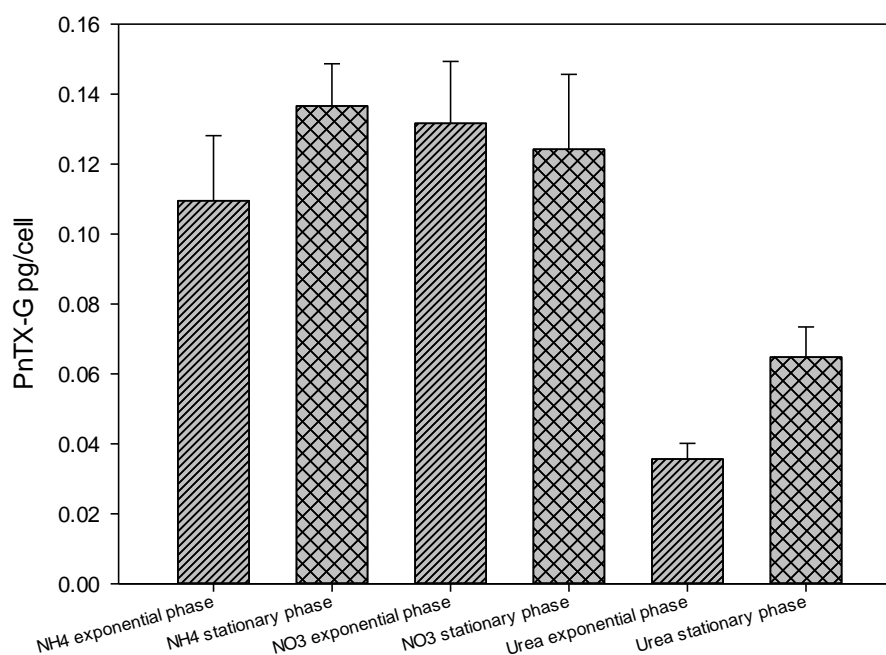
**Figure 4.** Variations of nitrate, ammonium, and urea concentrations ( $\mu\text{mol-N/L}$ ) in the cultures of *Vulcanodinium rugosum*.

We investigated the effect of different inorganic forms (nitrate and ammonium) and organic (urea) nitrogen, some of the major nutritive resources that could influence the growth

and the cell yield of *V. rugosum*. All sources of nitrogen can be used by this species, suggesting the osmotrophic behavior of *V. rugosum*. This behavior may give dinoflagellates a competitive advantage *in situ* since organic nutrients such as urea could represent a significant source of nitrogen (Collos et al., 2004; Collos et al., 2006). It has been shown that ammonium is rapidly assimilated by dinoflagellates because of the low energy cost required for protein synthesis (Twomey et al., 2005). Our results confirm these observations for the Mediterranean strain of *V. rugosum*. Compared to nitrate and urea, ammonium was rapidly assimilated by this dinoflagellate. Jauzein et al. (2008) showed that the absorption of urea by *A. catenella* resulted in intense excretion of ammonium into the culture medium. Cells primarily using ammonium may partly explain the slow uptake of urea ( $5.46 \mu\text{mol-N} \times 10^{-6} / \text{cell d}$ ) compared to other nitrogen sources. Several studies have shown that the effects of organic and inorganic nitrogen differ greatly from one species to another and sometimes even from one strain to another for the same species (Anderson et al., 2012a). Nutrients assimilated by phytoplankton species can influence both cell growth and toxin production (John & Flynn, 2000; Leong et al., 2004)-(Lee et al., 2012)-(Lim et al., 2010)-(Xu et al., 2012). Significant differences were shown to depend on the species, e.g. in the genus *Alexandrium*. For example, *A. catenella* primarily uses ammonium for growth (Collos et al., 2004). *V. rugosum* cell density increased after the 22<sup>nd</sup> day of incubation despite nitrogen deficiency in all of the cultures. We therefore suggest that after senescence, dead cells may represent a source of particulate organic matter, which could be converted into dissolved inorganic nutrients by heterotrophic bacteria as our culture was not axenic. Inorganic nitrogen bacterially produced can be used by living cells, which would again promote growth (Hadjadji et al., 2012).

#### 2.4. Toxin concentration variations

Concentrations of PnTX-G in *V. rugosum* cells, expressed in pg/cell, were measured both at the exponential and the stationary phases in cultures using different nitrogen sources. The use of urea had an impact on the production of PnTX-G. The toxin concentration in cells grown on this organic nitrogen form was significantly lower than that of cells grown on nitrate and ammonium (Fig. 5, one-way ANOVA,  $p < 0.001$ ). We also observed that PnTX-G production may depend on the growth phase. There was no significant difference in the amount of PnTX-G in cells grown on nitrate compared to those cultivated on ammonium (one way ANOVA,  $p > 0.35$ ).



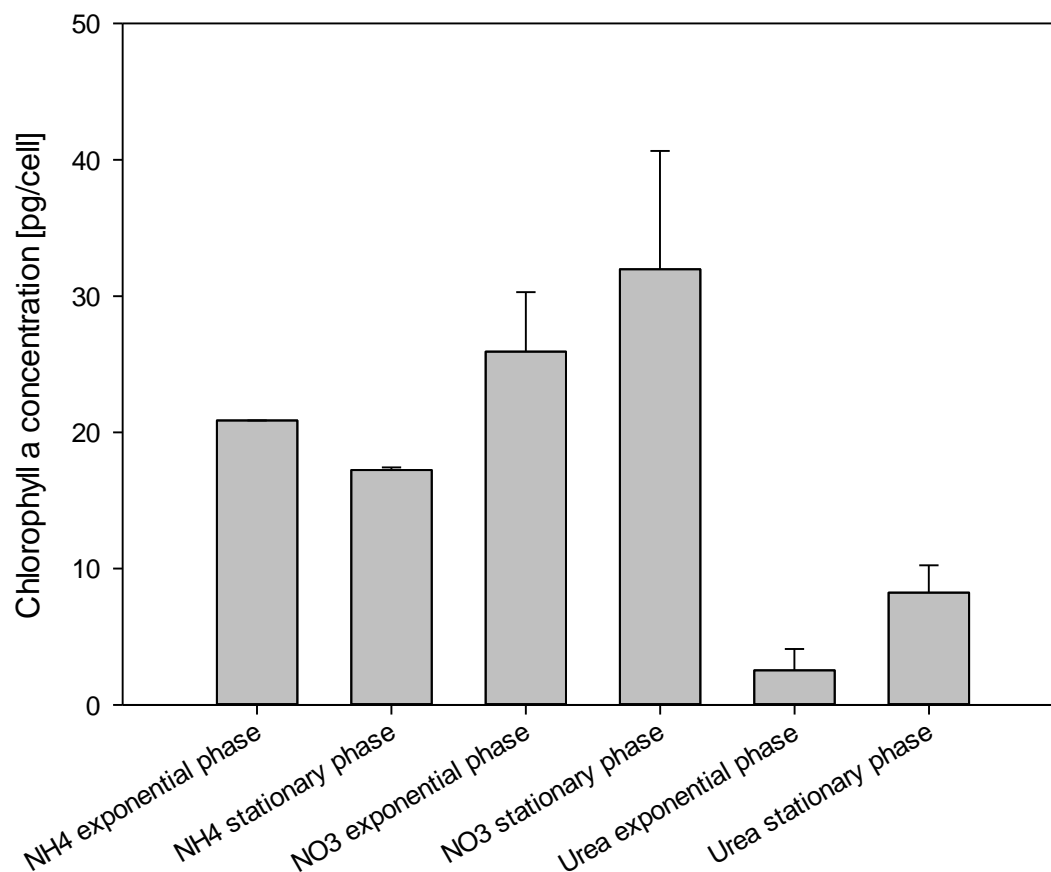
**Figure 5.** Concentration of pinnatoxin G in *Vulcanodinium rugosum* grown with nitrate, ammonium and urea as nitrogen sources, at exponential and stationary phases of the growth cycle.

For comparison, a toxic strain of *A. tamarense* showed a high growth rate using urea as the nitrogen source, whereas the saxitoxin production rate was favored by nitrate (Xu et al., 2012 ; Leong et al., 2004). In our study, the growth rate was not significantly different for *V. rugosum* when cultured with either urea or ammonium. However, the PnTX-G cell count was higher in cultures grown with inorganic nitrogen (ammonium and nitrate) than in cultures grown with urea.

### 2.5. Chlorophyll a measurements

The chlorophyll a (Chl *a*) concentration (pg/cell) was measured in cultures with different nitrogen sources at exponential and stationary growth phases. Chl *a* concentration was significantly lower for *V. rugosum* cells grown on urea than for cells using ammonium or nitrate (one way ANOVA,  $p < 0.004$ ). The highest concentration was detected in the cultures with nitrate and in cells harvested during the stationary phase with  $32 \pm 9$  pg/cell. The lowest

concentration was found in cultures using urea in the exponential phase of growth with  $2.5 \pm 1.6$  pg/cell (Fig.6).



**Figure 6.** Chlorophyll *a* concentration in *Vulcanodinium rugosum* cells grown with nitrate, ammonium, and urea and harvested in the exponential and stationary phases of growth.

### 3. Experimental Section

#### 3.1. Cultures of *Vulcanodinium rugosum*

The strain of *V.rugosum* (IFR10-017) used in this study was isolated from a single vegetative cell sampled from the water column of the Ingril lagoon (Figure 1), in 2009. Water sampling was performed in 2009 during an important development for this species *in situ* (~2200 cells/L); the water temperature was 23.3° C and salinity 36.5. The Ingril lagoon has a surface area of 685 hectares and communicates with the sea through Frontignan harbor, through a channel named Grau. Its depth reaches a maximum of 1.70 m with a sandy bottom (SMNLR, 2006). *V. rugosum* was grown on an Enriched Natural Sea Water (ENSW) culture medium (Harrison et al., 1980). It was based on water sampled in situ, filtered at 0.2 µm, and then autoclaved. Nutrients and trace elements were added to all the water at time zero  $t_0$  (batch culture). This strain was maintained in culture through monthly subcultures. In previous laboratory experiments, we determined the optimal growth conditions for this dinoflagellate which corresponded to a temperature of  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , salinity of 36, light intensity of  $100 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  using cool white fluorescent light, and a photoperiod of 12h/12h. Small-scale turbulence negatively affects the growth of dinoflagellates inducing the formation of temporary cysts, therefore agitation prior to sampling was very moderate.

As described by Rhodes et al. (Rhodes et al., 2011b), the *V. rugosum* life cycle shows typical motile vegetative cells and unornamented non-motile cells (30–32 µm diameter). Non-motile cells resembled the division cysts of *Scrippsiella hangoei* (J. Schiller) (Larsen et al., 1995)-(Kremp & Parrow, 2006). For each experiments testing the effect of any nitrogen source, the flasks were inoculated only with healthy motile cells. Our microscopic observations clearly showed that the cultures were dominated largely by motile cells (>95%) until the stationary phase, when non-motile cells appeared and settled onto the flask wall. Growth rate was calculated for the exponential phase only based on motile cells. PnTX-G and Chl *a* were measured at the exponential phase and at the beginning of the stationary phase when motile cells still dominated.

### 3.2. Experimental design

A culture of *V. rugosum* harvested in the exponential phase of growth was filtered on a GF/F filter to retain all the cells. Vegetative cells were then placed in the ENSW medium without the addition of nitrogen. Subsequently, cells were incubated during one week, after which cells were motile in the optimal physiological state and the nitrogen naturally present in the ENSW medium was completely depleted. At the beginning of the experiment, this culture was used to inoculate 250 mL sterile flasks containing various forms of nitrogen (nitrate, urea

and ammonium) to a final concentration of 110  $\mu\text{mol-N/L}$ . This concentration was defined following a preliminary experiment where we determined the growth rate of *V. rugosum* in cultures with different nitrogen concentrations (55, 110, 220, and 549  $\mu\text{mol-N/L}$ ). Ammonium was the only nitrogen form toxic to *V. rugosum* at concentrations of 220 and 549  $\mu\text{mol-N/L}$ . For each nitrogen source, the experiment was conducted in triplicate. During up to one month, we performed a cell count every 2-3 days to minimize interference with growth of the algae. Samples from cultures were collected during the exponential and stationary growth phases to analyze toxin and chlorophyll content and size.

### 3.3. Growth rate calculation

For all experiments, every day for two weeks, the experimental flasks were gently shaken and 500  $\mu\text{L}$  representative samples were fixed using Lugol's iodine solution. Cell concentration was monitored via direct microscopic counts using a Nageotte counting chamber. In accordance with Guillard (Guillard, 1973), the specific growth rate  $\mu$  (expressed in  $\text{day}^{-1}$ ) was calculated from the slope of a linear regression over the entire exponential phase of growth by the least square fit of a straight line to the data after logarithmic transformation;  $\mu = (\ln N_t - \ln N_0)/(t_1 - t_0)$  in units of  $\text{day}^{-1}$ , where  $N_0$  and  $N_t$  represent the cell density in cells/mL at the start,  $t_0$ , and end,  $t_1$ , of the exponential phase, respectively.

### 3.4. Cell diameter measurement

The cell diameter was calculated as the average diameter of at least 30 cells using a Flow Cam™ device. The Flow Cam™ is an instrument that combines the capabilities of a selective flow cytometer, microscopy (taking photos and biometrics), and fluorescence detectors. It analyzes particles or cells in a sample stream (Alvarez et al., 2011).

### 3.5. Nitrogen content in the cultures

The nitrogen concentration in the culture medium was measured every 5 days. Nitrate was measured using the method described by Collos et al. (1999) based on the absorption of nitrate in the UV. The sample was filtered on a membrane of 0.2  $\mu\text{m}$  Pall GelmanAcrodisk and no reagent was employed. The measurement was performed at 220 nm using a spectrophotometer. The nitrate concentration was estimated by reference to a calibration curve prepared with a water solution of artificial sea water treated, as described above, with the following concentrations: 10, 20, 50, 100, and 200  $\mu\text{mol}$ . Ammonium measurement was

performed using the method described by Koroleff (Koroleff, 1983). The determination of urea was performed using the method of Aminot and K erouel (Aminot & Kerouel, 1982).

### 3.6. Toxin Extraction and quantification

For toxin analyses, we took a 20 mL sample in each culture at the exponential and stationary growth phases. The samples were centrifuged (3000 g, 15 min, 4  C) and the supernatant removed carefully. Methanol (100 %, 1 mL) was added to the remaining pellet and the sample stored at -20  C until extraction of toxins (Rhodes et al., 2010). Extraction of toxins was carried using two consecutive sonication steps for 10 min each, followed by filtration of extracts over a 0.2  m membrane (Whatman Mini-UniPrep<sup>TM</sup>). The filtered extracts were stored at -24  C until quantification. Quantification of PnTX-G was carried out using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), using external calibrants over the range from 0.5 to 100 ng/mL. A C8 column was used at 25  C for analysis (injection volume of 5  L). The analysis was conducted at a flow rate of 0.8 mL/min (Hess et al., 2013).

### 3.7. Chlorophyll *a* measurements

Chlorophyll *a* (Chl *a*) was determined by spectrofluorimetry using the method described by Neveux and Lantoin e (1993). Cultures (15 or 20 mL) were filtered over GF/F filters (diameter 25 mm). Filters were stored at -24  C until extraction of the pigments with aqueous acetone (90 %). The extraction was carried out by allowing the filters to soak for 24 h at 4  C after adding acetone (5 mL) and sonication for 10 s (twice). The samples were then centrifuged (2750 g, 4  C for 15 min) and 3 mL were analyzed. Pigment concentration was expressed in pg/cell, using the cell concentration obtained by counting cells on the same day as sampling for chemical analyses.

## Conclusions

*V. rugosum* could use osmotrophy to enhance nutrient supplies in a relatively nutrient poor habitat such as the Ingril lagoon (inorganic nitrogen concentration measured in 2012-2013 ranged between 0.02 and 6.75  mol/L and 0.07 and 4.74  mol/L for nitrate and ammonium, respectively). The production of PnTx-G was significantly lower with urea as a nitrogen

source, suggesting that nutritional conditions prevailing at the moment of the bloom could determine the cellular toxicity of *V. rugosum*. This could partially influence the toxin concentration measured in the contaminated mollusks. However, the accumulation, biotransformation and depuration capacity of the bivalve also have to be considered.

### **Acknowledgements**

This work was supported by the LAGUNOTOX project funded by Fondation TOTAL. We would also like to thank l'Agence de l'Eau Rhone Méditerranée Corse (AERMC) for their financial help. Thanks to IRD (Institut National pour la Recherche et le Développement) for funding Mohamed Laabir's stay in Tunisia and to LMI COYS-MED for supporting his research. Contributions from Philipp Hess and Véronique Séchet were part of the COSELMAR project (partly funded by the Pays de la Loire Regional Council). Thanks to Yves Collos for his help.

### **Author Contributions**

Eric Abadie and Lamia Kaci : perform the experiments

Eric Abadie and Mohamed Laabir : conceived, designed and analyzed the data and wrote the paper

Tom Berteau : contribute to toxins analysis

Philipp Hess, Estelle Masseret and Jean Luc Rolland : contribute to correct and improve the manuscript

### **Conflicts of Interest**

The authors declare no conflict of interest

### **References**

1. Smayda, T.J. Harmful algal blooms: Their ecophysiology and general relevance to phytoplankton blooms in the sea. *Limnol. Oceanograph* **1997**, *42*, 1137-1153.



2. Zingone, A.; Oksfeldt Enevoldsen, H. The diversity of harmful algal blooms: A challenge for science and management. *Ocean. Coastal. Manag.* **2000**, *43*, 725-748.
3. Glibert, P.M., Anderson, DM ; Gentien, P; Granéli, E; Sellner, KG Global complex phenomena of harmful algal blooms. *Oceanography* **2005**, *18*, 136-147.
4. Shumway, S.E.; Allen, S.M.; Dee Boersma, P. Marine birds and harmful algal blooms: Sporadic victims or under-reported events ? *Harmful. Algae* **2003**, *2*, 1-17.
5. Bolch, C.J.S.; De Salas, M.F. A review of the molecular evidence for ballast water introduction of the toxic dinoflagellates *Gymnodinium catenatum* and the *Alexandrium tamarensis* complex to Australasia. *Harmful. Algae.* **2007**, *6*, 465-485.
6. Laabir, M.; Gentien, P. Survival of toxic dinoflagellates after gut passage in the pacific oyster *Crassostrea gigas* thunburg. *J. Shell. Res.* **1999**, *18*, 217-222.
7. Burkholder, J.M.; Glibert, P.M.; Skelton, H.M. Mixotrophy, a major mode of nutrition for harmful algal species in eutrophic waters. *Harmful. Algae.* **2008**, *8*, 77-93.
8. Takada, N.; Umemura, N.; Suenaga, K.; Chou, T.; Nagatsu, A.; Haino, T.; Yamada, K.; Uemura, D. Pinnatoxins B and C, the most toxic components in the pinnatoxin series from the okinawan bivalve pinna muricata. *Tetrahedron. Lett.* **2001**, *42*, 3491-3494.
9. Selwood, A.I.; Miles, C.O.; Wilkins, A.L.; Van Ginkel, R.; Munday, R.; Rise, F.; McNabb, P. Isolation, structural determination and acute toxicity of pinnatoxins E, F and G. *J.Agr. Food. Chem.* **2010**, *58*, 6532-6542.
10. Rhodes, L.; Smith, K.; Selwood, A.; McNabb, P.; Van Ginkel, R.; Holland, P.; Munday, R. Production of pinnatoxins by a peridinioid dinoflagellate isolated from northland, new zealand. *Harmful Algae* **2010**, *9*, 384-389.
11. Nézan, E.; Chomérat, N. *Vulcanodinium rugosum* gen. Nov., sp. Nov. (dinophyceae): A new marine dinoflagellate from the french mediterranean coast. *Cryptogamie Algologie* **2011**, *32*, 3-18.
12. Hess, P.; Abadie, E.; Herve, F.; Berteaux, T.; Sechet, V.; Araoz, R.; Molgo, J.; Zakarian, A.; Sibat, M.; Rundberget, T., *et al.* Pinnatoxin G is responsible for atypical

- toxicity in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and clams (*Venerupis decussata*) from Ingril, a French Mediterranean lagoon. *Toxicon* **2013**, *75*, 16-26.
13. Rhodes, L.; Smith, K.; Selwood, A.; McNabb, P.; Molenaar, S.; Munday, R.; Wilkinson, C.; Hallegraeff, G. Production of pinnatoxins E, F and G by scrippsielloid dinoflagellates isolated from Franklin Harbour, South Australia. *N. Z. J. Mar Freshw Res* **2011**, *45*, 703-709.
  14. Garrett, M.J.; Puchulutegui, C.; Selwood, A.I.; Wolny, J.. Identification of the harmful dinoflagellate *Vulcanodinium rugosum* recovered from a ballast tank of a globally traveled ship in Port Tampa Bay, Florida, USA. *Harmful Algae* **2014**, *39*, 202-209.
  15. Smith, K.F.; Rhodes, L.L.; Suda, S.; Selwood, A.I. A dinoflagellate producer of pinnatoxin G, isolated from sub-tropical Japanese waters. *Harmful Algae* **2011**, *10*, 702-705.
  16. Hernandez-Becerril, D.U.; Rodriguez-Palacio, M.C.; Lozano-Ramirez, C. Morphology and life stages of the potentially pinnatoxin-producing thecate dinoflagellate *Vulcanodinium rugosum* from the tropical Mexican Pacific. *Bot Marina* **2013**, *56*, 535-540.
  17. Selwood, A.I.; Wilkins, A.L.; Munday, R.; Gu, H.F.; Smith, K.F.; Rhodes, L.L.; Rise, F. Pinnatoxin H: A new pinnatoxin analogue from a South China Sea *Vulcanodinium rugosum* isolate. *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 5508-5510.
  18. Rhodes, L.; Smith, K.; Selwood, A.; McNabb, P.; Munday, R.; Suda, S.; Molenaar, S.; Hallegraeff, G. Dinoflagellate *Vulcanodinium rugosum* identified as the causative organism of pinnatoxins in Australia, New Zealand and Japan. *Phycologia* **2011**, *50*, 624-628.
  19. Anderson, D.M.; Glibert, P.M.; Burkholder, J.M. Harmful algal blooms and eutrophication: Nutrient sources, composition, and consequences. *Estuaries* **2002**, *25*, 704-726.
  20. Leong, S.C.Y.; Murata, A.; Nagashima, Y.; Taguchi, S. Variability in toxicity of the dinoflagellate *Alexandrium tamarense* in response to different nitrogen sources and concentrations. *Toxicon* **2004**, *43*, 407-415.

21. Lee, T.C.H.; Kwok, O.T.; Ho, K.C.; Lee, F.W.F. Effects of different nitrate and phosphate concentrations on the growth and toxin production of an *Alexandrium tamarense* strain collected from drake passage. *Mar. Envir. Res.* **2012**, *81*, 62-69.
22. Lim, P.T.; Leaw, C.P.; Kobiyama, A.; Ogata, T. Growth and toxin production of tropical *Alexandrium minutum* halim (dinophyceae) under various nitrogen to phosphorus ratios. *J. Appl. Phycol.* **2010**, *22*, 203-210.
23. Xu, J.; Ho, A.Y.T.; He, L.; Yin, K.; Hung, C.; Choi, N.; Lam, P.K.S.; Wu, R.S.S.; Anderson, D.M.; Harrison, P.J. Effects of inorganic and organic nitrogen and phosphorus on the growth and toxicity of two *Alexandrium* species from Hong Kong. *Harmful Algae* **2012**, *16*, 89-97.
24. Jones, R.I. Mixotrophy in planktonic protists as a spectrum of nutritional strategies. *Mar. Microb. Food Webs* **1994**, *8*, 87-96.
25. Jones, R.I. Mixotrophy in planktonic protists: An overview. *Freshw. Biol.* **2000**, *45*, 219-226.
26. Nygaard, K.; Tobiesen, A. Bacterivory in algae - a survival strategy during nutrient limitation. *Limnol. Oceanogr.* **1993**, *38*, 273-279.
27. Jeong, H.J.; Yoo, Y.D.; Kim, J.S.; Kim, T.H.; Kim, J.H.; Kang, N.S.; Yih, W. Mixotrophy in the phototrophic harmful alga *Cochlodinium polykrikoides* (dinophycean): Prey species, the effects of prey concentration, and grazing impact. *J. Eukaryot. Microbiol.* **2004**, *51*, 563-569.
28. Kudela, R.M.; Ryan, J.P.; Blakely, M.D.; Lane, J.Q.; Peterson, T.D. Linking the physiology and ecology of *Cochlodinium* to better understand harmful algal bloom events: A comparative approach. *Harmful Algae* **2008**, *7*, 278-292.
29. Collos, Y.; Vaquer, A.; Laabir, M.; Abadie, E.; Laugier, T.; Pastoureaud, A.; Souchu, P. Contribution of several nitrogen sources to growth of *Alexandrium catenella* during blooms in thau lagoon, southern france. *Harmful Algae* **2007**, *6*, 781-789.
30. Mitamura, O.; Saijo, Y. Decomposition of urea associated with photosynthesis of phytoplankton in coastal waters. *Mar. Biol.* **1975**, *30*, 67-72.

31. Collos, Y.; Bec, B.; Jauzein, C.; Abadie, E.; Laugier, T.; Lautier, J.; Pastoureaud, A.; Souchu, P.; Vaquer, A. Oligotrophication and emergence of picocyanobacteria and a toxic dinoflagellate in thau lagoon, southern france. *J. Sea Res.* **2009**, *61*, 68-75.
32. Laabir, M.; Jauzein, C.; Genovesi, B.; Masseret, E.; Grzebyk, D.; Cecchi, P.; Vaquer, A.; Perrin, Y.; Collos, Y. Influence of temperature, salinity and irradiance on the growth and cell yield of the harmful red tide dinoflagellate *Alexandrium catenella* colonizing mediterranean waters. *J. Plankton Res.* **2011**, *33*, 1550-1563.
33. Laabir, M.; Barre, N.; Franco, J.; Brunet, C.; Masseret, E.; Collos, Y. Morphological, biochemical and growth characteristics of *Alexandrium catenella* (whedon & kofoid) balech, a toxic dinoflagellate expanding in mediterranean waters. *Cahiers de Biologie Marine* **2012**, *53*, 365-372.
34. 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*, 421-428.
35. Guerrini, F.; Pezzolesi, L.; Feller, A.; Riccardi, M.; Ciminiello, P.; Dell'Aversano, C.; Tartaglione, L.; Iacovo, E.D.; Fattorusso, E.; Forino, M., *et al.* Comparative growth and toxin profile of cultured *Ostreopsis ovata* from the tyrrhenian and adriatic seas. *Toxicon* **2010**, *55*, 211-220.
36. Morton, S.L.; Vershinin, A.; Smith, L.L.; Leighfield, T.A.; Pankov, S.; Quilliam, M.A. Seasonality of *Dinophysis spp.* And *Prorocentrum lima* in black sea phytoplankton and associated shellfish toxicity. *Harmful Algae* **2009**, *8*, 629-636.
37. Vale, P.; Veloso, V.; Amorim, A. Toxin composition of a *Prorocentrum lima* strain isolated from the portuguese coast. *Toxicon* **2009**, *54*, 145-152.
38. Collos, Y.; Gagne, C.; Laabir, M.; Vaquer, A.; Cecchi, P.; Souchu, P. Nitrogenous nutrition of *Alexandrium catenella* (dinophyceae) in cultures and in thau lagoon, southern France. *J. Phycol.* **2004**, *40*, 96-103.
39. Collos, Y.; Lespilette, M.; Vaquer, A.; Laabir, M.; Pastoureaud, A. Uptake and accumulation of ammonium by *Alexandrium catenella* during nutrient pulses. *Afr. J. Mar. Sci.* **2006**, *28*, 313-318.

40. Twomey, L.J.; Piehler, M.F.; Paerl, H.W. Phytoplankton uptake of ammonium, nitrate and urea in the neuse river estuary, nc, USA. *Hydrobiologia* **2005**, *533*, 123-134.
41. Jauzein, C.; Collos, Y.; Garces, E.; Vila, M.; Maso, M. Short-term temporal variability of ammonium and urea uptake by *Alexandrium catenella* (Dinophyta) in cultures. *J. Phycol.* **2008**, *44*, 1136-1145.
42. Anderson, D.M.; Alpermann, T.J.; Cembella, A.D.; Collos, Y.; Masseret, E.; Montresor, M. The globally distributed genus *Alexandrium*: Multifaceted roles in marine ecosystems and impacts on human health. *Harmful Algae*. **2012**, *14*, 10-35.
43. John, E.H.; Flynn, K.J. Growth dynamics and toxicity of *Alexandrium fundyense* (Dinophyceae): The effect of changing N : P supply ratios on internal toxin and nutrient levels. *Europ. J. Phycol.*. **2000**, *35*, 11-23.
44. Hadjadji, I.; Masseret, E.; Plisson, B.; Laabir, M.; Cecchi, P.; Collos, Y. Clonal variation in physiological parameters of *Alexandrium tamarense*: Implications for biological invasions and maintenance. *Cahiers de Biologie Marine* **2012**, *53*, 357-363.
45. Harrison, P.J.; Waters, R.E.; Taylor, F.J.R. A broad-spectrum artificial seawater medium for coastal and open ocean phytoplankton. *J. Phycol.* **1980**, *16*, 28-35.
46. Larsen, J.; Kuosa, H.; Ikavalko, J.; Kivi, K.; Hallfors, S. A redescription of *Scrippsiella-hangoei* (schiller) comb-nov - a red tide dinoflagellate from northern Baltic. *Phycologia* **1995**, *34*, 135-144.
47. Kremp, A.; Parrow, M.W. Evidence for asexual resting cysts in the life cycle of the marine peridinioid dinoflagellate, *Scrippsiella hangoei*. *J. Phycol.* **2006**, *42*, 400-409.
48. Guillard, R.R.L. Division rates. *Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements* **1973**, *1*, 289-311.
49. Alvarez, E.; Lopez-Urrutia, A.; Nogueira, E.; Fraga, S. How to effectively sample the plankton size spectrum? A case study using flowcam. *J. Plankton Res.* **2011**, *33*, 1119-1133.

50. Collos, Y.; Mornet, F.; Sciandra, A.; Waser, N.; Larson, A.; Harrison, P.J. An optical method for the rapid measurement of micromolar concentrations of nitrate in marine phytoplankton cultures. *J. Appl. Phycol.* **1999**, *11*, 179-184.
51. Koroleff, F. Determination of ammonium. In Grasshoff et al.[Eds.] Method of sea water analysis. Verlag *Chemie. Weinheim* **1983**, 117-182.
52. Aminot, A.; Kerouel, R. Automatic-determination of urea in sea-water - a sensible method using diacetylmonoxime. *Can. J. Fish. Aqua. Sci.* **1982**, *39*, 174-183.

© 2015 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## Chapitre III : Distribution spatio-temporelle de *Vulcanodinium rugosum* dans la lagune d'Ingril et principaux facteurs déterminant sa dynamique in situ

### 1. Contexte et objectifs de l'étude

Dans le cadre du réseau de surveillance REPHY, il a été mis en évidence à partir de 2006 une toxicité atypique, de type neurotoxique mais non liée aux toxines réglementées (PSP et DSP), sur des souris auxquelles avait été injectés des extraits des moules récoltées dans l'étang d'Ingril. Cependant, les observations microscopiques des échantillons d'eau n'ont pas permis d'identifier une espèce phytoplanctonique connue comme productrice de neurotoxines. En 2009, une équipe IFREMER du laboratoire Environnement Ressources de Concarneau a isolé et décrit, pour la première fois, la nouvelle espèce *Vulcanodinium rugosum*, appartenant à un genre nouveau, *Vulcanodinium*, à partir d'un échantillon d'eau prélevé dans la lagune d'Ingril (Nézan & Chomérat, 2011). Malgré une fréquence d'échantillonnage élevée dans la lagune d'Ingril (hebdomadaire de mai à novembre), *V. rugosum* n'a été que très peu fréquemment observé dans les échantillons d'eau prélevés selon le protocole du RePHY. Alors que la recherche des pinnatoxines dans les échantillons de moules conservés à -20°C a montré la présence de pinnatoxines à des concentrations extrêmement élevées dès 2007, (maximum 1670 µg/kg de chair totale). Par la suite, il a été montré que cette espèce était productrice de pinnatoxines G (PnTX-G) responsables des toxicités atypiques observées depuis plusieurs années (Hess et al. 213). Ces observations posent clairement la question de sa répartition dans la colonne d'eau et de l'importance d'une éventuelle phase benthique dans son cycle de vie.

A ce jour, aucune étude écologique concernant la répartition spatio-temporelle de *V. rugosum* sous forme de kystes temporaires ou de cellules végétatives dans le milieu naturel n'avait été entreprise. Notre objectif dans ce travail a donc été d'apporter des premiers éléments sur la répartition de ce dinoflagellé dans l'Ingril (mars 2012- mars 2013) au niveau de la colonne d'eau et sur les macrophytes, substrat majeur dans cette lagune peu profonde. Les cellules, largement présentes sous forme de kystes temporaires, peuvent jouer un rôle clé dans l'ensemencement de la colonne d'eau et la résistance aux conditions environnementales défavorables. Un des objectifs de cette étude a été d'explorer les potentielles relations entre

les densités cellulaires de *V. rugosum in situ* et les principaux paramètres environnementaux (salinité, température, concentrations en nitrates, ions ammonium, nitrites, phosphates, concentrations en azote et phosphore totaux) Au cours d'un cycle annuel. Ces observations nous apporteront des informations importantes sur les facteurs clés influençant le développement et la dynamique de croissance de ce dinoflagellé dans son milieu naturel.

## 2. Résumé de l'article : Distribution spatio-temporelle de *Vulcanodinium rugosum* et principaux facteurs déterminant sa dynamique in situ

**Résumé.** Les efflorescences nuisibles de microalgues (HABs) sont souvent reliées à des espèces du groupe de dinoflagellés. Les HABs qui connaissent une augmentation en intensité et fréquence dans le monde, peuvent affecter négativement différentes composantes de l'écosystème marin et constituent une menace pour la santé humaine. Les côtes françaises ne sont pas épargnées par ces événements nocifs. En 2006, des symptômes neurotoxiques ont été observés grâce au REPHY (Réseau Français de surveillance du phytoplancton toxique et des toxines) en utilisation des bioessais sur souris à partir d'extraits de moules et d'huîtres récoltées dans la lagune de l'Ingril. Cette toxicité atypique a été reliée à la présence dans ces extraits de la pinnatoxine G (PnTX-G). Cette toxine, associée au groupe des imines cycliques est produite par *Vulcanodinium rugosum* une nouvelle espèce de dinoflagellé décrite en 2010 par Nézan et Chomérat se développant dans la lagune de l'Ingril. Nous avons réalisé un suivi mensuel d'un an (mars 2012 - mars 2013) durant lequel les principaux facteurs environnementaux tels que la température, la salinité et les nutriments azotés et phosphorés ont été mesurés. Nous avons également déterminé la distribution spatio-temporelle de *V. rugosum* dans la colonne d'eau (cellules végétatives) et sur les macrophytes (kystes temporaires). Les résultats ont montré que les cellules planctoniques de *V. rugosum* étaient observées dans toutes les stations échantillonnées mais à des densités relativement faibles (maximum de 1000 cell L<sup>-1</sup>). Les concentrations les plus importantes de ce dinoflagellé ont été observées de juin à septembre 2012. Nous avons noté une corrélation significative entre les densités cellulaires et le couple température/salinité suggérant que ce microorganisme était thermophile. Les kystes temporaires ont été observés sur les macrophytes avec un maximum



de 6300 cellules  $g^{-1}$  poids humide ce qui suggère que ces formes transitoires de résistance joueraient un rôle important dans la formation et le maintien d'un bloom en étant une source d'ensemencement rapidement mobilisable et continue sur la durée du bloom. Nos résultats montrent que les sources d'azote inorganique (nitrite, ions ammonium et azote inorganique dissous (NID)) sont négativement corrélées à l'abondance de *V. rugosum*. En revanche, l'azote total, le phosphore total et les phosphates sont positivement corrélés aux densités cellulaires dans la colonne d'eau. Ces résultats semblent confirmer la nature osmotrophe de *V. rugosum* ce qui pose la question de la détermination de la part de la nutrition organique pour la croissance de cette espèce. Enfin, nos résultats mettent en évidence la large distribution de *V. rugosum* dans la lagune d'Ingril, ce qui explique la fréquente contamination des mollusques bivalves dans cette lagune. Il est à craindre que, via le réseau de canaux existant et le déplacement de mollusques par les conchyliculteurs, *V. rugosum* puisse coloniser les lagunes voisines arborant des caractéristiques environnementales proches de celles d'Ingril jusqu'à la lagune de Thau (10 000 tonnes d'huîtres produites annuellement), ce qui mettrait en grande difficulté la filière conchylicole qui subit régulièrement des aléas d'ordre sanitaire.

Mots clés : *Vulcanodinium rugosum*, lagune méditerranéenne, lagune d'Ingril, neurotoxines, facteurs environnementaux, distribution spatio-temporelle, autécologie

3. Article : Occurrence of the neurotoxic dinoflagellate *Vulcanodinium rugosum* in Mediterranean: What are the driving environmental factors of its dynamic ?

**A soumettre**

**Occurrence of the neurotoxic dinoflagellate *Vulcanodinium rugosum* in Mediterranean: What are the driving environmental factors of its dynamic ?**

Eric Abadie<sup>1</sup>, Lesley Rhodes<sup>2</sup>, Nicolas Chomérat<sup>3</sup>, Claude Chiantella<sup>4</sup>, Anaïs Crottier<sup>4</sup>,  
Mohamed Laabir<sup>5</sup>

<sup>1</sup> IFREMER, Laboratoire Environnement Ressources du Languedoc-Roussillon, Centre for Marine Biodiversity, Exploitation and Conservation (MARBEC), CS30171 SETE CEDEX 03, France

<sup>2</sup> Adresse de Lesley Rhodes

<sup>3</sup> IFREMER, Laboratoire Environnement Ressources de Bretagne Occidentale,

<sup>4</sup> IFREMER, Unité Littorale, Laboratoire Phycotoxines (UL/PHYC), Rue de l'Île d'Yeu BP 21105 44311 Nantes CEDEX 3, France.

<sup>5</sup> Université de Montpellier, Center for Marine Biodiversity, Exploitation and Conservation (MARBEC), IRD, Ifremer, CNRS, Université de Montpellier, Place E. Bataillon, CC93, 34095 Montpellier cedex 5, France

\*Corresponding author : [Eric.abadie@ifremer.fr](mailto:Eric.abadie@ifremer.fr)

**ABSTRACT :**

Harmful Algal Blooms (HABs) often related to dinoflagellate species are increasing in intensity and frequency around the world. HABs affect negatively the ecosystem components and constitute a threat for human health. French coastal ecosystems have not been spared by these events. In 2006, neurotoxic symptoms were detected by RePHY (French monitoring program for the survey of HAB species and related toxins) using mouse bioassay carried out on mussels and oysters collected in Ingril Lagoon (NW Mediterranean). This atypical toxicity has been related to pinnatoxin G. This potent neurotoxin has been shown to be produced by a recently (2010) described dinoflagellate species, *Vulcanodinium rugosum* isolated in Ingril lagoon. During one year (march 2012 - march 2013) a monitoring campaign was conducted monthly in Ingril on 10 sampling stations. The main environmental parameters were measured (temperature, salinity, nutrients). We also determined the spatiotemporal distribution of *V.rugosum* cells in water column and on macrophytes. Results showed that the planktonic cells of *V.rugosum* were observed in all sampling stations but in relatively low concentrations (maximum of 1000 cell L<sup>-1</sup>). The highest concentrations of this dinoflagellate were observed from June to September. There was a positive correlation between cell densities and both temperature and salinity suggesting that organism is thermophilic. Temporary cysts were detected on macrophytes in many samples with a maximum concentration of 6300 cells g<sup>-1</sup> wet weight which suggest the key role of these cysts in forming and maintaining the bloom. The results showed that inorganic nitrogen sources (nitrite, ammonium and DIN) are negatively related to the *V. rugosum* abundance contrary to total nitrogen and total phosphorus and phosphates who are positively correlated. These results seemed confirm the osmotrophic behavior of *V. rugosum* . Our results highlighted the large distribution of this dinoflagellate in Ingril explaining the frequent observed contamination of the molluscs in this lagoon. *V. rugosum* is able to spread and colonize other connected economically important but environmentally similar lagoons as Thau.

**Keywords:** *Vulcanodinium rugosum*; neurotoxins, Ingril lagoon, environmental factors, spatio-temporal distribution

## 1. Introduction

Many dinoflagellate species are responsible of Harmful algal blooms (HABs) with negative impact on economic activity and human health (Smayda, 1997a). The monitoring network “REPHY” (French monitoring network on phytoplankton and phycotoxins) implemented in 1984 highlighted the increase in frequency of HABs and the spread of related species along French coasts. In French Mediterranean lagoons, many dinoflagellates are responsible for shellfish intoxications and farms closure. *Alexandrium catenella* producing paralytic shellfish toxins (PSTs), bloomed regularly in Thau lagoon since 1998 (Abadie, 1999b; Laabir et al., 2011; Laanaia et al., 2013) with high cell concentrations in the water column reaching  $14 \times 10^6$  cells/l in 2004. PSTs in Thau (up to 10 000 tons of molluscs produced each year) exceeded many times the sanitary threshold (800  $\mu\text{g}$  Eq STX / kg fresh mollusc meat) causing the closure of oysters farms with the subsequent economic damage (Laanaia et al., 2013). *Dinophysis acuminata* was also responsible of numerous events of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) contamination in Leucate Lagoon (REPHY monitoring program ; Laabir et al in preparation) but with very low cell densities in water column ( $2 \times 10^2$  to  $8.3 \times 10^3$  cell/L in 2013).

In 2007, an atypical toxicity in mice was detected in mussels collected in Ingril Lagoon. Mice death symptoms (mice bioassay ; Yasumoto 1984 analysis protocol)(Yasumoto et al., 1984) were very different compared to classic DSP symptoms related to lipophilic toxins (Okadaïc Acide, Dinophysis toxins, Azaspiracide, Yessotoxins...) and seemed to be a neurotoxic effect (Hess et al., 2013). This atypical toxicity was recurrent in this lagoon since 2007. In 2010 the French monitoring program (REPHY) according to the Union European regulation, changed the analysis protocol. The mouse bioassay has been replaced by a liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analytical method allowing the detailed measurement of lipophilic toxins in shellfish. This attested definitively that the common lipophilic toxins could not be incriminated. Hess (Hess et al., 2013) showed that this fast acting atypical toxicity corresponded to a toxic cyclic imine group, Pinnatoxins causing the observed mice symptoms in Ingril. Pinnatoxin, first isolated from *Pinna muricata* (Chou et al., 1996; Uemura et al., 1995) were described as potent shellfish poisons. In 2010, Nézan and Chomérat (Nézan & Chomérat, 2011) isolated in Ingril lagoon a dinoflagellate and identified this organism as a new species named *Vulcanodinium rugosum*. Smith (Smith et al., 2011) detected a new dinoflagellate, *V. rugosum* developing in Japanese waters and was shown to produce pinnatoxins. *V. rugosum* identified from Ingril Lagoon was shown to produce

Pinnatoxins (Abadie et al., 2015a; Hess et al., 2013) and thus responsible of the observed atypical toxicity in mice. Many studies clearly showed that *V. rugosum* was responsible of pinnatoxin accumulation in shellfish (Hess et al., 2013; Rhodes et al., 2011b; Zeng et al., 2012). *V. rugosum* was also observed in Mexican pacific waters (Hernandez-Becerril et al., 2013).

The development of HAB species and resulting blooms are controlled by complex biotic and abiotic factors. Among them, water temperature and salinity are believed to influence greatly the biology and physiology of dinoflagellates and thus their population dynamic. Growth of harmful algal species has been shown to be highly temperature dependant influencing the formation and decline of blooms (Laabir et al., 2011; Matsubara et al., 2007; Nagasoe et al., 2006; Yamaguchi & Honjo, 1989; Yamaguchi et al., 1991; Yamamoto et al., 2002). Temperature and salinity affect the dynamics of HABs by regulating the rate of dormant cells formation, their excystment and ability to inoculate the water column (Ishikawa et al., 2014; Moore et al., 2015; Ni Rathaille & Raine, 2011; Sildever et al., 2015; Triki et al., 2014), and growth of resulting vegetative cells (Laabir et al., 2011; Navarro et al., 2006).

Nutrients are among the most important factors controlling phytoplankton growth. Inorganic and organic nitrogen and phosphorus play a key role in the growth and development of HAB species. Eutrophication could be responsible for some HAB events (Anderson et al., 2002; Glibert et al., 2014; Glibert, 2005). Nutrient concentrations and ratios may influence cell growth as well as the toxicity of the blooming species. Most of ecophysiological and autoecological studies were performed on planktonic dinoflagellates as *Alexandrium* species whereas few studies were done on benthic dinoflagellates (Accoroni et al., 2015; Accoroni et al., 2011; Aissaoui et al., 2014; Almazan-Becerril et al., 2015; Cohu et al., 2013; Cohu et al., 2011; Selina et al., 2014). At our knowledge, no studies have been done on the effects of environmental factors on the occurrence of *V. rugosum* in natural environment. The aim of this study is to investigate *in situ* the effect of the main environmental factors (temperature, salinity, nutrients levels and macrophytes substrat) on the occurrence and densities of *V. rugosums*. Also, the spatio-temporal distribution of *V. rugosum* in Ingril lagoon was determined.

## 2. Materials and methods

### 2.1 Sampling area

Water samples and macrophytes were collected from Ingril lagoon (figure 1). Ingril is a french shallow mediterranean lagoon. This area has a surface of 685 hectares and communicates with the sea through Frontignan harbor, through a channel named Grau. A channel (Canal du Rhône à Sète) divides in two parts the lagoon: North Ingril and South Ingril. It's depth reaches a maximum of 1.7 m with a majority of sandy bottom. In Ingril, due to the shallow depth, temperature and salinity varied strongly during a same season and between the seasons. The dominant wind (N-NW) widely influence the variability of the water temperature. The temperature and the salinity (due the Mediterranean wind and rain pattern) ranged between 0 and 28.8 °C and 7.7 and 42.7, respectively (Rephy monitoring survey 2000-2013) (Figure 2 and 3).

### 2.2 Water samples

For this study, water samples were collected at 10 different stations situated in the north and the south of the lagoon (INST1 to INST10 - 8 stations in South Ingril and 2 stations in North Ingril ) during one year (march 2012 - march 2013). At each station, a water sample was taken using a submersible 12 v DC pump (Whale GP1352) at mid-depth during 3 to 5 mn. Before pumping, the pump was calibrated to calculate the exact water volume sampled. The water was collected in a bottle with two wall replaced by a 20 µm pore size net to concentrate the micro-phytoplankton fraction. The concentrate was stored in a 50 mL polypropylene tube with 100 µL of iodine solution. The observation of *Vulcanodinium rugosum* in samples were made with an Olympus IMT2 inverted microscope. The determination of *V.rugosum* concentration was performed according to the Utermöhl method (Utermöhl, 1931) with a 10 mL Hydrobios chamber. At each station, environmental parameters (temperature, salinity and oxygen) were measured with a WTW probe (LF197-S and OXI197-S).

### 2.2 Water samples for nutrients analysis

Ingril lagoon, like other Palavasien's lagoons is impacted by human activities and most of them are strongly eutrophicated (Réseau de Suivi Lagunaire du Languedoc-Roussillon. Bilan

des résultats 2013. (Derolez et al., 2014))(Bec et al., 2011; Souchu et al., 2010). For this study, two stations INST8 and INST10 (in each part of the lagoon) were sampled for nutrients analyses (total nitrogen TN, total phosphorus TP, phosphate PO<sub>4</sub>, nitrate NO<sub>3</sub>, nitrite NO<sub>2</sub> and ammonium NH<sub>4</sub>). Samples were stored at -20°C before analysis(Aminot, 2007).

### 2.3 Macrophytes samples for the determination of dinoflagellates concentration

Macrophytes were sampled at several stations in Ingril when the depth of the water column allowed their sampling. The macrophyte cover and the depth varied during the season. That the reason why it was not possible to sample at each date the macroalgae. When collected macrophytes were stored in a one litter plastic flask with the seawater from the sampled station in order to limit the loss of dinophycean cells. In the laboratory, cells of benthic dinoflagellates were separated from the macrophytes according to the protocol described by Blanfuné (Blanfuné et al., 2015). The final sample was fixed with formaldehyde (2% final concentration). The dinoflagellates were identified using an Olympus IMT2 inverted microscope and their densities determined using the Utermöhl method (Utermöhl, 1931) with a 10 mL Hydrobios chamber. Results are expressed in cell/g of fresh macroalgae (ww ie wet weight).

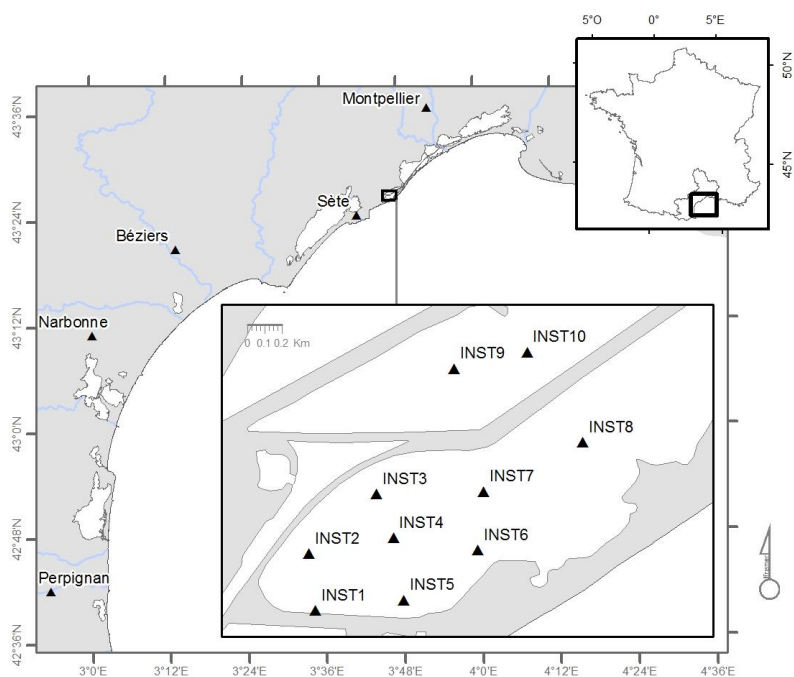


Figure 1 : Ingril Lagoon : map of the sampling points

## 2.4 Statistical analyses

SIGMAPLOT 12.5 was used for ANOVA and non parametrics tests (spearman correlation).

## 3. Results

### 3.1 Physico-chemical characteristics of the stations

In the stations studied in Ingril, temperature and salinity ranged from 4.7 °C to 29 °C and 13.5 to 42.5, respectively. No statistical differences were found between the stations for these two environmental parameters (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks  $p=0.995$  and  $p= 0.695$ ) (Figure 2). Oxygen varied from 16.6 % (saturation level, 1.15 mg/L in concentration) to 176 % (13.45 mg/L). Nutrients ( $\text{NO}_2$ ,  $\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_4$ ,  $\text{PO}_4$ , TN, TP) were analyzed only on two stations in each part of the lagoon due to the hydrologically homogeneous water conditions confirmed by the monitoring network RSL (Réseau de Suivi Lagunaire): INST8 (South Ingril) and INST10 (North Ingril). Using Spearman test, nutrients values from INST8 and INST10 were assigned to the other stations of the same part of the lagoon (INST8 for INST1 to INST7 and INST10 for INST9). It was not possible to highlight differences between nutrients concentrations from each part of the lagoon. The total Nitrogen (TN) concentrations varied from 17.21 to 42.45  $\mu\text{mol/L}$ . The total Phosphorus (TP) concentration range from 0.38 to 1.47  $\mu\text{mol/L}$ . The inorganic nitrogen sources  $\text{NO}_2$ ,  $\text{NO}_3$  and  $\text{NH}_4$ , varied from 0.02 to 0.53  $\mu\text{mol/L}$ , from 0.02 to 6.75  $\mu\text{mol/L}$  and from 0.07 to 4.96  $\mu\text{mol/L}$ , respectively. The phosphate ( $\text{PO}_4$ ) concentration ranged from 0.07 to 0.22  $\mu\text{mol/L}$ . During this study nitrogen and phosphorus sources showed relatively low values except for nitrate ( $\text{NO}_3$ ) and ammonium ( $\text{NH}_4$ ) for which the impact of two rainfall events were noted (23/11/2012 and 26/03/2013) with measured subsequent concentrations of 6.75 and 4.96  $\mu\text{mol/L}$  respectively ; the maximum values analyzed in this study (Figures 4 and 5).



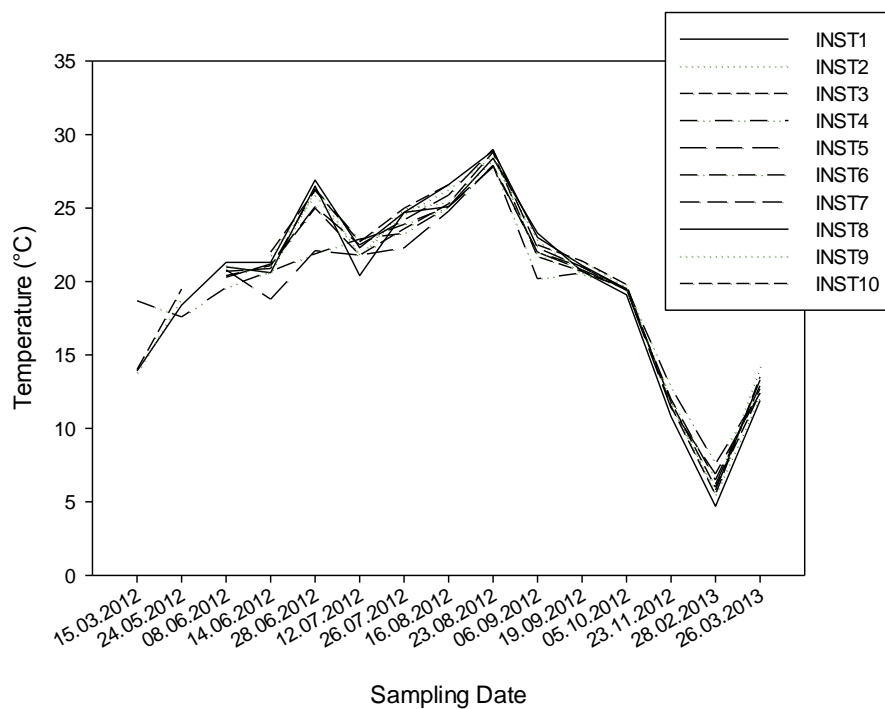


Figure 2 : Annual temperature variation in Ingril lagoon

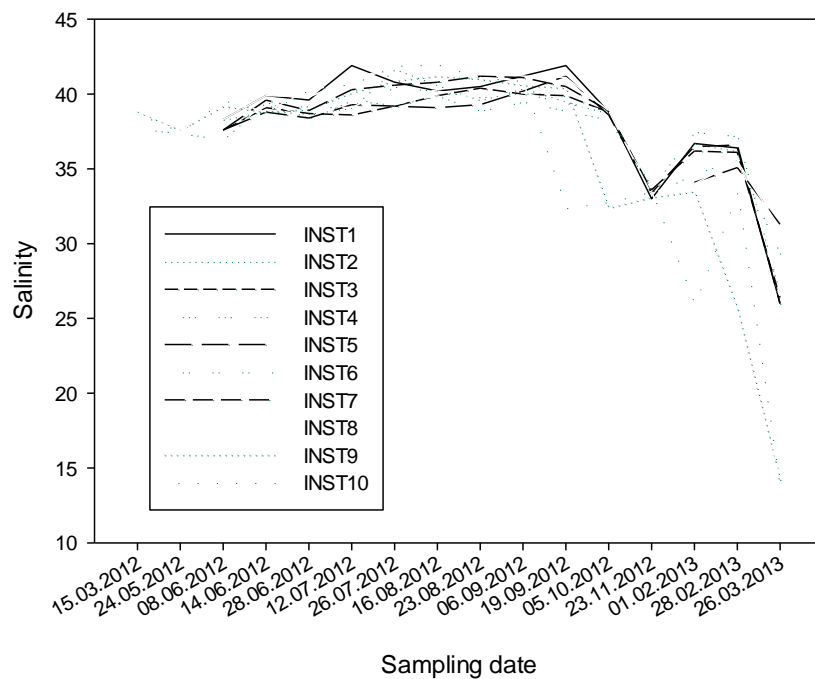


Figure 3. Annual salinity variation in Ingril lagoon

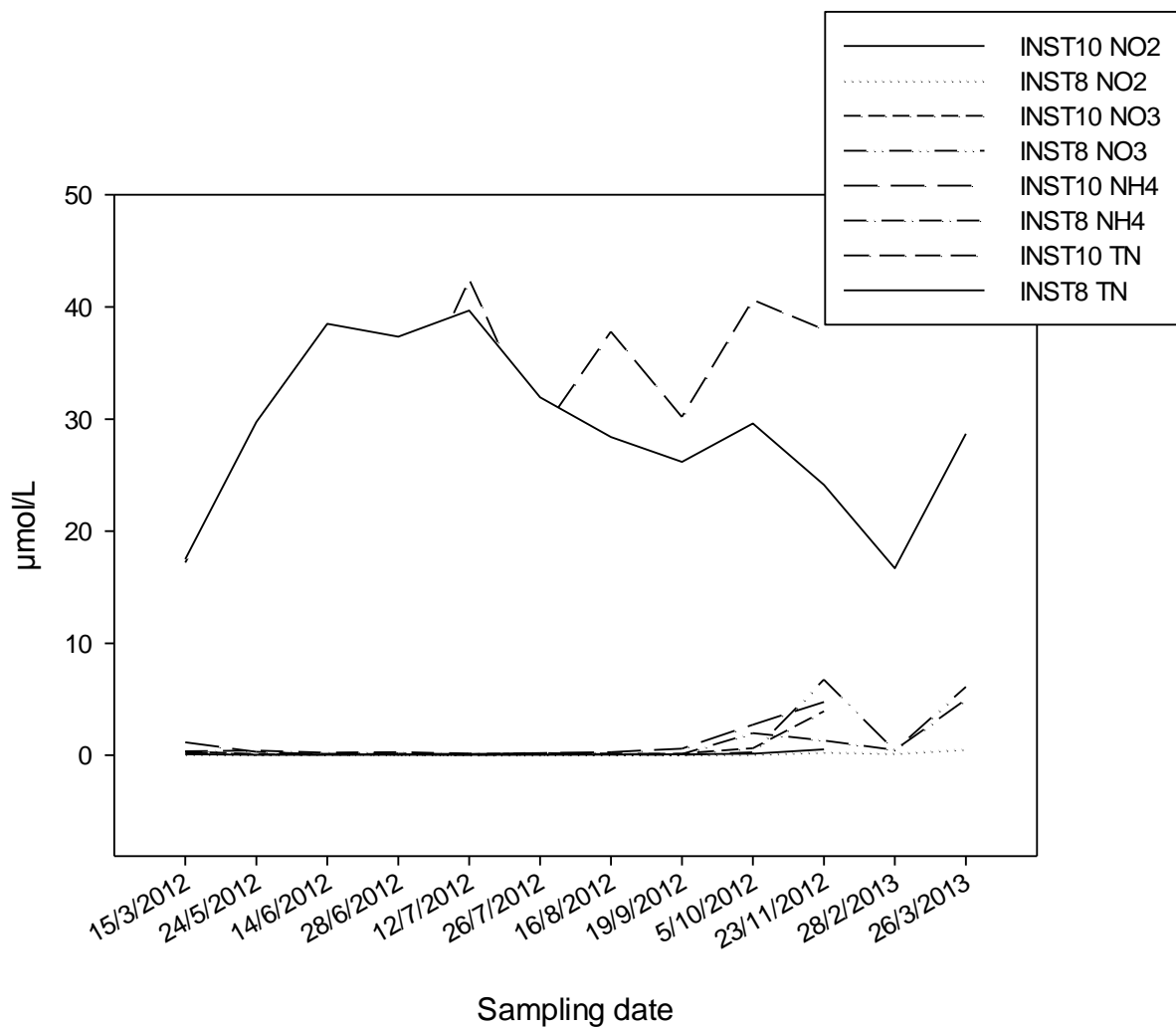


Figure 4. Temporal variations of TN NO<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>, NH<sub>4</sub>

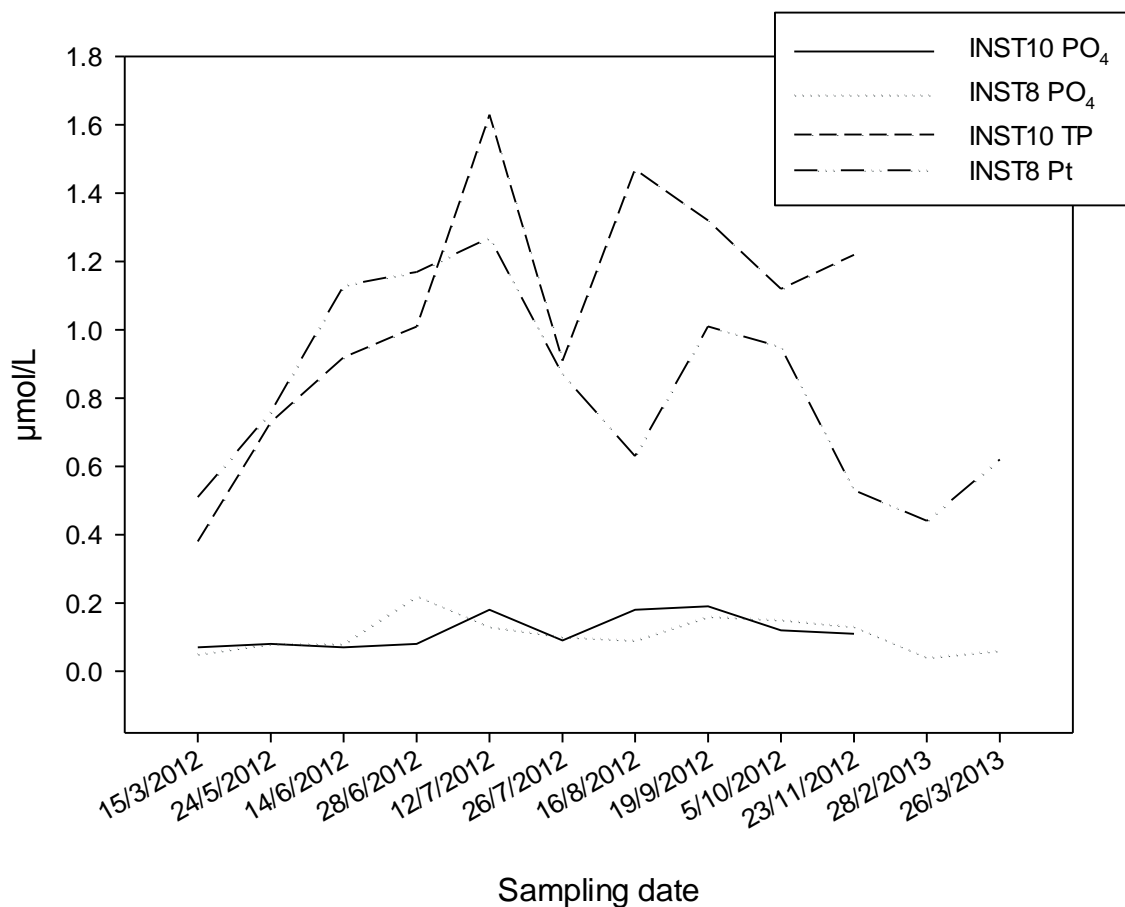


Figure 5. Temporal variations of TP, and PO<sub>4</sub>

### 3.2 Temporal and spatial variation in *Vulcanodinium rugosum* abundance

#### 3.2.1 *V. rugosum* abundance variations in water column

*V. rugosum* was detected in a very low concentration in March, April and May (from 3 to 25 cells/L) and in October and November (from 6 to 48 cells/L). Nevertheless this species was significantly observed, in water column, between June and September (Figure 6) with a maximum abundance at the station INST6 in July (995 cells/L).

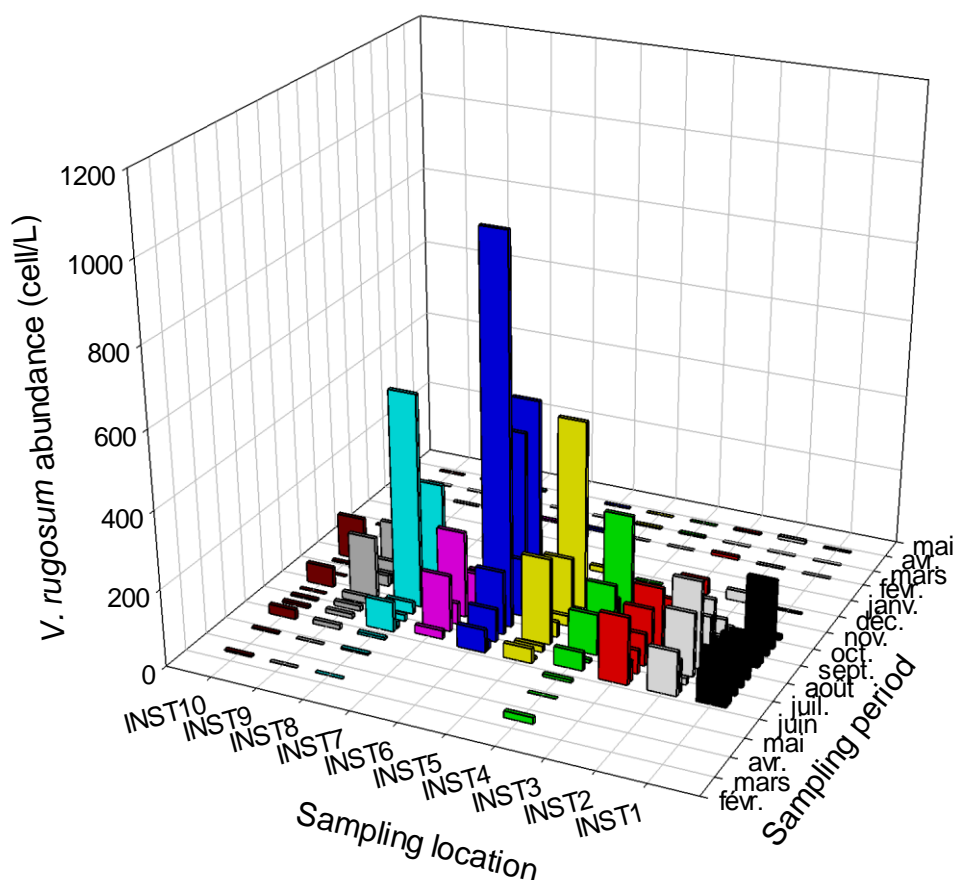


Figure 6 : Spatial distribution of *Vulcanodinium rugosum* in water column in Ingril lagoon

In spite of the absence of a significant statistical difference between the stations ( $p = 0.241$ ), *V. rugosum* abundance seemed to be higher at INST5 and INST6 and to a lesser extent, INST8 with a maximum abundance of 490, 995 and 557 cells/L, respectively. The two parts of the lagoon (North and South) were connected by a small channel through the “Canal du Rhône à Sète” channel. *V. rugosum* abundance in the north part of the lagoon was lower than that of the South part (6 times less when the maximum values were compared).

### 3.2.2 *V. rugosum* abundance variations on macrophyte

The abundance of *V. rugosum* cells on macroalgae (macrophyte) varied in relation with the station and the sampling period (Figure 7). The highest abundance of cells were observed

between June and August with a maximum of 6339 cells/g at INST1 in June 2012, 2654 cells/g at INST6 in July 2012 and 477 cells/g at INST9 and INST10 in august 2012.

The macrophyte species differed strongly between the sampling stations. 4 different species of macrophytes: Three macroalgae (*Chaetomorpha sp.*, *Ulva rigida* and *Gracilaria sp.*) and one magniophyte (*Zoostera noltii*) (Table 1) were sampled and identified (Lauret Michel, 2011). The highest concentrations of *V. rugosum* were observed on *Chaetomorpha sp.* (INST1, INST8 with 6339 and 4377 cells/g), on *Zoostera noltii* (INST6 with 2654 and 2174 cells/g) and on *Ulva rigida* (INST10 with 1026 cells/g).

Table 1 : Macrophyte species in relationship with sampling points and sampling dates. Chae: *Chaetomorpha*, Ulri: *Ulva rigida*, Zono: *Zoostera noltii*, Grac: *Gracilaria*,

	INST1	INST2	INST3	INST4	INST5	INST6	INST7	INST8	INST9	INST10
15/03/2012				Chae				Chae	Ulri	Ulri
26/04/2012				Chae				Chae		Ulri
24/05/2012				Chae				Chae	Ulri	Ulri
14/06/2012	Chae					Zono				Ulri
12/07/2012	Grac				Grac	Zono		Chae		Ulri
26/07/2012	Grac					Zono				Ulri
16/08/2012	Grac	Grac					Chae	Chae	Ulri	Ulri
19/09/2012				Chae		Zono				
05/10/2012	Grac					Zono				Ulri
23/11/2012	Grac									Ulri
01/02/2013		Chae				Zono				
28/02/2013						Zono			Ulri	
26/03/2013			Grac		Grac					Ulri

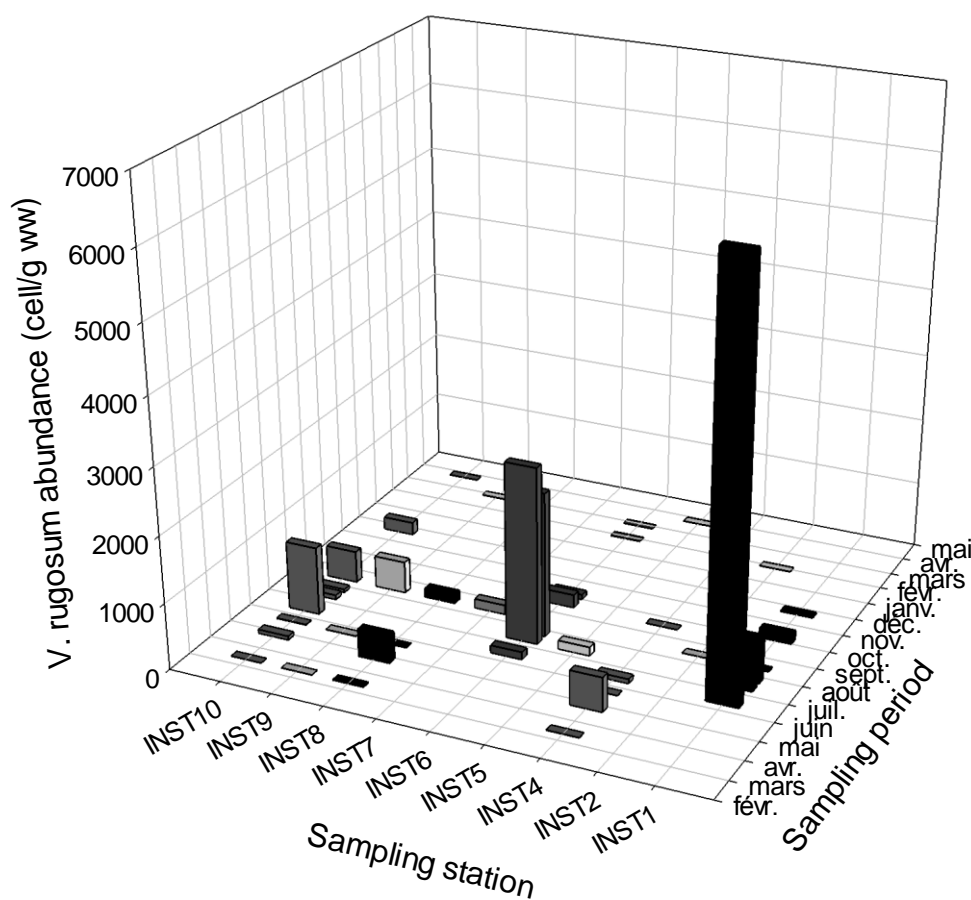


Figure 7: *Vulcanodinium rugosum* abundance on macrophytes in Ingril lagoon

### 3.3 Environmental factors in relation with *V. rugosum* abundance

#### 3.3.1 Influence of the temperature and the salinity

The spearman test confirmed the importance of the temperature controlling *V. rugosum* abundance (Table 2). The correlation coefficient  $r$  was highly significant for the abundance in water column than that for the macrophyte abundance ( $r = 0.658$  and  $0.460$  respectively and  $p < 0.01$ ). In the same way, data showed that salinity was positively correlate to *V. rugosum* abundance in the water column and cells settled on macrophytes ( $r = 0.526$  and  $0.595$  respectively and  $p < 0.01$ ). In the water column this dinoflagellate was observed since march with a temperature of  $14\text{ }^{\circ}\text{C}$  but in very low concentration (4 cells/L). *V. rugosum* higher than

50 cells/L were observed between 21 °C to 29 °C. The maximum concentration in water column was observed for a temperature of 23.9 °C and a salinity of 40.5. *V. rugosum* abundance on macrophytes was less correlated to temperature. This dinoflagellate was detected significantly from March 2012 to November 2012 for temperature between 11.5 °C to 26.6 °C and a salinity ranging between 32.4 to 41.9.

Table 2 : Spearman correlation coefficient between *V. rugosum* abundance in water column (cell/L) and on macrophyte (cell/g) and environmental factors, bold and underline when significant  $p < 0.01$  and only bold  $p < 0.05$

	Temp	Sal	NO <sub>2</sub>	NO <sub>3</sub>	NH <sub>4</sub>	DIN	PO <sub>4</sub>	TN	TP	N:P ratio
V.rug cell/L	<b><u>0.658</u></b>	<b><u>0.526</u></b>	<b><u>-0.691</u></b>	<b><u>-0.367</u></b>	<b><u>-0.453</u></b>	<b><u>-0.441</u></b>	<b><u>0.302</u></b>	<b><u>0.469</u></b>	<b><u>0.387</u></b>	-0.125
V.rug cell/g	<b><u>0.460</u></b>	<b><u>0.595</u></b>	<b><u>-0.369</u></b>	0.137	<b><u>-0.436</u></b>	<b><u>-0.372</u></b>	<b><u>0.378</u></b>	<b><u>0.464</u></b>	<b><u>0.515</u></b>	<b><u>-0.520</u></b>

### 3.3.2 Nutrients variations and *V. rugosum* dynamic

Data showed that nitrite (NO<sub>2</sub>), ammonium (NH<sub>4</sub>) and in a lesser extend nitrate (NO<sub>3</sub>) had a negative spearman correlation with the *V. rugosum* abundance in water column ( $r = -0.691$ ,  $-0.453$  and  $-0.367$ , respectively and  $p < 0.01$ ) (table 2). In the opposite this abundance was positively correlated with total Nitrogen (TN), total phosphorus (TP), organic nitrogen (estimated by TN minus DIN) and in a lesser extend with phosphate (PO<sub>4</sub>) ( $r = 0.469$ ,  $0.387$ ,  $0.593$  and  $0.302$  respectively with  $p < 0.01$ ). In the same way, the spearman test highlighted, a negative correlations for the abundance of this species on macrophyte, only for ammonium ( $r = -0.436$  and  $p < 0.01$ ), and a positive relation with TN, TP and organic nitrogen ( $r = 0.464$ ,  $0.515$  and  $0.472$  respectively with  $p < 0.01$ ). The ratio N:P (with N = TN and P= TP) was negatively correlated only with the abundance of *V. rugosum* on macrophyte ( $r = -0.520$  and  $p < 0.01$ ).

## 4. Discussion

Several studies showed that HAB species and their extension were related to human eutrophication of marine coastal areas (Burkholder et al., 2008; Smayda, 1997a). Many authors demonstrated that dinoflagellate species were affected by temperature and salinity conditions for their growth and spatial expansion. These main environmental factors impact many physiological processes of HAB species such as photosynthesis, toxin production and growth (Anderson et al., 2012b; Fu et al., 2008; Laabir et al., 2013a; Nagasoe et al., 2006; Pan et al., 1999; Xu et al., 2010). In this study we aimed to highlight the environmental factors which impact the *Vulcanodinium rugosum* abundance in Ingril lagoon.

### 4.1 Sampling location and period in relation with *V. rugosum* abundance

This study clearly showed that *V. rugosum* blooming period was related to a seasonal trend. This relation between season and proliferation of benthic dinoflagellates was described for a long time by many authors (Accoroni et al., 2012; Accoroni et al., 2015; Aissaoui et al., 2014; Chang et al., 2000; Cohu et al., 2011; Rhodes et al., 2000; Turki, 2005). In this study, *V. rugosum* abundance were related to spring, summer and beginning of autumn periods like other benthic species in Mediterranean coastal water in particular *Ostreopsis* (Accoroni et al., 2015; Blanfuné et al., 2015; Cohu et al., 2013). In a relative small area like Ingril lagoon, we showed a heterogeneity of *V. rugosum* abundance between sampling stations even if it was not statistically significant. These variations at a small scale were previously reported for *Ostreopsis ovata* by Cohu (Cohu et al., 2013; Cohu et al., 2011).

### 4.2 Impact of temperature and salinity on *V. rugosum* abundance

As other dinoflagellate, *V. rugosum* proliferation in the water column of Ingril lagoon was clearly related to the variation of the water temperature. In this study, in water column, the optimum growth range was estimated between 21 °C to 28 °C. These results for *V. rugosum* are in accordance with results described in laboratory by Abadie et al. (2015b). In the study, *V. rugosum* optimum temperature was 25 °C. In this study, the maximum temperature was observed for a temperature of 23.9 °C and a salinity of 40.5. In the laboratory study, *V.*



*rugosum* was able to grow between 20 °C and 30 °C. These results are consistent with those of prior retrospective studies. For the benthic species *Ostreopsis*, the favorable temperature range between 22 °C to 30 °C according to different studies in Mediterranean waters (Aligizaki & Nikolaidis, 2006; Coahu et al., 2013; Coahu et al., 2011; Mangialajo et al., 2008). But this relation seemed to be more complex, Vila (Vila et al., 2001a) described a bloom of *Ostreopsis* along the Costa Brava from a temperature of 18 °C. For another species, *Prorocentrum lima*, Assaoui (Aissaoui et al., 2014) showed an optimum temperature for this benthic dinoflagellate in the Gulf of Tunis, ranged from 23.1 °C to 30.2 °C. In the same way, Armi (Armi et al., 2010) described blooms of *Coolia monotis* for temperature higher than 22 °C. These results from prior studies and obtained in Ingril lagoon, confirm that temperature is one of the most important factor to explain the proliferation of benthic dinoflagellate in Mediterranean waters (Penna et al., 2006). In our study the spearman correlation coefficient showed clearly this relation ( $r = 0.658$  and  $p < 0.01$ ). As described by Rhodes (Rhodes et al., 2011b), the *V. rugosum* life cycle shows typical motile vegetative cells and unornamented non-motile cells. The motile cells (similar as a pelagic stage) are observed in the water column. Non motile cells are mainly founded on macrophyte. As it was observed for motile cells, the *V. rugosum* abundance on macrophyte was related to the temperature ( $r = 0.460$  and  $p < 0.01$ ). This relation was in accordance with previous studies cited above for others benthic species as *Ostreopsis*, *Prorocentrum lima* and *Coolia monotis* in mediterranean waters (Aissaoui et al., 2014; Aligizaki & Nikolaidis, 2006; Armi et al., 2010; Coahu et al., 2013; Coahu et al., 2011; Mangialajo et al., 2008) even if the temperature range for observed *V. rugosum* abundance on macrophyte was larger than that for the abundance in the water column (11.6 °C to 26.6 °C and 21 °C to 29 °C respectively). This difference between optimum ranges of temperature was previously showed by Vila (Vila et al., 2001a) for *Ostreopsis* in the Mediterranean Costa Brava waters (Spain) while others studies on *Ostreopsis* showed an optimum of temperature ranged between 22 °C and 30 °C (Aligizaki & Nikolaidis, 2006; Coahu et al., 2013; Coahu et al., 2011; Mangialajo et al., 2008).

In our study, it was demonstrated that salinity was also an important factor to explain *V. rugosum* abundance in water column and on macrophyte with a positive correlation. These results are in accordance with a laboratory study (Abadie in preparation) where a growth of *Vulcanodinium rugosum* was showed between a salinity varying from 20 to 40 with an optimum at 35. This study also showed that *V. rugosum* could grow at a low temperature (20 °C) with a small growth rate at only salinity ranged from 35 to 40. To our knowledge no data

are available on *V. rugosum* proliferation in natural sea waters. However, for others benthic species in Mediterranean waters, some studies showed values in the same ranges. Aissaoui (Aissaoui et al., 2014) observed a bloom of *Prorocentrum lima* in the Gulf of Tunis for a salinity between 36.1 and 40.3 with a positive correlation ( $r = 0.623$  and  $p < 0.05$ ). In the same way, Armi (Armi et al., 2010) founded that *Coolia monotis* could bloom for salinity higher than 38.6. On the contrary, Penna (Penna et al., 2006) demonstrated a negative correlation between harmful taxa density and salinity in Adriatic sea but the taxa observed were dinoflagellate pelagic species (lipophilic toxins and yessotoxins producer) or benthic diatoms (*Domoïc Acid producer*). The main characteristic of the French Mediterranean coastal lagoons, is the important seasonal variation of the salinity. In winter during rainy storms, the salinity can dip until values less than 20 and in summer the salinity often exceed the value 40 (REPHY monitoring network data). For *V. rugosum*, his capability to grow at high value of salinity could be an advantage on other harmful species.

#### 4.3 *V. rugosum* abundance related with nutrients

Ingril lagoon is a part of a set of 8 lagoons in the French Mediterranean coast named “Palavasiens” lagoons. These lagoons were strongly impacted until 2005 by the wastewater treatment plant of Montpellier (MAERA). The wastewater was rejected after treatment (- 80 % of phosphorus and - 70 % of total nitrogen) in the Lez river who was in connection with the lagoon by the channel “canal du Rhône à Sète”. After 2005, the wastewater was directly rejected in the Mediterranean Sea. Ingril lagoon was one of less impacted by the MAERA wastewater plant. From this date the monitoring network (Réseau de Suivi Lagunaire RSL) and in particular during a three year survey, showed low concentrations of NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>, DIN, TN, TP and N:P ratio (maximum concentration measured 0.15, 2.1, 3.67, 4.05, 51.57, 2.22 and 50.67 respectively). In comparison, for the other “Palavasiens” lagoons, for the same survey, founded an important range of values for nutrients. NO<sub>2</sub> varied from 0 to 3.37 µmol/L, NO<sub>3</sub> from 0 to 71.66 µmol/L, NH<sub>4</sub> from 0 to 21.62 µmol/L, DIN from 0.02 to 74.96 µmol/L, TN from 11.69 to 315.65 µmol/L, TP from 0.25 to 25.79 µmol/L and N:P ratio from 4.38 to 105.80. These results showed that Ingril lagoon is low eutrophicated and the N:P ratio highlight a phosphorus limitation rather than nitrogen limitation (RSL monitoring) contrary to the oligotrophic Mediterranean sea (Béthoux et al., 1998). In this study, the *V. rugosum* density in water column and on macrophyte was related positively to TN and to TP and

negatively to NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub> and DIN. These results are in accordance with a laboratory study. In fact Abadie et al. (2015a) showed that *V. rugosum* could grow in a medium with urea as only nitrogen source (no significant difference between growth rate with other nitrogen source : NO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>). Authors had supposed that this behavior may give to this dinoflagellate a competitive advantage *in situ*, since organic nutrients could represent a significant source of nitrogen (Burkholder et al., 2008). These results are in accordance with results of previous studies for others benthic species. Cohu (Cohu et al., 2013) showed a negative correlation between nitrate concentration and *Ostreopsis* abundance and a positive correlation with Phosphorus while others studies (Accoroni et al., 2015; Cohu et al., 2011) founded no correlation with nutrients for the same benthic species. For *Prorocentrum*, Aissaoui (Aissaoui et al., 2014) showed a negative correlation between *P. lima* density and NH<sub>4</sub> and N:P ration among other DIN while the author founded a positive correlation with *P. emarginatum* abundance and NO<sub>2</sub>. Armi (Armi et al., 2010) highlighted a positive correlation between the proliferation of *Coolia monotis* and NO<sub>3</sub>. These results suggest that benthic dinoflagellates depend on their habitats (eutrophicated or not enclosed areas like lagoons or oligotrophic sea waters). In mediterranean lagoons, the availability of phosphorus in water impact dinoflagellates bloom (Chikhaoui et al., 2008; Hadjadji et al., 2014; Sakka Hlaili et al., 2006). It is collectively described that lagoons sediments released phosphorus in summer due to frequent anoxic conditions (Gomez et al., 1999; Markou et al., 2007; Zaaboub et al., 2014) and therefore, it may promote dinoflagellate blooms.

#### 4.4 Substrate preference for *V. rugosum* on macrophyte

In our study, we founded significant *V. rugosum* abundance on three different macrophyte species (*Chaetomorpha*, *Zoostera noltii* and *Ulva rigida*). We identified and sampled four different species. The lack of significant abundance of *V. rugosum* on gracilaria is certainly linked to its spacial distribution that more of its type. However, many previous studies showed that benthic species and in particular for *Ostreopsis* the type of substrate (macrophyte species) was strongly related to dinoflagellate cells abundance (Aligizaki & Nikolaidis, 2006; Cohu et al., 2013; Mangialajo et al., 2008; Vila et al., 2001a). Unfortunately due to the small scale and the strong heterogeneity between sampled stations, we cannot conclude on an impact of substrate on the *V. rugosum* abundance in Ingril lagoon.

## 5. Conclusion

This study showed clearly that *V. rugosum* was spatially distributed in every sampling stations of Ingril lagoon with a higher abundance in the South of the lagoon (no significant statistically). Except for two station (INST3 and INST10) the *V. rugosum* abundance in water column was related to the period of sampling (June to September). Results highlighted the importance of temperature and salinity on the density of this dinoflagellate in this lagoon and explained the bloom period. The survey also showed that *V. rugosum* abundance is positively related to total nitrogen, total phosphorus and phosphate and negatively correlated with nitrite, nitrate, ammonium and DIN. However, this study didn't show any significant relation between epiphytic cells and substrate. In conclusion, this study allowed us to discriminate several active environmental factors on *V. rugosum* proliferation in this low, eutrophicated, Mediterranean lagoon. This study confirm that *V. rugosum* is a thermophilic and osmotrophic organism as shown in laboratory experiment.

Further studies should be carried out to investigate the occurrence of this neurotoxic dinoflagellate on others close Mediterranean lagoons like Thau lagoons where economic activities (tourism and oyster farming) could be negatively impact by the proliferation of *Vulcanodinium rugosum*.

- Abadie, E., Kaci, L., Berteaux, T., Hess, P., Sechet, V., Masseret, E., Rolland, J., Laabir, M., 2015a. Effect of Nitrate, Ammonium and Urea on Growth and Pinnatoxin G Production of *Vulcanodinium rugosum*. *Marine Drugs* 13(9), 5642.
- Abadie, E., Muguet, A., Berteaux, T., Chomérat, N., Hess, P., Roque D'OrbCastel, E., Masseret, E., Laabir, M., 2015b. Toxin and growth responses of *Vulcanodinium rugosum* to varying temperature and salinity conditions. *Journal of Plankton Research* Soumis le 23 novembre 2015.
- Abadie, E.B., C. ; Comps, MA. ; Elziere-Papayanni, P.; Lassus, P.; Le Bec, C.; Marcaillou-Le Baut, C.; Nezan, E.; Poggi, R., 1999. Contamination de l'étang de Thau par *Alexandrium tamarense*. Episode de novembre a decembre 1998.
- Accoroni, S., Colombo, F., Pichierri, S., Romagnoli, T., Marini, M., Battocchi, C., Penna, A., Totti, C., 2012. Ecology of *Ostreopsis cf. ovata* blooms in the northwestern Adriatic Sea. *Cryptogamie Algologie* 33(2), 191-198.
- Accoroni, S., Glibert, P.M., Pichierri, S., Romagnoli, T., Marini, M., Totti, C., 2015. A conceptual model of annual *Ostreopsis cf. ovata* blooms in the northern Adriatic Sea based on the synergic effects of hydrodynamics, temperature, and the N:P ratio of water column nutrients. *Harmful Algae* 45, 14-25.
- Accoroni, S., Romagnoli, T., Colombo, F., Pennesi, C., Di Camillo, C.G., Marini, M., Battocchi, C., Ciminiello, P., Dell'Acquasanto, C., Dello Iacovo, E., Fattorusso, E., Tartaglione, L., Penna, A., Totti, C., 2011. *Ostreopsis cf. ovata* bloom in the northern Adriatic Sea during summer 2009: Ecology, molecular characterization and toxin profile. *Marine Pollution Bulletin* 62(11), 2512-2519.
- Aissaoui, A., Armi, Z., Akrouf, F., Ben Hassine, O.K., 2014. Environmental Factors and Seasonal Dynamics of *Prorocentrum lima* Population in Coastal Waters of the Gulf of Tunis, South Mediterranean. *Water Environment Research* 86(12), 2256-2270.
- Aligizaki, K., Nikolaidis, G., 2006. The presence of the potentially toxic genera *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophyceae) in the north Aegean sea, Greece. *Harmful Algae* 5(6), 717-730.

- Almazan-Becerril, A., Escobar-Morales, S., Rosiles-Gonzalez, G., Valadez, F., 2015. Benthic-epiphytic dinoflagellates from the northern portion of the Mesoamerican Reef System. *Bot. Marina* 58(2), 115-128.
- Aminot, A.K., R., 2007. Dosage automatique des nutriments dans les eaux marines
- Anderson, D.M., Cembella, A.D., Hallegraeff, G.M., 2012. Progress in Understanding Harmful Algal Blooms: Paradigm Shifts and New Technologies for Research, Monitoring, and Management. *Annu. Rev. Mar. Sci.* 4, 143-176.
- Anderson, D.M., Glibert, P.M., Burkholder, J.M., 2002. Harmful algal blooms and eutrophication: Nutrient sources, composition, and consequences. *Estuaries* 25(4B), 704-726.
- Armi, Z., Turki, S., Trabelsi, E., Ben Maiz, N., 2010. First recorded proliferation of *Coolia monotis* (Meunier, 1919) in the North Lake of Tunis (Tunisia) correlation with environmental factors. *Environ Monit Assess* 164(1-4), 423-433.
- Bec, B., Collos, Y., Souchu, P., Vaquer, A., Lautier, J., Fiandrino, A., Benau, L., Orsoni, V., Laugier, T., 2011. Distribution of picophytoplankton and nanophytoplankton along an anthropogenic eutrophication gradient in French Mediterranean coastal lagoons. *Aquatic Microbial Ecology* 63(1), 29-45.
- Béthoux, J.P., Morin, P., Chaumery, C., Connan, O., Gentili, B., Ruiz-Pino, D., 1998. Nutrients in the Mediterranean Sea, mass balance and statistical analysis of concentrations with respect to environmental change. *Marine Chemistry* 63(1-2), 155-169.
- Blanfuné, A., Boudouresque, C., Gossel, H., Thibaut, T., 2015. Distribution and abundance of *Ostreopsis* spp. and associated species (Dinophyceae) in the northwestern Mediterranean: the region and the macroalgal substrate matter. *Environ Sci Pollut Res* 22(16), 12332-12346.
- Burkholder, J.M., Glibert, P.M., Skelton, H.M., 2008. Mixotrophy, a major mode of nutrition for harmful algal species in eutrophic waters. *Harmful Algae* 8(1), 77-93.

- Chang, F.H., Shimizu, Y., Hay, B., Stewart, R., Mackay, G., Tasker, R., 2000. Three recently recorded *Ostreopsis spp.* (Dinophyceae) in New Zealand: temporal and regional distribution in the upper North Island from 1995 to 1997. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 34(1), 29-39.
- Chikhaoui, M.A., Hlaili, A.S., Mabrouk, H.H., 2008. Réponses saisonnières du phytoplancton aux rapports d'enrichissements N:Si:P dans la lagune de Bizerte (Sud-Ouest de la Méditerranée). *Comptes Rendus Biologies* 331(5), 389-408.
- Chou, T., Haino, T., Kuramoto, M., Uemura, D., 1996. Isolation and structure of pinnatoxin D, a new shellfish poison from the Okinawan bivalve *Pinna muricata*. *Tetrahedron Letters* 37(23), 4027-4030.
- Cohu, S., Mangialajo, L., Thibaut, T., Blanfuné, A., Marro, S., Lemée, R., 2013. 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* 24, 32-44.
- Cohu, S., Thibaut, T., Mangialajo, L., Labat, J.-P., Passafiume, O., Blanfuné, A., Simon, N., Cottalorda, J.-M., Lemée, R., 2011. Occurrence of the toxic dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata* in relation with environmental factors in Monaco (NW Mediterranean). *Marine Pollution Bulletin* 62(12), 2681-2691.
- Derolez Valerie, F.A., Munaron Dominique, Ouisse Vincent, Oheix Jocelyne, Messiaen Gregory, Fortune Martine, Mortreux Serge, 2014. Réseau de Suivi Lagunaire du Languedoc-Roussillon. Bilan des résultats 2013. IFREMER.
- Fu, F.-X., Zhang, Y., Warner, M.E., Feng, Y., Sun, J., Hutchins, D.A., 2008. A comparison of future increased CO<sub>2</sub> and temperature effects on sympatric *Heterosigma akashiwo* and *Prorocentrum minimum*. *Harmful Algae* 7(1), 76-90.
- Glibert, P., M., Maranger, R., Sobota, D., J., Bouwman, L., 2014. The Haber Bosch–harmful algal bloom (HB–HAB) link. *Environmental Research Letters* 9(10), 105001.
- Glibert, P.A., DM ; Gentien, P; Granéli, E; Sellner, KG 2005. Global Complex Phenomena of Harmful algal Blooms. *Oceanography* 18, 136-147.

- Gomez, E., Durillon, C., Rofes, G., Picot, B., 1999. Phosphate adsorption and release from sediments of brackish lagoons: pH, O<sub>2</sub> and loading influence. *Water Research* 33(10), 2437-2447.
- Hadjadji, I., Frehi, H., Ayada, L., Abadie, E., Collos, Y., 2014. A comparative analysis of *Alexandrium catenella/tamarense* blooms in Annaba Bay (Algeria) and Thau lagoon (France); phosphorus limitation as a trigger. *Comptes Rendus Biologies* 337(2), 117-122.
- Hernandez-Becerril, D.U., Rodriguez-Palacio, M.C., Lozano-Ramirez, C., 2013. Morphology and life stages of the potentially pinnatoxin-producing thecate dinoflagellate *Vulcanodinium rugosum* from the tropical Mexican Pacific. *Bot. Marina* 56(5-6), 535-540.
- Hess, P., Abadie, E., Herve, F., Berteaux, T., Sechet, V., Araoz, R., Molgo, J., Zakarian, A., Sibat, M., Rundberget, T., Miles, C.O., Amzil, Z., 2013. Pinnatoxin G is responsible for atypical toxicity in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and clams (*Venerupis decussata*) from Ingril, a French Mediterranean lagoon. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 75.
- Ishikawa, A., Hattori, M., Ishii, K.-I., Kulis, D.M., Anderson, D.M., Imai, I., 2014. In situ dynamics of cyst and vegetative cell populations of the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* in Ago Bay, central Japan. *Journal of Plankton Research* 36(5), 1333-1343.
- Laabir, M., Collos, Y., Masseret, E., Grzebyk, D., Abadie, E., Savar, V.r., Sibat, M., Amzil, Z., 2013. Influence of Environmental Factors on the Paralytic Shellfish Toxin Content and Profile of *Alexandrium catenella* (*Dinophyceae*) Isolated from the Mediterranean Sea. *Marine Drugs* 11(5), 1583-1601.
- Laabir, M., Jauzein, C., Genovesi, B., Masseret, E., Grzebyk, D., Cecchi, P., Vaquer, A., Perrin, Y., Collos, Y., 2011. Influence of temperature, salinity and irradiance on the growth and cell yield of the harmful red tide dinoflagellate *Alexandrium catenella* colonizing Mediterranean waters. *Journal of Plankton Research* 33(10), 1550-1563.



- Laanaia, N., Vaquer, A., Fiandrino, A., Genovesi, B., Pastoureaud, A., Cecchi, P., Collos, Y., 2013. Wind and temperature controls on *Alexandrium* blooms (2000-2007) in Thau lagoon (Western Mediterranean). *Harmful Algae* 28, 31-36.
- Lauret Michel, O.J., Derolez Valerie, Laugier Thierry 2011. Guide de reconnaissance et de suivi des macrophytes des lagunes du Languedoc-Roussillon. Réseau de Suivi Lagunaire (Ifremer, Cépralmar, Agence de l'Eau RM&C, Région Languedoc-Roussillon). Ifremer.
- Mangialajo, L., Bertolotto, R., Cattaneo-Vietti, R., Chiantore, M., Grillo, C., Lemee, R., Melchiorre, N., Moretto, P., Povero, P., Ruggieri, N., 2008. The toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis ovata*: Quantification of proliferation along the coastline of Genoa, Italy. *Marine Pollution Bulletin* 56(6), 1209-1214.
- Markou, D.A., Sylaios, G.K., Tsihrintzis, V.A., Gikas, G.D., Haralambidou, K., 2007. Water quality of Vistonis Lagoon, Northern Greece: seasonal variation and impact of bottom sediments. *Desalination* 210(1-3), 83-97.
- Matsubara, T., Nagasoe, S., Yamasaki, Y., Shikata, T., Shimasaki, Y., Oshima, Y., Honjo, T., 2007. Effects of temperature, salinity, and irradiance on the growth of the dinoflagellate *Akashiwo sanguinea*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 342(2), 226-230.
- Moore, S.K., Bill, B.D., Hay, L.R., Emenegger, J., Eldred, K.C., Greengrove, C.L., Masura, J.E., Anderson, D.M., 2015. Factors regulating excystment of *Alexandrium* in Puget Sound, WA, USA, pp. 103-110.
- Nagasoe, S., Kim, D.-I., Shimasaki, Y., Oshima, Y., Yamaguchi, M., Honjo, T., 2006. Effects of temperature, salinity and irradiance on the growth of the red tide dinoflagellate *Gyrodinium instriatum* Freudenthal et Lee. *Harmful Algae* 5(1), 20-25.
- Navarro, J.M., Munoz, M.G., Contreras, A.M., 2006. Temperature as a factor regulating growth and toxin content in the dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Harmful Algae* 5(6), 762-769.

- Nézan, E., Chomérat, N., 2011. *Vulcanodinium rugosum* gen. nov., sp. nov. (Dinophyceae): a new marine dinoflagellate from the French Mediterranean coast. *Cryptogamie Algologie* 32(1), 3-18.
- Ni Rathaille, A., Raine, R., 2011. Seasonality in the excystment of *Alexandrium minutum* and *Alexandrium tamarense* in Irish coastal waters. *Harmful Algae* 10(6), 629-635.
- Pan, Y., Cembella, A.D., Quilliam, M.A., 1999. Cell cycle and toxin production in the benthic dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Marine Biology* 134(3), 541-549.
- Penna, A., Ingarao, C., Ercolessi, M., Rocchi, M., Penna, N., 2006. Potentially harmful microalgal distribution in an area of the NW Adriatic coastline: Sampling procedure and correlations with environmental factors. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 70(1-2), 307-316.
- Rhodes, L., Adamson, J., Suzuki, T., Briggs, L., Garthwaite, I., 2000. Toxic marine epiphytic dinoflagellates, *Ostreopsis siamensis* and *Coolia monotis* (Dinophyceae), in New Zealand. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 34(2), 371-383.
- Rhodes, L., Smith, K., Selwood, A., McNabb, P., Munday, R., Suda, S., Molenaar, S., Hallegraeff, G., 2011. Dinoflagellate *Vulcanodinium rugosum* identified as the causative organism of pinnatoxins in Australia, New Zealand and Japan. *Phycologia* 50(6), 624-628.
- Sakka Hlaili, A., Chikhaoui, M.A., El Grami, B., Hadj Mabrouk, H., 2006. Effects of N and P supply on phytoplankton in Bizerte Lagoon (western Mediterranean). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 333(1), 79-96.
- Selina, M.S., Morozova, T.V., Vyshkvartsev, D.I., Orlova, T.Y., 2014. Seasonal dynamics and spatial distribution of epiphytic dinoflagellates in Peter the Great Bay (Sea of Japan) with special emphasis on *Ostreopsis* species, pp. 1-10.
- Silvever, S., Andersen, T.r.J., Ribeiro, S., Ellegaard, M., 2015. Influence of surface salinity gradient on dinoflagellate cyst community structure, abundance and morphology in the Baltic Sea, Kattegat and Skagerrak, pp. 1-7.

- Smayda, T.J., 1997. Harmful Algal Blooms: Their Ecophysiology and General Relevance to Phytoplankton Blooms in the Sea. *Limnology and Oceanography* 42(5), 1137-1153.
- Smith, K.F., Rhodes, L.L., Suda, S., Selwood, A.I., 2011. A dinoflagellate producer of pinnatoxin G, isolated from sub-tropical Japanese waters. *Harmful Algae* 10(6), 702-705.
- Souchu, P., Bec, B., Smith, V.H., Laugier, T., Fiandrino, A., Benau, L., Orsoni, V., Collos, Y., Vaquer, A., 2010. Patterns in nutrient limitation and chlorophyll a along an anthropogenic eutrophication gradient in French Mediterranean coastal lagoons. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 67(4), 743-753.
- Triki, H.Z., Daly-Yahia, O.K., Malouche, D., Komaha, Y., Deidun, A., Brahim, M., Jaabir, M., 2014. Distribution of resting cysts of the potentially toxic dinoflagellate *Alexandrium pseudogonyaulax* in recently-deposited sediment within Bizerte Lagoon (Mediterranean coast, Tunisia), pp. 172-181.
- Turki, S., 2005. Distribution of toxic dinoflagellates along the leaves of seagrass *Posidonia oceanica* and *Cymodocea nodosa* from the Gulf of Tunis. *Cahiers De Biologie Marine* 46(1), 29-34.
- Uemura, D., Chou, T., Haino, T., Nagatsu, A., Fukuzawa, S., Zheng, S.Z., Chen, H.S., 1995. Pinnatoxin-A - A toxic amphoteric macrocycle from the Okinawan bivalve *Pinna muricata*. *Journal of the American Chemical Society* 117(3), 1155-1156.
- Utermöhl, H., 1931. Neue Wege in der quantitativen Erfassung des Planktons: (Mit besondere Berücksichtigung des Ultraplanktons). *Verh. Int. Ver. Theor. Angew. Limnol* 5, 567-595.
- Vila, M., Garcés, E., Maso, M., 2001. Potentially toxic epiphytic dinoflagellate assemblages on macroalgae in the NW Mediterranean. *Aquatic Microbial Ecology* 26(1), 51-60.
- Xu, N., Duan, S., Li, A., Zhang, C., Cai, Z., Hu, Z., 2010. Effects of temperature, salinity and irradiance on the growth of the harmful dinoflagellate *Prorocentrum donghaiense* Lu. *Harmful Algae* 9(1), 13-17.

- Yamaguchi, M., Honjo, T., 1989. Effects of temperature, salinity and irradiance on the growth of the noxious red tide flagellate *Gymnodinium nagasakiense* (Dinophyceae). *Nippon Suisan Gakkaishi* 55(11), 2029-2036.
- Yamaguchi, M., Imai, I., Honjo, T., 1991. Effects of temperature, salinity and irradiance on the growth-rates of the noxious red tide flagellates *Chattonella antiqua* and *C.marina* (Raphidophyceae). *Nippon Suisan Gakkaishi* 57(7), 1277-1284.
- Yamamoto, T., Oh, S.J., Kataoka, Y., 2002. Effects of temperature, salinity and irradiance on the growth of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) isolated from Hiroshima Bay, Japan. *Fish. Sci.* 68(2), 356-363.
- Yasumoto, T., Murata, M., Oshima, Y., Matsumoto, G.K., Clardy, J., 1984. Diarrhetic Shellfish Poisoning. *Acs Symposium Series* 262, 207-214.
- Zaaboub, N., Ounis, A., Helali, M.A., Béjaoui, B., Lillebø, A.I., Silva, E.F.d., Aleya, L., 2014. Phosphorus speciation in sediments and assessment of nutrient exchange at the water-sediment interface in a Mediterranean lagoon: Implications for management and restoration. *Ecological Engineering* 73, 115-125.
- Zeng, N., Gu, H., Smith, K.F., Rhodes, L.L., Selwood, A.I., Yang, W., 2012. The first report of *Vulcanodinium rugosum* (Dinophyceae) from the South China Sea with a focus on the life cycle. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 46(4), 511-521.

## Chapitre IV : Toxicité atypique due à la Pinnatoxine G (PnTX-G) produite par *Vulcanodinium rugosum*. Evaluation d'une méthode d'échantillonnage passif des des toxines lipophiles et des PnTX-G présentes dans la colonne d'eau

### 1. Contexte et objectifs de l'étude

Les Pinnatoxines ont d'abord été isolées à partir d'un extrait de coquillages de l'espèce *Pinna attenuata* Reeve, prélevé sur le site de Guangdong en Chine (Zheng et al., 1990) sans pour autant que sa structure puisse être décrite. Par la suite, c'est sur le site de l'île d'Okinawa au Japon, que les Pinnatoxines ont été pour la première fois décrites à partir d'un extrait de coquillages appartenant à l'espèce *Pinna muricata* (Chou et al., 1996; Uemura et al., 1995). Les pinnatoxines sont très toxiques pour les souris puisqu'elles peuvent entraîner, à des faibles doses (de l'ordre de quelques  $\mu\text{g}$  de PnTX) (Selwood et al., 2010), des symptômes neurologiques suivis d'une mort rapide (temps de survie inférieur à 20 min). L'organisme producteur des pinnatoxines est resté longtemps inconnu jusqu'à la découverte récente de la toxicité associée à *Vulcanodinium rugosum*, isolé dans les eaux de de la Nouvelle-Zélande (Rhodes et al., 2011a). En France, la mise en évidence des pinnatoxines en 2010 puis de *V. rugosum* (Nézan & Chomérat, 2011) a permis d'expliquer rétrospectivement les cas de toxicités atypiques, observés depuis 2006 chez des moules et des palourdes récoltées dans la lagune d'Ingril. Il s'agit donc de risques supplémentaires et nouveaux d'intoxication pour les consommateurs de coquillages en France qui peuvent être également un frein à l'exportation. Le premier objectif de ce travail a été de mesurer les concentrations de Pinnatoxines G et A présentes dans la chair de trois mollusques filtreurs de grande importance économique pour la région, la moule *Mytilus galloprovincialis*, l'huître *Crassostrea gigas* et la palourde *Venerupis decussata* récoltées dans la lagune méditerranéenne de l'Ingril. Pour répondre à cet objectif, une méthode d'analyse en tandem par chromatographie et spectrométrie de masse particulièrement sensible a été mise au point afin de mettre en évidence les différents niveaux de contamination de ces mollusques. Le deuxième objectif a été de mettre en évidence la production de pinnatoxines par le dinoflagellé *V. rugosum* se développant dans la lagune de

l'Ingril, dont les cellules sont ingérées par les mollusques filtreurs qui alors bioaccumulent les toxines algales.

Par ailleurs, les biotoxines marines représentent un problème important mondialement partagé. Ces composés impactent régulièrement et fortement la conchyliculture et la pisciculture. De nombreux pays ont mis en place des réseaux de surveillance du phytoplancton et des phycotoxines. Cependant ces réseaux traditionnels, même s'ils ont prouvé leur efficacité, ne représentent qu'une vision instantanée d'un bloom (1 point à 1 moment précis) (Lane et al., 2010) et ces systèmes ne prennent pas en compte les organismes trop petits ( $< 20 \mu\text{m}$ ) ni les espèces épi-benthiques. Pour ces raisons, les échantillonneurs passifs (SPATT : Solid Phase Adsorption Toxin Tracking) ont été développés et testés pour accumuler les biotoxines libérées dans l'eau de mer par les microalgues toxiques lors des blooms (MacKenzie et al., 2004). Ces systèmes présentent l'avantage de fixer les toxines sans les transformer (ce qui est souvent le cas pour les coquillages qui bio-transforment les toxines) et donc facilite leur identification ainsi que l'organisme producteur en fonction de ce profil de toxines. Ces SPATTs sont généralement constitués d'un support (sac, ...) permettant de maintenir la résine adsorbante. Ces résines sont choisies en fonction de leur structure et donc de leur affinité supposée envers ces biotoxines. Une fois les SPATTs récupérés, les toxines sont séparées de la résine grâce à des éluants adaptés aux biotoxines recherchées (d'où la nécessité de phase de test). Cependant, il apparut intéressant d'approfondir ces résultats en employant d'autres phases, utilisées actuellement plus particulièrement pour la recherche de contaminants chimiques tels que les pesticides ou les produits pharmaceutiques, notamment par le biais des échantillonneurs de type POCIS (Mackenzie, 2010). Cette approche devrait permettre d'accumuler les toxines présentes dans l'eau de mer à de faibles concentrations et d'envisager leur quantification, ce qui est actuellement impossible directement étant donné leur faible concentration dans la colonne d'eau. Une fois validées en laboratoire (type de résine, taux de récupération, choix du meilleur éluant), les techniques d'échantillonnage passif ont été appliquées *in situ* (Ingril) pendant deux années consécutives afin de suivre la présence ou non d'une contamination et son évolution. Ainsi, nous avons examiné si cette technique d'échantillonneurs passifs présentait un intérêt pour la surveillance des eaux lagunaires, notamment dans les zones conchylicoles. Plus particulièrement, cette approche devrait permettre une détection rapide des toxines produites par des algues benthiques ou épiphytes dans la colonne d'eau car l'observation de ces algues demeure délicate.

## 2. Résumé des articles.....

### 2.1 La pinnatoxine G responsable de toxicité atypique dans la moule *Mytilus galloprovincialis*, l'huitre *Crassostrea gigas* et la palourde *Venerupis decussata* de la lagune méditerranéenne de l'Ingril.

**Résumé.** Lors de l'analyse sanitaire par bio-essais de coquillages prélevés dans la lagune de l'Ingril, des mortalités atypiques de souris ne pouvant être causées par les toxines lipophiles connues ont été constatées. Notre travail a montré que la Pinnatoxine G (PnTX-G) était à l'origine de ces mortalités. Les analyses par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) de la chair de moules de l'Ingril collectées entre 2009 et 2012 ont indiqué que la PnTX-G était présente en quantité suffisante pour expliquer les mortalités atypiques observées. Les niveaux de PnTX-G dépassaient  $40 \mu\text{g kg}^{-1}$  dans la chair totale avec un maximum de  $1200 \mu\text{g kg}^{-1}$  en septembre 2010. Ces concentrations étaient très supérieures à celles mesurées dans 10 autres sites qui présentaient des concentrations inférieures à  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Les moules étaient plus contaminées que les palourdes, ce qui a confirmé que la moule était une espèce sentinelle de choix et adaptée pour la surveillance des pinnatoxines. Les profils toxiques ont indiqué que la concentration en pinnatoxine A dans les moules était inférieure de 2% à celle de la PnTX-G et que les pteriatoxines étaient présentes à des concentrations inférieures au seuil de sensibilité. L'activité de la pinnatoxine G naturelle a été comparée au standard de pinnatoxine G en utilisant la technique développée par Aráoz et al (2012) sur microplaque en se basant sur le mode d'action agoniste / antagoniste sur le récepteur nicotinique de l'acétylcholine. Les résultats montrent que la PnTX-G naturelle avait une activité similaire que celle de la PnTX-G de synthèse. L'analyse des cellules d'une culture monoclonale de *V. rugosum* (IFR-VRU-01) isolée de l'Ingril confirme que cette algue produit de la PnTX-G ( $4.7 \text{ pg cell}^{-1}$ ). L'absence de cette microalgue dans la colonne d'eau durant une période importante de la contamination des mollusques et la dominance de stades non mobiles du cycle de vie de *V. rugosum* suggèrent la nécessité de la mise en place d'études sur l'écologie de ce dinoflagellé et sur la cinétique d'accumulation des pinnatoxines dans les mollusques.

Mots clés: *Vulcanodinium rugosum*, Imines cycliques, toxines, mollusques, accumulation, LC-MS/MS, mortalité atypique

## 2.2. Evaluation des résines polymériques et lipophiliques pour l'échantillonnage passif des toxines marines

Les biotoxines marines sont des métabolites qui s'accumulent dans la chair des poissons et des mollusques et qui les rendent impropres à la consommation. Ces toxines libérées dans l'eau de mer durant les blooms de microalgues notamment par la lyse des cellules phytoplanctoniques, peuvent être suivies par un système d'échantillonnage passif. L'efficacité des solvants suivants, l'acétone, le méthanol et l'isopropanol a été évaluée pour tester leur capacité à extraire les toxines de la biomasse algale. L'isopropanol a été choisi pour mener des expériences complémentaires en raison de meilleurs rendements. La comparaison des résines Oasis HLB, Strata-X, BondElut C18 et HP-20 en mode SPE (Solid Phase Extraction) c'est-à-dire de conditionner ces résines (phase stationnaire) dans un contenant de type seringue, nous a conduit à choisir les résines Oasis HLB, HP-20 et Strata-X. Les propriétés de ces résines polymériques (cf. table 1 article) sont variables et auront des interactions plus ou moins fortes avec les toxines en fonction de leur structure, de leur surface ( $m^2/g$  résine), du diamètre moyen des pores et de la taille des particules qui la compose. Ces trois résines ont été exposées individuellement dans des échantillonneurs passifs durant 24h dans de l'eau de mer à laquelle on rajoute des extraits de microalgues contenant des concentrations connues d'acide okadaic (OA), azaspiracides (AZAs), pinnatoxine-G (PnTX-G), 13-desmethyl spirolide-C (SPX1) et des palytoxines (PITXs). Des rubans de polyéthylène faible densité (LDPE) et de silicone (PDMS) ont été testés en parallèle sur des mixtures similaires d'eau de mer naturelle durant 24h avec des extraits de culture de microalgues. Des cultures d'*Ostreopsis ovata*, *Prorocentrum lima*, *Vulcanodinium rugosum*, *Azadinium spinosum* et *Alexandrium ostenfeldii* (cf. materials and methods) ont permis d'obtenir des toxines purifiées par extraction avec différents solvants (pour tester le plus performant) et dont la concentration est fonction de la masse d'extrait algale. Les performances des rubans pour la captation des toxines ont été inférieures à celles des résines polymériques. Indépendamment du groupe de toxines, le taux d'adsorption des toxines sur HP-20 a été plus bas que d'autres résines Oasis HLB et Strata-X. Cependant les résines HP-20 et Strata-X ont présenté des niveaux d'adsorption plus importants après 24h d'exposition. Indépendamment des résines testées, l'adsorption a été généralement plus grande pour les imines cycliques et le groupe d'OA, un peu moins grande pour les AZAs et faible pour les PITXs. Les essais avec les moules placés dans des bacs avec une recirculation d'eau de mer et exposés à *Vulcanodinium rugosum* ou *Prorocentrum lima* ont permis d'évaluer parallèlement l'accumulation des toxines par cette



espèce sentinelle afin de comparer la bioaccumulation par des animaux et l'adsorption des toxines par les échantillonneurs passifs. Dans ces expériences avec ces différentes résines placées dans un support identique, on observe que la résine Strata-X accumule les toxines plus vite et à des niveaux supérieurs comparativement aux résines Oasis HLB et HP-20. Le déploiement de ces résines dans l'Ingril pour détecter la PnTX-G dans la colonne d'eau a montré une accumulation importante sur la résine HP-20 et la résine Oasis HLB en comparaison à la résine Strata-X. Ces résines, utilisées communément pour mettre en évidence les contaminants polyhalogénés, d'origine pharmaceutique, phytochimique et les résidus de médicaments vétérinaires, ont été pour la première fois utilisées à des fins de recherche de toxines algales dans de l'eau de mer. Notre étude a démontré que ces résines polymériques telles que l'Oasis HLB et la Strata-X étaient capables d'adsorber ces toxines naturelles dans des études de laboratoire et *in situ*.

Mots clés: Toxines marines Echantillonneur passif, SPATT, résines polymériques

3. Article : Pinnatoxin G is responsible for atypical toxicity in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and clams (*Venerupis decussata*) from Ingril, a French Mediterranean lagoon

## **Pinnatoxin G is responsible for atypical toxicity in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and clams (*Venerupis decussata*) from Ingril, a French Mediterranean lagoon**

Philipp Hess<sup>1\*</sup>, Eric Abadie<sup>2</sup>, Fabienne Hervé<sup>1</sup>, Tom Berteaux<sup>2</sup>, Véronique Séchet<sup>1</sup>, Romulo Aráoz<sup>3</sup>, Jordi Molgó<sup>3</sup>, Armen Zakarian<sup>4</sup>, Manoëlla Sibat<sup>1</sup>, Thomas Rundberget<sup>5</sup>, Christopher O. Miles<sup>5</sup>, Zouher Amzil<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ifremer, Laboratoire Phycotoxines, Centre Atlantique, 44311 Nantes Cedex, France

<sup>2</sup> Ifremer, Laboratoire Environnement Ressources – Languedoc Roussillon, 34203 Sète, France

<sup>3</sup> CNRS, Laboratoire Neurobiologie et Développement, UPR 3294, 91198 Gif-sur-Yvette, France

<sup>4</sup> Department of Chemistry and Biochemistry, University of California, Santa Barbara, California 93106-9510, United States

<sup>5</sup> Norwegian Veterinary Institute, P. O. Box 750 Sentrum, 0106 Oslo, Norway

\*corresponding author's email: [philipp.hess@ifremer.fr](mailto:philipp.hess@ifremer.fr)

**ABSTRACT :** Following a review of official control data on shellfish in France, Ingril Lagoon had been identified as a site where positive mouse bioassays for lipophilic toxins had been repeatedly observed. These unexplained mouse bioassays, also called atypical toxicity, coincided with an absence of regulated toxins and rapid death times in mice observed in the assay. The present study describes pinnatoxin G as the main compound responsible for the toxicity observed using the mouse bioassay for lipophilic toxins. Using a well-characterised standard for pinnatoxin G, LC-MS/MS analysis of mussel samples collected from 2009 to 2012 revealed regular occurrences of pinnatoxin G at levels sufficient to account for the toxicity in the mouse bioassays. Baseline levels of pinnatoxin G from May to October usually exceeded  $40 \mu\text{g kg}^{-1}$  in whole flesh, with a maximum in September 2010 of around  $1200 \mu\text{g kg}^{-1}$ . These concentrations were much greater than those at the other 10 sites selected for vigilance testing, where concentrations did not exceed  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$  in a 3-month survey from April to July 2010, and where rapid mouse deaths were not typically observed. Mussels were always more contaminated than clams, confirming that mussel is a good sentinel species for pinnatoxins. Profiles in mussels and clams were similar, with the concentration of pinnatoxin A less than 2% that of pinnatoxin G, and pteriatoxins were only present in non-quantifiable traces. Esters of pinnatoxin G could not be detected by analysis of extracts before and after alkaline hydrolysis. Analysis with a receptor-binding assay showed that natural pinnatoxin G was similarly active on the nicotinic acetylcholine receptor as chemically synthesized pinnatoxin G. Culture of *Vulcanodinium rugosum*, previously isolated from Ingril lagoon, confirmed that this alga is a pinnatoxin G producer ( $4.7 \text{ pg cell}^{-1}$ ). Absence of this organism from the water column during prolonged periods of shellfish contamination and the dominance of non-motile life stages of *V. rugosum* both suggest that further studies will be required to fully describe the ecology of this organism and the accumulation of pinnatoxins in shellfish.

**Keywords:** Cyclic imines, shellfish toxin, accumulation, liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), unexplained mouse toxicity

## 1. Introduction

Pinnatoxins (PnTXs) had initially been isolated from *Pinna muricata* collected in Japan (Chou et al., 1996a; Chou et al., 1996b; Takada et al., 2001a; Uemura et al., 1995), the same genus of mollusc associated in the early 1990s with a *Pinna attenuata* poisoning in China. Metabolism pathways were subsequently postulated by Selwood et al. (2010) to explain biotransformation of the algal metabolites PnTXs E, F and G into shellfish metabolites PnTXs A, B, C and D and pteriatoxins A, B and C, initially reported by Hao et al. (2006) and Takada et al. (2001b). The biological source of pinnatoxins had been unknown until a PnTX-producing dinoflagellate was discovered in New Zealand in 2010 (Rhodes et al., 2010). Subsequently, this organism was taxonomically identified as a previously undescribed dinoflagellate, *Vulcanodinium rugosum* (Nézan and Chomérat, 2011). A strain of this species was also recently isolated from Japanese (Smith et al., 2011) and from Chinese waters (Zeng et al., 2012).

In addition to the abovementioned reports on PnTXs from South East Asia, Australia and New Zealand, PnTXs have recently also been reported from Europe, specifically Norway (Miles et al., 2010; Rundberget et al., 2011), and from North America (McCarron et al., 2012). PnTXs can thus be considered to be fairly widespread. Maximum concentrations so far have been reported to be below 110  $\mu\text{g kg}^{-1}$  whole shellfish flesh in Canada (McCarron et al., 2012), below 120  $\mu\text{g kg}^{-1}$  in Norway (Rundberget et al., 2011) and below 200  $\mu\text{g kg}^{-1}$  in New Zealand (McNabb et al., 2012). These low levels appear very much in line with those typically found for spirolides: a relatively extensive data set with 1801 shellfish samples from France, Italy and the Netherlands showed a 95<sup>th</sup> percentile of 8.9  $\mu\text{g kg}^{-1}$  and a maximum of 105  $\mu\text{g kg}^{-1}$  for the sum of total spirolides over the 7-year period from 2002 to 2008 (EFSA, 2010).

Pinnatoxins exhibit fast-acting toxicity when injected intraperitoneally into mice (Munday et al., 2012), like many other toxins from the cyclic imine group of compounds (EFSA, 2010; Munday, 2008). The high intrinsic toxicity of pinnatoxins is indicated by low LD<sub>50</sub>s *i.p.* in mice, namely 57, 13 and 48  $\mu\text{g kg}^{-1}$  bodyweight for PnTXs-E, -F and -G, respectively (Munday et al., 2012). In addition, the uptake from the gastro-intestinal tract has also been shown in mice, both for voluntary feeding and classical gavage exposure routes (Munday et

al., 2012). These authors also report that there is only a comparatively small differential between the *i.p.* and the *per os* routes of exposure, i.e. a factor of about 3 for PnTX-G, and hence the toxic potential of PnTX may constitute a risk to consumers of contaminated shellfish.

Only one poisoning event had ever been linked to the bivalve genus *Pinna* (Zheng et al. (1990) cited in Selwood et al. (2010)). Even so, the putative initial poisoning event in China may well not have been caused by pinnatoxins, as the presence of this toxin group was not demonstrated in this first event, and potential contamination with pathogenic vibrio had also been reported from that area. No acute poisoning events have been reported in direct relation to contamination with PnTXs before or since their chemical characterisation in 1995. Possible confusion may arise from the fact that PnTX-G, one of the main algal metabolites, has the same chemical sum formula ( $C_{42}H_{63}NO_7$ ) as spirolide B and 13-desmethyl-spirolide D (Figure 1), two other representatives from the cyclic imines group of fast acting toxins. Even though spirolides are produced by a different genus of dinoflagellate, i.e. *Alexandrium ostenfeldii* (Cembella et al., 1999) and *Alexandrium peruvianum* (Borkman et al., 2012; Touzet et al., 2008), they accumulate in shellfish and due to the absence of sufficient reference calibration standards may thus have been confounded with PnTX-G. However, no acute poisonings have been associated with this toxin group either. Unlike spirolides, PnTXs are chemically rather stable compounds: they resist alkaline hydrolysis in aqueous methanol, at 76°C for 40 min (Rundberget et al., 2011) and aqueous HCl (pH 1.5) at 40°C for 24 h (Jackson et al., 2012). Due to this unusual stability, and their high oral toxicity, PnTXs may be a significant threat to shellfish consumers.

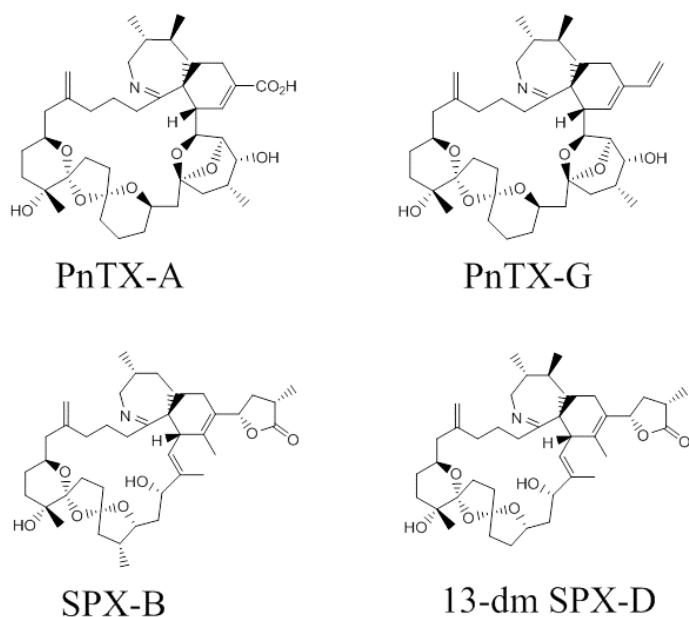


Figure 1. Structures of Pinnatoxin A (PnTXA) and G (PnTX-G), Spirolide-B and 13-desmethyl Spirolide-D (13-dm SPX-D). PnTX-G, SPX-B and 13-dm SPX-D all three have the same sum formula ( $C_{42}H_{63}NO_7$ ) and consequently the same accurate mass (693.46045 Da), even though pinnatoxins are produced by *Vulcanodinium rugosum* and spirolides are produced by *Alexandrium ostenfeldii*. Both compound groups possess several molecular features in common: a cyclic imine, a tri-spiro ring assembly and a macrocycle. Pinnatoxin-G differs from spirolides in particular through the heptacyclic ether with an addition ether-bridge.

Unfortunately, there is a general lack of information on occurrence for a large number of toxin groups on one hand, and epidemiological information on the other. The lack of information on toxin occurrence has been to some extent overcome by the use of the lipophilic mouse bioassay, also leading to criticism of this test, suggesting its potential for “false” positives. Several comparisons of chemical analyses using liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS) or to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) with the mouse bioassay (MBA) have been conducted as part of routine shellfish safety surveillance programs, e.g. in Ireland and France (Belin et al., 2009; Clarke et al., 2006). In France, the mouse bioassay protocol for lipophilic toxins is based on the EU harmonised protocol, using a 24h observation period and dichloro-methane as solvent for the partitioning clean-up (Yanagi et al., 1989; Yasumoto et al., 1984). The French study classified

unexplained MBA positives as atypical toxicity (Belin et al., 2009). In this 6-year study (2003–2008), over 1000 shellfish samples were analysed using both LC-MS/MS and MBA, with over 25% of the MBA positives being not explained by chemical analysis.

This large percentage of unexplained MBA results prompted us to investigate several monitoring sites further. Here, we report the findings concerning Ingril Lagoon, with PnTX-G identified as the main source of MBA positives observed since 2006 in this lagoon. Particular attention is given to the levels and profiles of PnTXs in mussels and clams, the two main shellfish species occurring naturally in this lagoon. PnTX-G levels in cultures of the toxin-producing organism are reported, as well as results from a functional assay based on the mode of action of the toxin on the *Torpedo* nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) (Aráoz et al., 2012).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Collection of shellfish samples

Shellfish samples were obtained from 11 sites for vigilance surveillance, i.e. parallel analysis by LC-MS/MS and the lipophilic MBA. Samples from Ingril Lagoon had been obtained during the four years from 2009 to 2012. Samples from 2009 had been obtained as digestive gland tissues, while samples from 2010 to 2012 had been whole flesh samples. For 2012, both whole flesh and digestive glands of mussel samples were obtained separately on 14 occasions. Samples from 2009 and 2010 had been stored as MeOH-extracts prior to re-analysis in 2011, while samples from 2011 and 2012 had been analysed shortly after sampling.

### 2.2. Pinnatoxin G standard

PnTX-G had previously been isolated from shellfish originating from New Zealand at Cawthron Institute (Selwood et al., 2010). An aliquot of this material, but only quantified by gravimetric analysis, had been used in 2010 for the analysis of the survey samples at the Norwegian Veterinary Institute (NVI). Subsequently, in 2011, the quantity of the isolated toxin was confirmed at the NRCC (CA) using quantitative nuclear magnetic resonance (qNMR). An aliquot of this well-characterised PnTX-G was used to prepare a calibration

standard in degassed methanol (0.01 % acetic acid), which has been provided to Ifremer at an approximate concentration level of  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Stability of the standard had been tested at NRCC, and no degradation was observed during a 2-week period at temperatures from  $-20$  to  $+40^\circ\text{C}$ . Dilutions of this standard in MeOH were used to quantify PnTXs in shellfish samples from Ingril Lagoon. Aliquots of this standard were also compared with synthetic PnTX-G, produced in the laboratory of A. Zakarian (Araoz et al., 2011), using a Torpedo microplate receptor-binding assay (Aráoz et al., 2012) to verify the biological activity on the nAChR target.

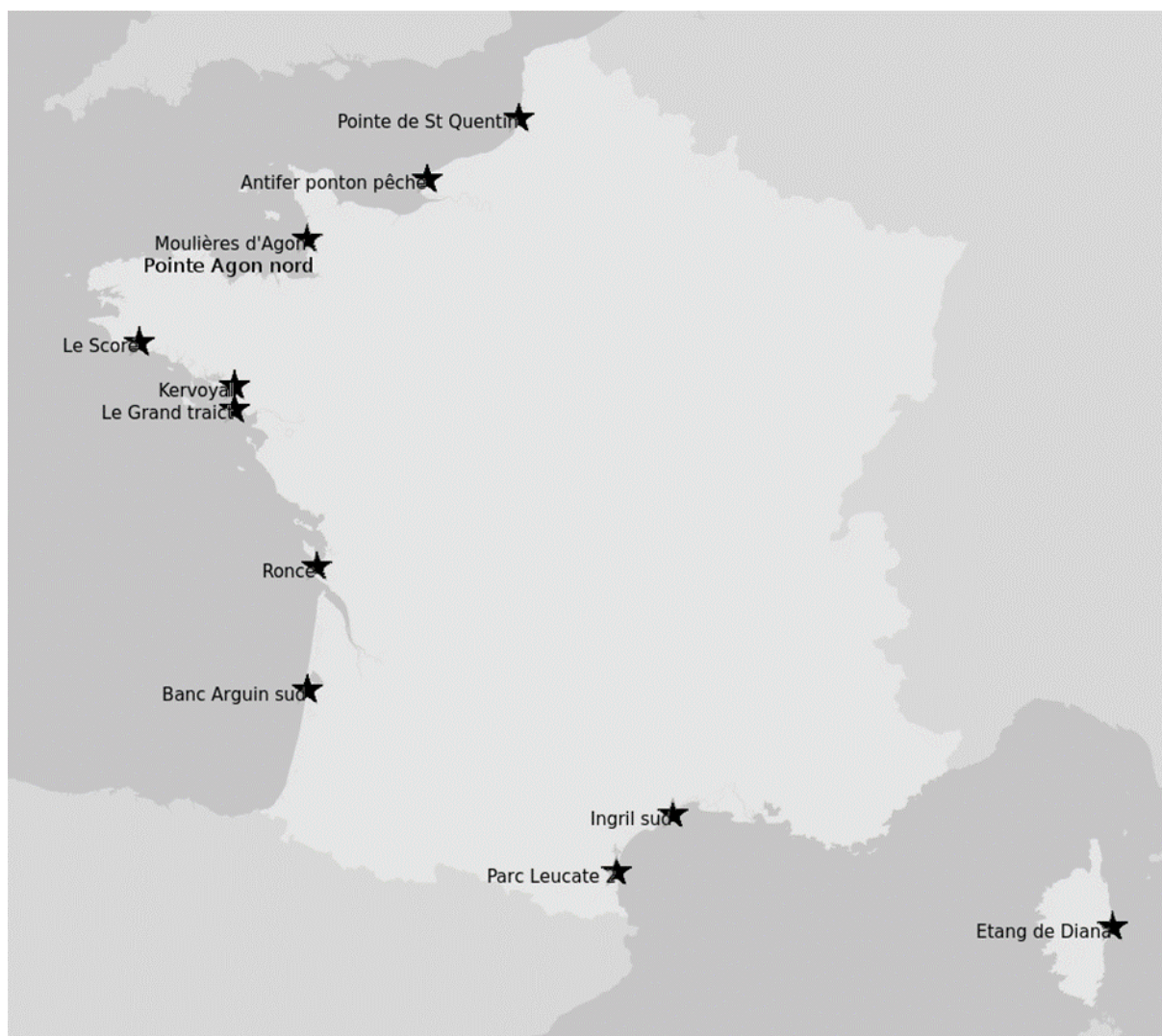
### 2.3. LC-MS/MS analyses of pinnatoxins

#### 2.3.1. Analysis of French shellfish samples from the vigilance surveillance programme in 2010 (Norwegian Veterinary Institute, triple-stage quadrupole)

Mussels were collected from the vigilance sentinel sites (Figure 2), digestive glands (DGs) were dissected, and weights of both DGs and remaining flesh recorded. Subsequently, homogenised aliquots (2 g) of these DG tissues were extracted with methanol (MeOH, 1:9 w/v). Filtered aliquots of these extracts were provided to the Norwegian Veterinary Institute for LC-MS/MS analysis.

Liquid chromatography was performed on an Xbridge C18 column ( $3\mu\text{m}$ ,  $50 \times 2.1 \text{ mm}$ ) (Waters, Milford, MA, USA), using a Waters Acquity UPLC module. Separation was achieved using linear gradient elution at  $0.3 \text{ mL min}^{-1}$  starting with acetonitrile–water (25:75, water containing 5 mM ammonium carbonate) rising to 100% acetonitrile over 9 min. Isocratic elution with 100% acetonitrile was maintained for 5 min before the eluent was switched back to 25% acetonitrile. The UPLC system was coupled to a Quattro Ultima Pt triple quadrupole mass spectrometer with an ESI interface (Waters Micromass, Manchester, UK). Instrumental parameters and ion transitions were the same as previously described (Rundberget et al., 2011). Quantitation was performed relative to the PnTX-G standard from Cawthron Institute and the detection limit was  $0.5 \mu\text{g kg}^{-1}$  whole shellfish flesh.





**Figure 2. Map of French coastline with the sites selected for vigilance surveillance and Ingril Lagoon.** Vigilance surveillance is complementary to routine surveillance and uses the lipophilic mouse bioassay as a screen for novel or emerging toxins. Sites have been selected for geographical spread, to reflect important shellfish production areas and from historical knowledge of bioassay results. The sampling site “Etang du Prévost” (Table 1) is connected to “Ingril Lagoon” and situated to the east of it.

### 2.3.2. Analysis of shellfish samples from Ingril Lagoon (*Ifremer, triple stage quadrupole*)

#### **Solvents and reagents**

Acetonitrile (LC-MS grade) and methanol (HPLC grade) were obtained from JT Baker. Water for analysis was supplied by a Millipore system. Ammonium formate (LC-MS quality) and formic acid (analyses quality) were from Sigma Aldrich. PnTX-G reference material (CRM)

was obtained from the NRC (Halifax, Canada) and diluted in methanol to calibration levels from 0.5 ng mL<sup>-1</sup> to 100 ng mL<sup>-1</sup>.

### **Extraction**

At least 100 g of whole mussel or clam tissue (or 30 g of DG) was homogenized with a blender. Methanol (9 mL) was added to aliquots of shellfish tissue (2 g), and toxins were extracted using a high speed homogenizer (Polytron) at 15000 rpm for 2 min. Samples were then centrifuged at 3700 g for 8 min at 4°C, and supernatants transferred to 20 mL volumetric flasks. This extraction was repeated twice and volumetric flasks were made up to 20 mL with MeOH. Aliquots of extracts were filtered (0.2 µm membrane filters) and analyzed by LC-MS/MS.

### **LC-MS/MS**

Analysis of pinnatoxins was performed on a UFLC (model Nexera, Shimadzu) coupled to a triple-quadrupole mass spectrometer (5500Qtrap, AB Sciex). Chromatography was performed with a Hyperclone MOS C8 column (50 × 2.0 mm, 3µm) with a C8 guard column (4 × 2.0 mm, 3 µm, Phenomenex). A binary mobile phase was used, phase A (100% aqueous) and phase B (95% aqueous acetonitrile), both containing 2 mM ammonium formate and 50 mM formic acid. The flow rate was 0.2 mL min<sup>-1</sup> and injection volume was 5 µL. The column and sample temperatures were 25°C and 4°C, respectively. A gradient elution was employed, starting with 30% B, rising to 95% B over 2.5 min, held for 5 min, then decreased to 30% B in 0.1 min and held for 2.5 min to equilibrate the system.

The LC-MS/MS system was used in positive ionization and multiple reaction monitoring (MRM) mode, with the following three transitions per compound: PnTX-G  $m/z$  694.4→676.4, 694.4→458.3 and 694.4→164.1; PnTX-A  $m/z$  712.4→694.4, 712.4→458.3 and 712.4→164.1, PnTX-B and C,  $m/z$  741.4→723.5, 741.4→458.3 and 741.4→164.1; PnTX-D,  $m/z$  782.4→764.4 782.4→488.3 and 782.4→164.1; PnTX-E,  $m/z$  784.4→764.4 784.4→488.3 and 784.4→164.1; PnTX F,  $m/z$  766.4→738.4, 766.4→488.3 and 766.4→164.1; pteriatoxins A, B and C  $m/z$  831.5→787.5, 831.5→458.3 and 831.5→164.1. The most intense transition, giving the product ion  $m/z$  164.1, was used to quantify toxins. All toxins were quantified against the PnTX-G standard from NRC, assuming that all analogues (pinnatoxins and pteriatoxins) had the same response factor as PnTX-G.

The ESI interface was operated using the following parameters: curtain gas 30 psi, temperature: 650°C, gas1 50 psi; gas2 60 psi, ion spray voltage 5500 V. For detection, parameters were: the declustering potential was 30 V and the entrance potential 10 V. Three collision energies were applied (53, 59 and 67 eV) with collision cell exit potentials of 10, 6 and 10 V for transitions 1, 2 and 3 of each compound, respectively.

The limit of detection (LOD) has been determined from the signal-to-noise ratio of the lowest standard injected after injection of 20 samples, using automated calculation in the Analyst 1.5.1 software of Applied Biosystems: This algorithm calculates the LOD as the sample giving a signal height 3 times the standard deviation of the noise. The LOD for PnTX-G was 0.05 ng mL<sup>-1</sup> or 0.5 µg kg<sup>-1</sup> whole flesh, i.e. for an injection of 5 µL an absolute amount of 250 fg injected on column.

### 2.3.3. Confirmatory high-resolution mass spectrometry at Ifremer (Q-ToF)

Accurate mass data were acquired on a QTOF 6540 Agilent instrument equipped with a dual ESI source coupled to an Agilent 1200 HPLC system. Separation was carried out on an Agilent Zorbax RRHD extend C18 column (50 x 2.1 mm, 1.8 µm) at 40°C with a flow rate at 0.5 mL min<sup>-1</sup> using a linear gradient elution from 10% B to 100% B over 5.5 min. 100% B was held for 2 min before returning to 10% B at 7.5 min. The column was then equilibrated for 2.5 min with 10% B prior to the next run. Mobile phase A was 100% water containing 50 mM formic acid and 2 mM ammonium formate and B was 95% acetonitrile with 5% water with 50 mM formic acid and 2 mM ammonium formate.

The instrument was operated in positive mode, performing full-scan analysis over  $m/z$  100-1700 at 1 spectrum s<sup>-1</sup> and targeted MS/MS analysis at 5 spectra s<sup>-1</sup>. Capillary voltage and fragmentor voltage were 3500 V and 200 V, respectively. The temperature of the Jet Stream Technologies source was 200°C with drying gas at 5 L min<sup>-1</sup> and sheath gas at 11 L min<sup>-1</sup> at 350°C. Three collision energies (20, 40 and 60 eV) were applied to the precursor ions to obtain an overview of the fragmentation pathways. The instrument has typically a mass error of 1 ppm in full scan mode and of 2 ppm in fragmentation mode. However, for small molecules or fragments and at low abundance this error may occasionally increase to less than 5 ppm. Resolution achieved is typically 25,000 to 40,000, depending on molecular weight.

### 2.4. Microplate receptor-binding assay for pinnatoxin G

Comparison of natural PnTX-G with that obtained by chemical synthesis was performed by using a microplate-receptor binding assay recently described (Aráoz et al., 2012). Briefly, flat-bottomed Maxisorp microplates were coated with 100  $\mu\text{L}$  per well of purified *Torpedo* electrocyte membrane protein ( $13.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) in TBS buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4). The plate was sealed and incubated overnight at  $4^\circ\text{C}$ . The membrane solution was discarded and without washing, 250  $\mu\text{L}$  blocking buffer (TBS, 0.5 % BSA) was added to each well, and the plate incubated overnight at  $4^\circ\text{C}$ . The coated microplates are ready-to-use and are stable for months when stored at  $4^\circ\text{C}$ .

For the test, the microplate was emptied and, without washing, 100  $\mu\text{L}$  of toxin standards prepared in blocking buffer were added to each well. The plate was sealed and incubated overnight at  $4^\circ\text{C}$ . Thereafter, 50  $\mu\text{L}$  biotin- $\alpha$ -Bungarotoxin ( $2.4 \times 10^{-7} \text{ M}$ ) was added to each well. The plate was sealed and incubated for 30 min under constant shaking at room temperature. Then, the wells were washed thrice with 250  $\mu\text{L}$  washing buffer (TBS, 0.1% Tween 20) and 100  $\mu\text{L}$  of streptavidin-HRP ( $220 \text{ ng nL}^{-1}$  protein) was added to each well. The plate was sealed and incubated for 30 min at room temperature with constant shaking. Thereafter, the wells were washed thrice with 250  $\mu\text{L}$  washing buffer. To detect the complex *Torpedo* nAChR–biotin- $\alpha$ -Bungarotoxin–streptavidin-HRP, 100  $\mu\text{L}$  of freshly prepared peroxidase substrate OPD was added to each well. After 3 min, the enzymatic reaction was stopped with 100  $\mu\text{L}$  of 0.5 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  and absorbance (492 nm) measured with an ELISA plate reader (GeniosPro, Tecan, Männedorf, Switzerland). Percentage inhibition was calculated from the equation:  $\% \textit{inhibition} = 100 \times [(100\% \textit{signal} - \textit{signal sample}) / (100\% \textit{signal} - 100\% \textit{inhibition})]$  (1) where: **100% signal** is obtained from wells in which *Torpedo* membranes were incubated in the absence of toxins or extracts. Non-specific binding was measured by incubating *Torpedo* electrocyte membranes with 1  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -Bungarotoxin (**100% inhibition**). The concentration of inhibitor at which biotin- $\alpha$ -Bungarotoxin binding is inhibited by 50% ( $\text{IC}_{50}$ ) was determined by nonlinear regression analysis using GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Curve fitting was performed by nonlinear regression analysis using the Hill equation.

## 2.5. Culture and analysis of *Vulcanodinium rugosum*

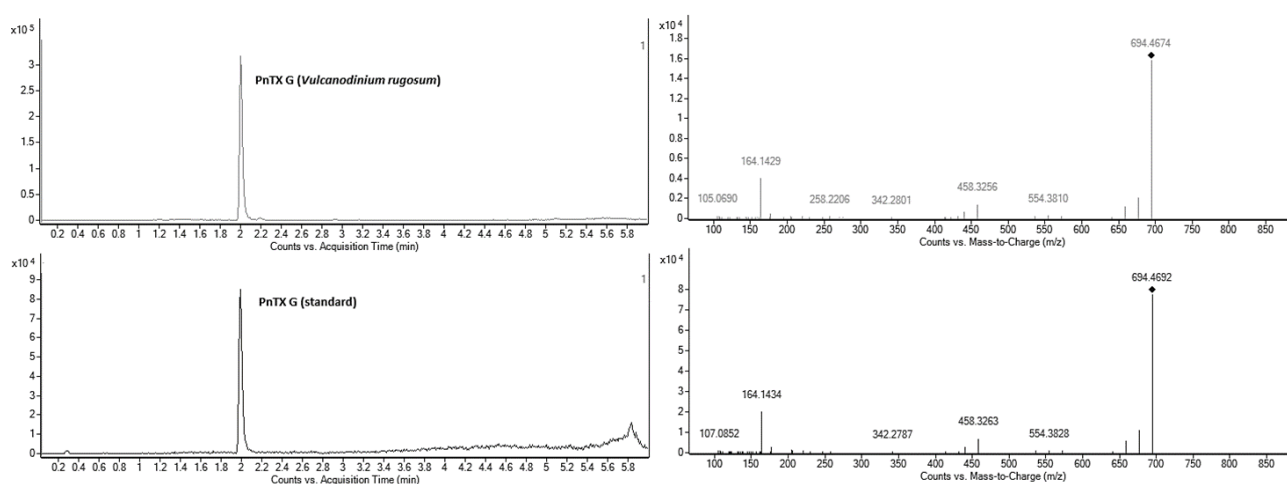
After initial observation in 2001, *V. rugosum* was observed again in a Lugol's-fixed sea water sample from Ingril Lagoon in July 2009 (Nézan and Chomérat, 2011). A sample of untreated sea water was obtained the following week and used to bring the organism into culture (strain IFR-VRU-01). This strain was cultured using L1 medium, prepared using filtered (0.2  $\mu\text{m}$ ) Mediterranean sea water (38 psu). A batch culture (200 mL) was prepared at 18°C, with a photon flux density at 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  and a photoperiod of 16 h of light and 8 h of dark. Cells were collected during stationary phase by centrifugation of 10 mL aliquots (3500 g, 20 min, 4°C), with 1,750 cells  $\text{mL}^{-1}$ . Cell pellets were extracted three times with 0.5 mL portions of MeOH. After filtration (0.2  $\mu\text{m}$ ), extracts were evaporated to dryness and taken up in a final volume of 1 mL MeOH for LC-MS/MS analysis.

### 3. Results and discussion

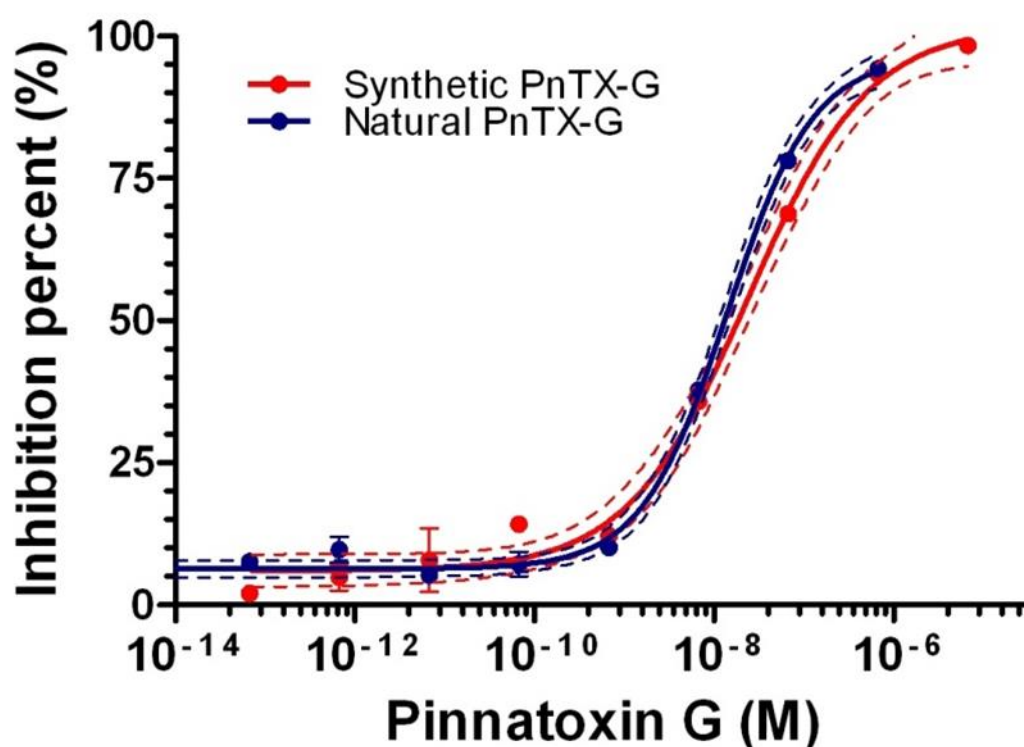
#### 3.1. Confirmation of structural identity and receptor-binding activity

One difficulty was the identification of PnTX-G as a toxin distinct from spirolide B and 13-desmethyl spirolide D. The standard obtained from New Zealand via the NRCC played a major role in this undertaking. First, this standard allowed for the verification of the retention time (RT) of the analyte observed in shellfish samples from Ingril: there was no difference in RT between the PnTX-G standard isolated at Cawthron and the RT of PnTX-G in both *V. rugosum* culture extracts and shellfish samples from Ingril Lagoon (electronic supplementary material Figure 1). Also, base hydrolysis did not result in destruction of the compound (see section 3.3), which suggested that the compound is not a spirolide analogue but a pinnatoxin (Rundberget et al., 2011). Furthermore, the mass spectral identity of PnTX-G in samples from Ingril Lagoon and in the standard were identical: fragments from  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  694.4 were observed at  $m/z$  458.3 and 164.1 (electronic supplementary material Figure 1). Accurate mass analysis also confirmed these fragmentation clusters at  $m/z$  458.3256 and 164.1429, both in the standard and in a sample of *V. rugosum* (Figure 3). The mass difference of the 458-fragment between the PnTX-G observed in the sample of *V. rugosum* isolated from Ingril Lagoon and that of the standard (originating from New Zealand shellfish) was -1.5 ppm, i.e. less than the specified acceptable mass accuracy for the instrument (i.e. 2ppm). While mass spectra of spirolide B and 13-desmethyl spirolide D also have the fragment cluster at  $m/z$  164.1 they do not possess the fragment at  $m/z$  458.3 (Sleno et al., 2004). It would be

extremely unlikely that two different compounds had the same accurate mass and fragmentation spectra and the same retention time. Additionally, comparison of natural PnTX-G isolated from New Zealand shellfish with chemically synthesized PnTX-G confirmed that both also had similar activity on the nicotinic acetylcholine receptor (Figure 4), strongly suggesting that if there were any potential stereochemical differences between the compounds these would not be toxicologically significant. More significantly, high resolution  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopic studies with synthetic pinnatoxin G unambiguously confirm its structural and stereochemical identity (Ar  oz et al., 2011). Taken together, these comparisons show that the compound observed in samples from Ingril Lagoon was indeed PnTX-G.



**Figure 3. Chromatograms (left) and high-resolution mass spectrometry spectra (right) of PnTX-G in a culture of *Vulcanodinium rugosum* isolated from Ingril (top) and in the standard from New Zealand characterised at NRCC (bottom).** Spectra were acquired on the Agilent 6540 Q-ToF instrument. Note presence of 458 fragment ion, specific for PnTX-G compared to SPX-B and 13-desmethyl-SPX-D. The spectrum shown is the sum of the three spectra at 20, 40 and 60 eV. For fragmentation pathway also see Figure 3 of the electronic supplementary material.



**Figure 4.** Comparison of natural PnTX-G with PnTX-G from chemical synthesis by using the *Torpedo* microplate binding assay. Inhibition of specific biotin- $\alpha$ -Bungarotoxin binding to *Torpedo*-nAChR by increasing concentrations of natural (blue circles) and synthetic (red circles) PnTX-G. Curve fitting was performed by nonlinear regression analysis using the Hill equation. Each data point is the mean value  $\pm$  standard error of the mean of 3 paired determinations. The dashed lines represent the 95% confidence band of the inhibition curve. The calculated  $IC_{50}$  for natural PnTX-G was 0.139 nM (0.113-172 nM, 95% confidence intervals), and for synthetic PnTX-G 0.236 nM (0.159-0.352 nM, 95% confidence intervals).

### 3.2. Occurrence of pinnatoxins in shellfish from France (3-month survey)

In 2010, retrospective analysis of shellfish extracts from the French vigilance surveillance programme was performed (Table 1). This analysis showed regular occurrence of low levels of spirolides, while only mussels from two sites contained PnTX-G (one in Brittany and one in the Mediterranean Sea (the Etang de Prévost is adjacent to Ingril Lagoon)) at very low levels. Such very low levels are quantifiable because cyclic imines generally exhibit high response factors in LC-MS/MS. However, such low levels may result from the presence of a

live PnTX-producing organism with benthic life stages in those areas, but might also potentially be due to contamination arising from advected water bodies.

**Table 1.** Pinnatoxin G (PnTX-G) and 13-desmethyl-spirolide-C (13-dmSPX-C) in French vigilance samples (April to July 2010). Oysters are *C. gigas* while mussels are *M. edulis* North of Arcachon and *M. galloprovincialis* South of Arcachon, with mussels at Arcachon likely to be a hybrid.



Sampling date	Sampling site	Species	PnTX-G	13dmSPX-C
			µg/kg	µg/kg
12/04/2010	Banc Arguin sud	Oysters	nd	8
12/04/2010	Banc Arguin sud	Mussels	nd	9
12/04/2010	Le Grand Traict	Mussels	nd	8
12/04/2010	Kervoyal	Mussels	nd	6
13/04/2010	Antifer	Mussels	nd	nd
14/04/2010	Pointe de St Quentin	Mussels	nd	nd
14/04/2010	Le Scoré	Mussels	nd	16
19/04/2010	Ronce	Oysters	nd	9
19/04/2010	Diana centre	Mussels	nd	3
19/04/2010	Parc Leucate	Mussels	nd	nd
19/04/2010	Parc Leucate	Oysters	nd	nd
19/04/2010	Etang du Prévost	Mussels	3	2
27/04/2010	Pointe Agon nord	Mussels	nd	nd
05/05/2010	Le Scoré	Mussels	nd	19
17/05/2010	Banc Arguin sud	Oysters	nd	6
17/05/2010	Banc Arguin sud	Mussels	nd	7
17/05/2010	Kervoyal	Mussels	nd	4
17/05/2010	Le Grand Traict	Mussels	nd	6
17/05/2010	Ronce	Oysters	nd	18
17/05/2010	Diana centre	Mussels	nd	2
19/05/2010	Pointe de St Quentin	Mussels	nd	nd
25/05/2010	Parc Leucate	Mussels	nd	nd
25/05/2010	Parc Leucate	Oysters	nd	nd
25/05/2010	Antifer	Mussels	nd	nd
27/05/2010	Pointe Agon nord	Mussels	nd	nd
02/06/2010	Le Scoré	Mussels	nd	13

### *3.3. Occurrence of pinnatoxins in mussels and clams from Ingril Lagoon (4-year survey)*

The presence of the low levels of PnTX-G at two locations prompted us to study other geographical areas of potential interest, based on the 6-year survey by Belin et al. (2009). One of the areas where rapid MBA deaths had been observed was Ingril Lagoon (see also electronic supplementary material Figure 2). Retrospective analysis of the routine samples from that area for 2010 showed surprisingly high levels of PnTX-G (Figure 5). These results led us to retrospectively analyse stored samples from 2009 and to survey the area for PnTXs during 2011 and 2012 (Figure 5). The 4-year survey of this area shows that PnTX-G is a recurrent toxin in both mussels and clams. Notable features of PnTX-G in this data are: i) high background concentrations; ii) high maximal concentrations; and iii) large differences in concentration between mussels and clams.

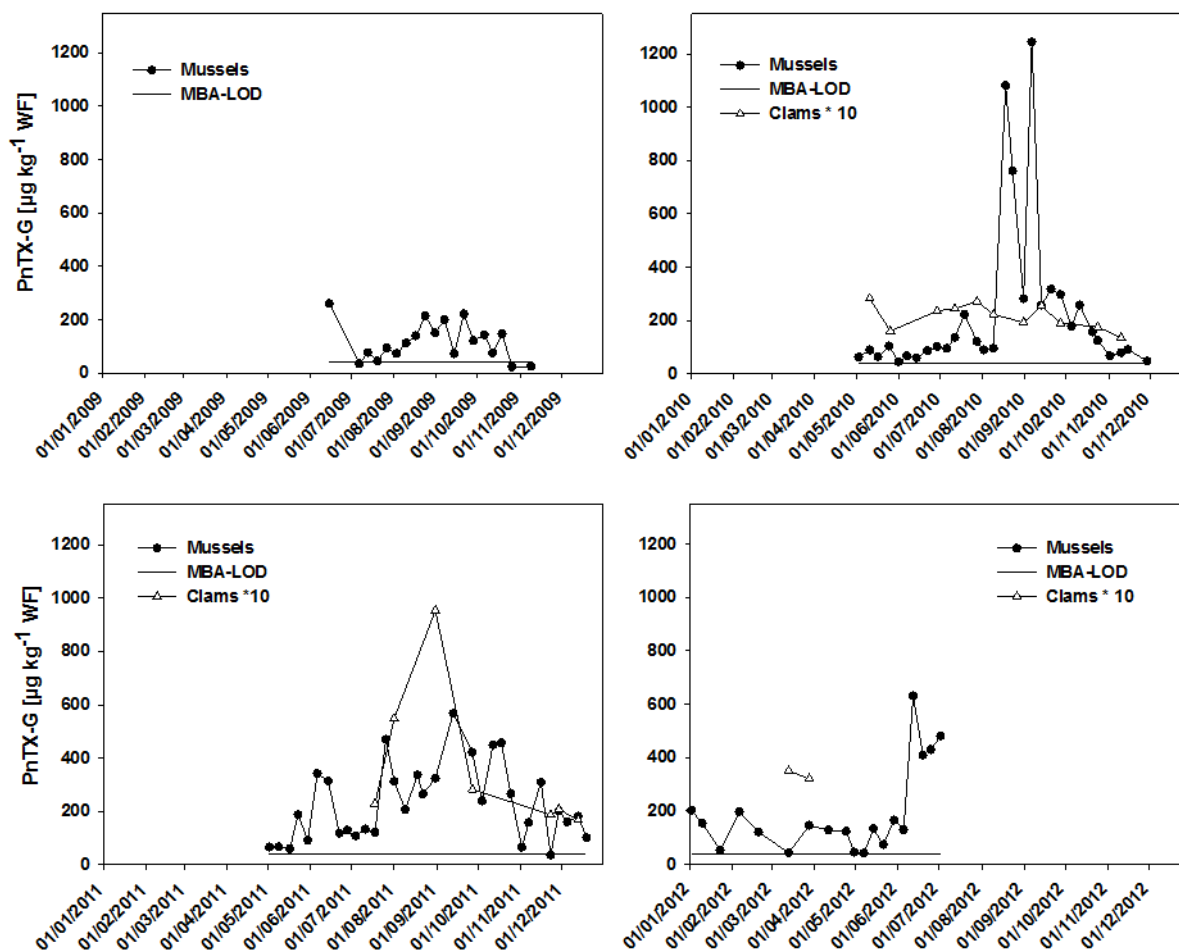
Based on the LD<sub>50</sub> reported (Munday, 2008), an MBA LD<sub>50</sub> can be calculated around 40 µg kg<sup>-1</sup> for PnTX-G in shellfish flesh. High concentrations were observed in mussels for prolonged periods during all four years: only on four sampling occasions was the PnTX-G concentration in mussels below 40 µg kg<sup>-1</sup> whole flesh. Mouse bioassays performed on mussel extracts from Ingril Lagoon were positive for extended periods during the summer months in the years from 2006 to 2009. Thus, the concentrations of PnTX-G are clearly sufficient to explain the atypical toxicities observed in mice injected with extracts of mussels from Ingril Lagoon.

High maximum concentrations of PnTX-G were observed in mussels every year, i.e. 261, 1244, 568 and 631 µg kg<sup>-1</sup> for 2009, 2010, 2011 and 2012, respectively. Thus, every year, the maximum concentration of PnTX-G observed in mussels at Ingril Lagoon exceeded all other reported levels worldwide, so far. The overall maximum during this study (1244 µg kg<sup>-1</sup>) was six-fold higher than any previously reported value. These high concentrations clearly constitute a concern that needs to be addressed in any future risk evaluation for this toxin group. As there are very few monitoring data for PnTXs (EFSA, 2010), further surveys will have to be conducted over larger geographical areas before the overall extent of contamination of shellfish with this toxin group can be assessed. It already appears from the “snapshot” analysis of the other 10 areas during the 2010 3-month survey that concentrations

elsewhere in France were comparatively low. As this may also be the case in many other countries, future surveys should attempt to have a fine geographic sampling net.

Significant differences were observed between the accumulation of PnTX-G in mussels and in clams (Figure 5 and Table 2). On average, mussels contained seven- to eight-fold higher levels of PnTX-G during the same sampling occasions at Ingril Lagoon. Even though mussels in Ingril Lagoon are from natural banks in the sediment, the physiological differences between the species or the difference in ecological niche of clams, as burrowing bivalves, may play a major role in this accumulation pattern.

The hitherto described metabolic pathways leading to PnTXs A-D and pteriatoxins A-C (Selwood et al., 2010) could not be verified, but transitions consistent with pteriatoxins were found in both clams and mussels (due to the absence of calibration standards it was not possible to identify which pteriatoxins). The only quantifiable metabolite was PnTX-A but even this was only present at low percentage of the PnTX-G concentrations (Table 3), assuming equal response factors (as all PnTX analogues were quantified against PnTX-G). As PnTX-G is stable to alkaline hydrolysis (Rundberget et al., 2011), we used this method to determine whether esters of PnTX were present in mussel and clam samples. No differences were observed in concentration of PnTX-G before and after alkaline hydrolysis. We conclude that, if esters were present in these samples, their concentrations were negligible. This appears somewhat in contrast to findings of McCarron et al. (2012), however, multiple factors may contribute to the formation of such esters, e.g. availability of free fatty acids and species or metabolic state of shellfish.



**Figure 5. Annual variations of Pinnatoxin G (PnTX-G) in mussels and clams from Ingril Lagoon (French Mediterranean Sea) in comparison to the mouse bioassay detection limit (MBA-LOD) of  $40 \mu\text{g kg}^{-1}$ .** All data are expressed in whole flesh equivalents; *nota bene*: clam concentrations have been multiplied by ten for illustration purposes only and mussels in 2009 had been analysed as digestive glands and whole flesh values were recalculated from the weight ratios of digestive glands and remainder. Mussels and clams from 2010 to 2012 had been analysed as whole flesh samples. No monitoring was carried out during the periods where no data points are visible on the four graphs. For comparative purposes, the mouse bioassay detection limit (MBA-LOD) of  $40 \mu\text{g kg}^{-1}$  is indicated with a horizontal line

Sampling date	Clams	Mussels	Ratio mussels/ clams
	PnTX-G ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ WF)		
11/05/2010	28	89	3
29/06/2010	24	102	4
12/07/2010	24	137	6
28/07/2010	27	121	4
09/08/2010	22	95	4
31/08/2010	19	282	15
27/09/2010	19	297	16
24/10/2010	18	125	7
18/07/2011	23	121	5
01/08/2011	55	459	8
31/08/2011	95	324	3
27/09/2011	28	421	15
23/11/2011	19	37	2
29/11/2011	21	202	10
13/12/2011	17	181	11
		average	7,6
		CV (%)	60,4

**Table 2.** Comparison of the contamination of mussels (*M. galloprovincialis*) with that in clams (*V. decussata*). WF = whole flesh

Sampling date	Clams	Mussels
	<b>Ratio PnTX-A/PnTX-G (%)</b>	
18/07/2011	2.1	0.9
01/08/2011	2.2	0.8
31/08/2011	1.2	0.6
27/09/2011	2.0	0.5
23/11/2011	n/a	3.7
29/11/2011	n/a	0.8
13/12/2011	n/a	0.6
13/03/2012	n/a	n/a
28/03/2012	n/a	n/a
average	<b>1.9</b>	<b>1.1</b>
CV (%)	25	100

**Table 3.** Percentage of pinnatoxin A (PnTX-A) versus G (PnTX-G) in clams (*V. decussata*) and mussels (*M. galloprovincialis*). n/a = not applicable due to PnTX-A not being quantifiable or below the limit of detection.

### 3.4. Tissue distribution of pinnatoxin G in mussels

During 2012, it was possible to obtain simultaneously both whole flesh samples and digestive glands of mussels on 14 sampling occasions. These tissues were analysed separately to gain further insight in the tissue distribution, and thus accumulation mechanisms, of PnTXs (Table 4). The fraction accumulated in the digestive gland appeared relatively low, with only ca. 65 % of total PnTX-G being accumulated in this tissue. In previous studies of other toxin groups, higher accumulation rates had been reported for digestive gland compared to whole flesh. For instance, a ratio of 5.2 for AZA concentrations in digestive gland compared to whole flesh was reported for the accumulation of AZAs in mussels, i.e. greater than 90% accumulation of AZAs in digestive gland tissue (Hess et al., 2005). Similarly, a separate study reported the ratio of OA-equivalents in digestive gland compared to whole flesh to be 6.2 and 8 in two samples of mussels (*M. edulis*), i.e. again > 90% accumulated in the digestive gland (McCarron et al., 2008). Even for domoic acid, a much more water soluble toxin,

accumulation of ca. 85% in the digestive gland was reported (McCarron and Hess, 2006). The finding that a significant portion of PnTX-G is accumulated in tissues other than the digestive gland suggests that other mechanisms than direct ingestion of micro-algae might play a role in the accumulation of PnTX-G in mussels. Further studies will be necessary to ascertain whether this difference is due to greater distribution post-accumulation or whether uptake from the dissolved phase may play a role for this toxin group.

Sampling date	PnTX-G <sub>WF</sub> [µg kg <sup>-1</sup> ]	PnTX-G <sub>DG</sub> [µg kg <sup>-1</sup> ]	PnTX-G <sub>DG</sub> / PnTX-G <sub>WF</sub> [%]
10/01/2012	154	117	76
23/01/2012	52	17	34
06/02/2012	197	106	54
20/02/2012	121	68	56
13/03/2012	43	22	51
28/03/2012	145	61	42
11/04/2012	454	31	7
14/05/2012	134	54	40
25/06/2012	430	265	62
02/07/2012	481	227	47
06/08/2012	652	494	76
10/09/2012	205	36	18
08/10/2012	25	46	180
06/11/2012	11	19	173
		<b>Average</b>	<b>65,4</b>

**Table 4. Tissue distribution of PnTX-G in mussels (*M. galloprovincialis*) from Ingril lagoon. Analyses of whole flesh (WF) are compared to analysis of digestive glands (DG). All concentrations are expressed as whole flesh equivalents, i.e. analyses of digestive glands have been weighted by the percentage of the digestive gland of the whole flesh. Nota bene: only ca. 65 % of the total PnTX-G accumulated in the digestive gland on average.**

### 3.5. Pinnatoxin G cell quota in *Vulcanodinium rugosum*, strain IFR-VRU-01

Triplicate analysis of the batch culture of strain IFR-VRU-01 of *V. rugosum* resulted in a PnTX-G concentration of ca. 4.7 pg cell<sup>-1</sup>. This finding, together with the observation of the organism on several occasions in the water column of Ingril Lagoon (Nézan and Chomérat, 2011) may explain the accumulation of PnTX-G as the main toxic component identified in shellfish from this area. This concentration is similar to the previously reported values of 12 to 15 pg cell<sup>-1</sup> PnTX-G for a Japanese strain (Smith et al., 2011), and up to 4 and 20 pg cell<sup>-1</sup> PnTX-E and PnTX-F, respectively, for isolates from New Zealand (Rhodes et al., 2010). However, the toxin quota in cultures may vary according to culture conditions and may not be the same as that in nature, and hence further studies will be necessary to fully understand the uptake mechanisms for this organism with non-motile life stages.

## 4. Conclusions

This study has shown the production of PnTX-G in *V. rugosum*, strain IFR-VRU-01, isolated from Ingril Lagoon in 2009. Furthermore, the results show for the first time the presence of PnTX-G in shellfish from the French Mediterranean, in Ingril Lagoon. The levels observed in mussels from this lagoon are higher than those reported elsewhere, while the levels in clams appear similar to previously reported levels in mussels (Canada and Norway) and oysters (New Zealand). As the percentage of PnTX-G accumulated in digestive gland was lower than for most other toxin groups studied previously, a more extensive study would be required to determine the extent and the mechanisms of the contamination of bivalves destined for human consumption. Levels observed in shellfish from Ingril Lagoon were as much as two orders of magnitude higher than those observed in other areas of shellfish production in France. Even though there have not been regular reports of unexplained lipophilic mouse bioassays in other French Mediterranean lagoons, there may still be a low level of contamination with PnTXs in these areas. Thus, further studies will be necessary to establish the full extent of the problem. While the precautionary principle would suggest closure of areas with such high levels of a bioactive substance, i.e. Ingril Lagoon, a formal risk assessment may be necessary if any ill effects in humans can be demonstrated for this toxin group.



## **1. Acknowledgements**

We acknowledge the collaboration of Paul McNabb and Andrew I. Selwood (both Cawthron Institute, New Zealand) and Michael A. Quilliam and Pearse McCarron (both Institute of Marine Biosciences, National Research Council Canada) for the provision of a well characterised reference solution for PnTX-G. The authors thank Thomas Glauner and Bernhard Wüst (both Agilent) for their collaboration on high resolution mass spectrometry. We also thank the technical staff of the Phycotoxin Laboratory in Nantes for help in the selection of samples and initial analysis of samples from Ingril Lagoon.

Funding for this work came from following separate sources: i) the COLNACOQ project funded by the Regional Council of the “Pays de la Loire” (2009 – 2013); ii) the French Directorate General for Food (DGAL), through Programme 206, convention number 2011/203/2100482701 (2011 – 2012); iii) Ifremer through the ALTOX and RISCAP projects funded by the French Ministry of Research and Higher Education through programme 148 (2009 – 2012); iv) National Institutes of Health (USA, NIGMS R01 GM077379); v) the Atlantic Area Programme (Interreg IVB Trans-national): 2009-1/117 Pharmatlantic; and vi) a Marie Curie International Incoming Fellowship within the 7<sup>th</sup> European Community Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement No. 221117 (to COM).

## **2. Conflict of interest statement**

The authors declare that there is no conflict of interest for any of the authors.

## **3. References**

- Aráoz, R., Ramos, S., Pelissier, F., Guérineau, V., Benoit, E., Vilariño, N., Botana, L.M., Zakarian, A., Molgó, J., 2012. Coupling the *Torpedo* microplate-receptor binding assay with mass spectrometry to detect cyclic imine neurotoxins. *Anal. Chem.* 84, 10445-10453.
- Araoz, R., Servent, D., Molgó, J., Iorga, B.I., Fruchart-Gaillard, C., Benoit, E., Gu, Z., Stivala, C., Zakarian, A., 2011. Total synthesis of pinnatoxins A and G and revision of the mode of action of pinnatoxin A. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 10499-10511.
- Belin, C., Soudant, D., Amzil, Z., 2009. Surveillance des toxines lipophiles dans les coquillages - Analyse statistique et comparaison des résultats obtenus par deux méthodes d'analyses: les bio-essais sur souris et les analyses chimiques par CL-SM/SM. Ifremer Archimer, 98 pages.
- Borkman, D.G., Smayda, T.J., Tomas, C.R., York, R., Strangman, W., Wright, J.L.C., 2012. Toxic *Alexandrium peruvianum* (Balech and de Mendiola) Balech and Tangen in Narragansett Bay, Rhode Island (USA). *Harmful Algae* 19, 92-100.
- Cembella, A.D., Lewis, N.I., Quilliam, M.A., 1999. Spirolide composition of micro-extracted pooled cells isolated from natural plankton assemblages and from cultures of the dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii*. *Natural Toxins* 7, 197-206.
- Chou, T., Haino, T., Kuramoto, M., Uemura, D., 1996a. Isolation and structure of pinnatoxin D, a new shellfish poison from the okinawan bivalve *Pinna muricata*. *Tetrahedron Lett.* 37, 4027-4030.
- Chou, T., Kamo, O., Uemura, D., 1996b. Relative stereochemistry of pinnatoxin A, a potent shellfish poison from *Pinna muricata*. *Tetrahedron Lett.* 37, 4023-4026.
- Clarke, D., Devilly, L., McMahon, T., O'Cinneide, M., Silke, J., Burrell, S., Fitzgerald, O., Hess, P., Kilcoyne, J., McElhinney, M., Ronan, J., Gallardo Salas, R., Gibbons, B., Keogh, M., McCarron, M., O'Callaghan, S., Rourke, B., 2006. A Review of shellfish toxicity monitoring in Ireland & Review of management cell decisions. Proceedings of the 6th Irish Shellfish Safety Scientific Workshop Marine Institute, Galway, Pp. 22-34.
- EFSA, 2010. Marine biotoxins in shellfish - Cyclic Imines (spirolides, gymnodimines, pinnatoxins and pteriatoxins), Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain; adopted on 5 July 2010. *EFSA Journal* 8, 1-39.

- Hao, J., Matsuura, F., Kishi, Y., Kita, M., Uemura, D., Asai, N., Iwashita, T., 2006. Stereochemistry of pteriatoxins A, B, and C. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 7742-7743.
- Hess, P., Nguyen, L., Aasen, J., Keogh, M., Kilcoyne, J., McCarron, P., Aune, T., 2005. Tissue distribution, effects of cooking and parameters affecting the extraction of azaspiracids from mussels, *Mytilus edulis*, prior to analysis by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Toxicon* 46, 62-71.
- Jackson, J.J., Stivala, C.E., Iorga, B.I., Molgó, J., Zakarian, A., 2012. Stability of cyclic imine toxins: interconversion of pinnatoxin amino ketone and pinnatoxin A in aqueous media. *J. Org. Chem.* 77, 10435-10440.
- McCarron, P., Hess, P., 2006. Tissue distribution and effects of heat treatments on the content of domoic acid in blue mussels, *Mytilus edulis*. *Toxicon* 47, 473-479.
- McCarron, P., Kilcoyne, J., Hess, P., 2008. Effects of cooking and heat treatment on concentration and tissue distribution of okadaic acid and dinophysistoxin-2 in mussels (*Mytilus edulis*). *Toxicon* 51, 1081-1089.
- McCarron, P., Rourke, W.A., Hardstaff, W., Pooley, B., Quilliam, M.A., 2012. Identification of pinnatoxins and discovery of their fatty acid ester metabolites in mussels (*Mytilus edulis*) from Eastern Canada. *J. Agric. Food Chem.* 60, 1437-1446.
- McNabb, P.S., McCoubrey, D.J., Rhodes, L., Smith, K., Selwood, A.I., Munday, R., Holland, P.T., 2012. New perspectives on biotoxin detection in Rangaunu Harbour, New Zealand arising from the discovery of pinnatoxins. *Harmful Algae* 13, 34-39.
- Miles, C.O., Rundberget, T., Sandvik, M., Aasen, J.A.B., Selwood, A.I., 2010. The presence of pinnatoxins in Norwegian mussels. National Veterinary Institute, Report 07b, p. 10 pages.
- Munday, R., 2008. Toxicology of cyclic imines: gymnodimine, spirolides, pinnatoxins, pteriatoxins, prorocontrolide, spiro-prorocentrimine and symbioimines. Chapter 27 in: . *Seafood and freshwater toxins - Pharmacology, Physiology and Detection*; ed. L. Botana. CRC Press, Taylor & Francis Group, ISBN: 0-8493-7437-5.
- Munday, R., Selwood, A.I., Rhodes, L., 2012. Acute toxicity of pinnatoxins E, F and G to mice. *Toxicon* 60, 995-999.

- Nézan, E., Chomérat, N., 2011. *Vulcanodinium rugosum* gen. et sp. nov. (Dinophyceae), un nouveau dinoflagellé marin de la côte méditerranéenne française. *Cryptogamie, Algologie* 32, 3-18.
- Rhodes, L., Smith, K., Selwood, A., McNabb, P., van Ginkel, R., Holland, P., Munday, R., 2010. Production of pinnatoxins by a peridinioid dinoflagellate isolated from Northland, New Zealand. *Harmful Algae* 9, 384-389.
- Rundberget, T., Aasen, J.A.B., Selwood, A.I., Miles, C.O., 2011. Pinnatoxins and spirolides in Norwegian blue mussels and seawater. *Toxicon* 58, 700-711.
- Selwood, A.I., Miles, C.O., Wilkins, A.L., van Ginkel, R., Munday, R., Rise, F., McNabb, P., 2010. Isolation, structural determination and acute toxicity of pinnatoxins E, F and G. *J. Agric. Food Chem.* 58, 6532-6542.
- Sleno, L., Chalmers, M.J., Volmer, D.A., 2004. Structural study of spirolide marine toxins by mass spectrometry - Part II. Mass spectrometric characterization of unknown spirolides and related compounds in a cultured phytoplankton extract. *Anal. Bioanal. Chem.* 378, 977-986.
- Smith, K.F., Rhodes, L.L., Suda, S., Selwood, A.I., 2011. A dinoflagellate producer of pinnatoxin G, isolated from sub-tropical Japanese waters. *Harmful Algae* 10, 702-705.
- Takada, N., Umemura, N., Suenaga, K., Chou, T., Nagatsu, A., Haino, T., Yamada, K., Uemura, D., 2001a. Pinnatoxins B and C, the most toxic components in the pinnatoxin series from the Okinawan bivalve *Pinna muricata*. *Tetrahedron Lett.* 42, 3491-3494.
- Takada, N., Umemura, N., Suenaga, K., Uemura, D., 2001b. Structural determination of pteriatoxins A, B and C, extremely potent toxins from the bivalve *Pteria penguin*. *Tetrahedron Lett.* 42, 3495-3497.
- Touzet, N., Franco, J.M., Raine, R., 2008. Morphogenetic diversity and biotoxin composition of *Alexandrium* (Dinophyceae) in Irish coastal waters. *Harmful Algae* 7, 782-797.
- Uemura, D., Chou, T., Haino, T., Nagatsu, A., Fukuzawa, S., Zheng, S., Chen, H., 1995. Pinnatoxin A: a toxic amphoteric macrocycle from the Okinawan bivalve *Pinna muricata*. *J. Am. Chem. Soc.* 117, 1155-1156.

- Yanagi, T., Murata, M., Torigoe, K., and Yasumoto, T., 1989. Biological activities of semisynthetic analogs of dinophysistoxin-3, the major diarrhetic shellfish toxin. *Agric. Biol. Chem.*, 53, 525-529.
- Yasumoto, T., Murata, M., Oshima, Y., Masumoto, K., Clardy, J., 1984. Diarrhetic shellfish poisoning. In E.P. Ragelis (ed.), *Seafood Toxins*. Washington D.C., American Chemical Society (ACS Symposium Series 262) pp. 207-214.
- Zeng, N., Gu, H., Smith, K.F., Rhodes, L.L., Selwood, A.I., Yang, W., 2012. The first report of *Vulcanodinium rugosum* (Dinophyceae) from the South China Sea with a focus on the life cycle. *N. Z. J. Mar. Freshw. Res.* 46, 511-521.
- Zheng, S.Z., Huang, F.L., Chen, S.C., Tan, X.F., Zuo, J.B., Peng, J., Xie, R.W., 1990. The isolation and bioactivities of pinnatoxin. *Chin. J. Mar. Drugs* 33, 33-35.

## Electronic supplementary material

### **Pinnatoxin-G is responsible for atypical toxicity in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and clams (*Venerupis decussata*) from Ingril, a French Mediterranean lagoon**

Philipp Hess<sup>1\*</sup>, Eric Abadie<sup>2</sup>, Fabienne Hervé<sup>1</sup>, Tom Berteaux<sup>2</sup>, Véronique Séchet<sup>1</sup>, Romulo Araújo<sup>3</sup>, Jordi Molgó<sup>3</sup>, Armen Zakarian<sup>4</sup>, Manoëlla Sibat<sup>1</sup>, Thomas Rundberget<sup>5</sup>, Christopher O. Miles<sup>5</sup>, Zouher Amzil<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ifremer, Laboratoire Phycotoxines, Centre Atlantique, 44311 Nantes Cedex, France

<sup>2</sup> Ifremer, Laboratoire Environnement Ressources – Languedoc Roussillon, 34203 Sète, France

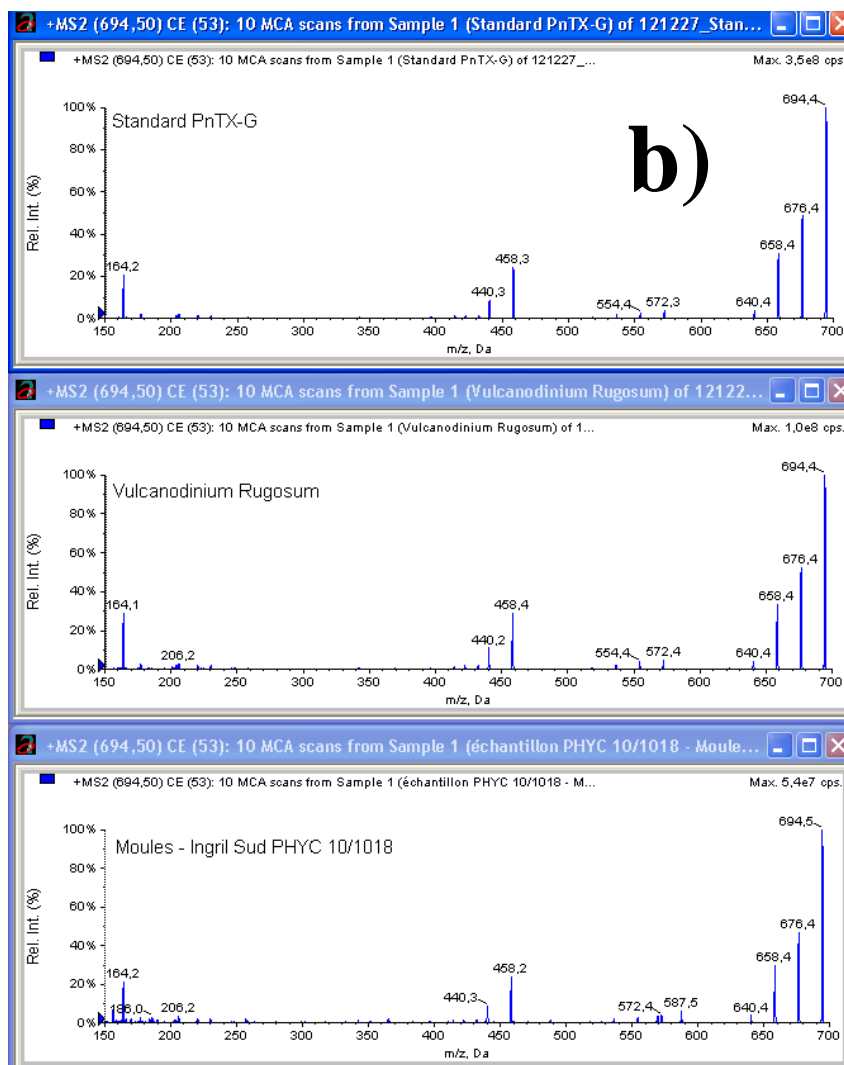
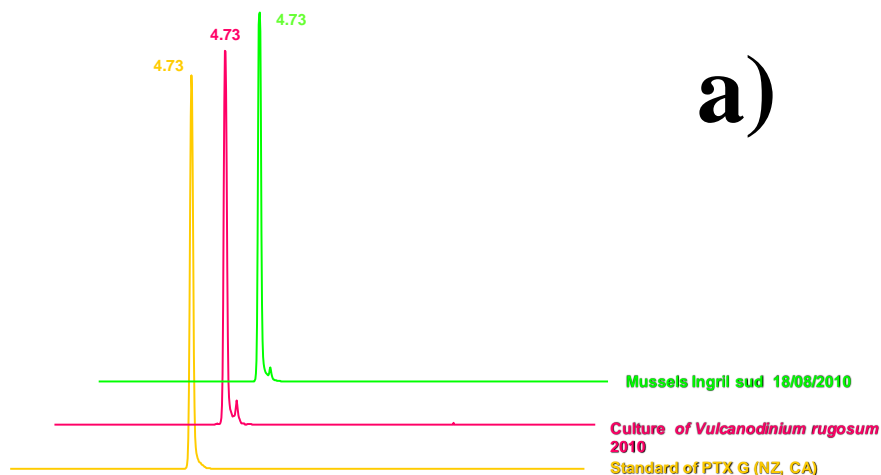
<sup>3</sup> CNRS, Laboratoire Neurobiologie et Développement, UPR 3294, 91198 Gif-sur-Yvette, France

<sup>4</sup> Department of Chemistry and Biochemistry, University of California, Santa Barbara, California 93106-9510, United States

<sup>5</sup> Norwegian Veterinary Institute, P. O. Box 750 Sentrum, 0106 Oslo, Norway

\*corresponding author's email: [Philipp.Hess@ifremer.fr](mailto:Philipp.Hess@ifremer.fr)

ESM Figure 1a) Comparison of retention times between standard of PnTX-G, PnTX-G in a *Vulcanodinium rugosum* culture and a mussel sample from Ingril lagoon; b) spectral comparison of PnTX-G in calibration standard (top), PnTX-G in a sample of *Vulcanodinium rugosum* (middle) and in a sample of mussels from Ingril Lagoon (bottom). Spectra were acquired on an API-4000 Q-Trap.



ESM Figure 2. Mouse bioassay results plotted as the inverse of average time to death (in 1/minutes) per sample for routine surveillance from 2006 to 2009 at Ingril lagoon.

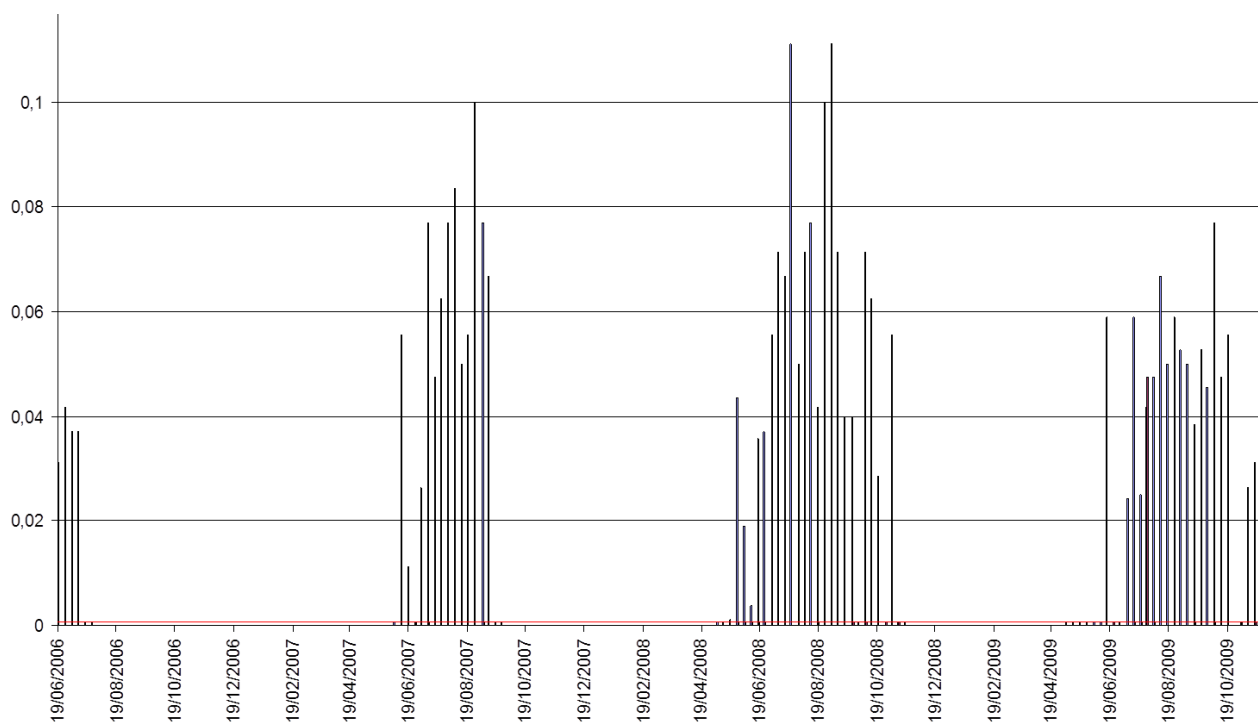
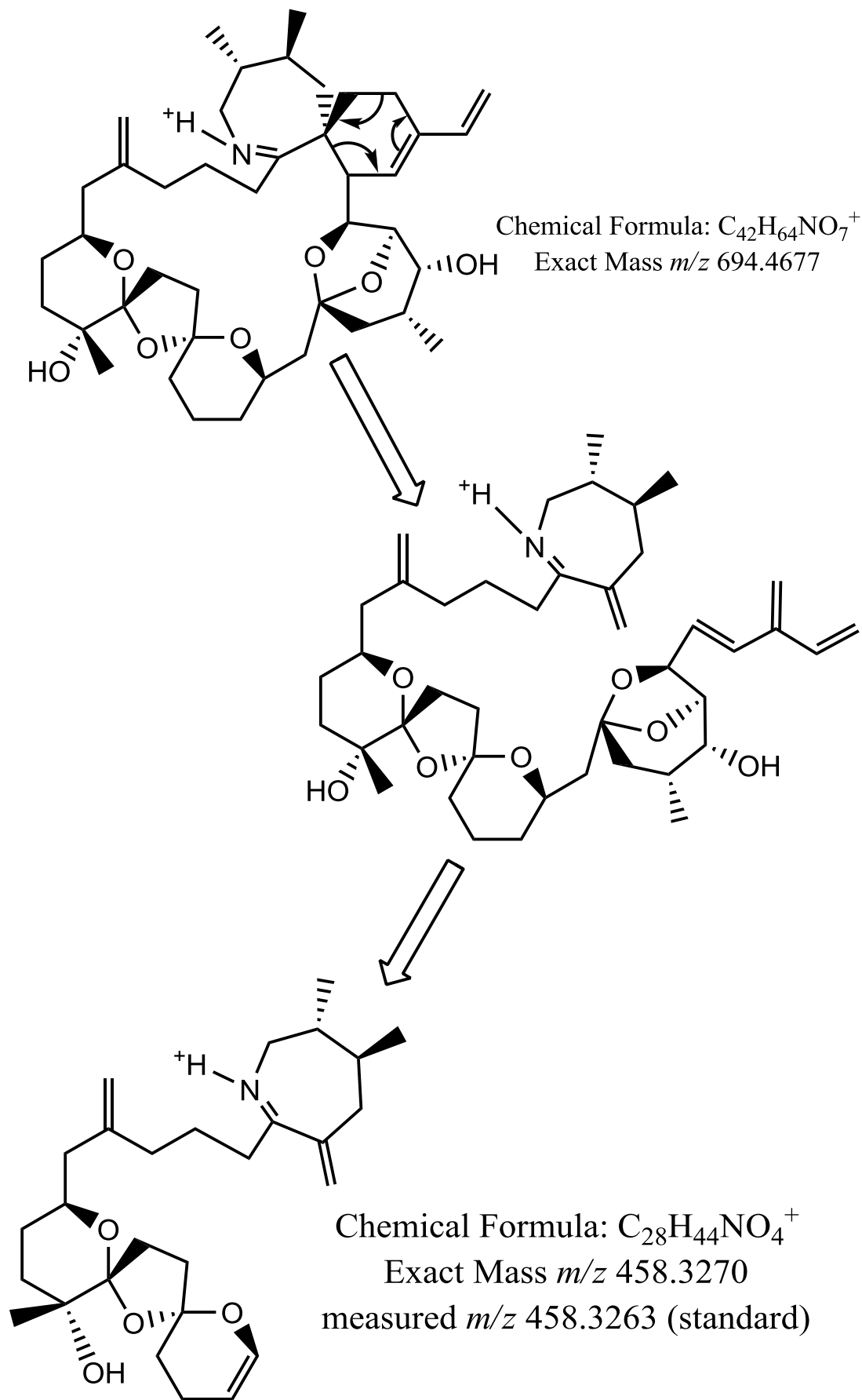


Figure 3. Proposed fragmentation scheme from PnTX-G to fragment  $m/z = 458.3270$





4. Article : Extended evaluation of polymeric and lipophilic sorbents for passive sampling of marine toxins

## **Extended evaluation of polymeric and lipophilic sorbents for passive sampling of marine toxins**

Zita Zendong<sup>a\*</sup>, Christine Herrenknecht<sup>b</sup>, Eric Abadie<sup>c</sup>, Charline Brissard<sup>a</sup>, Céline Tixier<sup>d</sup>,  
Florence Mondeguer<sup>a</sup>, Véronique Séchet<sup>a</sup>, Zouher Amzil<sup>a</sup>, Philipp Hess<sup>a</sup>.

<sup>a</sup>  
Ifremer, Laboratoire Phycotoxines, Rue de l'Île d'Yeu, 44311 Nantes, France;

<sup>b</sup>  
LUNAM, Université de Nantes, MMS EA2160, Faculté de Pharmacie, 9 rue Bias, 44035  
Nantes, France;

<sup>c</sup>  
Ifremer, Laboratoire Environnement Ressources Languedoc-Roussillon, Av. Jean Monnet,  
34203 Sète, France.

<sup>d</sup>  
Ifremer, Laboratoire Biogéochimie des Contaminants Organiques, Rue de l'Île d'Yeu, 44311  
Nantes, France;

\*Corresponding author at : Ifremer/Laboratoire phycotoxines, Rue de l'Île D'Yeu, 44311  
Nantes, France.

Tel.: +33 (2) 40 37 44 74. E-mail address: [Zita.Zendong@ifremer.fr](mailto:Zita.Zendong@ifremer.fr)

**ABSTRACT :**

Marine biotoxins are algal metabolites that can accumulate in fish or shellfish and render these foodstuffs unfit for human consumption. These toxins, released into seawater during algal occurrences, can be monitored through passive sampling. Acetone, methanol and isopropanol were evaluated for their efficiency in extracting toxins from algal biomass. Isopropanol was chosen for further experiments thanks to a slightly higher recovery and no artifact formation. Comparison of Oasis HLB, Strata-X, BondElut C18 and HP-20 sorbent materials in SPE-mode led to the choice of Oasis HLB, HP-20 and Strata-X. These three sorbents were separately exposed as passive samplers for 24 h to seawater spiked with algal extracts containing known amounts of okadaic acid (OA), azaspiracids (AZAs), pinnatoxin-G (PnTX-G), 13-desmethyl spirolide-C (SPX1) and palytoxins (PITXs). Low density polyethylene (LDPE) and silicone rubber (PDMS) strips were tested in parallel on similar mixtures of spiked natural seawater for 24h. These strips gave significantly lower recoveries than the polymeric sorbents. Irrespective of the toxin group, the adsorption rate of toxins on HP-20 was slower than on Oasis HLB and Strata-X. However, HP-20 and Strata-X gave somewhat higher recoveries after 24h exposure. Irrespective of the sorbent tested, recoveries were generally highest for cyclic imines and OA group toxins, slightly lower for AZAs, and the lowest for palytoxins. Trials in re-circulated closed tanks with mussels exposed to *Vulcanodinium rugosum* or *Prorocentrum lima* allowed for further evaluation of passive samplers. In these experiments with different sorbent materials competing for toxins in the same container, Strata-X accumulated toxins faster than Oasis HLB, and HP-20, and to higher levels. The deployment of these three sorbents at Ingril French Mediterranean lagoon to detect PnTX-G in the water column showed accumulation of higher levels on HP-20 and Oasis HLB compared to Strata-X. This study has significantly extended the range of sorbents for passive sampling of marine toxins. In particular, sorbents were included that had previously been evaluated for polyhalogenated contaminants, pharmaceuticals, phytochemicals or veterinary residues. Moreover, this study has for the first time demonstrated the usefulness of the

polymeric Oasis HLB and Strata-X sorbents in laboratory and field studies for various microalgal toxins.

**Keywords:** Passive sampling; marine toxins; Oasis HLB; Strata-X; LDPE; PDMS; SPATT

## 1. Introduction

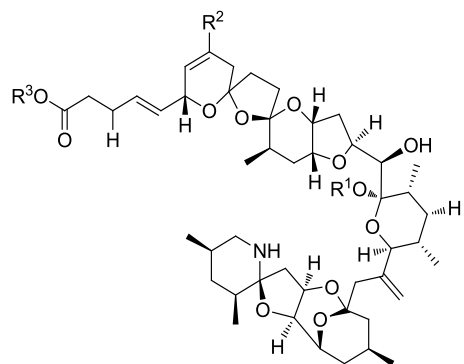
Marine toxins are an important international issue for public health and the fish and shellfish industry. Indeed, toxins produced by a number of naturally occurring planktonic and benthic/epiphytic microalgae can accumulate in seafood and render them improper for human consumption. To protect consumers from intoxication, many countries, essentially those with important shellfish industries, have set up monitoring programs. Traditional monitoring through phytoplankton monitoring and shellfish testing has proven to be an effective warning method. However, phytoplankton samples can only describe a 'snapshot' of the microalgal community at a single point in space and time (Lane et al., 2010), and some microalgal species are too small (< 20 µm) or benthic/epiphytic. Such algae are hard to identify or detect as identification is difficult for organisms below 20 µm in size and benthic/epiphytic algae require specific, additional sampling protocols (MacKenzie, 2010). For these reasons, Solid Phase Adsorption Toxin Tracking (SPATT) has been introduced as a passive sampling technique to detect and accumulate toxins released into the water during algal blooms (MacKenzie et al., 2004). Another advantage of the SPATT technique is the fact that the targeted toxins do not undergo biotransformation unlike in shellfish (Jauffrais et al., 2013). Thus, the identification of microalgae through toxin profiles in passive samplers is simplified. Many different sorbents have been used for passive sampling all over the world, from HP-20 to SEPABEADS type resins (Fux et al., 2008; Li et al., 2011; Pizarro et al., 2013; Zhao et al., 2013), for the accumulation of microalgal or cyanobacterial toxins of different polarities (Kudela, 2011; Lacaze, 2012; Zhao et al., 2013). In the environment, passive sampling has proven to be useful to detect toxins released into seawater by benthic or very small pelagic microalgae like Pinnatoxins (PnTXs) (MacKenzie et al., 2011) or Azaspiracids (AZAs) (Fux et al., 2009), using HP-20 sorbent. This sorbent was also efficient in accumulating ciguatoxin and maitotoxin in *Gambierdiscus pacificus* cultures (Caillaud et al., 2011).

Besides SPATT designed for toxin monitoring, various passive samplers were developed for the monitoring of polar or hydrophobic organic contaminants (HOCs), such as Polar Organic Chemical Sampler (POCIS), or Low Density PolyEthylene (LDPE) and Polydimethylsiloxane (PDMS) strips. There are two different POCIS configurations: the pharmaceutical POCIS and the pesticide POCIS. In the first one the membrane encloses Oasis HLB sorbent, while in the

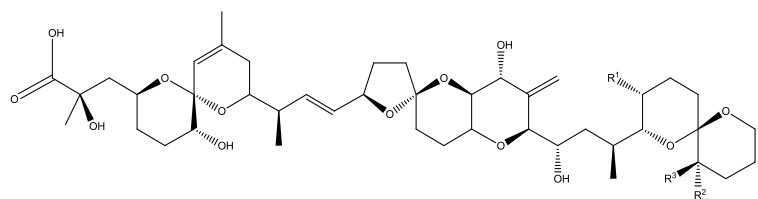
second the sorbent is a triphasic mixture of Isolute ENV<sup>+</sup> polystyrene divinylbenzene and Ambersorb1500 carbon dispersed on S-X3 Biobeads (Alvarez et al., 2004; Harman et al., 2012). POCIS devices are often used in aquatic environments to monitor polar organic chemicals (Alvarez et al., 2004; Harman et al., 2012; Kaserzon et al., 2012). For hydrophobic compounds, the first passive sampling device developed was the Semipermeable membrane device (SPMD) which is made of a layflat low density polyethylene (LDPE) membrane tube that contains a liquid film of triolein (Huckins et al., 1990). However, the use of SMPD can lead to various difficulties related to possible tearing of the membrane (loss of triolein) or the separation of triolein from HOCs. Moreover, a disadvantage of triolein is that it is too specific to be generically used for the monitoring of compounds of different polarities (Lacaze, 2012). Next to SMPD, single-phase polymeric sheets and films like LDPE (Allan et al., 2013; Bao et al., 2012) or silicone rubber (PDMS) (Rusina et al., 2007; Shea et al., 2006) have also been used for the accumulation of lipophilic compounds.

This study aims to evaluate the ability of Oasis<sup>®</sup> HLB, Strata-X<sup>™</sup>, BondElut<sup>™</sup> C18, LDPE and PDMS as passive samplers to accumulate marine toxins. Although passive sampling has been successfully used several times to monitor microalgal toxins using different bulk polymeric sorbents, Oasis HLB has, to our knowledge, never been evaluated as a passive sampling sorbent for phycotoxins, and Strata-X has been evaluated only once as a passive sampler for the accumulation of cyanotoxins (Wood et al., 2011). In this study we also evaluated the use of LDPE and silicone membrane strips for the accumulation of lipophilic toxins other than brevetoxins (BTXs) (Shea et al., 2006). This is also the first attempt to test samplers containing a low amount of sorbent (300 mg, ten times less than the amount typically used). Furthermore, in addition to lipophilic azaspiracids (AZAs), 13-desmethyl spirolide-C (SPX1), okadaic acid (OA), dinophysistoxin-1 (DTX1) and PnTX-G (Fig. 1), we have also tested our passive samplers for their ability to accumulate the amphiphilic palytoxins (PITXs).

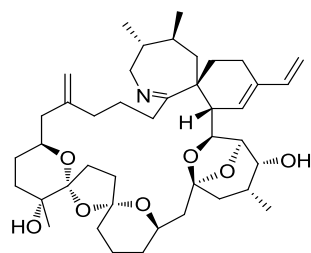
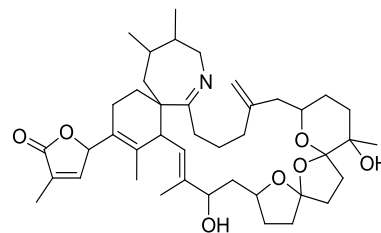
Different types of sorbents were investigated through various protocols: i) screening and optimisation of sorbents in SPE-mode, and choice of the sorbents appropriate for passive sampling; ii) passive samplers immersed in spiked seawater; iii) passive samplers in experimental tanks and iv) passive samplers in the field. Throughout the different protocols, sorbents and samplers were compared according to the amount of toxins they had accumulated.



	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>
<b>AZA1</b>	H	H	H
<b>AZA2</b>	H	CH <sub>3</sub>	H



	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>
<b>OA</b>	CH <sub>3</sub>	H	H
<b>DTX1</b>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>

**SPX1****PnTX-G**

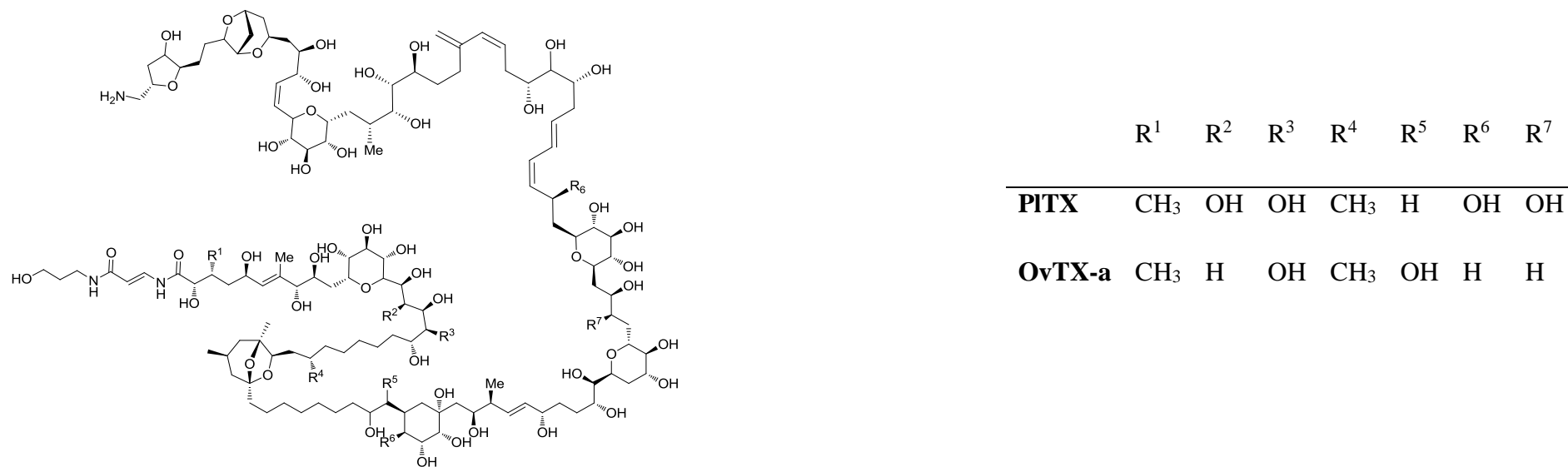


Figure 1: Structures of the toxins of interest: Azaspiracids 1 and 2 (AZA-1, AZA- 2), Okadaic acid (OA), Dinophysistoxin-1 ( DTX1), 13-desmethyl spirolide-C (SPX1), Pinnatoxin-G (PnTX-G), Palytoxin (PITX) and Ovatoxin-a (OvTX-a)



## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals and sorbent material

Certified standard solutions of OA, 13-DesMe-C (SPX1), AZA-1, 2 and 3, and PnTX-G were obtained from the National Research Council in Halifax, Canada. Purified Palytoxin (PITX) standard was from Wako (Japan). Methanol, acetonitrile, butanol, isopropanol, hexane, ethyl acetate and acetone were obtained as HPLC grade solvents from AtlanticLabo (Bordeaux, France) and Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). Acetic acid eluent for LC-MS and ammonium hydroxide (28–30%) were also acquired from Sigma-Aldrich. Milli-Q water was produced in-house to 18M $\Omega$ /cm quality, using a Milli-Q integral 3 system (Millipore). For analyses with the high resolution mass spectrometry instrument, acetonitrile and water of very high purity grade were obtained from Fischer Scientific (Illkirch, France).

Diaon<sup>®</sup> HP-20 polymeric resin was purchased as bulk resin from Sigma-Aldrich. Strata-X<sup>™</sup> (200 mg, 500 mg cartridges and bulk) and Oasis<sup>®</sup> HLB (30 mg, 200 mg and bulk) were supplied by Phenomenex (Le Pecq, France) and Waters (Saint Quentin Yvelines, France), respectively. Reverse phase BondElut<sup>™</sup> C18 cartridges (500 mg) and 3 mL capacity 2 frits-Reservoirs were from Agilent Technologies. AlteSil<sup>™</sup> translucent silicone rubber sheets (PDMS) of 500  $\mu$ m thickness were purchased from Altec Products Limited (Cornwall, UK). LDPE strips (70  $\mu$ m) were prepared from additive-free LDPE lay-flat tubing purchased from Brentwood Plastics (MO, USA).

### 2.2. Microalgae cultures and algal extracts

#### 2.2.1. Microalgae cultures

Algae paste from *Azadinium spinosum* and *Alexandrium ostenfeldii* were available from previous studies (Jauffrais et al., 2012b; Medhioub et al., 2011). *Prorocentrum lima*, *Vulcanodinium rugosum* and *Ostreopsis ovata* were cultured at the laboratory. *V. rugosum* (IFR-VRU-01 strain) was cultured using L1 medium without silicate, prepared with filtered (0.2  $\mu$ m) Mediterranean sea water. The culture was in batch mode (200 mL), with a photon flux density of 292  $\mu$ mol/m<sup>2</sup>/s. Temperature was set at 22°C. *P. lima* (PL4V and PL2V strains) was cultured using F/2 medium, prepared with filtered (0.2  $\mu$ m) Atlantic sea water.

The culture was in batch mode (300 mL), with a photon flux density of 181  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ . Temperature was set at 16°C. *O. ovata* strains, isolated in the bay of Villefranche-sur-Mer (France), were cultured using L1 medium without silicate, prepared with filtered (0.2 mm) Mediterranean seawater. Soil extract (2 mL/L of medium) (Andersen, 2005) was added to the medium. The culture was in batch mode (200 mL), with a photon flux density of 370  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ . Temperature was set at 22°C. All microalgae were cultured with a photoperiod of 16 h of light and 8 h of dark, and cells were collected during stationary phase by 20 min centrifugation at 3500 *g* and 4°C.

### 2.2.2 Algal extracts

For all spiking experiments, algal extracts were used rather than certified toxin standards. *Ostreopsis ovata* extracts were obtained according to a previously published procedure (Ciminiello et al., 2010), with the following modifications: sonication times were increased to 1 h with pulse mode (on ice) to ensure all cells were broken and three consecutive extractions were carried out, with 5 mL MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1, *v/v*) for each extraction step. The extracts were combined and evaporated to dryness under nitrogen stream before reconstitution in 5 mL of methanol/water (1:1, *v/v*). A protocol adapted from Jauffrais *et al.* (2012a and b) was used to obtain algal extracts for all other microalgae. Up to 1 g of algal paste was bath-sonicated and serially extracted using 3 x 5 mL of extraction solvent (organic solvent:water, 9:1, *v/v*). The combined supernatants were then gently evaporated to dryness under nitrogen at 45°C, and the residues reconstituted with 5 mL of methanol. Triplicate extractions with acetone, isopropanol or methanol as organic solvents, were investigated on *Vulcanodinium rugosum*, *Alexandrium ostenfeldii* and *Azadinium spinosum* to choose the most suitable solvent for maximum toxin recovery. Algal pellets (around 100mg) were accurately weighed before extraction and toxin concentrations were expressed as a function of algal mass (wet weight).

### 2.3. Instrumentation and analytical methods

Analyses were performed using a UHPLC system (1290 Infinity, Agilent Technologies) coupled to a 6540 UHD Accurate-Mass Q-ToF (Agilent Technologies) equipped with a dual ESI source. Chromatographic separation was achieved on a Phenomenex Kinetex C18 (150 x 2.1 mm, 1.8  $\mu\text{m}$ ) column, maintained at 40°C and with a flow rate of 500  $\mu\text{L}/\text{min}$ . The binary mobile phase consisted of water (A) and acetonitrile (B), both containing 0.1% acetic acid. The total run time of one chromatographic run was 21 min. The elution gradient started with

5% of B held constant for 2.4 min, then 100% B was reached within 11.6 min. After a hold time of 2.5 min at 100% B, 5% B was reached within 50 s, followed by 4 min re-equilibration of the column at 5% B. To avoid cross contamination of samples, the needle was washed for 10 s in the flush port with MeOH 90% before each injection.

The instrument was operated in positive mode and full-scan analysis was performed over  $m/z$  65 to 1700 range and with an acquisition range of 2 spectra/s. Capillary voltage was 2000 V and fragmentor voltage 200 V. The temperature of the Jet Stream Technologies™ source was set at 200°C with drying gas at 5 L/min and sheath gas at 12 L/min at 355°C. The resolution achieved was generally between 25,000 and 40,000 depending on mass. In full-scan mode, the instrument had a mass error of 1 ppm, which can increase to less than 5 ppm for very small molecules or low abundance.

The exact mass-to-charge ratios ( $m/z$ ) used for toxin analyses on the Q-ToF instrument were as follows: SPX1 692.4521; PnTX-G 694.4678; AZA1 842.5049; AZA2 856.5206; OA 805.4733; DTX1 819.4889; PITX 906.4858; OvTX-a (896.1573); PTX2 (881.4658).

Instrument limit of detection was 4.5 ng/mL for OA, 0.35 ng/mL for AZA1, 0.27 ng/mL for SPX1, 0.34 ng/mL for PnTX-G and 100 ng/mL for PITX.

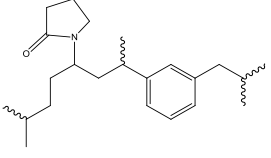
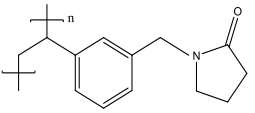
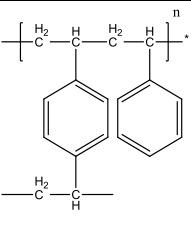
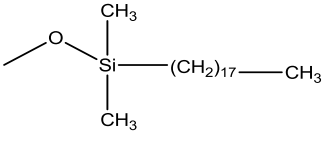
Statistical evaluations were carried out using SigmaPlot 12.5. The significance test used to discriminate between the accumulation capabilities of the sorbents was the t-test.

#### 2.4. Screening of sorbent material and optimization of toxin recovery

A wide range of cartridges and sorbents from different manufacturers are available to extract compounds with various chemical properties. To choose sorbents suitable for passive sampling, Oasis HLB, Strata-X, BondElut C18 and HP-20 were evaluated. The properties of these sorbents are listed in Table 1. Algal extracts (2.2.2) were quantified to determine the exact amount of toxin and used to prepare spiking solutions. Comparison was based on toxin recoveries obtained for each sorbent.

**Table 1:** Oasis HLB, Strata-X, HP-20 and BondElut C18 properties.

Sorbent	Structure	Surface area (m <sup>2</sup> /g)	Pore volume (cm <sup>3</sup> /g)	Average pore radius (Å)	Particle size (µm)

<b>Oasis HLB</b>		767	1.21	81	50 - 65
<b>Strata-X</b>		799	1.24	90	28 - 34
<b>HP-20</b>		500	1.3	200	397 - 840
<b>BondElut C18</b>		500	-	60	40 and 120 and irregular

**Table 2:** LDPE and PDMS properties

<b>Sorbent</b>	<b>LDPE</b>	<b>PDMS</b>
<b>Supplier</b>	Brentwood Plastics	Altec Products
<b>Thickness (µm)</b>	70	500

#### 2.4.1. Screening of the sorbent materials.

Commercially available Oasis HLB (30 mg), Strata-X (200 mg), BondElut C18 (200 mg) and HP-20 (200 mg) SPE cartridges were investigated. Spiked seawater (1 mL) was loaded onto cartridges previously preconditioned with MeOH followed by Milli-Q water. The spiked seawater contained microalgal extracts with quantified toxin amounts as follows: 2.2 ng of

SPX1, 11.5 ng of AZA1, 15.5 ng of PnTX-G, 104 ng of OA and 3639 ng of OvTX- a. Each cartridge was then washed with adapted volumes of 5% MeOH (500  $\mu$ L to 2 mL depending on the amount of sorbent), and eluted with 100% MeOH (2 to 3 mL). The MeOH was evaporated to dryness under a nitrogen stream at 45°C. Finally, the dry residue was then reconstituted in 500  $\mu$ L of MeOH, or in 500  $\mu$ L of a mixture of MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) for OvTX-a, before analysis.

#### *2.4.2. Choice of eluent to improve OvTX-a recoveries*

Two different solvents were tested in triplicate as elution solvents on Oasis HLB (30 mg) and Strata-X (200 mg) cartridges: MeOH and MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1, v/v). Both cartridges were first conditioned with methanol then Milli-Q water. Spiked seawater (1 mL) was loaded onto each cartridge. The seawater had been spiked with microalgal extracts to yield the following final amounts in the spiked seawater: 2.2 ng of SPX-1, 12 ng of AZA-1, 15 ng of PnTX-G, 105 ng of OA and 161 ng of OvTX-a. After a washing step with 5% methanol (500  $\mu$ L for HLB and 2 mL for Strata-X), cartridges were eluted with 6 mL of each solvent to be investigated. Eluents were evaporated to dryness under nitrogen stream at 45°C. The dry residue was reconstituted in 250  $\mu$ L of MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) and transferred into HPLC vials before analysis.

#### *2.4.3. Evaluation of toxin adsorption on SPE cartridges*

Cartridges (Oasis HLB, Strata-X, BondElut C18) were carefully emptied and only the bottom frit was left. The cartridges were thoroughly cleaned with MeOH and Milli-Q water to ensure all residual adsorbent was removed. Reservoirs of 3 mL capacity and with 2 frits (Agilent) were also tested (Supplementary material S1). Samples (1 mL seawater) containing 2.2 up to 161 ng of toxins (OA, AZA1, PnTX-G, SPX1, OvTX-a) were loaded onto the emptied and pre-cleaned cartridges. Washing was done with 1 mL MeOH (5%) and elution with 2 x 1 mL MeOH. Load, wash and elution were all recovered and directly analysed.

#### *2.4.4. Optimization of load volumes on Oasis HLB (30 mg) SPE cartridges.*

Load volumes of 5 mL, 15 mL and 25 mL were tested on HLB 30 mg cartridges with samples containing from 2.2 ng up to 160.7 ng of various toxins (OA, AZA1, PnTX-G, SPX1, OvTX-a). Before loading, the cartridges were first conditioned with 1 mL MeOH followed by 1 mL Milli-Q water. Then they were washed with 500  $\mu$ L MeOH (5%) and eluted with 6 mL

MeOH. Elution fractions were evaporated to dryness under nitrogen stream at 45°C and reconstituted in 250 µL of MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) before analysis.

#### *2.4.5. Evaluation of Oasis HLB, Strata-X, BondElut C18 and HP-20 (200 mg) inside Agilent Reservoirs*

Each adsorbent (200 mg) was packed inside Agilent reservoirs with 2 frits. Spiked seawater (2 mL) was loaded onto cartridges previously preconditioned with MeOH followed by Milli-Q water. The spiked seawater contained extracts with quantified toxin amounts as follows: 14 ng of SPX1, 19 ng of AZA1, 18 ng of PnTX-G, 238 ng of OA and 359 ng of OvTX- a. Each cartridge was then washed with adapted volumes of 5% MeOH (2 mL to 3.5 mL depending on sorbent type), and eluted with 100% MeOH (10 mL). The MeOH was evaporated to dryness under a nitrogen stream at 45°C. Finally, the dry residue was then reconstituted in 250 µL of a mixture of MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) before analysis.

#### *2.5. Laboratory experiments: design, handling and deployment*

HP-20, Strata-X and Oasis HLB SPATT bags and discs were essentially identical to those from Mackenzie *et al.* (2004) and Rundberget *et al.* (2009), respectively. Lower amounts of resin were used (100 mg to 300 mg weight as delivered), and a 30 µm nylon mesh (Mougel, France) was used with regards to the small particle size of Strata-X and Oasis HLB sorbents (Table 1). For HP-20 resin, we noted a significant water content in the product as delivered, the dry weights for this resin are only ca. 40% of the weights as delivered. Before exposure, SPATT bags and discs were soaked overnight in methanol. They were then gently washed with Milli-Q water to remove methanol residues, and soaked again during 2 hours in Milli-Q water. After conditioning, care was taken to keep the SPATTs in Milli-Q water at 4-6 °C, for not more than 2 days before use.

LDPE and PDMS membranes were cut into 2.8 x 5 cm strips (14 cm<sup>2</sup> surface area). Conditioning method of LDPE strip was adapted from Shea *et al.* (2006), with an extra pre-extraction step with methanol during 4 hours. PDMS strips were thoroughly pre-extracted with ethyl acetate during 48 hours in a Soxhlet apparatus (Rusina *et al.*, 2007). Both membrane strips were then allowed to dry, weighed and transferred separately into clean glassware and kept at -20 °C before use.

##### *2.5.1. Extraction protocol for Oasis HLB, Strata-X and HP-20 passive samplers*

After 24 h exposure, polymeric resins were extracted using a modified version of the extraction protocol developed by Fux *et al.* (2008). Briefly, the SPATTs bags and discs were rinsed twice in 500 mL Milli-Q water and the remaining surface water removed by blotting with paper. The resin was transferred into polypropylene reservoirs of 3 mL capacity with 2 frits (Agilent) placed on a manifold. Vacuum was applied to get rid of remaining water and the resin was eluted with 15 mL methanol drop wise. The extracts were evaporated to dryness under a nitrogen stream at 45°C. The dry residue was finally reconstituted with 500 µL of MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1, v/v), filtered on Nanosep MF centrifugal filters 0.2µm (Pall) and transferred into LC vials for analysis.

### 2.5.2. Extraction protocol for LDPE and PDMS sheets

At time 0 and after 1h, 7h, 24h and 72h of exposure, LDPE and PDMS strips were removed from the seawater, left to dry and then sequentially extracted twice with methanol. The fractions were gathered and evaporated to dryness under a stream of nitrogen at 45°C and the dry residue was reconstituted in 500 µL of MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1, v/v).

### 2.5.3. SPATTs, LDPE and PDMS sheets deployed in spiked seawater

Algal extracts from *A. spinosum*, *A. ostensfeldii*, *V. rugosum*, *P.lima* and *O. ovata* were used to spike seawater. The total content of methanol in seawater was approximately 0.2 % to ensure no modification of partition mechanisms. Spiking concentrations for each toxin were as follows: 22.4 ng/mL for OA, 1.36 ng/mL for SPX1, 1.76 ng/mL for AZA1, 1.70 ng/mL for PnTX-G and 33.7 ng/mL for OvTX-a.

Conditioned SPATT bags containing 100 mg, 200 mg or 300 mg of adsorbent (Oasis HLB, HP-20 or Strata-X) were individually placed in spiked seawater inside a closed Erlenmeyer flask. During the experiment beakers and Erlenmeyer flasks were agitated at ca. 90 rpm.

Each membrane strip was installed on a holding frame and placed inside a closed beaker containing spiked seawater solution. In order to avoid any cross contamination of membrane strips with unwanted molecules, glassware had carefully been cleaned and heated for 6 h at 400°C before use.

To monitor toxin accumulation using passive samplers, 1 mL (for SPATT experiment) and 3 mL (for LDPE/PDMS sheet experiment) of seawater were extracted on Oasis HLB SPE cartridges with the previously optimised protocol (2.5). Samples (1 mL to 3 mL) of seawater were withdrawn at times 0 h, 1 h, 7 h, and 24 h for SPATTs and up to 72 h for membrane strips.

#### 2.5.4. SPATT exposure in cylindro-conical tanks: seawater containing mussels and microalgae

Mussels (*Mytilus galloprovincialis*, obtained from Galicia, Spain, and *Mytilus edulis* from Pen Bé, France) were allowed a 3-day period of adaptation in separate 128 L seawater tanks, maintained in the laboratory at 18°C. *Mytilus galloprovincialis* mussels (9 kg) were fed with a culture of *V. rugosum*, while *Mytilus edulis* mussels (8 kg) were fed with a culture of *P. lima*. Both cultures had previously been concentrated by filtering them over a 100 µm nylon mesh to remove culture media and mucus. In each cylindro-conical tank, conditioned SPATT discs (300 mg) of Oasis HLB, Strata-X and HP-20 were immersed simultaneously in triplicate and extracted after 3-day exposure.

#### 2.6. Field trials at Ingril Lagoon

Ingril is a French Mediterranean lagoon, where the presence of the dinoflagellate *Vulcanodinium rugosum* has already been reported (Hess et al., 2013; Nézan and Chomérat, 2011). Conditioned SPATT discs containing 300 mg Oasis HLB, Strata-X or HP-20 were deployed on three consecutive weeks at South Ingril Lagoon during July 2013. Three SPATT discs of each type of sorbent were deployed at approximately 50 cm depth. The samplers were deployed inside cages typically used for POCIS™ deployment. After deployment, the samplers were kept at -20°C until extraction.

### 3. results

#### 3.1. Microalgae extraction: solvent efficiencies

*A. ostentfeldii*, *A. spinosum* and *V. rugosum* algal pellets were extracted in triplicate and the amount of toxin extracted was calculated based on SPX1, AZA1 and PnTX-G calibration curves. Toxin concentration was reported to the mass (g) of algal pellet used for each extraction. Isopropanol was more efficient than methanol or acetone for the extraction of SPX1, PnTX-G and AZA1 (Table 3). Overall, for each toxin, isopropanol extracted 4% more toxin than methanol and 7% more toxin than acetone.



**Table 3:** Average amounts (mean  $\pm$  standard deviation (=SD), n=3) of toxin extracted from *A. ostenfeldii*, *A. spinosum* and *V. rugosum* using acetone, methanol and isopropanol

		Acetone	Methanol	Isopropanol
<i>Toxin concentration (ng/g algae pellet)</i>	<i>SPX-1</i>	5207 $\pm$ 136	5422 $\pm$ 183	5788 $\pm$ 137
	<i>AZA-1</i>	23269 $\pm$ 245	24220 $\pm$ 1234	24651 $\pm$ 1090
	<i>PnTX-G</i>	26008 $\pm$ 1306	26680 $\pm$ 243	27732 $\pm$ 1143

### 3.2. Comparison of sorbents in SPE-mode

For the first experiment with commercially available Oasis HLB (30 mg), Strata-X (200 mg), BondElut C18 (500 mg) and home packed HP-20 (200 mg) SPE cartridges, recoveries of toxins were generally above 50% except for OvTX-a. Indeed, no OvTX-a was recovered from BondElut C18 and HP-20, and only 13% was recovered from Oasis HLB and 25% from Strata-X (Table 4).

**Table 4:** Toxin recoveries (%) from commercially available sorbents for the first screening experiment

	OASIS HLB (30 mg)	STRATA-X (200 mg)	BONDELUT C18 (500 mg)	HP-20 (200 mg)
<i>SPX-1</i>	88	85	83	59
<i>PnTX-G</i>	100	92	48	51
<i>OA</i>	111	100	95	83
<i>DTX-1</i>	119	103	95	86
<i>AZA-1</i>	67	66	46	48
<i>AZA-2</i>	57	60	34	44
<i>OvTX-a</i>	13	25	n.d	n.d

*n.d:* not detected

### 3.2.1. Choice of eluent to improve OvTX-a recoveries

Average recoveries of toxins (three replicates) from Oasis HLB and Strata-X cartridges using MeOH and MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) indicated that no toxin was recovered from Strata-X using the latter solvent (Table 5). Only OA (15%) could be recovered from Oasis HLB when MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) was used and best recoveries were obtained with MeOH. For pure MeOH, recoveries from Oasis HLB ranged from 20% (OvTX-a) to 97% (for OA) and those from Strata-X ranged from 9% (OvTX-a) to 85% (OA). AZA-1 and 2 had low recoveries compared to the other toxins, except for OvTX-a, the recovery of which was even lower.

**Table 5:** Recoveries (average  $\pm$  SD, n=3) obtained from Oasis HLB (30 mg) and Strata-X (200 mg) cartridges eluted with MeOH and MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1, v/v).

Recoveries (%)		SPX- 1	PnTX- G	OA	DTX- 1	AZA- 1	AZA- 2	OvTX- a
<i>MeOH</i>	<i>HLB</i>	80 $\pm$ 4	76 $\pm$ 1	97 $\pm$ 3	90 $\pm$ 2	57 $\pm$ 3	50 $\pm$ 3	20 $\pm$ 1
	<i>Strata-X</i>	72 $\pm$ 3	70 $\pm$ 2	85 $\pm$ 2	79 $\pm$ 2	66 $\pm$ 4	59 $\pm$ 4	9 $\pm$ 4
<i>MeOH/H<sub>2</sub>O</i> (1:1, v/v)	<i>HLB</i>	n.d	n.d	15 $\pm$ 2	n.d	n.d	n.d	n.d
	<i>Strata-X</i>	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d

*n.d:* not detected

### 3.2.2. Assessment of optimum load volume

Increasing sample volumes were loaded onto Oasis HLB (30 mg) cartridges to determine maximum load capacity. For all toxins, recoveries slightly increased from 5 mL to 15 mL load but declined with 25 mL load (Table 6). The load itself was also analysed for 5 and 15 mL

volumes after passage through the cartridge and no toxins had been detected for these load volumes. Yields ranged from 45% (AZA2) to 102% (DTX1). For OvTX-a, recoveries were significantly lower than for other toxins (around 10%) and quite similar regardless of the volume of sample loaded.

**Table 6:** Recoveries (average in %  $\pm$  SD, n=4) with an elution step of 6 mL MeOH for increasing sample volume (5 – 25 mL) onto Oasis HLB (30 mg) cartridges.

<i>Load volumes</i>	<i>SPX1</i>	<i>PnTX-G</i>	<i>OA</i>	<i>DTX1</i>	<i>AZA1</i>	<i>AZA2</i>	<i>OvTX-a</i>
<i>5 mL</i>	<i>72 <math>\pm</math> 2</i>	<i>79 <math>\pm</math> 3</i>	<i>82 <math>\pm</math> 2</i>	<i>96 <math>\pm</math> 3</i>	<i>54 <math>\pm</math> 2</i>	<i>45 <math>\pm</math> 2</i>	<i>14 <math>\pm</math> 2</i>
<i>15 mL</i>	<i>74 <math>\pm</math> 2</i>	<i>80 <math>\pm</math> 1</i>	<i>86 <math>\pm</math> 4</i>	<i>102 <math>\pm</math> 3</i>	<i>60 <math>\pm</math> 2</i>	<i>48 <math>\pm</math> 2</i>	<i>13 <math>\pm</math> 5</i>
<i>25 mL</i>	<i>61 <math>\pm</math> 3</i>	<i>68 <math>\pm</math> 3</i>	<i>71 <math>\pm</math> 2</i>	<i>81 <math>\pm</math> 5</i>	<i>48 <math>\pm</math> 1</i>	<i>37 <math>\pm</math> 1</i>	<i>9 <math>\pm</math> 2</i>

### 3.2.3. Evaluation of Oasis HLB, Strata-X, BondElut C18 and HP-20 inside 2-frits-reservoir (Agilent)

To make sure toxin adsorption on cartridge reservoirs would not jeopardize the comparison between Oasis HLB, Strata-X, BondElut C18 and HP-20 sorbents, the same cartridge reservoir (Agilent) and the same amount of sorbent (200 mg) were used for all sorbents. Recoveries equal to or higher than 90% were obtained for OA, DTX1 and PnTX-G on BondElut C18, Oasis HLB and Strata-X (Fig. 2). For AZA1 and SPX1, recoveries ranged from 55 to 80%. Compared to the other toxins, OvTX-a (35%) and AZA-2 (55%) recoveries were somewhat lower on all cartridges, especially for OvTX-a. BondElut C18 results were comparable to those of Oasis HLB or Strata-X, except for OvTX-a for which Oasis HLB recoveries were significantly lower ( $P = 0.006$ ). It is noteworthy that HP-20 gave the lowest recoveries for PnTX-G, OA and DTX-1, with statistically significant differences from the other sorbents ( $P < 0.001$ ). The recoveries of SPX1 and AZA-1 and 2 from HP-20 were also lower compared to the other resins, but the difference observed was not statistically significant ( $P > 0.06$ ).

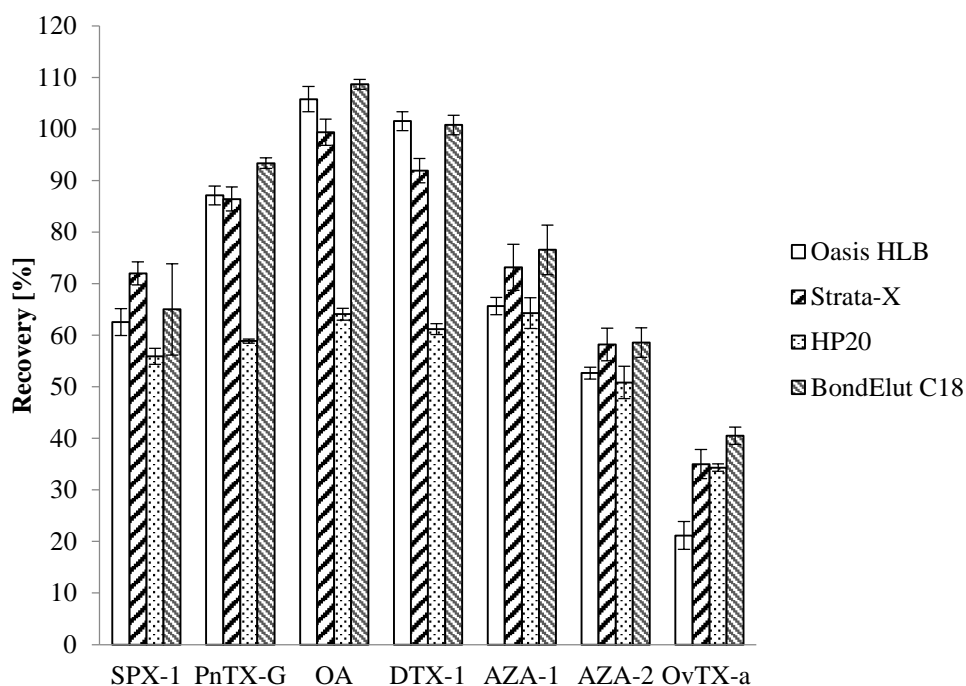


Fig 2: Average toxin recoveries (%) from Oasis HLB, Strata-X, BondElut C18 and HP-20 packed in the same SPE reservoir with 2-frits (Agilent). Error bars are standard deviations (n=3).

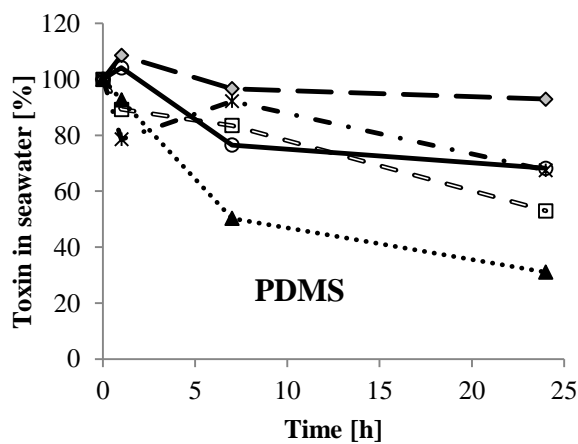
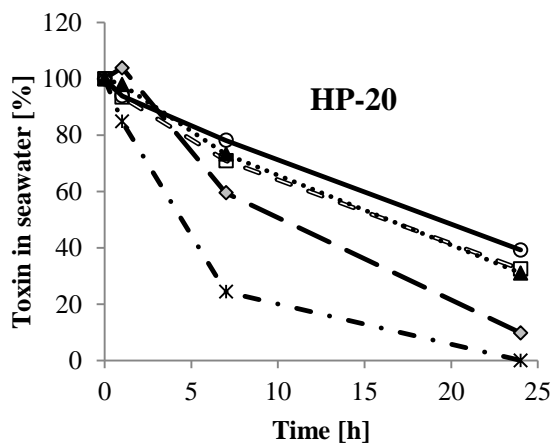
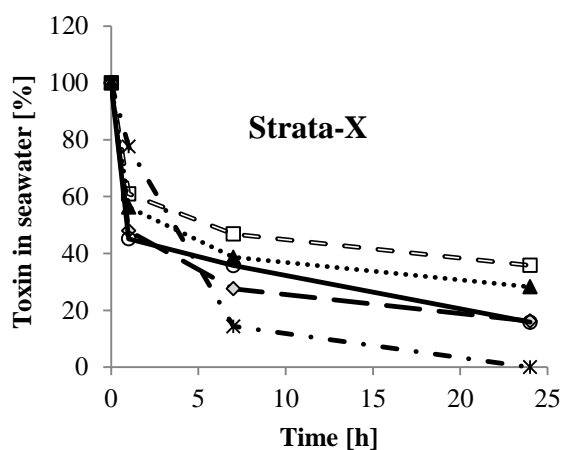
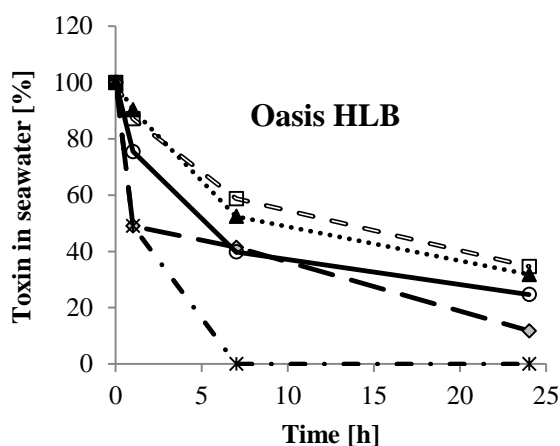
### 3.3. Comparison of passive samplers at laboratory scale

#### 3.3.1. Spiked seawater

##### 3.3.1.1 Monitoring of toxin disappearance from spiked seawater exposed to Oasis HLB, Strata-X, HP-20, LDPE and PDMS strips

Oasis HLB, Strata-X, HP-20, LDPE and PDMS passive samplers have been exposed to spiked seawater during 24h. It is important to note that spiking concentrations were voluntarily very high (five times each toxin LOD/mL) to ensure decrease of toxin in the water could be followed. Toxin content in seawater was monitored over the 24 h of exposure (Fig. 3 A-E). For the polymeric sorbents, first there was a rapid decrease until time 7h, and then the concentration continued to slowly decrease from 7h to 24h. For each toxin, similar decrease was observed for Oasis HLB, Strata-X and PDMS, with the exception of OvTX-a. For HP-20, the decrease was more linear than for the other samplers. Comparing these four passive samplers, it was obvious that during the first 7 hours of exposure, and from top to down,

Strata-X seemed to accumulate faster than Oasis HLB, HP-20 and PDMS. Despite the somewhat slower decrease with HP-20, the amount of toxin remaining in the seawater after 24 h was similar for Strata-X, HP-20 and Oasis HLB (i.e 0% for OvTX-a and between 10 and 30% for the other toxins). This amount was also comparable in the case of PDMS for PnTX-G, but significantly higher for the other toxins. Of all the samplers, LDPE seemed to be the least effective. Indeed, only AZA1 and OvTX-a appeared to be removed from the seawater by this sampler.



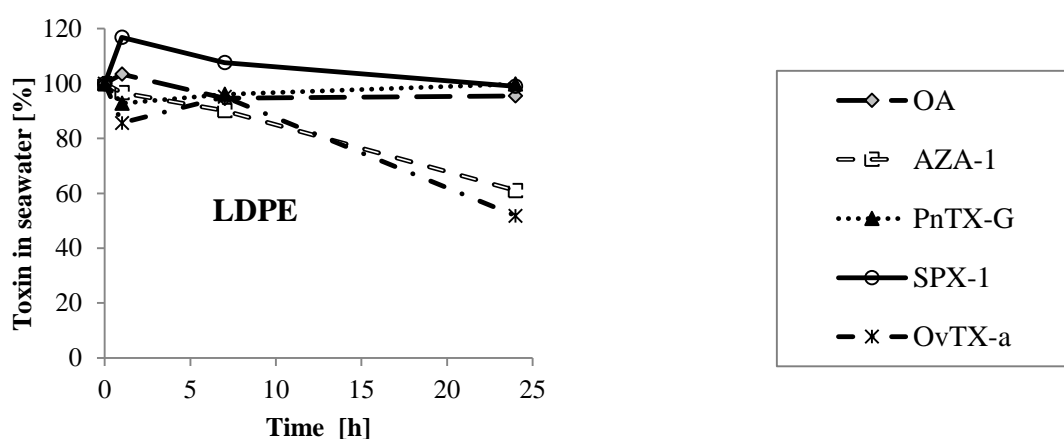


Fig 3: Toxin disappearance from seawater of OA, AZA1, PnTX-G, SPX1 and OvTX-a for Oasis HLB (300 mg), Strata-X (300 mg), HP-20 (300 mg), PDMS and LDPE passive samplers.

### 3.3.1.2. Toxin recovery on each sampler after 24h exposure

After 24h exposure to spiked seawater, passive samplers were extracted to determine the amount of toxin accumulated by each sampler. Recoveries from LDPE were negligible for all toxins (Fig. 4). For AZA1, PnTX-G and SPX1, HP-20 was the most suitable sampler. OA and OvTX-a recoveries were slightly better on Strata-X resin. Of the three resin-type passive samplers, Oasis HLB was the one that gave the lowest but acceptable recoveries. Although recovery using PDMS was generally significantly lower compared to the resin phases, PnTX-G was significantly better recovered by PDMS membrane strips than by Strata-X and Oasis HLB. In summary, Oasis HLB, Strata-X and HP-20 were all able to accumulate OA, AZA1, PnTX-G, SPX1 and OvTX-a, with different efficiencies. PDMS membrane strips showed a good accumulation of PnTX-G, and were also able to accumulate AZA1 and SPX1 but with unsatisfactory yields. LDPE was the poorest passive sampler of all those investigated. All toxins and samplers considered, HP-20 consistently produced recoveries above 50%, apart from OvTX-a, which had poor recoveries on all phases except on Strata-X.

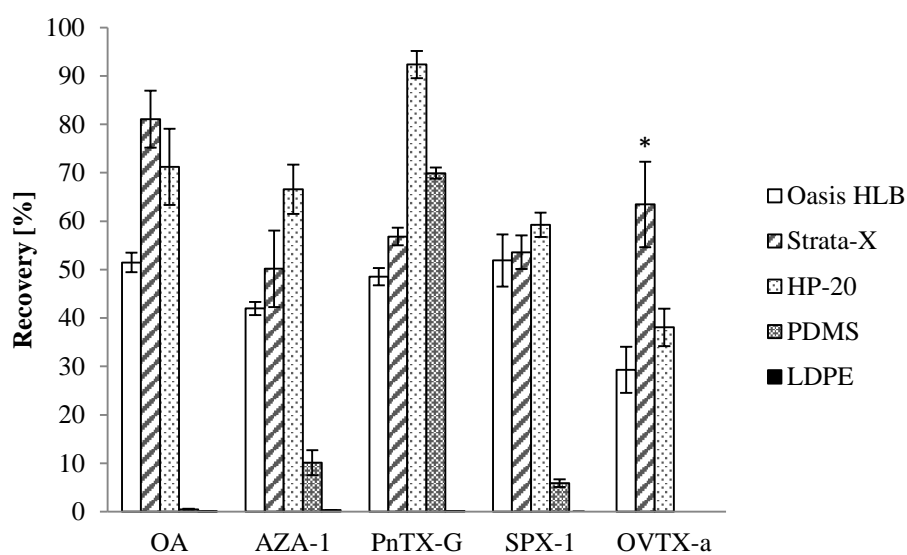


Fig 4: OA, AZA1, PnTX-G, SPX1 and OvTX-a recoveries from Oasis HLB, Strata-X, HP-20, PDMS and LDPE after 24h immersion in spiked seawater. Values for Oasis HLB, Strata-X and HP-20 are mean values from three SPATT bags containing 100 mg, 200 mg or 300 mg of resin. Error bars represent standard deviations (n=3). \* Strata-X (n = 2) significantly higher than Oasis HLB ( $P < 0.001$ , n = 3) and HP-20 ( $P = 0.043$ , n = 3).

### 3.3.2. Tank trials

Oasis HLB, Strata-X and HP-20 SPATTs (300 mg) were simultaneously exposed inside tanks containing mussels and *P. lima* or *V. rugosum* microalgal cultures. As a consequence, those SPATTs were in competition. Strata-X and Oasis HLB exceptionally accumulated more toxins than the HP-20 sampler (Fig. 5). The amount of PnTX-G, OA and DTX-1 was slightly higher on Strata-X than on Oasis HLB, however, this difference was not statistically significant ( $P = 0.462$ ).

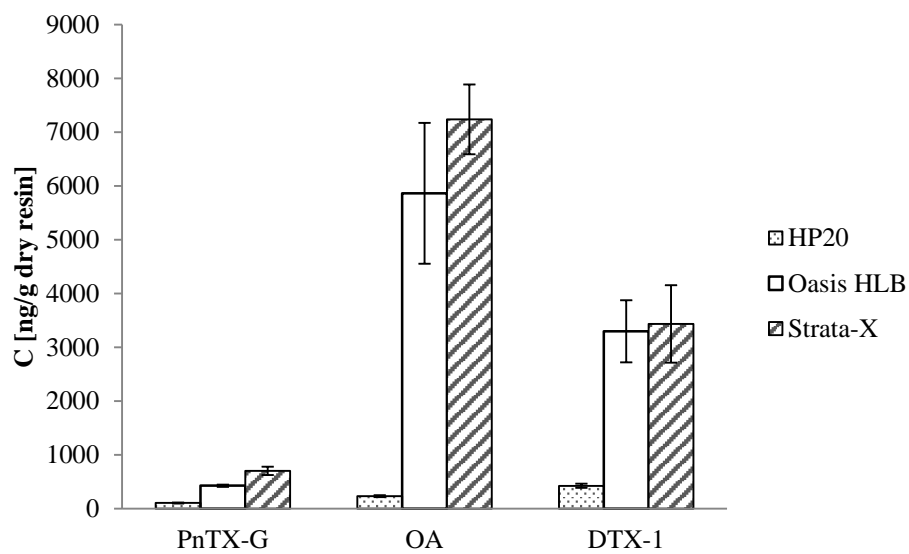
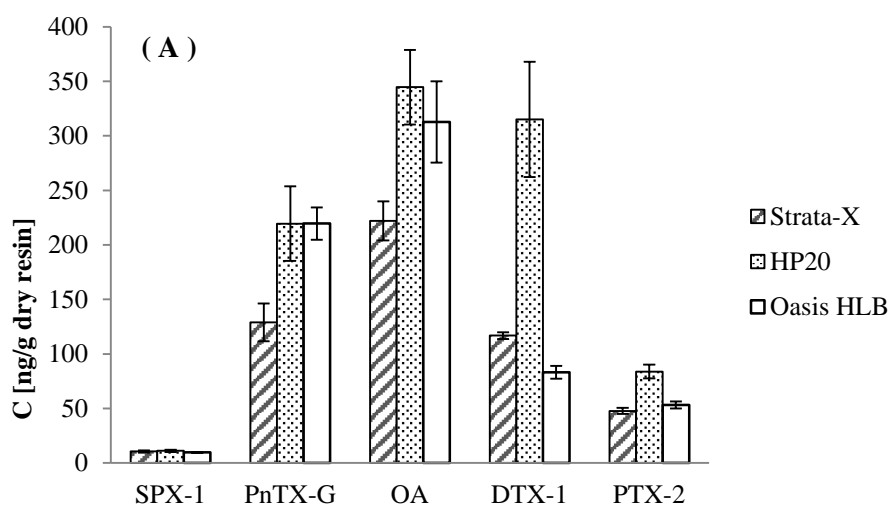


Fig 5: Amount of toxin (average in [ng/g dry resin]  $\pm$  SD) accumulated on HP-20, Oasis HLB and Strata-X exposed for 3 days in two cylindro-conical tanks (tank 1: *M. edulis* fed with *V. rugosum*; tank 2: *M. galloprovincialis* fed with *P. lima*).



### 3.4. Comparison of Oasis HLB, Strata-X and HP-20 samplers at Ingril lagoon

For assessment of the passive samplers in the field, Oasis HLB, Strata-X and HP-20 SPATTs were deployed in July at Ingril Lagoon on a weekly basis. All three samplers were able to accumulate five toxins in this lagoon: SPX1, PnTX-G, OA, DTX1 and PTX2 (Fig. 6A). The three samplers also had similar accumulation patterns for these five toxins, with SPX1 present at trace levels while PnTX-G, OA and DTX1 were present at higher concentrations than PTX2. Furthermore, there was no significant difference between Oasis HLB, HP-20 and Strata-X for accumulated SPX1 levels. HP-20 appeared to be more efficient for OA and DTX1, followed by Oasis HLB. Oasis HLB accumulated PnTX-G at levels equal to those on HP-20. Unexpectedly, Strata-X was the sampler that gave the lowest PnTX-G and OA amounts. The time of exposure had a slight effect on the amounts of OA accumulated. Also, adsorption of OA on Oasis HLB and Strata-X decreased with increasing time of exposure (Fig. 6B). As a result, the gap between OA levels on HP-20 compared to Strata-X and Oasis HLB, statistically significantly increased ( $P < 0.05$ ) with longer exposure times.



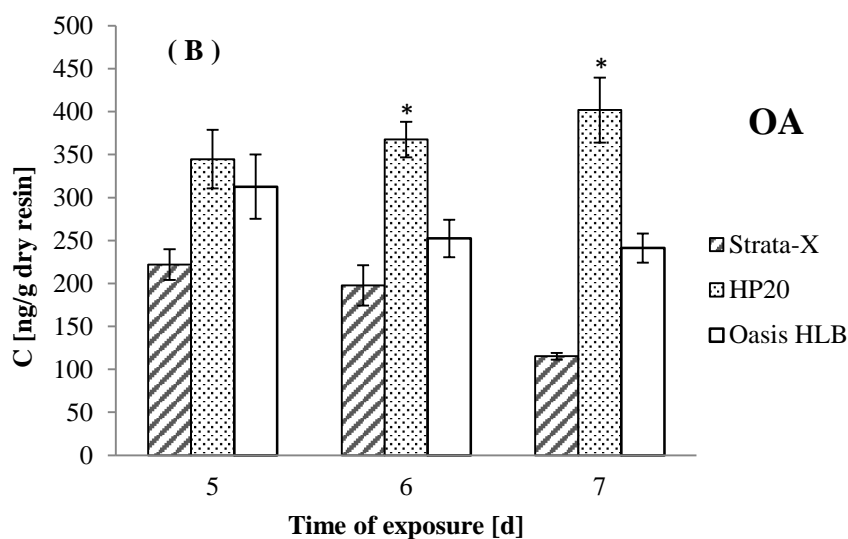


Fig 6: (A) Accumulation of SPX1, PnTX-G, OA, DTX1 and PTX2 on Oasis HLB, Strata-X and HP-20 SPATTs exposed in July at Ingril Lagoon on a weekly basis (expressed as [ng/g dry resin]). (B) OA adsorption on Oasis HLB, Strata-X and HP-20 for 5d, 6d and 7d of exposure during three consecutive weeks. Error bars represent standard deviations (n=3). \* Statistically significantly different ( $P < 0.05$ ).

#### 4. Discussion and conclusion

Microalgal extracts were used for all our spiking experiments at the laboratory. To investigate the solvent that yielded better toxin recoveries, methanol, isopropanol and acetone were tested. Methanol, acetone and acetonitrile had already been evaluated for *A. spinosum* extraction (Jauffrais et al., 2012a), and *V. rugosum* and *A. ostenfeldii* are commonly extracted using methanol (Geiger et al., 2013; Munday et al., 2012; Otero et al., 2010). Only isopropanol had not yet been tested as an extraction solvent for these microalgae. After estimation of toxin recoveries, isopropanol was chosen because it enabled extraction of higher amounts of compounds of interest and did not yield methylester artifacts as previously reported (Jauffrais et al., 2012a).

##### 4.1. Choice of extraction solvent and appropriate SPE type resin

HP-20 is a commonly used sorbent for passive sampling of toxins. The other three resins investigated (Oasis HLB, Strata-X and BondElut C18) are common SPE sorbents used to remove matrix effects (Gerssen et al., 2009; Kilcoyne and Fux, 2010) or to purify toxins

before structural elucidation (Uchida et al., 2013). On BondElut C18 cartridges, retention of the toxins may be based on hydrophobic interactions. On the other hand, with the polymeric sorbents, the retention of toxins depend on either hydrophobic or dipole-dipole, hydrogen bonding and  $\pi$ - $\pi$  interactions.

For the first SPE screening experiment with different resins, recoveries for OvTX-a were the lowest and no toxin was found in the loading and washing solvents, suggesting the elution solvent was either inappropriate or the eluent volume used was not sufficient. Therefore, optimisation was carried out to improve these recoveries. Two different extraction solvents were investigated on Oasis HLB and Strata-X SPE cartridges which were more efficient after the first trial. Best OvTX-a recoveries were obtained with methanol, while MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) was not suitable to recover OvTX-a. Indeed, in studies by Uchida *et al.* (2013) and Selwood *et al.* (2012) using Oasis HLB and Strata-X, PITXs were eluted with acidified organic solvents. This could explain why we were not able to recover OvTX-a under basic conditions. However, we did not tested acidic conditions since another toxin group i.e. AZAs had been shown to be easily degraded during evaporation of acidic eluents (Alfonso et al., 2008). Maximum capacity on 30 mg Oasis HLB cartridges was around 15 mL loading volume, and recoveries decreased with higher sample load volume.

As evaluation of toxin adsorption on cartridges had shown that toxins adsorbed less on the Agilent reservoirs with 2-frits (Supplementary material, S1), all the sorbents were tested inside this reservoir in a second experiment. HP-20 gave the lowest recoveries for most of the toxins compared to Oasis HLB, Strata-X and BondElut C18 (Fig. 2). This was in agreement with other studies that had demonstrated a low accumulation rate for HP-20, compared to polymeric resins other than Oasis HLB and Strata-X (Fux et al., 2009; Li et al., 2011). Thus, HP-20 was not appropriate for use in SPE-mode. BondElut gave higher recoveries than Oasis HLB and Strata-X but this sorbent was not retained because it was impractical for field use. Indeed, unlike polymeric sorbents which are readily wettable, BondElut C18 can never be allowed to dry once conditioned. The different resins we have tested are commercialised for their differences in retention mechanisms and thus we could have expected significant differences in the recoveries of the adsorbed toxins. However, apart from HP-20, all polymeric resins and even the lipophilic BondElut C18 performed quite similarly (Fig. 2). Indeed, all toxins tested are compounds with both polar and apolar features. Moreover, as the targeted toxins have various physico-chemical properties, simultaneous optimisation of

recoveries for all the toxin groups was hard to achieve as previously noted by Gerssen *et al.* (2010).

#### 4.2. Comparison of passive samplers at laboratory and field scale

As already mentioned, Oasis HLB, and Strata-X had already been tested in SPE mode to remove mussels matrix effects, but never as passive samplers for phycotoxins. These sorbents, as well as HP-20, were investigated as passive samplers in spiked seawater, experimental tanks and in the environment. LDPE and PDMS membrane strips were additionally tested as passive samplers in spiked seawater. Monitoring of toxin decrease in spiked seawater during 24h of samplers exposure confirmed the slow accumulation rate of HP-20 compared to Oasis HLB and Strata-X polymeric resins (Fig. 3; Supplementary material S2). Similar decrease in toxin levels in the seawater was observed with Oasis HLB, Strata-X and HP-20, except for OvTX-a. This difference could be explained by the amphiphilic property of OvTX-a as well as its large molecular size. Also, apparently almost all of OvTX-a had been adsorbed after only 7h exposure. OvTX-a recoveries from passive samplers were poor. These low recoveries were, however, consistent with the low recoveries in SPE mode described above. As of yet, there is no indication whether generally low recoveries for this compound are due to instability in solution or due to irreversible adsorption. Accumulation of toxins on LDPE and PDMS was lower than on Oasis HLB, Strata-X and HP-20. This may be due to the physical difference between the sorbents, thus, difference in sorption mechanisms. Furthermore, PDMS appears to be slightly more efficient for toxin sampling than LDPE. The diffusivity of large molecular size compounds like phycotoxins could be lower in LDPE than in PDMS (Rusina *et al.*, 2010). As reported by Allan *et al.* (2013) silicone (PDMS) also appears to be less effective than LDPE in sorption and is suitable for the sampling of a large range of compounds of interest. Surprisingly, adsorption of PnTX-G seemed to be easier on PDMS than the adsorption of SPX1, despite their structural similarities. An explanation for this difference could not be found. Levels of toxins accumulated on LDPE and PDMS were significantly lower than on Oasis HLB, Strata-X or HP-20, except for PnTX-G. HP-20 showed higher recoveries than every other sampler in the field, confirming observations about its higher sorption capacity than other polymeric resins (Lane *et al.*, 2010). The simultaneous exposure of Oasis HLB Strata-X and HP-20 inside the experimental tanks (Fig. 5) led to results different to those from the field trials and from the SPATTs exposed separately to spiked seawater. Indeed, levels of OA, DTX1 and

PnTX-G accumulated were higher on Strata-X and Oasis HLB than on HP-20. This was probably a result of the competition between the samplers, which was detrimental to HP-20 because of its low accumulation speed.

The amount of resin used for the passive sampling experiment was approximately ten times lower than the amount commonly reported in the literature (3 g). We also noted that, contrarily to Strata-X and HLB resins, HP-20 resin is delivered with a significant water content (i.e. 60% H<sub>2</sub>O); dry weight equivalents should be used to report results to facilitate standardisation and comparison across studies. Nevertheless, the SPATT deployed showed good accumulation efficiency. Indeed levels of OA per gram of sorbent were comparable to, or even higher, than those from SPATT deployed in similar semi-closed environments on the South Coast of Norway (Rundberget et al., 2009) or in New Zealand (MacKenzie et al., 2004; MacKenzie et al., 2005).

While this paper focussed on the technical aspects of passive sampling sorbents, it should be noted that other factors may also influence the choice of sorbent. For use in routine monitoring, the cost of sorbent material is also significant. Despite the high water content of HP-20 resin as product, its cost is significantly less than that of sorbent materials with similar efficacy (ca. 20-fold less). Also, the average particle size of HP-20 is relatively large, which facilitates collection using coarse phytoplankton mesh; possibly this reduces also the amount of bio-fouling observed on some of the finer mesh sizes.

As found by Mackenzie *et al.* (2011), our field experiments have also demonstrated the ability of passive sampling to accumulate and thus enable detection of toxins from benthic or epiphytic microalgae in environmental conditions. Accumulation of SPX1 and PnTX-G in our study indicated the presence of *A. ostenfeldii* and *V. rugosum*, respectively. On the other hand, the presence of OA, DTX1 and PTX2 (Fig. 6A) in the SPATTs deployed suggested that both *Dinophysis species* and *P. lima* were present in the water during the field trial at Ingril Lagoon.

#### 4.3. Conclusion

As recommended by Lacaze (2012), we have attempted to extend the range of sorbents suitable for passive sampling. This is the first report of Strata-X, Oasis HLB, LDPE and silicone (PDMS) investigation as passive samplers for lipophilic phycotoxins other than Brevetoxins (BTXs). In addition, investigation of polymeric sorbents had shown that passive sampling of OvTX-a was possible. However, more development is needed to improve toxin

recoveries of this toxin from polymeric resin after exposure. This study has also confirmed the possibility of detecting toxins from benthic microalgae in the environment. Moreover, this is the first time passive sampling has efficiently been used in France and has pointed towards the presence of different microalgae species including *P. lima*. As the sorbents we have investigated have shown different efficiencies and accumulation speed, we can conclude that Strata-X and Oasis HLB, which are fast accumulators, are probably better for daily or on-board evaluation of toxin presence. HP-20 however should be more appropriate for long exposure periods (> 5 days). Furthermore, the feasibility of down-scaling the amount of sorbent used in the passive sampling and thus decreasing the amounts of extraction solvents for a more economical and environmental friendly technique has been demonstrated for semi-enclosed coastal areas.

### **CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare that there are no conflicts of interest.

### **ACKNOWLEDGMENTS**

This study was carried out under the Coselmar project supported by Ifremer and Nantes University and funded by the Regional Council of the “Pays de la Loire”. We thank Agilent for their collaboration through the loan of the Agilent QToF mass spectrometer instrument. The authors would like to thank all the members of the laboratory Phycotoxins at the Atlantic Centre of Ifremer for their help and advice during this study.

## REFERENCES

- Alfonso, C., Rehmann, N., Hess, P., Alfonso, A., Wandscheer, C.B., Abuin, M., Vale, C., Otero, P., Vieytes, M.R., Botana, L.M., 2008. Evaluation of Various pH and Temperature Conditions on the Stability of Azaspiracids and Their Importance in Preparative Isolation and Toxicological Studies. *Analytical Chemistry* 80, 9672-9680.
- Allan, I.J., Harman, C., Ranneklev, S.B., Thomas, K.V., Grung, M., 2013. Passive sampling for target and nontarget analyses of moderately polar and nonpolar substances in water. *Environmental Toxicology and Chemistry* 32, 1718-1726.
- Alvarez, D.A., Petty, J.D., Huckins, J.N., Jones-Lepp, T.L., Getting, D.T., Goddard, J.P., Manahan, S.E., 2004. Development of a passive, *in situ*, integrative sampler for hydrophilic organic contaminants in aquatic environments. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 1640-1648.
- Andersen, R.A., 2005. *Algal culturing techniques*. Elsevier academic press.
- Bao, L.J., Xu, S.P., Liang, Y., Zeng, E.Y., 2012. Development of a low-density polyethylene-containing passive sampler for measuring dissolved hydrophobic organic compounds in open waters. *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC* 31, 1012-1018.
- Caillaud, A., de la Iglesia, P., Barber, E., Eixarch, H., Mohammad-Noor, N., Yasumoto, T., Diogène, J., 2011. Monitoring of dissolved ciguatoxin and maitotoxin using solid-phase adsorption toxin tracking devices: Application to *Gambierdiscus pacificus* in culture. *Harmful Algae* 10, 433-446.
- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Dello Iacovo, E., Fattorusso, E., Forino, M., Grauso, L., Tartaglione, L., Guerrini, F., Pistocchi, R., 2010. Complex palytoxin-like profile of *Ostreopsis ovata*. Identification of four new ovatoxins by high-resolution liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* : RCM 24, 2735-2744.
- Fux, E., Bire, R., Hess, P., 2009. Comparative accumulation and composition of lipophilic marine biotoxins in passive samplers and in mussels (*M. edulis*) on the West Coast of Ireland. *Harmful Algae* 8, 523-537.
- Fux, E., Marcaillou, C., Mondeguer, F., Bire, R., Hess, P., 2008. Field and mesocosm trials on passive sampling for the study of adsorption and desorption behaviour of lipophilic toxins with a focus on OA and DTX1. *Harmful Algae* 7, 574-583.

- Geiger, M., Desanglois, G., Hogeveen, K., Fessard, V., Lepretre, T., Mondeguer, F., Guitton, Y., Herve, F., Sechet, V., Grovel, O., Pouchus, Y.-F., Hess, P., 2013. Cytotoxicity, fractionation and dereplication of extracts of the dinoflagellate *Vulcanodinium rugosum*, a producer of pinnatoxin G. *Marine drugs* 11, 3350-3371.
- Gerssen, A., McElhinney, M.A., Mulder, P.P.J., Bire, R., Hess, P., de Boer, J., 2009. Solid phase extraction for removal of matrix effects in lipophilic marine toxin analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 394, 1213-1226.
- Gerssen, A., van Olst, E.H.W., Mulder, P.P.J., de Boer, J., 2010. In-house validation of a liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the analysis of lipophilic marine toxins in shellfish using matrix-matched calibration. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397, 3079-3088.
- Harman, C., Allan, I.J., Vermeirssen, E.L.M., 2012. Calibration and use of the polar organic chemical integrative sampler-a critical review. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31, 2724-2738.
- Hess, P., Abadie, E., Herve, F., Berteaux, T., Sechet, V., Araoz, R., Molgo, J., Zakarian, A., Sibat, M., Rundberget, T., Miles, C.O., Amzil, Z., 2013. Pinnatoxin G is responsible for atypical toxicity in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and clams (*Venerupis decussata*) from Ingril, a French Mediterranean lagoon. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 75, 16-26.
- Huckins, J.N., Tubergen, M.W., Manuweera, G.K., 1990. SEMIPERMEABLE-MEMBRANE DEVICES CONTAINING MODEL LIPID - A NEW APPROACH TO MONITORING THE BIOAVAILABILITY OF LIPOPHILIC CONTAMINANTS AND ESTIMATING THEIR BIOCONCENTRATION POTENTIAL. *Chemosphere* 20, 533-552.
- Jauffrais, T., Herrenknecht, C., Sechet, V., Sibat, M., Tillmann, U., Krock, B., Kilcoyne, J., Miles, C.O., McCarron, P., Amzil, Z., Hess, P., 2012a. Quantitative analysis of azaspiracids in *Azadinium spinosum* cultures. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 403, 833-846.
- Jauffrais, T., Kilcoyne, J., Herrenknecht, C., Truquet, P., Sechet, V., Miles, C.O., Hess, P., 2013. Dissolved azaspiracids are absorbed and metabolized by blue mussels (*Mytilus edulis*). *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 65, 81-89.



- Jauffrais, T., Kilcoyne, J., Sechet, V., Herrenknecht, C., Truquet, P., Herve, F., Berard, J.B., Nulty, C., Taylor, S., Tillmann, U., Miles, C.O., Hess, P., 2012b. Production and Isolation of Azaspiracid-1 and-2 from *Azadinium spinosum* Culture in Pilot Scale Photobioreactors. *Marine Drugs* 10, 1360-1382.
- Kaserzon, S.L., Kennedy, K., Hawker, D.W., Thompson, J., Carter, S., Roach, A.C., Booij, K., Mueller, J.F., 2012. Development and calibration of a passive sampler for perfluorinated alkyl carboxylates and sulfonates in water. *Environmental Science & Technology* 46, 4985-4993.
- Kilcoyne, J., Fux, E., 2010. Strategies for the elimination of matrix effects in the liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of the lipophilic toxins okadaic acid and azaspiracid-1 in molluscan shellfish. *Journal of Chromatography A* 1217, 7123-7130.
- Kudela, R.M., 2011. Characterization and deployment of Solid Phase Adsorption Toxin Tracking (SPATT) resin for monitoring of microcystins in fresh and saltwater. *Harmful Algae* 11, 117-125.
- Lacaze, J.-P., 2012. *New trends in Marine Freshwater Toxins*. Nova Science Publishers, Inc.
- Lane, J.Q., Roddam, C.M., Langlois, G.W., Kudela, R.M., 2010. Application of Solid Phase Adsorption Toxin Tracking (SPATT) for field detection of the hydrophilic phycotoxins domoic acid and saxitoxin in coastal California. *Limnology and Oceanography-Methods* 8, 645-660.
- Li, A., Ma, F., Song, X., Yu, R., 2011. Dynamic adsorption of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins in passive sampling relates to pore size distribution of aromatic adsorbent. *Journal of Chromatography. A* 1218, 1437-1442.
- MacKenzie, L., Beuzenberg, V., Holland, P., McNabb, P., Selwood, A., 2004. Solid phase adsorption toxin tracking (SPATT): a new monitoring tool that simulates the biotoxin contamination of filter feeding bivalves. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 44, 901-918.
- MacKenzie, L., Beuzenberg, V., Holland, P., McNabb, P., Suzuki, T., Selwood, A., 2005. Pectenotoxin and okadaic acid-based toxin profiles in *Dinophysis acuta* and *Dinophysis acuminata* from New Zealand. *Harmful Algae* 4, 75-85.
- MacKenzie, L.A., 2010. *In situ* passive solid-phase adsorption of micro-algal biotoxins as a monitoring tool. *Current Opinion in Biotechnology* 21, 326-331.

- MacKenzie, L.A., Selwood, A.I., McNabb, P., Rhodes, L., 2011. Benthic dinoflagellate toxins in two warm-temperate estuaries: Rangaunu and Parengarenga Harbours, Northland, New Zealand. *Harmful Algae* 10, 559-566.
- Medhioub, W., Sechet, V., Truquet, P., Bardouil, M., Amzil, Z., Lassus, P., Soudant, P., 2011. *Alexandrium ostenfeldii* growth and spirolide production in batch culture and photobioreactor. *Harmful Algae* 10, 794-803.
- Munday, R., Selwood, A.I., Rhodes, L., 2012. Acute toxicity of pinnatoxins E, F and G to mice. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 60, 995-999.
- Nézan, E., Chomérat, N., 2011. *Vulcanodinium rugosum* gen. nov., sp. nov. (Dinophyceae): a new marine dinoflagellate from the French Mediterranean coast. *Cryptogamie Algologie* 32, 3-18.
- Otero, P., Alfonso, A., Alfonso, C., Vieytes, M.R., Louzao, M.C., Botana, A.M., Botana, L.M., 2010. New protocol to obtain spirolides from *Alexandrium ostenfeldii* cultures with high recovery and purity. *Biomedical Chromatography* 24, 878-886.
- Pizarro, G., Morono, A., Paz, B., Franco, J.M., Pazos, Y., Reguera, B., 2013. Evaluation of passive samplers as a monitoring tool for early warning of dinophysins toxins in shellfish. *Marine Drugs* 11, 3823-3845.
- Rundberget, T., Gustad, E., Samdal, I.A., Sandvik, M., Miles, C.O., 2009. A convenient and cost-effective method for monitoring marine algal toxins with passive samplers. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 53, 543-550.
- Rusina, T.P., Smedes, F., Klanova, J., 2010. Diffusion coefficients of polychlorinated biphenyls and polycyclic aromatic hydrocarbons in polydimethylsiloxane and low-density polyethylene polymers. *Journal of Applied Polymer Science*, NA-NA.
- Rusina, T.P., Smedes, F., Klanova, J., Booij, K., Holoubek, I., 2007. Polymer selection for passive sampling: a comparison of critical properties. *Chemosphere* 68, 1344-1351.
- Selwood, A.I., van Ginkel, R., Harwood, D.T., McNabb, P.S., Rhodes, L.R., Holland, P.T., 2012. A sensitive assay for palytoxins, ovatoxins and ostreocins using LC-MS/MS analysis of cleavage fragments from micro-scale oxidation. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 60, 810-820.
- Shea, D., Tester, P., Cohen, J., Kibler, S., Varnam, S., 2006. Accumulation of brevetoxins by passive sampling devices. *African Journal of Marine Science* 28, 379-381.

- Uchida, H., Taira, Y., Yasumoto, T., 2013. 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* 27, 1999-2008.
- Wood, S.A., Holland, P.T., MacKenzie, L., 2011. Development of solid phase adsorption toxin tracking (SPATT) for monitoring anatoxin-a and homoanatoxin-a in river water. *Chemosphere* 82, 888-894.
- Zhao, H., Qiu, J., Fan, H., Li, A., 2013. Mechanism and application of solid phase adsorption toxin tracking for monitoring microcystins. *Journal of Chromatography A* 1300, 159-164.

### SUPPLEMENTARY MATERIAL:

S1: Evaluation of toxin adsorption on cartridges

S2: Monitoring of toxin decrease in spiked seawater for Oasis HLB, Strata-X, HP-20, LDPE and PDMS

#### S1: Evaluation of toxin adsorption on SPE cartridges and glassware

To evaluate toxin adsorption on empty cartridges (procedural losses), known amounts of toxin were loaded onto the cartridges and directly recovered just as wash and elution solvents. After loading, 100% recovery was obtained for none of the cartridges. However, the reservoir with 2 frits (Agilent) and the one of Oasis HLB yielded better recoveries than BondElut C18 and Strata-X reservoirs, indicating that there was less toxin adsorption on those cartridges. The washing step enabled recoveries to increase to up to 100% for all toxins except for AZA1. Indeed, for AZA1, the first elution step was required to reach 100% recovery. It is noteworthy that most of OvTX-a was retrieved after the loading step. Very high recoveries were obtained with the reservoirs containing 2 frits and Strata-X reservoirs gave the lowest OvTX-a recovery. Overall, all cartridges enable satisfactory recovery of nearly all toxins throughout the procedure. This is not the case for OvTX-a for which top down yields are obtained from 2-frits-reservoir, then BondElut C18, Oasis HLB and Strata-X, respectively.

Toxin adsorption evaluated from recovery (average  $\pm$  SD) after load (1 mL spiked seawater) wash (1 ml of 5% MeOH) and elution (2\*1 mL MeOH) through empty SPE cartridges. Standard deviation calculated from 3 replicates.

	<i>Steps</i>	<b>SPX-1</b>	<b>PnTX-G</b>	<b>OA</b>	<b>DTX-1</b>	<b>AZA-1</b>	<b>AZA-2</b>	<b>OvTX-a</b>
<b>BondElut C18 reservoir</b>	<i>Load</i>	89 $\pm$ 3	85 $\pm$ 6	89 $\pm$ 6	83 $\pm$ 8	61 $\pm$ 8	88 $\pm$ 6	73 $\pm$ 9
	<i>Wash</i>	8.8 $\pm$ 0.3	7.1 $\pm$ 0.4	10 $\pm$ 1	7.8 $\pm$ 0.3	1.6 $\pm$ 0.1	9 $\pm$ 1	n.d
	<i>Elution 1</i>	10 $\pm$ 1	17 $\pm$ 3	10 $\pm$ 2	15 $\pm$ 1	<b>37 <math>\pm</math> 6</b>	10 $\pm$ 2	8 $\pm$ 7
	<i>Elution 2</i>	0.8 $\pm$ 0.5	2 $\pm$ 0.4	n.d	2 $\pm$ 1	5 $\pm$ 1	0.6 $\pm$ 0.3	n.d
	<b><i>Total recovery</i></b>	<b>109 <math>\pm</math> 3</b>	<b>110 <math>\pm</math> 2</b>	<b>109 <math>\pm</math> 5</b>	<b>109 <math>\pm</math> 8</b>	<b>104 <math>\pm</math> 1</b>	<b>107 <math>\pm</math> 5</b>	<b>81 <math>\pm</math> 7</b>

<b>Strata-X</b> reservoir	Load	87 ± 2	85 ± 4	83 ± 1	86 ± 2	80 ± 5	83 ± 3	85 ± 7
	Wash	10.2 ± 0.4	9 ± 1	11 ± 1	9.8 ± 0.2	3.3 ± 0.4	11 ± 1	5 ± 5
	Elution 1	5.7 ± 0.2	9 ± 1	5.0 ± 0.6	7 ± 1	<b>15 ± 2</b>	4.8 ± 0.5	n.d
	Elution 2	0.1 ± 0.1	0.7 ± 0.1	n.d	n.d	1.9 ± 0.1	n.d	n.d
	<b>Total recovery</b>	<b>103 ± 2</b>	<b>104 ± 3</b>	<b>99 ± 2</b>	<b>103 ± 2</b>	<b>100 ± 4</b>	<b>99 ± 2</b>	<b>90 ± 9</b>
<b>Oasis HLB</b> reservoir	Load	99 ± 2	99 ± 6	92 ± 3	96 ± 2	86 ± 5	96 ± 4	82 ± 9
	Wash	15 ± 7	15 ± 7	17 ± 8	17 ± 7	7 ± 4	16 ± 7	n.d
	elution 1	6 ± 2	6 ± 2	4 ± 2	7 ± 2	<b>13 ± 5</b>	4 ± 1	n.d
	Elution 2	0.2 ± 0.1	0.7 ± 0.1	n.d	n.d	1.7 ± 0.1	n.d	n.d
	<b>Total recovery</b>	<b>109 ± 2</b>	<b>111 ± 7</b>	<b>103 ± 3</b>	<b>109 ± 2</b>	<b>99 ± 5</b>	<b>105 ± 4</b>	<b>82 ± 9</b>
<b>Agilent 2-frits-</b> reservoir	Load	96 ± 1	97 ± 5.4	97 ± 3	93 ± 2	89 ± 2	98 ± 4	95 ± 9
	Wash	12.2 ± 0.2	11.2 ± 0.5	14.0 ± 0.2	12.3 ± 0.6	4.4 ± 1.3	13.5 ± 0.2	n.d
	Elution 1	2.2 ± 0.3	2.8 ± 0.3	1.5 ± 0.2	0.4 ± 0.4	<b>7 ± 1</b>	0.4 ± 0.4	n.d
	Elution 2	n.d	0.7 ± 0.0	n.d	n.d	1.9 ± 0.3	n.d	n.d
	<b>Total recovery</b>	<b>111 ± 1</b>	<b>111 ± 6</b>	<b>113 ± 3</b>	<b>106 ± 2</b>	<b>102 ± 3</b>	<b>112 ± 4</b>	<b>95 ± 9</b>

n.d: not detected

## **S2: Monitoring of toxin decrease (%) in spiked seawater for Oasis HLB, Strata-X, HP-20, LDPE and**

### **PDMS**

	Time (hrs)	SPX-1	PnTX-G	OA	AZA-1	OvTX-a
<b>HLB</b> 100 mg	0	100	100	100	100	100
	1	49	44	32	48	7
	7	21	16	0	23	0
	24	33	28	12	28	0
<b>HLB</b> 200 mg	0	100	100	100	100	100
	1	105	105	103	99	124
	7	58	62	35	62	14
	24	36	36	17	33	0
<b>HLB</b> 300 mg	0	100	100	100	100	100
	1	75	90	63	87	49
	7	40	52	41	59	0
	24	25	32	12	35	0
<b>Strata-X</b> 100 mg	0	100	100	100	100	100
	1	87	88	83	95	-
	7	46	53	41	64	0
	24	28	32	0	36	0
<b>Strata-X</b> 200 mg	0	100	100	100	100	100
	1	118	81	62	75	-
	7	53	39	13	48	0
	24	37	30	0	33	0
<b>Strata-X</b> 300 mg	0	100	100	100	100	100
	1	45	56	48	61	78
	7	36	39	28	47	14

	<i>24</i>	16	28	16	36	0
	<i>0</i>	100	100	100	100	100
<b>HP-20</b> 100 mg	<i>1</i>	-	81	60	80	22
	<i>7</i>	112	33	6	41	0
	<i>24</i>	79	24	0	26	0
	<i>0</i>	100	100	100	100	100
<b>HP-20</b> 200 mg	<i>1</i>	81	95	100	90	56
	<i>7</i>	83	84	76	88	0
	<i>24</i>	44	44	23	42	0
	<i>0</i>	100	100	100	100	100
<b>HP-20</b> 300 mg	<i>1</i>	94	98	104	93	85
	<i>7</i>	78	73	59	71	24
	<i>24</i>	39	31	10	32	0
	<i>0</i>	100	100	100	100	100
<b>PDMS</b>	<i>1</i>	104	89	105	93	94
	<i>7</i>	82	44	95	78	72
	<i>24</i>	82	27	100	54	65
	<i>0</i>	100	100	100	100	100
<b>LDPE</b>	<i>1</i>	111	99	102	94	101
	<i>7</i>	122	112	110	102	109
	<i>24</i>	103	99	99	64	68

## **CHAPITRE V : Contamination des coquillages par *Vulcanodinium rugosum* et les pinnatoxines :**

**- Distribution spatiale de la pinnatoxine G dans les moules de cinq lagunes méditerranéennes françaises**

**- Impacts de *Vulcanodinium rugosum* sur la filtration de deux mollusques d'intérêt aquacole (*Crassostrea gigas* et *Mytilus galloprovincialis*) et viabilité de ce dinoflagellé après transit stomacal chez ces mollusques.**

### **1. Contexte des études**

Les zones estuariennes et côtières sont de plus en plus souvent sujettes à des proliférations de microalgues toxiques. Pour connaître et suivre l'évolution de ces contaminations des programmes de recherche et de surveillance ont été mis en place. Leurs objectifs sont de détecter rapidement les espèces potentiellement toxiques/nuisibles et de suivre la potentielle contamination des coquillages par les phycotoxines via l'ingestion des microalgues. En France, cette surveillance est effectuée par le Réseau de surveillance du Phytoplancton et des Phycotoxines de l'Ifremer (REPHY) pour le compte de l'Etat, dans les espaces côtiers et dans les coquillages issus du milieu naturel, c'est-à-dire prélevés dans les zones de production (parcs, filières, bouchots, etc.) ou dans les zones de pêche professionnelle. La surveillance des toxines dans les denrées alimentaires mises sur le marché pour la consommation humaine, relève de la responsabilité de la Direction Générale de l'Alimentation (DGAL).

Actuellement, en France, une partie de ces toxines, dites réglementées dont les toxines DSP (toxines diarrhéiques) ; PSP (toxines paralysantes) ; ASP (toxines amnésiantes), font l'objet d'un suivi selon un cahier des charges précis. La surveillance du phytoplancton toxique est réalisée en routine, la décision d'analyser les coquillages est prise si il y a risque de contamination par les microalgues toxiques. Cependant, dans le cas de zones à risque, déjà touchées de façon récurrente par des épisodes de toxicité et pendant les périodes dites à risque, le suivi des toxines réglementées est systématique et hebdomadaire. L'évolution des peuplements phytoplanctoniques du, aux changements climatiques, aux processus

d'eutrophisation/oligotrophisation, aux transferts des coquillages et aux activités de transports maritimes (eaux de ballast) peut impliquer l'émergence et la prolifération d'espèces algales non répertoriées. Les toxines qu'elles peuvent produire sont encore non réglementées parce que leur risque sanitaire est mal ou encore peu évalué. Le plus souvent leurs effets chez l'animal sont décrits mais ceux-ci demeurent souvent inconnus chez l'Homme voire non avérés). C'est le cas de *V. rugosum* producteur de pinnatoxines, qui sont des neurotoxines à action rapide, regroupées sous le nom anglo-saxon de « FATs » : Fast Acting Toxins et associées au groupe des imines cycliques. Les moules sont les organismes connus pour bioaccumuler des toxines produites par les espèces planctoniques retenues dans leurs branchies. Elles sont ainsi un animal de choix pour suivre la présence de phytoplancton toxique et de phycotoxines dans le milieu naturel.

### 1.1 *Vulcanodinium rugosum*, pinnatoxines et contamination des mollusques

Les Pinnatoxines ont d'abord été isolées à partir d'un extrait de coquillages de l'espèce *Pinna attenuate* Reeve, prélevé sur le site de Guangdong en Chine (Zheng et al., 1990). Les Pinnatoxines sont des imines cycliques et parmi elles, la Pinnatoxine-A a été la première à être caractérisée (Uemura et al., 1995). Les Pinnatoxines-B et -D ont ensuite été isolées à partir de *P. muricata* au Japon (Chou et al., 1996; Takada et al., 2001). Les Pinnatoxines-E et -G ont quant à elles été détectées dans des coquillages du nord de la Nouvelle- Zélande et de l'Australie du Sud (McNabb et al., 2012; Selwood et al., 2010). La découverte de la Pinnatoxine G dans des moules de Norvège et du Canada suggère la distribution internationale de cette toxine (McCarron et al., 2012; Rundberget et al., 2011). Même si les Pinnatoxines sont associées aux contaminations saisonnières qui touchent les mollusques, elles ne sont pas connues pour être à l'origine d'intoxication alimentaire, même si leur toxicité sur souris est avérée puisqu'elles peuvent entraîner, à des faibles doses, des symptômes neurologiques suivis d'une mort rapide des souris (temps de survie inférieur à 20 min) (Rhodes et al., 2011a; Selwood et al., 2010). L'organisme producteur de la Pinnatoxine est resté longtemps inconnu jusqu'à la découverte récente de la toxicité associée à un dinoflagellé armé, *V. rugosum*, isolé dans les eaux de de la Nouvelle-Zélande (Rhodes et al., 2011b). *V. rugosum* a été décrit pour la première fois, à partir d'un isolat d'une lagune méditerranéenne (Nézan & Chomérat, 2011). Il a été répertorié en Australie, Nouvelle-Zélande, Japon, Hawaii, Mexique et en Europe (Garrett et al., 2014; Hernandez-Becerril et al., 2013; Nézan & Chomérat, 2011; Rhodes et al., 2011b; Zeng et al., 2012). En France, la



mise en évidence des pinnatoxines en 2010 a permis d'expliquer par la suite les cas de toxicités atypiques des coquillages, observés auparavant à Ingril dans les moules et les palourdes (Hess et al., 2013).

### 1.2 Survie des dinoflagellés toxiques au passage par le tractus digestif des mollusques, vecteurs de contaminations de nouvelles zones lagunaires.

Des micro-organismes marins peuvent être transportés d'une zone à une autre par l'intermédiaire des organismes qui les ingèrent. Le transfert peut concerner des zones plus ou moins éloignées. Les mollusques sont sensibles aux dommages pouvant être causés par ces microorganismes photosynthétiques (suspension de la filtration et/ou mortalité) (Bardouil et al., 1993; Rolland et al., 2014; Rolland et al., 2012). Laabir et Gentien (Laabir & Gentien, 1999) ont démontré que plusieurs dinobiontes à thèque résistaient au transit stomacal suite à leur ingestion par *Crassostrea gigas* et étaient capables de rester vivants à la suite de ce transit et de se diviser quand les fèces contenant ces microorganismes étaient remises en milieu de culture et en présence de lumière. Cette capacité de résistance peut permettre aux dinobiontes ayant survécu au transit stomacal, de réensemencer la colonne d'eau quand les conditions de reviviscence sont réunies (Bauder & Cembella, 2000; Carriker, 1992; Scarratt et al., 1993). Ces résultats posent, d'une manière forte, le problème lié aux transferts des mollusques bivalves d'une zone contaminée à une autre car les mollusques peuvent garder dans leur conduit stomacal des dinobiontes toxiques non digérés, sous forme de kystes temporaires (pelliculaires) et les rejeter par la suite dans les biodépôts. Rares sont les travaux qui apportent des réponses claires à ces problèmes qui pourtant représentent une préoccupation majeure des ostréiculteurs et des législateurs. L'introduction des microorganismes photosynthétiques nuisibles ou toxiques peut affecter négativement le fonctionnement de l'écosystème marin et avoir des conséquences néfastes sur les activités aquacoles, la pêche et sur la santé publique. Une fois établis, les microorganismes photosynthétiques toxiques ne peuvent être extraits du milieu colonisé. Il semble donc évident, qu'empêcher leur introduction, reste une des meilleures stratégies.

### 1.3 Objectifs des études

Les précédents travaux et enquêtes (rapport DGAL, (Hess et al., 2013)) ont montré qu'il est urgent de mener une évaluation des risques pour les consommateurs à l'égard des

pinnatoxines en raison des très fortes teneurs trouvées dans les moules présentes dans la lagune d'Ingril. Il nous est apparu tout d'abord indispensable de cartographier les zones à risques en recherchant et quantifiant les pinnatoxines bioaccumulées dans des moules récoltées dans quatre autres lagunes méditerranéennes : les étangs de Leucate et de Thau, où la conchyliculture est une activité patrimoniale ainsi que des étangs du Prévost et de Vic. Les lagunes de Thau, de Vic et du Prévost sont limitrophes de l'étang d'Ingril.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés aux étapes en amont de la bioaccumulation des toxines dans l'huître creuse *Crassostrea gigas* et de la moule *Mytilus galloprovincialis* à savoir, la réaction des mollusques filtreurs à la présence de cette microalgue toxique en étudiant leurs performances de filtration en conditions contrôlées et le devenir de la microalgue dans le tractus digestif de ces coquillages et sa viabilité lors de sa libération dans le milieu extérieur par les fécès et pseudofécès. Enfin, nous avons caractérisé la concentration en toxines dans différents tissus afin d'explorer les premiers mécanismes de bioaccumulation.

## 2. Distribution spatiale de la pinnatoxine G dans les moules de cinq lagunes méditerranéennes françaises

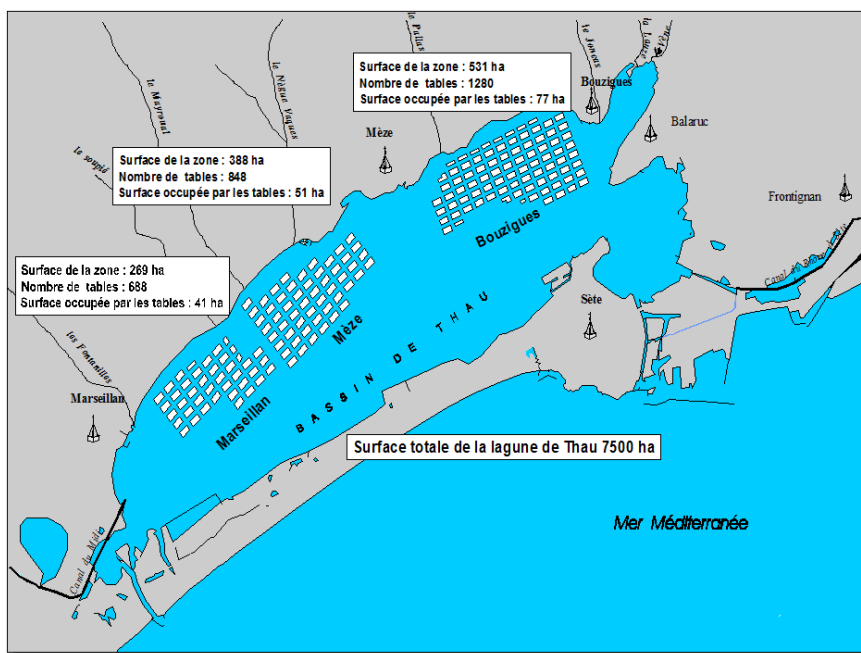
### 2.1 Matériels et méthodes

#### 2.1.1 Lagunes échantillonnées

##### a) Lagune de Thau

La lagune de Thau est située à une cinquantaine de kilomètres au sud-ouest de l'agglomération de Montpellier. Il s'agit de la plus grande (75 km<sup>2</sup>) et de la plus profonde (jusqu'à 10 m) des lagunes du littoral de la région Languedoc-Roussillon. Les principaux cours d'eau sont la Vène et le Pallas qui se déversent dans la zone nord-ouest de l'étang. La lagune reçoit également les eaux des canaux de navigation: le canal du Midi au sud-ouest qui communique avec l'Hérault à Agde, et le canal du Rhône à Sète à l'est. Elle communique avec la mer par le grau de Pisses-Saumes à l'extrémité sud et par le canal de Sète à l'est. Dans la lagune de Thau, l'activité conchylicole a débuté en 1880 avec la mise en place dans les canaux de Sète de structures flottantes destinées au grossissement des coquillages. La dégradation de la qualité sanitaire du milieu a entraîné en 1907 le déplacement des parcs dans

la lagune au large de Bouzigues. A partir de 1922 l'activité conchylicole s'intensifie, seize hectares sont consacrés à l'élevage de coquillages. Ce développement s'étend vers Mèze entre 1945 et 1951, puis vers Marseillan entre 1951 et 1957. C'est en 1972, qu'on assiste au remembrement de l'ensemble des concessions conchylicoles (Deslous-Paoli et al., 1998). Aujourd'hui, les tables d'exploitations conchylicoles (Figure 1) occupent 1/5 de la surface de la lagune de Thau et se répartissent en 3 secteurs d'activités qui comptent environ 2800 tables d'élevages exploitées par 800 producteurs. Même s'il reste difficile de connaître les chiffres exacts, on estime qu'environ 13000 tonnes d'huîtres (*Crassostrea gigas*) et 3000 tonnes de moules (*Mytilus galloprovincialis*) sont élevées et commercialisées chaque année. La production sur le bassin de Thau représente environ 10% de la production nationale et 90% de la méditerranée et un chiffre d'affaires direct estimé entre à 35 millions d'euros (données fournies par le Syndicat Mixte du Bassin de Thau, SMBT).



**Figure 1** : Conchyliculture dans la lagune de Thau

#### b) Lagune de Salses-Leucate

Cet étang est un système semi-fermé, pour lequel les connexions avec la mer se font via trois graus répartis le long de la côte Est. Le principal grau est fermé en fin d'automne jusqu'au début de l'hiver. Cette lagune est au cœur de multiples enjeux socio-économiques (pêche, conchyliculture, tourisme...) et écologiques. Depuis quelques années, l'état de la lagune de Salses-Leucate vis-à-vis de l'eutrophisation est relativement bon avec des dégradations

ponctuelles dans l'espace (Anse de la Roquette), dues à des pollutions localisées, et dans le temps, dues aux fluctuations inter-annuelles des conditions environnementales.

#### c) Etang d'Ingril

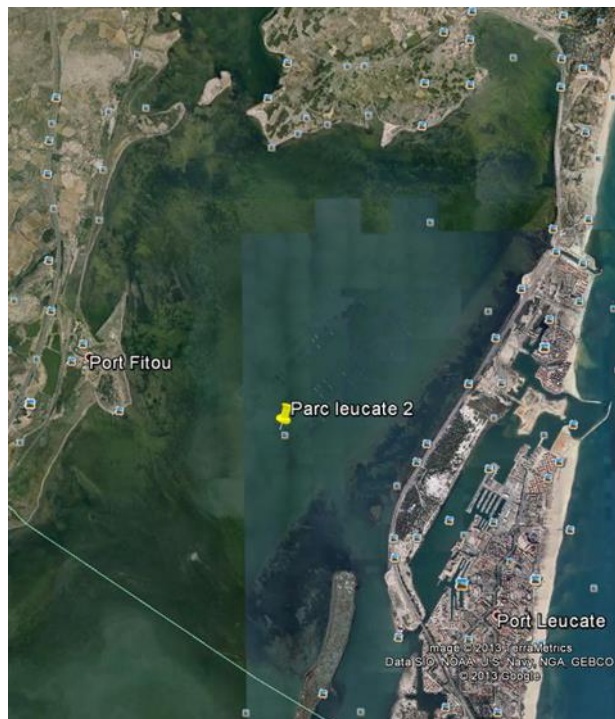
L'Ingril nord reçoit les eaux du bassin versant et notamment des Salins de Frontignan sur sa partie ouest. L'Ingril sud possède un grau au niveau du port de Frontignan (liaison directe avec la mer) et est en lien avec la partie nord par l'intermédiaire du canal du Rhône à Sète. Les températures sont relativement homogènes marquant un bon mélange des eaux. L'amplitude thermique annuelle en 2013 a été supérieure à 20 °C, ce qui indique de fortes fluctuations saisonnières caractéristiques de plans d'eau de faible profondeur. Ces fluctuations suivent les variations de température de l'air. L'hiver particulièrement froid et sec de cette année-là a donc entraîné des températures plus faibles qu'à l'accoutumée sur cet étang. Ces températures sont restées relativement basses jusqu'à l'été car ce n'est qu'entre les mois de juin et de juillet qu'elles ont dépassé 25 °C, alors qu'elles peuvent parfois dépasser ce seuil dès le mois de mai. De manière générale, l'étang d'Ingril garde la trace les évènements pluvieux et notamment celui de mars 2013 (le principal cette année-là, après un hiver relativement sec), d'autant plus finement que cette lagune est sous forte influence marine. L'étang d'Ingril est globalement plus salé que les autres lagunes du complexe palavasien en raison de la présence du grau de Frontignan et du Grand Canal (dérivation du canal du Rhône à Sète à la mer). Malgré des fluctuations probablement liées aux épisodes d'apports en eaux du mois de mars, ayant sans doute entraîné des blooms de la végétation, la courbe d'oxygène dissous fluctue de manière normale au cours de l'année. Le niveau d'oxygénation est satisfaisant et aucune crise anoxique n'a été observée sur cette période.

#### d) Etangs de Vic et du Prévost

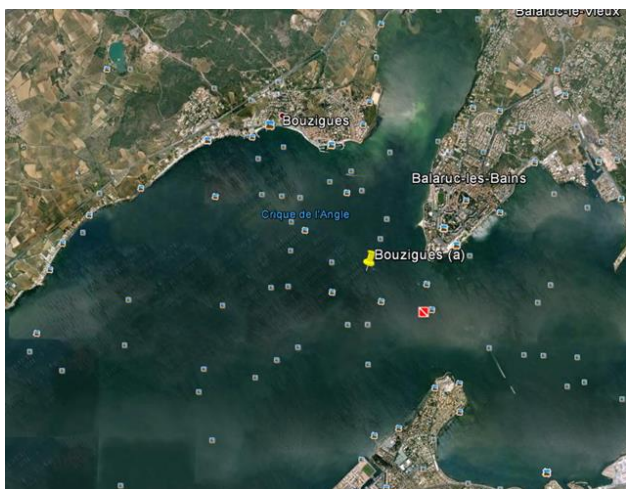
Les températures sont homogènes sur l'ensemble Vic et Prévost et présentent une évolution annuelle classique, comparable à celle de l'étang d'Ingril. Presque directement connecté à la mer par le grau du Prévost, l'amplitude de ses variations de salinité est très limitée.



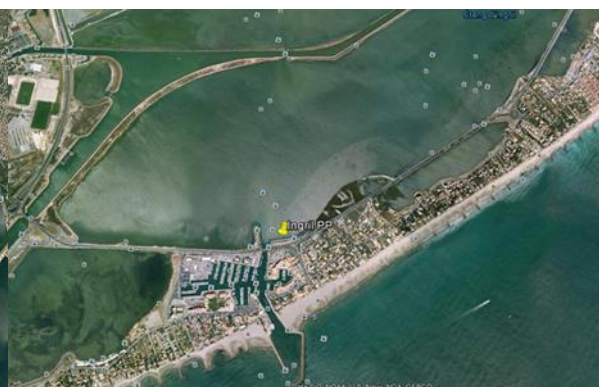
A



B

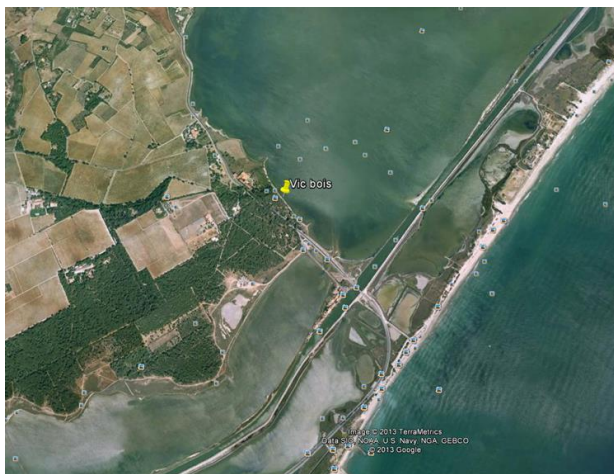


C



D





## E

**Figure 2.** Lagunes méditerranéennes échantillonnées pour dosage des toxines dans les moules (A : carte générale, B : Leucate, C : Thau, D : Ingril et D : Vic)

### 2.1.2. Suivi *in situ* des pinnatoxines dans la moule *Mytilus galloprovincialis*

Cinq lagunes du Languedoc-Roussillon, ont été suivies au cours de cette étude. Nous avons choisi les deux sites principaux d'exploitation conchylicole, Thau et Leucate et trois étangs palavasiens, Ingril, Vic et Prévost ; ces trois étangs étant reliés entre eux par le canal du Rhône à Sète. Il est aussi important de rappeler que le canal du Rhône à Sète débouche dans l'étang de Thau. Le positionnement des points tient compte des paramètres suivants, l'accessibilité, la représentativité et la pérennité. Les points situés dans les lagunes de Thau et de Leucate ont été positionnés sur un point du réseau REPHY (Parc Leucate 2 et Bouzigues a). Les points échantillonnés dans les étangs palavasiens sont situés en bordure d'étang dans des zones *a priori* favorable au développement de *Vulcanodinium rugosum*, Ingril Port des Pauvres, Vic Bois et Prévost Ifremer. La présente étude a porté sur le suivi des concentrations des pinnatoxines dans les moules en provenance des étangs de Vic, Prévost, Thau, Ingril et Leucate (figure 2).

### 2.1.3. Déroulement du suivi des pinnatoxines

La campagne de prélèvement a débuté en juin 2013. Les cinq lagunes ont été échantillonnées tous les 15 jours jusqu'en octobre 2013 puis mensuellement. Les prélèvements bi-mensuel ont repris en mai 2014 jusqu'en septembre 2014. Sur chaque point, l'abondance des cellules de *V. rugosum* a été déterminée à partir d'un prélèvement d'eau de mer qui a été réalisé par

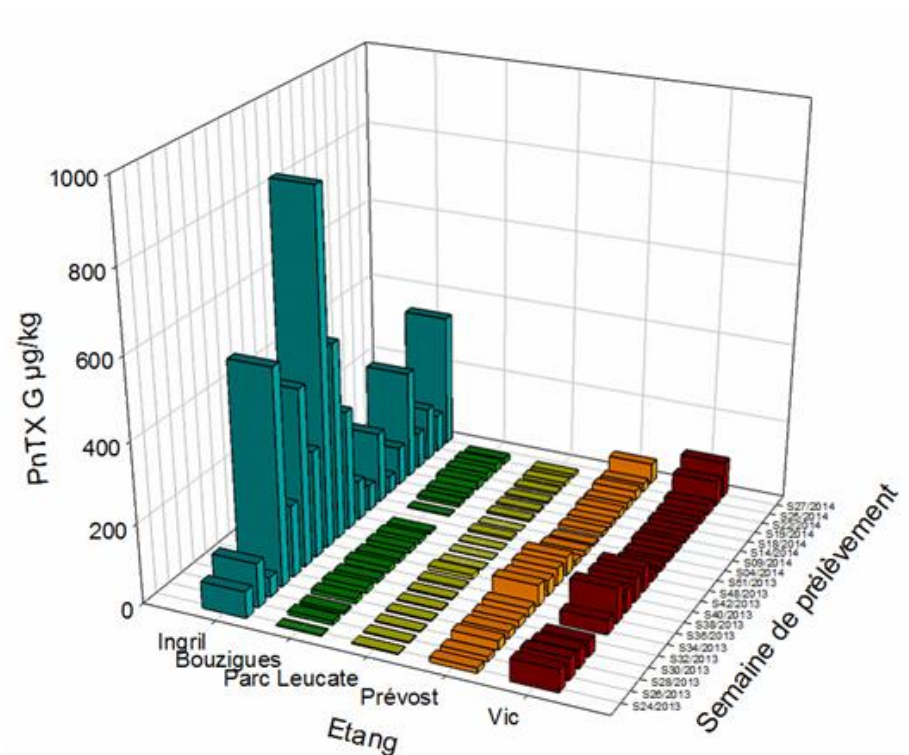
pompage d'un volume précis (environ 30 L) et concentré simultanément sur une toile à bluter de 20 µm puis lugolé. Des moules « sauvages » ont été systématiquement prélevées, sur le même point d'échantillonnage, pour la recherche des pinnatoxines.

#### 2.1.4. Quantification des pinnatoxines dans les moules

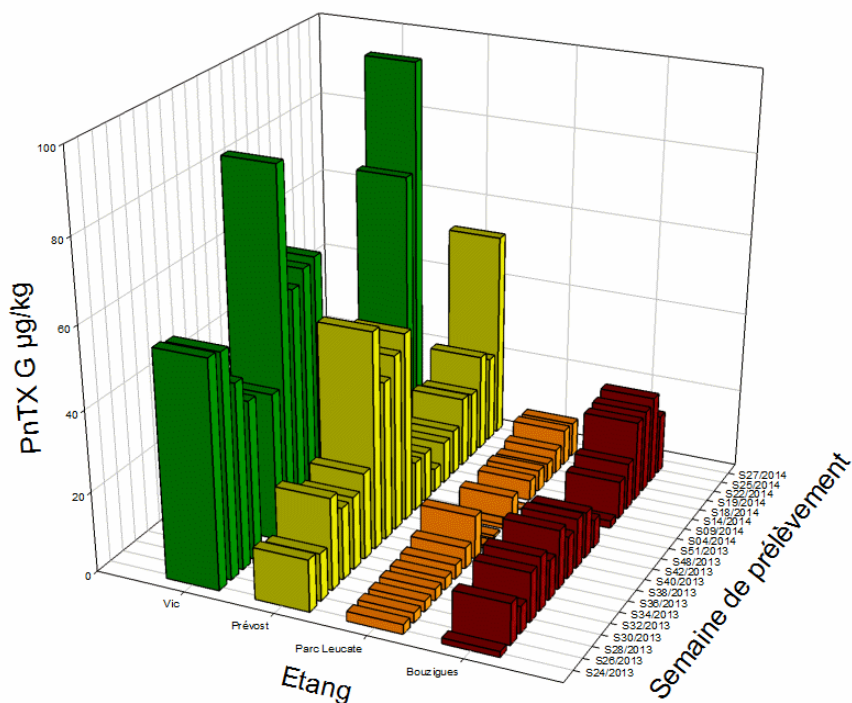
La quantification a été réalisée sur le système CL-SM/SM API-5500 Q-Trap et API-4000 Q-Trap. L'estimation des analyses des PnTXs a été réalisée sur un système chromatographique Shimadzu, UFLC Nexera couplé à un spectromètre de masse triple quadripôle ABSciex API-5500 QTrap ou API-4000 QTrap selon le protocole décrit par Hess (Hess et al., 2013). L'ensemble des PnTXs a été quantifié en utilisant l'étalon de PnTX-G, en considérant que l'ensemble des analogues a le même facteur de réponse que la PnTX-G. La gamme d'étalonnage en PnTX-G préparée dans du méthanol 100%, s'étendait de 0.5 à 100 ng.mL<sup>-1</sup>.

## 2.2 Résultats et discussion

Les concentrations en PnTX-G dans les moules de cinq lagunes ont été mesurées de la semaine 24 en 2013 (10/06/2013) à la semaine 27 en 2014 (30/06/2014). Des concentrations quantifiables de pinnatoxines ont été retrouvées dans toutes les lagunes. Les moules prélevées dans la lagune d'Ingril ont présenté les niveaux de contamination les plus importants enregistrés au cours de cette période d'étude. Les concentrations les plus faibles ont été détectées à Thau et à Leucate, suggérant la situation du point de prélèvement (en pleine eau) influencerait l'accumulation. L'Etang d'Ingril étant la lagune la moins profonde, les températures y sont plus fortes en été permettant ainsi un développement plus intense de *V. rugosum*. Les valeurs maximales des concentrations en PnTX-G varient au cours de l'année et ces périodes ne sont pas les mêmes en 2013 et 2014 (semaine 36 – 38 soit mi septembre en 2013 versus semaine 27 soit début juillet en 2014) (Figure 3 et 4).



**Figure 3.** Variations saisonnières des concentrations en PnTX G dans la chair des moules prélevées dans les 5 lagunes échantillonnées de 2013 à 2014



**Figure 4.** Variations saisonnières des concentrations en PnTX G dans la chair des moules prélevées dans les 4 lagunes échantillonnées de 2013 à 2014 (sans les valeurs mesurées dans la lagune de l'Ingril)



L'étude de terrain sur cinq lagunes méditerranéennes a permis d'établir que les valeurs de concentration en pinnatoxine G mesurées dans les moules provenant de l'étang d'Ingril étaient indéniablement plus importantes que dans celles mesurées chez des individus prélevés dans les quatre autres lagunes, et notamment dans l'étang de Thau. Dans la lagune de Thau, les concentrations observées durant l'été 2013 n'ont pas dépassé les  $20 \mu\text{g kg}^{-1}$  alors que la  $\text{LD}_{50}$  chez la moule est estimée à  $40 \mu\text{g kg}^{-1}$  (Hess et al., 2013). Ceci expliquerait donc le fait que des toxicités atypiques n'y ont pas été observées jusqu'à ce jour. Toutefois, les concentrations de la PnTX-G sont quantifiables dans l'étang de Thau et dans l'étang de Leucate, ce qui suggérerait la présence du microorganisme producteur, et donc un risque potentiel de toxicité des coquillages dans ces zones de production. La concentration maximale observée à Ingril durant l'été 2013 était d'environ  $550 \mu\text{g kg}^{-1}$  dans la chair totale des moules *M. galloprovincialis*. L'adsorption de la Pinnatoxine-G sous forme dissoute dans l'étang d'Ingril sur les résines SPATTS (Zendong et al., 2014) a montré que cette toxine était présente dans la colonne d'eau alors que son producteur biologique, le dinoflagellé *V. rugosum*, présentait essentiellement des phases de vie benthiques ou épiphytes.

### 3. Impact de *Vulcanodinium rugosum* sur la filtration de deux mollusques d'intérêt aquacole (*Crassostrea gigas* et *Mytilus galloprovincialis*) et viabilité de ce dinoflagellé après transit stomacal chez ces mollusques

#### 3.1 Matériels et méthodes

##### 3.1.1. Cultures de *Vulcanodinium rugosum*

*V. rugosum* a été cultivé sur le milieu de culture ENSW (Enriched Natural Sea Water) (Andersen & Provasoli-Guillard, 2005). Il s'agit de l'eau de l'étang de Thau stockée plusieurs mois à l'obscurité afin de favoriser les processus de minéralisation, filtrée sur  $0.2 \mu\text{m}$  puis autoclavée à laquelle sont ajoutés des nutriments et des oligoéléments. Cette souche (IFR-VRU-01) a été maintenue en culture grâce à des repiquages mensuels. Des cultures de *V. rugosum* en grand volume (plusieurs litres) ont été réalisées pour les expériences de balnéation des coquillages. Les conditions de croissance optimales correspondaient à une température de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , une salinité de 36, une intensité de lumière de  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  et une photopériode de 12h/12h. L'aération a été réalisée par simple dévissage des bouchons des flasques. La turbulence à petite échelle affecte négativement la croissance des dinobiontes

avec la formation des kystes temporaires, de ce fait, l'homogénéisation avant les prélèvements est très modérée.

### *3.1.2. Anato-momorphologie des Mollusques*

Le corps d'un mollusque bivalve présente typiquement une symétrie bilatérale et comprend la tête (région antérieure portant la bouche avec son appareil masticateur et des organes sensoriels), le pied et la masse viscérale (figure 5). Celle-ci est enveloppée par un repli tégumentaire, le manteau. Vers l'arrière, le manteau déborde de la masse viscérale pour délimiter la cavité palléale, qui contient en particulier les expansions respiratoires, les branchies. Les coquillages suspensivores filtrent les particules qui flottent dans le milieu aquatique. On les nomme aussi microphages. Les mollusques lamellibranches se singularisent par l'hypertrophie de leur cavité palléale et de leur appareil branchial. La capture des particules en suspension dans l'eau de mer nécessite la mise en oeuvre par les branchies de deux mécanismes distincts, d'une part induire un courant d'eau qui attire les aliments vers les structures filtrantes (circulation d'eau), d'autre part filtrer cette eau (filtration), en retenir les particules consommables (rétention) et les apporter vers l'orifice buccal (tri). Le déplacement de la masse d'eau chargée de particules est lié aux battements de cils. Cette activité assure aussi la ventilation des surfaces respiratoires. Les particules en suspension dans le courant d'eau sont alors piégées dans les mailles du filtre branchial et agglutinées par des sécrétions mucilagineuses. Quand les particules sont capturées par la branchie et piégées dans le mucus, elles sont entraînées par les courants locaux, dus aux cils frontaux et latéro-frontaux, vers les "sillons nourriciers", puis le long de ces sillons vers la bouche. Avant d'atteindre la bouche, les particules piégées vont être triées et certaines d'entre elles rejetées dans le milieu extérieur dans les pseudo-fécès. Deux organes sont impliqués dans le tri des particules avant l'ingestion, les branchies et les palpes labiaux. Un pré-tri s'effectue au niveau des branchies, assurant notamment l'évacuation des particules les plus grossières. Les palpes labiaux seraient capables de solubiliser et de réduire le mucus engluant les particules et donc d'effectuer le tri ultime avant ingestion. Ce tri est complexe car en plus d'un tri selon la taille, intervient également un tri selon la qualité des particules (Newell & Jordan, 1983). Chez les lamellibranches, le compartiment broyeur est représenté par un stylet cristallin. C'est un cylindre protéique sécrété par l'épithélium de la poche du style et animé d'un mouvement rotatif. Son usure sur la paroi chitineuse du bouclier gastrique libère des enzymes. L'intestin

présente un trajet récurrent, décrit une boucle dorso-ventrale autour de l'estomac et de la glande digestive. A l'intestin fait suite un rectum qui longe la face externe dorsale du muscle adducteur et s'ouvre dans la cavité palléale. A l'exception du bouclier gastrique, le tractus est tapissé par un épithélium cilié et par de nombreuses cellules glandulaires à sécrétion glycoprotéique. Au-delà d'un seuil de concentration sestonique de 4 à 5 mg/l pour les huîtres induisant la production de pseudofèces, leur production augmente linéairement avec la charge en particules. Ainsi l'individu maintient les quantités de matières ingérées constantes. Les fonctions post-ingestives: les plus grosses particules sont dirigées vers l'intestin, tandis que les plus petites sont transportées auprès des ouvertures de la glande digestive. Les particules alimentaires parcourent en un temps relativement réduit toute la longueur du tractus digestif, entre 15 et 150 minutes selon l'espèce et les quantités et la qualité de la nourriture consommée. Une fraction non négligeable de nourriture peut traverser le tractus digestif sans subir, de façon efficace, la digestion et ressortir intacte au niveau du rectum.

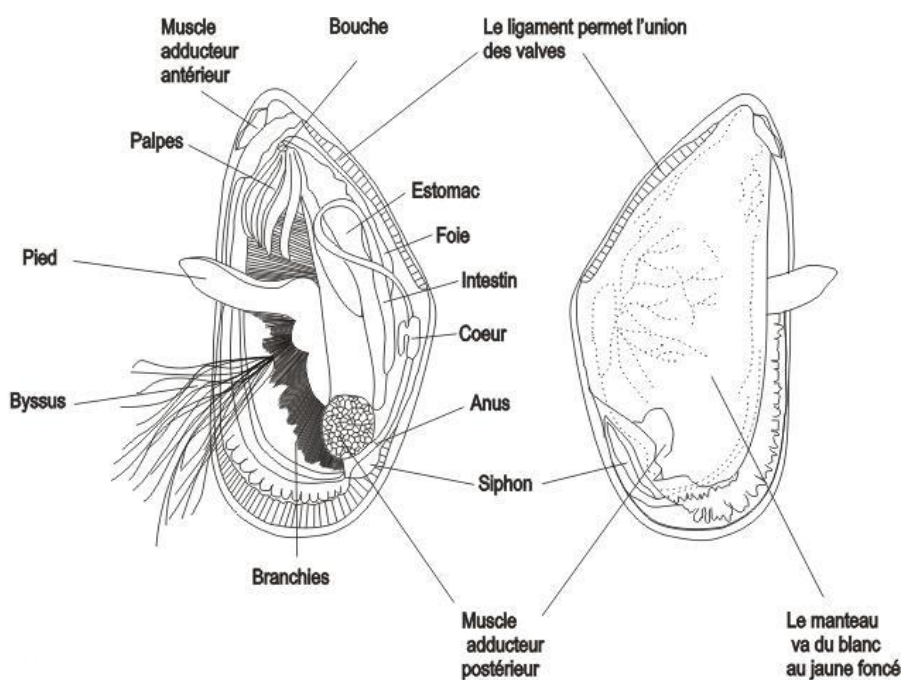
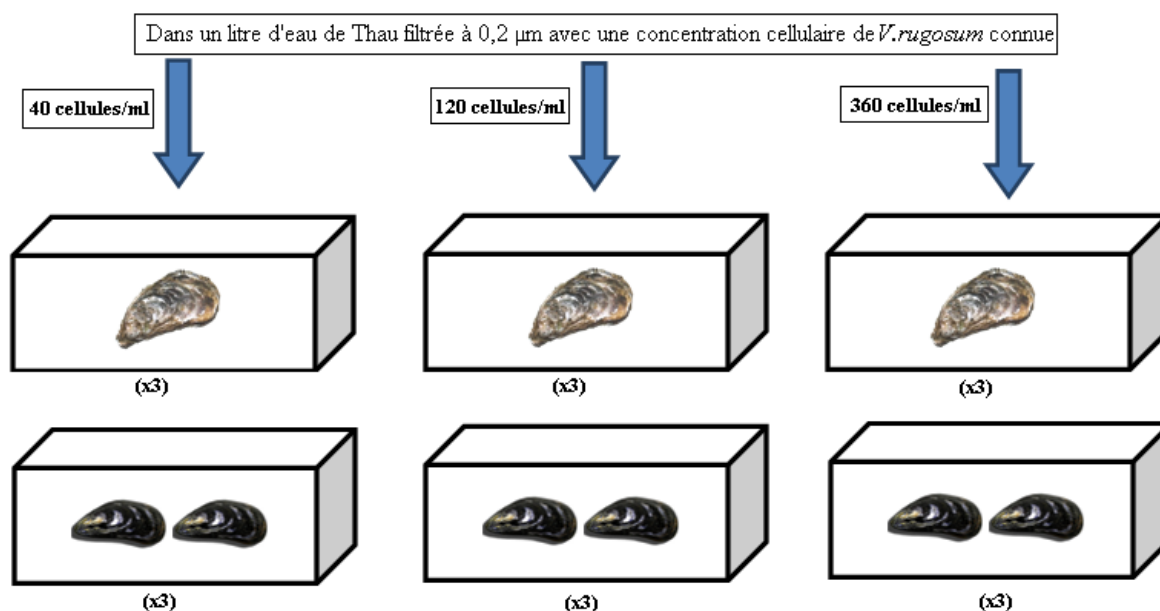


Figure 5 : Anatomie d'une moule (source Ifremer)

### 3.1.3. Expérimentation

Les huîtres (*C. gigas*) proviennent des parcs ostréicole de Bouzigues (Lagune de Thau) tandis que les moules ont été récoltées sur les filières des Aresquiers en mer ouverte. Les

mesurations moyennes des individus de *C. gigas* sont de 10 cm de longueur et de 6 cm de largeur, celle de *M. galloprovincialis* 7 cm de longueur et 4 cm de largeur. Elles ont été mises en baignade dans de l'eau de l'étang de Thau filtrée sur 0,2 µm pendant plus d'une semaine afin de vider le tractus digestif, et d'acclimater les individus aux conditions expérimentales. Les conditions expérimentales choisies étaient les suivantes, un apport d'air par injection dans l'eau, un cycle journalier de lumière/obscurité (12h/12h) et une température de  $15 \pm 2$  °C. Les mollusques ont été placés dans des cristallisoirs en verre avec 1L d'eau de Thau filtré à 0,2 µm en présence de *V. rugosum* à trois concentrations différentes (40, 120 et 360 cellules mL<sup>-1</sup>). Les suspensions cellulaires de *V. rugosum* sont ajoutées à t0 et ne sont pas renouvelées. Les expérimentations sont conduites en triplicat (Figure 6).



**Figure 6** : Mise en contact des bivalves avec les cellules de *V. rugosum*

#### a) Mesure du taux de filtration

Afin de suivre l'évolution de la concentration de *V. rugosum* au cours du temps, un comptage a été réalisé sur des échantillons prélevés après homogénéisation dans les cristallisoirs à 0h, 2h, 4h, 6h, 8h, 24h, 28h et 32h. Le dénombrement s'arrête au bout de 32h pour les huîtres et 48h pour les moules, quand les concentrations de *V. rugosum* sont proches de 0 cellules.L<sup>-1</sup>. Ces valeurs sont utilisées pour déterminer le taux de filtration de *V. rugosum* par les deux mollusques. La clairance a été calculée à partir de l'équation suivante :  $CR = \frac{\ln(N_0/N_t)}{t}$  M/t

(Coughlan, 1969) où  $N_0$  et  $N_t$  représentent respectivement la densité cellulaire par millilitre au début et après le temps  $t$  de l'expérience,  $M$  est le volume total du milieu dans les cristallisoirs et  $t$  le temps après le début de l'expérience.

#### b) Viabilité de *V.rugosum* suite au transit dans le tractus digestif des mollusques

Lors de l'expérience décrite précédemment, les cellules de *V.rugosum* intactes, non digérées, rejetées dans les fécès et les pseudo-fécès des mollusques ont été dénombrées. Les bio-dépôts sont récupérés séparément aux différents temps de stabulation (6h, 9h, 24h, et 48h) pour les huîtres et (2h, 4h, 6h, 24h, 28h, 32h et 48h) pour les moules. Ils ont été photographiés au microscope pour réaliser une estimation semi-quantitative du taux de remplissage en cellules intactes de *V.rugosum* sur une dizaine de bio-dépôts. Les fécès ont été rompues et les cellules ont été suspendues dans du milieu ENSW dans un volume final de 14 ml, le dénombrement des cellules intactes a été réalisé sur chaque échantillon à l'aide d'une cellule Nageotte. Ces suspensions ont été ensuite réparties dans des microplaques de culture 96 puits mais le suivi est effectué sur 20 puits. La viabilité des kystes pelliculaires, mise en évidence par leur germination, a été suivie sur plusieurs jours et ce jusqu'à ce qu'aucune variation ne soit notée au cours du suivi temporel. La viabilité a été considérée comme avérée lorsqu'au moins un kyste pelliculaire de *V.rugosum* a germé et a donné une cellule végétative mobile.

#### c) Extraction et quantification des toxines

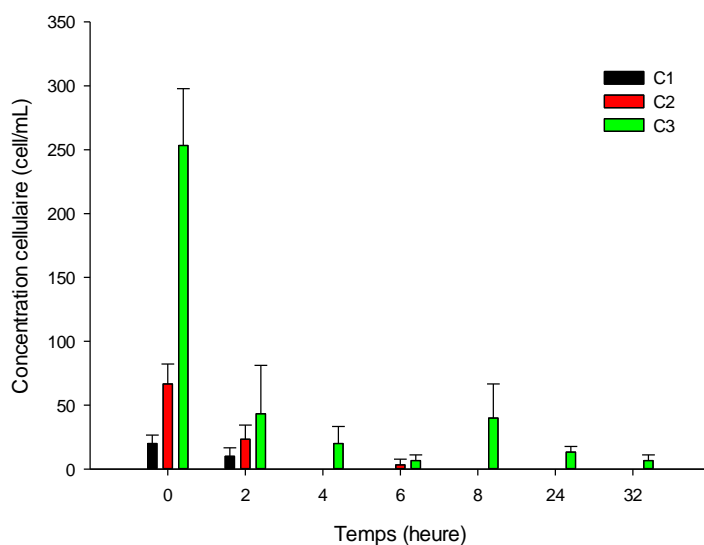
A la fin de l'expérience de balnéation avec *V.rugosum*, les mollusques ont été préparés pour déterminer la teneur en toxine dans les différents tissus d'intérêt. La glande digestive, les branchies et le manteau sont isolés chez chaque huître, la glande digestive et la chair restante chez les moules (soit 48h d'exposition aux cellules de *V. rugosum*). Ces tissus ont été stockés à  $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$  jusqu'à l'extraction de toxines. L'extraction des toxines dans la chair des mollusques a été différente de celle des cultures. Deux grammes de chaque tissu, glande digestive, branchies et manteau, sont isolés chez chaque individu. La quantification en pinnatoxine G a été obtenue à partir de l'analyse des extraits méthanoliques selon le protocole de Hess (Hess et al., 2013).

### 3.2 Résultats

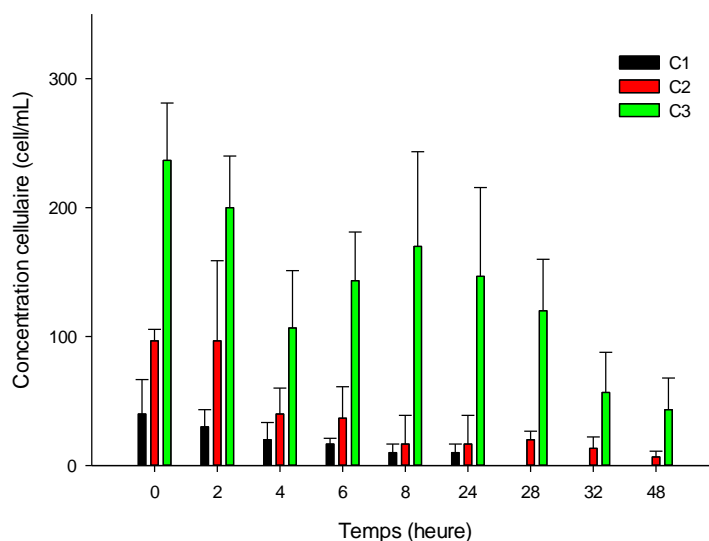
### 3.2.1. Evolution de la concentration de *V.rugosum* en présence des mollusques et taux de filtration

La densité cellulaire de *V. rugosum* en présence de *C.gigas* a diminué rapidement dans les cristallisoirs pour atteindre des valeurs proches de zéro au bout de 2h de contact. Au bout de 4h, les cellules de *V.rugosum* ont toutes été filtrées par *C.gigas* pour les concentrations cellulaires initiales de 40 et 120 cellules.mL<sup>-1</sup> (Figure 7). En présence de *M.galloprovincialis*, les densités cellulaires ont diminué progressivement au cours des premières 4h d'expérience.

Crassostrea gigas (a)



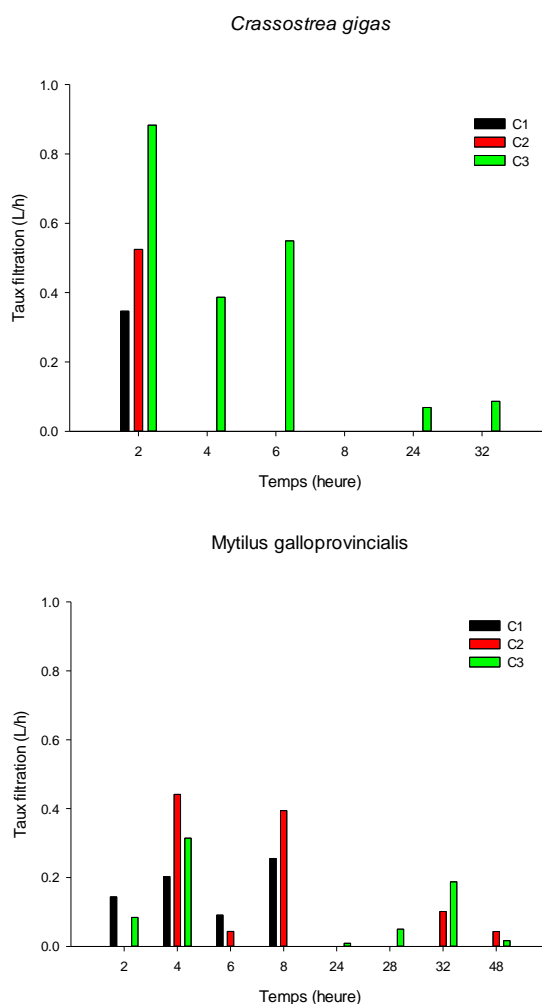
Mytilus galloprovincialis (b)



**Figure 7** : Evolution de la concentration cellulaire de *V.rugosum* dans les cristallisoirs lors de la mise en contact de différentes concentrations de la microalgue avec des huîtres (a) et des moules (b). Les concentrations algales C1, C2 et C3 à t0 correspondent respectivement à 40 (bleu), 120 (rouge) et 360 (vert) cellules mL<sup>-1</sup>.

### 3.2.2. Détermination des propriétés de filtration de *Vulcanodinium rugosum* par les deux mollusques bivalves

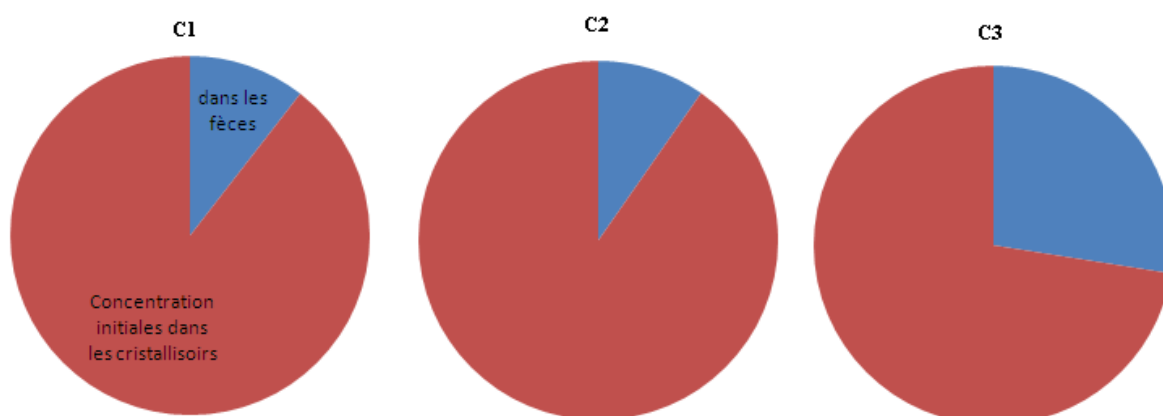
Pour les huîtres, la clairance diminue en fonction du temps pour les individus, mis à stabuler à T0, en présence de la plus forte concentration de *V. rugosum* (C3 : 360 cellules mL<sup>-1</sup>). Pour les deux concentrations les plus faibles (C1 : 40 cellules mL<sup>-1</sup> et C2 : 120 cellules mL<sup>-1</sup>), les cellules sont ingérées dès les premières heures de stabulation, ce qui ne permet pas de conclure sur le taux de clairance pour ces concentrations. Par ailleurs, nous n'observons pas de tendance pour *M. galloprovincialis*. Cependant une diminution progressive du taux de filtration est notée avec les taux les plus importants pour les intervalles de temps 2-4h et 6-8h. (Figure 8)



**Figure 8 :** Taux de filtration (litres. h<sup>-1</sup>) des huîtres et des moules mises en contact avec différentes concentrations de *V.rugosum* Les concentrations algales C1, C2 et C3 à t0 correspondent respectivement à 40 (bleu), 120 (rouge) et 360 (vert) cellules mL<sup>-1</sup>.

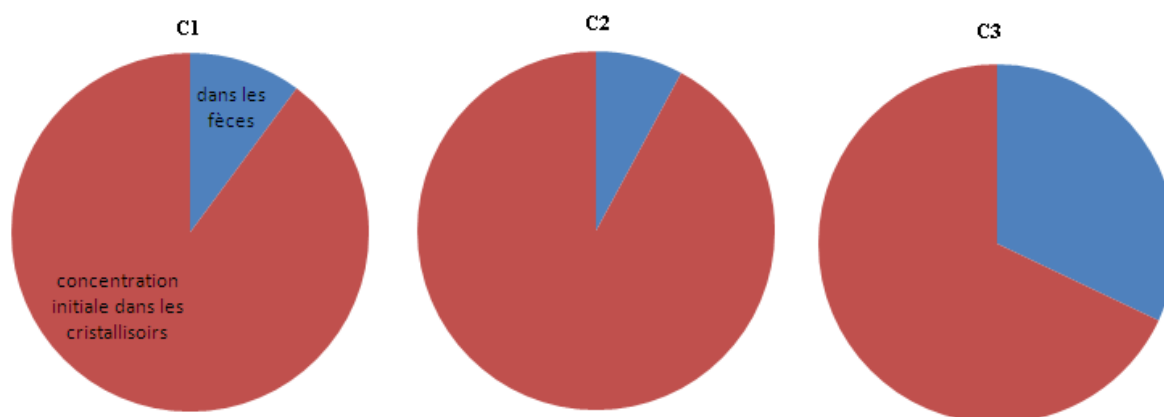
### 3.2.3. Viabilité des cellules de *Vulcanodinium rugosum* après transit dans le tractus digestif chez les mollusques filtreurs

Les fécès (séparés des pseudo fèces) produits par les huîtres et des moules ayant été nourries de cellules de *V.rugosum* sont composées de cellules microalgales intactes avec un taux de remplissage variant de 50 à 100%, le reste étant composé de débris. L'aspect morphologique de ces cellules a montré qu'il s'agissait de kystes pelliculaires. Un comptage précis du nombre de cellules intactes retrouvées dans les fécès a montré qu'une proportion non négligeable de cellules intactes de *V.rugosum* est présente dans ces bio-dépôts (Figures 9, 10). Plus de 25 % des cellules présentes à  $t_0$  dans le cristalliseur ont été retrouvées dans les fécès des deux mollusques mis en contact avec la densité cellulaire initiale C3 (360 cellules.mL<sup>-1</sup>). Pour les deux premières concentrations (C1 et C2), les abondances relatives observées ont été inférieures à 15%.



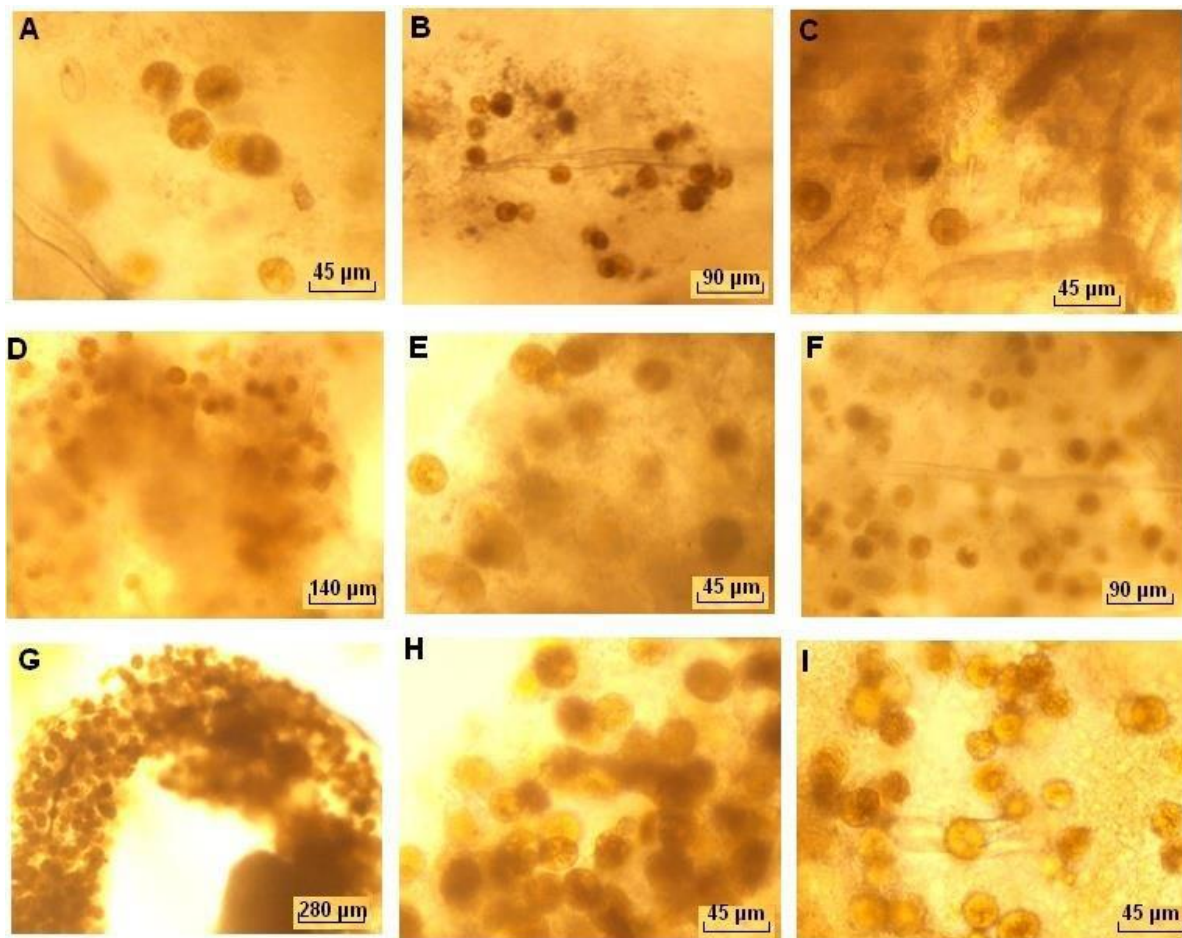
**Figure 9** : Abondances relatives des cellules de *V.rugosum* retrouvées intactes dans les fécès (bleu) de l'huître *C.gigas* par rapport au nombre total de cellules présentes dans le cristalliseur à  $t_0$ . Les concentrations algales C1, C2 et C3 à  $t_0$  correspondent respectivement à 40, 120 et 360 cellules mL<sup>-1</sup>.





**Figure 10** : Abondances relatives des cellules de *V.rugosum* retrouvées intactes dans les fèces (bleu) de la moule *M. galloprovincialis* par rapport au nombre total de cellules présentes dans le cristallisoir à t0. Les concentrations algales C1, C2 et C3 à t0 correspondent respectivement à 40, 120 et 360 cellules mL<sup>-1</sup>.

Des cellules de *V.rugosum* sous la forme de kystes pelliculaires obtenues à partir de fèces (Figure 11) rompus mécaniquement ont été mis en culture dans du milieu ENSW et à des conditions optimales de culture (température de 25°C, alternance jour/nuit 12h/12h). Après 24h d'incubation, la germination de ces kystes a été observée avec l'apparition de cellules végétatives mobiles. Le taux de germination a été d'environ 25% pour l'expérimentation avec la concentration cellulaire initiale C3 (360 cellules.mL<sup>-1</sup>) et d'environ 17% pour les deux autres concentrations C1 et C2. Au bout de 48h, le pourcentage de viabilité a atteint 100%, car tous les puits contenaient des cellules végétatives mobiles.

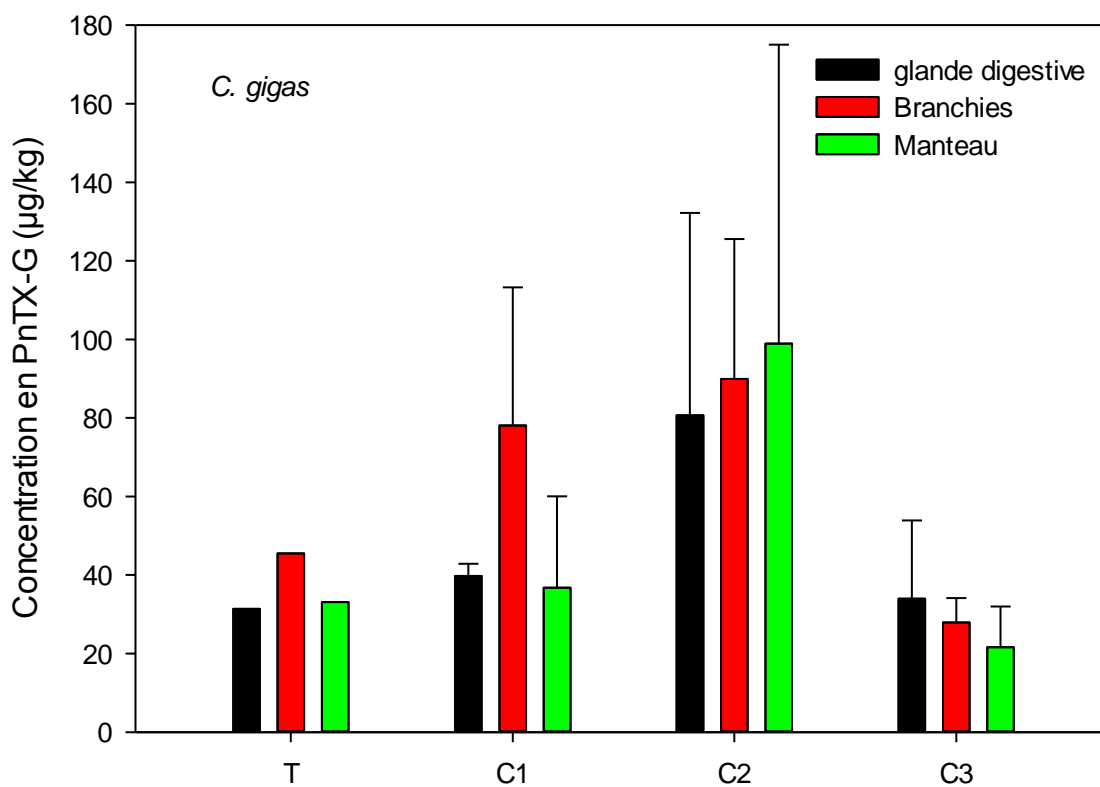


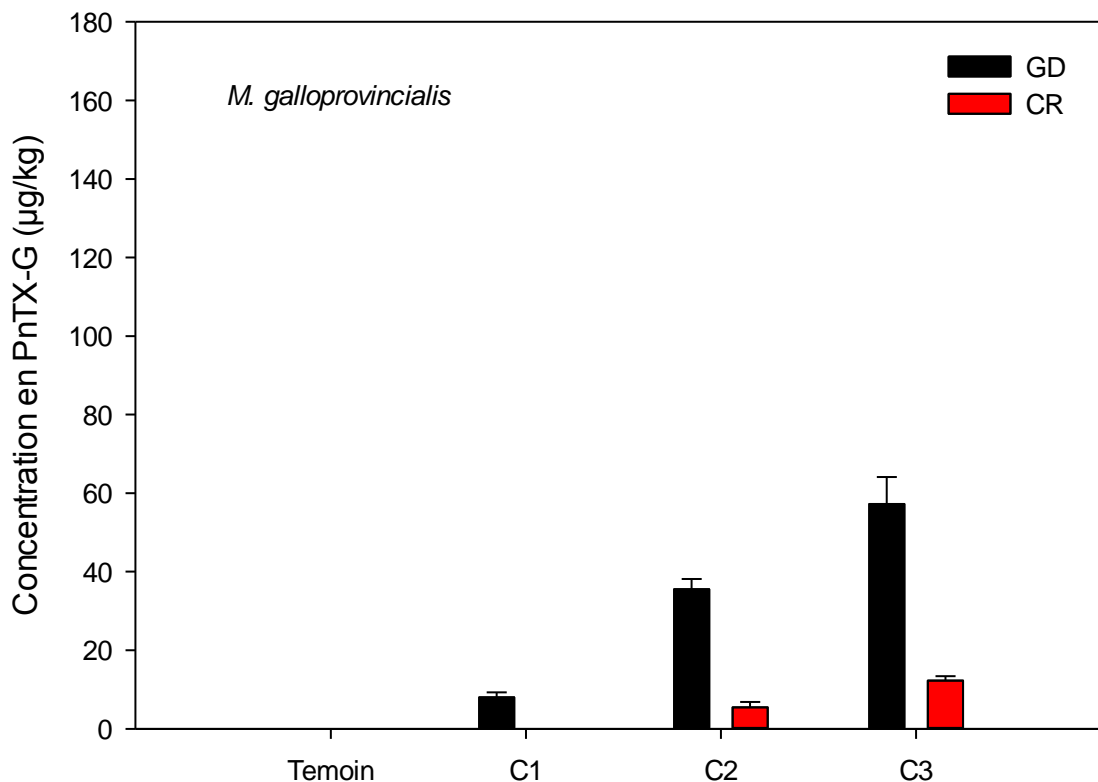
**Figure 11** : Photos prises sous microscope optique des fèces produites par les huîtres nourries avec de cellules *V. rugosum* à différentes concentrations cellulaires à T<sub>0</sub> (A,B,C : 40 cellules mL<sup>-1</sup>), (D,E,F : 120 cellules mL<sup>-1</sup>) et (G,H,I : 360 cellules mL<sup>-1</sup>). Ces fèces contiennent des cellules intactes de *V. rugosum*.

#### 3.2.4. Mesure des toxines dans les tissus des deux mollusques

La concentration des toxines extraites dans les différents tissus des mollusques a été mesurée. Elle est exprimée en microgramme de PnTX-G par kilogramme de tissus analysés. Pour *C.gigas*, les individus témoins sont naturellement contaminés avec les pinnatoxines ce qui confirme que *V.rugosum* est déjà présent dans la lagune de Thau. Il n'y a pas de différence significative entre les concentrations de toxines, dans les glandes digestives et le manteau des huîtres témoin (contaminés naturellement) et la concentration de pinnatoxine dans les individus soumis à la concentration C1 (40 cellules.mL<sup>-1</sup>) à T<sub>0</sub>. Pour les huîtres stabulées à T<sub>0</sub> avec les cellules de *V.rugosum* à la concentration C2 (120 cellules.mL<sup>-1</sup>), nous notons une augmentation significative des pinnatoxines dans tous les tissus. Curieusement à la plus forte

concentration initiale (C3 : 360 cellules.mL<sup>-1</sup>) la quantité de pinnatoxine n'est pas significativement différente de celle des individus témoins. Pour *M. galloprovincialis*, la quantité de toxines est corrélée positivement à la concentration cellulaire initiale de *V. rugosum* présente dans les cristallisoirs avec les moules. Les pinnatoxines s'accumulent majoritairement dans les glandes digestives et secondairement dans la chaire restante. (Figure 12).





**Figure 12** : Concentration en pinnatoxine G dans les glandes digestives (Gd) , les branchies (Br) et le manteau (Mn) de *C. gigas* et dans les glandes digestives (Gd) et la chaire restante (Cr) de *M. galloprovincialis* pour les concentration initiales en cellules de *V. rugosum* dans les cristallisoirs de : C1 (40 cellules.mL<sup>-1</sup>) ; C2 ( 120 cellules.mL<sup>-1</sup>) et C3 (360 cellules.mL<sup>-1</sup>).

### 3.3 Discussion

Trois expériences complémentaires évaluant l'accumulation des pinnatoxines dans les moules conduites dans le cadre du projet Pinnatoxines (Direction Générale Alimentation) ont montré qu'il existait des différences de bioaccumulation en fonction de l'espèce (Mondeguer & Hess, 2014). En effet, des différences d'accumulation ont été observées entre *M. galloprovincialis* et *M. edulis* soumise au même régime alimentaire composé de *V. rugosum*. Durant la première expérience avec une concentration très élevée en cellules algales (maximum de  $1.55 \cdot 10^7$  cellules L<sup>-1</sup>), une forte bioaccumulation en toxines est observée chez *M. edulis* accompagnée d'une mortalité supérieure à 20% des moules. Les expériences suivantes ont été réalisées avec des concentrations algales inférieures, sensiblement équivalentes à celles

enregistrées *in situ* et permettant de se situer en dessous du seuil de mortalité (de l'ordre de 50 cellules mL<sup>-1</sup>). Elles ont été menées afin de suivre le processus de détoxification de la pinnatoxine G chez les mollusques. Celle-ci est apparue relativement lente, surtout dans les glandes digestives où un temps de demi-vie d'environ 25 jours a été observé. En revanche, les concentrations en pinnatoxine G mesurées chez *M. galloprovincialis* sont plus élevées que chez *M. edulis*. Ce résultat a suggéré qu'il existait potentiellement un plus grand risque pour le consommateur de *M. galloprovincialis* si la décontamination n'était pas correctement menée.

Par ailleurs, il a été aussi observé que les réponses des bivalves à la présence dans leur milieu d'algues toxiques sont différentes. On observe des variations allant d'une filtration normale à un rejet total des microalgues (Sumway et al., 1990). Les résultats de nos expériences, montrent que la concentration cellulaire de *V.rugosum* dans les cristallisoirs, diminue rapidement en présence d'individus de *C. gigas*, et relativement moins en présence de *M. galloprovincialis*. Le taux de filtration moyen calculé pour les huîtres et les moules en balnéation en présence de *V.rugosum* diminue au cours du temps. Nous avons observé pour la première fois l'accumulation de la pinnatoxine G dans les différents tissus des mollusques mises en balnéation en présence de différentes concentrations de ce dinobionte. Cette neurotoxine s'accumule majoritairement dans les glandes digestives de *M. galloprovincialis* et sa concentration augmente avec le nombre de cellules algales. Malheureusement il n'a pas été possible de conclure avec les expérimentations de *C. gigas* car les individus témoins étaient contaminés naturellement. Les niveaux de toxines mesurés chez les huîtres provenant des exploitations de Bouzigues attestent de la présence de *V. rugosum* dans la lagune de Thau ce qui est une donnée nouvelle et vu l'importance économique de l'ostréiculture à Thau, une vigilance particulière devrait être envisagée pour suivre l'évolution de cette nouvelle espèce toxique.

De nombreuses études ont montré que des cellules intactes de dinoflagellés étaient rejetées dans les fèces et pseudo-fèces des mollusques bivalves (Bardouil et al., 1993; Bricelj et al., 1993; Shumway & Cucci, 1987). Marasovic (Marasovic, 1993) a observé que *Gonyaulax polyedra* pouvait résister aux conditions défavorables grâce aux kystes temporaires. Cette forme de résistance est initiée par l'organisme lorsqu'une ou plusieurs conditions physico-chimiques changent de façon importante. Les kystes temporaires sont produits en quelques heures par ecdysis, c'est-à-dire perte de la thèque et des flagelles, et donc deviennent

immobiles (Kita et al., 1985). Nous avons montré qu'une proportion non négligeable des cellules de *V. rugosum* sont ingérées mais non digérées par *C. gigas* et *M. galloprovincialis* et se retrouvent intactes dans les fèces des mollusques sous forme de kystes pelliculaires. Ces derniers sont viables et gardent un pouvoir de germination important. La résistance de *V. rugosum* au tractus digestif des mollusques bivalves peut jouer un rôle très important dans la dissémination de l'espèce dans les eaux côtières à la faveur du transfert des coquillages d'une zone à l'autre. Du fait de leur capacité de survie dans le conduit digestif de l'huître et de leur pouvoir de reviviscence, le transfert de cellules de *V. rugosum* d'une zone contaminée vers une zone saine est possible lors du retrempeage des mollusques contaminés. La conchyliculture est une activité qui nécessite de nombreux et fréquents transferts de coquillages. Malheureusement les professionnels méconnaissent ou sous-estiment ces risques d'introduction des micro-algues nuisibles. Des coquillages vivants sont commercialisés dans le monde entier et cela engendre une augmentation significative des risques d'introduction accidentelle de ces espèces nuisibles ou toxiques. Cependant peu d'études ont été réalisées sur l'introduction d'espèces nuisibles via les mollusques. On peut citer les travaux de Van den Bergh (2002) qui a montré que les mollusques représentent le premier vecteur d'introduction des HABs.

#### 4. Conclusion

Nos travaux ont mis en évidence l'expansion de l'espèce émergente *V. rugosum* dans quatre nouvelles lagunes méditerranéennes, peut-être à partir de la lagune d'Ingril où cet organisme avait été identifié en 2010 mais y était présent bien avant (Hess et al., 2013). Ils ont également montré que *V. rugosum* affectait la filtration et la clairance des huîtres et des moules tout en étant très peu digérés par ces mollusques. Ainsi, les mollusques sont des vecteurs importants de contamination de cellules capables de germer après passage dans le tractus digestif. La présence de *V. rugosum* dans les lagunes étudiées s'accompagne de la contamination importante des mollusques par les pinnatoxines synthétisées par ce dinoflagellé. La lagune d'Ingril présente indéniablement les plus fortes valeurs de pinnatoxine G des cinq lagunes méditerranéennes échantillonnées (Thau, Leucate, Ingril, Vic et Prévost). Ces valeurs sont même les plus fortes jamais rapportées au monde jusqu'à ce jour (jusqu'à 5 fois supérieures). Les concentrations en toxines enregistrées diminuent au fur et à

mesure que les points d'échantillonnage s'éloignent de la lagune de l'Ingril, cette observation soulève l'hypothèse d'un gradient de contamination en fonction de la distance. Ainsi, la contamination des coquillages diminue progressivement entre les étangs de l'Ingril, de Vic, du Prévost, de Thau jusqu'à Leucate. Ces observations sont confortées par l'existence du Canal du Rhône à Sète qui relie les lagunes de Thau, de Vic et du Prévost avec la lagune d'Ingril. Enfin, l'étang de Leucate n'est certes pas relié physiquement aux autres lagunes mais son activité conchylicole est fortement liée à celle de Thau par les échanges de coquillages. Ce travail a aussi montré que les mollusques classiquement élevés dans les lagunes (et aussi pour les moules à l'état sauvage) étaient capables d'accumuler dans leur tractus digestif une grande quantité de *V. rugosum* sous forme de kystes temporaires revivifiables. Par ailleurs, il a été démontré que *V. rugosum* impactait la capacité de filtration des mollusques pour des concentrations cellulaires élevées de 360 cells mL<sup>-1</sup>. Cette concentration n'a jamais été observée dans la lagune d'Ingril, En revanche, aucun effet significatif n'a été constaté pour la concentration minimale testée (40 cells mL<sup>-1</sup>) qui reste encore supérieur à la concentration maximale observée qui est de l'ordre de 1000 cellules.L<sup>-1</sup> pour les cellules végétatives et jusqu'à 7000 cellules g<sup>-1</sup> de macrophytes pour les kystes temporaires. Ces données confirment donc que des coquillages d'Ingril pourraient parfaitement être porteurs de cellules de *V. rugosum*. Cette lagune ne possède pas de parc d'élevage comme la lagune de Thau. Cependant, des quantités non négligeables de palourdes sont pêchées dans cette lagune. Elles sont régulièrement stockées en bassin à terre situés autour de la lagune de Thau. Ces bassins pompent de l'eau de Thau en continu et la rejette en continu dans la lagune. De plus, il existe aussi dans Ingril une activité dite de pré-grossissement des huîtres creuses qui sont destinées aux ostréiculteurs de Thau. En considérant que les échanges entre Thau et Leucate sont nombreux et fréquents la possibilité de dissémination de *V. rugosum* à Leucate est tout à fait probable.

Cette étude a donc permis de montrer l'expansion des contaminations à pinnatoxines dans les lagunes méditerranéennes du Languedoc- Roussillon et certainement de l'organisme producteur *V. rugosum*. Ces travaux devraient nous permettre d'attirer l'attention des professionnels sur les risques qui existent lors de transferts fréquents de coquillages. Mais aussi de sensibiliser les acteurs locaux (Administrations, Syndicats de gestion, collectivités locales...) à mettre en place une évaluation des risques liés à cet organisme et aux pinnatoxines qu'il produit car son expansion et son accroissement pourrait nuire fortement à la filière conchylicole française méditerranéenne et d'autres pays du pourtour méditerranéen.

## Références bibliographiques

- Andersen, R., Provasoli-Guillard, 2005. Algal Culturing Techniques.
- Bardouil, M., Bohec, M., Cormerais, M., Bougrier, S., Lassus, P., 1993. Experimental-study of the effects of a toxic microalgal diet on feeding of the oyster *Crassostrea gigas* thunberg. *Journal of Shellfish Research* 12(2), 417-422.
- Bauder, A.G., Cembella, A.D., 2000. Viability of the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* following ingestion and gut passage in the bay scallop *Argopecten irradians*. *Journal of Shellfish Research* 19, 321-324.
- Bricelj, V.M., M., G., Cembella, A.D., 1993. Growth of the blue mussel *Mytilus edulis* on toxic *Alexandrium fundyense* and effects of gut passage on dinoflagellate cells. Toxic phytoplankton blooms in the sea. *Dev. Mar. Biol. . Dev. Mar. Biol.* 3(371-376).
- Carriker, M.R., 1992. Introductions and transfers of molluscs: risk consideration and implications. *Journal of Shellfish Research* 11, 507-510.
- Chou, T., Haino, T., Kuramoto, M., Uemura, D., 1996. Isolation and structure of pinnatoxin D, a new shellfish poison from the Okinawan bivalve *Pinna muricata*. *Tetrahedron Letters* 37(23), 4027-4030.
- Coughlan, J., 1969. The estimation of filtering rate from the clearance of suspension. *Marine Biology* 2, 356-358.
- Deslous-Paoli, J.M., Souchu, P., Mazouni, N., Juge, C., Dagault, F., 1998. Relationship between environment and resources: impact of shellfish farming on a Mediterranean lagoon (Thau, France). *Oceanologica Acta* 21(6), 831-843.
- Garrett, M.J., Puchulutegui, C., Selwood, A.I., Wolny, J.L., 2014. Identification of the harmful dinoflagellate *Vulcanodinium rugosum* recovered from a ballast tank of a globally traveled ship in Port Tampa Bay, Florida, USA, pp. 202-209.
- Hernandez-Becerril, D.U., Rodriguez-Palacio, M.C., Lozano-Ramirez, C., 2013. Morphology and life stages of the potentially pinnatoxin-producing thecate dinoflagellate *Vulcanodinium rugosum* from the tropical Mexican Pacific. *Bot. Marina* 56(5-6), 535-540.
- Hess, P., Abadie, E., Herve, F., Berteaux, T., Sechet, V., Araoz, R., Molgo, J., Zakarian, A., Sibat, M., Rundberget, T., Miles, C.O., Amzil, Z., 2013. Pinnatoxin G is responsible for atypical toxicity in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and clams (*Venerupis decussata*) from Ingril, a French Mediterranean lagoon. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 75.
- Kita, T., Fukuyo, Y., Tokuda, H., Hirano, R., 1985. Life-history and ecology of *goniodoma pseudogoniaulax* (pyrrhophyta) in a rockpool. *Bulletin of Marine Science* 37(2), 643-651.
- Laabir, M., Gentien, P., 1999. Survival of toxic dinoflagellates after gut passage in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* Thunburg. *Journal of Shellfish Research* 18(1), 217-222.
- Marasovic, I., 1993. Preliminary observations on the relationship between temporary and resting cysts of *Lingulodinium polyedra* (Stein) Dodge. Toxic phytoplankton blooms in the sea. *Dev. Mar. Dev. Mar Biol.* 3(139-142).
- McCarron, P., Rourke, W.A., Hardstaff, W., Pooley, B., Quilliam, M.A., 2012. Identification of Pinnatoxins and Discovery of Their Fatty Acid Ester Metabolites in Mussels (*Mytilus edulis*) from Eastern Canada. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60(6), 1437-1446.
- McNabb, P.S., McCoubrey, D.J., Rhodes, L., Smith, K., Selwood, A.I., van Ginkel, R., MacKenzie, A.L., Munday, R., Holland, P.T., 2012. New perspectives on biotoxin



- detection in Rangaunu Harbour, New Zealand arising from the discovery of pinnatoxins. *Harmful Algae* 13, 34-39.
- Mondeguer, F., Hess, P., 2014. Contamination des mollusques bivalves par *Vulcanodinium rugosum*, producteur de Pinnatoxines (phase II). Ifremer.
- Newell, R.I.E., Jordan, S.J., 1983. Preferential ingestion of organic material by the american oyster *Crassostrea virginica*. *Marine Ecology Progress Series* 13(1), 47-53.
- Nézan, E., Chomérat, N., 2011. *Vulcanodinium rugosum* gen. nov., sp. nov. (Dinophyceae): a new marine dinoflagellate from the French Mediterranean coast. *Cryptogamie Algologie* 32(1), 3-18.
- Rhodes, L., Smith, K., Selwood, A., McNabb, P., Molenaar, S., Munday, R., Wilkinson, C., Hallegraeff, G., 2011a. Production of pinnatoxins E, F and G by scrippsielloid dinoflagellates isolated from Franklin Harbour, South Australia. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 45(4), 703-709.
- Rhodes, L., Smith, K., Selwood, A., McNabb, P., Munday, R., Suda, S., Molenaar, S., Hallegraeff, G., 2011b. Dinoflagellate *Vulcanodinium rugosum* identified as the causative organism of pinnatoxins in Australia, New Zealand and Japan. *Phycologia* 50(6), 624-628.
- Rolland, J.-L., Medhioub, W., Vergnes, A., Abi-khalil, C., Savar, V., Abadie, E., Masseret, E., Amzil, Z., Laabir, M., 2014. A Feedback Mechanism to Control Apoptosis Occurs in the Digestive Gland of the Oyster *Crassostrea gigas* Exposed to the Paralytic Shellfish Toxins Producer *Alexandrium catenella*. *Marine Drugs* 12(9), 5035.
- Rolland, J.-L., Pelletier, K., Masseret, E., Rieuvilleneuve, F., Savar, V., Santini, A., Amzil, Z., Laabir, M., 2012. Paralytic Toxins Accumulation and Tissue Expression of  $\alpha$ -Amylase and Lipase Genes in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas* Fed with the Neurotoxic Dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Marine Drugs* 10(11), 2519.
- Rundberget, T., Aasen, J.A.B.s., Selwood, A.I., Miles, C.O., 2011. Pinnatoxins and spirolides in Norwegian blue mussels and seawater. *Toxicon* 58(8), 700-711.
- Scarratt, A.M., Scarratt, D.J., Scarratt, M.G., 1993. Survival of live *Alexandrium tamarense* cells in mussel and scallop spat under simulated transfer conditions. *Journal of Shellfish Research* 12(2), 383-388.
- Selwood, A.I., Miles, C.O., Wilkins, A.L., van Ginkel, R., Munday, R., Rise, F., McNabb, P., 2010. Isolation, Structural Determination and Acute Toxicity of Pinnatoxins E, F and G. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(10), 6532-6542.
- Shumway, S.E., Cucci, T.L., 1987. The effects of the toxic dinoflagellate *protogonyaulax tamarensis* on the feeding and behavior of bivalve mollusks. *Aquatic Toxicology* 10(1), 9-27.
- Sumway, S.E., Newell, R.C., Cresp, D.J., Cucci, T.L., 1990. Particle selection in filter-feeding bivalves molluscs : a new technic on an old theme. In *The Bilvavia*. Hong Kong University Press, Hong Kong.
- Takada, N., Umemura, N., Suenaga, K., Chou, T., Nagatsu, A., Haino, T., Yamada, K., Uemura, D., 2001. Pinnatoxins B and C, the most toxic components in the pinnatoxin series from the Okinawan bivalve *Pinna muricata*. *Tetrahedron Letters* 42(20), 3491-3494.
- Uemura, D., Chou, T., Haino, T., Nagatsu, A., Fukuzawa, S., Zheng, S.Z., Chen, H.S., 1995. Pinnatoxin-A - A toxic amphoteric macrocycle from the Okinawan bivalve *Pinna muricata*. *Journal of the American Chemical Society* 117(3), 1155-1156.
- van den Bergh, J., Nunes, P., Dotinga, H.M., Kooistra, W., Vrieling, E.G., Peperzak, L., 2002. Exotic harmful algae in marine ecosystems: an integrated biological-economic-legal analysis of impacts and policies. *Marine Policy* 26(1), 59-74.

- Zendong, Z., Herrenknecht, C., Abadie, E., Brissard, C., Tixier, C., Mondeguer, F., Séchet, V., Amzil, Z., Hess, P., 2014. Extended evaluation of polymeric and lipophilic sorbents for passive sampling of marine toxins. *Toxicon* 91 pp. 57-68.
- Zeng, N., Gu, H., Smith, K.F., Rhodes, L.L., Selwood, A.I., Yang, W., 2012. The first report of *Vulcanodinium rugosum* (*Dinophyceae*) from the South China Sea with a focus on the life cycle. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 46(4), 511-521.
- Zheng, S.Z., Huang, F.L., Chen, S.C., Tan, X.F., Peng, J., Xie, R.W., 1990. The isolation and bioactivities of pinnatoxin. *Chinese J. Marine Drugs* 9, 33-35.

## Conclusions générales et perspectives

Jusqu'en 2010, la présence du dinoflagellé benthique *Vulcanodinium rugosum* n'avait pas été détectée par le réseau REPHY mis en place depuis de nombreuses années dans la lagune de l'Ingril. Cependant, ce réseau de surveillance avait mis en évidence des toxicités atypiques dès 2006. C'est grâce à la recherche des neurotoxines ayant provoqué ces toxicités non reliées aux toxines lipophiles incriminées habituellement qu'a été mis en évidence la présence de pinnatoxines par LC/MS dans les mollusques (Hess et al., 2013). La présence de *V. rugosum* dans cet écosystème fût alors soupçonnée et par conséquent cette espèce a été recherchée dans le milieu naturel. Cette espèce a été finalement observée dans des échantillons d'eau de l'Ingril et des cellules ont été isolées de ces prélèvements et mises en culture par Nézan et Chomérat (2011).

Les travaux conduits dans le cadre de cette thèse centrés sur *Vulcanodinium rugosum* producteur de pinnatoxines ont eu plusieurs objectifs. D'une part, ils se sont intéressés à sa biologie, son écologie et sa répartition géographique sur le littoral méditerranéen du Languedoc-Roussillon. D'autre part, ils ont cherché à améliorer le suivi de la présence de toxines algales, dans notre cas, des pinnatoxines, dans l'environnement marin par échantillonnage passif. Cette technique basée sur les mécanismes de diffusion des molécules d'intérêt présentes dans le milieu aquatique vers une phase réceptrice (liquides ou adsorbants poreux tel que les résines) du dispositif, va alors, dans notre cas, concentrer les toxines algales présentes à l'état de traces dans l'eau de mer. Enfin, la question de l'expansion de *V. rugosum* a été abordée en étudiant le devenir des cellules algales ingérées dans le tractus digestif de deux espèces de mollusques, et la présence de toxines dans ces mêmes espèces présentes naturellement dans les cinq lagunes présentant des contaminations à pinnatoxines.

### **1. Facteurs environnementaux influençant la croissance et la production de la pinnatoxine G chez *Vulcanodinium rugosum***

Au laboratoire, nous avons étudié les facteurs environnementaux abiotiques majeurs (température, salinité) et nutritionnels qui peuvent affecter sa croissance et la production de pinnatoxine G à l'aide d'expérimentations sur des cultures monoclonales issues de cellules prélevées dans la lagune d'Ingril maintenues en culture dans la souchothèque. Le suivi de la

dynamique des populations de *V. rugosum in situ* dans la lagune d'Ingril au cours d'un cycle annuel a permis de valider les observations faites au laboratoire. Ainsi, nous avons mis en évidence que *V. rugosum* était capable de se développer à des températures supérieures ou égales à 15°C et inférieures à 35°C et à des salinités variant de 20 à 40. Entre 20 et 30°C, cet organisme est capable de se diviser avec un taux de croissance maximal de 0.39 d<sup>-1</sup>, ce qui est relativement faible si on le compare à celui des espèces planctoniques comme *Alexandrium catenella* se développant dans Thau (Aguilera-Belmonte et al., 2013; Band-Schmidt et al., 2014; Etheridge & Roesler, 2005; Jauffrais et al., 2013; Laabir et al., 2011). Les conditions optimales de croissance sont à 25°C et à une salinité de 40. De plus, c'est entre 25°C et 30°C que *V. rugosum* produit le plus de PnTX-G (0.36 pg cell<sup>-1</sup>).

A partir de ces premiers résultats, nous avons testé l'influence des nutriments azotés sur le développement de *V. rugosum* en conditions optimales de croissance. Ainsi, les données obtenues montrent que *V. rugosum* assimile très rapidement l'ammonium. Cependant, il n'y a aucune différence significative entre les taux de croissance des cultures avec les différentes formes azotés inorganiques (ammonium et nitrates) et organique (urée). *V. rugosum* est donc parfaitement capable d'utiliser l'urée, ce qui prouve son caractère osmotrophe. Ce caractère osmotrophe a déjà été démontré chez de nombreuses espèces de dinoflagellée (Burkholder et al., 2008; Soler-Figueroa & Otero, 2015). Nous avons montré que l'utilisation de l'urée a un impact négatif sur sa production de PnTX-G dont la teneur est plus faible avec cette forme azotée. Nous pouvons alors supposer que les conditions nutritives présentes lors des efflorescences peuvent influencer la production de toxines par les microalgues et donc moduler la contamination des coquillages qui les accumuleront par filtration. Il serait intéressant d'étendre nos études toxiniques aux variations des quotas cellulaires en fonction des différentes phases du cycle de vie de *V. rugosum* (cellules végétatives, kystes temporaires et de résistance).

L'observation au laboratoire décrivant la turbulence comme un paramètre important influant sur le cycle de vie, a été confirmée dans le milieu naturel car la majorité des cellules observées étaient des kystes temporaires non mobiles pouvant former une banque de kystes temporaires qui assureraient l'ensemencement de la colonne d'eau et le maintien de l'efflorescence. En effet, une des caractéristiques de cette espèce est la faible présence des cellules végétatives observées dans la colonne d'eau (maximum enregistré de 995 cellules/L) au cours du suivi annuel. En raison de son cycle de vie incluant des kystes temporaires et probablement des kystes de résistance (que nous n'avons pas pu mettre en évidence dans

notre étude), la phase benthos-épiphytique (en surface du sédiment et des macrophytes) et la présence potentielle de kystes de résistance dans le sédiment constituent certainement des éléments clés dans la dynamique de cette espèce dans son milieu naturel. Les cellules végétatives peuvent former rapidement des kystes temporaires lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables, et alors venir enrichir le compartiment benthique en cellules kystiques capables elles-même de se diviser, et ré-ensemencer régulièrement la colonne d'eau. Les kystes temporaires et de résistance joueraient donc un rôle très important dans la contamination des mollusques par la pinnatoxine G. Cependant, leur rôle sur les niveaux de contaminations des mollusques par les pinnatoxines reste à étudier en détail.

## **2 Distribution spatiale et temporelle de *Vulcanodinium rugosum* dans la lagune d'Ingril et facteurs environnementaux influençant sa dynamique *in situ***

La distribution spatiale de *Vulcanodinium rugosum* et les paramètres environnementaux (température, salinité, nutriments azotés et phosphorés) ont été suivis sur un cycle annuel du mars 2012 à mars 2013 dans la lagune d'Ingril. Les résultats de cette étude ont montré, que même si ce dinoflagellé était présent dans toutes les stations échantillonnées, les abondances maximales dans la colonne d'eau restaient faibles ( $\leq 995$  cellules L<sup>-1</sup>). Les densités les plus élevées ont été mesurées de juin à septembre 2012 confirmant ainsi la préférence de ce dinoflagellé pour des températures et salinités élevées.

La présence de kystes temporaires sur les macrophytes a été confirmée avec une densité allant jusqu'à 6300 cellules g poids frais<sup>-1</sup>. Le rôle de cette phase benthos-épiphytique dans l'initiation et/ou le maintien des cellules dans la colonne d'eau serait potentiellement important mais reste à préciser. Par ailleurs, les formes inorganiques d'azotes (NO<sub>2</sub>, NH<sub>4</sub> et azote inorganique dissous) sont corrélées négativement à l'abondance de *V. rugosum* dans la colonne d'eau alors que l'azote total, le phosphore total et les phosphates le sont positivement. Des résultats similaires ont été montrés dans le cadre d'autres études notamment sur le dinoflagellé benthique *Ostreopsis* pour les nitrites et les phosphates (Cohu et al., 2013). Ces résultats laissent supposer que la nutrition organique peut être très importante pour cette espèce, cependant la part des formes organiques utilisée pour la croissance reste à quantifier.

### 3 Les échantillonneurs passifs ou Solid-Phase Adsorption Toxin Tracking (SPATT), des nouveaux outils d'investigation des toxines dans le milieu naturel. Application aux pinnatoxines

Les techniques classiques de détermination des contaminations toxiques dans les milieux naturels, par l'analyse de la toxicité ou de la teneur en toxines des coquillages ayant ingéré des microalgues toxiques, présentent l'inconvénient d'être fastidieuses et coûteuses. Ces techniques nécessitent des mises au point méthodologiques complexes en raison notamment de l'effet matrice à corriger ou des interférences possibles entre toxines mais aussi des conditions liées à l'expérimentation animale (Stewart & McLeod, 2014; Turner et al., 2015). Dans ce travail, nous avons pu tester l'utilisation d'une nouvelle technique d'échantillonnage des toxines par l'utilisation d'échantillonneurs passifs pour collecter et identifier les toxines dissoutes dans le milieu (Zendong et al., 2014).

Avant même d'avoir identifié l'organisme producteur, les pinnatoxines ont été détectées dès 2006 dans des échantillons de moules de la lagune d'Ingril. Ainsi les réactions de type neurologique des souris lors des bioessais réalisés, ont aiguillé les soupçons vers des toxines appartenant au FATs (Fast Acting Toxins) du groupe des imines cycliques. Grâce aux résultats acquis en 2010 sur des échantillons de moules d'Ingril et à l'étude rétrospective des échantillons de moules de cette lagune de 2009 (Hess et al., 2013), nous avons pu confirmer la présence de cette imine cyclique, la pinnatoxine G en concentration très importante dans ces échantillons. La valeur maximale obtenue en 2011 ( $1244 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) est 5 fois supérieure à toutes les valeurs obtenues jusqu'ici et relevées dans d'autres études internationales. Cette étude a aussi montré que les souris mourraient pour des valeurs de PnTX-G supérieures à  $40 \mu\text{g kg}^{-1}$  de chair de moule. Cette valeur peu élevée au regard des concentrations mesurées par LC/MS explique en partie la persistance pendant plusieurs mois de bioessais positifs. Cependant l'utilisation de cette technique de bioessai sur souris n'apporte pas de réponse rapide et nécessite des moyens coûteux. La nécessité de disposer d'outils facilement déployables sur le terrain, peu onéreux et éthiques est une priorité pour anticiper et suivre ces événements de contamination. L'utilisation des échantillonneurs passifs est une des solutions envisagées. Les résultats de cette étude ont montré la capacité de résines de SPATTs à accumuler les toxines de microalgues toxiques même en l'absence de l'organisme producteur dans l'eau. Etant donné son faible coût, sa facilité d'utilisation et les résultats obtenus sur la plupart des toxines trouvées *in situ*, la résine polymérique Diaion® HP-20 (non-polar

copolymer styrene-divinylbenzene adsorbent) semble très prometteuse (Zendong et al., 2014).

#### **4. Evidence de la propagation de *V. rugosum* dans les lagunes méditerranéennes françaises**

Il est clairement admis que l'expansion des HABs est en partie due à la propagation rapide des dinoflagellés toxiques (Anderson, 1995; Carriker, 1992; Hallegraeff, 1998; Hallegraeff, 2010; Kudela & Gobler, 2012). Les questions de la présence de *Vulcanodinium rugosum* et des contaminations des mollusques par des pinnatoxines dans d'autres écosystèmes lagunaires du Languedoc-Roussillon ont été rapidement posées en raison de leur enjeu sanitaire important. La présence de *V. rugosum* constatée sur l'ensemble de la lagune d'Ingril, accentue la probabilité de son expansion hors de cette lagune via le canal du Rhône à Sète. De plus, parmi les vecteurs possibles, le transfert de coquillages s'est imposé naturellement à nous puisque plusieurs lagunes proches hébergent une activité conchylicole importante (Carriker, 1992; Laabir & Gentien, 1999). De ce fait, nous avons recherché la présence des toxines de *V. rugosum* dans des mollusques récoltés dans plusieurs lagunes méditerranéennes françaises, et testé la viabilité de ce dinoflagellé après transit stomacal chez deux espèces de mollusques d'intérêt afin de mettre en évidence la capacité de dissémination de *V. rugosum* via le vecteur mollusque.

Dans l'étude menée entre 2013 et 2014, la pinnatoxine G a été mise en évidence dans tous les mollusques prélevés en différents points des zones échantillonnées dans quatre lagunes (Vic, Prévost, Thau, Leucate) et l'Ingril. Si les teneurs mesurées dans les moules d'Ingril restent de loin les plus élevées, des concentrations notables sont retrouvées dans toutes les autres lagunes. Les concentrations en PnTX-G enregistrées dans les mollusques semblent diminuer au fur et à mesure de l'augmentation de la distance entre l'Ingril et les autres lagunes échantillonnées. Ainsi les teneurs en PnTX-G diminuent progressivement de Vic jusqu'à Leucate. Les valeurs maximales observées sont de 93  $\mu\text{g kg}^{-1}$  à Vic, de 54  $\mu\text{g kg}^{-1}$  au Prévost, de 22  $\mu\text{g kg}^{-1}$  à Bouzigues à Thau et de 11  $\mu\text{g kg}^{-1}$  à Leucate. Ces résultats apparaissant comme logiques pour Vic, le Prévost et Thau en raison de la communication entre les masses d'eau *via* le canal du Rhône à Sète. En revanche, la contamination de la lagune de Leucate nous a surpris. Son éloignement des lagunes héraultaises nous a conduits à envisager un autre

mode de propagation de cette contamination. Les relations entre les ostréiculteurs de Thau et de Leucate sont nombreuses. La piste du transfert de coquillages a donc naturellement été envisagée. Les résultats de nos expérimentations au laboratoire montrent que pour des concentrations de *V. rugosum* cohérentes avec les densités trouvées dans le milieu (quelques milliers de cellules par litre), le bivalve filtreur en présence de ce dinoflagellé ne modifie pas de façon significative sa filtration. De plus, nous avons montré clairement que les cellules de *V. rugosum* étaient retrouvées intactes et viables en grand nombre dans les fécès après passage dans le tractus digestif et ceci malgré les contraintes mécaniques et chimiques dues au passage par ce tractus. Les premières cellules végétatives mobiles sont apparues après 24h d'incubation des fécès de mollusques contenant des kystes temporaires de *V. rugosum* dans des puits de plaques avec du milieu de culture dans les conditions optimales de température et de luminosité. Après 48h, tous les puits contenant des cellules vivantes et mobiles. Nous pouvons donc conclure que le transport des bivalves entre les différentes lagunes représente un risque réel d'introduction de *V. rugosum* dans des lagunes éloignées telle que la lagune de Leucate.

### **Perspectives**

Si nos travaux ont permis de mieux comprendre la biologie et l'écologie de *V. rugosum* et de mettre en évidence sa présence dans plusieurs lagunes languedociennes, de nombreuses questions restent en suspens concernant sa diversité génétique et toxinique intraspécifique, ses caractéristiques physiologiques nutritionnelles, son mode de reproduction.

Ainsi, nous avons montré que la souche de *V. rugosum* qui se développe dans la lagune d'Ingril a un profil toxinique qui diffère de souches asiatiques ou néo-zélandaises. Donc, au-delà de la simple différence phylogénétique, des études sur la biogéographie de ce dinoflagellé reposant sur des outils appropriés tel que l'analyse des microsatellites en collaboration avec le Cawthron Institute (Dr. Lesley Rhodes, New Zealand) et l'équipe de Patrick Berrebi (ISEM), devrait nous permettre d'appréhender le caractère indigène ou au contraire exogène/invasif de ce dinoflagellé. Plusieurs souches ont été isolées dans cet objectif et nous continuons d'en isoler pour mettre en place des dizaines de cultures monoclonales nécessaires à des études en génétique de populations (Gu et al., 2013; Laporte et al., 2014). De plus, cette collection nous permettra de mettre en évidence et de comprendre les diversités écophysiologiques et toxinique intraspécifiques.



Par ailleurs, les différents suivis *in situ*, ont mis en évidence la difficulté de suivre cette espèce avec les méthodes classique du REPHY. Ainsi, la réflexion autour de nouveaux outils de détection et de suivi devra être approfondie avec les responsables de ce réseau. L'utilisation de SPATTs comme méthode de surveillance semble être très prometteuse et mérite d'être testée dans plusieurs autres sites et pour d'autres toxines.

Devant la difficulté d'identifier cet organisme dans les échantillons d'eau en raison de sa faible abondance, de sa forme kystique, le développement de sondes moléculaires spécifiques faciliterait l'identification des cellules par PCR quantitative ou sur cellule entière par la méthode FISH (Touzet et al., 2009; Touzet & Raine, 2007), permettrait ainsi d'améliorer l'efficacité du réseau de surveillance.

Enfin, le cycle de vie de *V. rugosum* n'ayant pas été complètement décrit, un effort particulier devra être entrepris pour rechercher si cette espèce est homothallique ou hétérothallique et identifier clairement le kyste de résistance. Ceci devrait nous permettre de suivre sa distribution spatiale dans les sédiments des lagunes méditerranéennes et de mettre en évidence d'éventuelles banques de kystes. Il serait également nécessaire d'étudier au laboratoire les facteurs environnementaux clés qui vont déterminer la reviviscence des kystes temporaires, formes très importantes dans le milieu naturel, et des kystes de résistance afin de comprendre les processus d'inoculation de la colonne d'eau. A l'inverse, il serait intéressant d'identifier les facteurs qui induisent l'enkystement tels que la baisse de la température, la turbulence, le stress nutritif). Aussi, aborder le rôle du phosphore dans la nutrition de *V. rugosum* est nécessaire, ses capacités de nutrition hétérotrophe et phagotrophe, comme cela a déjà été réalisé par exemple sur *Alexandrium catenella* (Collos et al., 2013; Collos et al., 2014; Jauzein et al., 2011). Par ailleurs, en raison de l'importance de la forme « kyste temporaire benthique et épiphytique » pour l'ensemencement de la colonne d'eau, des études sur l'effet allélopathique positif ou négatif des macrophytes sur la croissance de *V. rugosum* devront être effectuées pour mieux comprendre sa répartition en lien avec les macroalgues et les phanérogames (Chen et al., 2015; Jakobsen et al., 2012; Laabir et al., 2013b; Qiu et al., 2014; Xu et al., 2015). Le rôle des parasites ou des virus dans le déclin des efflorescences de *V. rugosum* devrait être étudié à l'instar de ce qui a déjà été démontré pour d'autres espèces comme *Alexandrium minutum* évoluant dans les abers bretons (Chambouvet et al., 2011a; Chambouvet et al., 2011b; Chambouvet et al., 2008).

Toutes ces connaissances devraient nous permettre de mieux appréhender le déterminisme des efflorescences de *V. rugosum*, espèce neurotoxique émergente dans les écosystèmes

lagunaires côtiers dans la perspective des changements climatiques globaux qui sont annoncés. De plus, la nécessité de mettre en place des systèmes de surveillance de nouvelle génération dans ces écosystèmes, comme les SPATTs notamment, devient primordiale pour déceler précocement les microalgues benthiques toxiques émergentes sous nos latitudes telles qu'*Ostreopsis*, *Gambierdiscus*, *Vulcanodinium rugosum*.

## Références bibliographiques

- Abadie, E., Kaci, L., Berteaux, T., Hess, P., Sechet, V., Masseret, E., Rolland, J., Laabir, M., 2015a. Effect of Nitrate, Ammonium and Urea on Growth and Pinnatoxin G Production of *Vulcanodinium rugosum*. *Marine Drugs* 13(9), 5642.
- Abadie, E., Muguet, A., Berteaux, T., Chomérat, N., Hess, P., Roque D'OrbCastel, E., Masseret, E., Laabir, M., 2015b. Toxin and growth responses of *Vulcanodinium rugosum* to varying temperature and salinity conditions. *Journal of Plankton Research* Soumis le 23 novembre 2015.
- Abadie, E. ; Belin., C. ; Comps, MA. ; Elziere-Papayanni, P.; Lassus, P.; Le Bec, C.; Marcaillou-Le Baut, C.; Nezan, E.; Poggi, R., 1999b. Contamination de l'étang de Thau par *Alexandrium tamarense*. Episode de novembre à decembre 1998.
- Accoroni, S., Colombo, F., Pichierri, S., Romagnoli, T., Marini, M., Battocchi, C., Penna, A., Totti, C., 2012. Ecology of *Ostreopsis cf. ovata* blooms in the northwestern Adriatic Sea. *Cryptogamie Algologie* 33(2), 191-198.
- Accoroni, S., Glibert, P.M., Pichierri, S., Romagnoli, T., Marini, M., Totti, C., 2015. A conceptual model of annual *Ostreopsis cf. ovata* blooms in the northern Adriatic Sea based on the synergic effects of hydrodynamics, temperature, and the N:P ratio of water column nutrients. *Harmful Algae* 45, 14-25.
- Accoroni, S., Romagnoli, T., Colombo, F., Pennesi, C., Di Camillo, C.G., Marini, M., Battocchi, C., Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Dello Iacovo, E., Fattorusso, E., Tartaglione, L., Penna, A., Totti, C., 2011. *Ostreopsis cf. ovata* bloom in the northern Adriatic Sea during summer 2009: Ecology, molecular characterization and toxin profile. *Marine Pollution Bulletin* 62(11), 2512-2519.
- Aguilera-Belmonte, A., Inostroza, I., Carrillo, K.S.e., Franco, J.M., Riobo, P., Gomez, P.I., 2013. The combined effect of salinity and temperature on the growth and toxin content of four Chilean strains of *Alexandrium catenella* (Whedon and Kofoid) Balech 1985 (*Dinophyceae*) isolated from an outbreak occurring in southern Chile in 2009. *Harmful Algae* 23(0), 55-59.
- Aissaoui, A., Armi, Z., Akrouf, F., Ben Hassine, O.K., 2014. Environmental Factors and Seasonal Dynamics of *Prorocentrum lima* Population in Coastal Waters of the Gulf of Tunis, South Mediterranean. *Water Environment Research* 86(12), 2256-2270.
- Aligizaki, K., Nikolaidis, G., 2006. The presence of the potentially toxic genera *Ostreopsis* and *Coolia* (*Dinophyceae*) in the north Aegean sea, Greece. *Harmful Algae* 5(6), 717-730.
- Almazan-Becerril, A., Escobar-Morales, S., Rosiles-Gonzalez, G., Valadez, F., 2015. Benthic-epiphytic dinoflagellates from the northern portion of the Mesoamerican Reef System. *Bot. Marina* 58(2), 115-128.
- Alvarez, E., Lopez-Urrutia, A., Nogueira, E., Fraga, S., 2011. How to effectively sample the plankton size spectrum? A case study using FlowCAM. *Journal of Plankton Research* 33(7), 1119-1133.

- Alves-de-Souza, C., Pecqueur, D., Le Floc'h, E., Mas, S., Roques, C., Mostajir, B., Vidussi, F., Velo-Suarez, L., Sourisseau, M., Fouilland, E., Guillou, L., 2015. Significance of Plankton Community Structure and Nutrient Availability for the Control of Dinoflagellate Blooms by Parasites: A Modeling Approach. *Plos One* 10(6).
- Ami, D., Rochaix, L., 2013. Évaluation des conséquences économiques de la gestion des risques sanitaires liés aux proliférations phytoplanctoniques marines.
- Aminot, A., Kerouel, R., 1982. Automatic-determination of urea in sea-water - A sensible method using diacetylmonoxime. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 39(1), 174-183.
- Aminot, A.K., R., 2007. Dosage automatique des nutriments dans les eaux marines
- Amzil, Z., Sibat, M., Royer, F., Savar, V., 2008. First report on azaspiracid and yessotoxin groups detection in French shellfish. *Toxicon* 52(1), 39-48.
- Andersen, R., Provasoli-Guillard, 2005. *Algal Culturing Techniques*.
- Anderson, D.M., 1995. Toxic red tides and harmful algal blooms: A practical challenge in coastal oceanography. *Reviews of Geophysics* 33(S2), 1189-1200.
- Anderson, D.M., Alpermann, T.J., Cembella, A.D., Collos, Y., Masseret, E., Montresor, M., 2012a. The globally distributed genus *Alexandrium*: Multifaceted roles in marine ecosystems and impacts on human health. *Harmful Algae--The requirement for species-specific information* 14(0), 10-35.
- Anderson, D.M., Cembella, A.D., Hallegraeff, G.M., 2012b. Progress in Understanding Harmful Algal Blooms: Paradigm Shifts and New Technologies for Research, Monitoring, and Management. *Annu. Rev. Mar. Sci.* 4, 143-176.
- Anderson, D.M., Glibert, P.M., Burkholder, J.M., 2002. Harmful algal blooms and eutrophication: Nutrient sources, composition, and consequences. *Estuaries* 25(4B), 704-726.
- Anderson, D.M., Keafer, B.A., 1987. An endogenous annual clock in the toxic marine dinoflagellate *Gonyaulax-tamarensis*. *Nature* 325(6105), 616-617.
- Anderson, D.M., Kulis, D.M., Sullivan, J.J., Hall, S., Lee, C., 1990. Dynamics and physiology of saxitoxin production by the dinoflagellates *Alexandrium spp.* *Marine Biology* 104(3), 511-524.
- Aoki, K., Onitsuka, G., Shimizu, M., Kuroda, H., Matsuo, H., Kitadai, Y., 2015. Interregional differences in mortality of aquacultured yellowtail *Seriola quinqueradiata* in relation to a *Chattonella* bloom in the Yatsushiro Sea, Japan, in 2010. *Fish. Sci.* 81(3), 525-532.
- Armi, Z., Turki, S., Trabelsi, E., Ben Maiz, N., 2010. First recorded proliferation of *Coolia monotis* (Meunier, 1919) in the North Lake of Tunis (Tunisia) correlation with environmental factors. *Environ Monit Assess* 164(1-4), 423-433.
- Band-Schmidt, C.J., Bustillos-Guzman, J.J., Hernandez-Sandoval, F.E., Nunez-Vasquez, E.J., Lopez-Cortés, D.J., 2014. Effect of temperature on growth and paralytic toxin profiles in isolates of *Gymnodinium catenatum* (*Dinophyceae*) from the Pacific coast of Mexico. *Toxicon* 90(0), 199-212.
- Bardouil, M., Bohec, M., Cormerais, M., Bougrier, S., Lassus, P., 1993. Experimental-study of the effects of a toxic microalgal diet on feeding of the oyster *Crassostrea gigas* thunberg. *Journal of Shellfish Research* 12(2), 417-422.
- Bates, S.S., Bird, C.J., Defreitas, A.S.W., Foxall, R., Gilgan, M., Hanic, L.A., Johnson, G.R., McCulloch, A.W., Odense, P., Pocklington, R., Quilliam, M.A., Sim, P.G., Smith, J.C., Rao, D.V.S., Todd, E.C.D., Walter, J.A., Wright, J.L.C., 1989. Pennate diatom *Nitzschia -pungens* as the primary source of domoic acid, a toxin in shellfish from

- Eastern Prince Edward Island, Canada. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 46(7), 1203-1215.
- Bauder, A.G., Cembella, A.D., 2000. Viability of the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* following ingestion and gut passage in the bay scallop *Argopecten irradians*. *Journal of Shellfish Research* 19, 321-324.
- Bec, B., Collos, Y., Souchu, P., Vaquer, A., Lautier, J., Fiandrino, A., Benau, L., Orsoni, V., Laugier, T., 2011. Distribution of picophytoplankton and nanophytoplankton along an anthropogenic eutrophication gradient in French Mediterranean coastal lagoons. *Aquatic Microbial Ecology* 63(1), 29-45.
- Belin, C., 2004. Bilan sur 20 ans des interdictions administratives de vente et de ramassage des coquillages, pour présence de phycotoxines, sur le littoral français. Ifremer.
- Béthoux, J.P., Morin, P., Chaumery, C., Connan, O., Gentili, B., Ruiz-Pino, D., 1998. Nutrients in the Mediterranean Sea, mass balance and statistical analysis of concentrations with respect to environmental change. *Marine Chemistry* 63(1-2), 155-169.
- Blanfuné, A., Boudouresque, C., Gossel, H., Thibaut, T., 2015. Distribution and abundance of *Ostreopsis spp.* and associated species (*Dinophyceae*) in the northwestern Mediterranean: the region and the macroalgal substrate matter. *Environ Sci Pollut Res* 22(16), 12332-12346.
- Bolch, C.J.S., de Salas, M.F., 2007. A review of the molecular evidence for ballast water introduction of the toxic dinoflagellates *Gymnodinium catenatum* and the *Alexandrium tamarensis* complex to Australasia. *Harmful Algae* 6(4), 465-485.
- Bricelj, V.M., M., G., Cembella, A.D., 1993. Growth of the blue mussel *Mytilus edulis* on toxic *Alexandrium fundyense* and effects of gut passage on dinoflagellate cells. Toxic phytoplankton blooms in the sea. *Dev. Mar. Biol.* . *Dev. Mar. Biol.* 3(371-376).
- Burkholder, J.M., Azanza, R.V., Sako, Y., 2006. The Ecology of Harmful Dinoflagellates, In: Granéli, E., Turner, J. (Eds.), *Ecology of Harmful Algae*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 53-66.
- Burkholder, J.M., Glibert, P.M., Skelton, H.M., 2008. Mixotrophy, a major mode of nutrition for harmful algal species in eutrophic waters. *Harmful Algae* 8(1), 77-93.
- Burkholder, J.M., Hallegraeff, G.M., Melia, G., Cohen, A., Bowers, H.A., Oldach, D.W., Parrow, M.W., Sullivan, M.J., Zimba, P.V., Allen, E.H., Kinder, C.A., Mallin, M.A., 2007. Phytoplankton and bacterial assemblages in ballast water of US military ships as a function of port of origin, voyage time, and ocean exchange practices. *Harmful Algae* 6(4), 486-518.
- Carriker, M.R., 1992. Introductions and transfers of molluscs: risk consideration and implications. *Journal of Shellfish Research* 11, 507-510.
- Chambouvet, A., Alves-de-Souza, C., Cueff, V., Marie, D., Karpov, S., Guillou, L., 2011a. Interplay Between the Parasite *Amoebophrya sp* (Alveolata) and the Cyst Formation of the Red Tide Dinoflagellate *Scrippsiella trochoidea*. *Protist* 162(4), 637-649.
- Chambouvet, A., Laabir, M., Sengco, M., Vaquer, A., Guillou, L., 2011b. Genetic diversity of *Amoebophryidae* (Syndiniales) during *Alexandrium catenella/tamarensis* (*Dinophyceae*) blooms in the Thau lagoon (Mediterranean Sea, France). *Research in Microbiology* 162(9), 959-968.
- Chambouvet, A., Morin, P., Marie, D., Guillou, L., 2008. Control of Toxic Marine Dinoflagellate Blooms by Serial Parasitic Killers. *Science* 322(5905), 1254-1257.
- Chang, F.H., Shimizu, Y., Hay, B., Stewart, R., Mackay, G., Tasker, R., 2000. Three recently recorded *Ostreopsis spp.* (*Dinophyceae*) in New Zealand: temporal and regional

- distribution in the upper North Island from 1995 to 1997. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 34(1), 29-39.
- Chen, J., Ye, Q., Gu, H.-F., Li, H.-Y., Lv, S.-H., Liu, J.-S., Yang, W.-D., 2015. Variability in the allelopathic action of the *Alexandrium tamarense* species complex along the coast of China. *Harmful Algae* 47, 17-26.
- Chikhaoui, M.A., Hlaili, A.S., Mabrouk, H.H., 2008. Réponses saisonnières du phytoplancton aux rapports d'enrichissements N:Si:P dans la lagune de Bizerte (Sud-Ouest de la Méditerranée). *Comptes Rendus Biologies* 331(5), 389-408.
- Chou, T., Haino, T., Kuramoto, M., Uemura, D., 1996. Isolation and structure of pinnatoxin D, a new shellfish poison from the Okinawan bivalve *Pinna muricata*. *Tetrahedron Letters* 37(23), 4027-4030.
- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Dello Iacovo, E., Fattorusso, E., Forino, M., Grauso, L., Tartaglione, L., Guerrini, F., Pezzolesi, L., Pistocchi, R., 2010a. Characterization of 27-hydroxy-13-desmethyl spirolide C and 27-oxo-13,19-didesmethyl spirolide C. Further insights into the complex Adriatic *Alexandrium ostenfeldii* toxin profile. *Toxicon* 56(8), 1327-1333.
- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Grauso, L., Tartaglione, L., Guerrini, F., Pistocchi, R., 2007. Spirolide toxin profile of Adriatic *Alexandrium ostenfeldii* cultures and structure elucidation of 27-hydroxy-13,19-didesmethyl spirolide C. *Journal of Natural Products* 70(12), 1878-1883.
- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Tartaglione, L., Boschetti, L., Rubini, S., Cangini, M., Pigozzi, S., Poletti, R., 2010b. Complex toxin profile of *Mytilus galloprovincialis* from the Adriatic sea revealed by LC-MS. *Toxicon* 55(2-3), 280-288.
- Ciminiello, P., Fattorusso, E., Forino, M., Magno, S., Poletti, R., Satake, M., Viviani, R., Yasumoto, T., 1997. Yessotoxin in mussels of the northern Adriatic Sea. *Toxicon* 35(2), 177-183.
- Cognetti, G., Maltagliati, F., 2000. Biodiversity and adaptive mechanisms in brackish water fauna. *Marine Pollution Bulletin* 40(1), 7-14.
- Cohu, S., Mangialajo, L., Thibaut, T., Blanfuné, A., Marro, S., Lemée, R., 2013. 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* 24, 32-44.
- Cohu, S., Thibaut, T., Mangialajo, L., Labat, J.-P., Passafiume, O., Blanfuné, A., Simon, N., Cottalorda, J.-M., Lemée, R., 2011. Occurrence of the toxic dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata* in relation with environmental factors in Monaco (NW Mediterranean). *Marine Pollution Bulletin* 62(12), 2681-2691.
- Collos, Y., Bec, B., Jauzein, C., Abadie, E., Laugier, T., Lautier, J., Pastoureaud, A., Souchu, P., Vaquer, A., 2009. Oligotrophication and emergence of picocyanobacteria and a toxic dinoflagellate in Thau lagoon, southern France. *Journal of Sea Research* 61(1-2), 68-75.
- Collos, Y., Gagne, C., Laabir, M., Vaquer, A., Cecchi, P., Souchu, P., 2004. Nitrogenous nutrition of *Alexandrium catenella* (*Dinophyceae*) in cultures and in Thau lagoon, southern France. *Journal of Phycology* 40(1), 96-103.
- Collos, Y., Jauzein, C., Laabir, M., Vaquer, A., 2013. Discrepancies between net particulate carbon production and <sup>13</sup>C-labelled bicarbonate uptake by *Alexandrium catenella* (*Dinophyceae*): grazing controls the balance between autotrophic and non autotrophic carbon acquisition. *Journal of Phycology* 49(3), 441-446.

- Collos, Y., Jauzein, C., Ratmaya, W., Souchu, P., Abadie, E., Vaguer, A., 2014. Comparing diatom and *Alexandrium catenella/tamarense* blooms in Thau lagoon: Importance of dissolved organic nitrogen in seasonally N-limited systems. *Harmful Algae* 37, 84-91.
- Collos, Y., Lespilette, M., Vaquer, A., Laabir, M., Pastoureaud, A., 2006. Uptake and accumulation of ammonium by *Alexandrium catenella* during nutrient pulses. *African Journal of Marine Science* 28(2), 313-318.
- Collos, Y., Mornet, F., Sciandra, A., Waser, N., Larson, A., Harrison, P.J., 1999. An optical method for the rapid measurement of micromolar concentrations of nitrate in marine phytoplankton cultures. *Journal of Applied Phycology* 11(2), 179-184.
- Collos, Y., Vaquer, A., Laabir, M., Abadie, E., Laugier, T., Pastoureaud, A., Souchu, P., 2007. Contribution of several nitrogen sources to growth of *Alexandrium catenella* during blooms in Thau lagoon, southern France. *Harmful Algae* 6(6), 781-789.
- Costanza, R., d'Arge, R., de Groot, R., Farber, S., Grasso, M., Hannon, B., Limburg, K., Naeem, S., O'Neill, R.V., Paruelo, J., Raskin, R.G., Sutton, P., van den Belt, M., 1998. The value of the world's ecosystem services and natural capital (Reprinted from *Nature*, vol 387, pg 253, 1997). *Ecological Economics* 25(1), 3-15.
- Daiguji, M., Satake, M., Ramstad, H., Aune, T., Naoki, H., Yasumoto, T., 1998. Structure and fluorometric HPLC determination of 1-desulfoyessotoxin, a new yessotoxin analog isolated from mussels from Norway. *Natural toxins* 6(6), 235-239.
- Denant, V., Saliot, A., Mantoura, R.F.C., 1991. Distribution of algal chlorophyll and carotenoid-pigments in a stratified estuary - The Krka River, Adriatic Sea. *Marine Chemistry* 32(2-4), 285-297.
- Derolez, V., Fiandrino, A., Munaron, D., Ouisse, V., Oheix, J., Messiaen, G., Fortune, M., Mortreux, S., 2014. Réseau de Suivi Lagunaire du Languedoc-Roussillon. Bilan des résultats 2013. IFREMER.
- Deslous-Paoli, J.M., Souchu, P., Mazouni, N., Juge, C., Dagault, F., 1998. Relationship between environment and resources: impact of shellfish farming on a Mediterranean lagoon (Thau, France). *Oceanologica Acta* 21(6), 831-843.
- Dodge, J.D., 1995. Thecal structure, taxonomy, and distribution of the planktonic dinoflagellate *micracanthodinium setiferum* (gonyaulacales, *dinophyceae*). *Phycologia* 34(4), 307-312.
- Douglas, D.J., Bates, S.S., 1992. Production of domoic acid, a neurotoxic amino-acid, by an axenic culture of the marine diatom *nitzschia-pungens f-multiseriens* hasle. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 49(1), 85-90.
- Drake, L.A., Doblin, M.A., Dobbs, F.C., 2007. Potential microbial bioinvasions via ships' ballast water, sediment, and biofilm. *Marine Pollution Bulletin* 55(7-9), 333-341.
- Drake, L.A., Meyer, A.E., Forsberg, R.L., Baier, R.E., Doblin, M.A., Heinemann, S., Johnson, W.P., Koch, M., Rublee, P.A., Dobbs, F.C., 2005. Potential invasion of microorganisms and pathogens via 'interior hull fouling': biofilms inside ballast water tanks. *Biological Invasions* 7(6), 969-982.
- Etheridge, S.M., Roesler, C.S., 2005. Effects of temperature, irradiance, and salinity on photosynthesis, growth rates, total toxicity, and toxin composition for *Alexandrium fundyense* isolates from the Gulf of Maine and Bay of Fundy. *Deep-Sea Research Part II-Topical Studies in Oceanography* 52(19-21), 2491-2500.
- Faust, M.A., 1996. Morphology and ecology of the marine benthic dinoflagellate *Scrippsiella subsalsa* (*Dinophyceae*). *Journal of Phycology* 32(4), 669-675.
- Figueroa, R.I., Garces, E., Bravo, I., 2007. Comparative study of the life cycles of *Alexandrium tamutum* and *Alexandrium minutum* (Gonyaulacales, *Dinophyceae*) in culture. *Journal of Phycology* 43(5), 1039-1053.

- Figuerola, R.I., Bravo, I., Garces, E., 2008. The significance of sexual versus asexual cyst formation in the life cycle of the noxious dinoflagellate *Alexandrium peruvianum*. *Harmful Algae* 7(5), 653-663.
- Fire, S., Flewelling, L., Stolen, M., Noke Durden, W., de Wit, M., Spellman, A., Wang, Z., 2015. Brevetoxin-associated mass mortality event of bottlenose dolphins and manatees along the east coast of Florida, USA. *Marine Ecology Progress Series* 526, 241-251.
- Flewelling, L.J., Naar, J.P., Abbott, J.P., Baden, D.G., Barros, N.B., Bossart, G.D., Bottein, M.Y.D., Hammond, D.G., Haubold, E.M., Heil, C.A., Henry, M.S., Jacocks, H.M., Leighfield, T.A., Pierce, R.H., Pitchford, T.D., Rommel, S.A., Scott, P.S., Steidinger, K.A., Truby, E.W., Van Dolah, F.M., Landsberg, J.H., 2005. Brevetoxicosis: Red tides and marine mammal mortalities. *Nature* 435(7043), 755-756.
- Flynn, K.J., Flynn, K., 1995. Dinoflagellate physiology, nutrient stress and toxicity. In: Lassus P, Arzul G, Le Denn EE, Gentien P., Marcailloux C. (eds) *Harmful marine algal blooms*. Lavoisier Intercept, Paris, 541-550.
- Frémy, J.M., Lassus, P., 2001. Toxines d'algues dans l'alimentation. Ifremer-Afssa-Ministère de l'environnement, 554 pp.
- Fritz, L., Anderson, D.M., Triemer, R.E., 1989. Ultrastructural aspects of sexual reproduction in the red tide dinoflagellate *Gonyaulax tamarensis*. *Journal of Phycology* 25(1), 95-107.
- Fu, F.-X., Zhang, Y., Warner, M.E., Feng, Y., Sun, J., Hutchins, D.A., 2008. A comparison of future increased CO<sub>2</sub> and temperature effects on sympatric *Heterosigma akashiwo* and *Prorocentrum minimum*. *Harmful Algae* 7(1), 76-90.
- Fujimoto, A., Kondo, S.-i., Nakao, R., Tomaru, Y., Nagasaki, K., 2013. Co-occurrence of *Heterocapsa Circularisquama* Bloom and Its Lytic Viruses in Lake Kamo, Japan, 2010. *Jarq-Japan Agricultural Research Quarterly* 47(3), 329-338.
- Gangnery, A., 2003. Etude et modélisation de la dynamique des populations de bivalves en élevage (*Crassostrea gigas* et *Mytilus galloprovincialis*) dans le bassin de Thau (Méditerranée, France) et des ascidies solitaires associées. PhD Thesis, Université Montpellier II.
- Garcia-Altres, M., Casanova, A., Bane, V., Diogène, J., Furey, A., de la Iglesia, P., 2014. Confirmation of Pinnatoxins and Spirolides in Shellfish and Passive Samplers from Catalonia (Spain) by Liquid Chromatography Coupled with Triple Quadrupole and High-Resolution Hybrid Tandem Mass Spectrometry. *Marine Drugs* 12(6), 3706.
- Garrett, M.J., Puchulutegui, C., Selwood, A.I., Wolny, J.L., 2014. Identification of the harmful dinoflagellate *Vulcanodinium rugosum* recovered from a ballast tank of a globally traveled ship in Port Tampa Bay, Florida, USA, pp. 202-209.
- Garrett, M.J., Richardson, R.W., Wolny, J.L., Williams, B.J., Dirks, M.D., Brame, J.A., 2011. Methods for sampling and analysis of marine microalgae in ship ballast tanks: a case study from Tampa Bay, Florida, USA. *Algae* 26(2), 181-192.
- Gedaria, A.I., Luckas, B., Reinhardt, K., Azanza, R.V., 2007. Growth response and toxin concentration of cultured *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* to varying salinity and temperature conditions. *Toxicon* 50(4), 518-529.
- Genovesi, B., Laabir, M., Masseret, E., Collos, Y., Vaquer, A., Grzebyk, D., 2009. Dormancy and germination features in resting cysts of *Alexandrium tamarensis* species complex (*Dinophyceae*) can facilitate bloom formation in a shallow lagoon (Thau, southern France). *Journal of Plankton Research* 31(10), 1209-1224.



- Genovesi, B., Mouillot, D., Vaquer, A., Laabir, M., Pastoureaud, A., 2007. Towards an optimal sampling strategy for *Alexandrium catenella* (*Dinophyceae*) benthic resting cysts. *Harmful Algae* 6(6), 837-848.
- Giacobbe, M.G., Oliva, F.D., Maimone, G., 1996. Environmental Factors and Seasonal Occurrence of the Dinoflagellate *Alexandrium minutum*, a PSP Potential Producer, in a Mediterranean Lagoon. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 42(5), 539-549.
- Giacobbe, M.G., Penna, A., Gangemi, E., Maso, M., Garces, E., Fraga, S., Bravo, I., Azzaro, F., Penna, N., 2007. Recurrent high-biomass blooms of *Alexandrium taylorii* (*Dinophyceae*), a HAB species expanding in the Mediterranean. *Hydrobiologia* 580, 125-133.
- Glibert, P., M., Maranger, R., Sobota, D., J., Bouwman, L., 2014. The Haber Bosch–harmful algal bloom (HB–HAB) link. *Environmental Research Letters* 9(10), 105001.
- Glibert, P.A., DM ; Gentien, P; Granéli, E; Sellner, KG 2005. Global Complex Phenomena of Harmful algal Blooms. *Oceanography* 18, 136-147.
- Glibert, P.M., Burkholder, J.M., 2006. The Complex Relationships Between Increases in Fertilization of the Earth, Coastal Eutrophication and Proliferation of Harmful Algal Blooms, In: Granéli, E., Turner, J. (Eds.), *Ecology of Harmful Algae*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 341-354.
- Gomez, E., Durillon, C., Rofes, G., Picot, B., 1999. Phosphate adsorption and release from sediments of brackish lagoons: pH, O<sub>2</sub> and loading influence. *Water Research* 33(10), 2437-2447.
- Gomez, F., 2012. A quantitative review of the lifestyle, habitat and trophic diversity of dinoflagellates (Dinoflagellata, Alveolata). *Systematics and Biodiversity* 10(3), 267-275.
- Grzebyk, D., Bechemin, C., Ward, C.J., Verite, C., Codd, G.A., Maestrini, S.Y., 2003. Effects of salinity and two coastal waters on the growth and toxin content of the dinoflagellate *Alexandrium minutum*. *Journal of Plankton Research* 25(10), 1185-1199.
- Gu, H., Zeng, N., Liu, T., Yang, W., Mueller, A., Krock, B., 2013. Morphology, toxicity, and phylogeny of *Alexandrium* (*Dinophyceae*) species along the coast of China. *Harmful Algae* 27, 68-81.
- Guerrini, F., Pezzolesi, L., Feller, A., Riccardi, M., Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Tartaglione, L., Iacovo, E.D., Fattorusso, E., Forino, M., Pistocchi, R., 2010. Comparative growth and toxin profile of cultured *Ostreopsis ovata* from the Tyrrhenian and Adriatic Seas. *Toxicon* 55(2-3), 211-220.
- Guillard, R.R.L., 1973. Division rates. *Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements* 1, 289-311.
- Hadjadji, I., Frehi, H., Ayada, L., Abadie, E., Collos, Y., 2014. A comparative analysis of *Alexandrium catenella/tamarensis* blooms in Annaba Bay (Algeria) and Thau lagoon (France); phosphorus limitation as a trigger. *Comptes Rendus Biologies* 337(2), 117-122.
- Hadjadji, I., Masseret, E., Plisson, B., Laabir, M., Cecchi, P., Collos, Y., 2012. Clonal variation in physiological parameters of *Alexandrium tamarensis*: implications for biological invasions and maintenance. *Cahiers De Biologie Marine* 53(3), 357-363.
- Hallegraeff, G.M., 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia* 32(2), 79-99.
- Hallegraeff, G.M., 1998. Transport of toxic dinoflagellates via ships' ballast water: bioeconomic risk assessment and efficacy of possible ballast water management strategies. *Marine Ecology Progress Series* 168, 297-309.

- Hallegraeff, G.M., 2010. Ocean climate change, phytoplankton community responses, and harmful algal blooms: a formidable predictive challenge. *Journal of Phycology* 46(2), 220-235.
- Halstead, B.W., 1967. Poisonous and venomous marine animals of the world. U.S. Government Printing Office, Washington, DC. 2-Invertebrates.
- Hamasaki, K., Horie, M., Tokimitsu, S., Toda, T., Taguchi, S., 2001. Variability in Toxicity of the Dinoflagellate *Alexandrium Tamarense* Isolated from Hiroshima Bay, Western Japan, as a Reflection of Changing Environmental Conditions. *Journal of Plankton Research* 23(3), 271-278.
- Hansen, G., Daugbjerg, N., Franco, J.M., 2003. Morphology, toxin composition and LSU rDNA phylogeny of *Alexandrium minutum* (*Dinophyceae*) from Denmark, with some morphological observations on other European strains. *Harmful Algae* 2(4), 317-335.
- Hao, J., Matsuura, F., Kishi, Y., Kita, M., Uemura, D., Asai, N., Iwashita, T., 2006. Stereochemistry of pteriatoxins A, B, and C. *Journal of the American Chemical Society* 128(24), 7742-7743.
- Harrison, P.J., Waters, R.E., Taylor, F.J.R., 1980. A broad-spectrum artificial seawater medium for coastal and open ocean phytoplankton. *Journal of Phycology* 16(1), 28-35.
- Hattenrath, T.K., Anderson, D.M., Gobler, C.J., 2010. The influence of anthropogenic nitrogen loading and meteorological conditions on the dynamics and toxicity of *Alexandrium fundyense* blooms in a New York (USA) estuary. *Harmful Algae* 9(4), 402-412.
- Hegaret, H., da Silva, P.M., Wikfors, G.H., Haberkorn, H., Shumway, S.E., Soudant, P., 2011. In vitro interactions between several species of harmful algae and haemocytes of bivalve molluscs. *Cell Biology and Toxicology* 27(4), 249-266.
- Hernandez-Becerril, D.U., Rodriguez-Palacio, M.C., Lozano-Ramirez, C., 2013. Morphology and life stages of the potentially pinnatoxin-producing thecate dinoflagellate *Vulcanodinium rugosum* from the tropical Mexican Pacific. *Bot. Marina* 56(5-6), 535-540.
- Hess, P., Abadie, E., Herve, F., Berteaux, T., Sechet, V., Araoz, R., Molgo, J., Zakarian, A., Sibat, M., Rundberget, T., Miles, C.O., Amzil, Z., 2013. Pinnatoxin G is responsible for atypical toxicity in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and clams (*Venerupis decussata*) from Ingril, a French Mediterranean lagoon. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 75, 16-26.
- Hiscock, K., Southward, A., Tittley, I., Hawkins, S., 2004. Effects of changing temperature on benthic marine life in Britain and Ireland. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 14(4), 333-362.
- Hoegh-Guldberg, O., Bruno, J.F., 2010. The Impact of Climate Change on the World's Marine Ecosystems. *Science* 328(5985), 1523-1528.
- Howard, M.D.A., Silver, M., Kudela, R.M., 2008. Yessotoxin detected in mussel (*Mytilus californicus*) and phytoplankton samples from the US west coast. *Harmful Algae* 7(5), 646-652.
- Hu, T.M., Curtis, J.M., Oshima, Y., Quilliam, M.A., Walter, J.A., Watsonwright, W.M., Wright, J.L.C., 1995. Spirolide-b and spirolide-d, 2 novel macrocycles isolated from the digestive glands of shellfish. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications*(20), 2159-2161.
- Hwang, D.F., Lu, Y.H., 2000. Influence of environmental and nutritional factors on growth, toxicity, and toxin profile of dinoflagellate *Alexandrium minutum*. *Toxicon* 38(11), 1491-1503.

- Ishikawa, A., Hattori, M., Ishii, K.-I., Kulis, D.M., Anderson, D.M., Imai, I., 2014. In situ dynamics of cyst and vegetative cell populations of the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* in Ago Bay, central Japan. *Journal of Plankton Research* 36(5), 1333-1343.
- Ishikawa, A., Taniguchi, A., 1994. The role of cysts on population-dynamics of *Scrippsiella spp* (dinophyceae) in Onagawa Bay, Northeast Japan. *Marine Biology* 119(1), 39-44.
- Ishikawa, A., Taniguchi, A., 1996. Contribution of benthic cysts to the population dynamics of *Scrippsiella spp* (Dinophyceae) in Onagawa bay, northeast Japan. *Marine Ecology Progress Series* 140(1-3), 169-178.
- Ishikawa, A., Taniguchi, A., 1997. In situ germination patterns of cysts, and bloom formation of some armored dinoflagellates in Onagawa Bay, north-east Japan. *Journal of Plankton Research* 19(11), 1783-1791.
- Jakobsen, R., Hansen, P.J., Daugbjerg, N., Andersen, N.G., 2012. The fish-killing dictyochophyte *Pseudochattonella farcimen*: Adaptations leading to bloom formation during early spring in Scandinavian waters. *Harmful Algae* 18, 84-95.
- Jauffrais, T., Séchet, V.r., Herrenknecht, C., Truquet, P., Véronique, S., Tillmann, U., Hess, P., 2013. Effect of environmental and nutritional factors on growth and azaspiracid production of the dinoflagellate *Azadinium spinosum*. *Harmful Algae* 27(0), 138-148.
- Jauzein, C., Collos, Y., Garcés, E., Vila, M., Maso, M., 2008. Short-term temporal variability of ammonium and urea uptake by *Alexandrium catenella* (Dinophyta) in cultures. *Journal of Phycology* 44(5), 1136-1145.
- Jauzein, C., Collos, Y., Laabir, M., Vaquer, A., 2011. Dark metabolism and carbon-nitrogen uncoupling in the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* (Dinophyceae). *Harmful Algae* 11, 73-80.
- Jeong, H.J., Yoo, Y.D., Kim, J.S., Kim, T.H., Kim, J.H., Kang, N.S., Yih, W., 2004. Mixotrophy in the phototrophic harmful alga *Cochlodinium polykrikoides* (dinophycean): Prey species, the effects of prey concentration, and grazing impact. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 51(5), 563-569.
- John, E.H., Flynn, K.J., 2000. Growth dynamics and toxicity of *Alexandrium fundyense* (Dinophyceae): the effect of changing N : P supply ratios on internal toxin and nutrient levels. *European Journal of Phycology* 35(1), 11-23.
- John, U., Litaker, R.W., Montresor, M., Murray, S., Brosnahan, M.L., Anderson, D.M., 2014. Formal Revision of the *Alexandrium tamarense* Species Complex (Dinophyceae) Taxonomy: The Introduction of Five Species with Emphasis on Molecular-based (rDNA) Classification. *Protist* 165(6), 779-804.
- Jones, R.I., 1994. Mixotrophy in planktonic protists as a spectrum of nutritional strategies. *Marine Microbial Food Webs* 8, 87-96.
- Jones, R.I., 2000. Mixotrophy in planktonic protists: an overview. *Freshwater Biology* 45(2), 219-226.
- Kibler, S.R., Litaker, R.W., Holland, W.C., Vandersea, M.W., Tester, P.A., 2012. Growth of eight *Gambierdiscus* (Dinophyceae) species: Effects of temperature, salinity and irradiance. *Harmful Algae* 19(0), 1-14.
- Kim, D.-I., Matsuyama, Y., Nagasoe, S., Yamaguchi, M., Yoon, Y.-H., Oshima, Y., Imada, N., Honjo, T., 2004. Effects of temperature, salinity and irradiance on the growth of the harmful red tide dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* Margalef (Dinophyceae). *Journal of Plankton Research* 26(1), 61-66.

- Kim, J., Kim, C.-H., Takano, Y., Jang, I.-K., Kim, S.W., Choi, T.-J., 2012. Isolation and Physiological Characterization of a New Algicidal Virus Infecting the Harmful Dinoflagellate *Heterocapsa pygmaea*. *Plant Pathology Journal* 28(4), 433-438.
- Kita, T., Fukuyo, Y., Tokuda, H., Hirano, R., 1985. Life-history and ecology of *goniodoma pseudogoniaulax* (pyrrhophyta) in a rockpool. *Bulletin of Marine Science* 37(2), 643-651.
- Klausmeier, C.A., Litchman, E., Daufresne, T., Levin, S.A., 2004. Optimal nitrogen-to-phosphorus stoichiometry of phytoplankton. *Nature* 429(6988), 171-174.
- Koroleff, F., 1983. determination of ammonium. In Grasshoff K [Ed.] *Method of sea water analysis*.verlag. chemie.Weinheim, 117-182.
- Kremp, A., Parrow, M.W., 2006. Evidence for asexual resting cysts in the life cycle of the marine peridinioid dinoflagellate, *Scrippsiella hangoei*. *Journal of Phycology* 42(2), 400-409.
- Kudela, R.M., Gobler, C.J., 2012. Harmful dinoflagellate blooms caused by *Cochlodinium* sp.: Global expansion and ecological strategies facilitating bloom formation. *Harmful Algae* 14, 71-86.
- Kudela, R.M., Ryan, J.P., Blakely, M.D., Lane, J.Q., Peterson, T.D., 2008. Linking the physiology and ecology of *Cochlodinium* to better understand harmful algal bloom events: A comparative approach. *Harmful Algae* 7(3), 278-292.
- Laabir, M., Amzil, Z., Lassus, P., Masseret, E., Tapilatu, Y., De Vargas, R., Grzebyk, D., 2007. Viability, growth and toxicity of *Alexandrium catenella* and *Alexandrium minutum* (*Dinophyceae*) following ingestion and gut passage in the oyster *Crassostrea gigas*. *Aquatic Living Resources* 20(1), 51-57.
- Laabir, M., Barre, N., Franco, J., Brunet, C., Masseret, E., Collos, Y., 2012. Morphological, biochemical and growth characteristics of *Alexandrium catenella* (Whedon & Kofoid) Balech, a toxic dinoflagellate expanding in Mediterranean waters. *Cahiers De Biologie Marine* 53(3), 365-372.
- Laabir, M., Collos, Y., Masseret, E., Grzebyk, D., Abadie, E., Savar, V.r., Sibat, M., Amzil, Z., 2013a. Influence of Environmental Factors on the Paralytic Shellfish Toxin Content and Profile of *Alexandrium catenella* (*Dinophyceae*) Isolated from the Mediterranean Sea. *Marine Drugs* 11(5), 1583-1601.
- Laabir, M., Gentien, P., 1999. Survival of toxic dinoflagellates after gut passage in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* Thunberg. *Journal of Shellfish Research* 18(1), 217-222.
- Laabir, M., Grignon-Dubois, M., Masseret, E., Rezzonico, B., Soteras, G., Rouquette, M., Rieuvilleneuve, F., Cecchi, P., 2013b. Algicidal effects of *Zostera marina* L. and *Zostera noltii* Hornem. extracts on the neuro-toxic bloom-forming dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Aquatic Botany* 111, 16-25.
- Laabir, M., Jauzein, C., Genovesi, B., Masseret, E., Grzebyk, D., Cecchi, P., Vaquer, A., Perrin, Y., Collos, Y., 2011. Influence of temperature, salinity and irradiance on the growth and cell yield of the harmful red tide dinoflagellate *Alexandrium catenella* colonizing Mediterranean waters. *Journal of Plankton Research* 33(10), 1550-1563.
- Laanaia, N., Vaquer, A., Fiandrino, A., Genovesi, B., Pastoureaud, A., Cecchi, P., Collos, Y., 2013. Wind and temperature controls on *Alexandrium* blooms (2000-2007) in Thau lagoon (Western Mediterranean). *Harmful Algae* 28, 31-36.
- Laporte, M., Shao, Z., Berrebi, P., Laabir, M., Abadie, E., Faivre, N., Rieuvilleneuve, F., Masseret, E., 2014. Isolation of 12 microsatellite markers following a pyrosequencing procedure and cross-priming in two invasive cryptic species, *Alexandrium catenella* (group IV) and *A. tamarense* (group III) (*Dinophyceae*). *Marine Pollution Bulletin* 83(1), 302-305.

- Larsen, J., Kuosa, H., Ikavalko, J., Kivi, K., Hallfors, S., 1995. A redescription of *Scrippsiella-hangoei* (Schiller) Comb-Nov - A red tide dinoflagellate from northern baltic. *Phycologia* 34(2), 135-144.
- Lauret Michel, O.J., Derolez Valerie, Laugier Thierry 2011. Guide de reconnaissance et de suivi des macrophytes des lagunes du Languedoc-Roussillon. Réseau de Suivi Lagunaire (Ifremer, Cépralmar, Agence de l'Eau RM&C, Région Languedoc-Roussillon). Ifremer.
- Lee, S.Y., Jeong, H.J., Kang, N.S., Jang, T.Y., Jang, S.H., Lajeunesse, T.C., 2015. *Symbiodinium tridacnidorum* sp nov., a dinoflagellate common to Indo-Pacific giant clams, and a revised morphological description of *Symbiodinium microadriaticum* Freudenthal, emended Trench & Blank. *European Journal of Phycology* 50(2), 155-172.
- Lee, T.C.-H., Kwok, O.-T., Ho, K.-C., Lee, F.W.-F., 2012. Effects of different nitrate and phosphate concentrations on the growth and toxin production of an *Alexandrium tamarense* strain collected from Drake Passage. *Marine Environmental Research* 81, 62-69.
- Leong, S.C.Y., Murata, A., Nagashima, Y., Taguchi, S., 2004. Variability in toxicity of the dinoflagellate *Alexandrium tamarense* in response to different nitrogen sources and concentrations. *Toxicon* 43(4), 407-415.
- Li, C., Song, S., Liu, Y., Chen, T., 2014. Occurrence of Amoeboophrya spp. infection in planktonic dinoflagellates in Changjiang (Yangtze River) Estuary, China. *Harmful Algae* 37, 117-124.
- Lilly, E.L., Halanych, K.M., Anderson, D.M., 2007. Species boundaries and global biogeography of the *Alexandrium tamarense* complex (*Dinophyceae*). *Journal of Phycology* 43(6), 1329-1338.
- Lilly, E.L., Kulis, D.M., Gentien, P., Anderson, D.M., 2002. Paralytic shellfish poisoning toxins in France linked to a human-introduced strain of *Alexandrium catenella* from the western Pacific: evidence from DNA and toxin analysis. *Journal of Plankton Research* 24(5), 443-452.
- Lim, H.C., Leaw, C.P., Tan, T.H., Kon, N.F., Yek, L.H., Hii, K.S., Teng, S.T., Razali, R.M., Usup, G., Iwataki, M., Lim, P.T., 2014. A bloom of *Karlodinium australe* (*Gymnodiniales*, *Dinophyceae*) associated with mass mortality of cage-cultured fishes in West Johor Strait, Malaysia. *Harmful Algae* 40, 51-62.
- Lim, P.-T., Leaw, C.-P., Kobiyama, A., Ogata, T., 2010. Growth and toxin production of tropical *Alexandrium minutum* Halim (*Dinophyceae*) under various nitrogen to phosphorus ratios. *Journal of Applied Phycology* 22(2), 203-210.
- Lundgren, V.M., Roelke, D.L., Brooks, B.W., Granéli, E., Davis, S.L., Baty, T., Scott, W.C., 2015. *Prymnesium parvum* invasion success into coastal bays of the Gulf of Mexico: Galveston Bay case study. *Harmful Algae* 43, 31-45.
- MacKenzie, L.A., Selwood, A.I., McNabb, P., Rhodes, L., 2011. Benthic dinoflagellate toxins in two warm-temperate estuaries: Rangaunu and Parengarenga Harbours, Northland, New Zealand. *Harmful Algae* 10(6), 559-566.
- Mangialajo, L., Bertolotto, R., Cattaneo-Vietti, R., Chiantore, M., Grillo, C., Lemee, R., Melchiorre, N., Moretto, P., Povero, P., Ruggieri, N., 2008. The toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis ovata*: Quantification of proliferation along the coastline of Genoa, Italy. *Marine Pollution Bulletin* 56(6), 1209-1214.
- 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., Grossel, H., Marco-Miralles, F., Maso, M., Rene, A., Maria Rossi, A., Montserrat Sala, M.,

- Thibaut, T., Totti, C., Vila, M., Lemee, R., 2011. Trends in *Ostreopsis* proliferation along the Northern Mediterranean coasts. *Toxicon* 57(3), 408-420.
- Marasovic, I., 1993. Preliminary observations on the relationship between temporary and resting cysts of *Lingulodinium polyedra* (Stein) Dodge. Toxic phytoplankton blooms in the sea. *Dev. Mar. Biol.* 3(139-142).
- Markou, D.A., Sylaios, G.K., Tsihrintzis, V.A., Gikas, G.D., Haralambidou, K., 2007. Water quality of Vistonis Lagoon, Northern Greece: seasonal variation and impact of bottom sediments. *Desalination* 210(1-3), 83-97.
- Martins, C.A., Kulis, D., Franca, S., Anderson, D.M., 2004. The loss of PSP toxin production in a formerly toxic *Alexandrium lusitanicum* clone. *Toxicon* 43(2), 195-205.
- Maso, M., Garces, E., 2006. Harmful microalgae blooms (HAB); problematic and conditions that induce them. *Marine Pollution Bulletin* 53(10-12), 620-630.
- Matsubara, T., Nagasoe, S., Yamasaki, Y., Shikata, T., Shimasaki, Y., Oshima, Y., Honjo, T., 2007. Effects of temperature, salinity, and irradiance on the growth of the dinoflagellate *Akashiwo sanguinea*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 342(2), 226-230.
- McCarron, P., Rourke, W.A., Hardstaff, W., Pooley, B., Quilliam, M.A., 2012. Identification of Pinnatoxins and Discovery of Their Fatty Acid Ester Metabolites in Mussels (*Mytilus edulis*) from Eastern Canada. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60(6), 1437-1446.
- McNabb, P.S., McCoubrey, D.J., Rhodes, L., Smith, K., Selwood, A.I., van Ginkel, R., MacKenzie, A.L., Munday, R., Holland, P.T., 2012. New perspectives on biotoxin detection in Rangaunu Harbour, New Zealand arising from the discovery of pinnatoxins. *Harmful Algae* 13, 34-39.
- Minchin, D., 2007. Aquaculture and transport in a changing environment: Overlap and links in the spread of alien biota. *Marine Pollution Bulletin* 55(7-9), 302-313.
- Mitamura, O., Saijo, Y., 1975. Decomposition of urea associated with photosynthesis of phytoplankton in coastal waters. *Marine Biology* 30(1), 67-72.
- Moestrup, O., Hansen, G., Daugbjerg, N., Lundholm, N., Overton, J., Vestergard, M., Steinfeldt, S.J., Calado, A.J., Hansen, P.J., 2014. The dinoflagellates *Pfiesteria shumwayae* and *Luciella masanensis* cause fish kills in recirculation fish farms in Denmark. *Harmful Algae* 32, 33-39.
- Molgó, J., Girard, E., Benoit, E., 2007. The cyclic imines: an insight into this emerging group of bioactive marine toxins, In: Hui, Y.H., Luis, B. (Eds.), *Phycotoxins: Chemistry and Biochemistry*. Blackwell Publishing, Iowa, USA, pp. 319-335.
- Mondeguer, F., Hess, P., 2014. Contamination des mollusques bivalves par *Vulcanodinium rugosum*, producteur de Pinnatoxines (phase II). *Ifremer*.
- Mooney, B.D., Hallegraeff, G.M., Place, A.R., 2010. Ichthyotoxicity of four species of gymnodinioid dinoflagellates (*Kareniaceae*, Dinophyta) and purified karlotoxins to larval sheepshead minnow. *Harmful Algae* 9(6), 557-562.
- Moore, S.K., Bill, B.D., Hay, L.R., Emenegger, J., Eldred, K.C., Greengrove, C.L., Masura, J.E., Anderson, D.M., 2015. Factors regulating excystment of *Alexandrium* in Puget Sound, WA, USA, pp. 103-110.
- Moore, S.K., Mantua, N.J., Hickey, B.M., Trainer, V.L., 2009. Recent trends in paralytic shellfish toxins in Puget Sound, relationships to climate, and capacity for prediction of toxic events. *Harmful Algae* 8(3), 463-477.
- Moore, S.K., Mantua, N.J., Hickey, B.M., Trainer, V.L., 2010. The relative influences of El Niño-Southern Oscillation and Pacific Decadal Oscillation on paralytic shellfish toxin

- accumulation in northwest Pacific shellfish. *Limnology and Oceanography* 55(6), 2262-2274.
- Morton, S.L., Norris, D.R., Bomber, J.W., 1992. Effect of temperature, salinity and light-intensity on the growth and seasonality of toxic dinoflagellates associated with ciguatera. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 157(1), 79-90.
- Morton, S.L., Vershinin, A., Smith, L.L., Leighfield, T.A., Pankov, S., Quilliam, M.A., 2009. Seasonality of *Dinophysis* spp. and *Prorocentrum lima* in Black Sea phytoplankton and associated shellfish toxicity. *Harmful Algae* 8(5), 629-636.
- Munday, R., Selwood, A.I., Rhodes, L., 2012. Acute toxicity of pinnatoxins E, F and G to mice. *Toxicon* 60(6), 995-999.
- Nagasoe, S., Kim, D.-I., Shimasaki, Y., Oshima, Y., Yamaguchi, M., Honjo, T., 2006. Effects of temperature, salinity and irradiance on the growth of the red tide dinoflagellate *Gyrodinium instriatum* Freudenthal et Lee. *Harmful Algae* 5(1), 20-25.
- Navarro, J.M., Munoz, M.G., Contreras, A.M., 2006. Temperature as a factor regulating growth and toxin content in the dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Harmful Algae* 5(6), 762-769.
- Neveux, J.L., F., 1993. Spectrofluorometric assay for chlorophylls phaeopigments using the least squares approximation technique. *Deep-Sea research* 40, 1747-1765.
- Newell, R.I.E., Jordan, S.J., 1983. Preferential ingestion of organic material by the american oyster *Crassostrea virginica*. *Marine Ecology Progress Series* 13(1), 47-53.
- Nézan, E., Chomérat, N., 2011. *Vulcanodinium rugosum* gen. nov., sp. nov. (Dinophyceae): a new marine dinoflagellate from the French Mediterranean coast. *Cryptogamie Algologie* 32(1), 3-18.
- Ni Rathaille, A., Raine, R., 2011. Seasonality in the excystment of *Alexandrium minutum* and *Alexandrium tamarense* in Irish coastal waters. *Harmful Algae* 10(6), 629-635.
- Nixon, S.W., Lee, V., 1981. The flux of carbon, nitrogen and phosphorus between coastal lagoons and offshore waters. *UNESCO* 33, 325-348.
- Nygaard, K., Tobiesen, A., 1993. Bacterivory in algae - A survival strategy during nutrient limitation. *Limnology and Oceanography* 38(2), 273-279.
- Okolodkov, Y., Dodge, J.D., 1997. Morphology of some rare and unusual dinoflagellates from the north-eastern Atlantic. *Nova Hedwigia* 64(3-4), 353-365.
- Pan, Y., Cembella, A.D., Quilliam, M.A., 1999. Cell cycle and toxin production in the benthic dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Marine Biology* 134(3), 541-549.
- Parkhill, J.P., Cembella, A.D., 1999. Effects of salinity, light and inorganic nitrogen on growth and toxigenicity of the marine dinoflagellate *Alexandrium tamarense* from northeastern Canada. *Journal of Plankton Research* 21(5), 939-955.
- Penna, A., Garces, E., Vila, M., Giacobbe, M.G., Fraga, S., Luglie, A., Bravo, I., Bertozzini, E., Vernesi, C., 2005. *Alexandrium catenella* (Dinophyceae), a toxic ribotype expanding in the NW Mediterranean Sea. *Marine Biology* 148(1), 13-23.
- Penna, A., Ingarao, C., Ercolessi, M., Rocchi, M., Penna, N., 2006. Potentially harmful microalgal distribution in an area of the NW Adriatic coastline: Sampling procedure and correlations with environmental factors. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 70(1-2), 307-316.
- Persson, A., Smith, B.C., Wikfors, G.H., Alix, J.H., 2008. Dinoflagellate gamete formation and environmental cues: Observations, theory, and synthesis. *Harmful Algae* 7(6), 798-801.
- Philippart, C.J.M., Anadon, R., Danovaro, R., Dippner, J.W., Drinkwater, K.F., Hawkins, S.J., Oguz, T., O'Sullivan, G., Reid, P.C., 2011. Impacts of climate change on

- European marine ecosystems: Observations, expectations and indicators. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 400(1-2), 52-69.
- Pierce, R.H., Henry, M.S., 2008. Harmful algal toxins of the Florida red tide (*Karenia brevis*): natural chemical stressors in South Florida coastal ecosystems. *Ecotoxicology* 17(7), 623-631.
- Pistocchi, R., Pezzolesi, L., Guerrini, F., Vanucci, S., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., 2011. A review on the effects of environmental conditions on growth and toxin production of *Ostreopsis ovata*. *Toxicon Palytoxin-group toxins* 57(3), 421-428.
- Poulson-Ellestad, K., McMillan, E., Montoya, J.P., Kubanek, J., 2014. Are offshore phytoplankton susceptible to *Karenia brevis* allelopathy? *Journal of Plankton Research* 36(5), 1344-1356.
- Qiu, X., Shimasaki, Y., Yoshida, Y., Matsubara, T., Yamasaki, Y., Kawaguchi, M., Honda, M., Mouri, K., Nakajima, Y., Tasmin, R., Kuno, K., Kawamura, Y., Honjo, T., Oshima, Y., 2014. Allelopathic Effects of *Skeletonema spp.* May Influence Interspecific Competition and Bloom Formation of Co-occurring Harmful Flagellates. *Journal of the Faculty of Agriculture Kyushu University* 59(2), 373-381.
- Rengefors, K., Anderson, D.M., 1998. Environmental and endogenous regulation of cyst germination in two freshwater dinoflagellates. *Journal of Phycology* 34(4), 568-577.
- Rhodes, L., Adamson, J., Suzuki, T., Briggs, L., Garthwaite, I., 2000. Toxic marine epiphytic dinoflagellates, *Ostreopsis siamensis* and *Coolia monotis* (*Dinophyceae*), in New Zealand. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 34(2), 371-383.
- Rhodes, L., Smith, K., Selwood, A., McNabb, P., Molenaar, S., Munday, R., Wilkinson, C., Hallegraeff, G., 2011a. Production of pinnatoxins E, F and G by scrippsielloid dinoflagellates isolated from Franklin Harbour, South Australia. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 45(4), 703-709.
- Rhodes, L., Smith, K., Selwood, A., McNabb, P., Munday, R., Suda, S., Molenaar, S., Hallegraeff, G., 2011b. Dinoflagellate *Vulcanodinium rugosum* identified as the causative organism of pinnatoxins in Australia, New Zealand and Japan. *Phycologia* 50(6), 624-628.
- Rhodes, L., Smith, K., Selwood, A., McNabb, P., van Ginkel, R., Holland, P., Munday, R., 2010. Production of pinnatoxins by a peridinoid dinoflagellate isolated from Northland, New Zealand. *Harmful Algae* 9(4), 384-389.
- Rolland, J.-L., Medhioub, W., Vergnes, A., Abi-khalil, C., Savar, V., Abadie, E., Masseret, E., Amzil, Z., Laabir, M., 2014. A Feedback Mechanism to Control Apoptosis Occurs in the Digestive Gland of the Oyster *Crassostrea gigas* Exposed to the Paralytic Shellfish Toxins Producer *Alexandrium catenella*. *Marine Drugs* 12(9), 5035.
- Rolland, J.-L., Pelletier, K., Masseret, E., Rieuvilleneuve, F., Savar, V., Santini, A., Amzil, Z., Laabir, M., 2012. Paralytic Toxins Accumulation and Tissue Expression of  $\alpha$ -Amylase and Lipase Genes in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas* Fed with the Neurotoxic Dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Marine Drugs* 10(11), 2519.
- Rolton, A., Vignier, J., Soudant, P., Shumway, S.E., Bricelj, V.M., Volety, A.K., 2014. Effects of the red tide dinoflagellate, *Karenia brevis*, on early development of the eastern oyster *Crassostrea virginica* and northern quahog *Mercenaria mercenaria*. *Aquatic Toxicology* 155, 199-206.
- Rundberget, T., Aasen, J.A.B.s., Selwood, A.I., Miles, C.O., 2011. Pinnatoxins and spirolides in Norwegian blue mussels and seawater. *Toxicon* 58(8), 700-711.
- Sakka Hlaili, A., Chikhaoui, M.A., El Grami, B., Hadj Mabrouk, H., 2006. Effects of N and P supply on phytoplankton in Bizerte Lagoon (western Mediterranean). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 333(1), 79-96.



- Samson, J.C., Shumway, S.E., Weis, J.S., 2008. Effects of the toxic dinoflagellate, *Alexandrium fundyense* on three species of larval fish: a food-chain approach. *Journal of Fish Biology* 72(1), 168-188.
- Sasaki, K., Wright, J.L.C., Yasumoto, T., 1998. Identification and Characterization of Pectenotoxin (PTX) 4 and PTX7 as Spiroketal Stereoisomers of Two Previously Reported Pectenotoxins. *The Journal of Organic Chemistry* 63(8), 2475-2480.
- Satake, M., Ofuji, K., Naoki, H., James, K.J., Furey, A., McMahon, T., Silke, J., Yasumoto, T., 1998. Azaspiracid, a new marine toxin having unique spiro ring assemblies, isolated from Irish mussels, *Mytilus edulis*. *Journal of the American Chemical Society* 120(38), 9967-9968.
- Satake, M., Tubaro, A., Lee, J.S., Yasumoto, T., 1997. Two new analogs of yessotoxin, homoyessotoxin and 45-hydroxyhomoyessotoxin, isolated from mussels of the Adriatic Sea. *Natural toxins* 5(3), 107-110.
- Satta, C.T., Anglès, S., Lugliè, A., Guillén, J., Sechi, N., Camp, J., Garcés, E., 2013. Studies on dinoflagellate cyst assemblages in two estuarine Mediterranean bays: A useful tool for the discovery and mapping of harmful algal species. *Harmful Algae* 24(0), 65-79.
- Scarratt, A.M., Scarratt, D.J., Scarratt, M.G., 1993. Survival of live *Alexandrium tamarensis* cells in mussel and scallop spat under simulated transfer conditions. *Journal of Shellfish Research* 12(2), 383-388.
- Seki, T., Satake, M., Mackenzie, L., Kaspar, H.F., Yasumoto, T., 1995. Gymnodimine, a new marine toxin of unprecedented structure isolated from new-zealand oysters and the dinoflagellate, *Gymnodinium sp.* *Tetrahedron Letters* 36(39), 7093-7096.
- Selina, M.S., Morozova, T.V., Vyshkvartsev, D.I., Orlova, T.Y., 2014. Seasonal dynamics and spatial distribution of epiphytic dinoflagellates in Peter the Great Bay (Sea of Japan) with special emphasis on *Ostreopsis* species, pp. 1-10.
- Sellner, K.G., Doucette, G.J., Kirkpatrick, G.J., 2003. Harmful algal blooms: causes, impacts and detection. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 30(7), 383-406.
- Selwood, A.I., Miles, C.O., Wilkins, A.L., van Ginkel, R., Munday, R., Rise, F., McNabb, P., 2010. Isolation, Structural Determination and Acute Toxicity of Pinnatoxins E, F and G. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(10), 6532-6542.
- Selwood, A.I., Wilkins, A.L., Munday, R., Gu, H.F., Smith, K.F., Rhodes, L.L., Rise, F., 2014. Pinnatoxin H: a new pinnatoxin analogue from a South China Sea *Vulcanodinium rugosum* isolate. *Tetrahedron Letters* 55(40), 5508-5510.
- Selwood, A.I., Wilkins, A.L., Munday, R., Shi, F., Rhodes, L.L., Holland, P.T., 2013. Portimine: a bioactive metabolite from the benthic dinoflagellate *Vulcanodinium rugosum*. *Tetrahedron Letters* 54(35), 4705-4707.
- Sheng, J., Malkiel, E., Katz, J., Adolf, J.E., Place, A.R., 2010. A dinoflagellate exploits toxins to immobilize prey prior to ingestion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(5), 2082-2087.
- Shumway, S.E., Allen, S.M., Dee Boersma, P., 2003. Marine birds and harmful algal blooms: sporadic victims or under-reported events? *Harmful Algae* 2(1), 1-17.
- Shumway, S.E., Cucci, T.L., 1987. The effects of the toxic dinoflagellate *protogonyaulax tamarensis* on the feeding and behavior of bivalve mollusks. *Aquatic Toxicology* 10(1), 9-27.
- Sildever, S., Andersen, T.r.J., Ribeiro, S., Ellegaard, M., 2015. Influence of surface salinity gradient on dinoflagellate cyst community structure, abundance and morphology in the Baltic Sea, Kattegat and Skagerrak, pp. 1-7.

- Silva, N.J., Tang, K.W., Lopes, R.M., 2013. Effects of microalgal exudates and intact cells on subtropical marine zooplankton. *Journal of Plankton Research* 35(4), 855-865.
- Smayda, T.J., 1997a. Harmful Algal Blooms: Their Ecophysiology and General Relevance to Phytoplankton Blooms in the Sea. *Limnology and Oceanography* 42(5), 1137-1153.
- Smayda, T.J., 1997b. What is a bloom? A commentary. *Limnology and Oceanography* 42(5), 1132-1136.
- Smith, K.F., Rhodes, L.L., Suda, S., Selwood, A.I., 2011. A dinoflagellate producer of pinnatoxin G, isolated from sub-tropical Japanese waters. *Harmful Algae* 10(6), 702-705.
- Soler-Figueroa, B.M., Otero, E., 2015. The Influence of Rain Regimes and Nutrient Loading on the Abundance of Two Dinoflagellate Species in a Tropical Bioluminescent Bay, Bahia Fosforescente, La Parguera, Puerto Rico. *Estuaries and Coasts* 38(1), 84-92.
- Souchu, P., Bec, B., Smith, V.H., Laugier, T., Fiandrino, A., Benau, L., Orsoni, V., Collos, Y., Vaquer, A., 2010. Patterns in nutrient limitation and chlorophyll a along an anthropogenic eutrophication gradient in French Mediterranean coastal lagoons. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 67(4), 743-753.
- Souchu, P., Vaquer, A., Collos, Y., Landrein, S., Deslous-Paoli, J.M., Bibent, B., 2001. Influence of shellfish farming activities on the biogeochemical composition of the water column in Thau lagoon. *Marine Ecology Progress Series* 218, 141-152.
- Sournia, A., Belin, C., Billard, C., Catherine, M., Erardledenn, E., Fresnel, J., Lassus, P., Pastoureaud, A., Soulard, R., 1992. The repetitive and expanding occurrence of a green, bloom-forming dinoflagellate (*dinophyceae*) on the coasts of france. *Cryptogamie Algologie* 13(1), 1-13.
- Sournia, A., Birrien, J.L., 1995. The coastal oceanographic series of roscoff (western english-channel) from 1985 to 1993. *Cahiers De Biologie Marine* 36(1), 1-8.
- Sournia, A., Chretiennotdinet, M.J., Ricard, M., 1991. Marine-phytoplankton - how many species in the world ocean. *Journal of Plankton Research* 13(5), 1093-1099.
- Steidinger, K.A., Landsberg, J.H., Truby, E.W., Roberts, B.S., 1998. First report of *Gymnodinium pulchellum* (*Dinophyceae*) in North America and associated fish kills in the Indian River, Florida. *Journal of Phycology* 34(3), 431-437.
- Steidinger, K.A., Walker, L.M., 1984. *Marine plankton life cycle strategies*. CRC Press.
- Stewart, I., McLeod, C., 2014. The Laboratory Mouse in Routine Food Safety Testing for Marine Algal Biotoxins and Harmful Algal Bloom Toxin Research: Past, Present and Future. *Journal of Aoac International* 97(2), 356-372.
- Sumway, S.E., Newell, R.C., Cresp, D.J., Cucci, T.L., 1990. Particle selection in filter-feeding bivalves molluscs : a new technic on an old theme. In *The Bilvavia*. Hong Kong University Press, Hong Kong.
- Takada, N., Umemura, N., Suenaga, K., Chou, T., Nagatsu, A., Haino, T., Yamada, K., Uemura, D., 2001. Pinnatoxins B and C, the most toxic components in the pinnatoxin series from the Okinawan bivalve *Pinna muricata*. *Tetrahedron Letters* 42(20), 3491-3494.
- Tang, Y.Z., Kang, Y., Berry, D., Gobler, C.J., 2015. The ability of the red macroalga, *Porphyra purpurea* (*Rhodophyceae*) to inhibit the proliferation of seven common harmful microalgae. *Journal of Applied Phycology* 27(1), 531-544.
- Tawong, W., Yoshimatsu, T., Yamaguchi, H., Adachi, M., 2015. Effects of temperature, salinity and their interaction on growth of benthic dinoflagellates *Ostreopsis spp.* from Thailand. *Harmful Algae* 44, 37-45.

- Taylor, F.J.R., 1975. Taxonomic Difficulties in Red Tide and Paralytic Shellfish Poison Studies: The "Tamarensis Complex" of *Gonyaulax*. *Environmental Letters* 9(2), 103-119.
- Taylor, F.J.R., Hoppenrath, M., Saldarriaga, J.F., 2008. Dinoflagellate diversity and distribution. *Biodiversity and Conservation* 17(2), 407-418.
- Tillmann, U., Elbraechter, M., Krock, B., John, U., Cembella, A., 2009. *Azadinium spinosum* gen. et sp nov (*Dinophyceae*) identified as a primary producer of azaspiracid toxins. *European Journal of Phycology* 44(1), 63-79.
- Touzet, N., Keady, E., Raine, R., Maher, M., 2009. Evaluation of taxa-specific real-time PCR, whole-cell FISH and morphotaxonomy analyses for the detection and quantification of the toxic microalgae *Alexandrium minutum* (*Dinophyceae*), Global Clade ribotype. *Fems Microbiology Ecology* 67(2), 329-341.
- Touzet, N., Raine, R., 2007. Discrimination of *Alexandrium andersoni* and *A. minutum* (*Dinophyceae*) using LSU rRNA-targeted oligonucleotide probes and fluorescent whole-cell hybridization. *Phycologia* 46(2), 168-177.
- Triki, H.Z., Daly-Yahia, O.K., Malouche, D., Komiha, Y., Deidun, A., Brahim, M., Iaibir, M., 2014. Distribution of resting cysts of the potentially toxic dinoflagellate *Alexandrium pseudogonyaulax* in recently-deposited sediment within Bizerte Lagoon (Mediterranean coast, Tunisia), pp. 172-181.
- Tubaro, A., Durando, P., Del Favero, G., Ansaldi, F., Icardi, G., Deeds, J.R., Sosa, S., 2011. Case definitions for human poisonings postulated to palytoxins exposure. *Toxicon* 57(3), 478-495.
- Turki, S., 2005. Distribution of toxic dinoflagellates along the leaves of seagrass *Posidonia oceanica* and *Cymodocea nodosa* from the Gulf of Tunis. *Cahiers De Biologie Marine* 46(1), 29-34.
- Turner, A.D., McNabb, P.S., Harwood, D.T., Selwood, A.I., Boundy, M.J., 2015. Single-Laboratory Validation of a Multitoxin Ultra-Performance LC-Hydrophilic Interaction LC-MS/MS Method for Quantitation of Paralytic Shellfish Toxins in Bivalve Shellfish. *Journal of Aoac International* 98(3), 609-621.
- Twomey, L.J., Piehler, M.F., Paerl, H.W., 2005. Phytoplankton uptake of ammonium, nitrate and urea in the Neuse River Estuary, NC, USA. *Hydrobiologia* 533, 123-134.
- Uemura, D., Chou, T., Haino, T., Nagatsu, A., Fukuzawa, S., Zheng, S.Z., Chen, H.S., 1995. Pinnatoxin-A - A toxic amphoteric macrocycle from the Okinawan bivalve *Pinna muricata*. *Journal of the American Chemical Society* 117(3), 1155-1156.
- Utermöhl, H., 1931. Neue Wege in der quantitativen Erfassung des Planktons: (Mit besondere Berücksichtigung des Ultraplanktons). *Verh. Int. Ver. Theor. Angew. Limnol* 5, 567-595.
- Vale, P., Veloso, V., Amorim, A., 2009. Toxin composition of a *Prorocentrum lima* strain isolated from the Portuguese coast. *Toxicon* 54(2), 145-152.
- van den Bergh, J., Nunes, P., Dotinga, H.M., Kooistra, W., Vrieling, E.G., Peperzak, L., 2002. Exotic harmful algae in marine ecosystems: an integrated biological-economic-legal analysis of impacts and policies. *Marine Policy* 26(1), 59-74.
- Van Dolah, F.M., 2000. Marine algal toxins: Origins, health effects, and their increased occurrence. *Environmental Health Perspectives* 108, 133-141.
- Velo-Suarez, L., Brosnahan, M.L., Anderson, D.M., McGillicuddy, D.J., Jr., 2013. A Quantitative Assessment of the Role of the Parasite *Amoebophrya* in the Termination of *Alexandrium fundyense* Blooms within a Small Coastal Embayment. *Plos One* 8(12).

- Verlaque, M., 2001. Checklist of the macroalgae of Thau Lagoon (Herault, France), a hot spot of marine species introduction in Europe. *Oceanologica Acta* 24(1), 29-49.
- Vila, M., Garcés, E., Maso, M., 2001a. Potentially toxic epiphytic dinoflagellate assemblages on macroalgae in the NW Mediterranean. *Aquatic Microbial Ecology* 26(1), 51-60.
- Vila, M., Garcés, E., Maso, M., Camp, J., 2001b. Is the distribution of the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* expanding along the NW Mediterranean coast. *Marine Ecology Progress Series* 222, 73-83.
- Wang, D.-Z., Hsieh, D.P.H., 2005. Growth and toxin production in batch cultures of a marine dinoflagellate *Alexandrium tamarense* HK9301 isolated from the South China Sea. *Harmful Algae* 4(2), 401-410.
- Wang, J., Zhang, Y., Li, H., Cao, J., 2013. Competitive interaction between diatom *Skeletonema costatum* and dinoflagellate *Prorocentrum donghaiense* in laboratory culture. *Journal of Plankton Research* 35(2), 367-378.
- Wernberg, T., Smale, D.A., Thomsen, M.S., 2012. A decade of climate change experiments on marine organisms: procedures, patterns and problems. *Global Change Biology* 18(5), 1491-1498.
- Wolfe-Simon, F., Grzebyk, D., Schofield, O., Falkowski, P.G., 2005. The role and evolution of superoxide dismutases in algae. *Journal of Phycology* 41(3), 453-465.
- Xu, J., Ho, A.Y.T., He, L., Yin, K., Hung, C., Choi, N., Lam, P.K.S., Wu, R.S.S., Anderson, D.M., Harrison, P.J., 2012. Effects of inorganic and organic nitrogen and phosphorus on the growth and toxicity of two *Alexandrium* species from Hong Kong. *Harmful Algae* 16, 89-97.
- Xu, N., Duan, S., Li, A., Zhang, C., Cai, Z., Hu, Z., 2010. Effects of temperature, salinity and irradiance on the growth of the harmful dinoflagellate *Prorocentrum donghaiense* Lu. *Harmful Algae* 9(1), 13-17.
- Xu, N., Tang, Y.Z., Qin, J., Duan, S., Gobler, C.J., 2015. Ability of the marine diatoms *Pseudo-nitzschia multiseriata* and *P. pungens* to inhibit the growth of co-occurring phytoplankton via allelopathy. *Aquatic Microbial Ecology* 74(1), 29-41.
- Yamaguchi, M., Honjo, T., 1989. Effects of temperature, salinity and irradiance on the growth of the noxious red tide flagellate *Gymnodinium nagasakiense* (*Dinophyceae*). *Nippon Suisan Gakkaishi* 55(11), 2029-2036.
- Yamaguchi, M., Imai, I., Honjo, T., 1991. Effects of temperature, salinity and irradiance on the growth-rates of the noxious red tide flagellates *Chattonella antiqua* and *C.marina* (*Raphidophyceae*). *Nippon Suisan Gakkaishi* 57(7), 1277-1284.
- Yamaguchi, M., Shigeru, I., Nagasaki, K., Matsuyama, Y., Uchida, T., Imai, I., 1997. Effects of temperature and salinity on the growth of the red tide flagellates *Heterocapsa circularisquama* (*Dinophyceae*) and *Chattonella verruculosa* (*Raphidophyceae*). *Journal of Plankton Research* 19(8), 1167-1174.
- Yamamoto, T., Oh, S.J., Kataoka, Y., 2002. Effects of temperature, salinity and irradiance on the growth of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (*Dinophyceae*) isolated from Hiroshima Bay, Japan. *Fish. Sci.* 68(2), 356-363.
- Yasumoto, T., Murata, M., Oshima, Y., Matsumoto, G.K., Clardy, J., 1984. Diarrhetic Shellfish Poisoning. *Acs Symposium Series* 262, 207-214.
- Yasumoto, T., Murata, M., Oshima, Y., Sano, M., Matsumoto, G.K., Clardy, J., 1985. Diarrhetic Shellfish Toxins. *Tetrahedron* 41(6), 1019-1025.
- Yoshimatsu, T., Yamaguchi, H., Iwamoto, H., Nishimura, T., Adachi, M., 2014. Effects of temperature, salinity and their interaction on growth of Japanese Gambierdiscus spp. (*Dinophyceae*). *Harmful Algae* 35(0), 29-37.

- Zaaboub, N., Ounis, A., Helali, M.A., Béjaoui, B., Lillebø, A.I., Silva, E.F.d., Aleya, L., 2014. Phosphorus speciation in sediments and assessment of nutrient exchange at the water-sediment interface in a Mediterranean lagoon: Implications for management and restoration. *Ecological Engineering* 73, 115-125.
- Zendong, Z., Herrenknecht, C., Abadie, E., Brissard, C., Tixier, C., Mondeguer, F., Sechet, V., Amzil, Z., Hess, P., 2014. Extended evaluation of polymeric and lipophilic sorbents for passive sampling of marine toxins. *Toxicon* 91, 57-68.
- Zeng, N., Gu, H., Smith, K.F., Rhodes, L.L., Selwood, A.I., Yang, W., 2012. The first report of *Vulcanodinium rugosum* (*Dinophyceae*) from the South China Sea with a focus on the life cycle. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 46(4), 511-521.
- Zheng, S.Z., Huang, F.L., Chen, S.C., Tan, X.F., Peng, J., Xie, R.W., 1990. The isolation and bioactivities of pinnatoxin. *Chinese J. Marine Drugs* 9, 33-35.
- Zingone, A., Oksfeldt Enevoldsen, H., 2000. The diversity of harmful algal blooms: a challenge for science and management. *Ocean & Coastal Management* 43(8-9), 725-748.

## Résumé

Les efflorescences phytoplanctoniques nuisibles et/ou toxiques impactent depuis très longtemps les écosystèmes marins du monde entier. Ces développements massifs ont un effet néfaste sur les écosystèmes et leur exploitation. Les lagunes du Languedoc-Roussillon sont touchées depuis plusieurs décennies. En plus des risques sanitaires récurrents dus aux genres *Dinophysis* (toxines DSP) et *Alexandrium* (toxines PSP), *Vulcanodinium rugosum* a été identifiée en 2011 dans la lagune d'Ingril. Cette nouvelle espèce est productrice de pinnatoxines (neurotoxines). A travers ces travaux de thèse, la biologie de cette nouvelle espèce (cycle de vie, condition de croissance, production de toxines), ses capacités de contamination des mollusques et sa distribution géographique dans les lagunes limitrophes ont été étudiées sur des cultures au laboratoire et via des suivis environnementaux.

Les résultats de cette étude ont mis en évidence le caractère thermophile et euryhalin de cette microalgue (croissance optimale à 25°C et à une salinité de 40 ) avec des plages de croissance comprises entre 20 et 30°C. Sa capacité à croître sur une source azotée organique (urée) a été observée *in vitro*. Son expansion à des lagunes du Languedoc-Roussillon autre que l'étang d'Ingril, a été confirmée par la mise en évidence de la contamination des moules par la pinnatoxine G. La survie de ce dinoflagellé dans le tractus digestif des moules et des huîtres prouve que le transfert de coquillages est une source de contamination potentielle des écosystèmes non impactés par cette espèce toxique.

Le cycle de vie de *V. rugosum* n'a pu être élucidé que partiellement, le kyste de résistance n'ayant pas été identifié formellement. Les kystes temporaires apparaissent comme des stades très importants à prendre en considération en raison de leur capacité à se diviser et de leur forte présence sur les macrophytes. Ces formes temporaires de résistance peuvent constituer une source de contamination non négligeable des mollusques dans la lagune de l'Ingril même lorsque les cellules végétatives de *V. rugosum* sont peu présentes dans la colonne d'eau. En raison des faibles densités de *V. rugosum in situ* et la difficulté de son identification sur des critères morphologique, sa surveillance dans le cadre du REPHY demeure difficile. Ainsi l'utilisation de systèmes d'échantillonnage passifs (SPATT) constitués de résines qui adsorbent les toxines dissoutes dans l'eau permettrait la détection précoce des toxines associées à ces espèces benthiques émergentes. Cette étude met en évidence la prolifération d'une espèce émergente thermophile qui pourrait avec d'autres et à la faveur de changements climatiques constituer des problèmes sanitaires et économiques importants dans les écosystèmes lagunaires vulnérables de la Méditerranée.

## Summary

Harmful and / or toxic phytoplankton blooms impact for a long time marine ecosystems worldwide. These massive developments have an adverse effect on ecosystems and their exploitation. The lagoons of the region Languedoc-Roussillon are affected for decades. In

addition to recurring health risks from *Dinophysis* (DSP toxins) and *Alexandrium* (PSP toxins), *Vulcanodinium rugosum* was identified in 2011 in the lagoon Ingril. This new species produces pinnatoxins (neurotoxins). Through this thesis work, the biology of this new species (life cycle, growth condition, toxin production), its shellfish contamination capacity and geographic distribution in neighboring lagoons were studied on cultures in the laboratory and via environmental monitoring.

The results of this study have demonstrated its thermophilic and euryhaline features (optimum salinity and temperature of 25°C and 40 respectively) and its growth ranges between 20 and 30°C. Its ability to grow on an organic nitrogen source (urea) has been shown *in vitro*. Its expansion in other lagoons of Languedoc-Roussillon, was confirmed by the contamination of the mussels by the pinnatoxin G. The survival of this organism in the digestive tract of mussels and oysters proves that the transfer of shellfish is potentially a source of contamination of new ecosystems not yet affected by this toxic species.

The life cycle of *V. rugosum* has not been fully described because the resistance cyst has not been formally identified. Temporary cysts appear as very important stages to be considered because of their ability to divide and their strong presence on macrophytes. These temporary forms of resistance may be a significant source of contamination of shellfish in the lagoon of the Ingril even when the vegetative cells of *V. rugosum* are weakly present in the water column. Because of the low densities of *V. rugosum* *in situ* and the difficulty of its identification on morphological criteria, the monitoring within the REPHY protocol remains difficult. Thus the use of passive sampling systems (Spatt) made with resins which adsorb toxins dissolved in water would make possible the early detection of toxins associated with these emerging benthic species. This study highlights the growth of an emerging thermophilic species that might with others and thanks to climate change provide important health and economic problems in vulnerable lagoon ecosystems of the Mediterranean.