

# Thèse de doctorat de

L'UNIVERSITE DE NANTES  
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE  
ECOLE DOCTORALE N° 598

*Sciences de la Mer et du Littoral*

Discipline: Biologie de l'environnement marin

Spécialité: Écophysiologie des organismes marins

## Nour AYACHE

### Réponses écophysiologiques des espèces toxiques de *Pseudo-nitzschia* aux variations environnementales liées au changement climatique

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 06 décembre 2018

Unité de recherche : Laboratoire Phycotoxines (PHYC), Ifremer

#### Rapporteurs avant soutenance :

Myriam BORMANS  
Rodolphe LEMEE

Directrice de recherche, CNRS, Université de Rennes1  
Professeur, Université de la Sorbonne

#### Composition du Jury :

Président : Yves François POUCHUS  
Examineur : Pascal CLAQUIN

Professeur d'université, Université de Nantes  
Professeur, Université de Caen, Normandie

Directeur de thèse : Zouher AMZIL  
Co-encadrant de thèse : Amandine CARUANA

Directeur de recherche, Ifremer  
Chercheur, Ifremer

Invités : Hélène HEGARET  
Nina LUNDHOLM

Chargée de recherche, LEMAR  
Chargée de recherche, SNM, Université de Copenhague



## ***Remerciements***

Je tiens tout d'abord à remercier Myriam Bormans et Rodolphe Lemée d'avoir accepté d'être rapporteurs et d'évaluer mon travail de thèse. Je tiens également à remercier Pascal Claquin et Yves-François Pouchus, examinateurs de ce manuscrit, ainsi que Hélène Hégaret, Nina Lundholm, Amandine Caruana et Zouher Amzil, pour leur participation à mon jury de thèse.

Un grand merci à Zouher Amzil, mon directeur de thèse et du laboratoire PHYC ainsi qu'à Amandine Caruana ma co-encadrante. Je vous suis reconnaissante de m'avoir permis de découvrir l'univers des diatomées et de me donner l'opportunité de travailler sur un sujet aussi passionnant, ainsi que pour tous les conseils qui ont fait avancer ces recherches.

Merci aux membres de mon comité de thèse : Véronique Martin-Jézéquel et Mickael Le Gac, qui ont accepté de suivre avec intérêt l'évolution annuelle de mon projet de recherche. J'ai senti un réel investissement de leur part pour mon projet, qu'ils n'ont pas hésité à enrichir grâce à leurs questions, leurs remarques et leurs conseils pertinents.

J'ai pu réaliser l'ensemble de mes travaux de thèse grâce à de nombreux collaborateurs que je tiens à remercier pour leur professionnalisme et leur disponibilité. Je suis reconnaissante envers Fabienne Hervé, Virginie Raimbault, Georges-Augustin Rovillon, Florent Malo, Sébastien Longo, Delphine Bourreau, Léa Mustière, Yoann Le Merrer, Karine Collin, Nadine Neaud-Masson, Michael Retho, Raoul Gabellec, Nicholas Chomérat et Elisabeth Nézan. J'aimerais apporter un remerciement spécial à Fabienne Hervé pour m'avoir transmis son savoir et son aide précieuse pour les analyses de toxines et de pigments, malgré mes nombreuses sollicitations et les nombreux galères et soucis techniques sur les systèmes CL-SM/SM et CL-UV. Je voudrais aussi te remercier énormément pour la relecture très attentive de ce manuscrit de thèse. Je suis très reconnaissante pour toute ton aide et c'était un plaisir de travailler et de partager ces dernières années avec toi.

Un grand merci à Virginie Raimbault et Florent Malo pour votre aide dans les cultures de *Pseudo-nitzschia*, ces expérimentations n'auraient pas été réalisées sans votre participation (surtout pour les isolements des souches). Virginie, un grand merci pour ton soutien moral, les moments inoubliables, ton sourire, le fait que tu aies toujours aimé mes gâteaux (même les ratés !) et ton amitié précieuse.

Je tiens à remercier chaleureusement Michèle Bardouil ma camarade, merci d'avoir veillé sur moi et sur tous les autres. J'ai pris beaucoup de plaisir à travailler avec toi, je te remercie aussi pour les précieux avis nutritionnels et culturels, j'ai adoré découvrir la ville de Nantes (balades, exposés, musées, films,...) en suivant tes conseils.

Ces trois dernières années de thèse m'ont permis de rencontrer des collègues formidables au laboratoire Phyc. Merci à Georges (My Men pour tes conseils, ton sourire YO et ta bonne humeur même en tant que Augustin), Mano (pour ta bienveillance et tes encouragements), Fabienne (pour ton soutien permanent et toute ton aide), petite Véro (pour tes sifflements qui ont failli me faire craquer), Korian (pour toutes tes aides de bricolage), Florent (pour tes jeux de mots pourris mais très drôles en même temps), Estelle (pour tes astuces de couture et tous ce qui était kikiii), Florence (pour ta gentillesse et ta bienveillance), Nathalie (pour tout ton aide au labo), Hélène (pour ton amitié et ton aide), Liliane (pour ta bonne humeur), Véronique (pour ta bienveillance et ton attitude cool !), Philipp (pour toute ton aide précieuse, ta bonne humeur et tes blagues qui m'ont fait toujours rire), Seb (merci pour ton aide avec les stat et on est pas à Tahiti, mec !), Thomas et Elise (les nouveaux dans la famille Phyc). Je vous remercie pour votre soutien, conseils, bienveillance, encouragements et surtout pour votre amitié. Les moments de folies et de joies partagés ensemble ont permis de surmonter des moments plus difficiles.

Merci infiniment à Enora « ma Roommate du bureau » et Damien « Le Guingampais », vos encouragements, conseils, soutien et discussions enrichissantes durant cette dernière année m'ont permis de garder le moral et la détermination pour tout donner et être fière du travail effectué.

I will forever be thankful for Nina Lundholm for her great support, availability and constructive advices and discussions during my last year of PhD which were determinant for the accomplishment of the work presented in this thesis. You are my role model of a scientist, and the reason why I decided to go to pursue a career in research. Your enthusiasm, positive energy and love for science are contagious. It was a real privilege and an honour for me to work with you and share your exceptional scientific knowledge but also your extraordinary human qualities.

La meilleure partie de cette thèse est d'avoir trouvé mes meilleurs amis, les thésards « zinzins » : Solène Geffroy (zozo I'm cold), Sylvain Gaillard (zyzy 57,5 kg), Maxime Georges des Aulnois (petit bobo abricot) et Marin Pierre Gémin (le métalleux). Il n'y a pas de mots pour exprimer à quel point je vous aime « les ingrats ». Je vous remercie pour votre amitié

inconditionnelle, votre bonne humeur et soutien tout au long de cette thèse. Merci aussi à Cyrielle, François, Seb, Florent et Tetelle pour votre amitié, votre compagnie et pour les week-ends inoubliables (de ouf) passés ensemble. Vous avez tous rendu cette dernière année de thèse magnifique et extraordinaire malgré tout le stress et les difficultés vécus ensemble. Merci de m'avoir aimé et accepté telle que je suis ! Vous êtes précieux pour moi.

Je voudrais aussi remercier mes chers amis : Aumaya Taleb, Guilaine Cado, Eric Gérard, Razmig Kandilian, Sergio Rios, Aurélie Roderman et François Brillet. Merci d'avoir toujours été là depuis des années, dans les bons et les moins bons jours. Merci pour votre écoute, vos conseils et votre amour inconditionnel. Merci de faire partie de cette aventure.

Un grand merci à mon complice depuis tant d'années, Camille. Merci pour ton soutien indéfectible, ton amour, tes encouragements et ta confiance en moi. Merci infiniment pour avoir corrigé et relu ce manuscrit et m'avoir aidé à surmonter le stress et les doutes de la fin de thèse, sans fléchir et d'être toujours là pour moi. Merci aussi à toute ta famille pour leur soutien, leurs encouragements et leurs affections.

Enfin mes derniers remerciements vont à toute ma famille et particulièrement à mes parents Tarek et Wafica, mes sœurs, mon frère et ma mamie pour leur soutien inconditionnel, leurs encouragements, confiance et leur amour, sans lesquels je n'aurais pas pu être aussi loin.

Nour Ayache  
Le 25 janvier 2019

## **Sommaire**

<i>Introduction générale et objectifs de l'étude</i> .....	14
<i>Chapitre I : État de l'art</i> .....	19
1. <i>Microalgues toxiques</i> .....	19
2. <i>Les diatomées : description et cycle de vie</i> .....	21
3. <i>Présentation de la diatomée d'étude : Pseudo-nitzschia</i> .....	23
3.1. <i>Taxonomie</i> .....	24
3.2. <i>Appareil photosynthétique</i> .....	25
4. <i>Impact sanitaire et environnemental</i> .....	25
4.1. <i>Impact sanitaire</i> .....	25
4.2. <i>Impact environnemental</i> .....	30
5. <i>Situation en France métropolitaine</i> .....	31
6. <i>Méthodes de détection, surveillance et réglementation</i> .....	34
7. <i>Distribution géographique des espèces de Pseudo-nitzschia et conditions environnementales favorables</i> .....	35
8. <i>Facteurs abiotiques et biotiques affectant la croissance et la production toxinique chez les espèces de Pseudo-nitzschia</i> .....	37
8.1. <i>Température</i> .....	38
8.2. <i>Irradiance</i> .....	41
8.3. <i>Salinité</i> .....	44
8.4. <i>pH et acquisition du carbone inorganique</i> .....	49
8.5. <i>Bactéries</i> .....	54
9. <i>Objectifs de la thèse</i> .....	59

*Chapitre II : Influence d'un choc de salinité sur la physiologie et la production d'acide domoïque par deux souches de Pseudo-nitzschia australis..... 62*

1. *Abstract..... 64*

2. *Introduction ..... 66*

3. *Materials and methods ..... 68*

    3.1. *Culture conditions ..... 68*

    3.2. *Experimental set-up..... 69*

    3.3. *Physiological measurements ..... 70*

    3.4. *Toxin analyses ..... 70*

    3.5. *Statistical analyses ..... 71*

4. *Results..... 72*

    4.1. *Effect of salinity variation on growth..... 72*

    4.2. *Effect of salinity variation on the photosynthetic activity ..... 74*

    4.3. *Effect of salinity variation on domoic acid production..... 75*

5. *Discussion..... 77*

    5.1. *Effect of salinity variation on growth and the photosynthetic activity..... 77*

    5.1. *Effect of salinity variation on DA production ..... 79*

6. *Conclusion..... 82*

*Chapitre III : Acclimatation de la diatomée marine Pseudo-nitzschia australis à différentes conditions de salinité: Effets sur la croissance, l'activité photosynthétique et la production d'acide domoïque ..... 86*

1. *Abstract..... 88*

2. *Introduction ..... 89*

3. <i>Materials and methods</i> .....	92
3.1. <i>Experimental set-up</i> .....	92
3.2. <i>Growth rate</i> .....	93
3.3. <i>Cell volume</i> .....	93
3.4. <i>Nutrient analyses</i> .....	93
3.5. <i>Toxin analyses</i> .....	94
3.6. <i>Effective quantum yield <math>F_v/F_m</math></i> .....	95
3.7. <i>Pigment measurements</i> .....	95
3.8. <i>Statistical analyses</i> .....	96
4. <i>Results</i> .....	97
4.1. <i>Effect of salinity variation on growth and cell volume</i> .....	97
4.2. <i>Effect of salinity variation on the photosynthetic capacity</i> .....	99
4.3. <i>Effect of salinity variation on toxin production</i> .....	103
4.4. <i>Effect of salinity variation on nutrient consumption</i> .....	105
5. <i>Discussion</i> .....	107
5.1. <i>Growth</i> .....	107
5.2. <i>Cell volume</i> .....	108
5.3. <i>Nutrients</i> .....	109
5.4. <i>Photosynthetic capacity and pigments</i> .....	109
5.5. <i>Domoic acid</i> .....	110
6. <i>Conclusion</i> .....	113
<i>Chapitre IV: Impact de l'acidification de l'océan sur la croissance et la production toxinique de plusieurs souches toxiques et nontoxiques de Pseudo-nitzschia</i> .....	116



1. <i>Abstract:</i> .....	118
2. <i>Introduction</i> .....	119
3. <i>Materials and methods</i> .....	121
3.1. <i>Cultures and culture conditions</i> .....	121
3.2. <i>Experimental set-up</i> .....	124
3.3. <i>Growth monitoring</i> .....	124
3.4. <i>Cell volume</i> .....	125
3.5. <i>Nutrient concentrations</i> .....	126
3.6. <i>Toxin profile (particulate and dissolved)</i> .....	126
4. <i>Results</i> .....	128
4.1. <i>Effect of pH variation on growth and cell volume</i> .....	128
4.2. <i>Dissolved nutrients and inorganic carbon (DIC) content</i> .....	130
4.3. <i>Effect of pH variation on toxin content</i> .....	134
5. <i>Discussion</i> .....	137
5.1. <i>Effect of pH on growth rate</i> .....	137
5.2. <i>Effect of pH variation on carbon speciation</i> .....	139
5.3. <i>Effect of pH variation on particulate and dissolved DA content</i> .....	139
6. <i>Conclusion</i> .....	141
<i>Conclusion et perspectives</i> .....	146
<i>References</i> .....	152

## **Liste des Figures et Tableaux**

*Figure 1: Représentations de la diatomée Pseudo-nitzschia. Photographies de (A) P. australis (Nezan et al., 2006) et (B) P. pungens (Hasle, 1995) en microscopie optique, respectivement, (C) Illustration d'une cellule de Pseudo-nitzschia (Thessen et al., 2009). .....22*

*Figure 2: Illustration du mode de reproduction asexuée et sexuée chez les diatomées (Basu et al., 2017).....23*

*Figure 3: Schéma des gènes ribosomiques eucaryotes 18S; 5,8 S et 28S (Coleman, 2003), modifié.....24*

*Figure 4: Structures chimiques de l'acide domoïque et ses analogues (Saeed et al., 2017). .....26*

*Figure 5: Mécanisme d'action neurotoxique induit par l'AD dans les cellules nerveuses (Lefebvre and Robertson, 2010), modifié.....27*

*Figure 6: Répartition mondiale des espèces de Pseudo-nitzschia. Les espèces toxiques sont renseignées en caractères gras (à savoir que certaines souches de ces espèces sont toxiques dans des zones géographiques précises) (Bates et al., 2018; Trainer et al., 2012). .....37*

*Figure 7: Percentage mortality and growth rates ( $\mu$ ) in strains IFR-PAU-16.1 and IFR-PAU-16.2 exposed to a broad range of salinities: 10, 20, 30, 40 and 35 (control). Data are means  $\pm$  SD,  $n = 3$ . ( $\mu$  calculated between day 1 and 3 for salinities 30 and 35, and between day 0 and 1 for salinities 10, 20 and 40). \* Significant difference between cultures grown at salinities 10 and 20 compared with the control at 35 ( $p < 0.05$ ). .....73*

*Figure 8: Effect of different salinity conditions: 40, 35, 30, 20 and 10 on cell densities for strains IFR-PAU-16.1 (A) and IFR-PAU-16.2 (B). Time 0 refers to the cell transfer to the new salinity treatment media. Data are means  $\pm$  SD,  $n = 3$ . .....74*

*Figure 9: Variation in the effective quantum yield  $QY = F_v/F_m$  in strains IFR-PAU-16.1 (A) and IFR-PAU-16.2 (B) in response to salinity conditions 10, 20, 30, 35 and 40. Data are means  $\pm$  SD,  $n = 3$ . \* Significant difference between cultures at salinities 10 and 20 compared to the control at salinity 35 ( $p < 0.05$ ). .....75*

*Figure 10: Particulate, dissolved and total domoic acid concentrations in strains IFR-PAU-16.1 (A, C, E) and IFR-PAU-16.2 (B, D, F) subjected to different salinity conditions: 40, 35, 30, 20 and 10. Data are means  $\pm$  SD,  $n = 3$ . .....76*

Figure 11: Growth curves for the two strains of *P. australis* IFR-PAU-16.1 (A) and IFR-PAU-16.2 (B) acclimated at different salinity conditions (20, 30, 35 and 40); y axis is displayed with semi-log scale. Insert: specific growth rate ( $\mu$ ) calculated during the exponential growth phase for each salinity condition. Data are means  $\pm$  SD, n=3. Error bars are not visible as they are smaller than the dots. \* Significant difference existed between cultures grown at salinities 20 compared with the other cultures at salinities 30, 35 and 40 ( $p < 0.05$ )...... 98

Figure 12: Mean cell biovolume of IFR-PAU-16.1 (white bars) and IFR-PAU-16.2 (grey bars) acclimated to diverse salinity conditions: 20, 30, 35 and 40. BA refers to the initial cell volume before acclimation. Data are expressed as mean  $\pm$  SD, n=50. \* Significant difference existed between cultures grown at salinities 20 compared with the other cultures at salinities 30, 35 and 40 ( $p < 0.05$ )...... 99

Figure 13: Variations in maximum photosynthetic activity (Fv/Fm) for the strains IFR-PAU-16.1 (A) and IFR-PAU-16.2 (B) in response to the salinity conditions 20, 30, 35 and 40. Data are means  $\pm$  SD, n=3. Error bars are not visible as they are smaller than the dots..... 100

Figure 14: High performance liquid chromatogram obtained for the strain IFR-PAU-16.1 at 450 nm on the last day of the experiment showing all the identified pigments including the zeaxanthin. .... 101

Figure 15: Temporal variations in pigment concentrations (chl a, chlide a, fucoxanthin and zeaxanthin) observed during the growth of the strain IFR-PAU-16.1 under different salinity conditions: 20, 30, 35 and 40. Data are means  $\pm$  SD, n=3..... 102

Figure 16: Particulate and dissolved domoic acid concentrations for the IFR-PAU-16.1 (A, C) and IFR-PAU-16.2 (B, D) strains subjected to different salinities: 20, 30, 35 and 40. Data are means  $\pm$  SD, n=3. .... 104

Figure 17: Percentage of particulate and dissolved domoic acid concentrations during exponential (Expo) and stationary (Stat) growth phase for the IFR-PAU-16.1 (A) and IFR-PAU-16.2 (B) strains subjected to different salinities: 20, 30, 35 and 40. Data are means  $\pm$  SD, n=3. .... 105

Figure 18: Dissolved nitrogen (A), phosphate (B) and silicate (C) concentrations measured on the first day (L1) and the last day of the experiment for the strains IFR-PAU-16.1 and IFR-PAU-16.2 grown under different salinity conditions: 20, 30, 35 and 40. Data are  $\pm$  SD, n=3. Error bars are not visible as they are smaller than the dots..... 106

Figure 19: Mean specific growth rate ( $d^{-1}$ ) for *P. australis* strains (A) (IFR-PAU-17, L 3.4, L 3-30 and L 3-100) and *P. fraudulenta* strains (B) (IFR-FRA-17, PNfra 167 and PNfra 169) acclimated at three different pH levels (pH= 7.4, 7.77 and 8.07). Error bars represent  $\pm$  SD,  $n=3$ . ..... 129

Figure 20: Initial mean cell volume ( $\mu m^3$ ) for (A) *P. australis* strains (IFR-PAU-17, L 3.4, L 3-30 and L 3-100) and (B) *P. fraudulenta* strains (IFR-FRA-17, PNfra 167 and PNfra 169) measured at the beginning of the experiment. Error bars represent  $\pm$  SD,  $n=50$ . ..... 130

Figure 21: Example of pH adjustments for the culture of *P. australis* IFR-PAU-17 strain under the pH treatment 8.07. The first days represent the acclimation period and are not included in the results. Error bars represent  $\pm$  SD,  $n=3$ . ..... 131

Figure 22: Dissolved inorganic carbon (DIC) concentrations measured at the end of the experiment for *P. australis* (A) strains (IFR-PAU-17, L 3.4, L 3-30 and L 3-100) and *P. fraudulenta* (B) strains (IFR-FRA-17, PNfra 167 and PNfra 169) acclimated at three different pH levels (pH= 7.4, 7.77 and 8.07). Error bars represent  $\pm$  SD,  $n=3$ . ..... 132

Figure 23: Carbonate speciation (mean  $\pm$  SD) of *P. australis* (A) and *P. fraudulenta* (B) strains measured at each of the three pH treatments. Concentrations of  $HCO_3^-$ ,  $CO_3^{2-}$  and  $CO_2$  were calculated from pH and DIC concentrations at a temperature of 16°C and salinity of 32 using the Mehrbach equilibrium constants as refit by Dickson & Millero (1987). ..... 133

Figure 24: Particulate (A), dissolved (B) and total DA contents (C) ( $pg\ cell^{-1}$ ) for *P. australis* strains (IFR-PAU-17, L 3.4, L 3-30 and L 3-100) acclimated at three different pH levels (pH= 7.4, 7.77 and 8.07). Data are means  $\pm$  SD,  $n=3$ . The sign (\*) refers to values of dissolved DA for the strain IFR-PAU-17 on secondary Y axis, panel B. .... 135

Figure 25: Total DA concentrations for *P. australis* strains (IFR-PAU-17, L 3.4, L 3-30 and L 3-100) expressed on a per cell basis ( $pg\ cell^{-1}$ ) and as a percentage (%) of particulate and dissolved DA concentrations at the different pH levels: 8.07, 7.77 and 7.40. Data are means  $\pm$  SD,  $n=3$ . ..... 136

<i>Tableau 1: Exemples de cas de mortalités recensés chez les mammifères marins le long des côtes nord- et sud-américaines.....</i>	<i>31</i>
<i>Tableau 2: Exemples des effets de la variation de la température sur la croissance et la production d'AD par Pseudo-nitzschia spp. ....</i>	<i>40</i>
<i>Tableau 3: Exemples des effets de la variation de l'irradiance sur la croissance et la production d'AD par Pseudo-nitzschia spp.....</i>	<i>43</i>
<i>Tableau 4: Exemples des effets de la variation de la salinité sur la croissance et la production d'AD par Pseudo-nitzschia spp.....</i>	<i>48</i>
<i>Tableau 5: Exemples des effets de la variation du pH sur la croissance et la production d'AD par Pseudo-nitzschia spp.....</i>	<i>53</i>
<i>Tableau 6: Exemples des effets de la présence des bactéries sur la croissance et la production d'AD par Pseudo-nitzschia spp.....</i>	<i>57</i>
<i>Tableau 7: Information on Pseudo-nitzschia strains designations, sampling location and date, and sources.....</i>	<i>123</i>

# Introduction générale et objectifs de l'étude

Au cours des dix dernières années, plusieurs pays côtiers, dont la France, repartis au travers des cinq continents, ont connu un problème majeur et croissant lié à la prolifération de la diatomée du genre *Pseudo-nitzschia* (Bates et al., 2018). Cette diatomée comprend des espèces toxiques capables de produire de l'acide domoïque (AD), une neurotoxine responsable du syndrome d'intoxication amnésique chez l'Homme. L'intoxication humaine par l'AD se manifeste 2 à 24 heures après l'ingestion de coquillages contaminés et se caractérise tout d'abord par des troubles gastro-intestinaux suivis de troubles neurologiques tels que la perte de la mémoire à court terme. Les cas les plus extrêmes d'intoxication à l'AD peuvent conduire au coma, voire à la mort. Les efflorescences toxiques de *Pseudo-nitzschia* ont également été à l'origine d'épisodes de fortes mortalités chez les mammifères et les oiseaux marins. En France, plusieurs épisodes toxiques liés à la présence de l'AD dans la chair de coquillages se sont produits ces dernières années conduisant à une vigilance accrue, et à des mesures d'interdiction et d'arrêt de la pêche aux coquillages, en particulier des coquilles Saint-Jacques capables d'accumuler l'AD pendant plus d'un an. Ces proliférations toxiques présentent donc de nombreux risques allant de graves dommages écologiques et économiques, à des menaces pour la santé publique. Il apparaît donc nécessaire de mieux comprendre ces phénomènes de toxicité afin d'en limiter les impacts sur la santé publique et l'économie de certaines pêcheries.

D'après la littérature, l'abondance, la fréquence et l'intensité des blooms de *Pseudo-nitzschia* semblent être accentuées par l'eutrophisation, c'est-à-dire la modification naturelle ou non de la charge en nutriments du milieu aquatique, ainsi que par le changement climatique. Ainsi, plusieurs études ont examiné l'effet de ces changements sur la prolifération et la production de

l'AD, comprenant la modification de la température, du pH, de l'irradiance, de la salinité, de la disponibilité de différentes sources nutritives et de la présence de bactéries.

Des progrès scientifiques significatifs ont été réalisés afin d'élucider les facteurs favorisant l'apparition des blooms toxiques de *Pseudo-nitzschia* et leurs impacts sur l'écosystème, l'économie et la santé publique. Cependant, les résultats obtenus par ces études sont souvent contradictoires et ceci a généralement été justifié par la large variabilité entre les espèces et même les souches de *Pseudo-nitzschia* étudiées. La variabilité des réponses de ces espèces aux changements abiotiques et biotiques nécessite donc une étude approfondie.

Dans ce contexte, plusieurs espèces et souches de *Pseudo-nitzschia* isolées en France ont été étudiées au cours de cette thèse afin de mieux comprendre et prédire la réponse de ces espèces face à de futurs changements climatiques. En particulier, l'impact de deux facteurs très peu présentés dans la littérature, ont été étudiés, à savoir la variation de la salinité et l'acidification de l'océan (diminution de pH). Le but est de déterminer, pour ces deux facteurs, les seuils favorisant la prolifération et la production d'AD par les différentes espèces de *Pseudo-nitzschia* étudiées. Un intérêt particulier est donné à l'espèce toxique *P. australis* qui se développe sur les côtes françaises. Ces résultats permettront de déterminer l'influence et les seuils de tolérance des cellules de *Pseudo-nitzschia* face aux futurs changements climatiques, en analysant particulièrement leur impact sur la croissance, la physiologie et la toxicité des cellules de *Pseudo-nitzschia*, ainsi que leur capacité à s'acclimater aux futures conditions environnementales.

Ce manuscrit de thèse est présenté en plusieurs parties :

Une première partie dédiée à l'état de l'art présentant une introduction générale sur la diatomée *Pseudo-nitzschia* et abordant principalement les travaux scientifiques portant sur le changement

de plusieurs facteurs environnementaux abiotiques et biotiques et leurs conséquences sur la croissance et la production toxinique chez les espèces de *Pseudo-nitzschia* étudiées.

Une deuxième partie intitulée : **Effet d'un stress de salinité sur la croissance, l'activité photosynthétique et la production toxinique par deux souches de *Pseudo-nitzschia australis*.**

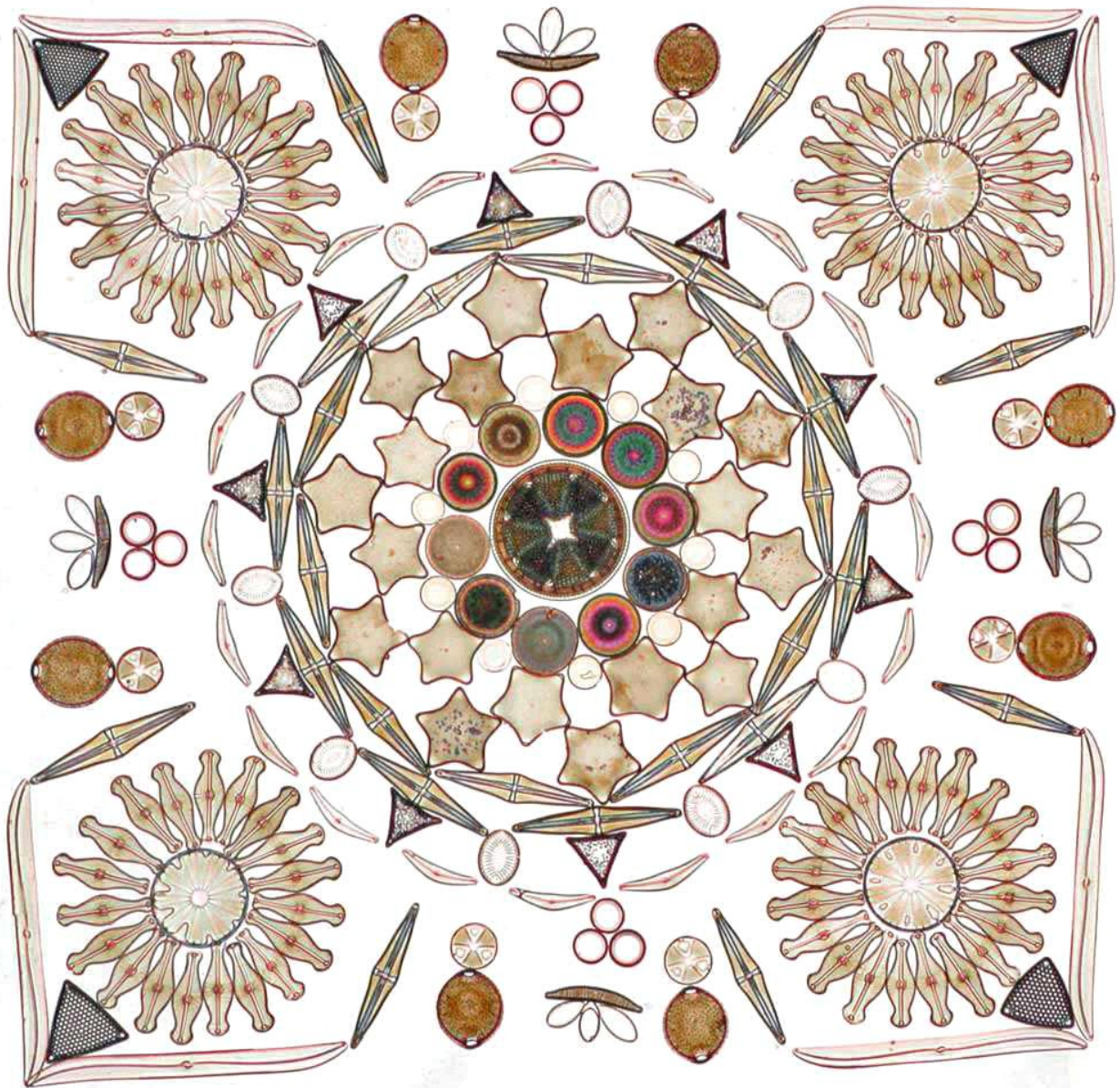
Cette partie présente une étude scientifique abordant pour la première fois la problématique d'un changement brusque de salinité sur la physiologie de deux souches toxiques de *P. australis* isolées en France. Cette variation brutale de salinité est relative aux conditions changeantes du climat telles que les modifications dans les régimes des précipitations et la fréquence des tempêtes. Cette première expérimentation visait à mieux comprendre la réponse des cellules de *Pseudo-nitzschia* face à un stress osmotique dont particulièrement, leur capacité à tolérer un choc rapide de salinité et leur capacité consécutive d'acclimatation. Une des hypothèses de cette expérimentation était de voir si l'AD agit comme un osmolyte lors d'un changement de salinité comme cela était proposé par d'autres scientifiques. Cette partie a fait l'objet d'un article ayant été accepté pour publication dans le journal scientifique « Journal of Phycology ».

Une troisième partie intitulée : **Acclimatation de la diatomée marine *Pseudo-nitzschia australis* à différentes conditions de salinité : effet sur la physiologie et la production d'acide domoïque.**

Cette partie, faisant suite à l'étude sur les chocs de salinité, aborde l'effet de l'acclimatation de deux souches de *P. australis* à différentes conditions de salinité. Le but de cette expérimentation étant de voir la réponse physiologique de ces souches faces aux nouvelles conditions osmotiques, en particulier l'impact sur leur taux de croissance, le biovolume cellulaire, leur activité photosynthétique ainsi que leur capacité à produire de l'AD. Cette partie permet d'éclairer les questions liées à la manifestation des blooms de *Pseudo-nitzschia australis* dans les zones côtières et estuariennes où sont présentes la majorité des activités conchylicoles et qui sont sujettes à des fluctuations importantes de salinité. Cet article présenté dans la troisième partie a été soumis dans le journal « Journal of Phycology ».



Une quatrième partie intitulée : **Impact de l'acidification de l'océan sur la croissance et la production toxinique de plusieurs souches toxiques et non-toxique de *Pseudo-nitzschia* issues de plusieurs zones géographiques.** Le but de cette partie est de simuler des variations entre le pH océanique actuel et de futurs niveaux probables, afin d'évaluer leurs impacts sur la croissance et la toxicité de six souches de *P. australis* et *P. fraudulenta*. De plus, cette partie permet d'évaluer comment ces souches pourraient s'acclimater dans le futur avec des conditions de forte teneur en CO<sub>2</sub>. Ce quatrième chapitre est présenté sous la forme d'un article qui sera soumis au journal "Harmful Algae".



Arrangements artistiques de Diatomées par Klaus Kemp-Microlife Services  
(<http://www.diatoms.co.uk/index.htm>)

# Chapitre I : État de l'art

## 1. *Microalgues toxiques*

Les microalgues constituent la base du réseau trophique aquatique. Grâce à la photosynthèse, les microalgues sont capables d'élaborer leur propre matière organique nécessaire pour la croissance et fournissent ainsi une source de nourriture pour les niveaux trophiques supérieurs (Falkowski and Raven, 1997). Lorsque les conditions environnementales sont favorables, des espèces de microalgues peuvent proliférer provisoirement en forte densité. Cette efflorescence de microalgues, connue sous le nom anglo-saxon de « bloom » (jusqu'à des millions de cellules par litre) est un phénomène naturel. Cependant, certains blooms de microalgues peuvent être nuisibles (« Harmful Algal Blooms » ou HAB). Parmi les milliers d'espèces de microalgues présentes dans l'environnement, environ 300 peuvent être considérées comme nuisibles dont une centaine sont recensées comme potentiellement toxiques (Caruana and Amzil, 2018; Hallegraeff, 1993; Landsberg, 2002; Visciano et al., 2016). Ces microalgues nuisibles sont classées en différentes catégories :

- les microalgues non toxiques, mais capables d'atteindre de fortes concentrations, pouvant entraîner la mort de la faune marine (poissons et invertébrés) par hypoxie (faible teneur en oxygène) ou anoxie (absence d'oxygène),
- les microalgues synthétisant des toxines pouvant s'accumuler dans la chaîne alimentaire et pouvant conduire à des intoxications chez le consommateur,
- les microalgues non toxiques pour l'être humain, mais nuisibles pour les poissons et autres organismes marins par la production de toxines hémolytiques,
- les microalgues toxiques conduisant à un impact sanitaire par inhalation ou par contact cutané.

L'impact sur la santé humaine est lié à l'intoxication après consommation de coquillages contaminés, par contact direct de la peau avec du phytoplancton toxique et/ou par l'inhalation de toxines en aérosol. Les mammifères marins peuvent également être victimes de toxines algales bioaccumulées le long de la chaîne trophique jusqu'à leurs proies.

D'après la littérature, la présence d'HAB est généralement associée à un ensemble complexe de conditions physiques, chimiques, biologiques, hydrologiques et météorologiques. D'où la difficulté à déterminer les facteurs environnementaux spécifiques impliqués dans la distribution, la prolifération ainsi que la production toxinique du phytoplancton. De plus, les occurrences d'événements HAB à travers le monde sont devenues plus fréquentes, plus répandues, et plus sévères, notamment en raison des facteurs liés aux activités humaines incluant:

- l'augmentation des pressions anthropiques dans les zones côtières, comme les apports en nutriments liés aux pratiques agricoles (Heisler et al., 2008),
- l'impact du changement climatique lié aux activités humaines (Moore et al., 2008),
- l'introduction d'espèces par les eaux de ballast des bateaux ou par le transport de stocks de coquillages d'un lieu à un autre (Hallegraeff and Bolch, 1991).

Les toxines de microalgues sont des métabolites secondaires qui présentent une diversité de composés aux structures chimiques variées et qui agissent via différents mécanismes de toxicité. Ainsi, parmi les toxines produites par les microalgues marines (*i.e.* dinoflagellés et diatomées), on retrouve des toxines diarrhéiques, amnésiantes, paralysantes ou neurotoxiques dont certaines peuvent entraîner la mort.

Les risques induits par les microalgues toxiques et nuisibles ont entraîné la mise en place de réseaux de surveillance et de seuils sanitaires lorsque suffisamment de données toxicologiques ont été disponibles. Lorsque ces seuils sont atteints ou dépassés dans les chairs des fruits de mer, les zones de production conchylicole ou de pêches récréatives sont fermées, et la vente des

coquillages concernés est interdite. Ces fermetures peuvent avoir un impact socio-économique majeur pour les communautés côtières et les opérateurs d'aquaculture, de pêche et de tourisme avec la fermeture des fermes conchylicoles et aquacoles.

La suite de l'état de l'art portera sur les diatomées, en particulier le genre *Pseudo-nitzschia* qui fait l'objet des travaux de thèse.

## **2. Les diatomées : description et cycle de vie**

Les diatomées (Bacillariophycées), estimées à 12 000 espèces (Guiry and Guiry, 2018), constituent le groupe le plus diversifié du phytoplancton eucaryote. Elles sont distribuées globalement des tropiques aux pôles et assurent 20 % de la production primaire marine (Nelson and Smith, 1991). Les diatomées jouent également un rôle primordial dans la régulation climatique en absorbant et stockant près de 40% du dioxyde de carbone anthropogénique (Buesseler, 1998; Mann and Mann, 1999). En outre, elles sont uniques parmi les organismes photosynthétiques marins en raison de la présence d'une paroi rigide siliceuse appelée frustule. Ce dernier est constitué d'une partie supérieure appelée épithèque et une partie inférieure appelée hypothèque qui s'emboîtent l'une dans l'autre. En se basant sur la morphologie du frustule, il est possible de distinguer deux grands groupes de diatomées: les centriques ayant une symétrie radiale et les pennées à symétrie bilatérale pourvue ou non d'un raphé (Figure 1) (Hendey, 1974; Round et al., 1990).

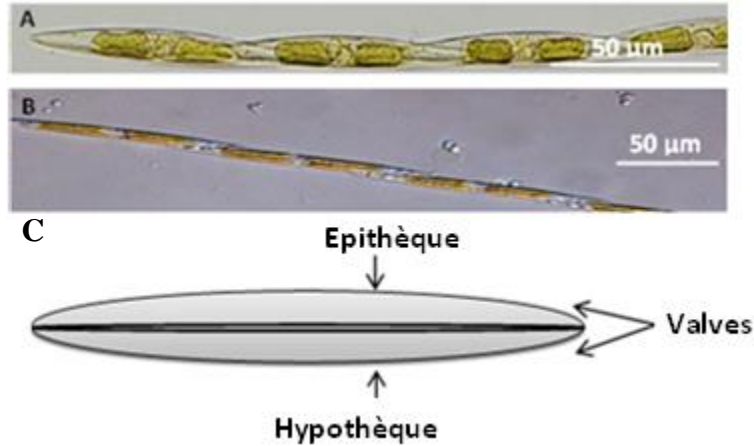


Figure 1: Représentations de la diatomée *Pseudo-nitzschia*. Photographies de (A) *P. australis* (Nezan et al., 2006) et (B) *P. pungens* (Hasle, 1995) en microscopie optique, respectivement, (C) Illustration d'une cellule de *Pseudo-nitzschia* (Thessen et al., 2009).

Comme de nombreux organismes phytoplanctoniques, le cycle de vie des diatomées comprend deux stades principaux : un stade végétatif où la diatomée est diploïde et se reproduit par mitose (reproduction asexuée), et un stade relativement court de reproduction sexuée (Chepurnov et al., 2008; Lewis et al., 1984) (Figure 2). Les diatomées peuvent se multiplier végétativement, chaque thèque de la cellule mère pouvant se séparer en deux demi-cellules, chacune formant par la suite une nouvelle hypothèque. En conséquence, l'une des deux nouvelles cellules filles est de taille identique à la cellule mère, alors que l'autre est de plus petite taille. Ainsi, les divisions successives des cellules conduisent à une réduction de la taille des diatomées jusqu'à une taille critique (environ 30- 40% de diminution par rapport à la taille initiale de la cellule mère) nécessitant une régénération par voie sexuée afin de rétablir leur taille originelle (Bates and Davidovich, 2002).

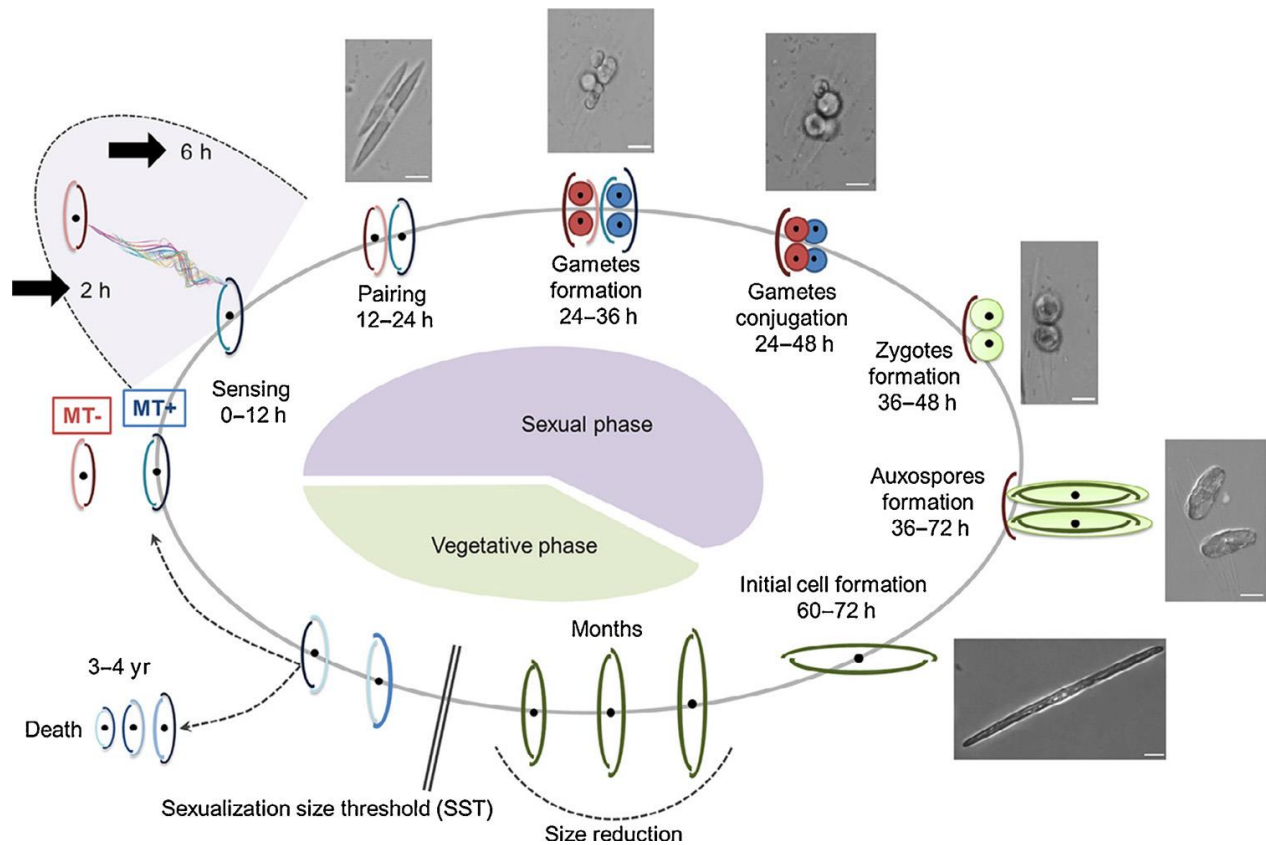


Figure 2: Illustration du mode de reproduction asexuée et sexuée chez les diatomées (Basu et al., 2017).

En plus du critère de taille, les conditions physico-chimiques peuvent jouer un rôle important dans l'initiation d'un cycle de reproduction sexuée. Elle peut parfois être induite par des conditions environnementales défavorables pour la croissance telles qu'un stress lumineux, la raréfaction en nutriments, la variation de la salinité et les changements de température (Falciatore and Bowler, 2002; Trainer et al., 2008).

### 3. Présentation de la diatomée d'étude : *Pseudo-nitzschia*

Le genre *Pseudo-nitzschia* appartient à l'ordre des diatomées pennées et est représenté par des cellules de formes allongées ayant la capacité de former des chaînes. À ce jour, le genre *Pseudo-nitzschia* comprend 52 espèces dont 26 sont productrices d'une neurotoxine appelée acide domoïque (AD) (Ajani et al., 2018; Gai et al., 2018; Lundholm, 2018). L'acide domoïque

(AD) et ses analogues sont des biotoxines marines, responsables chez l'Homme de l'Intoxication Amnésiante par les Fruits de Mer (IAFM ou « Amnesic Shellfish Poisoning » ASP).

### 3.1. Taxonomie

La taxonomie des espèces de *Pseudo-nitzschia* est basée sur des caractéristiques morphologiques et moléculaires. Afin de les différencier, trois groupes d'espèces ont été établis (Lundholm et al., 2006) :

- le groupe des « fines », appartenant au complexe *delicatissima* (comprenant *P. calliantha*, *P. delicatissima*, *P. pseudodelicatissima*),
- le groupe des « larges », appartenant au complexe *seriata* (comprenant *P. australis*, *P. fraudulenta*, *P. seriata*, *P. subpacific*),
- le groupe des « effilées » appartenant aussi au complexe *seriata* (comprenant *P. multiseri* et *P. pungens*) et pouvant former de longues chaînes.

L'observation par microscopie optique permet de différencier les deux complexes *P. delicatissima* et *P. seriata*. Cependant, les analyses taxonomiques approfondies par microscopie électronique à balayage ou à transmission sont souvent nécessaires pour mieux identifier certaines espèces. L'avènement des techniques de biologie moléculaire alternatives a également amélioré l'identification et la discrimination entre les espèces, les souches et même les clones de *Pseudo-nitzschia* en se référant aux gènes codants pour les ARNs ribosomiaux (18S, 5.8 S et 28 S) et pour les espaceurs internes transcrit (ITS « Internal Transcribed Spacers ») (Figure 3) (Amato et al., 2007; Rehnstam-Holm and Godhe, 1995).

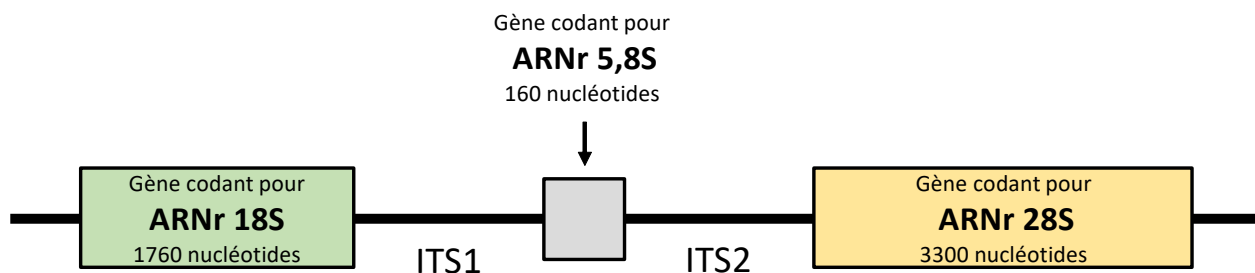


Figure 3: Schéma des gènes ribosomiques eucaryotes 18S ; 5,8 S et 28S (Coleman, 2003),  
modifié.



### 3.2. Appareil photosynthétique

L'appareil photosynthétique des diatomées est semblable aux autres algues eucaryotes et aux plantes. Il est constitué de deux parties principales : l'antenne collectrice qui absorbe l'énergie lumineuse à différentes longueurs d'onde (LHA pour « *Light-harvesting antenna* ») et le centre réactionnel (CR) qui transforme cette énergie lumineuse en énergie chimique. Chez les diatomées, les pigments sont classés en deux catégories à savoir les pigments photosynthétiques, qui permettent la conversion des photons en énergie chimique, et ceux dits accessoires qui ne peuvent pas effectuer cette conversion, mais qui permettent d'optimiser le spectre lumineux d'absorption tout en jouant un rôle dans la photoprotection (Jeffrey and Vesk, 2005). Les pigments photosynthétiques chez les diatomées sont la chlorophylle a, la chlorophylle c et la fucoxanthine. Les  $\beta$ -carotènes et les xanthophylles sont considérés comme des pigments accessoires ou photoprotecteurs (Jeffrey and Vesk, 2005). Cette composition pigmentaire confère aux diatomées un large spectre d'absorption allant de 400 à 580 nm (Kuczynska et al., 2015). Les pigments xanthophylles composés de la diadinoxanthine (DD) et la diatoxanthine (DT) sont impliqués dans la photoprotection. Il s'agit d'un processus physiologique permettant la dispersion des électrons excédentaires au niveau des CR pour ne pas les endommager (Brunet et al., 2015; Kuczynska et al., 2015). Le cycle des xanthophylles correspond à la conversion enzymatique d'une xanthophylle époxydée, la DD, en une forme dé-époxydée, la DT. Elles sont particulièrement impliqués dans la régulation rapide de l'absorption et la dissipation de la lumière lorsque les conditions environnementales sont défavorables (excès de lumière ou conditions limitant la croissance) et permettent ainsi une acclimatation rapide de la cellule à ces modifications (Goss et al., 2006; Lavaud, 2007).

## 4. Impact sanitaire et environnemental

### 4.1. Impact sanitaire

L'acide domoïque, toxine amnésiante, est un acide aminé de faible poids moléculaire de 311 Da appartenant au groupe des neurotoxines de type acide kaïnique. Il possède trois groupes

carboxyliques, est hydrosoluble et thermostable. À des températures supérieures à 50 °C ou sous rayonnement ultra-violet (UV), l'acide domoïque s'isomérisse pour donner principalement de l'acide épidoïque et des acides isodomoïques (Quilliam, 2003). À ce jour, neuf stéréoisomères ont été décrits et seulement quatre stéréoisomères ont été trouvés dans des extraits de coquillage (Saeed et al., 2017) (Figure 4). Cet acide aminé tricarboxylique est structurellement similaire à l'acide glutamique (glutamate) qui est un neurotransmetteur excitateur du système nerveux central chez les mammifères. Seuls l'acide domoïque et son analogue l'acide épidoïque sont considérés toxiques (Wright et al., 1989).

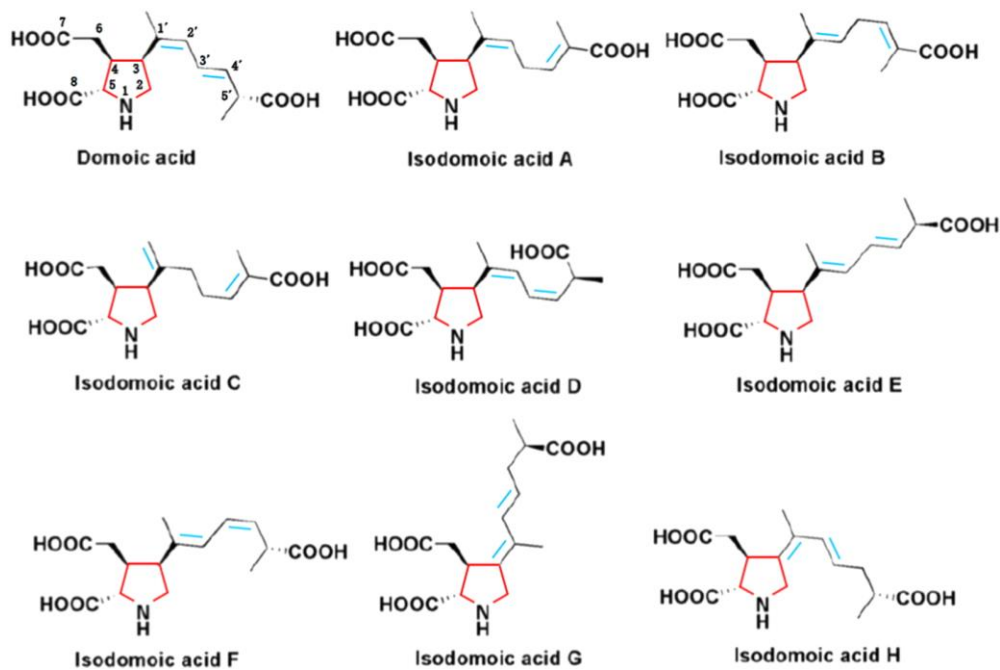
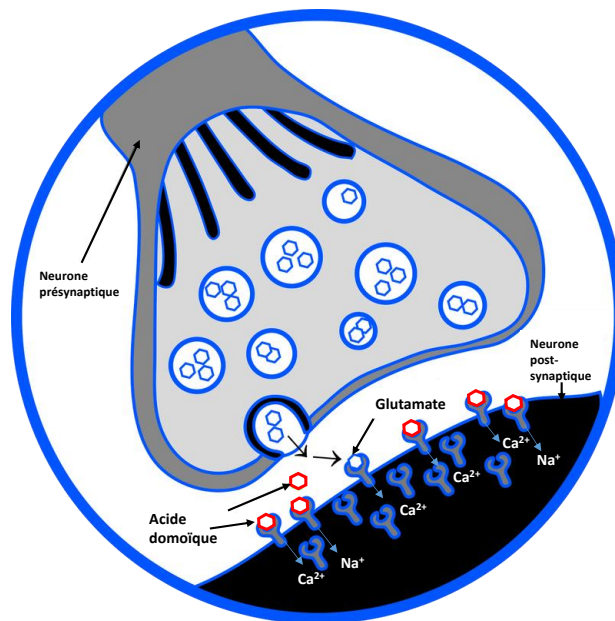


Figure 4: Structures chimiques de l'acide domoïque et ses analogues (Saeed et al., 2017).

L'acide glutamique est généralement impliqué dans la communication cellulaire et la potentialisation à long terme de l'hippocampe, un processus important dans l'apprentissage et la mémoire chez les mammifères (Bates, 1998). Après absorption par la muqueuse gastro-intestinale, l'AD peut se fixer sur les récepteurs de l'acide glutamique présents au niveau du système nerveux central et du myocarde (Ramsdell and Gulland, 2014). La liaison de l'AD aux

récepteurs provoque des flux incontrôlés d'ions calcium et sodium dans la membrane post-synaptique. L'accumulation intra-neuronale des ions calcium peut entraîner un gonflement neuronal, des dommages de l'ADN, la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), conduisant au dysfonctionnement ou à la mort des neurones (Pulido, 2008) (Figure 5). La cytotoxicité induite par l'AD entraîne un effet 100 fois plus puissant qu'une molécule d'acide glutamique, en raison de la prolongation de l'activation des récepteurs suivis d'un flux d'ions constant dans la cellule (Jeffery et al., 2004). Cependant, l'activité neurotoxique de l'AD pure s'est avérée moins toxique qu'un extrait de coquillage contaminé résultant d'une synergie entre la neurotoxicité de l'AD et celle des acides glutamique et aspartique présents dans les tissus des coquillages (Kumar et al., 2010; Lelong et al., 2012).



*Figure 5: Mécanisme d'action neurotoxique induit par l'AD dans les cellules nerveuses (Lefebvre and Robertson, 2010), modifié.*

Les neurones situés dans l'hippocampe qui sont affectés par l'AD conduisent chez les mammifères à l'amnésie ou à la perte de mémoire à court terme, d'où le nom d'intoxication amnésiante, connue sous le nom anglo-saxon Amnesic Shellfish Poisoning (ASP). La consommation de mollusques ayant accumulé des concentrations d'AD supérieures à la limite réglementaire fixée par la directive européenne à 20 mg AD kg<sup>-1</sup> de chair de coquillage peut provoquer chez l'Homme une intoxication de type ASP. Il existe une grande variété de vecteurs de l'AD, aussi bien des organismes marins filtreurs comme les mollusques bivalves (moules, palourdes, donaces, coquilles Saint-Jacques, etc.), que des poissons (anchois, sardines, maquereaux) (Lelong et al., 2012). L'AD s'accumule également chez les oiseaux (pélicans bruns, Cormorans de Brandt) et les mammifères marins (otaries, lions de mer, phoques), provoquant des mortalités de masse pour ces animaux (Bargu et al., 2012; Beltrán et al., 1997; Gulland, 2000; Lefebvre et al., 2012; Shumway et al., 2003).

Les organismes filtreurs représentent le plus grand risque d'exposition à l'AD pour l'Homme, particulièrement les coquilles Saint-Jacques capables de retenir dans l'ensemble de ses tissus de très fortes concentrations de toxines amnésiantes pendant plus d'un an (Amzil et al., 2007; Blanco et al., 2002).

En ce qui concerne la stabilité de l'AD à la température, les études de Hatfield et al. (1995) et McCarron et Hess (2006) ont montré que la cuisson des crustacés et des mollusques comme les crabes de Dungeness (*Cancer magister*) et les moules (*Mytilus edulis*) dans de l'eau bouillante durant 10 à 20 minutes ne permet pas la dégradation de l'AD. Alors que la concentration d'AD dans la chair de ces organismes a été réduite de 67 à 71%, cette toxine hydrophile est extraite des tissus des mollusques et se retrouve dissoute dans l'eau environnante. Ceci indique que le traitement par cuisson est inefficace pour éliminer l'AD avant consommation des coquillages.

L'intoxication par l'AD se manifeste 2 à 24 heures après ingestion de coquillages contaminés et est caractérisée premièrement par des troubles gastro-intestinaux tels que des vomissements, des diarrhées et des crampes abdominales, suivis de symptômes neurologiques (après 48 h) tels que des maux de tête, des convulsions, désorientation, des pertes de mémoire à court terme, pouvant même aller jusqu'au coma et à la mort dans les cas les plus graves (La Barre et al., 2014; Lefebvre and Robertson, 2010; Tasker, 2016; Visciano et al., 2016).

Les effets toxicologiques associés à l'AD ont été étudiés chez différents modèles animaux, dont les rongeurs *Mus musculus* et *Rattus norvegicus* et les macaques. Dans une étude de Tryphonas et al. (1990), des doses uniques d'AD ont été administrées à cinq singes macaques crabiers (*Macaca fascicularis*) par voie intrapéritonéale (4 mg kg<sup>-1</sup> de poids corporel). L'AD a provoqué de graves vomissements suivis d'hypothermie, d'un œdème pulmonaire aigu et de la mort de l'animal dans les 4 heures qui ont suivi l'injection. Des effets neurotoxiques similaires ont également été signalés dans plusieurs études sur les rongeurs. Ces études ont montré que l'administration de l'AD par voie intrapéritonéale à faible dose était extrêmement toxique avec des doses létales médianes (DL<sub>50</sub>) chez les souris comprises entre 2.4 et 3.6 mg AD par kg de poids corporel (Grimmelt et al., 1990; Jeffery et al., 2004; Tasker et al., 1991).

Le phénomène ASP a été reconnu pour la première fois en 1987 sur l'île du Prince Edouard au Canada, où la consommation de moules bleues (*Mytilus edulis*) contaminées par l'AD a causé une centaine de cas d'intoxications aiguës dont 4 se sont avérés fatales (Perl et al., 1990; Wright et al., 1989). Il a été établi que les moules consommées étaient contaminées par l'AD provenant d'un bloom de *Pseudo-nitzschia multiseries* (Perl et al., 1990). À partir des données cliniques et des analyses des moules contaminées, des concentrations d'AD ingérées par les patients ont été estimées à environ 60 et 290 mg (environ 1 à 5 mg kg<sup>-1</sup> pour une personne de 60 kg) (Perl et al., 1990). Ces dernières ont été considérées comme dose suffisante pour induire l'apparition des symptômes gastro-intestinaux et neurologiques chez l'Homme (Jeffery et al.,

2004; Perl et al., 1990). Toutefois, il existe très peu d'études concernant l'impact d'une exposition chronique et à faibles doses liées à la consommation régulière de coquillages contaminés par l'AD (Ferriss et al., 2017; Grant et al., 2015; Truelove et al., 1996).

#### 4.2. Impact environnemental

De nombreuses efflorescences de *Pseudo-nitzschia* ont été associées à des cas de mortalités en masse chez les oiseaux et mammifères marins suite à la présence de *Pseudo-nitzschia* toxiques ou à la détection de fortes concentrations d'AD accumulées dans ces organismes (Lefebvre et al., 2012; Scholin et al., 2000). Les effets des intoxications par l'AD sur la santé des oiseaux et mammifères marins ont été bien documentés le long de la côte ouest des États-Unis. Par exemple, les effets neurotoxiques de l'AD ont été signalés pour la première fois en 1998 sur les côtes américaines, où 400 otaries de Californie (*Zalophus californianus*) ont été retrouvées échouées dans la baie de Monterey (Californie, USA) suite à l'ingestion d'anchois et de sardines contaminés par l'AD produit par l'espèce *Pseudo-nitzschia australis* (Gulland, 2000; Scholin et al., 2000). Récemment une étude de Lefebvre et al. (2016) a montré la présence d'AD dans 905 mammifères marins appartenant à 13 espèces différentes dans le golf d'Alaska, comprenant : baleines à bosse, baleines boréales, bélugas, marsouins communs, phoques à fourrure du Nord, otaries, phoques communs, phoques annelés, phoques barbus, phoques maculés, morses du Pacifique et loutres de mer du Nord. L'acide domoïque a été détecté chez les 13 espèces examinées avec des prédominances d'intoxication chez les baleines boréales et les phoques communs. Au cours des dernières années, ces épisodes de toxicité ont donc provoqué des maladies et des mortalités importantes chez les mammifères marins le long des côtes nord et sud-américaines (exemples en Tableau 1).

Tableau 1: Exemples de cas de mortalités recensés chez les mammifères marins le long des côtes nord- et sud-américaines.

Localisation géographique	Année	Espèces touchées	Références
<b>Californie, USA</b>	1998-2000	Otaries ( <i>Zalophus californianus</i> )	(Gulland, 2000; Scholin et al., 2000)
<b>Californie, USA</b>	2002	Dauphins ( <i>Delphinus</i> sp.), otaries ( <i>Zalophus californianus</i> ), loutres ( <i>Enhydra lutris</i> )	(Gulland et al., 2002; NOAA Fisheries, 2016)
<b>Maine, USA</b>	2003	Baleines à bosse ( <i>Megaptera novaeangliae</i> )	(NOAA Fisheries, 2016)
<b>Península Valdés, Argentina</b>	2005	Baleines franches australes ( <i>Eubalaena australis</i> )	(Wilson et al., 2015)
<b>Texas, USA</b>	2008	Dauphins ( <i>Tursiops truncatus</i> )	(Fire et al., 2011)
<b>Californie, USA</b>	2005-2009	Phoques gris ( <i>Callorhinus ursinus</i> )	(Lefebvre and Robertson, 2010)
<b>Californie, USA</b>	2007-2009	Marsouins communs ( <i>Phocoena phocoena</i> )	(Wilkin et al., 2012)

### 5. Situation en France métropolitaine

Sur les côtes françaises métropolitaines, les espèces *P. australis* et *P. pseudodelicatissima* ont été formellement identifiées comme les principales espèces à l'origine des épisodes de toxicité ASP (Amzil et al., 2001; Nezan et al., 2006). Les premières identifications des espèces de *Pseudo-nitzschia* toxiques ont été mises en évidence en 1999 suite à la détection de l'AD à des concentrations largement au-dessus du seuil de sécurité sanitaire, lors d'une étude de criblage de toxines dans différentes espèces de coquillages le long du littoral (Amzil et al., 2001). Ceci a conduit à la mise en place à partir de l'an 2000, d'une surveillance réglementaire de *Pseudo-*

*nitzschia* et des toxines ASP dans le cadre du REPHY (Réseau de surveillance et d'observation du phytoplancton et des phycotoxines) créé en 1984 par IFREMER. Ce réseau a pour mission de détecter la présence d'espèces potentiellement toxiques en effectuant des prélèvements d'eau réguliers le long des côtes françaises. Au-delà d'un seuil de détection défini, des coquillages sont prélevés pour mesurer la concentration en toxines ( $3.10^5$  cellules/L pour le complexe *delicatissima* et  $10^5$  pour les autres espèces). La configuration générale des développements de *Pseudo-nitzschia* est assez similaire d'une année à l'autre, elle est observée tous les ans sur l'ensemble du littoral français métropolitain, avec des concentrations maximales annuelles importantes, très souvent supérieures à 100 000 cellules par litre.

Au cours des dernières décennies, plusieurs espèces toxiques ont été signalées à plusieurs reprises le long des côtes françaises (Caruana and Amzil, 2018; Husson et al., 2016; Nezan et al., 2006). Parmi celles-ci, *P. australis*, qui est considérée comme étant l'une des espèces les plus toxiques au monde (Thessen et al., 2009; Trainer et al., 2012), a été identifiée pour la première fois en France en 2004 suite à la détection de fortes concentrations d'AD dans les coquilles Saint-Jacques (*Pecten maximus*) (Amzil et al., 2007; Klein et al., 2010; Nezan et al., 2006). Des blooms de *P. australis* ont été depuis régulièrement signalés le long du littoral français (REPHY, 2017). Aucune intoxication ASP associée à des coquillages provenant de zones françaises n'a été rapportée à ce jour.

L'exploitation des données de terrain REPHY a permis de caractériser la dynamique saisonnière et la variabilité interannuelle des blooms de *Pseudo-nitzschia*, associés à la contamination des coquilles Saint-Jacques, dans six zones du littoral de la Manche et de l'Atlantique. Husson et al (2016) ont ainsi montré que l'importance et les caractéristiques des blooms de *Pseudo-nitzschia*, ainsi que la fréquence des épisodes de toxicité associés, varient grandement selon la zone. L'irradiance et la température jouent un rôle majeur sur l'initiation des



blooms de *Pseudo-nitzschia* au printemps. Des événements climatiques à grande échelle (tels que la tempête Xynthia en 2010) pourraient stimuler les espèces toxiques de *Pseudo-nitzschia*.

En effet, suite à cette tempête, des teneurs inhabituelles en AD dans les coquilles Saint-Jacques (*Pecten maximus*) (suite à un bloom de *P. australis*) ont été détectées avec des concentrations ayant largement dépassé les seuils de sécurité ( $445 \text{ mg DA kg}^{-1}$ ) dans plusieurs zones (Pertuis Breton, baie de Concarneau et baie de Quiberon) (Husson et al., 2016; Nézan et al., 2010; Ryckaert et al., 2010). Ceci a provoqué un arrêt de la pêche et de la vente des coquillages pendant plusieurs mois dans les zones affectées. Par la suite, la récurrence de nouvelles proliférations toxiques de *Pseudo-nitzschia* combinée à la lente épuration de l'AD dans les tissus de coquillages Saint-Jacques a prolongé les fermetures de zones de récolte pendant deux ans par exemple dans la baie de Quiberon (Ménèsquen and Lacroix, 2018; Ryckaert et al., 2010).

Sur le plan économique, la production de la coquille Saint-Jacques en France varie en moyenne entre 5000 et 15000 tonnes par an. L'activité de production française de la coquille Saint-Jacques est réalisée principalement dans la baie de Saint Brieuc et en Normandie (Foucher et al., 2010; FranceAgriMer, 2017). La production bretonne seule, en baie de Saint Brieuc, de Morlaix, en rade de Brest, en baie de Concarneau et Quiberon, est estimée entre 8 et 16 M€ (Belin et al., 2013). Les gisements de coquilles Saint-Jacques présents dans la rade de Brest, de Concarneau et Quiberon ont été régulièrement touchés par des contaminations d'AD pendant plusieurs années (2005 à 2012) (Belin et al., 2013). L'impact économique dû à la fermeture de ces gisements durant cette période a été évalué à environ 4 M€ pour Quiberon, et 2 M€ pour Concarneau. La rade de Brest, dont la flottille compte des petits bateaux dépendants de la ressource, a été particulièrement touchée suite à la fermeture de la zone en 2004 (perte de 1 M€ pour chaque saison de fermeture). Il apparaît donc nécessaire de mieux comprendre ces épisodes toxiques de *Pseudo-nitzschia* afin d'en limiter les impacts sur les économies locales et celles de certaines pêcheries.

## **6. Méthodes de détection, surveillance et réglementation**

Dans le contexte de sécurité sanitaire visant à protéger le consommateur, la détection et la quantification de l'acide domoïque produit par *Pseudo-nitzschia* sont indispensables.

La détection de l'acide domoïque peut se faire par :

- i. des méthodes physico-chimiques utilisant la chromatographie liquide couplée à un détecteur ultra-violet UV (CL/UV) ou à spectrométrie de masse en tandem (CL-SM/SM)
- ii. ou par des méthodes biochimiques/biologiques, en particulier la méthode ELISA qui est validée à l'échelle internationale AOAC, comme la méthode CL/UV.

La méthode de surveillance réglementaire européenne pour la détection des toxines amnésiantes (AD et épi-AD) est l'analyse chimique en CL/UV. Il s'agit d'une méthode officielle prévue par le règlement (CE) n° 2074/2005, reconnue au niveau communautaire et en accord avec les autorités européennes. Le seuil de sécurité sanitaire à ne pas dépasser pour que les coquillages soient considérés comme consommables est de 20 mg par kg de chair totale. La directive européenne 2002/226/CE a fixé ce seuil comme teneur maximale autorisée dans les coquillages commercialisés, pour la protection du consommateur (EFSA, 2009).

En matière de recherche, c'est la méthode en CL-SM/SM qui est utilisée pour la détection d'AD dans des extraits d'eau de mer et de coquillages (Wang et al., 2007). En effet, cette technique apporte une identification formelle de l'AD et ses analogues et une meilleure sensibilité (McCarron et al., 2014).

L'étude du premier évènement d'intoxication par l'AD en 1987 a connu ensuite un très vif intérêt, et a entraîné l'intégration de l'AD dans les programmes de surveillances sanitaires. La surveillance et la fermeture temporelle des zones de mollusques contaminés se sont avérées bénéfiques pour la protection de la santé humaine puisqu'aucune intoxication humaine à l'AD n'a été signalée depuis cet incident.

## ***7. Distribution géographique des espèces de Pseudo-nitzschia et conditions environnementales favorables***

La plupart des espèces de *Pseudo-nitzschia* sont cosmopolites (Hasle, 2002) (Figure 6). La répartition sur les cinq continents des espèces de *Pseudo-nitzschia* semble couvrir la quasi-totalité des environnements marins. Leur distribution géographique dépend des conditions favorables à leur croissance. Cette prolifération est souvent influencée par différents facteurs environnementaux, tels que la température (Hansen et al., 2011; Thorel et al., 2014), la photopériode (Fehling et al., 2005), la salinité (Doucette et al., 2008; Thessen et al., 2005), le pH (Lundholm et al., 2004), la disponibilité des macros et micronutriments (azote, phosphore, silicate, fer et cuivre) (Martin-Jézéquel et al., 2015), l'irradiance (Bates, 1998; Cochlan et al., 2008) ou encore la présence de bactéries ou de brouteurs (Hardardóttir et al., 2015; Sobrinho et al., 2017). Parmi ces facteurs environnementaux, certains semblent avoir une influence directe sur la croissance et la production toxinique des espèces de *Pseudo-nitzschia* comme la limitation en lumière, en silice ou en substrats azotés indispensables pour la réalisation de la photosynthèse. Ces derniers étant également à la base de la synthèse de l'AD qui est une toxine azotée (La Barre et al., 2014; Lelong et al., 2012). D'autres facteurs environnementaux comme la température, la salinité et le pH peuvent intervenir dans la régulation métabolique, dont la production d'AD, son accumulation dans la cellule ou sa libération dans le milieu extracellulaire. Toutefois, les conditions favorables à la prolifération de ces diatomées sont généralement réunies au printemps et en automne, lorsque les eaux sont fortement enrichies en nutriments par l'apport des rivières, et lorsque de la durée du jour est allongée favorisant ainsi la photosynthèse (Hasle, 2002).

Au cours des dernières décennies, plusieurs études ont reporté une expansion de la distribution et l'occurrence de blooms toxiques de *Pseudo-nitzschia* à l'échelle mondiale (Husson et al., 2016; Lim, 2012; Louw et al., 2017). La répartition mondiale des espèces de *Pseudo-nitzschia* peut dépendre de la capacité d'acclimatation et de tolérance des espèces de *Pseudo-*

*nitzschia* à différents facteurs biotiques et abiotiques et des changements de l'environnement (Durack and Wijffels, 2010; Skliris et al., 2014).

L'augmentation anthropique des concentrations de gaz à effet de serre dans l'atmosphère devrait avoir des répercussions considérables sur le climat à l'échelle mondiale selon les projections climatiques et hydrologiques basées sur plusieurs scénarios du 5<sup>ème</sup> rapport du groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat (GIEC) connue sous le nom anglo-saxon (IPCC) (IPCC, 2013). Pour les systèmes marins et d'eau douce, les concentrations croissantes de gaz à effet de serre devraient augmenter les températures de surface de l'eau, abaisser le pH et entraîner des modifications dans les régimes de précipitations et d'évaporation ainsi que la stratification des eaux. Les conséquences de telles modifications climatiques peuvent influencer non seulement sur la croissance des HABs, mais également sur leur survie, leur capacité à produire des toxines, ainsi que les types et le nombre d'interactions qu'ils établissent dans le milieu aquatique (IPCC, 2013).

D'après les premiers résultats obtenus dans la littérature, les scientifiques ont montrés que l'augmentation apparente de ces blooms dans le monde résulte probablement du changement climatique et de l'acidification des océans. Des recherches substantielles sont donc nécessaires pour évaluer plus clairement les associations directes et indirectes entre la prolifération des microalgues toxiques et ces changements environnementaux ainsi que leurs impacts sanitaires et environnementaux associés.

Par ailleurs, les données bibliographiques présentent une forte hétérogénéité de réponses de l'organisme *Pseudo-nitzschia* en termes de croissance et de production d'AD en fonction des facteurs biotiques et abiotiques testés. De plus, les liens entre les changements climatiques et les proliférations des blooms toxiques reposent sur des données expérimentales et d'observations limitées et souvent contradictoires.

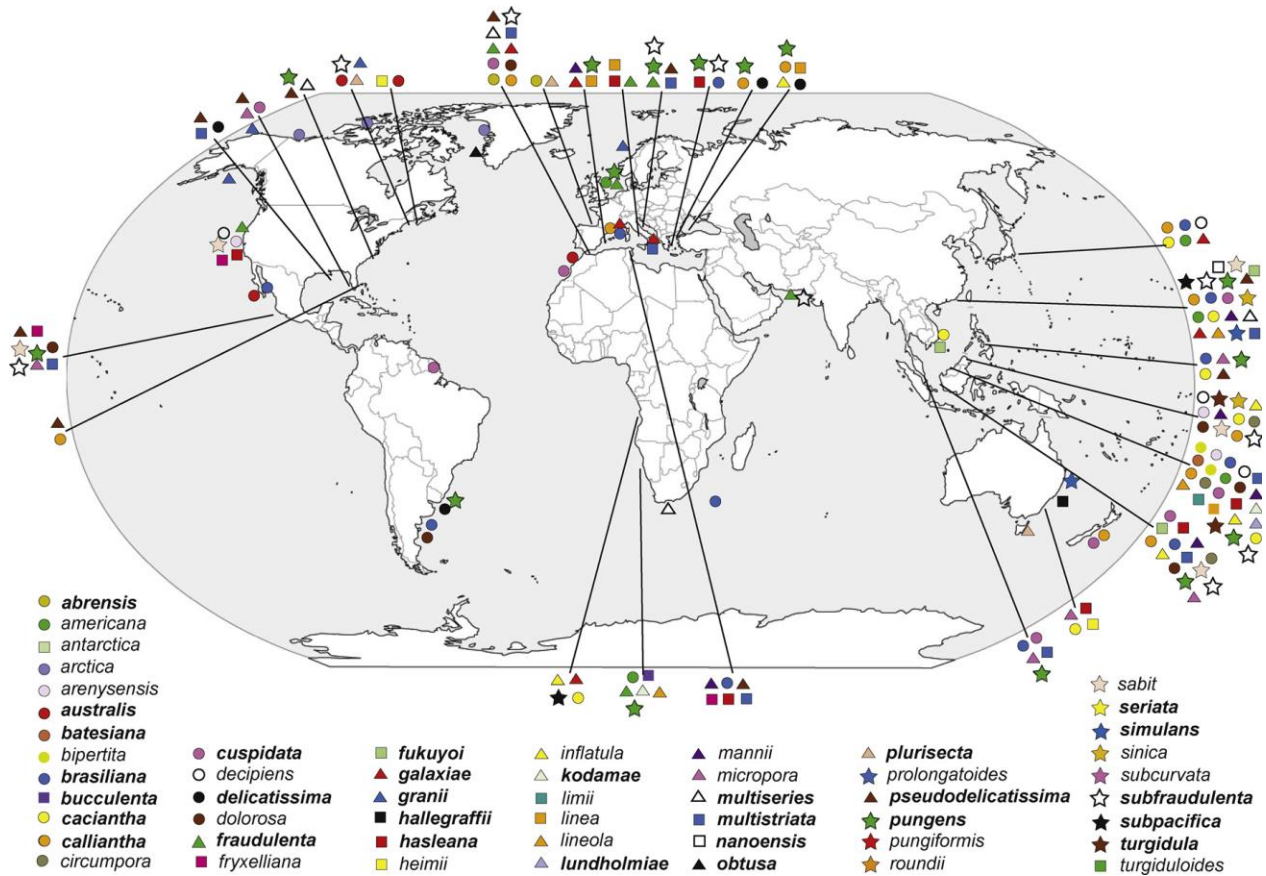


Figure 6: Répartition mondiale des espèces de *Pseudo-nitzschia*. Les espèces toxiques sont renseignées en caractères gras (à savoir que certaines souches de ces espèces sont toxiques dans des zones géographiques précises) (Bates et al., 2018; Trainer et al., 2012).

## 8. Facteurs abiotiques et biotiques affectant la croissance et la production toxinique chez les espèces de *Pseudo-nitzschia*

Cette dernière partie de l'état de l'art présente plusieurs travaux scientifiques portant sur l'étude des facteurs biotiques et abiotiques pouvant avoir une influence sur la prolifération et la toxicité des espèces de *Pseudo-nitzschia*. Les facteurs abiotiques présentés ci-dessous sont les plus sensibles d'être modifiés suite aux changements climatiques prévus dans le siècle à venir (IPCC, 2013).

### 8.1. Température

Le réchauffement climatique concerne l'atmosphère, mais également les océans et les mers. En effet, depuis 1970, la température des eaux de surface ne cesse d'augmenter. Une élévation de la température des eaux de surface des océans de l'ordre de  $0,11 \pm 0,02$  °C par décennie a été observée sur la période 1971 à 2010 (IPCC, 2013). Des proliférations de blooms toxiques de *Pseudo-nitzschia* ont également été signalées avec une fréquence croissante au cours de ces dernières décennies et plusieurs raisons ont été proposées y compris la variation de la température. De nombreuses études expérimentales ont été ensuite menées pour déterminer les gammes de valeurs de températures tolérées par les espèces de *Pseudo-nitzschia* afin de trouver les conditions qui favorisent leur croissance et déclenchent la production d'AD dans le but de prévoir les efflorescences de *Pseudo-nitzschia* toxiques.

Actuellement, plusieurs études bibliographiques ont reporté des résultats contradictoires quant à l'influence de la température sur la croissance et la production d'AD par les espèces toxiques de *Pseudo-nitzschia* (Tableau 2).

Des auteurs ont signalé des différences marquées de production toxinique et de taux de croissance en fonction de l'espèce étudiée, mais également entre les souches isolées dans une même zone géographique. Chaque espèce de *Pseudo-nitzschia* étudiée a présenté son propre optimum de température pour la croissance et la production d'AD en accord avec l'origine de la souche isolée (Bates and Trainer, 2006). Par exemple, chez *P. multiseriata*, les taux de division cellulaire et les teneurs en acide domoïque diminuent avec la température, avec un maximum de croissance cellulaire à 20 °C et de production toxinique à 25 °C (Lewis et al., 1993). À l'inverse, les données collectées dans les eaux danoises indiquent que *P. seriata* et *P. pseudodelicatissima* ont présenté de plus fortes teneurs cellulaires en AD aux faibles températures (2 à 5 °C) qu'aux températures plus élevées (15 et 25 °C) (Lundholm et al., 1997, 1994). De plus, chez *P.*

*multistriata*, de plus fortes productions d'AD ont été reportées dans les conditions de cultures à faibles températures (18 °C) plutôt qu'à forte température (27 °C) (Amato et al., 2010). Une étude récente de Thorel et al. (2014) a montré que la production d'AD par la souche *P. australis* a été stimulée par une augmentation de la température.

De plus, cette large variabilité de réponses entre les différentes espèces de *Pseudo-nitzschia* est potentiellement liée à l'influence de l'interaction de la température avec d'autres facteurs physico-chimiques comme la salinité, l'irradiance et la limitation en nutriments (Si et P) (Doan-Nhu et al., 2008; Santiago-Morales and García-Mendoza, 2011; Thorel et al., 2014).

Cependant, les données relatives au comportement d'autres souches et d'autres espèces ainsi que l'interaction de plusieurs facteurs biotiques et abiotiques sont encore manquantes. Ainsi, les généralisations sur l'influence de la température sur la croissance cellulaire et la production toxinique sur les espèces de *Pseudo-nitzschia* doivent être faites avec prudence.

Tableau 2: Exemples des effets de la variation de la température sur la croissance et la production d'AD par *Pseudo-nitzschia* spp.

Espèces étudiées	Lieu d'isolement	Températures tolérées	Effets observés	Références
<i>P. multiseriis</i>	Canada	5 à 25 °C	- Taux de croissance le plus élevé à 20 °C - Teneur en AD le plus élevé à 25 °C	(Lewis et al., 1993)
<i>P. seriata</i>	Danemark	4 et 15 °C	- Taux de croissance non mesuré - Teneur en AD plus élevé à 4 °C qu'à 15 °C	(Lundholm et al., 1994)
<i>P. pseudo-delicatissima</i>	Danemark	5 à 25 °C	- Taux de croissance maximum à 25 °C - Production d'AD détecté uniquement à 15 et 25 °C	(Lundholm et al., 1997)
<i>P. cuspidata</i>	Vietnam	20, 25 et 30 °C	- Taux de croissance plus élevé à 30 °C (croissance dépendante à la fois de la température et de la salinité) - Teneur en AD non mesuré	(Doan-Nhu et al., 2008)
<i>P. australis</i>	Mexique	12 à 15 °C	- Taux de croissance plus élevé à 12 et 15 °C - Teneur en AD plus élevé à 15 °C (croissance et production d'AD dépendantes à la fois de la température et de la limitation des nutriments)	(Santiago-Morales and García-Mendoza, 2011)
<i>P. australis</i>	France	5 à 21 °C	- Taux de croissance optimale entre 13.5 et 18.6 °C - Teneur AD plus élevé à 15.5 et 18 °C (croissance et production d'AD dépendantes à la fois de la température et de l'irradiance)	(Thorel et al., 2014)



## 8.2. Irradiance

Peu d'études ont été consacrées à l'impact de l'intensité lumineuse sur la physiologie et la production d'acide domoïque chez les espèces de *Pseudo-nitzschia* (Bates et al., 1991; Bill et al., 2012; Cusack et al., 2002; Thorel et al., 2014). Les résultats obtenus lors de cultures en batch et en semi-continu des espèces de *P. multiseriis* et *P. australis* ont montré une augmentation à la fois du taux de division cellulaire et de la teneur cellulaire en AD avec l'accroissement de l'irradiance. Ces résultats ont également montré une forte tolérance à une large gamme d'irradiance allant de 35 à 400  $\mu\text{mol}_{\text{photons}}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  chez la souche de *P. australis* et entre 45 et 145  $\mu\text{mol}_{\text{photons}}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  chez *P. multiseriis* (Bates, 1998; Thorel et al., 2014). Les études de Bates et al. (1991) et Cusack et al. (2002) ont pu mettre en évidence une intensité lumineuse seuil, comprise entre 100 et 200  $\mu\text{mol}_{\text{photons}}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (correspondant à la saturation de la photosynthèse), nécessaire pour éviter une limitation de croissance et de production toxinique chez les cellules de *P. multiseriis* et *P. australis*.

De plus, une étude récente de Thorel et al. (2014) a démontré que l'augmentation de l'intensité lumineuse à des valeurs supérieures à 100  $\mu\text{mol}_{\text{photons}}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  induit une diminution du taux de croissance de la souche *P. australis* française et provoque par la suite une photo-inhibition des cellules due à l'excès d'énergie lumineuse. Cependant, l'augmentation de l'intensité lumineuse au-delà de ce seuil d'irradiance a permis la stimulation de la production d'AD chez la souche étudiée (18 fois plus d'AD à 400 qu'à 35  $\mu\text{mol}_{\text{photons}}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Néanmoins, Bill et al. (2012), ont montré que le taux de croissance le plus élevé pour la souche *P. australis* isolée en Californie était obtenu à une irradiance de 334  $\mu\text{mol}_{\text{photons}}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (la production d'AD n'ayant pas été analysée dans cette étude).

Dans l'ensemble de ces études, la production d'AD semble être stimulée par une forte irradiance. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'énergie lumineuse est un des substrats

principaux du processus de la photosynthèse et par extension, de la production de carbone organique et de l'absorption d'azote nécessaire à la production toxinique (Bates, 1998; Pan et al., 1998). Ceci a d'ailleurs été montré lors de l'ajout d'un inhibiteur de photosynthèse ayant provoqué l'arrêt de la production d'AD chez une souche de *P. multiseriis* (Bates et al., 1991). Cependant, ces résultats confirment également la grande capacité d'acclimatation des espèces de *Pseudo-nitzschia* à la variabilité de l'intensité lumineuse et soulignent à nouveau la nécessité d'une meilleure compréhension de la variabilité inter et intra-spécifique chez ces espèces, surtout en ce qui concerne leur capacité à produire de l'AD.

Tableau 3: Exemples des effets de la variation de l'irradiance sur la croissance et la production d'AD par *Pseudo-nitzschia* spp.

Espèces	Lieu d'isolement	Irradiance tolérée ( $\mu\text{mol}_{\text{photons}}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )	Effets observés	Références
<i>P. multiseriis</i>	Ile de Prince Edward (Canada)	45 et 145	- Taux de croissance plus faible à 145 qu'à 45 $\mu\text{mol}_{\text{photons}}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ - Teneur en AD total 2 fois plus élevé à 145 qu'à 45 $\mu\text{mol}_{\text{photons}}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	(Bates et al., 1991)
<i>P. australis</i>	Irlande	12 et 115	- Pas d'effet sur les taux de croissance - Teneur en AD intracellulaire 130 fois plus élevé à 115 qu'à 12 $\mu\text{mol}_{\text{photons}}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	(Cusack et al., 2002)
<i>P. granii</i>	Nord-est du Pacifique subarctique	20 à 150	- Taux de croissance augmente avec l'augmentation de l'irradiance - Teneur en AD non mesurée	(El Sabaawi and Harrison, 2006)
<i>P. australis</i> , <i>P. turgidula</i>	Californie (USA) Subarctique (nord-est de l'océan Pacifique)	0 à 800	- Taux de croissance le plus élevé à 334 $\mu\text{mol}_{\text{photons}}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ pour les 2 espèces -Teneur en AD non mesurée	(Bill et al., 2012)
<i>P. australis</i>	Baie de Seine (France)	35 à 400	- Taux de croissance optimal à 100 $\mu\text{mol}_{\text{photons}}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ - Teneur en AD intracellulaire la plus élevée à 400 $\mu\text{mol}_{\text{photons}}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (production dépendante à la fois de la T° et de l'irradiance)	(Thorel et al., 2014)

### 8.3. Salinité

La plupart des espèces de *Pseudo-nitzschia* sont euryhalines, c'est-à-dire capables de se développer dans des zones exposées à des changements importants et durables de salinités (Bates, 1998; Jackson et al., 1992; Lundholm et al., 1997; Thessen et al., 2005). Ces dernières décennies, ces espèces se sont largement distribuées dans la plupart des systèmes océaniques, côtiers et estuariens du monde, y compris dans les eaux arctiques et antarctiques, et semblent être tolérantes à une large gamme de salinité comprise entre 6 et 48 ‰ (Almandoz et al., 2008; Hansen et al., 2011; Jackson et al., 1992; Thessen et al., 2005).

Selon les projections basées sur les scénarios de changement climatique, la variation de la salinité de l'eau de mer pourrait s'accroître dans les prochaines décennies (IPCC, 2007). Les fluctuations de salinité sont principalement liées aux changements dans les régimes de précipitations, les fréquences des tempêtes et des marées, la fonte des glaciers, le débit de ruissellement, les changements de direction du vent et l'évaporation (IPCC, 2013; Jewett and Romanou, 2017). Les conséquences de tels changements sur la salinité de l'eau peuvent avoir un impact sur la fréquence, l'intensité et la durée des proliférations des espèces de *Pseudo-nitzschia* et sur leur capacité à produire des toxines (Hallegraeff, 2010; Van Meerssche and Pinckney, 2017; Wells et al., 2015).

Peu d'études ont porté sur l'effet de la variation de la salinité sur la prolifération et la production d'AD par les espèces de *Pseudo-nitzschia* (Doucette et al., 2008; Lundholm et al., 1997; Pednekar et al., 2018; Thessen et al., 2005; Van Meerssche and Pinckney, 2017). Les quelques études de laboratoire et de terrain à ce sujet ont montré que la croissance de *Pseudo-nitzschia*, sa présence saisonnière et ses teneurs en AD (particulaires et dissoutes) sont fortement corrélées aux fluctuations de la salinité (Doucette et al., 2008; Downes-Tettmar et al., 2013; Lundholm et al., 1997; Pednekar et al., 2018; Quijano-Scheggia et al., 2008; Thessen et al., 2005;

Van Meerssche and Pinckney, 2017). De plus, ce facteur varie très rapidement en fonction du cycle de marée et du cycle hydrologique en zones côtières et estuariennes où la majorité des fermes conchylicoles et aquacoles sont présentes.

Une étude en laboratoire portant sur une souche *P. multiseriis* acclimatée à une salinité 20 a montré que cette dernière était capable de maintenir des taux de croissance élevés, mais associés à des concentrations plus faibles d'AD en comparaison avec les cultures acclimatées à salinités 30 et 40 (Doucette et al., 2008). De même, les observations de terrains où cette espèce a été isolée étaient en concordance avec l'étude en laboratoire de Doucette et al. (2008) où aucun évènement d'ASP ne fut enregistré dans cette zone estuarienne à faible salinité (Louisiane, USA) (Thessen et al., 2005).

Une étude récente de Pednekar et al. (2018) a montré que les taux de croissance les plus élevés chez *P. pungens* ont été obtenus pour des salinités de 15 à 25, et que des plus faibles ou plus fortes salinités ont entraîné une réduction du taux de croissance. Cette gamme de salinité correspond également à celle observée dans la zone où cette espèce fut isolée et est couramment présente dans les estuaires de Zuari et de Mandovi, dans l'ouest de l'Inde (Pednekar et al., 2018). En ce qui concerne la production de toxines, les auteurs ont également constaté que le taux de production d'AD augmentait avec la salinité, avec une concentration maximale observée à salinité 35. De même, les populations de *P. brasiliiana* et les concentrations totales d'AD mesurées dans la lagune de Bizerte (Tunisie) ont été fortement influencées par la salinité (Sahraoui et al., 2012). Cette espèce toxique est devenue dominante à l'automne dans les eaux à forte salinité associées à un apport élevé en nutriments. Cependant, l'abondance de *P. multistriata*, dans la même lagune, était négativement corrélée avec la salinité et était positivement liée à d'autres variables environnementales telles que la température et la turbidité (Sahraoui et al., 2012). Par conséquent, l'effet de différents facteurs environnementaux sur l'abondance et la production de toxines différait d'une espèce à l'autre.

Par ailleurs, la salinité est un facteur qui peut agir sur l'activité enzymatique des microalgues en modifiant le pH, et sur la consommation énergétique allouée à la régulation osmotique. Au cours de la croissance cellulaire dans des conditions de forte salinité, les diatomées peuvent établir des mécanismes d'adaptation cellulaire afin de compenser la pression osmotique (Schobert, 1974). L'équilibre osmotique peut être atteint par des mécanismes d'accumulation d'ions ou par la synthèse et l'accumulation d'osmolytes, qui sont des solutés organiques à faible poids moléculaire (Liu and Hellebust, 1976; Masmoudi et al., 2013; Schobert, 1977). Chez les diatomées, les osmolytes sont généralement des acides aminés tels que la proline, la lysine, la taurine, l'alanine, l'arginine, l'acide glutamique et l'acide aspartique (Fujii et al., 1995). L'étude de Jackson et al. (1992) a signalé une augmentation de la production d'acide glutamique et de taurine chez *Pseudo-nitzschia pungens* et *P. multiseriis* suite à une augmentation de la salinité. Bates (1998) a suggéré que l'AD pourrait agir comme un osmolyte en réponse à l'augmentation de la salinité, étant donné que la structure de l'AD est très similaire à celle des osmolytes dans les diatomées, comme l'acide glutamique et l'acide aspartique (Lefebvre and Robertson, 2010). De plus, Doucette et al. (2008), Van Meerssche et Pinckney (2017) et Pednekar et al. (2018) ont montré une augmentation de la production d'AD avec l'augmentation des niveaux de salinité, renforçant l'hypothèse de Bates (1998).

De même, plusieurs scientifiques ont suggéré que la synthèse d'une molécule d'AD à faible niveau de salinité, nécessiterait une forte consommation d'énergie et que les cellules de *Pseudo-nitzschia* favoriseraient l'utilisation d'énergie générée par la photosynthèse pour soutenir la croissance et maintenir l'équilibre osmotique plutôt que pour synthétiser de l'AD (Bates, 1998; Doucette et al., 2008; Lelong et al., 2012; Thessen et al., 2005).

Enfin, l'ensemble de ces études concernent généralement une seule souche comme représentant de l'espèce étudiée. Étant donné la grande variabilité intra-spécifique qui caractérise le genre *Pseudo-nitzschia*, il apparaît nécessaire de tester de nombreuses espèces et souches afin

de mieux comprendre l'impact de ce facteur sur les cellules de *Pseudo-nitzschia* et le rôle de l'AD dans la cellule. Aussi, l'étude de l'interaction du facteur de salinité avec d'autres facteurs environnementaux susceptibles d'influencer la croissance et la toxicité de ces espèces est indispensable afin d'apporter des éléments de réponses sur le déterminisme des efflorescences de *Pseudo-nitzschia* dans une zone géographique donnée.

Tableau 4: Exemples des effets de la variation de la salinité sur la croissance et la production d'AD par *Pseudo-nitzschia* spp.

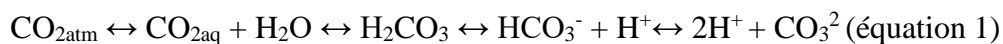
Espèces	Lieu d'isolement	Salinité tolérée (‰)	Effets observés	Références
<i>P. multiseriis</i> <i>P. pungens</i>	Pomquet, (Canada)	6 à 48	- <i>P. multiseriis</i> : taux de croissance optimal entre 30 et 45 ‰ - <i>P. pungens</i> : taux de croissance optimal entre 30 et 45 ‰ - Teneur en AD non mesurée	(Jackson et al., 1992)
<i>P. pseudo-delicatissima</i>	Limfjord (Danemark)	15 à 35	- Taux de croissance plus élevé à 25 ‰ - Production d'AD dépendante à la fois de la T° et de la salinité	(Lundholm et al., 1997)
<i>P. pungens</i> <i>P. multiseriis</i>	Gimhae (Corée du Sud)	10 à 50	- Taux de croissance plus élevés à 30 et 40 ‰ - Teneur en AD non mesurée	(Cho et al., 2001)
<i>P. delicatissima</i> <i>P. pseudodelicatissima</i> <i>P. multiseriis</i>	Louisiane–Texas (USA)	6.25 à 45	- Populations plus abondantes dans la gamme de salinité de 10 à 20 ‰ - Teneur en AD non mesuré	(Thessen et al., 2005)
<i>P. multiseriis</i>	Bai de Monterey (Californie, USA)	10, 20, 30 et 40	- Taux de croissance plus élevés à 30 et 40 ‰ - Teneur en AD total 3 à 7 fois plus élevée à 30 et 40 ‰ qu'à 10 et 20 ‰	(Doucette et al., 2008)
<i>Pseudo-nitzschia</i> spp.	Caroline du Sud (USA)	15 à 37	- Abondance plus élevée avec l'augmentation de la salinité - Diminution de l'AD dissous avec l'augmentation de la salinité	(Van Meerssche and Pinckney, 2017)
<i>P. pungens</i>	Estuaires de Mandovi et Zuari (Inde)	5 à 35	- Taux de croissance plus élevé compris entre 15 et 25 ‰ - Teneur en AD augmente avec l'augmentation de la salinité (max à 35 ‰)	(Pednekar et al., 2018)



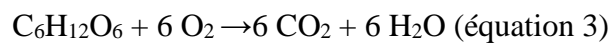
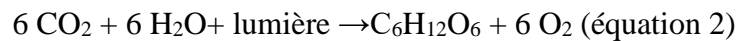
#### 8.4. pH et acquisition du carbone inorganique

Depuis le début de l'ère industrielle, la concentration du dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) dans l'atmosphère est passée de 280 parties par million (ppm) à 384 ppm en 2007 (Beardall et al., 2009). Les estimations du Groupe d'experts Intergouvernemental sur l'Evolution du Climat (GIEC/IPCC) basées sur les scénarios d'émissions de gaz à effet de serre et les modèles de circulation des courants atmosphériques et océaniques, suggèrent qu'à la fin du siècle le niveau de CO<sub>2</sub> atmosphérique (CO<sub>2atm</sub>) pourrait dépasser 880 ppm (IPCC, 2013). Cette augmentation rapide est essentiellement due à la combustion des ressources de carbones fossiles (charbon, pétrole ou gaz) et à la déforestation. L'océan permet de capter près d'un tiers des émissions de CO<sub>2</sub> d'origine anthropique (Le Quéré et al., 2013). Le pH océanique actuel est approximativement inférieur de 0,1 unité aux valeurs préindustrielles, il est passé de 8.21 à 8.1 et pourrait diminuer encore de 0.3 à 0.4 unités d'ici la fin du siècle si le CO<sub>2atm</sub> atteint 880 ppm en 2100 (IPCC, 2013; Schnoor, 2014).

La dissolution du CO<sub>2atm</sub> dans l'eau de mer forme du CO<sub>2</sub> dissous (CO<sub>2aq</sub>) qui réagit avec des molécules d'eau pour former de l'acide carbonique (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) instable, se dissociant par la suite en ions carbonates (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) et bicarbonates (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>). L'étape de dissociation du H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> entraîne la libération de protons, responsable de l'acidification des océans et qui entraîne un changement de l'équilibre des carbonates (équation 1) (Andersson et al., 2007; Hartin et al., 2016; Morse et al., 2006). Cette acidification pourrait avoir un impact significatif sur la physiologie, la prolifération et la distribution des espèces phytoplanctoniques dans les systèmes marins.



Lors de la photosynthèse, les organismes phytoplanctoniques fixent le  $\text{CO}_{2\text{aq}}$  pour produire leur propre matière organique et pour respirer. L'accumulation du  $\text{CO}_{2\text{atm}}$  devrait donc en théorie favoriser la photosynthèse et augmenter la production des écosystèmes marins. La réduction du  $\text{CO}_{2\text{aq}}$  requiert l'hydrogène de l'eau dont l'oxygène est libéré sous forme de dioxygène (équation 2). La respiration à partir de l' $\text{O}_2$  permet la transformation de la matière organique en  $\text{CO}_2$  (équation 3).



L'absorption du  $\text{CO}_{2\text{aq}}$  par de fortes densités de phytoplancton peut donc entraîner une augmentation du pH. Une activité photosynthétique intense peut aboutir à des valeurs de pH aussi élevées que 9 dans les environnements marins ouverts (Hinga, 2002) et même jusqu'à 10 dans les lagunes et les fjords côtiers (Hansen, 2002). De plus, les projections sur l'évolution du climat apportées par le GIEC indiquent que le carbone inorganique dissous (CID) des eaux de surface composé d'acide carbonique et des ions carbonates et bicarbonates pourrait probablement augmenter de plus de 12%, entraînant une diminution du pH de l'ordre de 0.4 unité. Cependant, la part des ions carbonates devrait diminuer de près de 60% (IPCC, 2013).

La diminution du pH des océans, causée par l'augmentation de l'absorption du  $\text{CO}_{2\text{atm}}$  ou l'augmentation du pH dû à la fixation du  $\text{CO}_{2\text{aq}}$  par les microorganismes lors de la photosynthèse, pourrait avoir une influence directe sur la physiologie des espèces de *Pseudo-nitzschia*, et leurs capacités d'adaptation face à ces changements (Hallegraeff, 2010; Moore et al., 2008; Wells et al., 2015).

Des études précédentes ont pu montrer que l'augmentation du pH de l'eau de mer inhibait la croissance et induisait la production d'AD par les souches de *P. multiseries* testées (Lundholm

et al., 2004; Trimborn et al., 2008). Cependant, une tendance inverse au niveau de la production toxinique a été observée dans l'étude de Sun et al. (2011), où la baisse des valeurs de pH (pH 8.4 à 8) a favorisé la croissance et la production de forte teneur en AD chez la même espèce de *P. multiseriis*. Contrairement aux études précédentes, une étude antérieure de Cho et al. (2001), n'a montré aucun effet significatif du changement du pH sur les taux de croissance de *P. multiseriis* et *P. pungens* cultivées à pH 5-9.

Ces résultats contradictoires pourraient être dus à la variabilité intra-spécifique entre les différentes souches de *P. multiseriis* testées, à l'état physiologique des cellules (âge, taille et biovolume cellulaire) ou même aux différents protocoles expérimentaux utilisés (cultures en batch et semi-continu, durée de l'acclimatation).

L'impact du changement de pH sur les mécanismes physiologiques des cellules *Pseudo-nitzschia* n'est pas bien connu. Cependant, plusieurs études ont proposé des hypothèses indiquant que les changements de pH intracellulaire pouvaient être impliqués dans la stimulation ou l'inhibition de la production toxinique chez ces espèces. Les auteurs ont suggéré que l'augmentation du pH de l'eau peut influencer les processus impliqués dans le maintien du pH intracellulaire (Pucéat, 1999; Smith and Raven, 1979). Les processus enzymatiques dans les cellules ont des pH optima différents et, par conséquent, un changement du pH intracellulaire peut affecter le fonctionnement des processus métaboliques tels que ceux impliqués dans la biosynthèse de l'AD (Taraldsvik and Myklestad, 2000).

De plus, le changement de pH peut également affecter la biodisponibilité des métaux lourds (Fe, Zn et Cu) indispensables pour les processus biochimiques chez les espèces de *Pseudo-nitzschia* (Maldonado et al., 2002). Plusieurs études ont démontré que l'AD pourrait probablement avoir un rôle chélateur impliqué dans l'acquisition et l'absorption des métaux lourds (Rue and Bruland, 2001; Wells et al., 2005).

Par conséquent, une baisse ou une augmentation du pH des eaux de surfaces pourraient avoir des conséquences sur la capacité des espèces de *Pseudo-nitzschia* à synthétiser de l'AD et ainsi influencer la distribution et la compétition de ces espèces avec d'autres organismes marins (Lelong et al., 2012; Lundholm et al., 2004).

Tableau 5: Exemples des effets de la variation du pH sur la croissance et la production d'AD par *Pseudo-nitzschia* spp.

Espèces	Lieu d'isolement	pH testés	Effets observés	Références
<i>P. multiseriis</i> <i>P. pungens</i>	Gimhae (Corée du Sud)	5 à 9	- Pas d'effet sur les taux de croissance - Teneur en AD non mesurée	(Cho et al., 2001)
<i>P. multiseriis</i> (2 souches)	Baie de Fundy (Canada) Baie d'Okkiray (Japon)	8 à 9	- pH > 8.6 inhibe la croissance des 2 souches - pH > 8.6 stimule la production d'AD	(Lundholm et al., 2004)
<i>P. multiseriis</i>	Baie d'Okkiray (Japon)	7.9, 8.4 et 8.9	- Taux de croissance non mesuré - Teneur en AD 33 et 73 fois plus élevées à pH 8.9 qu'à pH 8.4 et 7.9 respectivement	(Trimborn et al., 2008)
<i>P. multiseriis</i>	Est du Canada	8, 8.2 et 8.4	- Taux de croissance non mesuré - Teneur en AD 5 fois plus élevé à pH 8 qu'à pH 8.4	(Sun et al., 2011)

## 8.5. Bactéries

Les bactéries et le phytoplancton vivent en symbiose. En effet, les bactéries dépendent du phytoplancton photosynthétique pour acquérir le carbone organique nécessaire à leur croissance et le phytoplancton est dépendant des bactéries pour la conversion de la matière organique en substituant inorganiques nécessaires à sa croissance (Worden et al., 2015). En effet, les bactéries peuvent produire des cofacteurs, des micronutriments, des macronutriments, des protéines et des molécules de signalisation qui peuvent affecter directement la synthèse de l'AD (Amin et al., 2012; Behringer et al., 2018). Les interactions entre les bactéries et les phytoplanctons pourraient avoir une importance capitale dans la dynamique des populations algales et dans le fonctionnement des écosystèmes aquatiques, mais leur rôle est encore très largement méconnu à ce jour (Seymour et al., 2017).

Plusieurs études ont montré que les bactéries pourraient affecter la croissance et la production toxinique chez les espèces de *Pseudo-nitzschia* (Bates et al., 2004, 1995; Douglas and Bates, 1992; Kobayashi et al., 2009; Lelong et al., 2014; Osada and Stewart, 1997; Stewart, 2008). Les travaux effectués avec différentes souches de *P. multiseriis* ont démontré que les cultures axéniques ont pu conserver leur capacité à produire de l'AD, mais avec des quantités beaucoup moins importantes que pour des cultures non-axéniques (Bates et al., 1995; Douglas and Bates, 1992; Osada and Stewart, 1997). De plus, la réintroduction de souches bactériennes isolées à partir d'une culture toxique de *P. multiseriis* dans les cultures axéniques a permis d'augmenter la production d'AD d'un facteur 3 à 95 par rapport aux cultures axéniques (Bates et al., 1995; Douglas and Bates, 1992). L'introduction de bactéries isolées d'une culture non toxique de la diatomée *Chaetoceros* sp. a également pu stimuler la production d'AD chez les souches de *P. multiseriis* étudiées (115 fois plus d'AD dans les cultures non-axéniques que dans les cultures axéniques) (Bates et al., 1995). Ainsi, l'impact des bactéries sur la culture de *P. multiseriis* ne semble pas obligatoirement associé à une interaction spécifique *Pseudo-*

*nitzschia*/bactérie. L'étude de Douglas & Bates (1992) a également montré que les cultures non-axéniques de *P. multiseriis* étaient capables de produire 20 fois plus d'AD que les cultures axéniques. Toutefois, la présence ou l'absence de bactéries n'a pas montré d'effet sur les taux de croissance et de division cellulaire. De même, ces auteurs n'ont trouvé aucune preuve que les bactéries isolées à partir de ces souches non-axéniques de *P. multiseriis* et cultivées en laboratoire soient capables de produire de l'AD (Bates et al., 2004).

Les travaux de Lelong et al. (2014) ont également montré une augmentation de la production d'AD par la souche axénique de *P. multiseriis* toxique après réintroduction de communautés bactériennes isolées d'une souche non toxique de *P. delicatissima* (17 fois plus d'AD que dans les cultures non-axéniques de *P. multiseriis* cultivées avec leur propre communauté bactérienne). En outre, la croissance, la teneur en chlorophylle *a* et la capacité photosynthétique des cellules de *P. multiseriis* ont été négativement affectées (Lelong et al., 2014). Cependant, indépendamment de la communauté bactérienne associée, il a été confirmé que la souche non toxique de *P. delicatissima* ne produisait pas d'AD (Lelong et al., 2014).

Les travaux d'Osada et Stewart et al. (1997) et Stewart et al. (1997) ont démontré que les bactéries isolées d'une culture non-axénique de *P. multiseriis* (*Moraxella* et *Alteromonas* sp) étaient capables de produire de l'acide gluconique et du gluconolactone à partir du glucose fourni par les cellules de *P. multiseriis*. Ainsi, l'ajout de ces deux composés dans les cultures axéniques de *P. multiseriis* a permis de doubler la production d'AD par rapport aux autres cultures non-axéniques (Osada and Stewart, 1997; Stewart, 2008).

Les interactions entre les bactéries et les diatomées ne sont donc pas clairement comprises et leurs impacts sur la croissance et la production d'AD restent encore complexes. Celles-ci incluent par exemple la compétition des bactéries pour la matière organique disponible et la

production de substrats extracellulaires par les cellules de *Pseudo-nitzschia* qui peuvent inhiber ou stimuler la croissance des bactéries et vice versa (Seymour et al., 2017).



Tableau 6: Exemples des effets de la présence des bactéries sur la croissance et la production d'AD par *Pseudo-nitzschia* spp.

Espèces	Lieu d'isolement	Cultures axéniques ou non-axéniques	Effets observés	Références
<i>P. multiseriis</i>	Galveston (Texas)	Axénique	- Pas d'effet sur le taux de croissance - Culture axénique capable de produire de l'AD	(Douglas and Bates, 1992)
<i>P. multiseriis</i> (5 souches)	Île-du-Prince-Édouard (Canada)	Axénique	- Pas d'effet sur le taux de croissance - Teneur en AD 8 à 38 fois moins élevée que les cultures non-axéniques (variabilité selon les souches de <i>P. multiseriis</i> )	(Bates et al., 1995)
<i>P. multiseriis</i> (5 souches)		+ Bactéries associées à <i>P. multiseriis</i> toxiques	- Pas d'effet sur le taux de croissance - Teneur en AD 3 à 95 fois plus élevée que les cultures axéniques (variabilité selon les souches de <i>P. multiseriis</i> et les bactéries testées)	
<i>P. multiseriis</i> (2 souches)		+ Bactéries associées à <i>Chaetoceros</i> non toxique	- Pas d'effet sur le taux de croissance - Teneur en AD 2 à 115 fois plus élevée que les cultures axéniques (variabilité selon les souches de <i>P. multiseriis</i> testées)	
<i>P. multiseriis</i>	Île-du-Prince-Édouard (Canada)	Axénique	- Taux de croissance plus élevé que les cultures non-axéniques - Teneur en AD 5 fois moins élevée que celle de la culture non-axénique	(Osada and Stewart, 1997)
		+ acide gluconique / gluconolactone produits par des bactéries	- Pas d'effet sur le taux de croissance - Teneur en AD 2 fois plus élevée que celle de la culture non-axénique	

<i>P. multiseriis</i>	Île-du-Prince-Édouard (Canada)	+ Bactéries associées à <i>P. multiseriis</i> toxique	- Culture bactérienne incapable de produire de l'AD toute seule	(Bates et al., 2004)
<i>P. multiseriis</i>	Baie d'Ofunato (Japon)	Axénique	- Pas d'effet sur la croissance cellulaire - Pas de production d'AD dans les cultures axéniques - Réintroduction des bactéries associées rétablit la production d'AD	(Kobayashi et al., 2009)
<i>P. multiseriis</i>	Baie de Fundy (Canada)	+ Bactéries associées à <i>P. delicatissima</i> non toxique	- Arrêt de croissance après ajout de bactéries - Teneur en AD 17 fois plus élevée par rapport aux cultures non-axéniques	(Lelong et al., 2014)
<i>P. delicatissima</i>	Bretagne (France)	+ Bactéries associées à <i>P. multiseriis</i> toxique	- Pas d'effet sur la croissance par rapport aux cultures axéniques - Pas de production d'AD	

## 9. Objectifs de la thèse

Dans l'ensemble, quel que soit le facteur présenté dans la littérature, une variabilité importante de la réponse physiologique de la diatomée *Pseudo-nitzschia* a été observée selon :

- les espèces
- les souches d'une même espèce
- l'état physiologique de la cellule (taille, âge)
- la zone géographique d'isolement

En raison de cette importante variabilité, il apparaît nécessaire d'étudier d'autres espèces et d'autres souches, afin d'avoir une réponse plus complète de l'effet d'un facteur sur la physiologie de l'espèce.

Parmi les différents facteurs environnementaux qui pourront être significativement affectés par de futurs changements climatiques, la salinité et le pH ont été retenus afin d'étudier leurs influences sur la physiologie et la toxicité des cellules de *Pseudo-nitzschia*. Le choix s'est porté sur ces deux facteurs puisque très peu d'études ont été menées jusqu'à présent sur ce sujet.

L'acide domoïque n'étant probablement pas nécessaire à la croissance cellulaire puisqu'il n'est pas considéré comme un métabolite primaire (Bates, 1998), il est nécessaire de mettre en évidence son rôle dans le métabolisme cellulaire et de comprendre les conditions permettant de stimuler ou limiter sa production.

Cette étude vise donc à répondre aux questions suivantes :

- 1- La diatomée *Pseudo-nitzschia* est-elle capable de supporter efficacement un changement de salinité (gradient hypo- et hypersalin), représentatif des futurs scénarios lié au changement climatique, aussi bien lors d'une modification brutale en mode de stress instantané ou lente de façon à permettre une acclimatation ?

- 2- Cette diatomée est-elle également capable de s'acclimater à des variations du pH de l'eau de mer représentatives des futurs niveaux plausibles ?
- 3- Quelle sera la réponse physiologique des cellules de *Pseudo-nitzschia* du point de vue de la survie, la croissance, le volume cellulaire, l'activité photosynthétique et la production toxinique, suite à la variation de ces facteurs environnementaux ?
- 4- Existe-il une variabilité inter et intra-spécifique dans les réponses aux variations des facteurs abiotiques étudiés ?
- 5- A partir des expérimentations effectuées, est-il possible de caractériser le rôle physiologique de l'AD dans les cellules de *Pseudo-nitzschia* ?



Diatomeen  
Kreispräparat  
mit 83 Formen  
E. Raap Sangerhausen

# Chapitre II : Influence d'un choc de salinité sur la physiologie et la production d'acide domoïque par deux souches de *Pseudo-nitzschia australis*

**Résumé :** Plusieurs pays côtiers, dont la France, ont connu des problèmes graves et croissants liés aux proliférations de blooms toxiques de *Pseudo-nitzschia*. Ces proliférations toxiques se produisent dans les eaux estuariennes et côtières potentiellement sujettes aux fluctuations de la salinité. Dans cette étude, nous documentons pour la première fois la viabilité, la croissance, l'efficacité photosynthétique et la production de toxines de deux souches de *Pseudo-nitzschia australis* cultivées dans des conditions de changements soudains de salinité. Suite à la variation de la salinité, les deux souches ont survécu dans une gamme restreinte de salinité allant de 30 à 35, avec des réponses physiologiques favorables, où la croissance, l'efficacité photosynthétique et la teneur en toxines étaient élevées par rapport aux autres conditions. De plus, des teneurs élevées en acide domoïque (AD) intracellulaire ont été observées à salinité 40 pour la souche IFR-PAU-16.1 en comparaison avec la deuxième souche IFR-PAU-16.2 pour laquelle tout le contenu toxique a été directement libéré dans le milieu. En revanche, le stress osmotique imposé par les salinités inférieures 20 et 10 a entraîné une lyse cellulaire et une libération directe de l'AD dans le milieu extracellulaire pour les deux souches étudiées. Une variabilité intra-spécifique a été observée sur la croissance et la production de toxines, avec notamment la souche IFR-PAU-16.1 qui a pu résister à des salinités plus élevées que la souche IFR-PAU-16.2. Dans l'ensemble, l'AD ne semble pas agir comme un osmolyte en réponse à des changements brusques de salinité. Étant donné que la plupart des zones de pêches et de récoltes de mollusques bivalves en France se situent dans des zones où la salinité varie généralement entre 30 et 35, les proliférations de *Pseudo-nitzschia australis* pourraient avoir un impact sur la santé publique et l'économie locale.

**INFLUENCE OF SUDDEN SALINITY VARIATION ON THE  
PHYSIOLOGY AND DOMOIC ACID PRODUCTION BY TWO  
STRAINS OF *PSEUDO-NITZSCHIA AUSTRALIS***

Ayache Nour, Hervé Fabienne, Martin-Jézéquel Véronique, Amzil Zouher, Caruana Amandine  
M. N

Corresponding author: Ayache Nour, [nour.ayache@ifremer.fr](mailto:nour.ayache@ifremer.fr) ; Tel : +33 (0)2 40 37 40 00 ; Fax :  
+33 (0)2 40 37 42 41

Ayache Nour, IFREMER, Phycotoxins Laboratory, rue de l'Île d'Yeu, BP 21105, 44311 Nantes,  
France

Hervé Fabienne, IFREMER, Phycotoxins Laboratory, rue de l'Île d'Yeu, BP 21105, 44311  
Nantes, France

Martin-Jézéquel Véronique, CNRS UMR 7266, LIENSs, La Rochelle University, 2 rue Olympe  
de Gouges, 17000 La Rochelle, France

Amzil Zouher, IFREMER, Phycotoxins Laboratory, rue de l'Île d'Yeu, BP 21105, 44311 Nantes,  
France

Caruana Amandine M. N, IFREMER, Phycotoxins Laboratory, rue de l'Île d'Yeu, BP 21105,  
44311 Nantes, France

## ***1. Abstract***

Several coastal countries including France have experienced serious and increasing problems related to *Pseudo-nitzschia* toxic blooms. These toxic blooms occur in estuarine and coastal waters potentially subject to fluctuations in salinity. In this study, we document for the first time the viability, growth, photosynthetic efficiency and toxin production of two strains of *Pseudo-nitzschia australis* grown under conditions with sudden salinity changes. Following salinity variation, the two strains survived over a restricted salinity range of 30 to 35, with favorable physiological responses, as the growth, effective quantum yield and toxin content were high compared to other conditions. In addition, high cellular quotas of domoic acid (DA) were observed at salinity 40 for the strain IFR-PAU-16.1 in comparison with the other strain IFR-PAU-16.2 where the cell DA content was directly released into the medium. On the other hand, the osmotic stress imposed at lower salinities, 20 and 10, resulted in cell lysis and a sudden DA leakage in the medium. Intra-specific variability was observed in growth and toxin production, with the strain IFR-PAU-16.1 apparently able to withstand higher salinities than the strain IFR-PAU-16.2. On the whole, DA does not appear to act as an osmolyte in response to sudden salinity changes. Since most of the shellfish harvesting areas of bivalve molluscs in France are located in areas where the salinity generally varies between 30 and 35, *Pseudo-nitzschia australis* blooms might potentially impact public health and commercial shellfish resources in these places.

**Key words:** Amnesic shellfish poisoning, domoic acid, harmful algae, *Pseudo-nitzschia australis*, salinity stress.



## **Abbreviation**

ANOVA, analysis of variance

API 4000 Trap, triple quadrupole mass spectrometer

ASP, amnesic shellfish poisoning

DA, domoic acid

dDA, dissolved domoic acid

$F_v/F_m$ , effective quantum yield,

LOQ, Limit of quantification

LOD, Limit of detection

QY, quantum yield

SD, standard deviation

UFLC, ultra-fast liquid chromatography

## 2. Introduction

The genus *Pseudo-nitzschia* is distributed throughout the world. At least 52 species are currently described of which 26 are known to produce a neurotoxin called domoic acid (DA) (Ajani et al., 2018; Gai et al., 2018; Li et al., 2018; Lundholm, 2018). The consumption of DA-contaminated shellfish at concentrations higher than the EU-regulatory limit of 20 mg DA kg<sup>-1</sup>, can cause severe amnesic shellfish poisoning (ASP) (Visciano et al., 2016). The human illness associated with DA intoxication is characterized by gastrointestinal symptoms like nausea, cramps, vomiting and diarrhea, followed by neurological symptoms including severe headache, seizures, short-term memory loss, coma and in severe cases, death (La Barre et al., 2014; Lefebvre and Robertson, 2010; Tasker, 2016). In addition to public health impacts, mortality events of marine birds and mammals linked to DA in the food web are also a serious ethical and economic issues (Beltrán et al., 1997; Gulland, 2000; Pulido, 2008). In recent decades, several species of toxic *Pseudo-nitzschia*, including *P. australis*, have been repeatedly reported along French coastlines (Amzil et al., 2001; Husson et al., 2016; Nezan et al., 2006) as well as in many other parts of the world such as the North and South Americas (Anderson et al., 2006; Bargu et al., 2008; Mather et al., 2010), other parts of Europe (Churro et al., 2009; Lundholm et al., 2006; Orive et al., 2013; Zapata et al., 2011), Asia and Africa (Hallegraeff, 2004; Hasle and Lundholm, 2005; Louw et al., 2018; Teng et al., 2016). Moreover, the species *P. australis* is considered one of the most toxic species worldwide (Thessen et al., 2009; Trainer et al., 2012). It was identified for the first time in France in 2004 as the main source of DA contamination in king scallops (*Pecten maximus*) (Amzil et al., 2007; Klein et al., 2010; Nezan et al., 2006). Toxic blooms of *Pseudo-nitzschia* species appear to be increasing in frequency and toxicity (Trainer et al., 2009). Several studies have examined the environmental factors that may affect toxin production in *Pseudo-nitzschia*, such as pH, salinity, temperature, irradiance, nutrient availability (silicate, phosphate, nitrate, and iron) and the presence of bacteria and copepod grazers (Cusack et al., 2002; Hardardóttir et al., 2015; Meredith D. Armstrong Howard et al., 2007; Lelong et al., 2012; Pan et al., 1998;

Tammilehto et al., 2015; Tatters et al., 2012). In addition, DA production may vary according to the inter- and intra-specific diversity commonly highlighted for the *Pseudo-nitzschia* genus, along with several physiological factors such as the age of the culture and the growth phase (lag, exponential and stationary phases). This highlights the difficulties in predicting the initiation of *Pseudo-nitzschia* blooms and DA production in the environment (Bates and Trainer, 2006; Godhe and Rynearson, 2017; Kim et al., 2015; Lelong et al., 2012; Lundholm et al., 1997).

Most of the *Pseudo-nitzschia* species are euryhaline, i.e., able to grow in a wide range of salinities, and can inhabit coastal areas exposed to significant and long-lasting changes in sea water salinity (Bates, 1998; Jackson et al., 1992; Lundholm et al., 1997; Thessen et al., 2005). The increase in frequency of storm tides, rise in water temperatures, altered precipitation and runoff can all cause the salinity level of coastal aquatic and estuarial ecosystems to change, and major alterations might be expected in phytoplankton diversity, dominance and toxin production (Stocker et al., 2013). According to several studies on climate change, salinity alterations have already been observed and are predicted to intensify worldwide (IPCC, 2007). The consequences of such changes in water salinity may have an impact on the frequency, intensity and the duration of *Pseudo-nitzschia* blooms and their ability to produce toxins (Hallegraeff, 2010; Van Meerssche and Pinckney, 2017; Wells et al., 2015). To our knowledge, very few studies have been conducted on the effect of salinity variation on growth and DA production by other *Pseudo-nitzschia* species (*P. multiseriata*, *P. delicatissima*, *P. pungens*, *P. calliantha*), and those studies that were carried out tested only one acclimated strain as a representative of the studied species (Doucette et al., 2008; Lundholm et al., 1997; Pednekar et al., 2018; Thessen et al., 2005; Van Meerssche and Pinckney, 2017). During cell growth in hypersaline conditions, diatoms can establish cellular adaptation mechanisms in order to compensate the osmotic pressure (Schobert, 1974). The osmotic balance can be achieved by ion accumulation mechanisms (sodium uptake) or by the synthesis and accumulation of osmolytes, which are low-molecular weight organic solutes (Liu and Hellebust, 1976; Masmoudi et al., 2013; Schobert, 1977). In diatoms, osmolytes are commonly amino acids like proline, lysine, taurine, alanine, arginine, glutamic acid and

aspartic acid (Fujii et al., 1995). However, while Doucette et al. (2008) and Pednekar et al. (2018) noticed an increase in DA production with increasing salinity in *P. multiseriens* and *P. pungens* cells, the potential physiological role of DA as an osmolyte have not yet been fully confirmed (Doucette et al., 2008; Lelong et al., 2012; Pednekar et al., 2018).

According to an FAO survey, France is the top shellfish producer in the EU, with an estimated production of 187,420 tons in 2002 for a turnover of 371 million euros (Food and Agricultural Organization FAO 2005). The present article reports for the first time, the effect of salinity shock on two strains of *P. australis* isolated from French waters and grown in batch cultures. The two studied strains were subjected to five different salinity conditions (10, 20, 30, 35 and 40) and their growth, effective quantum yield ( $F_v/F_m$ ) and toxin production were measured following the salinity shock. The aim of this study is to better understand the physiology of these toxic *Pseudo-nitzschia* strains, the possible role of DA as an osmolyte in the cells and to test whether the toxicity of *Pseudo-nitzschia* cells might be dependent on salinity. The overall objective is to investigate the effect of instantaneous salinity changes on *P. australis* cells and their ability to produce toxin. The acquired knowledge will be made available to help predict potential *P. australis* toxic blooms and their economic and health impacts on shellfish resources and local communities.

### **3. Materials and methods**

#### *3.1. Culture conditions*

Two strains of *Pseudo-nitzschia australis* were used in this study, strains IFR-PAU-16.1 and IFR-PAU-16.2, which were isolated in May 2016 from the Bay of Arcachon, located on the south-western Atlantic coast of France (44°40'N, 1°10'W). Both strains were confirmed to produce domoic acid. The cultures were grown in 1 L polystyrene culture flasks containing sterile L1 medium (Guillard and Hargraves, 1993). Natural seawater was filter-sterilized through a 0.22  $\mu\text{m}$  polycarbonate membrane filter (Corning NY, USA) and enriched with L1 media with

additional silicates for a final concentration of 100  $\mu\text{M}$  as described by Guillard and Hargraves (1993). The *P. australis* strains were grown in batch cultures and routinely maintained at a temperature-controlled room at 16°C, exposed to a photon flux density of 120  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (fluora and cool-white fluorescent light, Osram, Germany) in a 12 : 12 h light:dark cycle. Natural seawater obtained from the English Channel, with a salinity of 35, was selected as a control medium for comparison of salinity-induced stress. The natural seawater was diluted with distilled water to reach the salinities 10, 20 and 30. To provide a salinity treatment of 40, seawater was freeze-concentrated.

### 3.2. Experimental set-up

*P. australis* strains IFR-PAU-16.1 and IFR-PAU-16.2 were cultured for one week in L1 growth medium at salinity 35, i.e. the same salinity that was subsequently used as a control condition in the experiment. The cells were then centrifuged for 5 min at 150 *g* and 25°C and transferred into new culture media of different salinities (10, 20, 30, 35 and 40). Initial inocula concentrations for strains IFR-PAU-16.1 and IFR-PAU-16.2 before centrifugation were  $17 \times 10^3 \text{ cell mL}^{-1}$  and  $16 \times 10^3 \text{ cell mL}^{-1}$ , respectively. Triplicate cultures of each salinity condition were incubated in 1 L polystyrene bottles (Nest Biotechnology, China) at 16°C, with 120  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  photons flux density and 12:12 h light – dark cycle. Monitoring was carried out 4 hours after the salinity shock ( $T_0$ ), than daily for 4 days ( $T_1$ ,  $T_2$ ,  $T_3$  and  $T_4$ ) at a fixed time corresponding to the middle of the light cycle. Percentage cell mortality was calculated with data collected four hours after the transfer of cultures to the different salinities. Calculation was based on the differences between cell counts of the control culture at salinity 35 and those at the different salinities (10, 20, 30, 35 and 40).

### 3.3. Physiological measurements

A daily sampling of 35 mL of each culture was used in order to measure cell growth, effective quantum yield (QY)  $F_v/F_m$ , and DA content. Growth was monitored by daily cell counts of Lugol fixed samples (1% final concentration). A minimum of 400 viable cells were counted using a Nageotte counting chamber with a light microscope (Leica Microsystems Switzerland) at  $\times 10$  magnification. When growth occurred, the specific growth rate for the mean value of the triplicate cultures ( $\mu$ ,  $d^{-1}$ ) was calculated for the period of the first three days. When the strains did not grow, negative growth rates were calculated one day after the salinity stress according to the equation given in by Guillard (1973):

$$\mu = (\ln N_1 - \ln N_3) / (T_1 - T_3)$$

where N is cell density at a given time (T).

A PhytoPAM Phytoplankton fluorometer (Walz, Effeltrich, Germany) was used for the measurements of the effective quantum yield (QY) of the primary photosystem PSII ( $F_v/F_m$ ). For each culture,  $F_v/F_m$  was calculated via an assessment of the chlorophyll fluorescence yield and the saturation pulse using the following equation (Schreiber et al., 2002):

$$QY = (F_m - F_0) / F_m$$

where  $F_0$  is the minimum fluorescence measured after a period of complete darkness,  $F_m$  is the maximum fluorescence obtained during a saturating light pulse when all reaction centers are closed, and  $F_v = F_m - F_0$ .

### 3.4. Toxin analyses

In order to determine the toxin content (particulates and dissolved in the medium) of the two *P. australis* strains in different salinity treatments, 15 mL of culture were centrifuged (5 min, 3600 g, 4 °C) and separated into cell pellets and filtrate. DA concentrations in the particulate fraction

were determined by extraction of the cell pellet in 1 mL methanol/water mixture (50/50: v/v) and stored at -80 °C. Before analysis, the extraction was prolonged by 15 minutes of sonication in an ice-cold bath then centrifuged and filtered (15 min, 8000 g, 4 °C, 0.2 µm) to recover the supernatant (Amzil et al., 2007).

DA content in the dissolved fraction was extracted by solid phase extraction (SPE) using Agilent Bond Elut C18 200 mg cartridges. The SPE column was conditioned with 10 mL methanol followed by 10 mL of ultra-pure water. The sample was then passed through the SPE column after acidifying with 20% aqueous formic acid to give 0.2% formic acid. The cartridge was rinsed with 10 mL of 0.2% aqueous formic acid then dried for 1 minute. DA, adsorbed on the cartridge, was eluted with 1.5 mL of methanol/water (50/50: v/v) into a glass vial and stored at -80 °C for later analysis.

DA analyses were performed using Ultra-Fast Liquid Chromatography (UFLC, Shimadzu) coupled to an ABSciex API 4000QTrap triple quadrupole mass spectrometer. The chromatographic separation was carried out on a Kinetex C18 column (150 × 2.1 mm, 2.6 µm, Phenomenex) equipped with a pre-column. Certified DA standard (CNRC, Halifax, Canada) was used for external calibration range in order to quantify DA in sea water. LOD and LOQ are respectively 0.1 and 0.25 ng mL<sup>-1</sup>.

### *3.5. Statistical analyses*

The experiment was carried out in triplicate and the data presented are mean standard deviation (SD) for n=3. Statistical analyses were performed to determine whether the growth, effective quantum yield ( $F_v/F_m$ ), or the DA content of the two tested strains significantly varied ( $p < 0.05$ ) for the different salinity conditions. Data were analyzed statistically using nonparametric Kruskal-Wallis tests followed by multiple comparison tests (H tests) to determine the source of significant differences. All comparisons were made against the salinity 35 control data and analyses were performed using R software version 3.4.1, 2017.

#### **4. Results**

Cell growth, effective quantum yield and domoic acid content (particulates, dissolved and total domoic acid) of the two strains of IFR-PAU-16.1 and IFR-PAU-16.2 were all influenced by the sudden changes in salinity conditions (Figure 7-10).

##### *4.1. Effect of salinity variation on growth*

The salinity stress led to an instantaneous decrease in cell density for all cultures, with a percentage of mortality ranging from 18% to 93% (Figure 7). At salinities 20 and 10, the two strains showed a sharp increase in mortality (84% to 93% cell mortality), while small increases were observed at salinities 40 and 30 (18% to 38% cell mortality) (Figure 7). Similarly, control cultures, at 35 salinity, showed a moderate cell mortality of 20% and 18% for strains IFR-PAU-16.1 and IFR-PAU-16.2, respectively (Figure 7). This was likely due to culture centrifugation and transfer to new media at the beginning of the experiment. At salinity 30, the two strains IFR-PAU-16.1 and IFR-PAU-16.2 showed high growth rates of 0.39 d<sup>-1</sup> and 0.43 d<sup>-1</sup>, respectively. Moderately lower growth rates of 0.35 d<sup>-1</sup> and 0.19 d<sup>-1</sup> were observed at salinity 35 for strains IFR-PAU-16.1 and IFR-PAU-16.2, respectively. However, at salinities 10, 20 and 40, neither strain showed any growth at all (Figure 7 and Figure 8), and negative growth rates were observed e.g., -0.29 d<sup>-1</sup>, -0.39 d<sup>-1</sup>, and -0.04 d<sup>-1</sup>, respectively, in IFR-PAU-16.2.



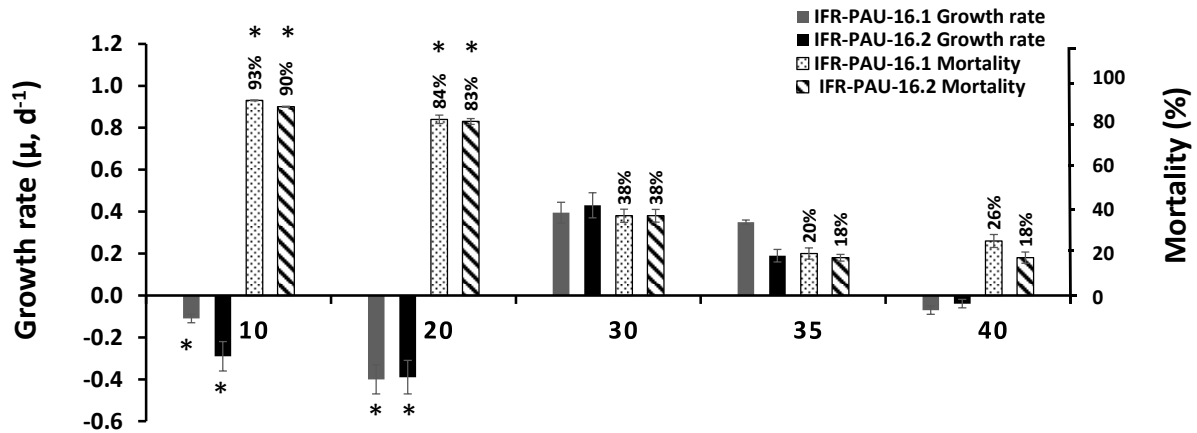


Figure 7: Percentage mortality and growth rates ( $\mu$ ) in strains IFR-PAU-16.1 and IFR-PAU-16.2 exposed to a broad range of salinities: 10, 20, 30, 40 and 35 (control). Data are means  $\pm$  SD,  $n = 3$ . ( $\mu$  calculated between day 1 and 3 for salinities 30 and 35, and between day 0 and 1 for salinities 10, 20 and 40). \* Significant difference between cultures grown at salinities 10 and 20 compared with the control at 35 ( $p < 0.05$ ).

After the salinity shock, growth recovery was observed at salinity 30 during the four days of culture, and a slight and progressive decrease in cell density was observed at salinity 40 (Figure 8). In transfers to salinities 10 and 20, the osmotic shock led to cell lysis and very low cell densities. The highest cell concentrations were reached on days 3 and 4 for both strains at salinities 30 ( $26 \times 10^3$  and  $21 \times 10^3$  cells mL<sup>-1</sup>) and 35 ( $26 \times 10^3$  and  $20 \times 10^3$  cells mL<sup>-1</sup>) (Figure 8).

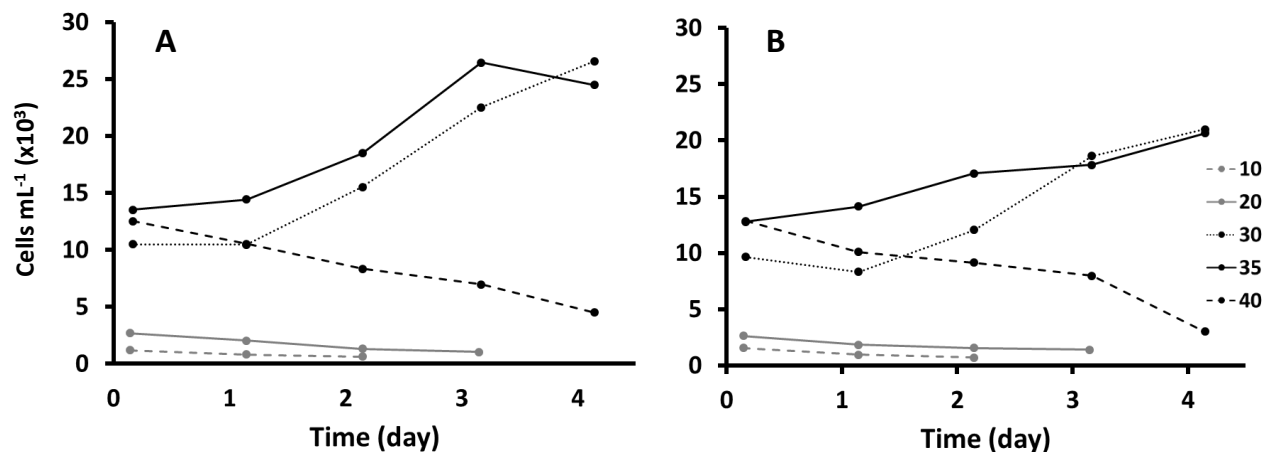


Figure 8: Effect of different salinity conditions: 40, 35, 30, 20 and 10 on cell densities for strains IFR-PAU-16.1 (A) and IFR-PAU-16.2 (B). Time 0 refers to the cell transfer to the new salinity treatment media. Data are means  $\pm$  SD,  $n = 3$ .

#### 4.2. Effect of salinity variation on the photosynthetic activity

The salinity shocks of 20 and 10 for the two *Pseudo-nitzschia* strains also had a negative effect on the cellular photosynthetic efficiency (Figure 9). The effective quantum yield  $F_v/F_m$  of the stock culture was 0.65 for both strains (Figure 9). Following the salinity stress treatments, the  $F_v/F_m$  values declined in both strains, possibly as a consequence of the cell transfer process. However, cultures transferred at salinities 40, 35 and 30 showed a recovery of the effective quantum yield, as the  $F_v/F_m$  value remained stable throughout the growth period (Figure 9). The  $F_v/F_m$  of cultures at salinity 40 decreased on the last two days of the experiment to minima of 0.47 and 0.38 for IFR-PAU-16.1 and IFR-PAU-16.2, respectively. The  $F_v/F_m$  yield was greatest for cultures at salinity 30 with values equal to 0.67 for IFR-PAU-16.1 and IFR-PAU-16.2, and similar for cultures at 35 salinity (0.65 for both strains) (Figure 9). However, cultures subjected to salinity stress of 20 underwent a drop in the  $F_v/F_m$  just after the transfer (0.11 and 0.09 for IFR-

PAU-16.1 and IFR-PAU-16.2, respectively), whereas at salinity 10, photosynthetic efficiency was reduced to almost nothing (0.01 and 0.02, respectively).

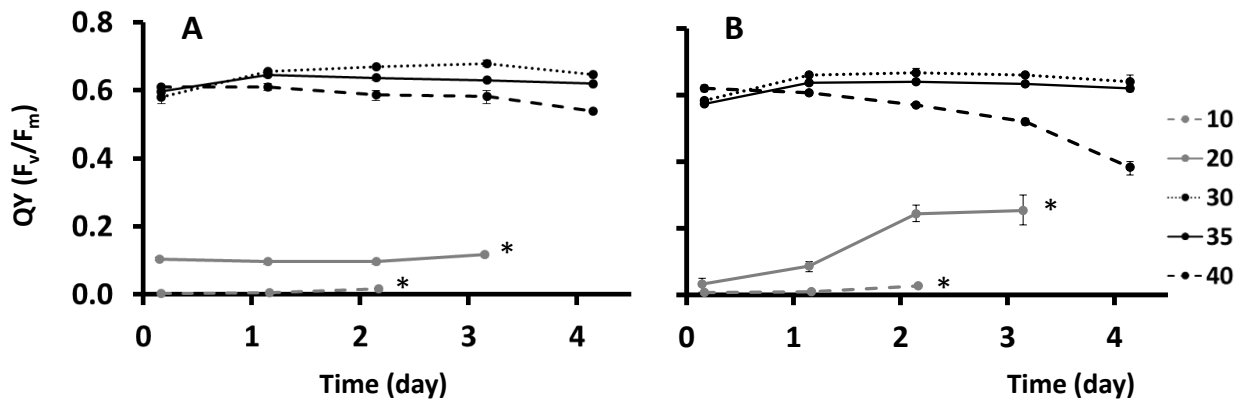


Figure 9: Variation in the effective quantum yield  $QY = F_v/F_m$  in strains IFR-PAU-16.1 (A) and IFR-PAU-16.2 (B) in response to salinity conditions 10, 20, 30, 35 and 40. Data are means  $\pm$  SD,  $n = 3$ . \* Significant difference between cultures at salinities 10 and 20 compared to the control at salinity 35 ( $p < 0.05$ ).

#### 4.3. Effect of salinity variation on domoic acid production

The initial particulate domoic acid content of all cultures was  $0.25 \text{ pg cell}^{-1}$  and  $0.16 \text{ pg cell}^{-1}$  for IFR-PAU-16.1 and IFR-PAU-16.2, respectively. Neither strain survived the osmotic shock when subjected to salinity stress at 10 or 20 as this resulted in cell lysis (Figure 8). Cell lysis effects were also observable on the dissolved DA concentration (Figure 10C, D), as high amounts of dissolved DA were detected in the culture medium from the beginning of the experiment and remained constant over the four next days (almost  $3 \text{ ng mL}^{-1}$  for IFR-PAU-16.1 and IFR-PAU-16.2 at salinities 10 and 20). This shows that the entire DA cell content had been released into the culture medium. At salinity 40, particulate DA showed a slow and steady increase for IFR-PAU-16.1 ( $0.24 \text{ pg cell}^{-1}$  at day 4) and very low levels of particulate DA for IFR-PAU-16.2 ( $0.03 \text{ pg cell}^{-1}$  at day 4), (Figure 10A, B).

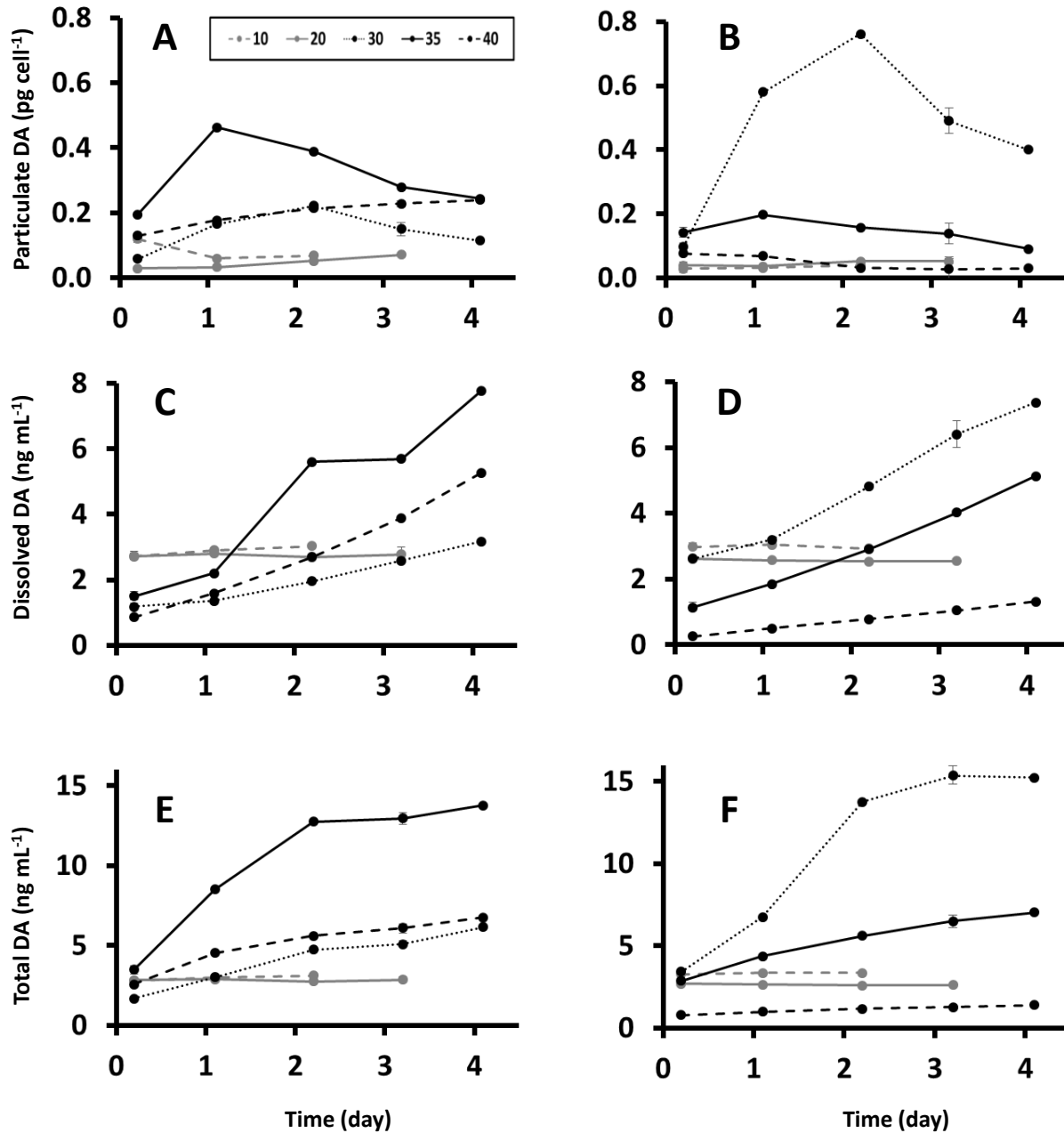


Figure 10: Particulate, dissolved and total domoic acid concentrations in strains IFR-PAU-16.1 (A, C, E) and IFR-PAU-16.2 (B, D, F) subjected to different salinity conditions: 40, 35, 30, 20 and 10. Data are means  $\pm$  SD,  $n = 3$ .

In addition, the highest total DA content (particulate and dissolved) differed substantially between the two lowest salinities and other salinities tested. At salinities 30, 35 and 40, high

amounts of DA were detected after the salinity shock. The highest total DA concentrations were reached in cultures at salinity 35 for strain IFR-PAU-16.1 (13.8 ng mL<sup>-1</sup>) and at salinity 30 for IFR-PAU-16.2 (15.2 ng mL<sup>-1</sup>). An increase was observed during the two first days, which corresponds to the early exponential growth phase (see supplementary data and Figure 10E, F). This was followed by a phase where DA production slowed down and stabilized at days 3 and 4, corresponding to the late exponential and stationary growth phases (see supplementary data). A slow and steady increase in DA was observed for strain IFR-PAU-16.1 at salinities 30 and 40, and for IFR-PAU-16.2 at salinities 35 and 40 (Figure 10E, F). The large increase of total DA observed at the beginning of the experiment for salinities 35 and 30 resulted from the accumulation of DA inside the cell during the first day for IFR-PAU-16.1 (from 0.19 to 0.46 pg cell<sup>-1</sup> for salinity 35) and the two first days for IFR-PAU-16.2 (from 0.10 to 0.78 pg cell<sup>-1</sup> for salinity 30), (Figure 10A, B). This was followed by the decrease of intracellular DA content until the end of the experiment due to toxins release into the culture medium (Figure 10C, D). Dissolved DA showed a rapid and progressive increase after the medium change for the salinities 30, 35 and 40 and reached elevated levels once cell concentrations reached a plateau. Dissolved DA reached its highest levels at salinity 35 for strain IFR-PAU-16.1 (7.8 ng mL<sup>-1</sup>) and 30 for strain IFR-PAU-16.2 (7.4 ng mL<sup>-1</sup>) (Figure 10C, D). The concentration of dissolved DA in the medium was also high at salinity 40 for strain IFR-PAU-16.1 (5.1 ng mL<sup>-1</sup>). In contrast, the dissolved DA value for strain IFR-PAU-16.2 at salinity 40 remained steady and low (1.3 ng mL<sup>-1</sup> on day 4) throughout the experiment (Figure 10C, D).

## 5. Discussion

### 5.1. Effect of salinity variation on growth and the photosynthetic activity

This study was the first investigation into the effects of salinity stress on two strains of the diatom *P. australis*, considered to be one of the main species responsible for amnesic shellfish poisoning incidents worldwide (Bates, 2000; Campbell et al., 2001; Husson et al., 2016). As reported in

several studies, the expected future increases in salinity fluctuations in coastal and estuarine areas, brought about by climate change and anthropogenic pressure, could potentially affect the frequency and intensity of *Pseudo-nitzschia* blooms (IPCC, 2007; McCabe et al., 2016). Our results indicate that such salinity fluctuations may also affect domoic acid (DA) production by *Pseudo-nitzschia* cells. *P. australis* blooms have been reported every year in spring and autumn in many estuarine and coastal waters in France and other parts of the world (Hallegraeff, 2004; Hasle and Lundholm, 2005; Husson et al., 2016; Nezan et al., 2006). In particular, our experiments raise concern about the potential effects of rapid fluctuations of the sea surface salinity as a result of rainfall or river discharge into the coastal areas and the effect of salinity increase during drought periods on cell viability and domoic acid content of *P. australis* cells. The results of this experiment clearly demonstrate that the studied strains can resist sudden salinity change over only a small range, here from 35 to 30.

Previous field and laboratory studies on other *Pseudo-nitzschia* species (*P. multiseriis*, *P. pungens*, *P. calliantha*, *P. cuspidata*, and *P. fraudulenta*) have also reported impacts of salinity variation on growth and DA production (Doucette et al., 2008; Lundholm et al., 1997; Markina and Aizdaicher, 2016; Pednekar et al., 2018; Thessen et al., 2005; Thessen and Stoecker, 2008; Van Meerssche and Pinckney, 2017). The results of these previous studies showed that high cell abundances and growth rates of *Pseudo-nitzschia* cells were associated with high salinity levels. A recent field study by Van Meerssche and Pinckney (2017) showed a positive correlation between dissolved DA concentrations and salinity. Their findings showed an increase in *Pseudo-nitzschia* abundance with increasing salinity but with less DA release in the water. Our results are in agreement with the laboratory studies on *P. multiseriis* and *P. pungens* strains acclimated to different salinities (Doucette et al., 2008; Pednekar et al., 2018). Doucette et al. (2008) concluded that the *P. multiseriis* strain was able to maintain high growth rates and its greatest cellular DA concentrations at higher salinities (three- to seven-fold higher total DA concentrations at salinities 30 and 40 compared with salinities 10 and 20). Additionally, a recent study by Pednekar et al. (2018) showed that the highest growth rates were obtained at salinities of 15 to 25, and that

higher and lower salinities resulted in a reduction of growth rate. This salinity range also corresponded to the area where this species was isolated and is commonly present in the Zuari and Mandovi estuaries in western India (Pednekar et al., 2018). The authors also found that DA production increased as salinity increased with the most produced at salinity 35. However, the lack of laboratory studies on the effect of sudden salinity changes on toxic *Pseudo-nitzschia* species makes comparisons of our finding difficult, especially knowing the wide variability within and between *Pseudo-nitzschia* species (Casteleyn et al., 2010; Moschandreou et al., 2012; Tesson et al., 2014).

In comparison to previous studies examining *P. australis* growth rates with different nitrogen sources, the growth rates observed in our study at salinities 35 and 30 (0.39 and 0.43 d<sup>-1</sup> respectively) were similar to those observed by Martin-Jézéquel et al. (2015) (0.33 to 0.60 d<sup>-1</sup>), and lower than those in Howard et al. (2007) (0.52 to 0.93 d<sup>-1</sup>). In addition, the cells maintained high effective quantum yield ( $F_v/F_m$ ). However, cultures at salinity 40 showed a slow decrease in  $F_v/F_m$  while the biomass was rapidly decreasing suggesting that the effect of salinity stress was greater in cell division than on the effective quantum yield. Furthermore, in response to salinity stress at 10 and 20, the effective quantum yield ( $F_v/F_m$ ) decreased severely, suggesting that the salinity drop to 10 and 20 was too excessive to allow the maintenance and protection of the cell membrane and caused direct cell lysis. These responses are common in plants and microalgae under severe environmental stress (Chokshi et al., 2017; Pancha et al., 2015).

### *5.1. Effect of salinity variation on DA production*

Likewise, salinity stress also had an impact on toxin production of particulates and dissolved DA. High amounts of dissolved DA were detected four hours after cultures were transferred from salinity 35 to salinities 10 and 20 due to cell lysis (lysed cells were observed under the microscope). The DA content of these cultures remained stable until the end of the experiment, while for salinities 30, 35 and 40, a progressive release of DA was observed over the four days of

the experiment (Fig. 4C, D). The highest cell particulate DA contents detected for strains IFR-PAU-16.1 and IFR-PAU-16.2 (0.46 pg cell<sup>-1</sup> and 0.76 pg cell<sup>-1</sup>, respectively) were lower than the values previously reported for *P. australis* strains studied by Buck et al. (Buck et al., 1992) (3 to 31 pg cell<sup>-1</sup>) and Trainer et al. (2000) (0.1 to 78 pg cell<sup>-1</sup>) and comparable to those measured by Campbell et al. (2001) (1.2 to 1.32 pg cell<sup>-1</sup>), Cusack et al. (2002) (0.21 to 0.98 pg cell<sup>-1</sup>) and Rhodes et al. (2002) (2 pg cell<sup>-1</sup>). The particulate DA content measured in *P. australis* strains by Martin-Jézéquel et al. (2015) (10.8 to 30.3 fg cell<sup>-1</sup>) and Howard et al. (2007) (0.48 fg cell<sup>-1</sup>), however, were much lower than the detected concentrations in our experiment. Furthermore, the highest cellular DA contents were observed in the cultures at salinities 35 and 30, where growth rates and the effective quantum yield were high. In suitable growth conditions, the DA content of *P. australis* seemed to appear in two stages: a first one where the DA content (particulate) is greater than the release (dissolved), (until days 1 and 2 for both strains) and a second where the release in the culture medium prevails. Similar patterns of DA production in *P. australis* strains have also been reported in previous studies (Garrison et al., 1992; Meredith D. Armstrong Howard et al., 2007; Martin-Jézéquel et al., 2015), where the highest cell DA contents were measured during the exponential or late-exponential growth phases. It was suggested that during active growth (exponential growth phase) in which no nutrients were limiting and the effective quantum yield ( $F_v/F_m$ ) was elevated, a large amount of metabolic energy was generated to fulfil the requirements of both growth and DA biosynthesis (Bates, 1998; Maldonado et al., 2002). It is noteworthy that the majority of previous studies (Bates, 1998; Doucette et al., 2008; Martin-Jézéquel et al., 2015; Pan et al., 1996b) usually reported enhanced cellular DA levels during the mid-stationary growth phase in *P. multiseriis* strains, and it has been speculated that the reduction or cessation of cell division during this phase could allow the cells to accumulate a higher particulate DA content, especially when nutrients (i.e., silicate and phosphate) are depleted in the medium. This variability in toxin production phase may be attributable to the wide interspecific diversity of *Pseudo-nitzschia* genus as well as changes in cell physiology (cell size, age of culture) or their initial environmental conditions (Bates and Trainer, 2006; Gai et al., 2018;



Moschandreu et al., 2012; Thessen et al., 2009; Trainer et al., 2012). This exacerbates the difficulties of comparing different studies and deriving conclusions about the behaviour observed.

The stress imposed by raising the salinity up to 40 induced the accumulation of high amounts of particulate DA in the strain IFR-PAU-16.1, while for the strain IFR-PAU-16.2, a much lower particulate DA content were observed, associated with a rapid increase of DA in the medium. These results suggest that IFR-PAU-16.1 had higher salinity tolerance (salinity 30 to 40) than IFR-PAU-16.2 (30 to 35) in terms of toxin production. Likewise, previous laboratory experiments conducted by Parkhill and Cembella (1999) on the marine dinoflagellate *Alexandrium tamarense* also showed that the sudden transfer of cells from salinity 30 into medium of 10 and 15 reduced toxin production, and caused an instantaneous leakage of toxins from the cells. Guerrini et al. (2007) found that the amount of yessotoxin released into the medium by the dinoflagellate *Protoceratium reticulatum* decreased as salinity increased, the highest amount of cellular toxin was produced at intermediate salinity, with decreases in both lower and higher salinity levels.

Following a fluctuation in salinity, diatoms have been shown capable of producing and accumulating organic osmolytes in order to maintain cellular osmotic balance (Masmoudi et al., 2013). For example, Schobert (1974) reported high levels of proline in *Cyclotella meneghiniana* subjected to high salt concentrations. The levels of proline and lysine in *Nitzschia ovalis* were likewise found to increase as salinity went up (Garza-Sánchez et al., 2009). A study by Jackson et al. (1992) reported an increase in glutamic acid and taurine production in *Pseudo-nitzschia pungens* and *P. multiseriis* following an increase in salinity conditions. Given that DA is highly structurally similar to common osmolytes in diatoms, like glutamic acid and aspartic acid (Lefebvre and Robertson, 2010), it is tempting to suggest that DA acts as an osmolyte in response to increasing salinity as put forward by Bates (1998). In addition, Doucette et al. (2008), Van Meerssche and Pinckney (2017) and Pednekar et al. (2018) showed an increase in DA production with rising salinity levels, reinforcing the hypothesis of Bates (1998). In our study, the

concentration of any osmolyte would be expected to decrease in cells transferred to lower salinity and to increase in cells transferred to higher salinity. Whereas a decrease in particulate DA was observed for strain IFR-PAU-16.1 when the salinity was decreased to 30, and a slow increase was found when cells were transferred to salinity 40. Particulate DA content remained lower at salinity 40 than at salinity 35. Likewise, higher particulate DA content was observed at salinity 30 than at salinity 35 for the strain IFR-PAU-16.2. When strain IFR-PAU-16.2 was grown at salinity 40, it produced lower amounts of DA that were directly released into the culture medium (no accumulation observed), probably because the salinity stress was too severe for this strain and damaged cells. Therefore, with regard to abrupt salinity changes, DA does not seem to act as an osmolyte in *P. australis* cells in either of the two strains studied here. Furthermore, intra-specific variability was observed, as strain IFR-PAU-16.1 seemed to withstand higher salinities than strain IFR-PAU-16.2 in terms of growth capacities and DA content, with an optimal salinity at 35, whereas this was 30 for IFR-PAU-16.2. The two strains of *P. australis* tested withstand and tolerate fluctuation in the salinity ranges 30 to 35, in which cells continued to proliferate and produce high amounts of DA. As these salinities generally correspond to the areas along the French coast most heavily harvested areas for bivalve molluscs, ASP could be expected in these places. However, the osmotic stress imposed at salinities 20 and 10 resulted in cell lysis, inhibition of toxin biosynthesis and an immediate DA leakage into the medium. Thus, further investigations on the effect of salinity variation, done in acclimation mode rather than with a shock, would provide interesting complementary knowledge on the potential response of *P. australis* cell physiology, particularly regarding DA production in an environment of variable salinity.

## **6. Conclusion**

In recent decades, 26 toxic *Pseudo-nitzschia* species have been reported in the world's oceans (Amzil et al., 2001; Gai et al., 2018; Trainer et al., 2009). These habitats are widely used as shellfish growing and harvesting areas and are often subjected to large fluctuations in salinity.

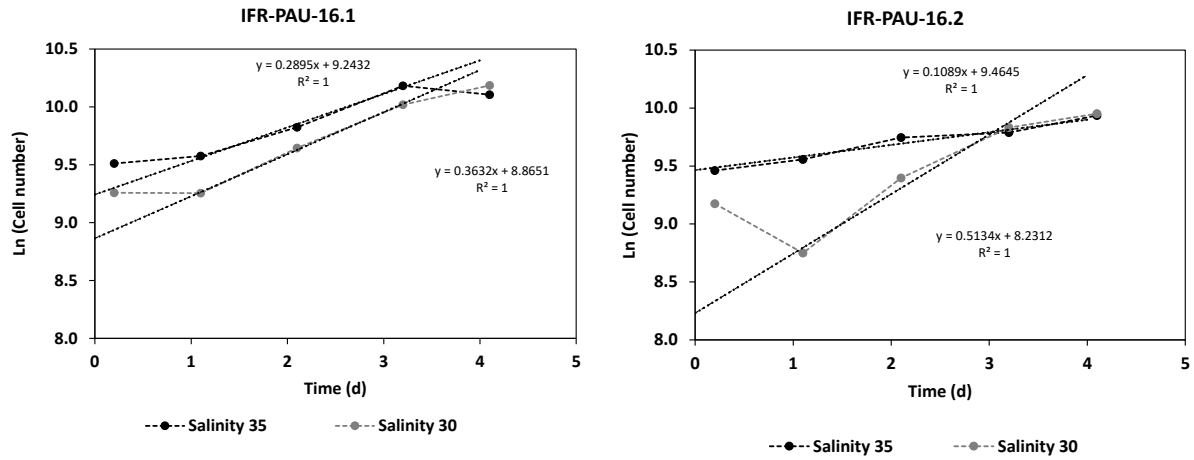
These variations in salinity are influenced by various natural and/or anthropogenic environmental factors (heavy rain, river discharge, high evaporation). The results of our study revealed that the two studied strains show similar behaviour in response to sudden salinity variations, with a limited range of salinity tolerance between 30 and 35, and an intra-specific variability in terms of optimal growth and DA content. Our result does not support the hypothesis of DA acting as an osmolyte in *P. australis* cells subjected to rapid salinity change. Moreover, deviation from optimal salinities towards lower and higher levels (salinity 20 and 40) can stress cells, leading potentially to cell lysis, reduced growth, photosynthetic efficiency, and effects on DA production and release. These results indicate that *P. australis* is a salinity-sensitive species that will not thrive in coastal areas after large salinity fluctuations. It would now be useful to perform further laboratory studies on the impact of salinity variation on cell physiology and DA production mechanisms in acclimation mode.

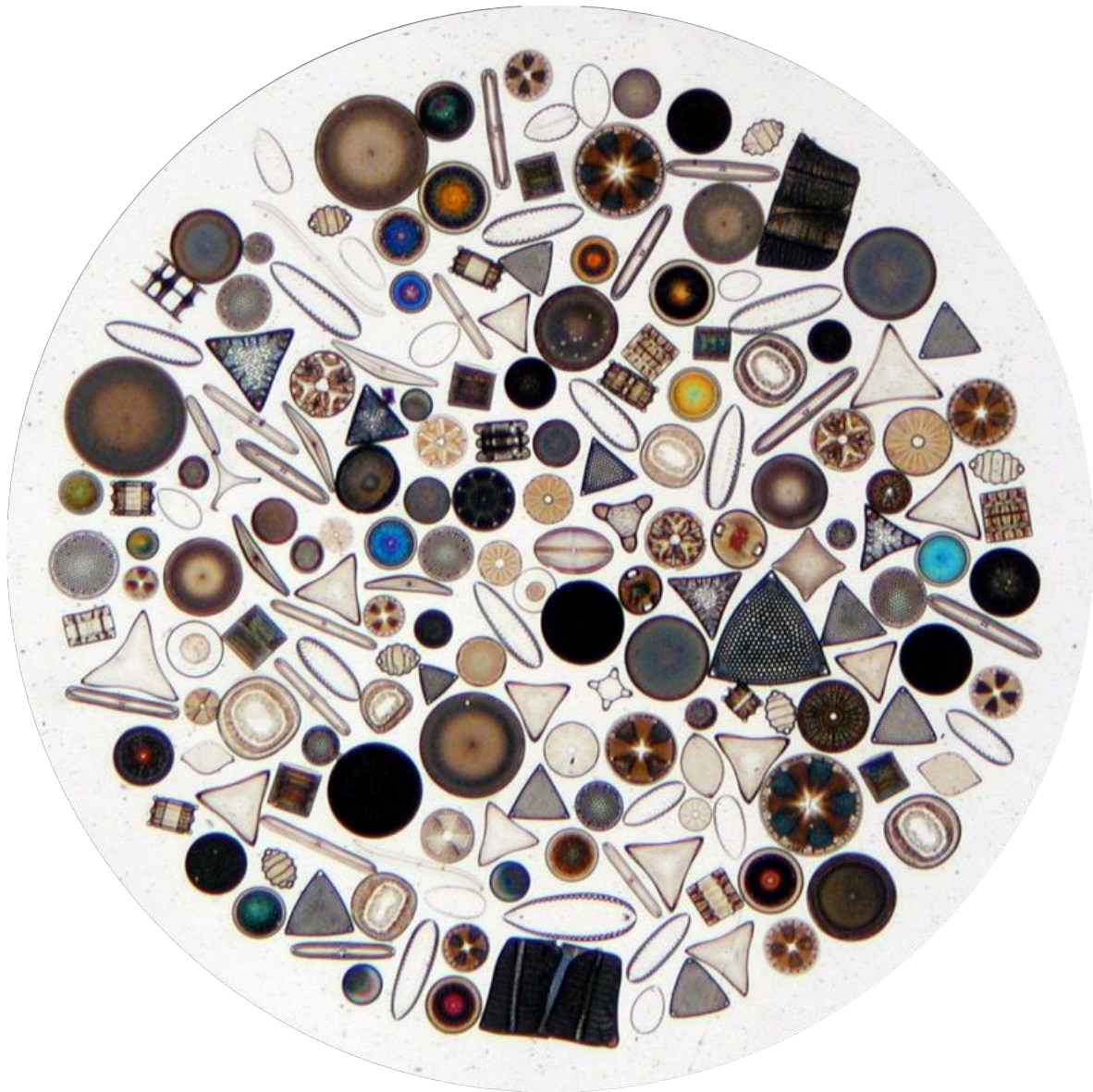
### **Acknowledgments**

The authors acknowledge Ifremer and the Regional Council of the *Région des Pays de la Loire* for the PhD funding of Nour Ayache. The authors would like to thank Elizabeth Nézan and Nicolas Chomérat from Ifremer, Concarneau, France for providing and identifying the *Pseudo-nitzschia australis* strains.

## Supplementary data

Figure S1: Semi-log plots of cell counts measured for the two strains IFR-PAU-16.1 and IFR-PAU-16.2 grown at salinities 35 and 30.





Arrangements artistiques de Diatomées par Klaus Kemp-Microlife Services

(<http://www.diatoms.co.uk/index.htm>)

# Chapitre III : Acclimatation de la diatomée marine *Pseudo-nitzschia australis* à différentes conditions de salinité: Effets sur la croissance, l'activité photosynthétique et la production d'acide domoïque

**Résumé :** Deux souches toxiques de *Pseudo-nitzschia australis* isolées des eaux côtières françaises ont été étudiées pour déterminer leur capacité à s'adapter à différentes salinités. Leur acclimatation à différentes conditions de salinité (10, 20, 30, 35 et 40) a été étudiée sur la croissance, la capacité photosynthétique, le biovolume cellulaire et la teneur en acide domoïque (AD). Les deux souches ont montré une capacité de s'acclimater à une gamme de salinité de 20 à 40, avec une croissance optimale entre les salinités 30 et 40. Le biovolume cellulaire le plus élevé a été observé à la plus faible salinité 20 et a été associé à des taux de croissance les plus bas pour les deux souches étudiées. Cependant, la salinité n'a pas affecté l'activité photosynthétique des cellules, puisque les valeurs  $F_v/F_m$  et les teneurs en pigments sont restées élevées sans différence significative entre les différentes salinités testées. Une production importante de zéaxanthine a cependant été observée à la fin des phases stationnaires et de déclin dans toutes les cultures à l'exception de celles acclimatées à la salinité 20. En ce qui concerne la production toxinique, les concentrations en AD particulaire étaient 2 à 3 fois plus élevées à la salinité la plus faible (20) en comparaison avec les autres salinités et ont été associées avec une faible libération d'AD dissous dans le milieu extracellulaire. Le fait que *P. australis* soit devenu plus toxique dans des eaux moins salées montre que les changements de salinité liés au climat peuvent affecter la physiologie de *Pseudo-nitzschia* par des effets directs sur la croissance, la physiologie et la production de toxines.

**ACCLIMATION OF THE MARINE DIATOM *PSEUDO-NITZSCHIA AUSTRALIS* TO DIFFERENT SALINITY CONDITIONS: EFFECTS ON GROWTH, PHOTOSYNTHETIC ACTIVITY AND DOMOIC ACID PRODUCTION**

Authors: Ayache Nour, Hervé Fabienne, Lundholm Nina, Amzil Zouher, Caruana Amandine M.N

Corresponding author: Ayache Nour, [nour.ayache@ifremer.fr](mailto:nour.ayache@ifremer.fr) ; Tel: +33 (0)2 40 37 40 00; Fax: +33 (0)2 40 37 42 41

Ayache Nour, IFREMER, Phycotoxin Laboratory, rue de l'Île d'Yeu, BP 21105, 44311 Nantes, France

Hervé Fabienne, IFREMER, Phycotoxin Laboratory, rue de l'Île d'Yeu, BP 21105, 44311 Nantes, France

Lundholm Nina, Natural History Museum of Denmark, University of Copenhagen, Øster Farimagsgade 5, 1307 Copenhagen, Denmark

Amzil Zouher, IFREMER, Phycotoxin Laboratory, rue de l'Île d'Yeu, BP 21105, 44311 Nantes, France

Caruana Amandine M. N., IFREMER, Phycotoxin Laboratory, rue de l'Île d'Yeu, BP 21105, 44311 Nantes, France

## ***1. Abstract***

Two toxic *Pseudo-nitzschia australis* strains isolated from French coastal waters were studied to investigate their capacity to adapt to different salinities. Their acclimation to different salinity conditions (10, 20, 30, 35 and 40) was studied on growth, photosynthetic capacity, cell volume and domoic acid (DA) content. The two strains showed ability to acclimate to a salinity range from 20 to 40, with optimal growth between salinities 30 and 40. The highest cell volume was observed at the lowest salinity 20 and was associated with the lowest growth rate. Salinity did not affect the photosynthetic activity as the  $F_v/F_m$  values and the pigment contents remained high with no significant difference among salinities. An enhanced production of zeaxanthin was, however, observed in the late stationary and decline phases in all cultures except for those acclimated to salinity 20. In terms of toxin production, particulate DA concentrations were 2 to 3-fold higher at the lowest salinity (20) than at the other salinities and were combined with a low amount of dissolved DA. The fact that *P. australis* became more toxic in less saline waters, illustrates that climate-related changes in salinity may affect *Pseudo-nitzschia* physiology through direct effects on growth, physiology and toxin production.

**Key words:** Acclimation, climate change, domoic acid, *Pseudo-nitzschia australis*, physiology, salinity.

## **Highlights:**

- Salinity condition influenced growth, cell size and cellular DA content, without any effect on photosynthetic activity
- The two studied *P. australis* strains tolerated a salinity range from 20 to 40
- The lowest salinity resulted in reduced growth, enlarged cell volume and enhanced cellular DA content



## 2. Introduction

The genus *Pseudo-nitzschia* includes several toxic species that produce the toxin domoic acid (DA) which is harmful to humans. These toxigenic species are responsible for amnesic shellfish poisoning (ASP) events worldwide (Bates et al. in press). The symptoms of such intoxications are characterized by nausea, vomiting, abdominal cramps, diarrhea, short-term memory loss, seizures, disorientation and in extreme cases, coma and death (Pulido, 2008; Ramsdell and Gulland, 2014; Schwarz et al., 2014). In recent decades, numerous reports have linked mortality events in sea birds, fish and sea mammals to the presence of toxic *Pseudo-nitzschia* blooms and the accumulation of high DA concentrations in organisms (Goldstein et al., 2008; Lefebvre et al., 2012; Scholin et al., 2000). The worldwide distribution and occurrence of *Pseudo-nitzschia* outbreaks have been reported to appear on larger spatial and temporal scales in recent decades (Husson et al., 2016; Lim, 2012; Louw et al., 2017). This wide expansion is likely associated with the accentuated effects of climate change and anthropogenic activities on aquatic ecosystems (Durack and Wijffels, 2010; Skliris et al., 2014). For instance, Atlantic coastal waters of France were subjected to a destructive climate event when the storm Xynthia occurred in February 2010. The storm triggered highly toxic *Pseudo-nitzschia australis* blooms and afterwards caused an unusual DA accumulation in king scallops that greatly exceeded the safety thresholds (445 mg DA kg<sup>-1</sup>) in several areas (Pertuis Breton, Concarneau bay and Quiberon bay), (Husson et al., 2016; Nézan et al., 2010; Ryckaert et al., 2010). Thereafter, the recurrence of new toxic *Pseudo-nitzschia* blooms combined with a slow depuration of DA in king scallop tissues, extended the closures of harvest areas for two years in Quiberon Bay (Ryckaert et al., 2010). Monitoring and temporal closures of contaminated shellfish grounds have proven to be beneficial for protecting human health because no further confirmed human DA poisoning have been reported since the 1987 Prince Edward (Canada) ASP outbreak (Todd, 1993). The strategy have, however, also contributed to negative economic impacts on shellfish industries and local communities (Hoagland and Scatasta, 2006) because of closures when DA concentrations in

shellfish exceeds the safety thresholds (20 mg DA kg<sup>-1</sup> of shellfish meat) (Anderson et al., 2000; Hoagland and Scatosta, 2006; Visciano et al., 2016).

In order to identify the environmental changes that trigger *Pseudo-nitzschia* occurrence, proliferation as well as toxin production, research have explored the effects of various physical, chemical and biological factors such as photoperiod, pH, temperature, macronutrients (silicate, phosphate, and nitrogen), micronutrients availability (copper and iron), life stages and the presence of bacteria and grazers (Ayache et al., 2018; Fehling et al., 2005; Hansen et al., 2011; Hardardóttir et al., 2015; Kaczmarek et al., 2005; Lelong et al., 2012; Lundholm et al., 2004; Martin-Jézéquel et al., 2015; Sobrinho et al., 2017; Thorel et al., 2014). Few studies have, however, addressed the effect of salinity on the proliferation and DA production of *Pseudo-nitzschia* species (Ayache et al., 2018; Doucette et al., 2008; Lundholm et al., 1997; Pednekar et al., 2018; Thessen et al., 2005; Van Meerssche and Pinckney, 2017).

Given their wide distribution along most of the world's coastal and estuarine systems including Arctic and Antarctic waters (Almandoz et al., 2008; Hansen et al., 2011), *Pseudo-nitzschia* species might be considered able to adapt to a large salinity range (from 6 to 45) (Thessen et al., 2005). In addition, climate change scenarios suggest that salinity variation may accentuate in the coming decades. Analyses of trends in global sea surface salinity changes over the period 1950-2008 have revealed that regions that are dominated by net evaporation are getting more saline, while regions dominated by net precipitation and runoff are getting fresher (Durack and Wijffels, 2010; Terray et al., 2012). They also suggest that the Arctic Ocean becomes gradually fresher and the Atlantic waters become warmer and more saline throughout most of the basins. Salinity fluctuations are mostly related to changes in precipitation patterns, storm frequencies, melting of glaciers, river discharge, changes in wind direction and evaporation (IPCC, 2007; Jewett and Romanou, 2017). Such climate disturbances may result in salinity changes in coastal and estuarine waters, thereby potentially affecting *Pseudo-nitzschia* blooms and their capacity to produce toxin. Previous laboratory and field studies have shown that salinity is a factor potentially affecting growth and DA production of *Pseudo-nitzschia* species (Ayache et al., 2018;

Doucette et al., 2008; Lundholm et al., 1997; Pednekar et al., 2018; Thessen et al., 2005; Van Meerssche and Pinckney, 2017), but with apparently contradictory results on toxin production, particularly in terms of salinity conditions. Some laboratory studies have e.g. shown increasing salinity to induce DA production rate in *P. multiseriis* and *P. pungens*, hypothesizing that DA may be implicated in osmoregulatory mechanisms in these species (Doucette et al., 2008; Pednekar et al., 2018), whereas a field study conducted by Van Meerssche and Pinckney (2017), have shown that *Pseudo-nitzschia* species reduce the amount of DA released into the extracellular medium with increasing salinity levels. Particulate DA content was unfortunately not measured.

A high genetic and physiological intra- and interspecific variability exists among strains of *Pseudo-nitzschia*; and among strains used in laboratory experiments, parameters such as strain age, cell size and geographical origin of the strain may also vary (Gai et al., 2018; Moschandreu et al., 2012; Thessen et al., 2009; Trainer et al., 2012). Therefore, comparisons among studies as well as the extrapolations to other *Pseudo-nitzschia* species have to be made with care. A recent study conducted on the effect of sudden salinity changes on the physiology and toxin content of two *P. australis* strains showed that the favourable salinity range for growth, photosynthetic capacity and DA production was restricted to a salinity range of 30 to 35 (Ayache et al., 2018). In addition, high cellular DA quotas were found at salinity 40 for one strain, whereas the other strain released most of the DA into the medium at the same salinity, illustrating the intra-specific variability. A sudden change in salinity to higher or lower salinity levels (10, 20 and 40) resulted in growth inhibition, cell lysis and DA leakage into the medium (Ayache et al., 2018).

The present study was initiated to study, for the first time, the effect of salinity variation on growth and DA content of acclimated *P. australis* strains. Two strains were acclimated for several months to the different salinity conditions and afterwards monitored for two weeks in batch cultures. The effects of salinity change on growth, cell volume, photosynthetic capacity, nutrient consumption as well as DA content were assessed in order to increase our knowledge on which salinity conditions that trigger proliferation and toxicity of *Pseudo-nitzschia*.

### 3. *Materials and methods*

Two strains of *Pseudo-nitzschia australis*, IFR-PAU-16.1 and IFR-PAU-16.2, were isolated in May 2016 from the Bay of Arcachon, Atlantic coast of France (44°40'N, 1°10'W). The two strains were grown in 1L polystyrene flasks containing sterile L1 medium (Guillard and Hargraves, 1993). The *P. australis* strains were grown as batch cultures at 16°C exposed to a photon flux density of 120  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (fluora and cool-white fluorescent light, Osram, Germany) on a 12:12 h light:dark cycle. For culture medium, natural seawater with a salinity of 35 obtained from the English Channel was filter-sterilized through a 0.22  $\mu\text{m}$  polycarbonate membrane filter (Corning NY, USA) and enriched with L1 medium solutions; but adding silicate for a final concentration of 220  $\mu\text{M}$  (Guillard and Hargraves, 1993). Natural seawater with a salinity of 35 was used as control medium for comparison of salinity induced effects. The seawater was diluted with distilled water to reach salinities: 10, 20 and 30, and freeze-concentrated to increase the salinity up to 40.

#### 3.1. *Experimental set-up*

Prior to the experiment, cells were acclimated to the different salinities by inoculating exponentially growing stock cultures at salinity 35 into media with salinities of 40, 30, 20 and 10. Salinities were increased or decreased by a salinity increment of 5, and only after cultures had reached a constant growth rate at the previous salinity. At low salinity conditions (20 and 10), a salinity increment of 2 was needed to avoid cell death. However, even with this careful handling, cultures at salinity 10 did not exhibit growth. Cultures were grown and acclimated for four months in order to ensure a steady growth rate at the respective experimental salinities before starting the experiments.

For the experiments, the two strains, IFR-PAU-16.1 and IFR-PAU-16.2, were cultured in triplicates. Culture monitoring was carried out daily for 13 days at a fixed time of the day,

corresponding to the middle of the light cycle, by sampling 35 mL of each flask in order to measure cell growth, cell volume, effective quantum yield  $F_v/F_m$ , pigment and DA content.

### 3.2. Growth rate

The growth rate was monitored every day by cell counts of Lugol fixed samples (1 % final concentration) using a light microscope (Leica Microsystems Switzerland) at x10 magnification. For each sample, a minimum of 400 viable cells were counted using a Nageotte counting chamber. The specific growth rates ( $\mu$ ,  $d^{-1}$ ) were calculated using a minimum of three data points of the exponential growth phase, using a linear regression analysis, with a regression coefficient  $R^2 > 0.98$  for each salinity condition.

### 3.3. Cell volume

The cell volume of *Pseudo-nitzschia* cells was calculated based on a prism of a parallelogram base shape, as defined in Vadrucci et al. (2007). Therefore, for each experimental condition, a minimum of 50 cells in exponential growth phase were selected and measured using a Leica light microscope at x100 magnification equipped with a Leica digital camera and imaging software (Leica application suite 3. 1. 0, Switzerland). The cell volume was calculated as the mean  $\pm$  standard deviation of 50 cells using the following equation:

$V = \frac{1}{2} a \times b \times c$ , with a= length, b= width and c= thickness

### 3.4. Nutrient analyses

Dissolved inorganic nitrogen (nitrate, nitrite, and ammonium), phosphorus and silicate were measured on the last day of the experiment in order to determine the amount of remaining nutrients in the culture. Samples were obtained by filtering 10 mL of culture onto 25 mm

Whatman GF/F filters under low filtration pressure. The filtrate was stored frozen at -20°C except for silicate which was stored at 4°C until analyses. Analyses were carried out using a Seal Analytical auto analyzer using colorimetric techniques (Bendschneider and Robinson, 1952) optimized by Aminot et al. (2009).

### *3.5. Toxin analyses*

In order to determine the toxin content (particulate and dissolved fractions), 10 mL of culture was centrifuged (5 min, 3600 g, 4 °C) and separated into pellet and supernatant. DA concentration in the particulate fraction was determined by extraction of the residue in 1 mL methanol/water mixture (50/50: v/v). The extraction was prolonged by 15 minutes of sonication in an ice-cold bath then centrifuged and filtered (15 min, 8000 g, 4 °C, 0.2 µm) to recover the supernatant (Calu, 2011). Samples were then stored at -20 °C for later analyses.

DA content in the dissolved fraction was extracted by solid phase extraction SPE using Agilent Bond Elut 200 mg C<sub>18</sub> cartridges. The SPE column was conditioned with 10 mL of methanol followed by 10 mL of ultra-pure water. The sample was acidified with 20% aqueous formic acid (100 µL) then passed through the SPE column. The cartridge was rinsed with 10 mL of 0.2% aqueous formic acid then dried for 1 minute. DA adsorbed on the cartridge was eluted with 1.5 mL of methanol/water (50/50: v/v) into a glass vial and reserved at -20 °C for later analyses. DA analyses were performed using Ultra-Fast Liquid Chromatography (UFLC, Shimadzu) coupled to ABSciex API 4000QTrap triple quadrupole mass spectrometer. The separation was carried out on a Kinetex C18 column (150x2.1 mm, 2.6 µm, Phenomenex) equipped with a pre-column. Certified DA standard (CNRC, Halifax, Canada) was used for external calibration in order to quantify DA in seawater. Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were respectively 0.1 and 0.25 ng mL<sup>-1</sup>. The particulate and dissolved DA content were expressed on a per cell basis (pg cell<sup>-1</sup>).

### 3.6. Effective quantum yield $F_v/F_m$

The effective quantum yield of the primary photosystem PSII ( $QY=F_v/F_m$ ), which is an indicator of the cellular physiological condition, was measured every day (Maxwell and Johnson, 2000).  $QY$  measurements were obtained using a PhytoPAM Phytoplankton fluorometer (Walz, Effeltrich, Germany). For each culture,  $F_v/F_m$  was calculated using the following equation:

$QY= (F_m-F_0)/F_m$ , where  $F_0$  is the minimum fluorescence measured after a period of complete darkness and  $F_m$  is the maximum fluorescence obtained during a saturating light pulse when all reaction centers are closed.

### 3.7. Pigment measurements

To further assess the photosynthetic condition of cells exposed to different salinity treatments, pigment concentrations were measured by filtering 10 mL culture samples onto 25 mm Whatman GF/F filters. Filters were immediately frozen in liquid nitrogen and stored in the dark at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Pigments were extracted with 1 mL 100% acetone and the mixture was sonicated for 20 minutes in an ice-cold bath then incubated overnight at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Afterwards, the extract was filtered through a  $0.2\ \mu\text{m}$  syringe PTFE fiber filter (VWR International, USA) to remove any particulate and filter residues and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis. High-performance liquid chromatography (HPLC) analyses were performed on an Agilent 1200 HPLC instrument with a diode-array detector (Agilent Technologies, Massy, France) controlled by an OpenLAB CDS Chemstation software. The separation was carried out using a C18 XSelect HSS T3 column ( $150 \times 3\ \text{mm}$ ,  $3.5\ \mu\text{m}$ , Waters) equipped with a pre-column. The method used for the analysis was adapted from the protocol of Zapata et al. (2012). Pigment identification and quantification was done at 436 nm corresponding to the maximum absorbance peaks of chl *a* and its degradation product, chlorophyllide *a* (chl *a*) and at 450 nm for other pigments (fucoxanthin, chl *c*<sub>1</sub>, chl *c*<sub>2</sub>, divinyl protochlorophyllide (MgDVP), diadinoxanthin, diatoxanthin, zeaxanthin and  $\beta,\beta$  - carotene).

Pigments were then identified by comparison of the retention time and the UV spectra with commercial standards obtained from DHI (Denmark), except for the chl  $c_1$  quantified with the chl  $c_2$  spectra. The pigment concentrations were expressed as a percentage of the total cell pigment content according to the following equation:

$$\% = \left( \frac{\text{concentration of cell pigment (fg } \mu\text{m}^{-3})}{\text{concentration of total cell pigment (fg } \mu\text{m}^{-3})} \right) \times 100$$

### 3.8. Statistical analyses

The experiments were carried out in triplicate and the data presented as mean values  $\pm$  standard deviation (SD). Statistical analyses were performed to determine whether growth, effective quantum yield ( $F_v/F_m$ ), cell volume, pigments and DA content of the two strains varied significantly ( $p < 0.05$ ) between the different salinity conditions. All data were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Tukey HSD post-hoc test for multiple comparisons, in order to determine the source of significant differences. Data were normally distributed, as determined by the Shapiro-Wilk test, thus permitting the use of parametric statistical analyses. Analyses were performed using R software (version 3.4.1, 2017).



#### **4. Results**

Among the five salinity treatments tested, the two strains of *P. australis*, IFR-PAU-16.1 and IFR-PAU-16.2, were able to acclimate to salinities 20, 30, 35 and 40, whereas they did not grow below salinity 20 (data not shown).

##### *4.1. Effect of salinity variation on growth and cell volume*

For both strains, an increase in growth rate was observed with an increase in salinity. The highest growth rate ( $\mu$ ) was observed at salinity 40 ( $0.29 \text{ d}^{-1}$  and  $0.31 \text{ d}^{-1}$  for strain IFR-PAU-16.1 and IFR-PAU-16.2 respectively (Figure 11A, B). At the lowest salinity condition tested (20), growth rates were significantly lower ( $p < 0.05$ ) than at the other salinity conditions, which were not significantly different. The lowest cell densities were observed in the cultures acclimated to salinity 20 ( $12 \times 10^3$  and  $14 \times 10^3$  cells  $\text{mL}^{-1}$  for IFR-PAU-16.1 and IFR-PAU-16.2, respectively) and the maximum cell concentrations were obtained in cultures with high salinities, 40 and 35 for the strains IFR-PAU-16.1 and IFR-PAU-16.2 respectively ( $59 \times 10^3$  cells  $\text{mL}^{-1}$ ). Overall, the maximum growth rate ranged between  $0.18 \text{ d}^{-1}$  and  $0.29 \text{ d}^{-1}$  for strain IFR-PAU-16.1 and between  $0.17 \text{ d}^{-1}$  and  $0.31 \text{ d}^{-1}$  for strain IFR-PAU-16.2 (Figure 11A, B).

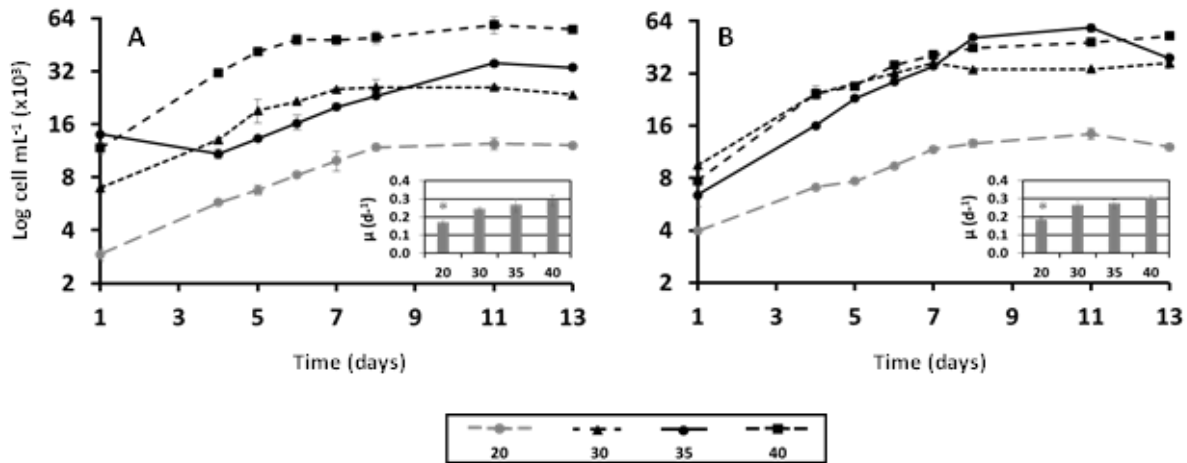


Figure 11: Growth curves for the two strains of *P. australis* IFR-PAU-16.1 (A) and IFR-PAU-16.2 (B) acclimated at different salinity conditions (20, 30, 35 and 40); y axis is displayed with semi-log scale. Insert: specific growth rate ( $\mu$ ) calculated during the exponential growth phase for each salinity condition. Data are means  $\pm$  SD,  $n=3$ . Error bars are not visible as they are smaller than the dots. \* Significant difference existed between cultures grown at salinities 20 compared with the other cultures at salinities 30, 35 and 40 ( $p < 0.05$ ).

The strains were isolated at the same time from the same geographical region and were grown in parallel under the four different salinity conditions. The initial cell volumes of the stock cultures for the control condition (salinity 35) were 1277 and 1702  $\mu\text{m}^3$  for IFR-PAU-16.1 and IFR-PAU-16.2, respectively. During the acclimation period (4 months), cell volumes decreased with a percentage of 62% and 43% for the strains IFR-PAU-16.1 and IFR-PAU-16.2, respectively, when grown at salinity 35. Thus, the cell volumes of IFR-PAU-16.1 and IFR-PAU-16.2 decreased by 3.8% and 2.6% per week respectively during the acclimation period. Among all salinity treatments, cell volumes ranged from 478 to 998  $\mu\text{m}^3$  for the strain IFR-PAU-16.1 and from 932 to 1352  $\mu\text{m}^3$  for strain IFR-PAU-16.2 (Figure 12). The highest cell volumes were obtained at

salinity 20 for both strains and were significantly higher ( $p < 0.05$ ) than the other cultures at salinities 30, 35 and 40, which did not differ significantly from each other.

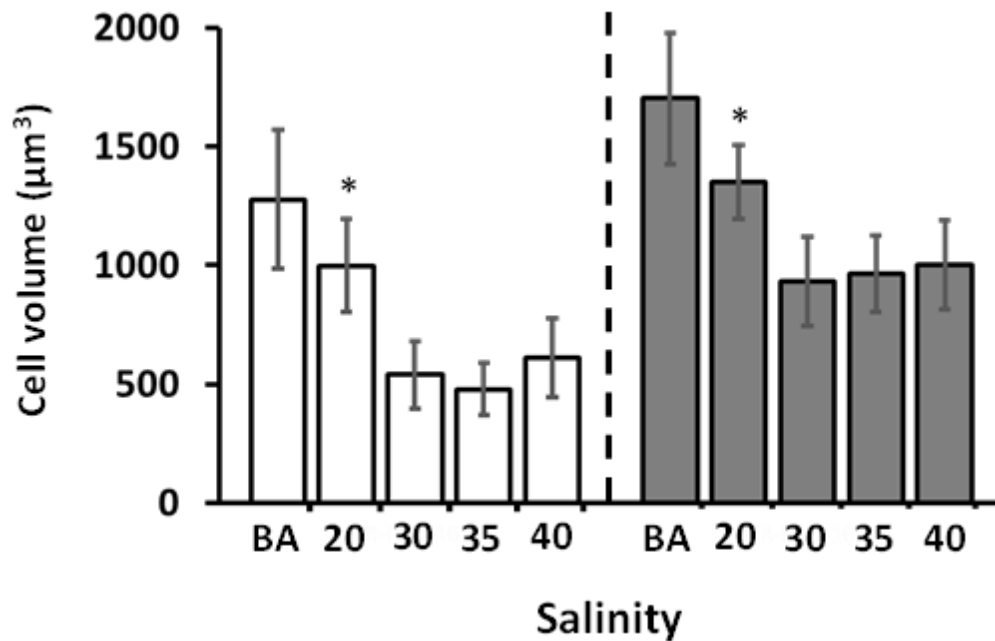


Figure 12: Mean cell biovolume of IFR-PAU-16.1 (white bars) and IFR-PAU-16.2 (grey bars) acclimated to diverse salinity conditions: 20, 30, 35 and 40. BA refers to the initial cell volume before acclimation. Data are expressed as mean  $\pm$  SD,  $n=50$ . \* Significant difference existed between cultures grown at salinities 20 compared with the other cultures at salinities 30, 35 and 40 ( $p < 0.05$ ).

#### 4.2. Effect of salinity variation on the photosynthetic capacity

During the experiment period where the cells were actively growing, the two studied strains displayed high effective quantum yield  $F_v/F_m$  values, ranging between 0.60 and 0.67, with no significant differences among all salinity treatments ( $p = 0.21$ ) (Figure 13A and B). Otherwise, the photosynthetic capacity profile followed the growth, as high  $F_v/F_m$  values were observed

during the exponential growth phase and then slowly decreased when the cells entered the stationary phase and reached a minimum during the last day of the experiment for all the salinity conditions (Figure 13A and B). Among all the salinity treatments, no significant differences in photosynthetic capacity were found among exponential ( $p = 0.71$ ) and stationary ( $p = 0.29$ ) growth phases for both tested strains.

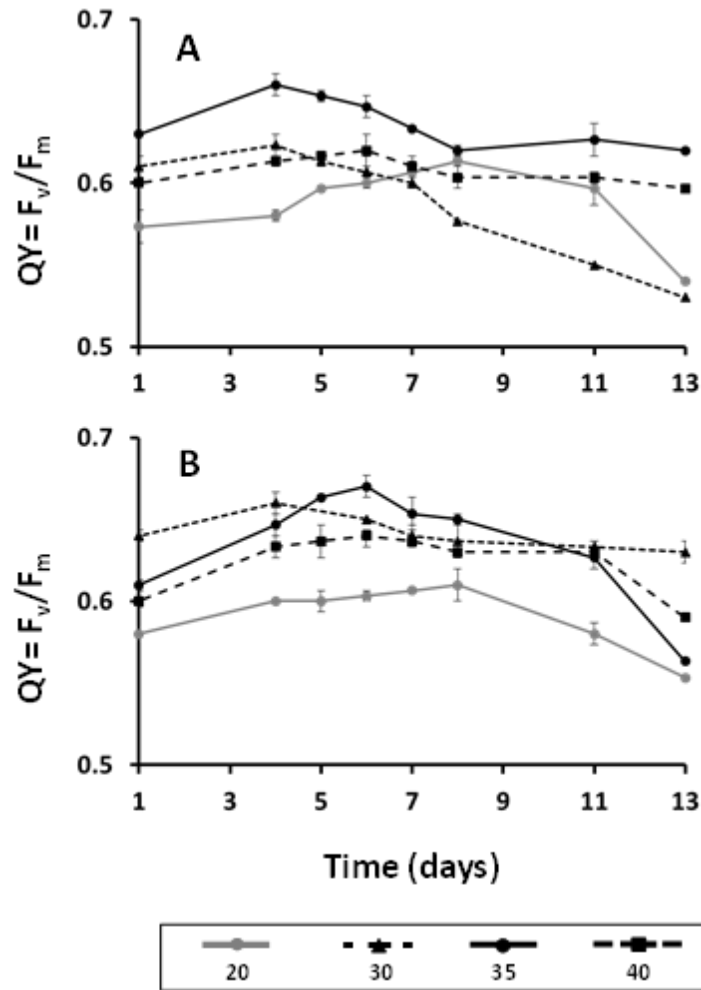


Figure 13: Variations in maximum photosynthetic activity ( $F_v/F_m$ ) for the strains IFR-PAU-16.1 (A) and IFR-PAU-16.2 (B) in response to the salinity conditions 20, 30, 35 and 40. Data are means  $\pm$  SD,  $n=3$ . Error bars are not visible as they are smaller than the dots.

The pigments chl *a* and its degradation product chl *a*, along with the accessory pigments (MgDVP, chl *c*<sub>1</sub>, chl *c*<sub>2</sub>, fucoxanthin, diadinoxanthin, diatoxanthin, and  $\beta$ ,  $\beta$ - carotene) were detected at all salinities for both *P. australis* strains (Figure 14). Pigment compositions as well as their temporal evolution during growth stages were similar for both strains, therefore only the results for the strain IFR-PAU-16.1 are shown (Figure 15A, B, C and D).

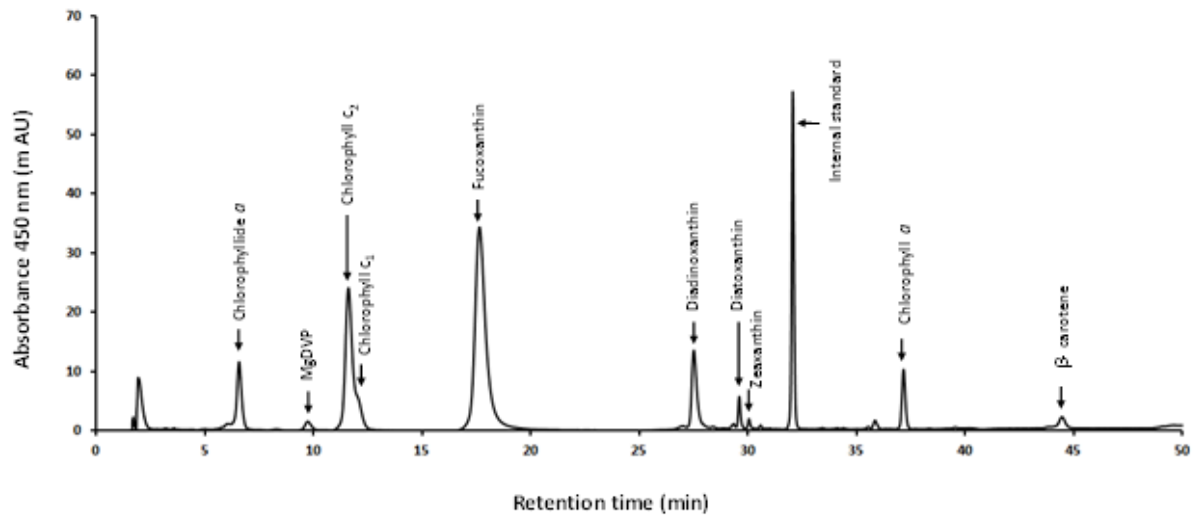


Figure 14: High performance liquid chromatogram obtained for the strain IFR-PAU-16.1 at 450 nm on the last day of the experiment showing all the identified pigments including the zeaxanthin.

In both strains, the major identified pigments were chl *a*, chl *a* and fucoxanthin and they comprised an average of 85% of the total pigment content in the cultures (Figure 15A, B and C). In addition, the temporal evolution of these pigments as well as the other minor ones (MgDVP, chl *c*<sub>1</sub>, chl *c*<sub>2</sub>, diadinoxanthin, diatoxanthin, and  $\beta$ ,  $\beta$ - carotene) showed no significant variations between the growth stages (exponential and stationary) (Figure 15A, B and C). Also, when comparing the pigment profiles among the different salinity conditions, no significant differences was found ( $p > 0.05$ ). Interestingly, during the stationary and decline phase, the pigment

zeaxanthin appeared above detection levels (LOD and LOQ were respectively 0.025 and 0.050 mg L<sup>-1</sup>) at salinity conditions 30, 35 and 40 (between 0.5 and 1% of the total pigment content), but at salinity 20 this pigment was not detected (Figure 15D).

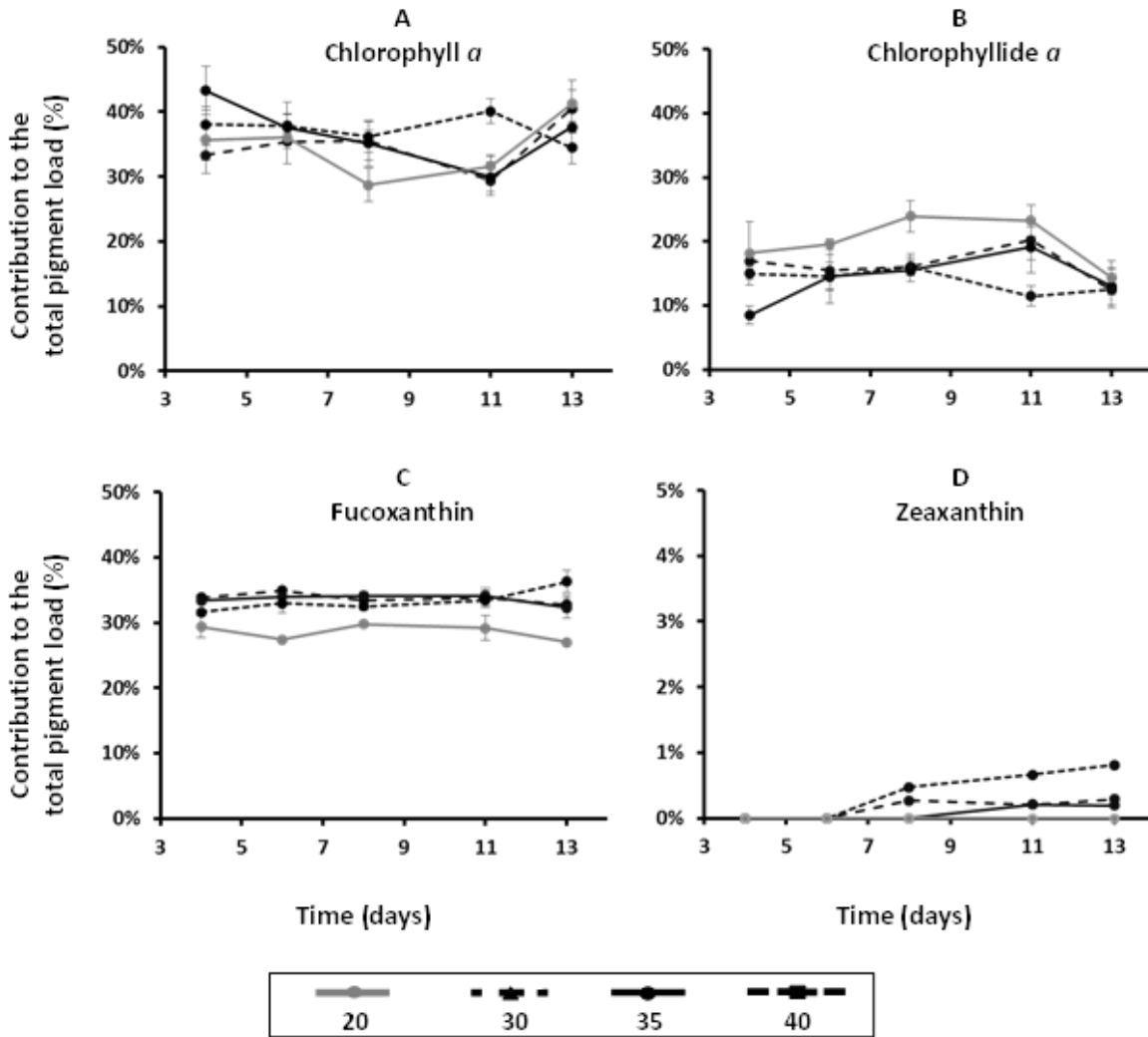


Figure 15: Temporal variations in pigment concentrations (chl a, chlide a, fucoxanthin and zeaxanthin) observed during the growth of the strain IFR-PAU-16.1 under different salinity conditions: 20, 30, 35 and 40. Data are means  $\pm$  SD, n=3.

### *4.3. Effect of salinity variation on toxin production*

At salinity 20, both strains contained a high pDA content that remained relatively stable throughout the experimental period ( $p=0.08$  and  $p=0.13$ , respectively), and ranged between 1.81 and 1.64  $\text{pg cell}^{-1}$  for IFR-PAU-16.1 and IFR-PAU-16.2 strains, respectively (Figure 16A and B). Stable pDA contents were also observed for the other salinities 30, 35 and 40, with average values of 0.19  $\text{pg cell}^{-1}$  and 0.17  $\text{pg cell}^{-1}$  throughout the experiment for strains IFR-PAU-16.1 and IFR-PAU-16.2, respectively, but with an almost 10-fold lower pDA content than detected at salinity 20. At salinity 35 for strain IFR-PAU-16.1 and salinity 40 for strain IFR-PAU-16.2, a minor increase in pDA was noted during the exponential growth phase, followed by a progressive decrease thereafter until the end of the experiment (0.61  $\text{pg cell}^{-1}$  and 0.45  $\text{pg cell}^{-1}$ , respectively at day 4) (Figure 16A and B). Surprisingly, pDA content for strain IFR-PAU-16.2 at salinity 35 remained very low (0.02  $\text{pg cell}^{-1}$ ) throughout the experiment with a slight increase (0.07  $\text{pg cell}^{-1}$ ) when cell concentration started to decline (days 11 to 13) (Figure 11B and Figure 16B). The initial particulate DA content (pDA) before the acclimation period (salinity 35) was 0.46  $\text{pg cell}^{-1}$  and 0.20  $\text{pg cell}^{-1}$  for IFR-PAU-16.1 and IFR-PAU-16.2, respectively (data not shown). During the acclimation period (4 months), pDA content decreased with a percentage of 24% and 65% for the strains IFR-PAU-16.1 and IFR-PAU-16.2, respectively, when grown at salinity 35.

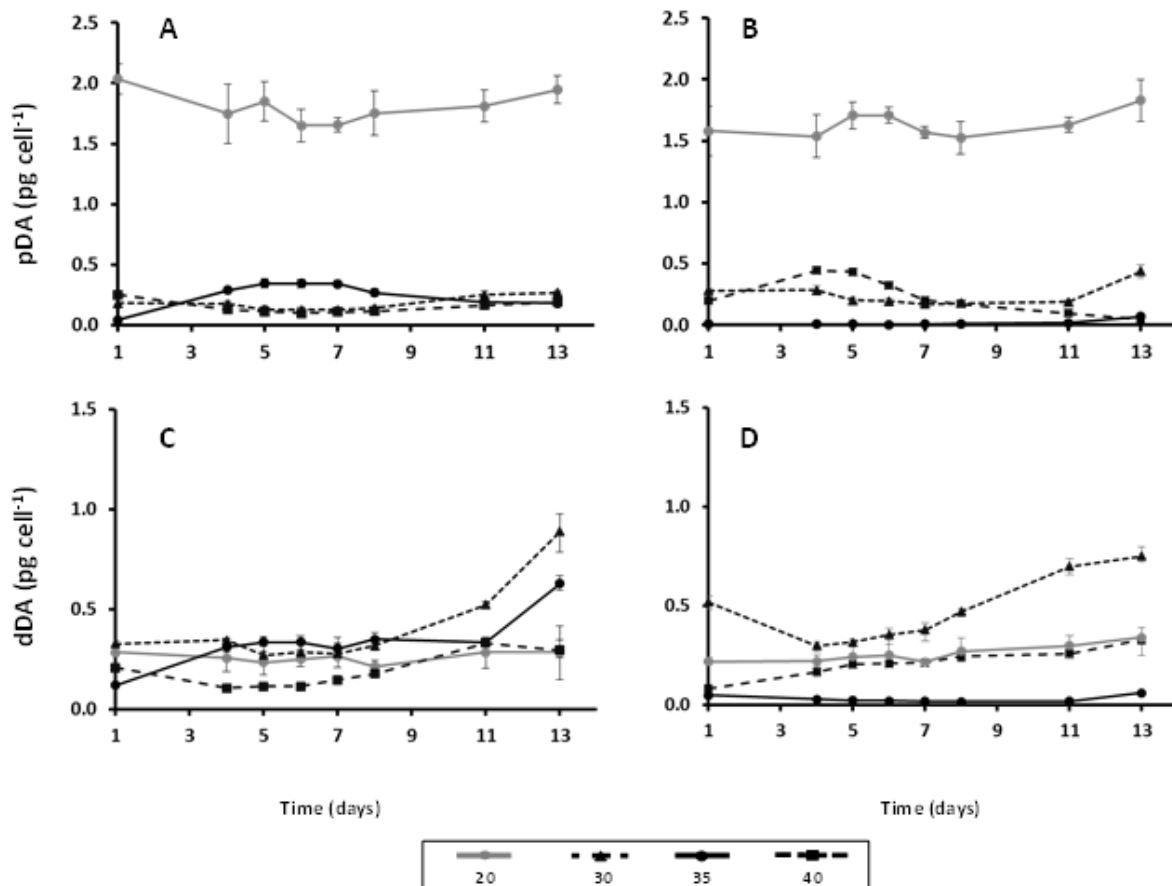


Figure 16: Particulate and dissolved domoic acid concentrations for the IFR-PAU-16.1 (A, C) and IFR-PAU-16.2 (B, D) strains subjected to different salinities: 20, 30, 35 and 40. Data are means  $\pm$  SD,  $n=3$ .

Dissolved DA contents remained essentially constant ( $p=0.98$  and  $p=0.96$ , respectively) during the exponential growth phase for both strains grown at all salinities, and ranged between 0.24 and 0.63  $\text{pg cell}^{-1}$  for IFR-PAU-16.1 and between 0.21 and 0.32  $\text{pg cell}^{-1}$  for IFR-PAU-16.2 at day 7 (Figure 16C and D). Thereafter, dDA content increased and achieved its highest level during late exponential and stationary growth phases, as cell division rate slowed, with concentrations ranging from 0.48 to 1.65  $\text{pg cell}^{-1}$  for the strain IFR-PAU-16.1 (Figure 16C) and from 0.25 to 0.80  $\text{pg cell}^{-1}$  for IFR-PAU-16.2 at day 13 (Figure 16D). At salinity 20, dissolved DA contents for the two strains remained relatively steady and low, with no significant difference ( $p > 0.05$ )



between growth phases (Figure 16A and B). The highest dDA values at salinity 20 measured at day 13 were 6 and 3-fold lower than those measured at salinity 30 (which overall had the highest dDA content) for strains for IFR-PAU-16.1 ( $0.26 \text{ pg cell}^{-1}$ ) and IFR-PAU-16.2 ( $0.25 \text{ pg cell}^{-1}$ ), respectively (Figure 16C and D).

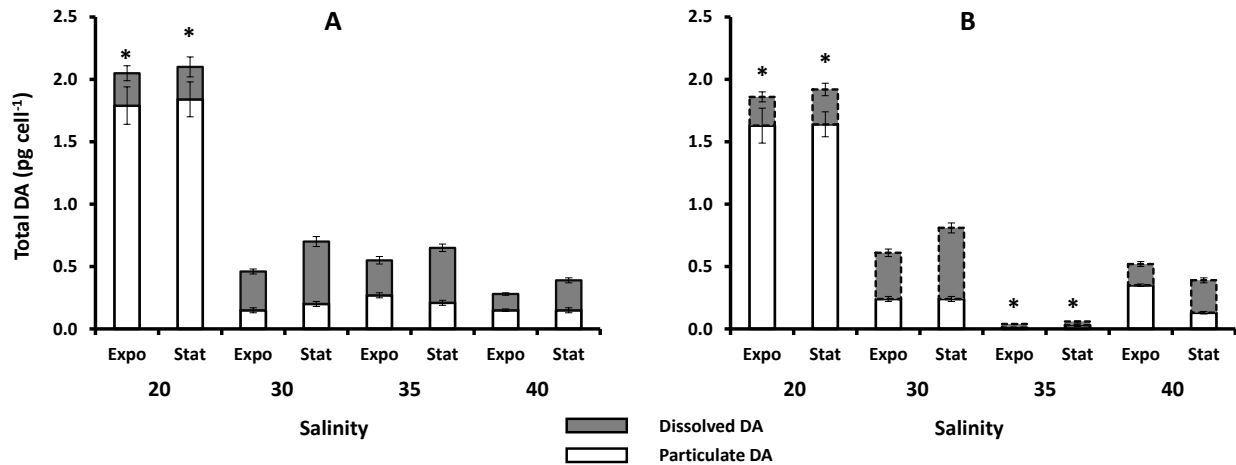
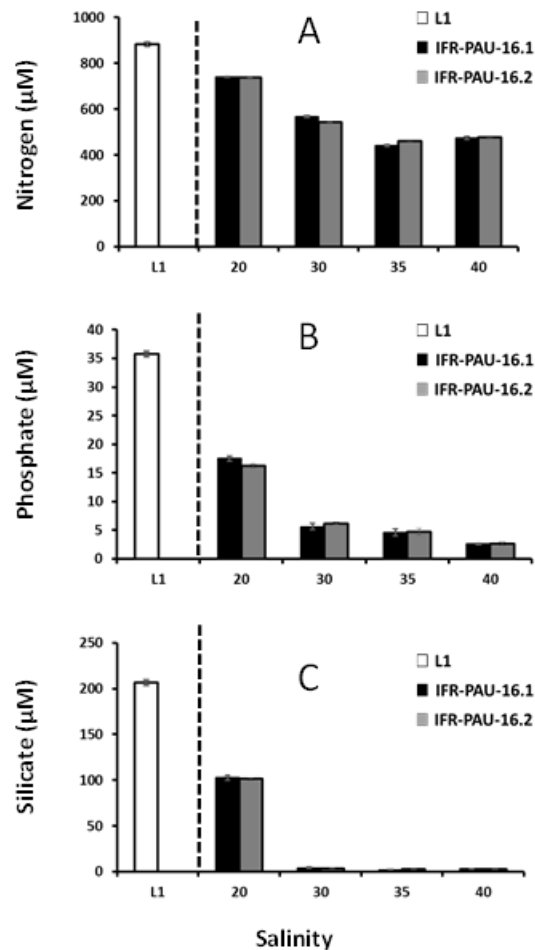


Figure 17: Percentage of particulate and dissolved domoic acid concentrations during exponential (Expo) and stationary (Stat) growth phase for the IFR-PAU-16.1 (A) and IFR-PAU-16.2 (B) strains subjected to different salinities: 20, 30, 35 and 40. Data are means  $\pm$  SD,  $n=3$ .

Dissolved DA content of the two strains grown at salinities 30, 35 and 40, represented the major part of the total DA content (up to 50 and 70% of the total DA content) produced during both growth phases (exponential and stationary) (Figure 17A and B). At salinity 20, dDA content accounted, however, only 13% and 15% of the total DA concentrations measured during both exponential and stationary growth phase, respectively (Figure 17A and B).

#### 4.4. Effect of salinity variation on nutrient consumption

Dissolved nitrogen (N), phosphorus (P) and silicate (Si) concentrations were measured on the last day of the experiment in order to determine which nutrients limited the growth and possibly influenced DA production when the cells became senescent in batch culture. The initial concentrations of dissolved N, P and Si measured in the growth L1 medium were equal to 883  $\mu\text{M}$ , 35.8  $\mu\text{M}$  and 206.5  $\mu\text{M}$ , respectively (*Figure 18A, B and C*). Cultures of both strains acclimated to salinity 20 showed low nitrogen, phosphate and silicate consumption equal to 16%, 45% and 50%, respectively (*Figure 18A, B and C*).



*Figure 18: Dissolved nitrogen (A), phosphate (B) and silicate (C) concentrations measured on the first day (L1) and the last day of the experiment for the strains IFR-PAU-16.1 and IFR-PAU-16.2 grown under different salinity conditions: 20, 30, 35 and 40. Data are  $\pm$  SD,  $n=3$ . Error bars are not visible as they are smaller than the dots.*

The concentrations of dissolved nitrogen (nitrate, nitrite) remained high (ranging from 442  $\mu\text{M}$  to 740  $\mu\text{M}$ ) at all conditions in both strains and were therefore not limiting. Moreover, dissolved P (2.6 - 5.6  $\mu\text{M}$ ) and Si (2.4 - 4.4  $\mu\text{M}$ ) concentrations were low but not limiting for both strains grown in all other salinity conditions (30, 35 and 40) (Egge and Aksnes, 1992) (*Figure 18A, B and C*).

## 5. Discussion

*Pseudo-nitzschia* species inhabit estuarine and coastal areas exposed to temporal and long-term changes in sea water salinity (Hallegraeff, 2004; Hasle and Lundholm, 2005; Thessen et al., 2005). Salinity fluctuations in these regions are mainly due to river discharge, rainfall or evaporation and seasonal or diurnal tidal amplitudes (Jewett and Romanou, 2017; Skliris et al., 2014). Climate change is expected to further intensify salinity fluctuations, leading to either higher salt content or increased freshwater inputs in coastal and estuarine waters worldwide (IPCC, 2007; McCabe et al., 2016). Consequently, such changes in salinity are likely to impact physiological and biochemical mechanisms in *Pseudo-nitzschia* cells, leading to differences in cell survival (Bates, 1998; Thessen et al., 2005).

### 5.1. Growth

Our results demonstrate a growth tolerance for the two tested *P. australis* strains in a salinity range from 20 to 40. None of the strains survived at salinities below 20, most probably due to osmotic stress resulting in direct cell lysis. This is not surprising as the two strains were isolated from the Bay of Arcachon (France) with seasonal salinity fluctuations between 20 and 36 (REPHY, 2017). The highest cell densities and growth rates for both strains were reached at salinities 30, 35 and 40. These salinities agree with salinities recorded in several areas of the French Atlantic coast and the English Channel during blooms of *P. australis* (Husson et al., 2016;

Nézan et al., 2010). By contrast, in a previous study, the same *P. australis* strains only grew at salinities 30 and 35, not at 20 or 40, following an abrupt transfer from 35 (Ayache et al., 2018). This suggests that salinity change needs to be progressive with small salinity intervals to allow potential adaptation. Previous laboratory and field studies also report high growth rates across the same salinity range for several other *Pseudo-nitzschia* species (*P. multiseriata*, *P. pungens*, *P. multistriata*, *P. calliantha*) with a marked decrease in growth for salinities below 20 (Doucette et al., 2008; Lundholm et al., 1997; Thessen et al., 2005; Villac et al., 2004).

The growth rates calculated in this study for IFR-PAU-16.1 and IFR-PAU-16.2 strains (0.29 and 0.31 d<sup>-1</sup> respectively) were 1.3- to 2.1-fold lower than those measured for the stock cultures four months prior to the experiments (0.39 and 0.65 d<sup>-1</sup> respectively). This is possibly due to a change in cell physiology (age of the culture, cell size) as previously pointed out (Casteleyn et al., 2010; Lelong et al., 2012; Moschandreu et al., 2012; Tesson et al., 2014; Thessen et al., 2009), and emphasizes that meaningful comparison of growth rates among strains is challenging and should be done with caution.

## 5.2. Cell volume

Over time, diatoms are well known to decrease in cell size during vegetative cell divisions. Reduced cell size, and therefore cell volume was thus expected, and found, for all cultures during the acclimation period. Across salinities, larger cell volumes were observed in cultures acclimated to the lowest salinity 20 compared to all other salinities. These high cell volumes (about 52% and 27% higher cell volumes at salinity 20 than the control salinity 35 for IFR-PAU-16.1 and IFR-PAU-16.2, respectively) were associated with low growth rates (about 1.6-fold lower growth rates than the control salinity 35 for both strains). This suggests that the osmotic pressure at salinity 20 induced a lower cell division rate, and that the larger volumes at salinity 20 may result from influx of water into the cells in order to restore the internal turgor pressure. Similar inverse correlation between growth rates and cell volumes have previously been reported

in 14 different diatom species by Williams (1964). Similarly, Roubex and Lancelot (2008) found that at lower salinity, the growth rate of *Cyclotella meneghiniana* was lower and the cell size was higher compared to the other high salinity levels tested.

### 5.3. Nutrients

The concentrations of remaining nutrients (Si, P and N) at salinity 20 were approximately 2- to 3-fold higher than all the other salinity treatments, corresponding to slower growth rates. At high salinities (30, 35 and 40), inorganic phosphate and silicate concentrations became low but not limiting in the medium (the average of remaining P and Si at these salinities was 3.1  $\mu\text{M}$  and 3.3  $\mu\text{M}$ , respectively) (Egge and Aksnes, 1992). We cannot exclude, however, that other factors such as high pH, limitation of light or other essential nutrients (vitamins and trace metals) may have become limiting (Lema et al., 2017; Martens et al., 2016; Pan et al., 1998).

### 5.4. Photosynthetic capacity and pigments

In the present study, the salinity variation did not affect the photosynthetic capacity and thus the two strains were well acclimated and in a favourable physiological state at the four salinities. Similarly, no differences in pigment profiles were observed among the four tested salinities. This confirms earlier findings of high efficiency of the photosynthetic apparatus of *Pseudo-nitzschia* species for adaptation to environments of variable salinity (Aizdaicher and Markina, 2011). The detection of zeaxanthin in late stationary and decline phase at salinities ranging from 30 to 40, however, suggests the initiation of stress behaviour of the *Pseudo-nitzschia* cells due to unfavourable conditions during these phases. Hyperosmotic conditions may trigger the formation of intracellular reactive oxygen species (ROS), (Chakraborty et al., 2011; Rout and Shaw, 2001), which can be critical since the generation of ROS may be irreversible and cell destructive. However, diatoms are known to be able to increase the production of xanthophylls including

zeaxanthin, another photoprotective mechanism, in order to avoid the ROS formation (Markina and Aizdaicher, 2016; Pelah et al., 2004). The increased production of zeaxanthin might hence be related to the prevention of cell damage and hence maintenance the photosynthetic abilities at high salinities (30, 35 and 40).

Whereas, the absence of zeaxanthin in both strains acclimated at salinity 20 may suggest that the dissipation of excess energy associated with the synthesis of this pigment is probably compensated to fulfil other important cell functions necessary for the osmoregulatory mechanisms for instance. Another plausible reason for the lack of zeaxanthin production in these cultures could be explained by the fact that cultures acclimated at the lowest salinity may have not been subjected to an increase in the pH in the culture media in comparison with the other salinity conditions (cell density was 2- to 5-fold lower at salinity 20 than the other salinities). Therefore, cells were probably not subjected to stress conditions in order to trigger zeaxanthin biosynthesis.

### 5.5. Domoic acid

Salinity variation had an impact on the toxin content of particulate and dissolved DA. The two *P. australis* strains produced DA throughout the different growth stages, and pDA and dDA concentrations differed clearly between the lowest salinity and the other salinities. For both strains, the pDA content at salinity 20 showed up to 2- and 3-fold higher concentrations compared to all other salinities, probably associated with the lower growth rate and larger cell volume. The high pDA amounts accumulated in cells were associated with low dDA release into the culture medium (up to 2- to 3-fold lower dDA than the highest values at salinity 30 for both strains).

DA has previously been hypothesized to play a role in the osmoregulation process of *Pseudo-nitzschia* cells (Bates, 1998; Jackson et al., 1992). The authors suggested that *Pseudo-nitzschia* cells increase DA production in order to adjust and maintain their effective cellular functions in

hypersaline conditions as the external osmotic pressure rises. In studies by Doucette et al. (2008), Van Meerssche and Pinckney (2017) and Pednekar et al. (2018), an increase in DA production was observed with increasing salinity, reinforcing this hypothesis. This is exactly the opposite of our experimental results, where an increase in total DA content was observed at the lowest salinity level. Similarly, in a previous study on instantaneous variation of salinity, DA did not seem to act as an osmolyte in *P. australis* strains as increasing salinity did not lead to an increase in cell DA concentration (Ayache et al., 2018).

The pDA concentrations remained relatively similar and constant throughout the experiment, except for the high salinities 35 and 40 (for strains IFR-PAU-16.1 and IFR-PAU-16.2, respectively), where an increase in pDA content was observed during exponential growth phase. Using the same strains, Ayache et al. (2018) also reported enhanced pDA content for *P. australis* strains during exponential growth phase at salinities ranging from 30 to 35. These results are also in agreement with previous studies which suggested that in nutrient-replete conditions (exponential growth), *Pseudo-nitzschia australis* cells were able to maintain high growth rates and high pDA content (Cochlan et al., 2008; Meredith D. Armstrong Howard et al., 2007; Martin-Jézéquel et al., 2015). In contrast, previous studies on other species (*P. multiseriata*) usually report lower pDA concentrations during exponential phase and enhanced pDA production during mid-stationary growth phase (Bates, 1998; Doucette et al., 2008). This diversity in DA production during growth stages may be accounted to the strong inter-specific variability that characterize the genus of *Pseudo-nitzschia* (Kim et al., 2015; Lundholm et al., 2006; Thessen et al., 2009).

Maximum dDA in IFR-PAU-16.1 and IFR-PAU-16.2 cells (at day 13) was detected in cultures grown at salinity 30 and represented 77% and 63% respectively, of the total cellular DA content (pDA and dDA). At salinity 20, maximum dDA represented, however, only 13% and 15%, respectively (0.28 and 0.34 pg cell<sup>-1</sup>, respectively) of the total DA. For both strains, the highest dDA content were measured during stationary growth phase in most of the salinity conditions tested (except for salinity 20), reaching their maximum values in the late stationary or decline

phase. Several studies also reported increasing in DA content during mid-stationary phase especially for other *Pseudo-nitzschia* species e.g. *P. multiseriis* (Bates, 1998; Bates and Trainer, 2006; Doucette et al., 2008; Lundholm et al., 2004; Maldonado et al., 2002). The authors associated increases in cellular DA quotas with reduction in cell growth rate due to the limitation of several macro- and micro-nutrients (P, Si, Cu and Fe) in this phase excluding conditions of nitrogen limitation as DA is a nitrogen-containing toxin. On the contrary, in this study, the total cellular DA content of the two *Pseudo-nitzschia* strains were not varying much between growth phases and were not restricted by limitation of nutrients. Rather, the main increase in DA content occurred when salinity resulted in reduced growth.

The highest total DA content (particulate and dissolved) differed substantially among the lowest salinity (20) and other salinities tested in this study (30, 35 and 40). For example, the strain IFR-PAU-16.1 showed 3- to 7-fold higher total DA concentrations at salinity 20 compared with salinities 30, 35 and 40 throughout the experiment. The total cellular DA contents (pDA and dDA) measured in this study at the different salinities (0.49 to 2.23 pg cell<sup>-1</sup> for IFR-PAU-16.1 and 0.13 to 2.17 pg cell<sup>-1</sup>) were similar to other *P. australis* strains grown under different culture conditions Anderson et al. (2006) (0.14 to 2.1 pg cell<sup>-1</sup>), Alvarez et al. (2009) (0.04 to 1.74 pg cell<sup>-1</sup>), Santiago-Morales et al. (2011) (0.81 to 1.87 pg cell<sup>-1</sup>) but lower than levels reported by Buck et al. (1992) (3 to 31 pg cell<sup>-1</sup>) and Cusack et al. (2002) (0.65 to 26 pg cell<sup>-1</sup>). This latter difference in toxicity is not surprising as intra-specific variability within *Pseudo-nitzschia* has been reported previously, even among strains of the same species isolated from the same geographical area (Ayache et al., 2018; Bates, 1998; Gai et al., 2018).

Previous laboratory and field studies have also shown that the *Pseudo-nitzschia* growth, seasonal occurrence as well as DA content (particulate and dissolved) are strongly correlated with the salinity fluctuations particularly in estuarine and coastal areas (Doucette et al., 2008; Downes-Tettmar et al., 2013; Lundholm et al., 1997; Pednekar et al., 2018; Quijano-Scheggia et al., 2008; Thessen et al., 2005; Van Meerssche and Pinckney, 2017). A laboratory study on *P. multiseriis* showed opposite trend of *P. australis*, as the *P. multiseriis* strain acclimated to salinity 20 was



able to maintain high growth rates (similar to salinities 30 and 40) and was associated with lower pDA and dDA concentrations compared to the higher salinities (30 and 40) (Doucette et al., 2008). The authors suggested that DA production is a high energy-consuming metabolite and that cells would rather use the energy generated from photosynthesis to sustain growth and maintain the osmotic balance at this low salinity level. This assumption on osmotic balance is in complete disagreement with our results, as we found lower growth and higher DA content at low salinity compared to the higher salinities.

In a field study, Van Meerssche and Pinckney (2017) showed a positive correlation between the abundance of *Pseudo-nitzschia* species, dDA concentrations and an increase in salinity. Similarly, *P. brasiliiana* populations along with total DA concentrations measured in the Bizerte Lagoon (Tunisia) were strongly influenced by salinity (Sahraoui et al., 2012). This toxic species became dominant in the fall in high salinity waters associated with high nutrient input, potentially leading to a high risk of shellfish contamination in this region. However, the abundance of *P. multistriata*, in the same lagoon was negatively correlated with salinity and positively related with other environmental variables such as temperature and turbidity (Sahraoui et al., 2012). Hence, the effect of different environmental factors on the abundance and toxin production seen to differ among species. This highlights the importance of testing several environmental factors that might influence growth and toxicity and testing these factors on multiple species and strains of *Pseudo-nitzschia* in order to more precisely assess the threat of ASP events.

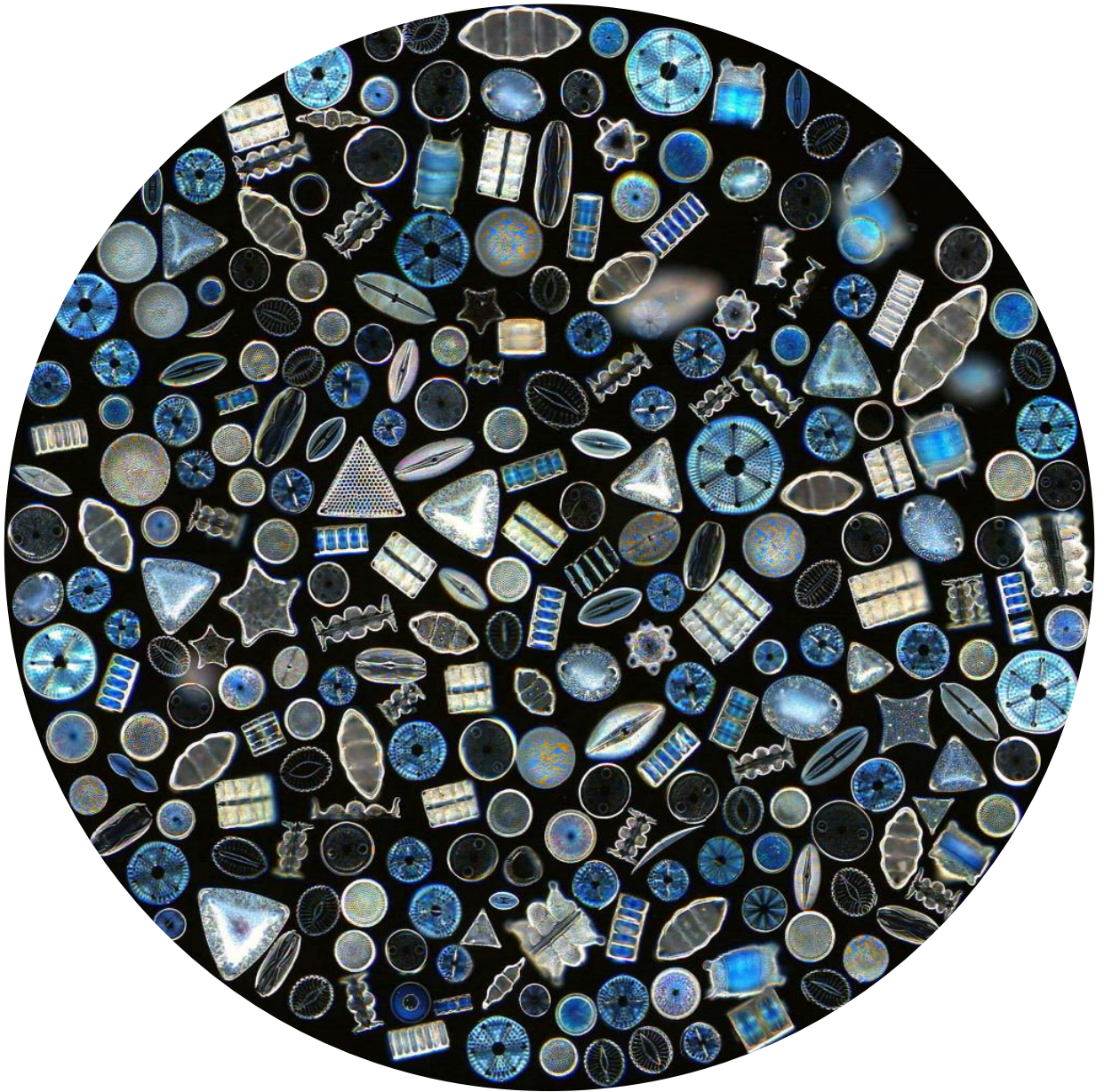
## **6. Conclusion**

The two toxic strains of *P. australis* showed capacity to acclimate to salinities ranging from 20 to 40, and no growth was detected below this range. An increase in salinity level was associated with increases in cell densities and growth rates. The lowest salinity condition led to a decrease in growth rate, a larger cell volume as well as high amounts of pDA and minimum toxin release into the medium. Hence, a decrease in salinity during periods of high streamflow (storms, precipitations and river discharge) can be potentially problematic as *Pseudo-nitzschia australis*

cells might be able to survive and produce high amounts of DA with high probability of toxic ASP events. Such event may have the greatest potential impact on harvesting areas in coastal and estuarine areas and on the shellfish industries in these areas.

### **Acknowledgments**

The authors acknowledge Ifremer and the Regional Council of the “*Région des Pays de la Loire*” for the PhD funding of Nour Ayache. The authors would like to thank Elizabeth Nézan and Nicolas Chomérat from Ifremer, Concarneau, France for providing and identifying the *Pseudo-nitzschia australis* strains. Thanks are also due to Karine Collin from Ifremer LER-MPL Nantes for nutrients analysis, and for Delphine Bourreau for her help in the extractions of toxin samples.



A.L. Brigger (California Academy of Sciences Diatom Collection)

# Chapitre IV: Impact de l'acidification de l'océan sur la croissance et le contenu toxinique de plusieurs souches toxiques et non toxiques de *Pseudo-nitzschia*

**Résumé:** Les effets de l'acidification de l'océan sur la croissance et le contenu en acide domoïque (AD) par les espèces toxiques de *Pseudo-nitzschia australis* et non toxique de *P. fraudulenta* ont été examinés dans cette étude. Trois souches de chaque espèce (y compris deux clones de *P. australis*) ont été acclimatées et mises en cultures en semi-continues à trois niveaux de pH 8,07, 7,77 et 7,40 afin de simuler les changements de pH de l'eau de mer, des niveaux actuels aux niveaux futur plausibles. Les taux de croissance de deux souches de *P. australis* n'ont pas été affectés par la variation du pH de 8,07 à 7,77, mais une diminution des taux de croissance de 15% à 33% a été détectée au pH le plus faible (7,40). Une dynamique opposée a été observé pour la troisième souche de *P. australis*, où une augmentation du taux de croissance a été associée à un pH décroissant de 8,07 à 7,40 (augmentation de 21%). Néanmoins, le changement de pH (de 8,07 à 7,77 et 7,40) n'a pas eu un effet sur les trois souches non toxiques de *P. fraudulenta*. Chez les souches toxiques de *P. australis* la concentration cellulaire maximale en AD a été observée à pH ambiant 8,07. La teneur totale en AD a diminué significativement avec la diminution du pH de 8,07 à 7,77 pour toutes les souches de *P. australis*, mais a ensuite augmenté à nouveau avec une diminution supplémentaire du pH (7,40) dans une seule souche, mais est restée inchangée dans les autres. Par conséquent, les variations de pH prévus d'ici la fin du siècle pourront influencer de manière conséquente la croissance et le contenu en AD de l'espèce toxique *P. australis*. De plus, la diversité des réponses physiologiques rapportées dans cette étude met en évidence une très forte variation inter et intra-spécifique au sein du genre *Pseudo-nitzschia*, mais également entre les clones d'une même souche.

**IMPACT OF OCEAN ACIDIFICATION ON GROWTH AND  
TOXIN PRODUCTION OF SEVERAL TOXIC AND NON-TOXIC  
*PSEUDO-NITZSCHIA* STRAINS**

**Ayache Nour**, Lundholm Nina, Gai Frederik Frøsig, Hervé Fabienne, Amzil Zouher, Caruana Amandine

Corresponding author: Ayache Nour, [nour.ayache@ifremer.fr](mailto:nour.ayache@ifremer.fr) ; Tel: +33 (0)2 40 37 40 00; Fax: +33 (0)2 40 37 42 41

Ayache Nour, IFREMER, Phycotoxin Laboratory, rue de l'Île d'Yeu, BP 21105, 44311 Nantes, France

Lundholm Nina, Natural History Museum of Denmark, University of Copenhagen, Øster Farimagsgade 5, 1307 Copenhagen, Denmark

Gai Frederik, Natural History Museum of Denmark, University of Copenhagen, Øster Farimagsgade 5, 1307 Copenhagen, Denmark

Hervé Fabienne, IFREMER, Phycotoxin Laboratory, rue de l'Île d'Yeu, BP 21105, 44311 Nantes, France

Amzil Zouher, IFREMER, Phycotoxin Laboratory, rue de l'Île d'Yeu, BP 21105, 44311 Nantes, France

Caruana Amandine M. N., IFREMER, Phycotoxin Laboratory, rue de l'Île d'Yeu, BP 21105, 44311 Nantes, France

## ***1. Abstract***

The effects of ocean acidification (reduced pH due to increased CO<sub>2</sub> uptake) on growth and domoic acid (DA) production were studied in strains of *Pseudo-nitzschia australis* and *P. fraudulenta* species. Three strains of each species (plus 2 subclones of *P. australis*) were acclimated and grown in semi-continuous cultures at three pH levels: 8.07, 7.77 and 7.40 in order to simulate changes of seawater pH from present to plausible future levels. The growth rates for two of the *P. australis* strains were not affected by pH variation from 8.07 to 7.77, but a decrease in growth rates on 15% to 33% was detected at the lowest pH (7.40). The opposite was found in the third *P. australis* strain, where an increase in growth rate was detected with pH decreasing from 8.07 to 7.40 (21% increase). No effect on growth with pH changing from 8.07 to 7.77 and 7.40 was observed for any of the three non-toxic *P. fraudulenta* strains.

The *P. australis* strains produced DA at all pH levels, and the highest cellular DA contents were found at pH 8.07. Total cellular DA content significantly decreased with decreasing pH from 8.07 to 7.77 for all *P. australis* strains, but re-increased thereafter with further decrease in pH (7.40) in one strain, but remained unchanged in the other strains. Hence, *P. australis* growth and DA production capacity will be strongly affected by changes in pH within the range expected by the end of the century. The diversity in the physiological responses in growth and DA production highlights a very strong inter- and intra-specific variation in *Pseudo-nitzschia*. Finally, the culturing history of a strain was found to be affecting both growth and DA content.

**Key words:** Climate change, domoic acid, ecophysiology, ocean acidification, *Pseudo-nitzschia*

## **2. Introduction**

Carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) concentration in the atmosphere increased from c. 278 ppm to 400 ppm during the pre-industrial period and is predicted to reach between 800 and 1000 ppm by the end of the 21st century (IPCC, 2013; Le Quéré et al., 2018). As atmospheric CO<sub>2</sub> concentrations continue to rise, the amount of concentrated CO<sub>2</sub> in the ocean will also increase. Approximately one-third of the anthropogenic CO<sub>2</sub> released to the atmosphere (CO<sub>2</sub> atm) has been absorbed by the world's oceans since 1850 (Le Quéré et al., 2018; Sabine et al., 2004). The dissolution of CO<sub>2</sub> in seawater (CO<sub>2</sub> (aq)) forms unstable carbonic acid (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), subsequently dissociating into carbonate ions (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) and bicarbonates (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) and releasing protons (H<sup>+</sup>). An increase in oceanic CO<sub>2</sub> uptake will result in increasing concentrations of bicarbonate and CO<sub>2</sub>\* (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>+CO<sub>2</sub> (aq)) and thus in decreasing seawater pH. The sum of carbonate, bicarbonate and CO<sub>2</sub>\* represents the dissolved inorganic carbon (DIC) of the ocean (Hartin et al., 2016; Morse et al., 2006; Stark et al., 2018).

Coastal and estuarine ecosystems are naturally exposed to pH fluctuation (maximally: pH 7.4 to pH 9.2) due to upwelling, water depth, tidal currents, residence time, photosynthesis and respiration of phytoplankton (Feely et al., 2008; Middelboe and Hansen, 2007). The oceanic pH has already decreased by 0.1 units (from 8.21 to 8.1) since the beginning of the industrial era, and may decrease by another 0.2-0.4 units by 2100 if CO<sub>2</sub> atm reaches 800 ppm (Feely et al., 2008; IPCC, 2013; Schnoor, 2014). This acidification may, however, have a significant impact on the physiology, proliferation and distribution of phytoplankton species in marine ecosystems (Orr et al., 2005). Variations in pH can have serious consequences on the function of marine ecosystems, from direct effects on the physiological responses of phytoplankton to indirect effects on food web and species interactions (Cornwall et al., 2013; Kroeker et al., 2013; Lundholm et al., 2004; Orr et al., 2005). Ocean acidification may affect the distribution of photosynthetic species, allowing certain species that benefits from high DIC availability (CO<sub>2</sub>\* and bicarbonate ions) to thrive and dominate the marine ecosystems (Rost et al., 2008).

Several species of the diatom *Pseudo-nitzschia* produce a neurotoxin, domoic acid (DA), which can cause serious ecological, economic and health problems due to the accumulation of the toxin in the marine food web. As anthropogenic CO<sub>2</sub> emissions continue to increase, it is critically important to understand how the physiology of *Pseudo-nitzschia* species, which can dominate coastal phytoplankton communities, may shift in response to the ongoing pH changes in the environment.

Presently, few studies have examined the effect of changing pH on the physiology of *Pseudo-nitzschia* species. The findings obtained show, however, different results with respect to growth and domoic acid production in different *Pseudo-nitzschia* species (Lundholm et al., 2004; Sun et al., 2011; Tatters et al., 2012; Trimborn et al., 2008; Wingert, 2017). A *P. multiseries* and *P. fraudulenta* strains showed an increase in growth rates and cellular DA concentrations at reduced pH (7.9) compared to pH 8.2 both when cultures were nutrient-limited and replete (Sun et al., 2011; Tatters et al., 2012). Furthermore, Wingert (2017) also showed an increase in DA production in a *P. australis* strain acclimated to low pH level (7.8) compared to pH 8.1, but, the growth rate was negatively affected (30% lower than at pH 8.1). Increased DIC concentration has been hypothesized to stimulate primary production of phytoplankton (Riebesell et al., 2007; Rost et al., 2008; Schippers et al., 2004). Thus, the increased availability of inorganic carbon at lowered pH conditions is expected to induce cell growth and DA production in *Pseudo-nitzschia* species (Sun et al., 2011; Tatters et al., 2012). Negative physiological responses (low growth rates) to lowered CO<sub>2</sub> (high pH levels) have been observed in other studies using different pH levels, methodologies and strains of *Pseudo-nitzschia*, as Lundholm et al., (2004) and Trimborn et al., (2008) observed an increase in DA content in *P. multiseries* when grown at elevated pH levels (pH 8.9) compared to pH 7.9 and 8.4. Finally, no change in the specific growth rates were observed in *P. multiseries* and *P. pungens* when maintained under a wide range of pH (from 5 to 9) (Cho et al. 2001). These apparently contradicting results could be linked to pH levels, inter- and intra-specific variability among *Pseudo-nitzschia* species and strains, as well as to the different experimental protocols employed (batch and semi-continuous cultures).



Most of the existing studies investigating the effect of changing pH on the physiology and DA production by *Pseudo-nitzschia* species used only one strain as representative of a species. Thus, considering the well-documented genetic and physiologic inter- and intra-specific variability of *Pseudo-nitzschia*, it is important to test several strains and species, optimally isolated from different geographical areas, in order to better understand the tolerance and toxin production capacity of *Pseudo-nitzschia* species in response to future decreases in seawater pH.

Therefore, the present study examined the effects of reduced pH on growth rate and DA production in acclimated strains of two *Pseudo-nitzschia* species isolated from different geographical areas. The aim was to simulate decreasing seawater pH from present (pH 8.07) to probable future levels (pH 7.77 and 7.40) using three toxic *P. australis* strains (including 2 subclones) and three non-toxic strains of *P. fraudulenta*. *P. australis* and *P. fraudulenta* are common and globally widespread species. Understanding how *Pseudo-nitzschia* species respond to a future, more acidic ocean is important in order to mitigate their harmful effects on health and economy of impacted marine ecosystems.

### **3. Materials and methods**

#### *3.1. Cultures and culture conditions*

Six different strains of *Pseudo-nitzschia* were included, three *P. fraudulenta* strains (PNfra167, PNfra169 and IFR-FRA-17) as non-toxic representatives, and three *P. australis* strains (IFR-PAU-17, L 3.4, L3-30 and L3-100) as toxin-producing strains. Before the experiments, two subclones, L3-30 and L3-100 were established from the same monoclonal culture (L3), which was split and grown at two different culture conditions: L3-100 was inoculated weekly at 100  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  cool white light for at least 3 months, while L3-30 was kept at 30  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  cool white light. Designation and information on strains are given in Table 1. All cultures were kept at 15°C in L1 medium (Guillard and Hargraves, 1993) based on autoclaved

seawater with a salinity of 32 and a pH value of 8.1. The L1 growth medium was selected to ensure nutrient-replete conditions for the cultures before and during the whole experiment (Lundholm et al., 2004).

**Tableau 7:** Information on *Pseudo-nitzschia* strains designations, sampling location and date, and sources.

<b>Species</b>	<b>Strain</b>	<b>Sampling location</b>	<b>Sampling date</b>	<b>Source</b>
<i>P. australis</i>	IFR-PAU-17	Brest harbor, Brest, France	10/2017	IFREMER, LER-BO, Concarneau, France
<i>P. australis</i>	L3.4	Namibian coasts	12/2016	National Marine Information and Research Centre (NatMIRC), Lüderitz and Swakopmund, Namibia
<i>P. australis</i>	L3-30	Namibian coasts	12/2016	National Marine Information and Research Centre (NatMIRC), Lüderitz and Swakopmund, Namibia
<i>P. australis</i>	L3-100	Namibian coasts	12/2016	National Marine Information and Research Centre (NatMIRC), Lüderitz and Swakopmund, Namibia
<i>P. fraudulenta</i>	PNfra 167	Luc-sur-Mer, English Channel, France	06/2017	UMR BOREA, Normandy university, France
<i>P. fraudulenta</i>	PNfra 169	Luc-sur-Mer, English Channel, France	06/2017	UMR BOREA, Normandy university, France
<i>P. fraudulenta</i>	IFR-FRA-17	Men Er Roué, Quiberon Bay, France	08/2017	IFREMER, Phycotoxins Laboratory, Nantes, France

### 3.2. Experimental set-up

The experiments were carried out at three different pH levels, 8.07 (representing ambient seawater pH level), 7.77 (projected end-of-century seawater pH) and 7.40 (projected pH level by 2300) (Caldeira and Wickett, 2003; IPCC, 2013). The L1 medium was acidified to reach the different pH levels (7.40 7.77 and 8.07) by adding gaseous CO<sub>2</sub> (Air Liquid Denmark A/S. UN 1013 Carbon Dioxide, Class 2, 2A, ADR).

The strains of *P. fraudulenta* and *P. australis*, including the two subclones L3-30 and L3-100, were grown in triplicates at the three different pH levels. The cells were acclimated to the different pH treatments for at least 20 generations, and were considered as being acclimated when growth rates did not vary more than  $\pm 0.05 \text{ d}^{-1}$  for at least three consecutive generations at each pH condition (MacIntyre and Cullen, 2005). All cells were grown in triplicate semi-continuous cultures in 65 mL Nunclon polystyrene flasks filled up to capacity with L1 medium of the specific pH value. The cultures were diluted daily, and 60% to 90% of the total culture volume was replaced with an equal volume of pH-specific medium. Dilutions allowed to keep cells in exponential growth phase (between 500 and 2000 cell mL<sup>-1</sup>) in order to avoid pH fluctuations. Cultures were kept in suspension by agitation on a plankton wheel (1 rpm) in a temperature-controlled room at 15°C, exposed to a photon flux density of 100  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  cool white light following a light: dark cycle of 16: 8 h. The pH level was measured before and after dilution using a WTW pH 340i pH-meter with a SenTix 41 electrode, with a sensor detection limit of 0.01. The pH-meter was calibrated daily (2-point calibration) using buffers of pH 7.00 and 10.00.

### 3.3. Growth monitoring

Cell growth was monitored on a daily basis for 14 days by cell counts (1 replicate) and Relative Fluorescence Unit (RFU) measurements. For cell concentrations, 1 mL samples were fixed with acidic Lugol's solution. Sub-sampling was carried out at approximately the same time of the day

every day. A light microscope Olympus CKX53 at 10× magnification and a Nageotte counting chamber were used, and a minimum of 400 cells were counted. For RFU measurements, 1 mL of each culture were transferred to a quartz cuvette and the RFU determined using a Trilogy® laboratory fluorometer (Turner Designs, San Jose, CA, USA). A standard curve ( $r^2 > 0.90$ ) relating both the RFU measurements and the cell counts was used to estimate the cell density for each replicate. The specific growth rate for the mean value of the triplicate cultures ( $\mu$ ,  $d^{-1}$ ) was calculated for the last four days of the experiment (when growth rates did not vary more than  $\pm 0.05 d^{-1}$ ) according to the following equation:

$$\mu = \ln \frac{(N_{t14}/N_{t11})}{t_{14} - t_{11}}$$

Where  $N_t$  is the cell density at a given time ( $t$ ) in days.

#### 3.4. Cell volume

The cell volume of each *Pseudo-nitzschia* strain was calculated at the end of the experiment based on a prism of a parallelogram base shape, as defined in Vadrucchi et al. (2007). Therefore, for each strain, 50 cells in exponential growth phase were selected and measured using an Olympus BX53 microscope at x100 magnification equipped with an Olympus DP74 digital camera and CellSens imaging software CellSens Entry v1.41. Cell volume measurement were made as mean  $\pm$  standard deviation of 50 cells with the assumption that the width and thickness of *Pseudo-nitzschia* cells are similar (Lundholm et al., 2004) using the following equation:

$$V = \frac{1}{2} a \times b^2 = \frac{1}{2} a \times b \times c$$

With a = length, b = width

### *3.5. Nutrient concentrations*

Dissolved nutrients concentrations were measured at the beginning and the end of the experiments. Samples ( $3 \times 24$  mL) for inorganic nitrate, phosphate and silicate were passed through polycarbonate  $0.2 \mu\text{m}$  filters and stored frozen at  $-20^\circ\text{C}$  immediately. Phosphate and silicate samples were analyzed with a Trilogy® laboratory fluorometer (Turner Designs, San Jose, CA, USA) using standard colorimetric techniques (Hansen and Koroleff, 1999). For analyses of inorganic nitrate, a modification of Solórzano & Sharp (1980) was used, and the samples were analyzed on an ALPKEM auto-analyzer.

### *3.6. Toxin profile (particulate and dissolved)*

On the last day of the experiment, 20 mL of exponentially growing culture was sampled for measuring particulate and dissolved DA fractions. Samples were centrifuged (3000 g, 15 min at  $4^\circ\text{C}$ ) and separated into cell pellet and supernatant. Particulate DA content in the cell pellets were suspended in 1 mL methanol/water mixture (50/50: v/v). The extraction was prolonged by 15 min of sonication in an ice-cold bath then centrifuged and filtered (8000 g, 15 min,  $4^\circ\text{C}$ ,  $0.2 \mu\text{m}$ ) to recover the supernatant and stored at  $-80^\circ\text{C}$  for later analysis (Calu, 2011). DA content in the dissolved fraction was extracted by solid phase extraction (SPE) using Agilent Bond Elut 200 mg  $\text{C}_{18}$  cartridges. The SPE column was conditioned with 10 mL methanol followed by 10 mL high purity water. The sample was acidified with 20% aqueous formic acid (200  $\mu\text{L}$ ) then passed through the SPE column. The cartridge was rinsed with 10 mL of 0.2% aqueous formic acid then dried for 1 minute. DA was eluted with 1.5 mL of methanol/water (50/50: v/v) into a glass vial and stored at  $-80^\circ\text{C}$  for later analysis.

DA analyses were performed using Ultra-Fast Liquid Chromatography (UFLC, Shimadzu) coupled to an ABSciex API 4000 Q-Trap (triple quadrupole mass spectrometer). The chromatographic separation was carried out on a Kinetex  $\text{C}_{18}$  column ( $150 \times 2.1$  mm,  $2.6 \mu\text{m}$ ,

Phenomenex) equipped with a pre-column. Certified DA standard (CNRC, Halifax, Canada) was used for external calibration range in order to quantify DA. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were respectively 0.1 and 0.25 ng mL<sup>-1</sup>. The particulate (pDA) and dissolved DA (dDA) contents were expressed on a per cell basis (pg cell<sup>-1</sup>). Total DA (tDA) is calculation by addition of pDA and dDA.

#### *Dissolved inorganic carbon*

The concentration of dissolved inorganic carbon (DIC) in the medium in all three pH treatments was measured in triplicates at the end of the experiment. DIC samples (2 × 12 mL) were stored in airtight borosilicate flasks without headspace (to avoid CO<sub>2</sub> leaking out of the water phase) in the dark at 4°C until measurements. DIC concentrations were measured on 1 ml subsamples using an infrared gas analyzer (ADC 225 Mk3, Analytic Development Co. Ltd., Hoddesdon, England) as described in detail elsewhere (Nielsen et al., 2007). The carbon speciation (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> and CO<sub>2</sub>\* [\*includes H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and CO<sub>2</sub>]) was calculated from pH and DIC concentration at a temperature of 16°C and salinity 32. Calculations were made using the CO2SYS program and the following available inputs: set of constants: K1, K2 from Mehrbach et al. (1973) refit by Dickson & Millero (1987); KHSO<sub>4</sub>: Dickson; pH scale: seawater (SW) scale (mol kg<sup>-1</sup> SW) (Lewis and Wallace, 1998).

#### *Statistical analysis*

The experiments were carried out in triplicate and the data presented as mean values ± standard deviation (SD). Statistical differences among growth rates, cell volumes, nutrients concentrations and DA content at the different pH levels were determined using a one-way analysis of variance (ANOVA). A pair-wise Tukey HSD multiple comparisons test was performed to identify differences between each pH treatment. Data were normally distributed, as determined by the

Shapiro-Wilk test, thus permitting the use of parametric statistical analyses. The level of significance ( $\alpha$ ) was set to 0.05 for all statistical tests employed in this study. All statistical analyses were conducted using R software (version 3.4.1, 2017).

#### **4. Results**

##### *4.1. Effect of pH variation on growth and cell volume*

The growth rates of the *Pseudo-nitzschia australis* strains were significantly affected by the pH condition. Our results showed that the highest growth rate for strains IFR-PAU-17, L3-30 and L3-100 occurred at pH 8.07 and 7.77, and were not significantly different ( $p > 0.05$ ) (i.e. 2.69 and 2.65  $d^{-1}$  at pH 8.07 and 7.77 respectively for strain L3-30) (Figure 19A). Growth rates significantly decreased when pH was lower than 7.77 ( $p < 0.05$ ) (Figure 19A). On the contrary, for *P. australis* L 3.4 strain, a significant increase in growth rate ( $p < 0.05$ ) was observed with decreasing pH from 8.07 to 7.77 (1.43 and 1.66  $d^{-1}$ , respectively), and a continued increase was observed between pH 7.77 and 7.40 (1.66 and 1.73  $d^{-1}$ , respectively) ( $p = 0.12$ ) (Figure 19A). In *P. australis* the overall highest growth rate was observed in L3-30 at pH 8.07 (2.69  $d^{-1}$ ), which was 1.4-fold higher than in L3-100 (1.91  $d^{-1}$ ), followed by IFR-PAU-17 grown at the same pH (1.68  $d^{-1}$ ) (Figure 19A). The overall lowest growth rate was obtained in strain L 3.4 at the same pH, 8.07 (1.43  $d^{-1}$ ) (Figure 19A).



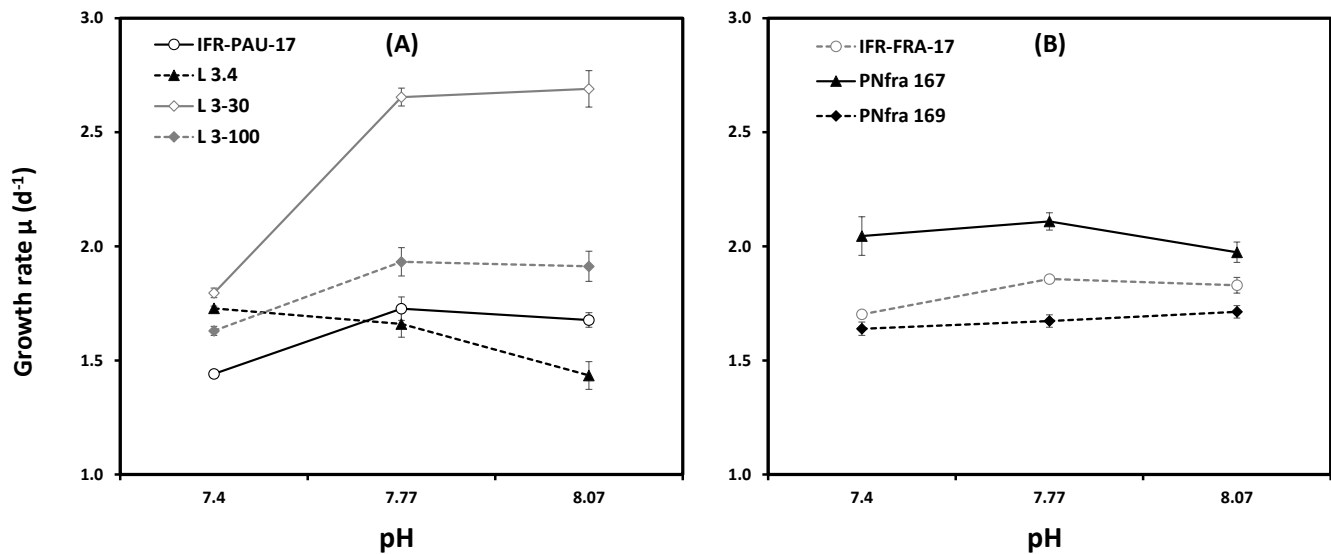


Figure 19: Mean specific growth rate ( $d^{-1}$ ) for *P. australis* strains (A) (IFR-PAU-17, L 3.4, L 3-30 and L 3-100) and *P. fraudulenta* strains (B) (IFR-FRA-17, PNfra 167 and PNfra 169) acclimated at three different pH levels (pH= 7.4, 7.77 and 8.07). Error bars represent  $\pm$  SD,  $n=3$ .

Interestingly, for the three *P. fraudulenta* strains, growth rates were not significantly affected by the pH level ( $p > 0.05$ ). The growth rate ranged between 1.75 and 1.64  $d^{-1}$  in strain IFR-FRAU-17 and between 1.83 and 1.70  $d^{-1}$  in strain PNfra167 grown at pH 8.07 and 7.4, respectively (0B). In *P. fraudulenta*, the highest growth rate was obtained in PNfra167 at pH 7.77 (2.1  $d^{-1}$ ) and the lowest in strain IFR-FRA-17 at pH 7.4 (1.64  $d^{-1}$ ) (Figure 19B).

The cell volume ranged between 629  $\mu m^3$  and 1642  $\mu m^3$  for the *P. australis* strains and between 495  $\mu m^3$  and 884  $\mu m^3$  for the *P. fraudulenta* strains (Figure 20A and B). In *P. australis*, the highest cell volume was observed in strain L3-30 (1642  $\mu m^3$ ) which did not differ significantly from strains IFR-PAU-17 and L3-100 (1241 and 1112  $\mu m^3$ , respectively). The lowest cell volume, however, was obtained in L3.4, and was significantly lower ( $p < 0.05$ ) than all the other

*P. australis* strains (Figure 20A). The cell volumes for the subclones L3-30 and L3-100 were affected by the culturing history ( $p < 0.05$ ) (Figure 20A).

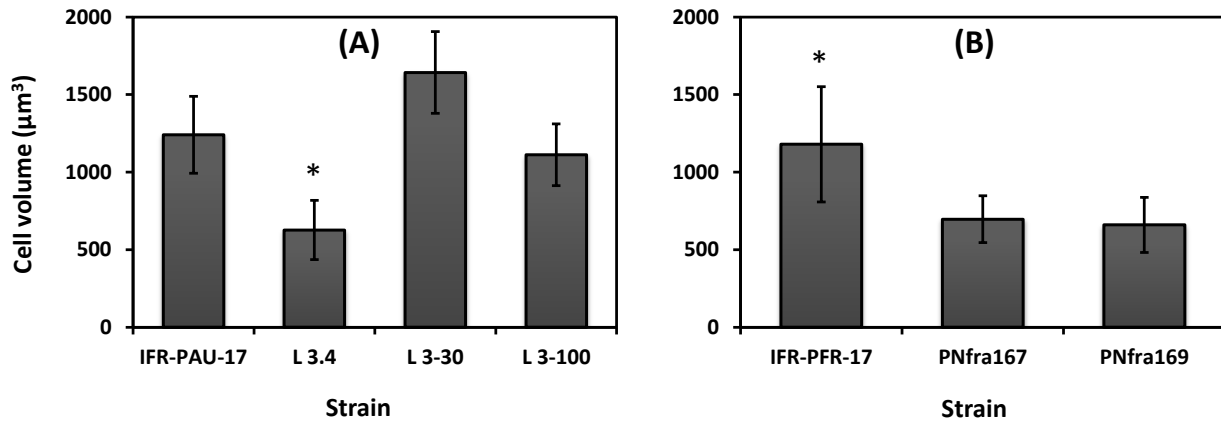


Figure 20: Initial mean cell volume ( $\mu\text{m}^3$ ) for (A) *P. australis* strains (IFR-PAU-17, L 3.4, L 3-30 and L 3-100) and (B) *P. fraudulenta* strains (IFR-FRAU-17, PNfra 167 and PNfra 169) measured at the beginning of the experiment. Error bars represent  $\pm$  SD,  $n=50$ .

Cell volume of L3-100 (grown at high light) was 32% lower than L3-30 (kept at low light) (1112 and 1642  $\mu\text{m}^3$ , respectively) (Figure 20A). In *P. fraudulenta*, the highest cell volume, obtained in strain IFR-FRAU-17 (1179  $\mu\text{m}^3$ ), differed significantly from the two other strains PNfra167 and PNfra169 (696 and 660  $\mu\text{m}^3$ , respectively) (Figure 20B). The two strains, PNfra167 and PNfra 169, isolated at the same time from the same geographical area and grown under the same growth conditions had similar cell volumes ( $p = 0.36$ ) (Figure 20B).

#### 4.2. Dissolved nutrients and inorganic carbon (DIC) content

The pH in all the experimental treatments fluctuated minimally ( $< \pm 0.02$  units) from the designated pH levels of 8.07, 7.77 and 7.40 throughout the experimental period (Figure 21).

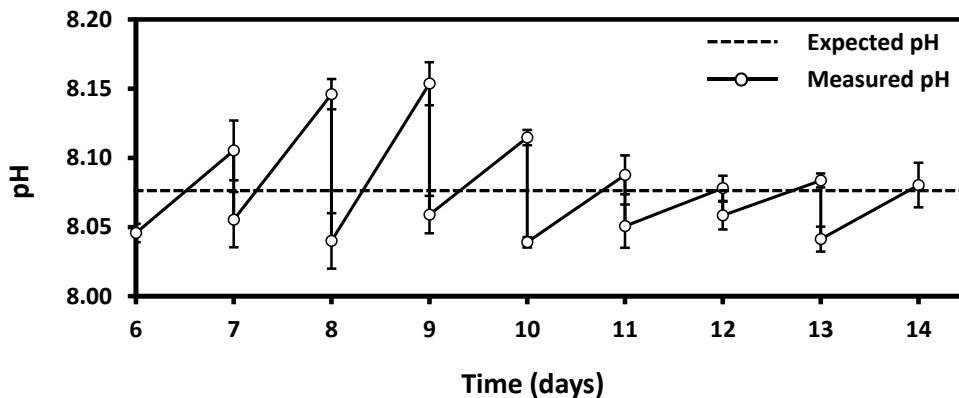


Figure 21: Example of pH adjustments for the culture of *P. australis* IFR-PAU-17 strain under the pH treatment 8.07. The first days represent the acclimation period and are not included in the results. Error bars represent  $\pm$  SD,  $n=3$ .

Dissolved nitrogen (N), phosphate (P) and silicate (Si) concentrations were measured on the last day of the experiment in all strains grown under different pH levels (see supplementary data Table S2). The initial concentrations of dissolved N, P and Si measured in L1 medium were equal to 883.4  $\mu$ M, 36.1  $\mu$ M and 157.8  $\mu$ M, respectively (see supplementary data Table. S1). For all pH treatments, no significant differences in nutrient consumption were found among *P. australis* and *P. fraudulenta* strains ( $p > 0.05$ ). The mean nutrient concentrations in all strains acclimated at the different pH levels were equal to 664  $\mu$ M for dissolved N, 33.5  $\mu$ M for dissolved P and 144.8 for dissolved Si (see supplementary data Table. S1), and hence, we conclude that cells of none of the strains were not nutrient-limited at any of the pH levels.

The DIC concentrations measured in the *P. australis* strains of ranged between 1924 and 2104  $\mu$ mol  $\text{kg}^{-1}$ , and between 2016 and 2173  $\mu$ mol  $\text{kg}^{-1}$  for *P. fraudulenta* strains for all pH treatments (Figure 22A and B, Figure 23).

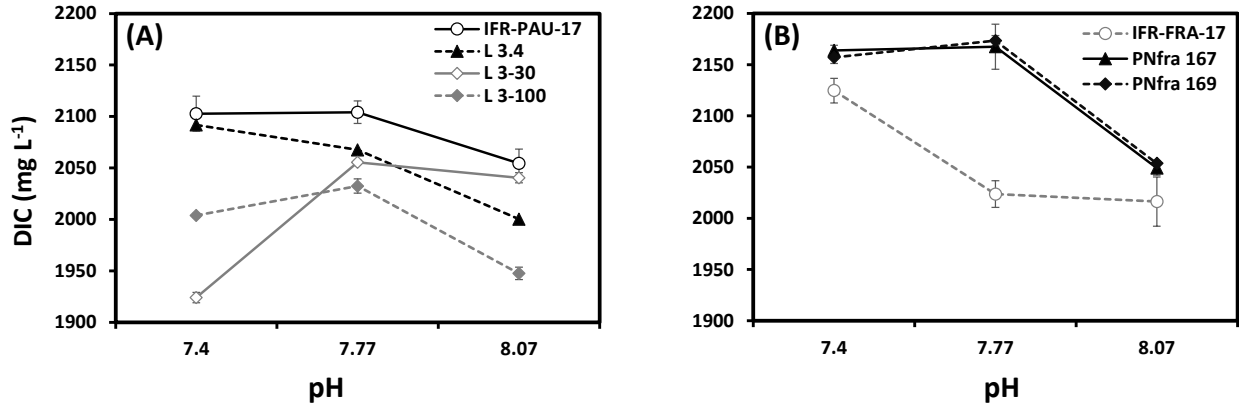


Figure 22: Dissolved inorganic carbon (DIC) concentrations measured at the end of the experiment for *P. australis* (A) strains (IFR-PAU-17, L 3.4, L 3-30 and L 3-100) and *P. fraudulenta* (B) strains (IFR-FRA-17, PNfra 167 and PNfra 169) acclimated at three different pH levels (pH= 7.4, 7.77 and 8.07). Error bars represent  $\pm$  SD, n=3.

In all strains, the concentrations of  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$  and  $\text{CO}_2$  were significantly different among the pH treatments ( $p < 0.05$ ) (Figure 23). In all pH treatments, the carbon speciation of DIC was dominated by bicarbonate ion ( $\text{HCO}_3^-$ ) followed by the carbonate ion ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) and carbon dioxide. The concentrations of  $\text{HCO}_3^-$  (91% to 95%) and  $\text{CO}_2$  (1% to 3%) increased with decreasing pH from pH 8.07 to pH 7.40, respectively, whereas the concentrations of  $\text{CO}_3^{2-}$  decreased (8% to 2%) (Figure 23 and Table S2).

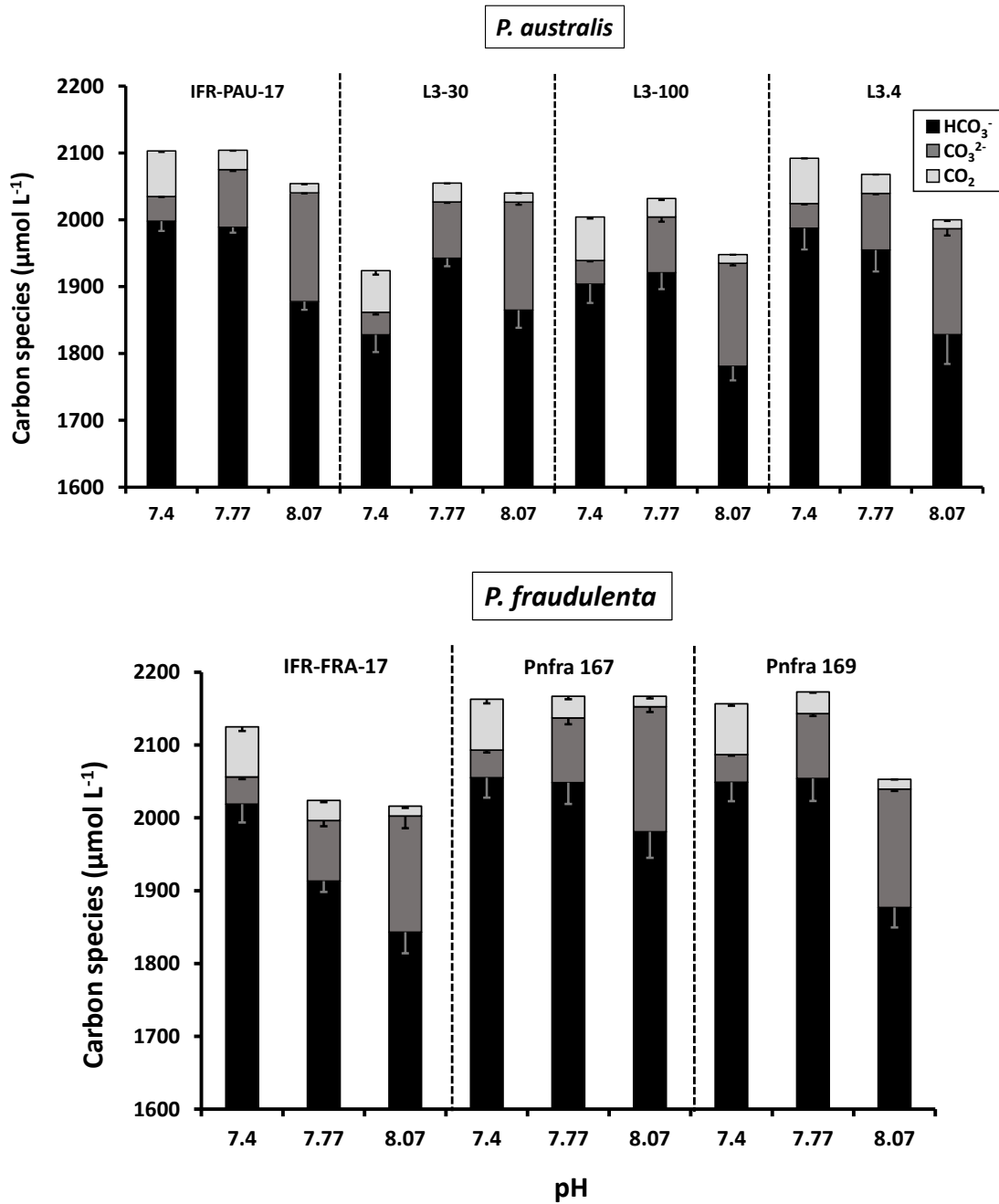


Figure 23: Carbonate speciation (mean  $\pm$  SD) of *P. australis* (A) and *P. fraudulenta* (B) strains measured at each of the three pH treatments. Concentrations of  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$  and  $\text{CO}_2$  were calculated from pH and DIC concentrations at a temperature of 16°C and salinity of 32 using the Mehrbach equilibrium constants as refit by Dickson & Millero (1987).

#### 4.3. Effect of pH variation on toxin content

No particulate (pDA) or dissolved domoic acid (dDA) contents were detected in any of the *P. fraudulenta* strains at a detection limit of 0.1 ng mL<sup>-1</sup>. The *P. australis* strains confirmed their capability to produce DA (pDA and dDA) at all three pH levels tested (Figure 24A, B and C).

Particulate DA content decreased significantly ( $p < 0.05$ ) with pH decreasing from 8.07 to 7.77 for most of the *P. australis* strains (L3, L3.16 and IFR-PAU-17), whereas DA content was unchanged in last strain (Figure 24A). For pH decreasing further to 7.40, DA content was unchanged except in one strain (IFR-PAU-17) where it increased. The highest pDA content was detected in IFR-PAU-17 at pH 8.07 (2.49 pg cell<sup>-1</sup>), and it significantly decreased (10-fold lower, 0.25 pg cell<sup>-1</sup>) at pH 7.77, and increased again thereafter at pH 7.4 (1.23 pg cell<sup>-1</sup>) (Figure 24A). The two clones L3-30 and L3-100 showed similar patterns for pDA contents at the three pH treatments, with no significant differences in pDA contents at pH 7.77 and 7.4 ( $p > 0.05$ ) (i.e. 0.63 and 0.70 pg cell<sup>-1</sup> for strain L3-100 at pH 7.77 and 7.4, respectively) (Figure 24A). The highest pDA content in L3-100 was observed at pH 8.07 (1.64 pg cell<sup>-1</sup>), which was significantly (4-fold) higher than the pDA content of L3-30 acclimated at the same pH (0.37 pg cell<sup>-1</sup>). The lowest pDA content was obtained in L3.4 and it did not differ significantly ( $p = 0.85$ ) among the three pH levels tested (0.07 pg cell<sup>-1</sup> at pH 7.4, 7.77 and 8.07) (Figure 24A).

Similar to pDA, dDA content decreased significantly with pH decreasing from 8.07 to 7.77 for all the *P. australis* strains (Figure 24B). At pH 8.07, dDA content was significantly higher in IFR-PAU-17 strain (1.04 pg cell<sup>-1</sup>) ( $p < 0.05$ ) compared to the three other strains L3-100 (13-fold), L3.4 (26-fold) and L3-30 (52-fold) at the same pH (Figure 24B). In strain IFR-PAU-17, dDA showed a pattern similar to pDA, where the highest dDA content was measured at pH 8.07 (1.04 pg cell<sup>-1</sup>), it significantly decreased ( $p < 0.05$ ) at pH 7.77 (0.18 pg cell<sup>-1</sup>, almost 6-fold lower), and increased again thereafter at pH 7.4 (0.60 pg cell<sup>-1</sup>) (Figure 24B). Likewise, strain L3-100

showed no significant difference between the dDA contents at pH 8.07 and 7.4 (0.08 and 0.07 pg cell<sup>-1</sup>, respectively), however, at pH 7.77 the dDA concentration was 2-fold lower (0.04 pg cell<sup>-1</sup>) (Figure 24B).

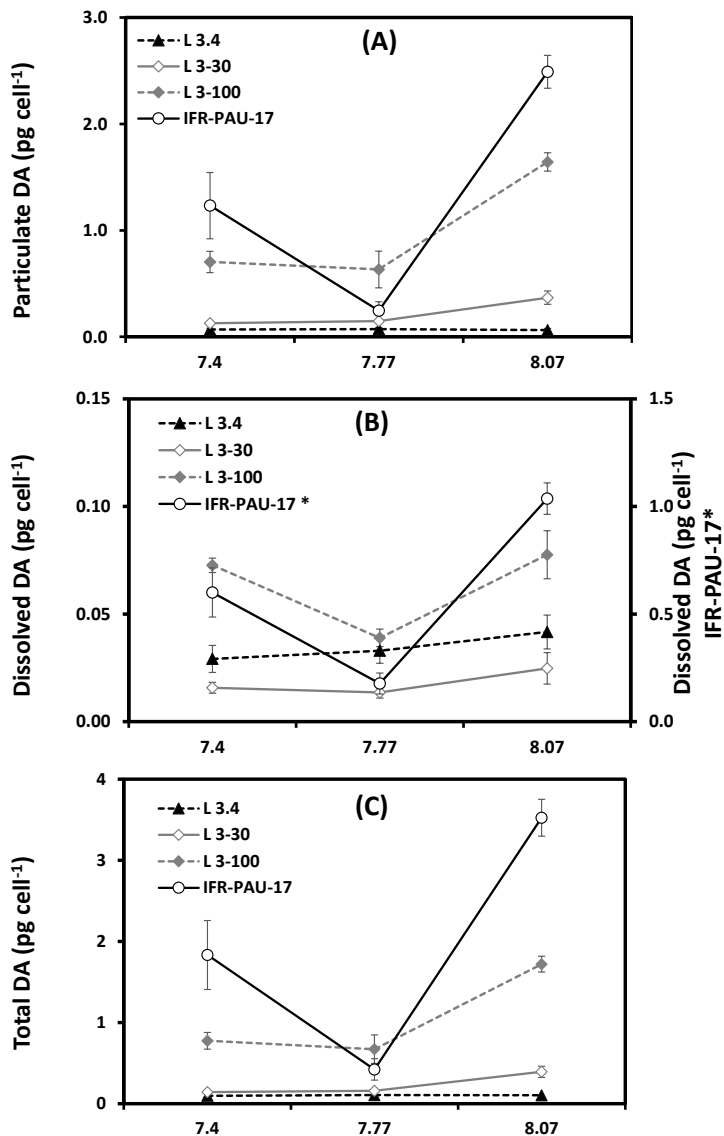


Figure 24: Particulate (A), dissolved (B) and total DA contents (C) (pg cell<sup>-1</sup>) for *P. australis* strains (IFR-PAU-17, L 3.4, L 3-30 and L 3-100) acclimated at three different pH levels (pH= 7.4, 7.77 and 8.07). Data are means  $\pm$  SD, n=3. The sign (\*) refers to values of dissolved DA for the strain IFR-PAU-17 on secondary Y axis, panel B.

Whereas for L3.4 and L3-30, no significant differences in dDA content were observed among the three pH levels ( $p > 0.05$ ) (i.e. for strain L3-30, dDA content equal to 0.02, 0.01 and 0.01  $\text{pg cell}^{-1}$  at pH 8.07, 7.77 and 7.4, respectively) (Figure 24B). The overall variations in cellular content of tDA did not vary much from pDA (Figure 24C and Figure 25A).

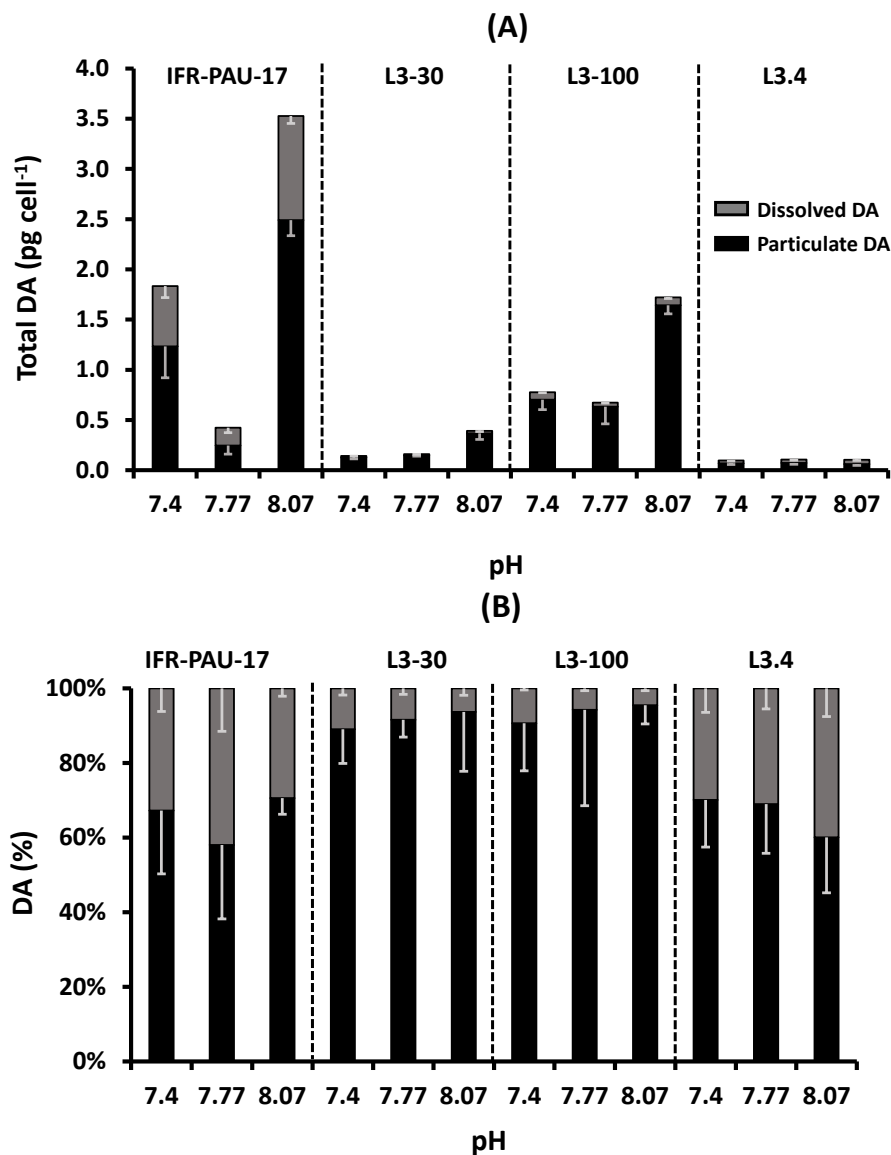


Figure 25: Total DA concentrations for *P. australis* strains (IFR-PAU-17, L 3.4, L 3-30 and L 3-100) expressed on a per cell basis ( $\text{pg cell}^{-1}$ ) and as a percentage (%) of particulate and dissolved DA concentrations at the different pH levels: 8.07, 7.77 and 7.40. Data are means  $\pm$  SD,  $n=3$ .



The highest DA content was obtained at pH 8.07 for most of the *P. australis* strains (IFR-PAU-17, L3-100 and L3-30) (Figure 25A). In addition, at pH 8.07, IFR-PAU-17 strain produced the highest amount of DA ( $3.53 \text{ pg cell}^{-1}$ ) in comparison with the three other *P. australis* strains at the same pH ( $p < 0.05$ ) (Figure 25A). While the lowest total DA content was obtained in strain L3.4, which was not affected by the pH variation ( $p = 0.52$ ) (Figure 25A). Interestingly, in strains L3.4 and IFR-PAU-17, 30% and 40%, respectively, of the total DA content was released into the culture medium at pH 8.07, whereas the dDA share for L3-30 and L3-100 represented only 5% of the total DA content at the same pH level (Figure 25B).

## 5. Discussion

### 5.1. Effect of pH on growth rate

An increase in oceanic  $\text{CO}_2$  uptake will result in increasing concentrations of bicarbonate and  $\text{CO}_2$  and thus in decreasing seawater pH, which is predicted to decline by 0.2 to 0.4 units (from 8.1) by 2100 according to the IPCC emissions scenario (IPCC, 2013; Orr et al., 2005; Pörtner et al., 2014). Variations in pH can have serious consequences on the function of marine ecosystems, from direct effects on the physiological responses of phytoplankton to indirect effects on food web and species interactions (Cornwall et al., 2013; Kroeker et al., 2013; Lundholm et al., 2004; Orr et al., 2005). Increased oceanic  $\text{CO}_2$  uptake could potentially increase primary production by 20%, especially for species relying on  $\text{CO}_2$  or  $\text{HCO}_3^-$  uptake (IPCC, 2013; Riebesell et al., 2007; Schippers et al., 2004). *P. multiseriis* has been shown to rely almost equally on  $\text{CO}_2$  or  $\text{HCO}_3^-$  uptake (Trimborn et al. 2008). Marine diatoms have developed a highly efficient inorganic concentrating mechanisms (CCMs) in order to acquire and utilize bicarbonate ions to support their photosynthesis. Operating and maintaining CCMs requires cellular energy (ATP), hence at higher pH levels, the acquired energy must be used for maintaining growth rates whereas cells grown at lower pH use less energy for CMMs (Hopkinson et al., 2010; Hutchins et al., 2009). Hence, decreasing pH would be expected to support the development of *Pseudo-nitzschia* blooms

in coastal and estuarine waters where most of the shellfish harvesting areas are located. In contrast, our results showed that decreasing pH from current level (8.07) to predicted pH level in 2100 (7.77) did not affect the growth rates of most of the toxic *P. australis* strains (IFR-PAU-17, L3-30 and L3-100), and growth rates even decreased with pH lowered to 7.40 (by 15% for L3-100 and IFR-PAU-17 and 30% for L3-30) compared to the rates at pH 8.07 and 7.77. In addition, growth rates of non-toxic *P. fraudulenta* strains were not affected by pH changes even down to pH 7.40. Likewise, Zhu et al. (2017), observed a significant decrease in growth rate of the strain *P. subcurvata* when cultured under increased CO<sub>2</sub> availability (pH 7.40).

Contrasting these results and supporting the initial expectations, a single strain of *P. australis*, L3.4, showed an overall positive effect on growth rate with decreasing pH. Similarly, an increase in growth rate of *P. multiseriis* (16% increase) and *P. fraudulenta* (33% increase) were found with pH decreasing from 8.1 to 7.8 (Sun et al., 2011; Tatters et al., 2012).

Several studies suggest that a deviation from optimum intracellular pH of cells may affect physiological processes such as, enzyme activity, protein function and nutrient uptake (Gattuso and Hansson, 2009; Graneli and Haraldsson, 1993; McMinn et al., 2014). Thereby, the decline in growth rate in our study may be due to the potentially high energy spent on maintaining pH homeostasis necessary for cell function at the expense of growth in these strains (Beardal and Raven, 2004; Riebesell, 2004).

The two subclones reacted similarly to the three different pH treatments, but the subclone L3-100 had generally a lower growth rate, e.g. a 30% lower growth rate at pH 8.07, compared to L3-30 kept at low light conditions. This is not surprising, because at higher light conditions *Pseudo-nitzschia* cells have been shown to accelerate their aging process and decline in cell size compared to low light conditions (Pan et al., 1996a). The higher growth rates obtained in L3-30 were associated with higher cell volume (32% higher cell volume than subclone L3-100). But usually smaller diatom cells tend to divide faster than larger cells (Cloern, 2017; Williams, 1964). This decrease in cell volume and growth rate in L3-100 compared to L3-30 may be due to differences in the physiological state of the cells (they are physiologically “older”) as, subclone

L3-100 was subjected to accelerative division conditions (high light) compared to L3-30 kept at low light.

As a whole, it seems that seawater pH may affect *Pseudo-nitzschia* growth by multiple mechanisms. Thus, decreasing pH may not systematically result in an enhancement of growth rates as other physiological processes may be affected negatively by acidification. In addition, variations in growth rates among strains of a single species confirms the importance of considering intra-specific diversity within the genus *Pseudo-nitzschia* when studying the effects of changing environmental factors.

### 5.2. Effect of pH variation on carbon speciation

The concentration of carbon species at pH 8.07 corresponded well to the concentrations found in the oceanic surface-water where  $\text{HCO}_3^-$  is the dominant species representing about ~90% of the total DIC, followed by  $\text{CO}_3^{2-}$  (9%), and 1% of remaining  $\text{CO}_2$  (aq) (Feely et al., 2009; Riebesell, 2004). The concentrations of bicarbonate ions ( $\text{HCO}_3^-$ ) and dissolved  $\text{CO}_2$  increased with increased experimental acidification. In the present study, the increase of inorganic carbon availability with decreasing pH was, however, not reflected in the growth rates of *P. fraudulenta* and most of *P. australis* strains. It is possible that lowering pH contributed to adverse effects on the physiological mechanisms of *Pseudo-nitzschia* species instead of stimulating cell growth with the increased carbon availability.

### 5.3. Effect of pH variation on particulate and dissolved DA content

As expected, DA was produced in the potentially toxic strains of *P. australis*, while no production was found in the potentially non-toxic strains of *P. fraudulenta*.

The content of cellular DA decreased significantly in most of the toxic *P. australis* strains (IFR-PAU-17, L3-30 and L3-100) with decreasing pH from 8.07 to 7.77 but was most pronounced for

IFR-PAU-17 strain, where the decrease in cellular DA content was almost 10-fold. This finding confirms the observation by Lundholm et al. (2004) and Trimborn et al. (2008) where higher pH levels induced higher DA content in different strains of *P. multiseriis*. To explain this effect, it has been proposed that toxin production could be induced by carbon limitation with increasing pH (Lundholm et al., 2004). The decrease in pH level from 7.77 to 7.40, however, did not affect DA production ability of L3-30 and L3-100, while, for strain IFR-PAU-17, a re-increase in cellular DA content was observed (5-fold increase). This stimulation in DA production, which was associated with the lowest growth rate in this strain, may be linked to the physiological stress caused by lowering pH level, and therefore enhancing DA accumulation at the expense of growth. Another possible explanation, is that the higher pDA content at pH 7.40 may result from the lower growth rate and hence a slower dilution rate of cellular DA. The findings of Sun et al. (2011) and Tatters et al. (2012) also found elevated domoic acid levels in *P. multiseriis* and *P. fraudulenta* strains cultured under low pH (high pCO<sub>2</sub>) conditions. These prior studies suggested that lowering seawater pH may have triggered cellular DA production through potential changes in cell enzymatic processes, heavy metals speciation, bacterial communities, or modifications in the internal optimum pH (Lundholm et al., 2004).

The cellular DA content of the two subclones showed similar patterns to the three different pH treatments, but with much lower DA content in L3-30 (e.g. 77% lower DA content compared to L3-100 at pH 8.07). This variability in DA content may be attributed to the differences in cell size and growth rate, as the slower growing L3-100 had a higher DA content due to less “dilution” of the DA content.

The different pH treatments had, however, no impact on particulate DA production of the *P. australis* strain L3.4 isolated from the same geographical area as the two subclones. This variability in toxin production among *P. australis* strains may be attributed to the intra-specific variability within *Pseudo-nitzschia* species, as well as changes in cell characteristic (growth rate, cell size). This emphasizes the difficulties in comparing results from different studies and in deriving conclusions about physiological behavior like toxin production.

As a whole among the three pH treatments, particulate DA content for most of the *P. australis* strains tested in this study was the highest in cultures acclimated at the ambient pH (8.07), and the lowest at the projected 2100 seawater pH (7.77).

In terms of dissolved DA (dDA), the French *P. australis* strains IFR-PAU-17 showed a significantly higher content ranging from 92% to 98% compared to Namibian strains. In IFR-PAU-17 and L3-100 strains, dDA decreased with decreasing pH from 8.07 to 7.77, and then re-increased when pH was reduced to 7.40. In contrast, the two other *P. australis* strains showed no significant differences in dDA content among the three pH treatments. The direct effect of changes in environmental pH on particulate and dissolved DA content seems less clear but several studies have suggested that it can be related to the changes in intracellular pH and membrane potential, as well as enzyme activity, all of which could influence cell metabolism (Lundholm et al., 2004; Beardal and Raven, 2004; Giordano et al., 2005; Trimborn et al., 2008). The observed patterns of the response of pH changing on DA production seem to be strain-, and even, subclone-specific.

## **6. Conclusion**

Overall, *P. fraudulenta* and most of *P. australis* strains showed capacity to acclimate and maintain growth rates when pH decreased from current pH (8.07) to projected pH in 2100 (7.77), indicating that these strains may neither benefit nor suffer from ongoing ocean acidification. A further decrease in pH (7.40) showed, however, a significant reduction in the growth rate of most of *P. australis* strains. In terms of DA content, *P. australis* strains were negatively affected by the future projected reduction of pH (from 8.07 to 7.77), as the highest total DA contents were found in *P. australis* strains grown at current pH. Further decreasing pH to 7.40 resulted in a re-increase in total DA content relative to pH 7.77 in one strain, whereas, it did not affect the total DA content of the other *P. australis* strains. The results also revealed that two subclones with a

different culturing history showed a similar behaviour in response to pH variations, but with a difference in the absolute levels in growth rates and DA concentrations obtained at each pH level. The diversity in the physiological responses reported highlights a very strong inter- and intra-specific variation in *Pseudo-nitzschia*, and that their culturing history may affect the physiology.

### **Acknowledgments**

The authors acknowledge Ifremer and the Regional Council of the “Région des Pays de la Loire” for the PhD funding of Nour Ayache. The authors would like to thank Audrey Duval and Nicolas Chomérat from Ifremer, Concarneau, France for providing and identifying the *Pseudo-nitzschia australis* IFR-PAU-17 strain. Thanks are also due to Juliette Fauchot from UMR BOREA, Normandy University, France, for providing the two *P. fraudulenta* strains PNfra167 and PNfra 169. The authors thank also Georges-Augustin Rovillon for his invaluable help for technical assistance in toxin analysis.

## Supplementary data

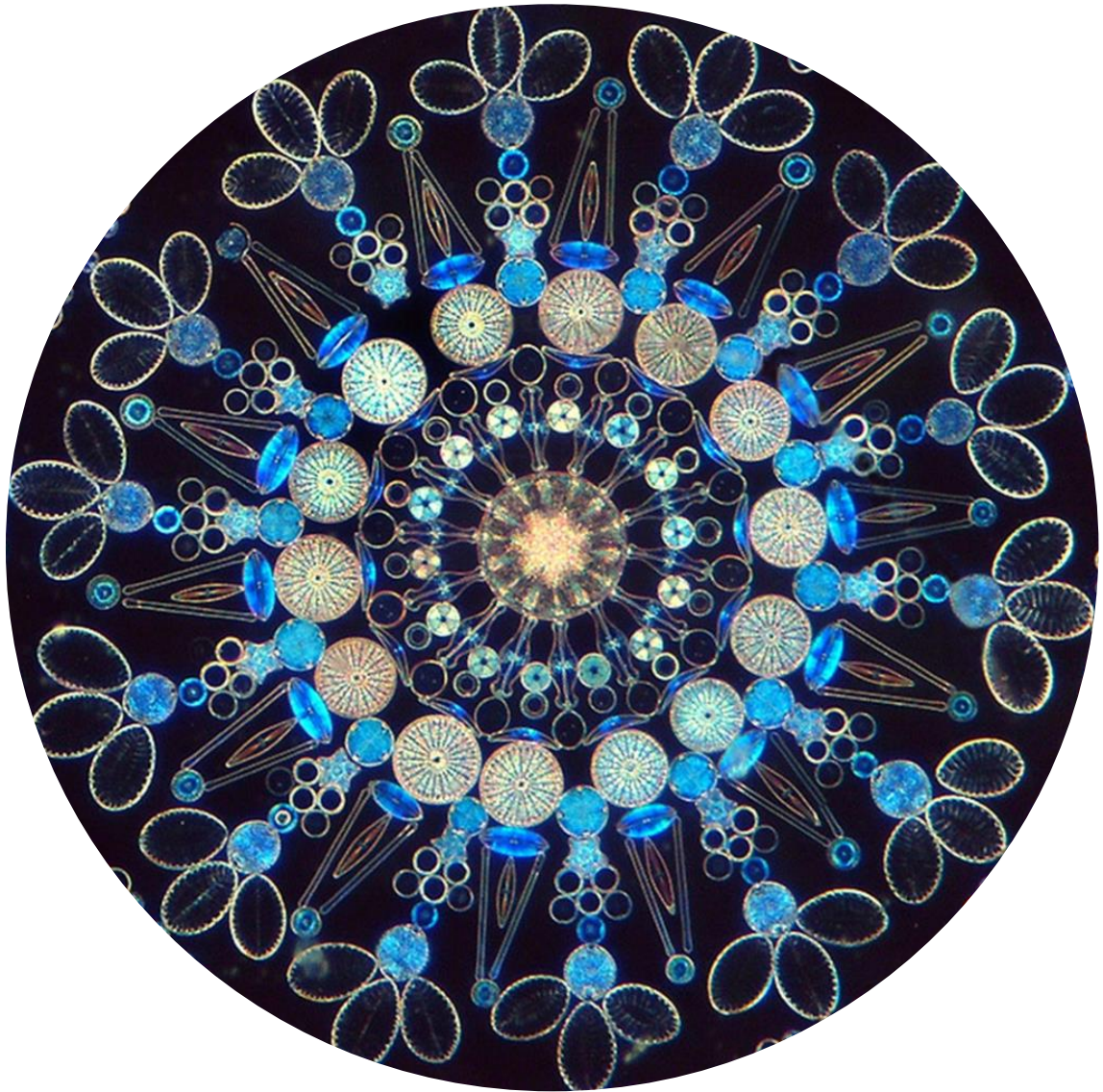
Table S1: Dissolved nutrients (nitrogen, phosphate and silicate) content measured at the beginning (in L1-medium) and the end of the experiment for all strains acclimated at the three different pH levels (pH= 7.4, 7.77 and 8.07). Data are mean  $\pm$  SD, n=3.

Species	Strains	pH	Nitrogen ( $\mu$ M)	Phosphate ( $\mu$ M)	Silicate ( $\mu$ M)
<i>P. australis</i>	IFR-PAU-17	7.4	604 $\pm$ 39	34.2 $\pm$ 0.4	152 $\pm$ 0.7
		7.77	693 $\pm$ 50	34.3 $\pm$ 0.4	140 $\pm$ 1.3
		8.07	510 $\pm$ 25	32.9 $\pm$ 0.5	147 $\pm$ 0.6
	L3.4	7.40	723 $\pm$ 41	33.7 $\pm$ 0.2	149 $\pm$ 1.1
		7.77	785 $\pm$ 14	33.1 $\pm$ 0.3	136 $\pm$ 0.3
		8.07	881 $\pm$ 27	32.1 $\pm$ 0.1	149 $\pm$ 1.8
	L3-30	7.40	565 $\pm$ 22	34.1 $\pm$ 1.1	151 $\pm$ 0.7
		7.77	611 $\pm$ 38	33.3 $\pm$ 0.4	151 $\pm$ 0.9
		8.07	670 $\pm$ 29	33.7 $\pm$ 0.6	154 $\pm$ 1.8
	L3-100	7.40	612 $\pm$ 21	35.4 $\pm$ 1.0	154 $\pm$ 2.8
		7.77	662 $\pm$ 18	34.4 $\pm$ 0.6	151 $\pm$ 1.1
		8.07	578 $\pm$ 32	32.7 $\pm$ 1.1	157 $\pm$ 0.3
<i>P. fraudulenta</i>	PNfra 167	7.40	735 $\pm$ 22	32.9 $\pm$ 0.3	142 $\pm$ 0.4
		7.77	651 $\pm$ 34	32.9 $\pm$ 1.9	137 $\pm$ 3.2
		8.07	623 $\pm$ 33	34.4 $\pm$ 1.3	142 $\pm$ 0.8
	PNfra 169	7.40	694 $\pm$ 27	32.8 $\pm$ 0.1	144 $\pm$ 1.7
		7.77	675 $\pm$ 11	33.8 $\pm$ 0.6	137 $\pm$ 1.9
		8.07	666 $\pm$ 21	34.1 $\pm$ 0.4	142 $\pm$ 1.3
	IFR-PFR-17	7.40	785 $\pm$ 53	32.6 $\pm$ 0.9	140 $\pm$ 3.8
		7.77	646 $\pm$ 33	32.5 $\pm$ 0.8	132 $\pm$ 0.7
		8.07	579 $\pm$ 16	32.9 $\pm$ 0.7	136 $\pm$ 5.0
	L1-medium	7.40	881 $\pm$ 15	35.1 $\pm$ 0.8	160 $\pm$ 3.5
		7.77	939 $\pm$ 36	36.6 $\pm$ 1.2	159 $\pm$ 4.7
		8.07	944 $\pm$ 40	36.2 $\pm$ 0.9	155 $\pm$ 1.8

**Tableau S2:** Carbonate speciation (mean  $\pm$  SD) of *P. australis* and *P. fraudulenta* strains measured at each of the three pH treatments. DIC concentrations and pH were measured in cultures at the last day of the experiment. The remaining parameters were calculated from pH and DIC concentrations at a temperature of 16°C and salinity of 32 using the Mehrbach equilibrium constants as refit by Dickson & Millero (1987).

Species	Strain	pH	DIC ( $\mu\text{mol kg}^{-1}$ )	$\text{HCO}_3^-$ ( $\mu\text{mol kg}^{-1}$ )	$\text{CO}_3^{2-}$ ( $\mu\text{mol kg}^{-1}$ )	$\text{CO}_2$ ( $\mu\text{mol kg}^{-1}$ )	pCO <sub>2</sub> ( $\mu\text{atm}$ )
<i>P. australis</i>	IFR-PAU-17	8.07	2054 $\pm$ 23	1878 $\pm$ 12	163 $\pm$ 10	14 $\pm$ 1	371 $\pm$ 23
		7.77	2104 $\pm$ 21	1989 $\pm$ 18	86 $\pm$ 2	29 $\pm$ 1	785 $\pm$ 19
		7.40	2103 $\pm$ 27	1998 $\pm$ 25	37 $\pm$ 1	68 $\pm$ 2	1848 $\pm$ 42
	L3-30	8.07	2040 $\pm$ 31	1865 $\pm$ 27	162 $\pm$ 4	14 $\pm$ 0	369 $\pm$ 9
		7.77	2055 $\pm$ 14	1943 $\pm$ 12	84 $\pm$ 1	28 $\pm$ 1	766 $\pm$ 13
		7.40	1924 $\pm$ 35	1828 $\pm$ 26	34 $\pm$ 3	62 $\pm$ 6	1691 $\pm$ 66
	L3-100	8.07	1948 $\pm$ 25	1781 $\pm$ 21	154 $\pm$ 3	13 $\pm$ 0	351 $\pm$ 8
		7.77	2032 $\pm$ 34	1921 $\pm$ 24	83 $\pm$ 7	28 $\pm$ 2	758 $\pm$ 66
		7.40	2004 $\pm$ 32	1904 $\pm$ 28	35 $\pm$ 1	65 $\pm$ 2	1761 $\pm$ 64
	L3.4	8.07	2000 $\pm$ 56	1828 $\pm$ 44	158 $\pm$ 10	13 $\pm$ 2	362 $\pm$ 49
		7.77	2068 $\pm$ 34	1955 $\pm$ 32	85 $\pm$ 1	28 $\pm$ 0	771 $\pm$ 9
		7.40	2092 $\pm$ 34	1988 $\pm$ 32	37 $\pm$ 1	68 $\pm$ 0	1838 $\pm$ 9
<i>P. fraudulenta</i>	IFR-FRA-17	8.07	2016 $\pm$ 48	1843 $\pm$ 29	160 $\pm$ 17	13 $\pm$ 2	364 $\pm$ 62
		7.77	2024 $\pm$ 25	1913 $\pm$ 15	83 $\pm$ 8	28 $\pm$ 3	755 $\pm$ 70
		7.40	2125 $\pm$ 34	2019 $\pm$ 25	37 $\pm$ 3	69 $\pm$ 6	1867 $\pm$ 56
	PNfra167	8.07	2049 $\pm$ 46	1981 $\pm$ 36	172 $\pm$ 7	14 $\pm$ 3	370 $\pm$ 17
		7.77	2168 $\pm$ 42	2048 $\pm$ 29	89 $\pm$ 9	30 $\pm$ 4	808 $\pm$ 16
		7.40	2164 $\pm$ 36	2055 $\pm$ 27	38 $\pm$ 3	70 $\pm$ 6	1901 $\pm$ 57
	PNfra169	8.07	2054 $\pm$ 30	1877 $\pm$ 27	163 $\pm$ 2	14 $\pm$ 0	371 $\pm$ 6
		7.77	2173 $\pm$ 35	2054 $\pm$ 31	89 $\pm$ 3	30 $\pm$ 1	810 $\pm$ 29
		7.40	2157 $\pm$ 30	2049 $\pm$ 26	38 $\pm$ 1	70 $\pm$ 3	1895 $\pm$ 72





Arrangements artistiques de Diatomées par Klaus Kemp-Microlife Services

(<http://www.diatoms.co.uk/index.htm>)

# Conclusion et perspectives

Les problèmes liés à la prolifération de la diatomée toxique *Pseudo-nitzschia* se multiplient dans le monde entier et le besoin de la société scientifique de mieux comprendre les facteurs influant sur l'apparition des blooms toxiques de cette diatomée est plus nécessaire que jamais. Les impacts négatifs des blooms de *Pseudo-nitzschia* sur la santé publique, le tourisme, l'économie de la pêche et les écosystèmes se sont multipliés, conduisant à une attention scientifique et réglementaire accrue. Les connaissances physiologiques et biologiques accumulées dans la littérature restent toutefois insuffisantes. En effet, de nombreuses questions demeurent encore en suspens autour de l'impact du changement climatique sur la prolifération et la capacité des cellules de *Pseudo-nitzschia* à produire des toxines. Les travaux d'écophysiologie réalisés au cours de cette thèse représentent une contribution à l'avancée des connaissances sur la physiologie et la production toxinique par les espèces de *Pseudo-nitzschia*. En particulier, les expérimentations effectuées durant cette thèse ont permis d'explorer l'impact de la variation de la salinité et du pH sur la croissance et la production d'acide domoïque (AD) chez plusieurs espèces et souches de *Pseudo-nitzschia*, dont particulièrement *P. australis*.

Les résultats de la première partie de l'étude ont permis, pour la première fois, de déterminer l'influence d'un choc de salinité sur la croissance, l'activité photosynthétique ainsi que la production toxinique de deux souches de *Pseudo-nitzschia*. Les résultats obtenus ont montré que les deux souches de *P. australis* se sont avérées tolérantes à une gamme relativement restreinte de salinité (30 à 35), du fait d'une croissance et d'une activité photosynthétique optimale à ces niveaux de salinité. Cette gamme couvre toutefois la plupart des zones de pêche et de récolte de coquillages dans les eaux côtières françaises, ce qui pourrait avoir un impact significativement négatif sur la santé publique et les ressources commerciales dans ces zones. En revanche, le stress osmotique causé par des salinités en dehors de cet intervalle a entraîné une lyse cellulaire, une

inhibition de la croissance et une libération de l'acide domoïque dans le milieu extracellulaire. Au vu de la différence entre les valeurs de salinité optimale de croissance et de production d'AD observées entre les deux souches étudiées, l'importante variabilité intra-spécifique qui caractérise le genre *Pseudo-nitzschia* a également été mise en évidence. Les informations acquises dans le cadre de cette étude ont donc permis de mieux comprendre l'impact d'un choc de salinité sur la physiologie des espèces toxiques de *P. australis*. Par conséquent, ces connaissances peuvent contribuer à l'évaluation du risque associé aux épisodes toxiques de *Pseudo-nitzschia* lors des événements météorologiques extrêmes. En effet, l'augmentation potentielle de la fréquence des tempêtes et des épisodes de précipitations intenses, due aux changements climatiques, entraînerait une baisse de la salinité de l'eau de mer, en particulier dans les zones estuariennes et côtières. Cette baisse de salinité pourrait, d'après les résultats de cette étude, entraîner une libération d'acide domoïque dans l'eau et augmenter le risque de contamination des coquillages. Dans cette perspective, il serait nécessaire de caractériser le risque écologique, économique et sanitaire lié à la présence de concentrations toxiques élevées dans la colonne d'eau lors de fortes précipitations et déversements d'eaux douces dans les zones côtières et estuariennes.

Ensuite, les travaux effectués sur l'effet de la salinité en mode acclimatation sur les mêmes souches de *P. australis* ont montré des réponses différentes par rapport aux autres travaux rapportés dans la littérature pour d'autres espèces de *Pseudo-nitzschia*. Les deux souches étudiées ici ont montré une capacité à s'acclimater à une plage de salinité de 20 à 40, gamme plus large que lors d'un changement brutal de salinité. Les croissances optimales se situaient entre les salinités 30 et 40. La variation de la salinité a également affecté la production d'AD chez ces deux souches. Les résultats obtenus ont montré que la croissance des souches acclimatées à la plus faible condition de salinité (20) était ralentie, mais que les cellules étaient cependant capables d'accumuler 2 à 3 fois plus d'AD intracellulaire, tout en libérant une très faible quantité dans le milieu extracellulaire par rapport aux autres salinités 30, 35 et 40. Les deux expérimentations effectuées (stress et acclimatation) montrent ainsi que les changements de

salinité peuvent affecter la physiologie de *Pseudo-nitzschia* par des effets directs sur la croissance et la production de toxines. Cependant, le rôle physiologique supposé de l'AD agissant comme un osmolyte suite à un changement de salinité a été infirmé dans cette étude.

Pour compléter ces travaux, il serait donc intéressant de suivre la production d'autres molécules connues comme osmolyte chez les diatomées comme la taurine, la proline et l'acide glutamique afin d'explorer toute relation entre ces composés et la production d'AD suite à une modification de la salinité. De plus, comme les deux souches étudiées ont montré une variabilité de réponses par rapport à la salinité optimale de croissance et de production toxinique, il serait important de tester une plus large variété d'espèces et souches de *Pseudo-nitzschia* afin de pouvoir compléter, extrapoler et prédire avec précision l'évolution de ces efflorescences lors d'un éventuel changement climatique.

Ainsi, les résultats obtenus à salinité 20, montrant un ralentissement de la croissance cellulaire accompagné d'une forte accumulation d'AD dans les cellules, soulignent un lien déjà rapporté dans la littérature. Des études précédentes ont montré que l'AD serait un métabolite secondaire probablement synthétisé en cas de croissance cellulaire ralentie (Bates, 1998; Pan et al., 1996a, 1996b). Ces auteurs ont suggéré qu'il existe une relation négative entre le taux de division cellulaire et la teneur intracellulaire en acide domoïque (Bates, 1998). L'impact de la salinité pourrait être d'entraîner un ralentissement de la croissance cellulaire tout en permettant d'accumuler l'AD dans la cellule plutôt que d'agir directement sur la production toxinique.

La connaissance des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de l'AD permettrait une meilleure compréhension des conditions environnementales qui déclenchent la production de cette toxine, du rôle physiologique de l'AD, ainsi que de la diversité de la toxicité des espèces de *Pseudo-nitzschia*. Récemment, une étude de Bruson et al. (2018) a établi la voie de biosynthèse de l'acide domoïque chez l'espèce *P. multiseriis* dépendante de l'expression des gènes « Dab A, C et D ». Les auteurs ont pu ensuite identifier ces gènes dans le génome *P. multistriata* et *P. australis* toxiques. Il serait donc intéressant de caractériser l'expression (sur- ou sous-expression)

des gènes qui gouvernent la production d'AD dans des conditions de fortes et faibles salinité afin de mieux comprendre les processus d'évolution et d'adaptation de ces espèces face à un environnement instable.

Dans un troisième temps, la capacité d'adaptation des cellules de *Pseudo-nitzschia* face à une potentielle acidification des océans due au changement climatique a été étudiée. Pour cela, deux espèces de *Pseudo-nitzschia* ont été utilisées, dont trois souches de *P. australis* toxiques (y compris deux clones) isolées en France et en Namibie et trois souches de *P. fraudulenta* non toxiques isolées à partir de deux zones différentes en France. Les résultats obtenus lors de cette étude ont clairement démontré que l'acidification de l'eau de mer causée par l'augmentation de la concentration en CO<sub>2</sub> atmosphérique affecte la croissance et le potentiel toxinique des souches de *P. australis* testées. Chez la plupart des souches de *P. australis* cultivées en semi-continu, une plus forte production toxinique (3 à 8 fois plus d'AD total) à pH actuel (8.07) a été mise en évidence en comparaison à un pH de 7.77 prévu par les projections basées sur les scénarios de changement climatique en 2100. Cependant, la diminution du pH ne semble pas affecter la croissance des souches toxiques de *P. australis* et celles non toxiques de *P. fraudulenta*. La diversité des réponses physiologiques rapportées dans cette étude souligne une très forte variation inter, intra-spécifique mais également entre le comportement des clones d'une même souche de *Pseudo-nitzschia* sujets à différentes conditions de pH. Il serait donc nécessaire de reproduire ces travaux sur d'autres souches toxiques et non toxiques afin de mieux répondre aux questions relatives à l'influence d'une variation de pH de l'eau de mer sur les blooms de *Pseudo-nitzschia*. Des expérimentations supplémentaires devront étudier les effets interactifs d'une baisse de pH associée aux variations d'autres variables environnementales susceptibles de répondre au changement climatique, en utilisant d'autres espèces et souches de *Pseudo-nitzschia*. Des expériences à plus long terme évaluant le potentiel évolutif de ces organismes faces aux perturbations du milieu marin induites par le climat seraient également extrêmement utiles.

Bien que l'accumulation de l'AD chez les mollusques bivalves puisse se produire rapidement sur quelques jours, l'élimination de cette toxine, en particulier chez les coquilles Saint-Jacques, est un processus beaucoup plus lent et peut nécessiter des mois, voire des années. Une dépuración lente de l'AD dans les coquilles Saint-Jacques (*Pecten maximus*) a été largement signalée (Amzil et al., 2007; Blanco et al., 2002; Campbell et al., 2001) et a été responsable de fermetures prolongées dans les pêcheries (Gallacher et al., 2001; Smith et al., 2006). Depuis 2004, en raison d'une contamination élevée par l'AD, des restrictions continues sur la récolte des coquilles Saint-Jacques (*P. maximus*) ont été imposées en France, qui est considéré comme un des pays producteurs majeurs en Europe (Husson et al., 2016; Nezan et al., 2006). Concernant l'AD dissous, Bogan et al. (2007) ont montré que son accumulation dans les tissus de *P. maximus* était considérée comme négligeable. Cependant, l'exposition de l'AD aux tissus de ces coquillages n'avait duré que trois jours, période peut-être trop courte pour une absorption significative de l'AD. En effet, Douglas et al. (1997) ont indiqué qu'une présence significative d'AD dans la chair des coquillages ne se produisait qu'après une exposition de 6 jours. De plus, Liu et al. (2007), ont étudié l'impact de l'AD dissous sur les larves des coquilles Saint-Jacques et ont démontré que la croissance et la survie des larves de *P. maximus* étaient significativement affectées. Les auteurs ont suggéré qu'il pourrait être nécessaire de déplacer les larves des coquilles Saint-Jacques d'élevage en éclosérie pour les protéger des proliférations toxiques de *Pseudo-nitzschia*. Cependant, le manque de connaissances et d'études sur le comportement des coquillages sujets à des concentrations fortes en AD dissous dans l'eau de mer rend difficile l'évaluation des enjeux économiques (fermeture de la pêche suite à la contamination des coquillages), écologiques (impact sur la chaîne trophique et la communauté phytoplanctoniques) et sanitaires (consommation des coquillages contaminés) réels. Pour cela, il serait intéressant d'étudier, de manière *in vitro*, l'impact direct de l'AD dissous sur la physiologie des mollusques bivalves et leur capacité de dépuración de fortes concentrations en AD dissous.

En conclusion, les expérimentations effectuées durant cette thèse ont montré que les espèces de *Pseudo-nitzschia* sont plutôt flexibles, capables de s'acclimater et proliférer dans des conditions environnementales variables de salinités et de pH, malgré une importante diversité de réponses en fonction des souches ou des espèces de *Pseudo-nitzschia* étudiées. Pour pallier cette importante variabilité, il semble nécessaire d'explorer l'effet de la variation de ces facteurs environnementaux sur une population mixte de *Pseudo-nitzschia* afin de mieux expliquer l'interaction, la dominance et la répartition de ces espèces dans les zones côtières et estuariennes. Ces informations pourraient ensuite être utilisées pour développer des modèles reliant la dynamique des populations de *Pseudo-nitzschia* aux propriétés de l'environnement.

Ces travaux de thèse, à travers les résultats obtenus, soulignent donc l'importance du champ d'investigation scientifique représenté par l'étude de la diatomée toxique *Pseudo-nitzschia*. Les objectifs de ces travaux scientifiques ont aussi bien permis d'approfondir les connaissances sur la physiologie et la production toxinique des espèces de *Pseudo-nitzschia* face aux futurs changements climatiques, que d'encourager la poursuite de ces travaux en posant de nouvelles hypothèses de travail. Il est nécessaire de souligner en particulier le besoin d'étudier :

- l'impact de la présence de fortes concentrations en AD dissous sur la dépuration et le comportement des mollusques bivalves,
- l'expression des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de l'AD face aux changements de salinité (stress et acclimatation) et de pH,
- la variation des facteurs environnementaux sur une population mixte de *Pseudo-nitzschia*,
- l'effet de la variation couplée du pH et de la salinité sur la physiologie et la production toxinique des cellules de *Pseudo-nitzschia*.

# References

- Aizdaicher, N.A., Markina, Z. V., 2011. Influence of changes in sea water salinity on the growth, photosynthetic pigment content, and cell size of the benthic alga *Attheya ussurensis* Stonik, Orlova et Crawford, 2006 (Bacillariophyta). *Russ. J. Mar. Biol.* 37, 472–477. <https://doi.org/10.1134/S1063074011060034>
- Ajani, P.A., Verma, A., Lassudrie, M., Doblin, M.A., Murray, S.A., 2018. A new diatom species *P. hallegraeffii* sp. nov. belonging to the toxic genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) from the East Australian Current. *PLoS One* 13, e0195622. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195622>
- Almandoz, G.O., Ferreyra, G.A., Schloss, I.R., Dogliotti, A.I., Rupolo, V., Paparazzo, F.E., Esteves, J.L., Ferrario, M.E., 2008. Distribution and ecology of *Pseudo-nitzschia* species (Bacillariophyceae) in surface waters of the Weddell Sea (Antarctica). *Polar Biol.* 31, 429–442. <https://doi.org/10.1007/s00300-007-0369-9>
- Álvarez, G., Uribe, E., Quijano-Scheggia, S., López-Rivera, A., Mariño, C., Blanco, J., 2009. Domoic acid production by *Pseudo-nitzschia australis* and *Pseudo-nitzschia calliantha* isolated from North Chile. *Harmful Algae* 8, 938–945. <https://doi.org/10.1016/J.HAL.2009.05.005>
- Amato, A., Kooistra, W.H.C.F., Levialdi Ghiron, J.H., Mann, D.G., Pröschold, T., Montresor, M., 2007. Reproductive Isolation among Sympatric Cryptic Species in Marine Diatoms. *Protist* 158, 193–207. <https://doi.org/10.1016/J.PROTIS.2006.10.001>
- Amato, A., Lüdeking, A., Kooistra, W.H.C.F., 2010. Intracellular domoic acid production in *Pseudo-nitzschia multistriata* isolated from the Gulf of Naples (Tyrrhenian Sea, Italy). *Toxicon* 55, 157–161. <https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2009.07.005>
- Amin, S.A., Parker, M.S., Armbrust, E. V., 2012. Interactions between Diatoms and Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 76, 667–684. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00007-12>
- Aminot, A., Kérouel, R., Coverly, S., 2009. Nutrients in seawater using segmented flow analysis, in: *Practical Guidelines for the Analysis of Seawater*. pp. 143–178. <https://doi.org/10.1201/9781420073072.ch8>



- Amzil, Z., Fresnel, J., Le Gal, D., Billard, C., 2001. Domoic acid accumulation in French shellfish in relation to toxic species of *Pseudo-nitzschia multiseriata* and *P. pseudodelicatissima*. *Toxicon* 39, 1245–1251. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(01\)00096-4](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(01)00096-4)
- Amzil, Z., Royer, F., Sibat, M., Fiant, L., Gelin, M., Le Gal, D., Françoise, S., 2007. First report on amnesic and diarrhetic toxins detection in French scallops during 2004-05 monitoring surveys, in: Sixth International Conference on Molluscan Shellfish Safety. pp. 307–314.
- Anderson, C.R., Brzezinski, M.A., Washburn, L., Kudela, R., 2006. Circulation and environmental conditions during a toxigenic *Pseudo-nitzschia australis* bloom in the Santa Barbara Channel, California. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 327, 119–133. <https://doi.org/10.3354/meps327119>
- Anderson, D.M., Hoagland, P., Kaoru, Y., White, A.W., 2000. Estimated annual economic impacts from harmful algal blooms (HABs) in the United States. <https://doi.org/10.1575/1912/96>
- Andersson, A.J., Bates, N.R., Mackenzie, F.T., 2007. Dissolution of carbonate sediments under rising pCO<sub>2</sub> and ocean acidification: Observations from Devil’s Hole, Bermuda. *Aquat. Geochemistry* 13, 237–264. <https://doi.org/10.1007/s10498-007-9018-8>
- Ayache, N., Hervé, F., Martin-jezequel, V., Amzil, Z., Caruana, A.M.N., 2018. Influence of sudden salinity variation on the physiology and domoic acid production by two strains of *Pseudo-nitzschia australis*. *J. Phycol.*
- Bargu, S., Powell, C.L., Wang, Z., Doucette, G.J., Silver, M.W., 2008. Note on the occurrence of *Pseudo-nitzschia australis* and domoic acid in squid from Monterey Bay, CA (USA). *Harmful Algae* 7, 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2007.05.008>
- Bargu, S., Silver, M.W., Ohman, M.D., Benitez-Nelson, C.R., Garrison, D.L., 2012. Mystery behind Hitchcock’s birds. *Nat. Geosci.* 5, 2–3. <https://doi.org/10.1038/ngeo1360>
- Basu, S., Patil, S., Mapleson, D., Russo, M.T., Vitale, L., Fevola, C., Maumus, F., Casotti, R., Mock, T., Caccamo, M., Montresor, M., Sanges, R., Ferrante, M.I., 2017. Finding a partner in the ocean: molecular and evolutionary bases of the response to sexual cues in a planktonic diatom. *New Phytol.* 215, 140–156. <https://doi.org/10.1111/nph.14557>
- Bates, S.S., 2000. Domoic-acid producing diatoms: another genus added. *J. Phycol.* 36, 978–983. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2000.03661.x>

- Bates, S.S., 1998. Ecophysiology and metabolism of ASP Toxin production, in: Anderson, D.M., Cembella, A.D., Hallegraeff, G.M. (Eds.), *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*. Springer-Verlag, pp. 405–426.
- Bates, S.S., Davidovich, N.A., 2002. Factors affecting the sexual reproduction of diatoms, with emphasis on *Pseudo-nitzschia* spp, in: Garces, E., Zingone, A., Dale, B., Montresor, M., Reguera, B. (Eds.), *LIFEHAB Workshop: Life History Of microalgal Species Causing Harmful Algal Blooms*. Commission of the European Community.
- Bates, S.S., De Freitas, A.S., Milley, E., Pocklington, R., Quilliam, M.A., Smith, J., Worms, J., 1991. Controls on domoic acid production by the diatom *Nitzschia pungens* f. multiseriis in culture: Nutrients and irradiance. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48, 1136–1144.
- Bates, S.S., Douglas, D.J., Doucette, G.J., Léger, C., 1995. Effects of reintroducing bacteria on domoic acid production by axenic cultures of the diatom *Pseudonitzschia pungens* f. multiseriis. *Nat. Toxins* 3, 428–435.
- Bates, S.S., Gaudet, J., Kaczmarek, I., Ehrman, J.M., 2004. Interaction between bacteria and the domoic-acid-producing diatom *Pseudo-nitzschia multiseriis* (Hasle) Hasle; Can bacteria produce domoic acid autonomously? *Harmful Algae* 3, 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2003.08.001>
- Bates, S.S., Hubbard, K.A., Lundholm, N., Montresor, M., Leaw, C.P., 2018. *Pseudo-nitzschia*, *Nitzschia*, and domoic acid: new research since 2011. *Harmful Algae*.
- Bates, S.S., Trainer, V.L., 2006. The Ecology of Harmful Diatoms, in: Graneli, E., Turne, J.T. (Eds.), *Ecology of Harmful Algae*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 81–93. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-32210-8\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-540-32210-8_7)
- Beardall, J., Raven, J., 2004. The potential effects of global climate change on microalgal photosynthesis, growth and ecology. *Phycologia* 43, 26–40.
- Beardall, J., Stojkovic, S., Larsen, S., 2009. Living in a high CO<sub>2</sub> world: impacts of global climate change on marine phytoplankton. *Plant Ecol. Divers.* 2, 191–205. <https://doi.org/10.1080/17550870903271363>
- Behringer, G., Ochsenkühn, M.A., Fei, C., Fanning, J., Koester, J.A., Amin, S.A., 2018. Bacterial communities of diatoms display strong conservation across strains and time. *Front. Microbiol.* 9, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00659>
- Belin, C., Chapelle, A., Delmas, D., Nezan, E., Siano, R., 2013. *DYNAMiques des efflorescences*

et de la toxicité des espèces phytoplanctoniques nuisibles du genre *Pseudo-nitzschia* en région Loire-Bretagne. Ifremer 61pp.

- Beltrán, A.S., Palafox-Uribe, M., Grajales-Montiel, J., Cruz-Villacorta, A., Ochoa, J.L., 1997. Sea bird mortality at Cabo San Lucas, Mexico: Evidence that toxic diatom blooms are spreading. *Toxicon* 35, 447–453. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(96\)00140-7](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(96)00140-7)
- Bendschneider, K., Robinson, R.J., 1952. A new spectrophotometric method for the determination of nitrite in sea water. *J. Mar. Res.* 11, 87–96.
- Bill, B.D., Cochlan, W.P., Trainer, V.L., 2012. The effect of light on growth rate and primary productivity in *Pseudo-nitzschia australis* and *Pseudo-nitzschia turgidula*. *Proc. 14th Int. Conf. Harmful Algae. Int. Soc. Study Harmful Algae Intergov. Oceanogr. Comm. UNESCO* 78–80.
- Blanco, J., Acosta, C., Bermúdez de la Puente, M., Salgado, C., 2002. Depuration and anatomical distribution of the amnesic shellfish poisoning (ASP) toxin domoic acid in the king scallop *Pecten maximus*. *Aquat. Toxicol.* 60, 111–121. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(01\)00274-0](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(01)00274-0)
- Bogan, Y.M., Harkin, A.L., Gillespie, J., Kennedy, D.J., Hess, P., Slater, J.W., 2007. The influence of size on domoic acid concentration in king scallop, *Pecten maximus* (L.). *Harmful Algae* 6, 15–28. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2006.05.005>
- Brunet, C., Johnsen, G., Lavaud, J., Roy, S., 2015. Selected pigment applications in oceanography: Pigments and photoacclimation processes. *Phytoplankt. Pigment. Charact. Chemotaxon. Appl. Oceanogr.* 1, 445–471. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Brunson, J.K., Mckinnie, S.M.K., Chekan, J.R., Mccrow, J.P., Miles, Z.D., Bertrand, E.M., Bielinski, V.A., Luhavaya, H., Oborník, M., Smith, G.J., Hutchins, D.A., Allen, A.E., Moore, B.S., 2018. Biosynthesis of the neurotoxin domoic acid in a bloom-forming diatom, *Science*. [https://doi.org/DOI: 10.1126/science.aau0382](https://doi.org/DOI:10.1126/science.aau0382)
- Buck, K.R., Uttal-Cookel, L., Pilskaln, C.H., Roelke, D.L., Villac, M.C., Fryxell, G.A., Cifuentes, L., Chavez, F.P., 1992. Autecology of the diatom *Pseudonitzschia australis*, a domoic acid producer, from Monterey Bay, California. *Mar. Ecol. Ser.* 84, 293–302.
- Buesseler, K.O., 1998. The decoupling of production and particle export in the surface ocean. *Global Biogeochem. Cycles* 12, 297–310. <https://doi.org/10.1029/97GB03366>

- Caldeira, K., Wickett, M.E., 2003. Anthropogenic carbon and ocean pH. *Nature* 425, 365.  
<https://doi.org/10.1038/425365a>
- Calu, G., 2011. Contribution to the study of Pseudo-nitzschia toxicity: regulation of domoic acid production and synthesis of chemical analogues. Nantes, France.
- Campbell, D.A., Kelly, M.S., Busman, M., Bolch, C.J., Wiggins, E., Moeller, P.D.R., Morton, S.L., Hess, P., Shumway, S.E., 2001. Amnesic shellfish poisoning in the king scallop, *Pecten maximus*, from the west coast of Scotland. *J. Shellfish Res.* 20, 75–84.
- Caruana, A.M.N., Amzil, Z., 2018. Microalgae and Toxins. Chapter 13, in: Levine, I., Fleurence, J. (Eds.), *Microalgae in Health and Disease Prevention*. pp. 1–44.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811405-6.00013-X>
- Casteleyn, G., Leliaert, F., Backeljau, T., Debeer, A.-E., Kotaki, Y., Rhodes, L., Lundholm, N., Sabbe, K., Vyverman, W., 2010. Limits to gene flow in a cosmopolitan marine planktonic diatom. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 12952–7.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1001380107>
- Chakraborty, P., Acharyya, T., Raghunadh Babu, P. V, Bandhyopadhyay, D., 2011. Impact of salinity and pH on phytoplankton community in a tropical freshwater system: An investigation with pigment analysis by HPLC. *J. Environ. Monit.* 13, 614–620.
- Chepurnov, V.A., Mann, D.G., Von Dassow, P., Vanormelingen, P., Gillard, J., Inzé, D., Sabbe, K., Vyverman, W., 2008. In search of new tractable diatoms for experimental biology. *BioEssays* 30, 692–702. <https://doi.org/10.1002/bies.20773>
- Cho, E.S., Kotaki, Y., Park, J.G., 2001. The comparison between toxic Pseudo-nitzschia multiseriata (Hasle) Hasle and non-toxic *P. pungens* (Grunow) Hasle isolated from Jinhae Bay, Korea. *Algae* 16, 275–285.
- Chokshi, K., Pancha, I., Ghosh, A., Mishra, S., 2017. Salinity induced oxidative stress alters the physiological responses and improves the biofuel potential of green microalgae *Acutodesmus dimorphus*. *Bioresour. Technol.* 244, 1376–1383.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.003>
- Churro, C.I., Carreira, C.C., Rodrigues, F.J., Craveiro, S.C., Calado, A.J., Casteleyn, G., Lundholm, N., 2009. Diversity and abundance of potentially toxic Pseudo-nitzschia peragallo in aveiro coastal lagoon, Portugal and description of a new variety, *P. pungens* var. *aveirensis* var. nov. *Diatom Res.* 24, 35–62.

<https://doi.org/10.1080/0269249X.2009.9705782>

- Cloern, J.E., 2017. Why large cells dominate estuarine phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* 63, S392–S409. <https://doi.org/10.1002/lno.10749>
- Cochlan, W.P., Herndon, J., Kudela, R.M., 2008. Inorganic and organic nitrogen uptake by the toxigenic diatom *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae). *Harmful Algae* 8, 111–118. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2008.08.008>
- Coleman, A.W., 2003. ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. *Trends Genet.* 19, 370–375. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(03\)00118-5](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(03)00118-5)
- Cornwall, C.E., Hepburn, C.D., McGraw, C.M., Currie, K.I., Pilditch, C.A., Hunter, K.A., Boyd, P.W., Hurd, C.L., 2013. Diurnal fluctuations in seawater pH influence the response of a calcifying macroalga to ocean acidification. *Proceedings. Biol. Sci.* 280, 20132201. <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.2201>
- Cusack, C.K., Bates, S.S., Quilliam, M.A., Patching, J.W., Raine, R., 2002. Confirmation of domoic acid production by *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae) isolated from Irish waters. *J. Phycol.* 38, 1106–1112. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2002.01054.x>
- Dickson, A.G., Millero, F.J., 1987. A comparison of the equilibrium constants for the dissociation of carbonic acid in seawater media. *Deep Sea Res. Part A, Oceanogr. Res. Pap.* 34, 1733–1743. [https://doi.org/10.1016/0198-0149\(87\)90021-5](https://doi.org/10.1016/0198-0149(87)90021-5)
- Doan-Nhu, H., Nguyen Thi, M.A., Nguyen-Ngoc, T.G., 2008. *Pseudo-nitzschia* in south-central coastal waters of Vietnam: growth and occurrence related to temperature and salinity. *Proc. 12th Int. Conf. Harmful Algae.* 29–32. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.11162.44485>
- Doucette, G.J., King, K.L., Thessen, A.E., Dortch, Q., 2008. The effect of salinity on domoic acid production by the diatom *Pseudo-nitzschia multiseries*. *Nov. Hedwigia* 133, 31.
- 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. *multiseries* Hasle. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 49, 85–90. <https://doi.org/10.1139/f92-010>
- Douglas, D.J., Kenchington, E.R., Bird, C.J., Pocklington, R., Bradford, B., Silvert, W., 1997. Accumulation of domoic acid by the sea scallop (*Placopecten magellanicus*) fed cultured cells of toxic *Pseudo-nitzschia multiseries*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 54, 907–913. <https://doi.org/10.1139/cjfas-54-4-907>
- Downes-Tettmar, N., Rowland, S., Widdicombe, C., Woodward, M., Llewellyn, C., 2013.

- Seasonal variation in *Pseudo-nitzschia* spp. and domoic acid in the Western English Channel. *Cont. Shelf Res.* 53, 40–49. <https://doi.org/10.1016/j.csr.2012.10.011>
- Durack, P.J., Wijffels, S.E., 2010. Fifty-Year trends in global ocean salinities and their relationship to broad-scale warming. *J. Clim.* 23, 4342–4362. <https://doi.org/10.1175/2010JCLI3377.1>
- EFSA, 2009. Marine biotoxins in shellfish - Summary on regulated marine biotoxins. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. *EFSA J.* 7, 1306. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2009.1306>
- Egge, J.K., Aksnes, D.L., 1992. Silicate as regulating nutrient in phytoplankton competition. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 83, 281–289. <https://doi.org/10.3354/meps083281>
- El Sabaawi, R., Harrison, P.J., 2006. Interactive Effects of Irradiance and Temperature on the Photosynthetic Physiology of the Pennate Diatom *Pseudo-Nitzschia Granii* (Bacillariophyceae) From the Northeast Subarctic Pacific. *J. Phycol.* 42, 778–785. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2006.000246.x>
- Falciatore, A., Bowler, C., 2002. Revealing the molecular secrets of marine diatoms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53, 109–130. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.091701.153921>
- Falkowski, P.G., Raven, J.A., 1997. *Aquatic Photosynthesis*. Blackwell, Malden, MA, USA.
- FAO 2005. (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Fishery country profile, France. 2005. [http://www.fao.org/fishery/docs/DOCUMENT/fcp/fr/FL\\_CP\\_FR.pdf](http://www.fao.org/fishery/docs/DOCUMENT/fcp/fr/FL_CP_FR.pdf) (last accessed 27 March 2018).
- Feely, R.A., Doney, S.C., Cooley, S.R., 2009. Ocean Acidification. *Oceanography* 22, 36–47. <https://doi.org/10.1002/9780470057339.vnn124>
- Feely, R.A., Sabine, C.L., Hernandez-ayon, J.M., Ianson, D., Hales, B., 2008. Evidence for Upwelling of Corrosive Continental “Acidified” water onto the continental Shelf. *Science* (80-. ). 1490, 1–4. <https://doi.org/10.1126/science.1155676>
- Fehling, J., Davidson, K., Bates, S.S., 2005. Growth dynamics of non-toxic *Pseudo-nitzschia delicatissima* and toxic *P. seriata* (Bacillariophyceae) under simulated spring and summer photoperiods. *Harmful Algae* 4, 763–769. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2004.11.002>
- Ferriss, B.E., Marcinek, D.J., Ayres, D., Borchert, J., Lefebvre, K.A., 2017. Acute and chronic dietary exposure to domoic acid in recreational harvesters: A survey of shellfish consumption behavior. *Environ. Int.* 101, 70–79. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.01.006>

- Fire, S.E., Wang, Z., Byrd, M., Whitehead, H.R., Paternoster, J., Morton, S.L., 2011. Co-occurrence of multiple classes of harmful algal toxins in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) stranding during an unusual mortality event in Texas, USA. *Harmful Algae* 10, 330–336. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2010.12.001>
- Foucher, E., Biseau, A., Berthou, P., Fifas, S., Forest, A., Vigneau, J., 2010. Eléments d'information sur la coquille Saint-Jacques en baie de Seine et l'éventualité de la mise en place d'une zone de restriction spéciale. Ifremer 24pp.
- FranceAgriMer, 2017. The fisheries and aquaculture sector in France.
- Fujii, S., Nishimoto, N., Notoya, A., Hellebust, J.A., 1995. Growth and osmoregulation of *Chaetoceros muelleri* in relation to salinity. *Plant Cell Physiol* 36, 759–764.
- Gai, F.F., Hedemand, C.K., Louw, D.C., Grobler, K., Krock, B., Moestrup, Ø., Lundholm, N., 2018. Morphological, molecular and toxigenic characteristics of Namibian *Pseudo-nitzschia* species – including *Pseudo-nitzschia bucculenta* sp. nov. *Harmful Algae* 76, 80–95. <https://doi.org/10.1016/J.HAL.2018.05.003>
- Gallacher, S., Howard, G., Hess, P., MacDonald, E., Kelly, M.C., Bates, L.A., Brown, N., MacKenzie, M., Gillibrand, P., Turrell, W.R., 2001. The occurrence of amnesic shellfish poisons in shellfish from Scottish waters. *Harmful Algal Bloom. 2000 Proc. Ninth Int. Conf. Harmful Algal Bloom.* 30–33.
- Garrison, D.L., Conrad, S.M., Eilers, P.P., Waldron, E.M., 1992. Confirmation of domoic acid production by *Pseudonitzschia australis* (Bacillariophyceae) cultures. *J. Phycol.* 28, 604–607. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1992.00604.x>
- Garza-Sánchez, F., Chapman, D.J., Cooper, J.B., 2009. *Nitzschia ovalis* (bacillariophyceae) mono lake strain accumulates 1,4/2,5 cyclohexanetetrol in response to increased salinity. *J. Phycol.* 45, 395–403. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2009.00667.x>
- Gattuso, J.-P., Hansson, L., 2009. Ocean acidification : background and history, in: Gattuso, J.-P., Hansson, L. (Eds.), *Ocean Acidification.* pp. 1–20.
- Godhe, A., Rynearson, T., 2017. The role of intraspecific variation in the ecological and evolutionary success of diatoms in changing environments. *Philos. Trans. R. Soc. B* 372, 20160399. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0399>
- Goldstein, T., Mazet, J.A.K., Zabka, T.S., Langlois, G., Colegrove, K.M., Silver, M., Bargu, S., Van Dolah, F., Leighfield, T., Conrad, P.A., Barakos, J., Williams, D.C., Dennison, S.,

- Haulena, M., Gulland, F.M.D., 2008. Novel symptomatology and changing epidemiology of domoic acid toxicosis in California sea lions (*Zalophus californianus*): An increasing risk to marine mammal health. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 275, 267–276. <https://doi.org/10.1098/rspb.2007.1221>
- Goss, R., Ann Pinto, E., Wilhelm, C., Richter, M., 2006. The importance of a highly active and  $\Delta$ pH-regulated diatoxanthin epoxidase for the regulation of the PS II antenna function in diadinoxanthin cycle containing algae. *J. Plant Physiol.* 163, 1008–1021. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.09.008>
- Graneli, E., Haraldsson, C., 1993. Can Increased Leaching Of Trace-Metals From Acidified Areas Influence Phytoplankton Growth In Coastal Waters. *Ambio* 22, 308–311.
- Grant, K., Burbacher, T., Faustman, E., Grattan, L., 2015. Domoic acid: Neurobehavioral consequences of exposure to a prevalent marine biotoxin. *Neurotoxicol Teratol* 32, 132–141. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2015.06.023>. Gut-Liver
- Grimmelt, B., Nijjar, M.S., Brown, J., Macnair, N., Wagner, S., Johnson, G.R., Amend, J.F., 1990. Relationship between domoic acid levels in the blue mussel (*Mytilus edulis*) and toxicity in mice. *Toxicon* 28, 501–508. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(90\)90294-H](https://doi.org/10.1016/0041-0101(90)90294-H)
- Guerrini, F., Ciminiello, P., Dell’Aversano, C., Tartaglione, L., Fattorusso, E., Boni, L., Pistocchi, R., 2007. Influence of temperature, salinity and nutrient limitation on yessotoxin production and release by the dinoflagellate *Protoceratium reticulatum* in batch-cultures. *Harmful Algae* 6, 707–717. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2007.02.006>
- Guillard, R.R.L., 1973. Division rates. *Handbook of phycological methods: culture methods and growth measurements*, in: Stein, J. (Ed.), . Cambridge University Press, New York, pp. 289–312.
- Guillard, R.R.L., Hargraves, P.E., 1993. *Stichochrysis immobilis* is a diatom, not a chrysophyte. *Phycologia* 32, 234–236. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-32-3-234.1>
- Guiry, M.D., Guiry, G.M., 2018. AlgaeBase [WWW Document]. World-wide Electron. Publ. Natl. Univ. Ireland, Galw. URL <http://www.algaebase.org>
- Gulland, F., 2000. Domoic acid toxicity in California sea lions (*Zalophus californianus*) stranded along the Central California Coast, May-October 1998. Report to the National Marine Fisheries service working group on unusual marine mammal mortality events.
- Gulland, F.M., Haulena, M., Fauquier, D., Langlois, G., Lander, M., Zabka, T., Duerr, R., 2002.



- Domoic acid toxicity in Californian sea lions (*Zalophus californianus*): clinical signs, treatment and survival. *Vet. Rec.* 150, 475–480.
- Hallegraeff, G.M., 2010. Ocean climate change, phytoplankton community responses, and harmful algal blooms: A formidable predictive challenge. *J. Phycol.* 46, 220–235. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2010.00815.x>
- Hallegraeff, G.M., 2004. Harmful algal blooms: a global overview, in: *Manual on Harmful Marine Microalgae*. pp. 25–50. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391499-6.00008-6>
- Hallegraeff, G.M., 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia* 32, 79–99.
- Hallegraeff, G.M., Bolch, C.J., 1991. Transport of toxic dinoflagellate cysts via ships' ballast water. *Mar. Pollut. Bull.* 22, 27–30. [https://doi.org/10.1016/0025-326X\(91\)90441-T](https://doi.org/10.1016/0025-326X(91)90441-T)
- Hansen, H.P., Koroleff, F., 1999. Determination of nutrients, in: Grasshoff, K., Kremling, K., Ehrhardt, M. (Eds.), *Methods of Seawater Analysis*, Third Edition. Verlag Chemie, Germany, pp. 159–228.
- Hansen, L.R., Soyulu, S. í, Kotaki, Y., Moestrup, Ø., Lundholm, N., 2011. Toxin production and temperature-induced morphological variation of the diatom *Pseudo-nitzschia seriata* from the Arctic. *Harmful Algae* 10, 689–696. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.05.004>
- Hansen, P.J., 2002. Effect of high pH on the growth and survival of marine phytoplankton: Implications for species succession. *Aquat. Microb. Ecol.* 28, 279–288. <https://doi.org/10.3354/ame028279>
- Hardardóttir, S., Pančić, M., Tammilehto, A., Krock, B., Møller, E.F., Nielsen, T.G., Lundholm, N., 2015. Dangerous relations in the arctic marine food web: Interactions between toxin producing *Pseudo-nitzschia* diatoms and *Calanus* copepodites. *Mar. Drugs* 13, 3809–3835. <https://doi.org/10.3390/md13063809>
- Hartin, C.A., Bond-Lamberty, B., Patel, P., Mundra, A., 2016. Ocean acidification over the next three centuries using a simple global climate carbon-cycle model: Projections and sensitivities. *Biogeosciences* 13, 4329–4342. <https://doi.org/10.5194/bg-13-4329-2016>
- Hasle, G.R., 2002. Are most of the domoic acid-producing species of the diatom genus *Pseudo-nitzschia* cosmopolites? *Harmful Algae* 1, 137–146. [https://doi.org/10.1016/S1568-9883\(02\)00014-8](https://doi.org/10.1016/S1568-9883(02)00014-8)
- Hasle, G.R., 1995. *Pseudo-Nitzschia Pungens* and *P. Multiseries* (Bacillariophyceae):

- Nomenclatural History, Morphology, and Distribution. *J. Phycol.* 31, 428–435.  
<https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1995.00428.x>
- Hasle, G.R., Lundholm, N., 2005. Pseudo-nitzschia seriata f. obtusa (Bacillariophyceae) raised in rank based on morphological, phylogenetic and distributional data. *Phycologia* 44, 608–619.  
[https://doi.org/10.2216/0031-8884\(2005\)44\[608:PSFOBR\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2216/0031-8884(2005)44[608:PSFOBR]2.0.CO;2)
- Hatfield, C.L., Gauglitz, E.J., Barnett, H.J., Lund, J.A.K., Wekell, J.C., Eklund, M., 1995. The fate of domoic acid in Dungeness crab (*Cancer magister*) as a function of processing. *J. Shellfish Res.* 14, 359–363. <https://doi.org/10.2983/035.029.0302>
- Heisler, J., Glibert, P., Burkholder, J., Anderson, D., Cochlan, W., Dennison, W., Gobler, C., Dortch, Q., Heil, C., Humphries, E., Lewitus, A., Magnien, R., Marshall, H., Sellner, K., Stockwell, D., Stoecker, D., Suddleson, M., 2008. Eutrophication and Harmful Algal Blooms: A Scientific Consensus. *Harmful Algae* 8, 3–13.  
<https://doi.org/10.1016/j.hal.2008.08.006>
- Hendey, N., 1974. A Revised Check-List of British Marine Diatoms. *J. mar. biol. Ass. U.K.* 54, 277–300. <https://doi.org/10.1017/S0025315400058549>
- Hinga, K.R., 2002. Effects of pH on coastal marine phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 238, 281–300. <https://doi.org/10.3354/meps238281>
- Hoagland, P., Scatasta, S., 2006. The economic effects of harmful algal blooms, in: *Ecology of Harmful Algae*. pp. 391–402. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-32210-8\\_30](https://doi.org/10.1007/978-3-540-32210-8_30)
- Hopkinson, B.M., Xu, Y., Shi, D., McGinn, P.J., Morel, F.M.M., 2010. The effect of CO<sub>2</sub> on the photosynthetic physiology of phytoplankton in the Gulf of Alaska. *Limnol. Oceanogr.* 55, 2011–2024. <https://doi.org/10.4319/lo.2010.55.5.2011>
- Howard, M.D.A., Cochlan, W.P., Ladizinsky, N., Kudela, R.M., 2007. Nitrogenous preference of toxigenic *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae) from field and laboratory experiments. *Harmful Algae* 6, 206–217. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2006.06.003>
- Howard, M.D.A., Cochlan, W.P., Ladizinsky, N., Kudela, R.M., 2007. Nitrogenous preference of toxigenic *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae) from field and laboratory experiments. *Harmful Algae* 6, 206–217. <https://doi.org/10.1016/J.HAL.2006.06.003>
- Husson, B., Hernández-Fariñas, T., Le Gendre, R., Schapira, M., Chapelle, A., 2016. Two decades of *Pseudo-nitzschia* spp. blooms and king scallop (*Pecten maximus*) contamination by domoic acid along the French Atlantic and English Channel coasts: Seasonal dynamics,

- spatial heterogeneity and interannual variability. *Harmful Algae* 51, 26–39. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.10.017>
- Hutchins, D., Mulholland, M., Fu, F., 2009. Nutrient Cycles and Marine Microbes in a CO<sub>2</sub>-Enriched Ocean. *Oceanography* 22, 128–145. <https://doi.org/10.5670/oceanog.2009.103>
- IPCC, 2007. *Climate Change 2007: The Physical Science Basis.*, in: Solomon, S., Qin, D.M., Manning, Z., Chen, M., Marquis, K.B., Averyt Tingor, M., Miller, H.L. (Eds.), *Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge. United Kingdom and New York, NY, USA, p. 996.
- IPCC, 2013: *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Stocker, T.F., D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S.K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex and P.M. Midgley (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 1535 pp.
- Jackson, A.E., Ayer, S.W., Laycock, M. V., 1992. The effect of salinity on growth and amino acid composition in the marine diatom *Nitzschia pungens*. *Can. J. Bot.* 70, 2198–2201. <https://doi.org/10.1139/b92-272>
- Jeffery, B., Barlow, T., Moizer, K., Paul, S., Boyle, C., 2004. Amnesic shellfish poison. *Food Chem. Toxicol.* 42, 545–557. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2003.11.010>
- Jeffrey, S.W., Vesik, M., 2005. Introduction to marine phytoplankton and their pigment signatures, *Phytoplankton Pigments in Oceanography-Guidelines to Modern Methods*.
- Jewett, L., Romanou, A., 2017. *Ocean Acidification and Other Ocean Changes, Climate Science Special Report: Fourth National Climate Assessment, Volume I.* <https://doi.org/10.7930/JOQV3JQB>
- Kaczmarek, I., Ehrman, J.M., Bates, S.S., Green, D.H., Léger, C., Harris, J., 2005. Diversity and distribution of epibiotic bacteria on *Pseudo-nitzschia multiseries* (Bacillariophyceae) in culture, and comparison with those on diatoms in native seawater. *Harmful Algae* 4, 725–741. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2004.10.001>
- Kim, J.H., Park, B.S., Kim, J.-H., Wang, P., Han, M.-S., 2015. Intraspecific diversity and distribution of the cosmopolitan species *Pseudo-nitzschia pungens* (Bacillariophyceae): morphology, genetics, and ecophysiology of the three clades. *J. Phycol.* 51, 159–172. <https://doi.org/10.1111/jpy.12263>

- Klein, C., Claquin, P., Bouchart, V., Le Roy, B., Véron, B., 2010. Dynamics of *Pseudo-nitzschia* spp. and domoic acid production in a macrotidal ecosystem of the Eastern English Channel (Normandy, France). *Harmful Algae* 9, 218–226. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2009.10.004>
- Kobayashi, K., Takata, Y., Kodama, M., 2009. Direct contact between *Pseudo-nitzschia* multiseriales and bacteria is necessary for the diatom to produce a high level of domoic acid. *Fish. Sci.* 75, 771–776. <https://doi.org/10.1007/s12562-009-0081-5>
- Kroeker, K.J., Kordas, R.L., Crim, R., Hendriks, I.E., Ramajo, L., Singh, G.S., Duarte, C.M., Gattuso, J.P., 2013. Impacts of ocean acidification on marine organisms: Quantifying sensitivities and interaction with warming. *Glob. Chang. Biol.* 19, 1884–1896. <https://doi.org/10.1111/gcb.12179>
- Kuczynska, P., Jemiola-Rzeminska, M., Strzalka, K., 2015. Photosynthetic Pigments in Diatoms. *Mar. Drugs* 13, 5847–81. <https://doi.org/10.3390/md13095847>
- Kumar, M., Kumari, P., Gupta, V., Reddy, C.R.K., Jha, B., 2010. Biochemical responses of red alga *Gracilaria corticata* (Gracilariales, Rhodophyta) to salinity induced oxidative stress. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 391, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2010.06.001>
- La Barre, S., Bates, S.S., Quilliam, M.A., 2014. Domoic acid, in: La Barre, S., Kornprobst, J.-M. (Eds.), *Outstanding Marine Molecules: Chemistry, Biology, Analysis*. KgaA, Weinheim, Germany, pp. 189–216. <https://doi.org/10.1002/9783527681501.ch08>
- Landsberg, J.H., 2002. The effects of harmful algal blooms on aquatic organisms. *Rev. Fish. Sci.* 10, 113–390. <https://doi.org/10.1080/20026491051695org/10.1080/20026491051695>
- Lavaud, J., 2007. Fast Regulation of Photosynthesis in Diatoms: Mechanisms, Evolution and Ecophysiology. *Funct. Plant Sci. Biotechnonology* 267–287.
- Le Quéré, C., Andres, R.J., Boden, T., Conway, T., Houghton, R.A., House, J.I., Marland, G., Peters, G.P., Van Der Werf, G.R., Ahlström, A., Andrew, R.M., Bopp, L., Canadell, J.G., Ciais, P., Doney, S.C., Enright, C., Friedlingstein, P., Huntingford, C., Jain, A.K., Jourdain, C., Kato, E., Keeling, R.F., Klein Goldewijk, K., Levis, S., Levy, P., Lomas, M., Poulter, B., Raupach, M.R., Schwinger, J., Sitch, S., Stocker, B.D., Viovy, N., Zaehle, S., Zeng, N., 2013. The global carbon budget 1959-2011. *Earth Syst. Sci. Data* 5, 165–185. <https://doi.org/10.5194/essd-5-165-2013>
- Le Quéré, C., Andrew, R.M., Friedlingstein, P., Sitch, S., Pongratz, J., Manning, A.C., Korsbakken, J.I., Peters, G.P., Canadell, J.G., Jackson, R.B., Boden, T.A., Tans, P.P.,

- Andrews, O.D., Arora, V.K., Bakker, D.C.E., Barbero, L., Becker, M., Betts, R.A., Bopp, L., Chevallier, F., Chini, L.P., Ciais, P., Cosca, C.E., Cross, J., Currie, K., Gasser, T., Harris, I., Hauck, J., Haverd, V., Houghton, R.A., Hunt, C.W., Hurtt, G., Ilyina, T., Jain, A.K., Kato, E., Kautz, M., Keeling, R.F., Klein Goldewijk, K., Körtzinger, A., Landschützer, P., Lefèvre, N., Lenton, A., Lienert, S., Lima, I., Lombardozzi, D., Metzl, N., Millero, F., Monteiro, P.M.S., Munro, D.R., Nabel, J.E.M.S., Nakaoka, S.-I., Nojiri, Y., Padin, X.A., Peregon, A., Pfeil, B., Pierrot, D., Poulter, B., Rehder, G., Reimer, J., Rödenbeck, C., Schwinger, J., Séférian, R., Skjelvan, I., Stocker, B.D., Tian, H., Tilbrook, B., Tubiello, F.N., Van Der Laan-Luijkx, I.T., Van Der Werf, G.R., Van Heuven, S., Viovy, N., Vuichard, N., Walker, A.P., Watson, A.J., Wiltshire, A.J., Zaehle, S., Zhu, D., 2018. Global Carbon Budget 2017. *Earth Syst. Sci. Data* 10, 405–448. <https://doi.org/10.5194/essd-10-405-2018>
- Lefebvre, K.A., Frame, E.R., Kendrick, P.S., 2012. Domoic acid and fish behavior: A review. *Harmful Algae* 13, 126–130. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.09.011>
- Lefebvre, K.A., Quakenbush, L., Frame, E., Huntington, K.B., Sheffield, G., Stimmelmayer, R., Bryan, A., Kendrick, P., Ziel, H., Goldstein, T., Snyder, J.A., Gelatt, T., Gulland, F., Dickerson, B., Gill, V., 2016. Prevalence of algal toxins in Alaskan marine mammals foraging in a changing arctic and subarctic environment. *Harmful Algae* 55, 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.01.007>
- Lefebvre, K.A., Robertson, A., 2010. Domoic acid and human exposure risks: A review. *Toxicol* 56, 218–230. <https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2009.05.034>
- Lelong, A., Hégaret, H., Soudant, P., 2014. Link between domoic acid production and cell physiology after exchange of bacterial communities between toxic *Pseudo-nitzschia multiseries* and non-toxic *Pseudo-nitzschia delicatissima*. *Mar. Drugs* 12, 3587–3607. <https://doi.org/10.3390/md12063587>
- Lelong, A., Hégaret, H., Soudant, P., Bates, S.S., 2012. *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) species, domoic acid and amnesic shellfish poisoning: revisiting previous paradigms. *Phycologia* 51, 168–216. <https://doi.org/10.2216/11-37.1>
- Lema, K.A., Latimier, M., Nézan, É., Fauchot, J., Le Gac, M., 2017. Inter and intra-specific growth and domoic acid production in relation to nutrient ratios and concentrations in *Pseudo-nitzschia*: phosphate an important factor. *Harmful Algae* 64, 11–19.

<https://doi.org/10.1016/J.HAL.2017.03.001>

- Lewis, E., Wallace, D.W.R., 1998. Program developed for CO<sub>2</sub> system calculations, ORNL/CDIAC-105, Carbon Dioxide Information Analysis Center. Oak Ridge, Tennessee. <https://doi.org/4735>
- Lewis, M.R., Horne, E.P.W., Cullen, J.J., Oakey, N.S., Platt, T., 1984. Turbulent motions may control phytoplankton photosynthesis in the upper ocean. *Nature* 311. <https://doi.org/10.1038/311049a0>
- Lewis, N., Bates, S.S., McLachlan, J.L., Smith, J., 1993. Temperature effects on growth, domoic acid production, and morphology of the diatom *Nitzschia pungens* f. multiseriata, in: Smayda, T.J., Shimizu, Y. (Eds.), *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*. Elsevier Science Publishers, pp. 601–606.
- Li, Y., Dong, H., Teng, S.T., Bates, S.S., Lim, P.T., 2018. *Pseudo-nitzschia nanaoensis* sp. nov. (Bacillariophyceae), a novel species from the Chinese coast of the South China Sea. *J. Phycol.* (in press).
- Lim, J.R., 2012. Occurrence and distribution of toxic *Pseudo-nitzschia* events in Washington State: Analysis of scientific findings and policy responses. thesis.
- Liu, H., Kelly, M.S., Campbell, D.A., Dong, S.L., Zhu, J.X., Wang, S.F., 2007. Exposure to domoic acid affects larval development of king scallop *Pecten maximus* (Linnaeus, 1758). *Aquat. Toxicol.* 81, 152–158. <https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2006.11.012>
- Liu, M.S., Hellebust, J.A., 1976. Effects of salinity and osmolarity of the medium on amino acid metabolism in *Cyclotella cryptica*. *Can. J. Bot.* 54, 938–948. <https://doi.org/10.1139/b76-098>
- Louw, D.C., Doucette, G.J., Lundholm, N., 2018. Morphology and toxicity of *Pseudo-nitzschia* species in the northern Benguela Upwelling System. *Harmful Algae* 75, 118–128. <https://doi.org/10.1016/J.HAL.2018.04.008>
- Louw, D.C., Doucette, G.J., Voges, E., 2017. Annual patterns, distribution and long-Term trends of *Pseudo-nitzschia* species in the northern Benguela upwelling system. *J. Plankton Res.* 39, 35–47. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbw079>
- Lundholm, N., 2018. Bacillariophyceae, in IOC-UNESCO Taxonomic Reference List of Harmful Micro Algae [WWW Document]. URL <http://www.marinespecies.org/hab>
- Lundholm, N., Hansen, P.J., Kotaki, Y., 2004. Effect of pH on growth and domoic acid

- production by potentially toxic diatoms of the genera *Pseudo-nitzschia* and *Nitzschia*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 273, 1–15. <https://doi.org/10.3354/meps273001>
- Lundholm, N., Moestrup, Ø., Kotaki, Y., Hoef-Emden, K., Scholin, C., Miller, P., 2006. Inter- and intraspecific variation of the *Pseudo-nitzschia delicatissima* complex (Bacillariophyceae) illustrated by rRNA probes, morphological data and phylogenetic analyses. *J. Phycol.* 42, 464–481. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2006.00211.x>
- Lundholm, N., Skov, J., Pocklington, R., Moestrup, Ø., 1997. Studies on the marine planktonic diatom *Pseudo-nitzschia*. 2. Autecology of *P. pseudodelicatissima* based on isolates from Danish coastal waters. *Phycologia* 36, 381–388. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-36-5-381.1>
- Lundholm, N., Skov, J., Pocklington, R., Moestrup, Ø., 1994. Domoic acid, the toxic amino acid responsible for amnesic shellfish poisoning, now in *Pseudonitzschia seriata* (Bacillariophyceae) in Europe. *Phycologia* 33, 475–478. <https://doi.org/10.1006/mben.2002.0224>
- MacIntyre, H.L., Cullen, J.J., 2005. Using cultures to investigate the physiological ecology of microalgae, in: Andersen, R.A. (Ed.), *Algal Culturing Techniques*. ELSEVIER ACADEMIC PRESS, Burlington, MA, USA, pp. 287–326.
- Maldonado, M.T., Hughes, M.P., Rue, E.L., Wells, M.L., 2002. The effect of Fe and Cu on growth and domoic acid production by *Pseudo-nitzschia multiseries* and *Pseudo-nitzschia australis*. *Limnol. Oceanogr.* 47, 515–526. <https://doi.org/10.4319/lo.2002.47.2.0515>
- Mann, D.G., Mann, D.G., 1999. The species concept in diatoms, *Phycologia*.
- Markina, Z. V., Aizdaicher, N.A., 2016. The effect of lowered salinity of sea water on the growth and photosynthetic pigment content in three strains of the microalgae *Pseudo-nitzschia pungens* (Grunow ex. P.T. Cleve) Hasle, 1993 (Bacillariophyta). *Russ. J. Mar. Biol.* 42, 414–418. <https://doi.org/10.1134/S1063074016050060>
- Martens, H., Van de Waal, D.B., Brandenburg, K.M., Krock, B., Tillmann, U., 2016. Salinity effects on growth and toxin production in an *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) isolate from The Netherlands. *J. Plankton Res.* 38, 1302–1316. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbw053>
- Martin-Jézéquel, V., Calu, G., Candela, L., Amzil, Z., Jauffrais, T., Séchet, V., Weigel, P., 2015. Effects of organic and inorganic nitrogen on the growth and production of domoic acid by

- Pseudo-nitzschia multiseriata and P. australis (Bacillariophyceae) in culture. *Mar. Drugs* 13, 7067–7086. <https://doi.org/10.3390/md13127055>
- Masmoudi, S., Nguyen-Deroche, N., Caruso, A., Ayadi, H., Morant-Manceau, A., Tremblin, G., Bertrand, M., Schoefs, B., 2013. Cadmium, copper, sodium and zinc effects on diatoms: from heaven to hell — a review. *Cryptogam. Algal.* 34, 185–225. <https://doi.org/10.7872/crya.v34.iss2.2013.185>
- Mather, L., Macintosh, K., Kaczmarek, I., Klein, G., Martin, J.L., 2010. A checklist of diatom species reported (and presumed native) from Canadian coastal waters. *Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci.* 2881, 1–78.
- Maxwell, K., Johnson, G.N., 2000. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *J. Exp. Bot.* 51, 659–668. <https://doi.org/10.1093/jexbot/51.345.659>
- McCabe, R.M., Hickey, B.M., Kudela, R.M., Lefebvre, K.A., Adams, N.G., Bill, B.D., Gulland, F.M.D., Thomson, R.E., Cochlan, W.P., Trainer, V.L., 2016. An unprecedented coastwide toxic algal bloom linked to anomalous ocean conditions. *Geophys. Res. Lett.* 43, 10,366–10,376. <https://doi.org/10.1002/2016GL070023>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.01.004>
- McCarron, P., Wright, E., Quilliam, M.A., 2014. Liquid chromatography/mass spectrometry of domoic acid and lipophilic shellfish toxins with selected reaction monitoring and optional confirmation by library searching of product ion spectra. *J. AOAC Int.* 97, 316–324. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.SGEMcCarron>
- McMinn, A., Muller, M.N., Mertin, A., Ryan, K.G., 2014. The Response of Antarctic Sea Ice Algae to Changes in pH and CO<sub>2</sub>. *PLoS One* 9, e86984. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101371>
- Mehrbach, C., Culbertson, C.H., Hawley, J.E., Pytkowicz, R.M., 1973. Measurement of the Apparent Dissociation Constants of Carbonic Acid in Seawater At Atmospheric Pressure. *Limnol. Oceanogr.* 18, 897–907. <https://doi.org/10.4319/lo.1973.18.6.0897>
- Ménesguen, A., Lacroix, G., 2018. Modelling the marine eutrophication: A review. *Sci. Total Environ.* 636, 339–354. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.183>
- Middelboe, A.L., Hansen, P.J., 2007. High pH in shallow water macroalgal habitats. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 338, 107–117. <https://doi.org/10.2307/24871746>



- Moore, S.K., Trainer, V.L., Mantua, N.J., Parker, M.S., Laws, E.A., Backer, L.C., Fleming, L.E., 2008. Environmental Health Impacts of climate variability and future climate change on harmful algal blooms and human health. *Environ. Heal.* 7, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-7-S2-S4>
- Morse, J.W., Andersson, A.J., Mackenzie, F.T., 2006. Initial responses of carbonate-rich shelf sediments to rising atmospheric pCO<sub>2</sub> and “ocean acidification”: Role of high Mg-calcites. *Geochim. Cosmochim. Acta* 70, 5814–5830. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2006.08.017>
- Moschandreu, K.K., Baxevanis, A.D., Katikou, P., Papaefthimiou, D., Nikolaidis, G., Abatzopoulos, T.J., 2012. Inter- and intra-specific diversity of *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) in the northeastern Mediterranean. *Eur. J. Phycol.* 47, 321–339. <https://doi.org/10.1080/09670262.2012.713998>
- Nelson, D.M., Smith, W., 1991. Sverdrup revisited: Critical depths, maximum chlorophyll levels, and the control of Southern Ocean productivity by the irradiance-mixing regime. *Limnol. Oceanogr.* 36, 1650–1661. <https://doi.org/10.4319/lo.1991.36.8.1650>
- Nezan, E., Antoine, E., Fiant, L., Billard, C., 2006. Identification of *Pseudo-nitzschia australis* and *P. multiseries* in the Bay of Seine. Was there a relation to presence of domoic acid in king scallops in autumn 2004? *Harmful Algae News* 31, 1–3.
- Nézan, E., Chomérat, N., Bilién, G., Boulben, S., Duval, A., 2010. *Pseudo-nitzschia australis* on French Atlantic coast, an unusual toxic bloom. *Harmful Algae News* 2.
- Nielsen, L.T., Lundholm, N., Hansen, P.J., 2007. Does irradiance influence the tolerance of marine phytoplankton to high pH? *Mar. Biol. Res.* 3, 446–453. <https://doi.org/10.1080/17451000701711820>
- NOAA Fisheries, N.M.F.S., 2016. Fisheries of the United States, 2016 Report.
- Orive, E., Pérez-Aicua, L., David, H., García-Etxebarria, K., Laza-Martínez, A., Seoane, S., Miguel, I., 2013. The genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) in a temperate estuary with description of two new species: *Pseudo-nitzschia plurisecta* sp. nov. and *Pseudo-nitzschia abrensis* sp. nov. *J. Phycol.* 49, 1192–1206. <https://doi.org/10.1111/jpy.12130>
- Orr, J.C., Fabry, V.J., Aumont, O., Bopp, L., Doney, S.C., Feely, R.A., Gnanadesikan, A., Gruber, N., Ishida, A., Joos, F., Key, R.M., Lindsay, K., Maier-Reimer, E., Matear, R., Monfray, P., Mouchet, A., Najjar, R.G., Plattner, G.K., Rodgers, K.B., Sabine, C.L., Sarmiento, J.L., Schlitzer, R., Slater, R.D., Totterdell, I.J., Weirig, M.F., Yamanaka, Y.,

- Yool, A., 2005. Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms. *Nature* 437, 681–686. <https://doi.org/10.1038/nature04095>
- Osada, M., Stewart, J.E., 1997. Gluconic acid/gluconolactone: Physiological influences on domoic acid production by bacteria associated with *Pseudo-nitzschia multiseries*. *Aquat. Microb. Ecol.* 12, 203–209. <https://doi.org/10.3354/ame012203>
- Pan, Y., Bates, S.S., Cembella, A.D., 1998. Environmental stress and domoic acid production by *Pseudo-nitzschia*: a physiological perspective. *Nat. Toxins* 6, 127–135. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-7189\(199805/08\)6:3/4<127::AID-NT9>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-7189(199805/08)6:3/4<127::AID-NT9>3.0.CO;2-2)
- Pan, Y., Subba Rao, D. V., Mann, K.H., 1996a. Acclimation to low light intensity in photosynthesis and growth of *Pseudo-nitzschia multiseries* Hasle, a neurotoxic diatom. *J. Plankton Res.* 18, 1427–1438. <https://doi.org/10.1093/plankt/18.8.1427>
- Pan, Y., Subba Rao, D. V., Mann, K.H., Brown, R.G., Pocklington, R., 1996b. Effects of silicate limitation on production of domoic acid, a neurotoxin, by the diatom *Pseudo-nitzschia multiseries*. I. Batch culture studies. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 131, 225–233.
- Pancha, I., Chokshi, K., Maurya, R., Trivedi, K., Patidar, S.K., Ghosh, A., Mishra, S., 2015. Salinity induced oxidative stress enhanced biofuel production potential of microalgae *Scenedesmus* sp. *CCNM* 1077. *Bioresour. Technol.* 189, 341–348. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.017>
- Parkhill, J.P., Cembella, A.D., 1999. Effects of salinity, light and inorganic nitrogen on growth and toxicity of the marine dinoflagellate *Alexandrium tamarense* from northeastern Canada. *J. Plankton Res.* 21, 939–955. <https://doi.org/10.1093/plankt/21.5.939>
- Pednekar, S.M., Bates, S.S., Kerkar, V., Prabhu Matondkar, S.G., 2018. Environmental factors affecting the distribution of *Pseudo-nitzschia* in two monsoonal estuaries of Western India and effects of salinity on growth and domoic acid production by *P. pungens*. *Estuaries and Coasts* 41, 1448–1462. <https://doi.org/10.1007/s12237-018-0366-y>
- Pelah, D., Sintov, A., Cohen, E., 2004. The effect of salt stress on the production of canthaxanthin and astaxanthin by *Chlorella zofingiensis* grown under limited light intensity. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 20, 483–486.
- Perl, T., Bedard, L., Kosatsky, T., Hockin, J., Todd, E.C., Remis, R., 1990. An outbreak of toxic encephalopathy caused by eating mussels contaminated with domoic acid. *New Engl. J. Med. Engl. J. Med.* 32, 1775–1780.

- Pörtner, H.O., Karl, D.M., Boyd, P.W., 2014. Ocean systems: Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Part A: Global and Sectoral Aspects, in: Field, C.B., Barros, V.R., Dokken, D.J., Mach, K.J., Mastrandrea, M.D., Bilir, T.E., Chatterjee, M., Ebi, K.L., Estrada, Y.O., Genova, R.C., Girma, B., Kissel, E.S., Levy, A.N., MacCracken, S., Mastrandrea, P.R., White, L.L. (Eds.), Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, pp. 411–484.
- Pucéat, M., 1999. pH(i) regulatory ion transporters: An update on structure, regulation and cell function. *Cell. Mol. Life Sci.* 55, 1216–1229. <https://doi.org/10.1007/s000180050368>
- Pulido, O.M., 2008. Domoic Acid Toxicologic Pathology: A Review. *Mar. Drugs* 6, 180–219. <https://doi.org/10.3390/md6020180>
- Quijano-Scheggia, S., Garcés, E., Sampedro, N., Van Lenning, K., Flo, E., Andree, K., Fortuño, J.-M., Camp, J., 2008. Identification and characterisation of the dominant *Pseudo-nitzschia* species (Bacillariophyceae) along the NE Spanish coast (Catalonia, NW Mediterranean). *Sci. Mar.* 72, 343–359. <https://doi.org/10.3989/scimar.2008.72n2343>
- Quilliam, M. a., 2003. Chemical methods for domoic acid, the amnesic shellfish poisoning (ASP) toxin. *Mar. Harmful Microalgae* 11, 247–266.
- Ramsdell, J.S., Gulland, F.M., 2014. Domoic acid epileptic disease. *Mar. Drugs* 12, 1185–1207. <https://doi.org/10.3390/md12031185>
- Rehnstam-Holm, A.-S., Godhe, A., 1995. Genetic Engineering of Algal Species. *Encycl. Life Support Syst.*
- REPHY, 2017. French observation and monitoring program for phytoplankton and hydrology in coastal waters.
- Rhodes, L.L., Holland, P., Adamson, J., Selwood, A., McNabb, P., 2002. Mass culture of New Zealand isolates of *Pseudo-nitzschia australis* for production of a new isomer of domoic acid. *Harmful Algae* 125–127.
- Riebesell, U., 2004. Effects of CO<sub>2</sub> enrichment on marine phytoplankton. *J. Oceanogr.* 60, 719–729. <https://doi.org/10.1007/s10872-004-5764-z>
- Riebesell, U., Schulz, K.G., Bellerby, R.G.J., Botros, M., Fritsche, P., Meyerhöfer, M., Neill, C., Nondal, G., Oschlies, A., Wohlers, J., Zöllner, E., 2007. Enhanced biological carbon consumption in a high CO<sub>2</sub> ocean. *Nature* 450, 545–548.

<https://doi.org/10.1038/nature06267>

- Rost, B., Zondervan, I., Wolf-Gladrow, D., 2008. Sensitivity of phytoplankton to future changes in ocean carbonate chemistry: Current knowledge, contradictions and research directions. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 373, 227–237. <https://doi.org/10.3354/meps07776>
- Roubeix, V., Lancelot, C., 2008. Effect of salinity on growth, cell size and silicification of an euryhaline freshwater diatom: *Cyclotella meneghiniana* Kütz. *Transitional Waters Bull.* 2, 31–38. <https://doi.org/10.1285/i1825229Xv2n1p31>
- Round, F.E., Crawford, R.M., Mann, D.G., 1990. *The Diatoms : biology and morphology of the genera.* Cambridge University Press.
- Rout, N.P., Shaw, B.P., 2001. Salt tolerance in aquatic macrophytes: ionic relation and interaction. *Biol. Plant.* 4, 95–99.
- Rue, E., Bruland, K., 2001. Domoic acid binds iron and copper: A possible role for the toxin produced by the marine diatom *Pseudo-nitzschia*. *Mar. Chem.* 76, 127–134. [https://doi.org/10.1016/S0304-4203\(01\)00053-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4203(01)00053-6)
- Ryckaert, M., Nézan, E., Chomérat, N., Le Gal, D., Genauzeau, S., Derrien, A., Schmitt, A., Fillon, A., Gaignon, J.L., 2010. *Pseudo-nitzschia australis* occurrence and A . S . P . toxicity in Pertuis Charentais (France) after Xynthia storm ( 28 feb . 2010 ), in: ICES Annual Science Conference. p. 1.
- Sabine, C.L., Feely, R.A., Gruber, N., Key, R.M., Lee, K., Bullister, J.L., Wanninkhof, R., Wong, C.S., Wallace, D.W.R., Tilbrook, B., Millero, F.J., Peng, T.H., Kozyr, A., Ono, T., Rios, A.F., 2004. The oceanic sink for anthropogenic CO<sub>2</sub>. *Science* (80-. ). 305, 367–371. <https://doi.org/10.1126/science.1097403>
- Saeed, A.F., Awan, S.A., Ling, S., Wang, R., Wang, S., 2017. Domoic acid: Attributes, exposure risks, innovative detection techniques and therapeutics. *Algal Res.* 24, 97–110. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2017.02.007>
- Sahraoui, I., Grami, B., Bates, S.S., Bouchouicha, D., Chikhaoui, M.A., Mabrouk, H.H., Hlaili, A.S., 2012. Response of potentially toxic *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) populations and domoic acid to environmental conditions in a eutrophied, SW Mediterranean coastal lagoon (Tunisia). *Estuaries and Coasts* 102, 95–104. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2012.03.018>
- Santiago-Morales, I.S., García-Mendoza, E., 2011. Growth and domoic acid content of *Pseudo-*

- nitzschia australis isolated from northwestern Baja California, Mexico, cultured under batch conditions at different temperatures and two Si:NO<sub>3</sub> ratios. *Harmful Algae* 12, 82–94. <https://doi.org/10.1016/J.HAL.2011.09.004>
- Schippers, P., Lürling, M., Scheffer, M., 2004. Increase of atmospheric CO<sub>2</sub> promotes phytoplankton productivity. *Ecol. Lett.* 7, 446–451. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2004.00597.x>
- Schnoor, J.L., 2014. Responding to Climate Change with a Carbon Tax. *Environ. Sci. Technol.* 48, 12475–12476. <https://doi.org/10.1021/es5047952>
- Schobert, B., 1977. The Influence of water stress on the metabolism of diatoms. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 85, 451–461. [https://doi.org/10.1016/S0044-328X\(77\)80303-6](https://doi.org/10.1016/S0044-328X(77)80303-6)
- Schobert, B., 1974. The influence of water stress on the metabolism of diatoms I. Osmotic resistance and proline accumulation in *Cyclotella meneghiniana*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 74, 106–120. [https://doi.org/10.1016/S0044-328X\(74\)80164-9](https://doi.org/10.1016/S0044-328X(74)80164-9)
- Scholin, C.A., Gulland, F., Doucette, G.J., Benson, S., Busman, M., Chavez, F.P., Cordaro, J., DeLong, R., De Vogelaere, A., Harvey, J., Haulena, M., Lefebvre, K., Lipscomb, T., Loscutoff, S., Lowenstine, L.J., Marin, R., Miller, P.E., McLellan, W.A., Moeller, P.D.R., Powell, C.L., Rowles, T., Silvagni, P., Silver, M., Spraker, T., Trainer, V., Van Dolah, F.M., 2000. Mortality of sea lions along the central California coast linked to a toxic diatom bloom. *Nature* 403, 80–84. <https://doi.org/10.1038/47481>
- Schreiber, U., Müller, J.F., Haugg, A., Gademann, R., 2002. New type of dual-channel PAM chlorophyll fluorometer for highly sensitive water toxicity biotests. *Photosynth. Res.* 74, 317–330. <https://doi.org/10.1023/A:1021276003145>
- Schwarz, M., Jandová, K., Struk, I., Marešová, D., Pokorný, J., Riljak, V., 2014. Low dose domoic acid influences spontaneous behavior in adult rats. *Physiol. Res.* 63, 369–376. <https://doi.org/932636> [pii]
- Seymour, J.R., Amin, S.A., Raina, J.B., Stocker, R., 2017. Zooming in on the phycosphere: The ecological interface for phytoplankton-bacteria relationships. *Nat. Microbiol.* 2, 17065. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.65>
- Shumway, S.E., Allen, S.M., Boersma, P.D., 2003. Marine birds and harmful algal blooms: Sporadic victims or under-reported events? *Harmful Algae* 2, 1–17. [https://doi.org/10.1016/S1568-9883\(03\)00002-7](https://doi.org/10.1016/S1568-9883(03)00002-7)

- Skliris, N., Marsh, R., Josey, S.A., Good, S.A., Liu, C., Allan, R.P., 2014. Salinity changes in the World Ocean since 1950 in relation to changing surface freshwater fluxes. *Clim. Dyn.* 43, 709–739. <https://doi.org/10.1007/s00382-014-2131-7>
- Smith, E.A., Papapanagiotou, E.P., Brown, N.A., Stobo, L.A., Gallacher, S., Shanks, A.M., 2006. Effect of storage on amnesic shellfish poisoning (ASP) toxins in king scallops (*Pecten maximus*). *Harmful Algae* 5, 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2005.02.002>
- Smith, F.A., Raven, J. a, 1979. and Its Regulation.
- Sobrinho, B.F., De Camargo, L.M., Sandrini-Neto, L., Kleemann, C.R., Da Costa Machado, E., Mafra, L.L., 2017. Growth, toxin production and allelopathic effects of *Pseudo-Nitzschia multiseries* under Iron-enriched conditions. *Mar. Drugs* 15. <https://doi.org/10.3390/md15100331>
- Solorzano, L., Sharp, J.H., 1980. Determination of total dissolved nitrogen in natural waters. *Limnol. Oceanogr.* 25, 751–754.
- Stark, J.S., Roden, N.P., Johnstone, G.J., Milnes, M., Black, J.G., Whiteside, S., Kirkwood, W., Newbery, K., Stark, S., Van Ooijen, E., Tilbrook, B., Peltzer, E.T., Berry, K., Roberts, D., 2018. Carbonate chemistry of an in-situ free-ocean CO<sub>2</sub>enrichment experiment (antFOCE) in comparison to short term variation in Antarctic coastal waters. *Sci. Rep.* 8, 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21029-1>
- Stewart, J.E., 2008. Bacterial involvement in determining domoic acid levels in *Pseudo-nitzschia multiseries* cultures. *Aquat. Microb. Ecol.* 50, 135–144. <https://doi.org/10.3354/ame01159>
- Stewart, J.E., Marks, L.J., Wood, C.R., Risser, S.M., Gray, S., 1997. Symbiotic relations between bacteria and the domoic acid producing diatom *Pseudo-nitzschia multiseries* and the capacity of these bacteria for gluconic acid/gluconolactone formation. *Aquat. Microb. Ecol.* 12, 211–221. <https://doi.org/10.3354/ame012211>
- Stocker, T.F., Qin, D., Plattner, G.-K., Tignor, M.M.B., Allen, S.K., Boschung, J., Nauels, A., Xia, Y., Bex, V., Midgley, P.M., 2013. *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.* <https://doi.org/10.1017/CBO978110741532>
- Sun, J., Hutchins, D.A., Feng, Y., Seubert, E.L., Caron, D.A., Fu, F.X., 2011. Effects of changing pCO<sub>2</sub> and phosphate availability on domoic acid production and physiology of the marine harmful bloom diatom *Pseudo-nitzschia multiseries*. *Limnol. Oceanogr.* 56, 829–840.

<https://doi.org/10.4319/lo.2011.56.3.0829>

- Tammilehto, A., Nielsen, T.G., Krock, B., Møller, E.F., Lundholm, N., 2015. Induction of domoic acid production in the toxic diatom *Pseudo-nitzschia seriata* by calanoid copepods. *Aquat. Toxicol.* 159, 52–61. <https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2014.11.026>
- Taraldsvik, M., Myklestad, S., 2000. The effect of pH on growth rate, biochemical composition and extracellular carbohydrate production of the marine diatom *Skeletonema costatum*. *Eur. J. Phycol.* 35, 189–194. <https://doi.org/10.1080/09670260010001735781>
- Tasker, R.A., 2016. Domoic acid and other amnesic toxins: toxicological profile, in: Gopalakrishnakone, P., Haddad, V., Kem, W.R., Tubaro, A., Kim, E. (Eds.), *Marine and Freshwater Toxins*. Dordrecht Netherlands, pp. 93–112. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-6650-1>
- Tasker, R.A.R., Connell, B.J., Strain, S.M., 1991. Pharmacology of systemically administered domoic acid in mice. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 69, 378–382. <https://doi.org/10.1139/y91-057>
- Tatters, A.O., Fu, F.-X., Hutchins, D.A., 2012. High CO<sub>2</sub> and silicate limitation synergistically increase the toxicity of *Pseudo-nitzschia fraudulenta*. *PLoS One* 7, e32116. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032116>
- Teng, S.T., Tan, S.N., Lim, H.C., Dao, V.H., Bates, S.S., Leaw, C.P., 2016. High diversity of *Pseudo-nitzschia* along the northern coast of Sarawak (Malaysian Borneo), with descriptions of *P. bipertita* sp. nov. and *P. limii* sp. nov. (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 52, 973–989. <https://doi.org/10.1111/jpy.12448>
- Terray, L., Corre, L., Cravatte, S., Delcroix, T., Reverdin, G., Ribes, A., 2012. Near-surface salinity as nature's rain gauge to detect human influence on the Tropical water cycle. *J. Clim.* 25, 958–977. <https://doi.org/10.1175/JCLI-D-10-05025.1>
- Tesson, S.V.M., Montresor, M., Procaccini, G., Kooistra, W.H.C.F., 2014. Temporal changes in population structure of a marine planktonic diatom. *PLoS One* 9, e114984. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114984>
- Thessen, A.E., Bowers, H.A., Stoecker, D.K., 2009. Intra- and interspecies differences in growth and toxicity of *Pseudo-nitzschia* while using different nitrogen sources. *Harmful Algae* 8, 792–810. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2009.01.003>
- Thessen, A.E., Dortch, Q., Parsons, M.L., Morrison, W., 2005. Effect of salinity on *Pseudo-*

- nitzschia species (Bacillariophyceae) growth and distribution. *J. Phycol.* 41, 21–29. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2005.04077.x>
- Thessen, A.E., Stoecker, D.K., 2008. Distribution, abundance and domoic acid analysis of the toxic diatom genus *Pseudo-nitzschia* from the Chesapeake Bay. *Estuaries and Coasts* 31, 664–672. <https://doi.org/10.1007/s12237-008-9053-8>
- Thorel, M., Fauchot, J., Morelle, J., Raimbault, V., Le Roy, B., Miossec, C., Kientz-Bouchart, V., Claquin, P., 2014. Interactive effects of irradiance and temperature on growth and domoic acid production of the toxic diatom *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae). *Harmful Algae* 39, 232–241. <https://doi.org/10.1016/J.HAL.2014.07.010>
- Todd, E.C.D., 1993. Domoic Acid and Amnesic Shellfish Poisoning - A Review. *J. Food Prot.* 56, 69–83. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-56.1.69>
- Trainer, V.L., Adams, N.G., Bill, B.D., Stehr, C.M., Wekell, J.C., Moeller, P., Busman, M., Woodruff, D., 2000. Domoic acid production near California coastal upwelling zones, June 1998. *Limnol. Oceanogr.* 45, 1818–1833. <https://doi.org/10.4319/lo.2000.45.8.1818>
- Trainer, V.L., Bates, S.S., Lundholm, N., Thessen, A.E., Cochlan, W.P., Adams, N.G., Trick, C.G., 2012. *Pseudo-nitzschia* physiological ecology, phylogeny, toxicity, monitoring and impacts on ecosystem health. *Harmful Algae* 14, 271–300. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.10.025>
- Trainer, V.L., Hickey, B.M., Bates, S.S., 2008. Toxic diatoms, in: Walsh, P.J., Smith, S.L., Fleming, L.E., Solo-Gabriele, H., Gerwick, W.H. (Eds.), *Oceans and Human Health: Risks and Remedies from the Sea*. Elsevier Science Publishers, New York, pp. 219–237.
- Trainer, V.L., Hickey, B.M., Lessard, E.J., Cochlan, W.P., Trick, C.G., Wells, M.L., MacFadyen, A., Moore, S.K., 2009. Variability of *Pseudo-nitzschia* and domoic acid in the Juan de Fuca eddy region and its adjacent shelves. *Limnol. Oceanogr.* 54, 289–308. <https://doi.org/10.4319/lo.2009.54.1.0289>
- Trimborn, S., Lundholm, N., Thoms, S., Richter, K.U., Krock, B., Hansen, P.J., Rost, B., 2008. Inorganic carbon acquisition in potentially toxic and non-toxic diatoms: The effect of pH-induced changes in seawater carbonate chemistry. *Physiol. Plant.* 133, 92–105. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.01038.x>
- Truelove, J., Mueller, R., Pulido, O., Iverson, F., 1996. Subchronic toxicity study of domoic acid in the rat. *Food Chem. Toxicol.* 34, 525–9. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(96\)81814-X](https://doi.org/10.1016/0278-6915(96)81814-X)



- Tryphonas, L., Truelove, J., Nera, E., Iverson, F., 1990. Acute neurotoxicity of domoic acid in the rat. *Toxicol. Pathol.* 18, 1–9. <https://doi.org/10.1177/019262339001800101>
- Vadrucci, M.R., Cabrini, M., Basset, A., 2007. Biovolume determination of phytoplankton guilds in transitional water ecosystems of Mediterranean Ecoregion. *Transitional Waters Bull.* 1, 83–102. <https://doi.org/10.1285/I1825229XV1N2P83>
- Van Meerssche, E., Pinckney, J.L., 2017. The influence of salinity in the domoic acid effect on estuarine phytoplankton communities. *Harmful Algae* 69, 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2017.10.003>
- Villac, M.C., Matos, M.G., Santos, V.S., Rodrigues, A.W., Viana, S.C., 2004. Composition and distribution of *Pseudonitzschia* from Guanabara Bay, Brazil: the role of salinity, based on field and culture observations.
- Visciano, P., Schirone, M., Berti, M., Milandri, A., Tofalo, R., Suzzi, G., 2016. Marine biotoxins: occurrence, toxicity, regulatory limits and reference methods. *Front. Microbiol.* 7, 1051. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01051>
- Wang, Z., King, K.L., Ramsdell, J.S., Doucette, G.J., 2007. Determination of domoic acid in seawater and phytoplankton by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1163, 169–176. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.06.054>
- Wells, M.L., Trainer, V.L., Smayda, T.J., Karlson, B.S.O., Trick, C.G., Kudela, R.M., Ishikawa, A., Bernard, S., Wulff, A., Anderson, D.M., Cochlan, W.P., 2015. Harmful algal blooms and climate change: Learning from the past and present to forecast the future. *Harmful Algae* 49, 68–93. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.07.009>
- Wells, M.L., Trick, C.G., Cochlan, W.P., Hughes, M.P., Trainer, V.L., 2005. Domoic acid: The synergy of iron, copper, and the toxicity of diatoms. *Limnol. Oceanogr.* 50, 1908–1917.
- Wilkin, S.M., Cordaro, J., Gulland, F.M.D., Wheeler, E., Dunkin, R., Sigler, T., Casper, D., Berman, M., Flannery, M., Fire, S., Wang, Z., Colegrove, K., Baker, J., 2012. An unusual mortality event of harbor porpoises (*Phocoena phocoena*) off central California: Increase in blunt trauma rather than an epizootic. *Aquat. Mamm.* 38, 301–310. <https://doi.org/10.1578/AM.38.3.2012.301>
- Williams, R.B., 1964. Division rates of Salt Marsh diatoms in relation to salinity and cell size. *Ecol. Soc. Am.* 45, 877–880.
- Wilson, C., Sastre, A.V., Hoffmeyer, M., Rowntree, V.J., Fire, S.E., Santinelli, N.H., Ovejero,

- S.D., D'Agostino, V., Marón, C.F., Doucette, G.J., Broadwater, M.H., Wang, Z., Montoya, N., Seger, J., Adler, F.R., Sironi, M., Uhart, M.M., 2015. Southern right whale (*Eubalaena australis*) calf mortality at Península Valdés, Argentina: Are harmful algal blooms to blame? *Mar. Mammal Sci.* 32, 423–451. <https://doi.org/10.1111/mms.12263>
- Wingert, C., 2017. The Effects of Ocean Acidification on Growth, Photosynthesis, and Domoic Acid Production by the Toxigenic Diatom, *Pseudo-nitzschia australis*. Master's Thesis.
- Worden, A.Z., Follows, M.J., Giovannoni, S.J., Wilken, S., Zimmerman, A.E., Keeling, P.J., 2015. Environmental science. Rethinking the marine carbon cycle: Factoring in the multifarious lifestyles of microbes. *Science* (80-. ). 347, 1257594. <https://doi.org/10.1126/science.1257594>
- Wright, J.L.C., Boyd, R.K., Freitas, a. S.W. De, Falk, M., Foxall, R. a., Jamieson, W.D., Laycock, M. V., McCulloch, a. W., McInnes, a. G., Odense, P., Pathak, V.P., Quilliam, M. a., Ragan, M. a., Sim, P.G., Thibault, P., Walter, J. a., Gilgan, M., Richard, D.J. a., Dewar, D., 1989. Identification of domoic acid, a neuroexcitatory amino acid, in toxic mussels from eastern Prince Edward Island. *Can. J. Chem.* 67, 481–490. <https://doi.org/10.1139/v89-075>
- Zapata, M., Fraga, S., Rodríguez, F., Garrido, J., 2012. Pigment-based chloroplast types in dinoflagellates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 465, 33–52. <https://doi.org/10.3354/meps09879>
- Zapata, M., Rodríguez, F., Fraga, S., Barra, L., Ruggiero, M.V., 2011. Chlorophyll c pigment patterns in 18 species (51 strains) of the genus *Pseudo-nitzschia* (bacillariophyceae). *J. Phycol.* 47, 1274–1280. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2011.01055.x>
- Zhu, Z., Qu, P., Gale, J., Fu, F., Hutchins, D.A., 2017. Individual and interactive effects of warming and CO<sub>2</sub> on *Pseudo-nitzschia subcurvata* and *Phaeocystis antarctica*, two dominant phytoplankton from the Ross Sea, Antarctica. *Biogeosciences* 14, 5281–5295. <https://doi.org/10.5194/bg-14-5281-2017>

**Titre : Réponses écophysiological des espèces toxiques de *Pseudo-nitzschia* aux variations environnementales liées au changement climatique**

**Mots clés :** acide domoïque, changement climatique, écophysiology, *Pseudo-nitzschia*

La diatomée *Pseudo-nitzschia* comprend certaines espèces toxiques capables de produire de l'acide domoïque (AD), une neurotoxine amnésiante. La prolifération de ces espèces toxiques présente de nombreux risques allant de graves dommages écologiques et économiques à des menaces pour la santé publique. Les problèmes liés à cette prolifération se multiplient dans le monde entier et le besoin de la société scientifique de mieux comprendre les facteurs environnementaux influant sur l'apparition de ces blooms est plus nécessaire que jamais. Dans ce contexte, plusieurs espèces et souches de *Pseudo-nitzschia* ont été étudiées afin de mieux comprendre et prédire leurs réponses physiologiques face à de futurs changements climatiques. En particulier, les expérimentations

effectuées ont permis d'explorer l'impact de la variation de la salinité et de l'acidification de l'océan (diminution de pH) sur la croissance et la production d'AD chez les espèces de *Pseudo-nitzschia australis* et *P. fraudulenta*. Les résultats obtenus ont montré que les espèces de *Pseudo-nitzschia* sont capables de s'adapter, proliférer et produire des toxines dans des conditions variables de salinité et de pH, malgré une importante diversité de réponses en fonction des souches ou des espèces étudiées. Ces résultats ont permis de déterminer l'influence et la capacité d'acclimatation des cellules de *Pseudo-nitzschia* face aux futures conditions environnementales (salinité, pH). Les travaux réalisés représentent une contribution à l'avancée des connaissances sur l'écophysiology et la production toxinique par les espèces de *Pseudo-nitzschia*.

**Title: Ecophysiological responses of *Pseudo-nitzschia* toxic species to environmental variations related to climate change**

**Keywords:** amnesic shellfish poisoning, climate change, domoic acid, ecophysiology, *Pseudo-nitzschia*

The diatom *Pseudo-nitzschia* includes certain toxic species capable of producing domoic acid (DA), an amnesic neurotoxin. The proliferation of these toxic species presents many risks ranging from serious ecological and economic damage to threats to public health. Problems related to these proliferations are increasing worldwide and the need for scientist to better understand the environmental factors influencing the appearance of these blooms is more necessary than ever. In this context, several species and strains of *Pseudo-nitzschia* have been studied to better understand and predict their physiological responses to future climate change. In particular, the experiments carried out allowed to explore the impact

of salinity variations and ocean acidification (decrease of pH) on the growth, photosynthesis and DA production by several *Pseudo-nitzschia* species and strains. The results obtained showed that *Pseudo-nitzschia* species are flexible, able to adapt, proliferate and produce toxins under varying conditions of salinity and pH, despite the large diversity of responses depending on the strains or species studied. These results made it possible to determine the influence and acclimation capacities of *Pseudo-nitzschia* cells facing future environmental conditions (pH, salinity). Thus, the work carried out represents a contribution to the advancement of knowledge on the ecophysiology and toxin production by *Pseudo-nitzschia* species.