

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES

ECOLE DOCTORALE N°598

Sciences de la Mer et du littoral

Spécialité : *Biologie marine*

Par

Marin-Pierre GEMIN

Effets *in situ* et *in vitro* des paramètres environnementaux sur l'abondance, le métabolome et le contenu toxinique d'*Ostreopsis cf. ovata* et purifications des ovatoxines

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 3 juillet 2020

Unité de recherche: Laboratoire Phycotoxines – Ifremer Nantes

Thèse N° :

Rapporteurs avant soutenance :

Elisa BERDALET – Chargé de recherche – ICM-CSIC
Barcelone

Luisa PASSERON MANGIALAJO – Maître de conférences des
universités – Université Nice Sophia Antipolis

Composition du Jury :

Olivier GROVEL – Professeur des universités – UFR des
Sciences Pharmaceutiques et Biologiques Nantes

Pascal CLAQUIN – Professeur des universités – Université
Caen Normandie

Ronel BIRE – Chargé de projets scientifiques et techniques –
ANSES Maisons-Alfort

Directeur de thèse

Zouher AMZIL – Directeur de recherche – Laboratoire
Phycotoxines – Ifremer Nantes

Remerciements

En premier lieu, je souhaite remercier Elisa Berdalet et Luisa Mangialajo d'avoir accepté d'être les rapporteurs et d'évaluer mon travail de thèse. Je remercie également Olivier Grovel, Pascal Claquin, Ronel Biré et Zouher Amzil pour leur participation à mon jury de thèse.

J'aimerais ensuite remercier tout particulièrement Zouher Amzil, mon directeur de thèse au laboratoire PHYC de l'Ifremer de Nantes pour m'avoir offert la possibilité de réaliser cette thèse et ce, dans de bonnes conditions. Je te remercie de m'avoir permis de réaliser les déplacements pour des missions terrains et pour des congrès en France comme à l'étranger. Je te remercie également pour avoir pris le temps de relire et corriger mes posters, mes rapports, mes articles et finalement ce manuscrit.

Je remercie également mes co-encadrants : Véronique Séchet et Damien Réveillon de l'Ifremer de Nantes, Samuel Bertrand du laboratoire Mer, Molécules, Santé de l'Université des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Nantes. Merci Véronique pour le soutien moral et scientifique que tu m'as apporté au cours de ces quelques années et pour le temps que tu as consacré à mes travaux. Merci à Samuel Bertrand pour avoir encadré ma thèse, avoir suivi l'évolution de mon travail, pour m'avoir initié à la métabolomique et pour m'avoir aidé dans l'interprétation des données et dans la rédaction des articles. Je tiens tout particulièrement à adresser mes remerciements à Damien Réveillon. Merci, pour avoir suivi mon travail de près et ce, depuis ta première semaine au laboratoire ! Merci pour m'avoir aidé, guidé et soutenu durant cette thèse, lors des manip et de la rédaction. Je suis admiratif de ta rigueur et de ton énergie inébranlable. Merci aussi pour ta patience, pour avoir lu, corrigé, relu, recorrecté, encore et encore l'ensemble de mes travaux et surtout ce manuscrit. J'ai beaucoup appris à tes côtés et je t'en suis reconnaissant.

J'aimerais remercier les membres de mon comité de thèse Véronique Martin-Jézéquel de l'Université des Sciences et Techniques de Nantes et Rodolphe Lemée du Laboratoire d'Océanographie de Villefranche-sur-Mer pour avoir suivi mon travail et permis de poursuivre ma thèse chaque année.

Je tiens également à remercier Oliver Thomas, coordinateur du projet ANR OCEAN-15 dans lequel s'inscrit cette thèse. Je remercie également l'ensemble des personnes du consortium (LOV, ANSES-Fougère et GéoAzur) pour leur retour lors de mes présentations et leur participation dans mes travaux.

Je remercie très chaleureusement l'ensemble des membres du labo PHYC avec qui j'ai partagé ces 3 années : Merci à petite Véro et Korian (Macgyver) pour les dépannages techniques et informatiques. Merci Korian pour ton aide précieuse lors des tests Neuro-2A et notamment pour l'entretien de nos cellules que nous avons baptisées « Kadoc » et « Karadoc », pour avoir élaboré et construit les panneaux LED utilisés lors de mes plans d'expériences, pour les discussions passionnées autour de la bière (et d'une bière !) et des jeux en ligne (Heroes of the Storm !). Merci à Virginie pour m'avoir formé à la culture d'Ostreopsis lors de mes premiers pas au laboratoire et à Florent (Floflo) pour ses blagues, sa bonne humeur, son aide et son soutien lors des manip et des

cultures. Merci à Georges, Mano et Michelle pour vos rires, votre bonne humeur et vos encouragements du début à la fin ! Vous connaître fut un réel plaisir et je pars avec plein de supers souvenirs ! Je remercie énormément Fabienne, ma première voisine de bureau quand je suis arrivé au laboratoire PHYC. Merci de m'avoir aidé à m'intégrer au sein du labo, de m'avoir formé aux différents instruments et protocoles et de m'avoir conseillé, guidé, écouté et aidé jusqu'au bout. J'ai très apprécié travailler avec toi. Je le referai sans hésiter. Merci également aux autres membres du laboratoire PHYC pour avoir animé les pauses café, pour leur soutien, leur aide, à savoir : Philippe, Enora, Amandine, Liliane, Nathalie et Elise. Merci à Hélène de m'avoir aidé à organiser les différentes missions et déplacements et de t'être occupée des nombreux colis que j'ai dû envoyer ! A toute l'équipe, je vous remercie de m'avoir intégré, d'avoir animé la vie du labo, pour les rires et les coups durs et l'ensemble des moments partagés au travail comme à l'extérieur ! Merci !

Je tiens également à remercier Nicolas Chomérat pour m'avoir aidé à y voir plus clair dans la taxonomie d'Ostreopsis et pour son aide sur l'état de l'art consacré à cet organisme.

J'adresse un remerciement tout particulier à mes collègues thésards (la super team Zinzins !) : Merci à Max avec qui j'ai débuté ma thèse et dont je n'ai toujours pas perçu le salaire comme indiqué sur son contrat de travail. Merci pour les bons moments passés au labo, à l'extérieur et sur le champ de bataille (Clash Royal !). Merci à Cyrielle, qui a dû endurer nos débats sur le travail et pour m'avoir encouragé jusqu'au bout ! Merci à Nounou pour les gâteaux, le houmous (ma nouvelle religion), pour tes rires, tes vanes, ta bonne humeur et tes conseils. Merci à Mamie Soso, pour la bonne humeur, pour les encouragements et avoir représenté la Bretagne et nous y avoir emmené ! Merci à Sysy, mon vendéen préféré, qui m'a beaucoup fait rire pendant ces deux années et pour les bons moments passés au labo, au RoadHouse et au Motoc (\m/). Merci à Toto (le petit dernier) et Sébastien pour avoir apporté plein de bonnes vibrations dans le groupe que nous étions, pour les soirées MarioKart et les soirées au bar. Merci à mon ami Francesco, avec qui nous nous évadions après le travail via Farewell Allodynia, notre groupe de musique. Merci à Tetelle la sportive, pour m'avoir accompagné au sport entre midi et deux, au badminton comme à Basic-fit, pour les soirées Switch, les rires et les discussions (sans oublier les potins !!!). De tout mon cœur, merci à vous tous, vous avez joué un rôle important dans mon quotidien lors de ces 3 années (presque 4 !), sur le plan professionnel comme personnel. J'ai la tête chargée de souvenirs et j'espère sincèrement que ce ne seront pas les derniers ! Quand je pense à vous mon cœur danse la macérana lala lala (Damso et al., 2017).

Je tiens aussi à remercier les personnes qui ont été de passage au laboratoire et avec qui j'ai passé de très bons moments au labo comme en dehors ; Sylvain K. et Maria. Merci aux stagiaires de passage au laboratoire : Pauline, Tanguy et Charline avec qui j'ai partagé le bureau pendant plusieurs mois et ce dans la bonne humeur. Je tiens à remercier tout particulièrement mon stagiaire Maxime Tharaud. Merci pour ton investissement dans ma thèse et ta positive attitude au quotidien. Ton encadrement fut un plaisir !

Je remercie également les sportifs de « l'étage du dessus où ils comptent les poissons » à savoir : Oliver (mention spéciale : Oscar des meilleurs jeux de mots) et Florianne qui m'ont permis de déconnecter sur le terrain de badminton.

Je tiens à remercier Rodolphe Lemée pour m'avoir accueilli au sein du LOV pendant l'été 2017 et de m'avoir permis de réaliser une étude terrain avec son équipe. D'ailleurs, je tiens à remercier Anne-So pour avoir effectué de nombreuses sorties en mer pour poser et récupérer les substrats artificiels quand j'étais à Nantes, pour m'avoir intégré à l'équipe du LOV pendant mon séjour. Je remercie Joana Olivi et les « rodolphettes » (les deux Mélanie) pour avoir effectué une grande partie des comptages et pour m'avoir aidé dans les prélèvements terrain. Je tiens à remercier Laury Açaf pour m'avoir permis de contribuer à son travail de thèse, pour m'avoir fait découvrir et sortir à Nice le temps de mon séjour. Grace à vous, je garde un très bon souvenir sur le plan personnel et professionnel.

Je voudrais remercier très chaleureusement l'ensemble des mes amis pour m'avoir encouragé, soutenu du début à la fin, avec qui j'ai partagé mes joies et mes déceptions, les bons moments comme les coups durs et qui m'ont permis de déconnecter au quotidien. Je remercie donc ma « team Michelet » : Mathilde (pour les soirées !) et Laurent, Maxou (y'a plus de saison), Gillou et Marine (merci à vous deux pour les relectures !), Clément, Natha et Alexis (vie de bandit). Merci également à Pierre, Yves et Julie, Guillaume et Héloïse, Sarah (miss Houmous), Cilou et Alex, Thomas et Sarah pour leur soutien. Je remercie également mes amis de Rennes : Willy et Steven et mes amis de Paris : mon Fabou, Alex et Laurianne. Je remercie également le club des 4 : Marinette, Alexandre et Xavier pour leur soutien et leurs encouragements sans faille.

La thèse a aussi été l'occasion de rencontrer d'autres doctorants de disciplines et nationalités différentes. Así que me gustaría agradecer a mis amigas latina: Jenny y Elisabeth. Muchas gracias por los estímulos, las discusiones sobre la tesis y los buenos tiempos durante y fuera de los entrenamientos.

Je voudrais également remercier mes anciens collègues et amis du LBCM de Vannes : Maya, Ludo, Anne-So et Romain qui m'ont donné l'envie de poursuivre en thèse et qui m'ont encouragé pendant celle-ci. Ainsi que Gilles Bedoux et Nathalie Bourgoignon pour m'avoir motivé à me lancer dans cette aventure qu'est la thèse.

Je tiens à énormément remercier ma compagne Paloma, pour son soutien au quotidien, son aide précieuse (merci pour les relectures !), pour avoir partagé les bons moments comme les mauvais, mon mauvais caractère (par moment), pour m'avoir chouchouté quand je rédigeais et pour ta bonne humeur et tes rires contagieux que tu m'apportes chaque jour. Sans toi la thèse aurait été tout autre.

Pour finir, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance envers ma famille, mes parents et mon frère. Vous m'avez encouragé, soutenu dans mes choix et dans les moments difficiles depuis toujours. Sans vous, je ne serais jamais arrivé où j'en suis actuellement. Merci du fond du cœur. Maman, papa et Clément, je vous dédicace ce manuscrit en gage de ma gratitude et pour tout ce que vous m'avez apporté.

*« Il y a une mélancolie particulière dans l'accompagnement, dans le fait de savoir qu'un but
longuement poursuivi a enfin été atteint et qu'il nous faut refaçonner sa vie en fonction de nouveaux
objectifs. »*

Arthur C. Clarke, La Cité et les Astres, 1956.

Table des matières

Table des matières	I
Liste des figures	VII
Liste des tableaux.....	XI
Liste des annexes	XIII
Liste des abréviations.....	XV
Introduction générale et objectifs de la thèse	1
Chapitre 1 - Etat de l'art	5
1. Les efflorescences de microalgues nuisibles	6
1.1 Généralités sur les HAB	6
1.2 Espèces de microalgues et toxines associées.....	7
1.3 Les problématiques associées aux HAB	9
1.4 <i>Ostreopsis</i> , un dinoflagellé toxique émergent en Méditerranée.....	10
2. Le genre <i>Ostreopsis</i>	11
2.1 Taxonomie et description.....	11
2.2 Distribution mondiale.....	14
3. Les toxines produites par <i>Ostreopsis</i>	17
3.1 Les molécules toxiques du type PLTX-like.....	17
3.1.1 L'origine historique de la PLTX	17
3.1.2 Structure chimique de la PLTX et de ses analogues	17
3.1.3 La découverte des OVTX.....	19
3.2 Les molécules toxiques non PLTX-like	22
4. Toxicité de la PLTX et de ses analogues	23
4.1 Les mécanismes d'action de la PLTX	23
4.2 Evaluation de la toxicité <i>in vivo</i> de la PLTX.....	24

4.3	Risques sanitaires et surveillance des PLTX-like produits par <i>Ostreopsis</i>	26
4.3.1	Les cas d'intoxications par ingestion de produits contaminés par la PLTX	26
4.3.2	Accumulation de PLTX et OVTX dans les organismes marins.....	27
4.3.3	Les cas d'intoxications par inhalation ou contact cutané avec la PLTX du palythoa.....	28
4.3.4	Risques sanitaires liés aux blooms d' <i>Ostreopsis</i> en Méditerranée	29
4.3.5	Risque sanitaire et réglementation en France	29
4.4	Effets toxiques sur la faune marine.....	32
4.5	Toxicité d'ovatoxines purifiées.....	35
5.	Ecophysiologie d'<i>Ostreopsis cf. ovata</i> dans un contexte de changement global	38
5.1	Le changement climatique en mer Méditerranée	38
5.2	Influence des paramètres environnementaux sur <i>Ostreopsis cf. ovata</i>	38
5.2.1	Influence de la température.....	45
5.2.2	Effet de la salinité.....	47
5.2.3	Effet de l'intensité lumineuse.....	48
5.2.4	Effet des nutriments.....	49
5.2.5	Effet de l'acidité.....	49
5.2.6	Effet de l'hydrodynamisme sur les blooms	50
5.2.7	Etude des effets de facteurs environnementaux combinés	51
5.2.8	Effet du type de substrat.....	54
5.3	Les facteurs régulant la production d'ovatoxines chez <i>O. cf. ovata</i>	55
5.3.1	Production d'OVTX en fonction de la température	55
5.3.2	Production d'OVTX en fonction de la salinité	56
5.3.3	Effet de l'hydrodynamisme sur la production d'OVTX.....	56
5.3.4	Production d'OVTX en fonction des nutriments	56
5.3.5	Production des OVTX en fonction de la phase de croissance d' <i>O. cf. ovata</i>	57
5.3.6	Impact de la croissance et paramètres environnementaux sur les profils toxiques d' <i>O. cf. ovata</i>	58
5.4	Conclusion	58
6.	Annexes	59
	Chapter 2 - Toxin content of <i>Ostreopsis cf. ovata</i> depends on bloom phases, depth and macroalgal substrate in the NW Mediterranean Sea	63
	Abstract	64

1. Introduction	64
2. Material and methods	66
2.1 Sampling area and methods.....	66
2.2 Toxin extraction and analysis by LC-MS/MS	68
2.3 Statistical analysis.....	69
3. Results	69
3.1 <i>Ostreopsis cf. ovata</i> bloom development and cellular toxin content	69
3.2 Variability of <i>Ostreopsis</i> toxin content with the depth	71
3.3 Variation of <i>Ostreopsis</i> toxin content with macroalgal substrate	72
4. Discussion	74
4.1 Temporal development of the bloom	74
4.2 Variability of <i>Ostreopsis</i> abundances and total toxin content with depth	75
4.3 Variation in <i>Ostreopsis</i> toxin content with macroalgal substrate.....	76
4.4 Toxin profiles.....	78
5. Conclusion	79
6. Supplementary data	81
Chapter 3 - Combined effects of temperature and light intensity on growth, metabolome and ovatoxins content of <i>Ostreopsis cf. ovata</i> strain from the Mediterranean Sea	83
Abstract	84
1. Introduction	85
2. Materials and methods	88
2.1 Culture conditions, acclimation and experimental setup	88
2.2 Analyses.....	89
2.2.1 Cell counting and growth rate.....	89
2.2.2 Extraction of cells for OVTX analysis	89
2.2.3 Photosynthetic efficiency (Fv/Fm).....	89
2.2.4 Bacteria enumeration.....	89
2.2.5 Nutrients analysis	89

2.2.6	LC-HRMS analyses for metabolomics.....	90
2.2.7	LC-MS/MS quantification of ovatoxins.....	91
2.3	Statistical analysis.....	91
2.4	LC-HRMS feature annotation	92
3.	Results	92
3.1	Growth pattern.....	92
3.2	Metabolomics analyses	94
3.2.1	Effect of temperature, light intensity and time of growth on global <i>O. cf. ovata</i> metabolome	94
3.2.2	Specific features impacted by temperature and light intensity modification	96
3.2.3	Putative identification of compounds depending on the temperature and/or light intensity	98
3.3	Intracellular OVTX content	99
4.	Discussion	100
4.1	Effect of environmental parameters on growth of <i>O. cf. ovata</i>	100
4.2	Effect of temperature and light intensity on the metabolome of <i>O. cf. ovata</i>	102
4.2.1	Effect of temperature on the metabolome.....	103
4.2.2	Effect of light intensity on metabolome.....	103
4.2.3	Combined effect of temperature and light intensity on metabolome	104
4.3	Effect of temperature and light on OVTX content and profile.....	105
5.	Conclusion.....	107
6.	Supplementary data.....	108
Chapitre 4 - Etude de stabilité de la palytoxine et purification des ovatoxines		
.....		117
1.	Introduction.....	118
2.	Matériel et méthode	121
2.1	Méthodes d'analyse par LC-MS/MS.....	121
2.1.1	Méthode d'analyse de la PLTX seule (« méthode PLTX »)	122
2.1.2	Méthodes d'analyse des OVTX et de la PLTX (« méthodes multi-toxines »)	122
2.1.3	Analyse d'extraits contenant du DMSO	123
2.2	Etude de stabilité.....	123

2.2.1	Plan d'expériences n°1 – Effet du solvant de reprise, du type de contenant et de la concentration en PLTX.....	124
2.2.2	Plan d'expériences n°2 – Etude de l'effet de la matrice sur la conservation de la PLTX 125	
2.2.3	Plan d'expériences n°3 – Etude de l'effet de l'évaporation	125
2.2.4	Tests complémentaires	126
2.3	Culture d' <i>Ostreopsis cf. ovata</i>	127
2.4	Optimisation de la durée d'extraction des OVTX intracellulaires	128
2.5	Comparaison des méthodes de fractionnement.....	128
2.5.1	Présentation des méthodes de fractionnement	128
2.5.2	Procédures de fractionnement par SEC et chromatographie flash	129
2.6	Extraction et purification des OVTX	129
2.6.1	Extraction des OVTX à partir des culots cellulaires	133
2.6.2	Fractionnement par SEC des extraits bruts pour la purification	133
2.6.3	Purification des OVTX par chromatographie semi-préparative	133
2.7	Analyses statistiques	134
3.	Résultats et discussion	135
3.1	Etude de stabilité.....	135
3.1.1	Effet du type de solvant, du contenant et de la concentration sur la réponse en LC-MS/MS de la PLTX et sa conservation dans le temps.....	135
3.1.2	Etude de l'effet matrice sur la stabilité de la PLTX.....	140
3.1.3	Effet de l'évaporation.....	143
3.2	Optimisation de la durée d'extraction des OVTX.....	147
3.3	Comparaisons des méthodes fractionnement des extraits bruts : SEC vs. Chromatographie flash	149
3.4	Purification des ovatoxines	150
3.4.1	Profils d' <i>Ostreopsis cf. ovata</i> : MCCV54 et MCCV55	150
3.4.2	Fractionnement des extraits bruts concentrés par SEC (Sephadex LH-20).....	151
3.4.3	Séparation par chromatographie semi-préparative d'un mélange d'OVTX.....	152
3.4.4	Purification des OVTX-a et -d à partir du mélange d'OVTX obtenu de la souche MCCV55	153
4.	Conclusions générales	157
5.	Annexes	160
	Chapitre 5 - Discussion générale, conclusion et perspectives.....	167

1. L'effet du substrat macroalgale sur <i>Ostreopsis</i>	168
2. L'évolution des méthodes de suivis des efflorescences	170
3. Les effets des paramètres environnementaux sur <i>Ostreopsis cf. ovata</i>..	172
3.1 Effets de la température	172
3.2 Effets de l'intensité lumineuse	174
3.3 Effets des facteurs combinés.....	176
3.4 Des biomarqueurs du changement de température et de lumière	176
3.5 L'impact de la température dans un contexte de changement global	178
4. La variabilité intraspécifique d'<i>Ostreopsis cf. ovata</i>.....	179
4.1 Les variations intraspécifiques d' <i>Ostreopsis cf. ovata</i> en fonction des paramètres environnementaux	179
4.2 La variabilité intraspécifique d' <i>Ostreopsis cf. ovata</i> au sein d'une population	179
5. Faisabilité de la purification des ovatoxines en vue d'études toxicologiques	
181	
5.1 Bilan des tests de stabilité de la palytoxine	181
5.2 Bilan de la purification des OVTX	183
5.3 Perspective pour la purification	186
Conclusion et synthèse.....	189
Valorisations scientifiques	191
Bibliographie.....	193

Liste des figures

Figure 1 : Risque de transfert des phycotoxines dans la chaîne trophique. En vert : contaminations directes des organismes et bioaccumulation de toxines dans leurs tissus. En orange : contaminations indirectes via la consommation d'organismes contaminés. Schéma adapté de Burkholder et al. (2018).	9
Figure 2 : Dessins des 11 espèces d' <i>Ostreopsis</i> repris d'Accoroni et al. (2016) et de Verma et al. (2016).	12
Figure 3 : Distribution connue d' <i>Ostreopsis</i> spp. dans le monde, repris de Tester et al. (2020).....	15
Figure 4 : Distribution géographique des efflorescences d' <i>Ostreopsis</i> cf. <i>ovata</i> en mer Méditerranée d'après la littérature.....	16
Figure 5 : Structure de la palytoxine (PLTX) (C ₁₂₉ H ₂₂₃ O ₅₄ N ₃) avec ses sites d'absorbance à 233 et 263 nm (en bleu), le fragment A (en marron) et la position des modifications chimiques par rapport ses analogues (en rouge).....	18
Figure 6: A : Structure chimique de l'ostréol-A (C ₆₇ H ₁₁₂ N ₂ O ₂₃) et B de l'ostréol-B (C ₅₇ H ₁₀₈ O ₂₂).	22
Figure 7 : A : Fonctionnement normal de la pompe Na ⁺ /K ⁺ -ATPase. B : Mécanisme d'action de la PLTX sur la pompe Na ⁺ /K ⁺ -ATPase.	23
Figure 8 : Périodes d'efflorescences d' <i>Ostreopsis</i> cf. <i>ovata</i> en mer Méditerranée (d'après les données présentes dans la littérature, Tableau 8).	45
Figure 9 : Diagramme du modèle d'initiation des blooms en fonction de la température et du rapport N/P en mer Adriatique (d'après Accoroni et al. (2015a) Phase de pré-bloom (A) : à une température inférieure à 25 °C et un ratio N/P élevé (> 1000). Phase de pré-bloom juste avant l'initiation de l'efflorescence (B) : l'augmentation de la température (> 25°C) permet aux kystes de commencer à germer mais le ratio N/P reste trop élevé et ne permet pas aux cellules de se développer. Phase d'initiation du bloom (C) : un apport de phosphate dans le milieu réduit le ratio N/P (= 24) et le maintien de la température à plus de 25 °C permet aux cellules de continuer à germer et à proliférer. Phase de bloom (D) : Le bloom peut être maintenu et le pic peut avoir lieu à plus faible température (i.e. 20 °C) et jusqu'à 30 jours après le pic de température à plus de 25 °C. Le ratio N/P peut augmenter légèrement mais reste favorable à la prolifération des cellules.....	53

Figure 10 : Modèle sur les effets des ratios N/P, de la température de l'eau et de l'hydrodynamisme sur la formation et le maintien de blooms d' <i>Ostreopsis cf. ovata</i> (Accoroni et al. (2015a). Les flèches symbolisent les effets positifs (vert) et négatifs (rouge). Les lignes pointillées représentent les effets moins significatifs.	54
Figure 11 : Sampling was performed at three stations (A, B, and C) at Rochambeau, Villefranche-sur-Mer, France (NW Mediterranean Sea). Dotted line shows the slope where <i>Padina pavonica</i> was sampled from 0.5 m to 5 m depth.	68
Figure 12 : (A) Monitoring <i>Ostreopsis cf. ovata</i> blooms during summer 2017 in Rochambeau. Means stations A, B and C were expressed in cells/g FW and cells/L for benthic and planktonic abundances. (B) Mean total toxin content of epiphytic cells sampled on artificial substrate (pg/cell). Error bars represent standard deviations (n = 3). Arrows show the day of sampling to study the importance of the macroalgae (7 th) and the depth (10 th) on abundance and toxin content.....	70
Figure 13 : (A) Mean benthic cell abundance and (B) mean OVTX content of the epiphytic <i>O. cf. ovata</i> cells on <i>P. pavonica</i> from 0.5 m to 5 m depth. No significant difference was observed (<i>p</i> -value = 0.30 and 0.20, n = 3, for toxin and cell concentration). Error bars represent standard deviations.....	71
Figure 14 : Relative concentration (%) of OVTX-a to -e for each depth (isob-PLTX and OVTX-f < LOD).	72
Figure 15 : (A) Mean epiphytic cell abundance (cells/g FW) sampled on <i>Dictyota</i> spp., <i>Padina pavonica</i> and <i>Halopteris scoparia</i> (n = 3) and (B) mean total toxin content of the associated <i>Ostreopsis</i> cells (n = 3) on 7 July 2017. ns: non-significant, * <i>p</i> <0.05, ** <i>p</i> <0.01. Error bars represent standard deviations.	73
Figure 16 : Relative concentration (%) of OVTX-a to -e for cells epiphytic collected on <i>Dictyota</i> spp., <i>P. pavonica</i> and <i>H. scoparia</i> (isob-PLTX and OVTX-f < LOD).	73
Figure 17: Growth patterns of acclimated cultures of <i>O. cf. ovata</i> (MCCV54) at 23 (A), 27 (B), 30 °C (C) and 200 (solid), 400 (dashed), 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (dotted lines). Error bars represented the standard deviation (n = 3).	93
Figure 18 : Growth rates of <i>O. cf. ovata</i> (MCCV54) at the different temperatures (23 °C, 27 °C, 30 °C) and irradiances (200, 400, 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). No significant difference was found between values with the same letters (two-way ANOVA <i>p</i> -value < 0.05).	94
Figure 19 : ANOVA-PCA (UV scaling) from LC-HRMS data corresponding to <i>Ostreopsis cf. ovata</i> cultivated at 23, 27, 30 °C, under a light intensity of 200, 400 and 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and after 6, 10, 14,	

18 and 21 days of growth. The loading plots represented the specific effects of temperature (A), light intensity (B) and time of growth (C).....	95
Figure 20 : ANOVA-OPLS from LC-HRMS data corresponding to <i>Ostreopsis cf. ovata</i> cultivated at 23, 27, 30 °C, under a light intensity of 200, 400 and 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and after 6, 10, 14, 18 and 21 days of growth. The loading plots represented the ANOVA-OPLS models of temperature (A, $R^2 = 0.97$, $Q^2 = 0.95$) and light intensity (B, $R^2 = 0.91$, $Q^2 = 0.80$). A share and unique structures plot (SUS-plot, C) highlight features with VIP (Variable Importance in Projection) ≥ 1.5 according to both models. Temperature is represented on the X-axis and the light intensity on the Y-axis.....	97
Figure 21 : Total intracellular ovatoxins concentration ($\mu\text{g}/\text{cell}$) measured by LC-MS/MS during the growth at 23 (A), 27 (B) and 30 °C (C) and at 200, 400 and 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	99
Figure 22: Cultures d' <i>Ostreopsis cf. ovata</i> en Fernbachs au laboratoire PHYC.....	127
Figure 23 : Procédure d'extraction, de fractionnement et de purification des OVTX pour la souche MCCV54 : mélange d'OVTX.	131
Figure 24 : Procédure d'extraction, de fractionnement et de purification des OVTX pour la souche MCCV55 : OVTX-a et -d.....	132
Figure 25 : Graphiques des effets directs sur les aires du pic chromatographique de la PLTX mesurées en fonction des trois facteurs considérés (solvant, contenant, concentration) à J0, J1, J28 et le tableau des ANOVA avec les p-values et R^2 associés aux différents facteurs et leurs interactions : solvant (MeOH 50 %, MeOH 100 % ou DMSO), concentration (0,2 ou 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) et le contenant (verre ou PP) avec en rouge les facteur significatifs ($p\text{-value} < 0,05$, $n = 3$).....	136
Figure 26 : Chromatogrammes montrant les différences de ratios d'ions pour la PLTX selon le solvant : $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ (bleu), $[\text{M}+2\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ (rouge) et $[\text{M}+3\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^{3+}$ (vert) dans des vials en PP à des concentrations de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Pour le DMSO, la solution a été diluée au 1/5 pour permettre l'injection en LC-MS/MS puis les résultats ont été multipliés par 5 pour obtenir une concentration équivalente à 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$	137
Figure 27 : Graphique des effets directs sur les aires de pics de la PLTX en LC-MS/MS en fonction des quatre facteurs considérés entre J1 et J15 et tableau des ANOVA avec les p-values et R^2 associés aux différents facteurs (solvant, contenant, concentration et temps) et leurs interactions.	138
Figure 28 : Graphiques des effets directs sur les aires du pic de la PLTX mesurées à J0, J5 et les p-values et R^2 associés aux différents facteurs et leurs interactions : solvant (MeOH 50 % ou MeOH 100 %), contenant (Verre ou PP) et présence de matrice avec en rouge les facteurs significatifs ($p\text{-value} < 0,05$, $n = 2$).....	141

Figure 29 : Graphique des effets directs sur les aires de pics de la PLTX en LC-MS/MS en fonction des quatre facteurs considérés entre J0 et J41 et tableau des ANOVA avec les p-values associés aux différents facteurs (solvant, contenant, présence de matrice MCCV57 et durée de conservation) et leurs interactions.....	142
Figure 30 : Aires des pics de PLTX en fonction du temps dans du MeOH 100%, selon le contenant (V = verre et PP) et la présence ou non de matrice (mat vs. solv). Les barres d'erreurs représentent les écarts-types (n = 2).....	143
Figure 31 : Graphique des effets directs sur les pertes obtenues lors de l'évaporation (différence des aires avant et après évaporation/reprise) et le tableau des ANOVA avec les p-value associées aux différents facteurs : Solvant, présence d'acide acétique, de matrice (MCCV57) et du type d'évaporation (i.e. concentration jusqu'à V = 200 µL ou évaporation à sec) avec en rouge les facteur significatif (<i>p-value</i> < 0,05, n = 2).	144
Figure 32 : Concentrations en OVTX totales dans des extraits obtenus à partir de 0,5 g de biomasse de la souche MCCV55 selon différentes conditions d'extraction : en vert 1 min de vortex (V) (sans sonication) et en bleu 5, 15, 30, 60 et 120 min sous ultrasons (US) en mode pulsé (10 sec on, 5 sec off). Les lettres montrent une différence significative (<i>p-value</i> < 0,05, n = 3).	148
Figure 33 : Profils d'élution des OVTX à partir d'extraits brut issus de l'extraction de 2 g de culot humide par chromatographie d'exclusion stérique (A) et d'affinité (B).	150
Figure 34 : Chromatogramme LC-UV avec gradient lent obtenu à partir du pool d'OVTX issu de la souche MCCV55. Les numéros indiquent les fractions qui ont été récoltées. Les fractions 1, 3, 4 et 5 correspondent respectivement à l'OVTX-d, -e, -b et -a.	154
Figure 35 : Chromatogramme (TIC) des extraits d'OVTX-d et -a isolé à partir du mélange d'OVTX. Les extraits ont été analysés avec la méthode « multi-toxines 1 ».....	156
Figure 36 : Système BEDI (Benthic Dinoflagellate Integrator) développé par Mangialajo et al. (2017) utilisé pour le dénombrement des dinoflagellé benthiques.....	171

Liste des tableaux

Tableau 1 : Phycotoxines rapportées dans la littérature, associées à leurs organismes producteurs, leur syndrome et leur structure chimique (Botana, 2016; Rasmussen et al., 2016; Basti et al., 2018; Farabegoli et al., 2018).....	8
Tableau 2 : Palytoxine et ses analogues (palytoxine isobarique, ovatoxines, ostrécocines et mascarénotoxines) retrouvés chez <i>Ostreopsis</i> : formule brute, masse molaire (théorique) et positions suspectées des modifications chimiques (annotées R1 à R10 sur la Figure 5).	20
Tableau 3 : Toxicité <i>in vivo</i> de la PLTX après 24 h d'exposition selon l'animal et la voie d'administration (d'après Deeds and Schwartz, 2010; Munday, 2011; Patocka et al., 2015).....	25
Tableau 4 : Exemples de DL ₅₀ de phycotoxines injectées par voie intrapéritonéale (i.p.) chez la souris d'après l'EFSA (European Food Safety Authority) (EFSA, 2008a, b, 2009a, b, c, d, e, f, 2010a, b, c)....	26
Tableau 5 : Concentrations maximales de PLTX-like retrouvées dans la chair totale d'organismes marins.....	28
Tableau 6 : Seuils d'alerte associés à leur niveau de risque pour la santé en fonction des densités cellulaires dans la colonne d'eau et des conditions environnementales, repris de Funari et al. (2015).	31
Tableau 7 : Toxicité des cellules d' <i>Ostreopsis cf. ovata</i> sur la faune marine.	33
Tableau 8 : Recensement des efflorescences d' <i>Ostreopsis</i> en mer Méditerranée en fonction des régions, des températures lors des efflorescences et du pic, des concentrations maximales observées (en vert benthiques en cellules/g de poids frais et en bleu : planctoniques en cellules/L) et des espèces de macroalgues échantillonnées (vert : Chlorophyceae, rouge : Florideophyceae et brun : Phaeophyceae).....	40
Tableau 9 : Recensement des taux de croissance d' <i>Ostreopsis cf. ovata</i> selon la température, la lumière (intensité et photopériode), la salinité et les nutriments obtenus en laboratoire.	43
Tableau 10 : Toxicités des autres PLTX-like et non PLTX-like évaluées sur des lignées cellulaires, par tests hémolytiques ou par bioessais sur des souris ou des crustacés (<i>Artemia</i>).	62
Tableau 11 : Proportions (%) des OVTX-a à -g et d'isob-PLTX dans les profils 1 à 4 identifiés par Tartaglione et al. (2017) et le nombre de souches associées à ces profils.	119

Tableau 12 : Transitions utilisées pour la quantification de la palytoxine et des ovatoxines par LC-MS/MS.....	123
Tableau 13 : Plan d'expériences numéro 1 : effet du solvant (MeOH 50 %, MeOH 100 % et DMSO), du contenant (verre et polypropylène) et de la concentration (0,2 et 2 µg/mL).	124
Tableau 14 : Plan d'expériences numéro 2 : effet du solvant (MeOH 50 % et MeOH 100 %) et du contenant (verre ou PP) avec ou sans matrice « <i>Ostreopsis</i> ».....	125
Tableau 15 : Plan d'expériences numéro 3 : pertes de PLTX liées à l'évaporation en fonction du solvant (MeOH 50 % ou 100 %), de la présence d'acide acétique (AA), de la présence de matrice « <i>Ostreopsis</i> » et du type d'évaporation (à sec ou réduction du volume).....	126
Tableau 16 : Pertes relatives (%) en PLTX à J4, J15 et J28 par rapport à J1 pour les différentes conditions de conservation.	139
Tableau 17 : Pertes relatives en PLTX à J28 par rapport à J0 pour les différentes conditions de conservation. n.c. : résultats non calculés.	142
Tableau 18 : Pertes relatives en PLTX (moyennes et écart-types, n = 2) observées lors de concentration (en gris) ou l'évaporation à sec (en blanc) à partir de solutions de de PLTX dans du MeOH 50 % et MeOH 100 %, avec/sans acide acétique et avec/sans matrice.	145
Tableau 19 : Pertes en PLTX après évaporation d'une solution de PLTX dans du MeOH 50 % et repris avec du MeOH 50 %, de l'eau puis du MeOH 100 % et du MeOH 100 % puis de l'eau (n=2).....	145
Tableau 20 : Pertes associées à l'évaporation (concentration ou à sec) puis la reprise de PLTX dans un mélange ACN/Eau (70 : 30 v/v) et d'eau.	146
Tableau 21 : Temps de sonication utilisé dans la littérature pour extraire les OVTX à partir de culots cellulaires.....	147
Tableau 22 : Profil toxique (%) des souches d' <i>Ostreopsis cf. ovata</i> MCCV54 et 55 utilisées pour la purification.	151
Tableau 23 : Proportions (%) des OVTX issues des souches MCCV54 et MCCV55 après de la première étape de chromatographie semi-préparative.	153
Tableau 24 : Bilan de la purification des OVTX : masses et rendements expérimentaux (mesurés par LC-MS/MS) vs. théoriques (calculés d'après les pertes observées lors de l'étude de stabilité).	155
Tableau 25 : Résumé des quantités de PLTX-like purifiées d'après la littérature.....	184

Liste des annexes

Annexe 1 : Localisations d' <i>Ostreopsis cf. ovata</i> dans les océans et mers du monde.....	59
Annexe 2 : Toxicité des molécules produites par le genre <i>Ostreopsis</i>	61
Annex 3 : Linear regression between mean of benthic and planktonic abundances of cells sampled on site A, B and C in Rochambeau.....	81
Annex 4 : Relative concentration (%) of OVTX-a to -e for cells collected on artificial substrates (isob-PLTX and OVTX-f <LOD).....	81
Annex 5 : Design of experiments to study the combined effects of temperature and light intensity on the growth, metabolome and ovatoxins content of pre-acclimated cells.....	108
Annex 6 : Nutrient concentration in the culture media of nitrogen (blue) and phosphorus (orange) during the growth at 23 (A1-A2), 27 (B1-B2) and 30 °C (C1-C2) at 200, 400 and 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	109
Annex 7 : PCA (UV scaling) from LC-HRMS data obtained after the growth of <i>Ostreopsis cf. ovata</i> at 23, 27, 30 °C, under a light intensity of 200, 400 and 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and after 6, 10, 14, 18 and 21 days of growth.	110
Annex 8 : Retention time, acquisition mode, masse (m/z) and VIP score of the 115 features identified in a combination of low/high temperature and light.....	110
Annex 9 : Total intracellular ovatoxin concentration basis on cell biovolume ($\text{fg}/\mu\text{m}^3$) during the growth at 23 (A), 27 (B) and 30 °C (C) at 200 (black), 400 (grey) and 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (white).	114
Annex 10 : p -value of the one-way ANOVA ($n = 3$) on toxin content between day 6 and the day where the maximum toxin content was reached.	114
Annex 11 : Total bacteria basis on volume media (A) and on <i>Ostreopsis</i> cell calculated by flux cytometry.	115
Annex 12 : Activity of photosystem II (f_v/f_m) measured with Aquapen at 23 (A), 27 (B) and 30 °C (C) under 200 (black), 400 (green), 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (blue) at day 6, 10, 14, 18 and 21.	115
Annex 13 : Relative concentration of intracellular OVTX-a to -e (%) growing at 23, 27 and 30 °C, under 200, 400 and 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and during 21 days. Concentrations of OVTX-c, -e and/or -d at 27 °C – 200/400/600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ – D14 and at 23 °C – 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ – D21 are under the limit of detection.	116

Annexe 14 : Protocole du plan d'expériences sur l'effet de la reprise d'une solution de PLTX à 0,5 µg/mL dans du MeOH 50 % évaporée à sec à 30 °C sous flux d'azote.....	160
Annexe 15 : Schéma du protocole d'optimisation de la durée d'extraction des OVTX par agitation vortex ou sonication.....	161
Annexe 16 : Procédure de préparation des échantillons d'OVTX purifiées dans du DMSO pour les tests de toxicité.....	162
Annexe 17 : Essais de fractionnement des extraits bruts par chromatographie flash.	163
Annexe 18 : Caractéristiques et calculs des volumes d'élutions des OVTX par chromatographie d'exclusion stérique (SEC).	165

Liste des abréviations

ACN	:	Acétonitrile
ADN	:	Acide Désoxyribonucléique
ANR	:	Agence National de la Recherche
ANSES	:	Agence National de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'environnement et du travail
AP	:	Antéropostérieur
ASP	:	Amnesic Shellfish Poisoning
AZP	:	Azaspiracid Shellfish Poisoning
BHAB	:	Benthic Harmful Algal Bloom (Bloom Benthique d'Algues Nuisibles)
CFP	:	Ciguatera Fish Poisoning
CO ₂	:	Dioxyde de carbone
DMSO	:	Diméthylsulfoxyde
DSP	:	Diarrethic Shellfish Poisoning
DV	:	Dorsoventral
EFSA	:	European Food Safety Authority (Autorité de Sécurité Sanitaire Européenne)
HAB	:	Harmful Algal Bloom (Bloom d'Algues Nuisibles)
HPLC	:	Chromatographie Liquide Haute Performance
i.m.	:	Intra-musculaire
i.p.	:	Intra-péritonéale
i.v.	:	Intra-veineux
ITS	:	Internal Transcribed Spacer
LC-HRMS	:	Liquid Chromatography coupled to High Resolution Mass Spectrometer (Chromatographie Liquide couplée à un Spectromètre de Masse Haute Résolution)
LC-MS/MS	:	Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometer (Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse en tandem)
LD	:	Limite de Détection
LOV	:	Laboratoire d'Océanographie de Villefranche-sur-Mer
LQ	:	Limite de Quantification
MCCV	:	Mediterranean Culture Collection of Villefranche (Collection de Cultures Méditerranéenne de Villefranche)
MCTX	:	Mascarénotoxine
MeOH	:	Méthanol
MRM	:	Multiple Reaction Monitoring
Neuro-2A	:	Cellules de neuroblastome de souris
NSP	:	Neurotoxic Shellfish Poisoning
O ₂	:	Dioxygène
OST	:	Ostréocine
OTX	:	Ostréotoxine
OVTX	:	Ovatoxine
PCR	:	Polymeric Chain Reaction (Réaction en Chaîne par Polymérase)
PLTX	:	Palytoxine
PP	:	Polypropylène
PSP	:	Paralytic Shellfish Poisoning
ROS	:	Reactive Oxygen Species (Espèces réactive à l'oxygène)
RT-qPCR	:	Real Time quantitative PCR (PCR quantitative en temps réelle)
SEC	:	Size Exclusion Chromatography (Chromatographie d'exclusion stérique)
SUS	:	Share and Unique Structure

Introduction générale et objectifs de la thèse

Les microalgues sont des organismes unicellulaires à la base des chaînes alimentaires des écosystèmes marins et produisent, via la photosynthèse, la moitié de l'oxygène atmosphérique (**Granéli and Turner, 2006**). Lorsque les conditions environnementales sont favorables, certaines espèces sont capables de former d'importantes efflorescences, appelées blooms (**Anderson, 2017**). Les fortes concentrations cellulaires associées peuvent donner lieu à des efflorescences visibles (e.g. coloration rouge ou verte de la surface de l'eau), mais aussi en cas d'espèce nuisible ou toxique, engendrer des effets indésirables à la fois sur les organismes marins (e.g. mortalité, reproduction altérée) et sur la santé humaine (e.g. exposition directe ou suite à la bioaccumulation de toxines algales, appelées phycotoxines, dans les aliments) (**Granéli and Turner, 2006; Burkholder et al., 2018**).

Au niveau mondial, l'extension des efflorescences de microalgues toxiques, y compris du dinoflagellé benthique *Ostreopsis cf. ovata*, a été associée au changement global, notamment aux phénomènes d'eutrophisation et de changement climatique (**Hallegraeff, 1993; Van Dolah, 2000; Hallegraeff, 2010; Griffith and Gobler, 2019; Tester et al., 2020**). Parmi les facteurs du changement global, l'évolution des facteurs environnementaux (e.g. température, salinité, pH) sont suspectés de favoriser la prolifération cellulaire, leur rôle sur la production de toxines et leur impact à l'échelle de l'écosystème doivent être davantage étudiés.

Depuis une quinzaine d'années, des proliférations régulières d'*Ostreopsis* ont été rapportées lors des périodes chaudes sur le pourtour méditerranéen (**Mangialajo et al., 2011; Illoul et al., 2012; Accoroni and Totti, 2016**) y compris sur les côtes françaises (**Cohu et al., 2013; Brissard et al., 2014**). L'espèce *Ostreopsis cf. ovata* est la plus répandue en mer Méditerranée (**Penna et al., 2010**) et est connue pour produire des toxines de la famille de la palytoxine (PLTX), les ovatoxines (OVTX). A ce jour, une douzaine d'analogues sont référencés, énumérés de -a à -l (**Ciminiello et al., 2008; Ciminiello et al., 2010; Ciminiello et al., 2012d; Brissard et al., 2015; García-Altare et al., 2015; Tartaglione et al., 2016b; Tartaglione et al., 2017**). Comme la PLTX, les OVTX peuvent s'accumuler dans les produits de la mer et notamment les oursins (**Amzil et al., 2012; Biré et al., 2013; Biré et al., 2015**). Mais contrairement aux intoxications liées à la consommation de produits contaminés par la PLTX, aucun cas par l'ingestion d'OVTX n'a été déclaré chez l'Homme (**Tubaro et al., 2011**). Notons que sur les côtes

méditerranéennes françaises, les oursins contaminés pouvant être à l'origine d'intoxication humaine, font l'objet d'interdiction administrative de la pêche pendant l'été, période d'efflorescence d'*O. cf. ovata*. Cependant, les efflorescences d'*Ostreopsis* ont été associées à de nombreuses affections des voies respiratoires et des irritations cutanées en Italie, en Espagne, en France et en Algérie (**Ciminiello et al., 2006; Kermarec et al., 2008; Vila et al., 2008; Illoul et al., 2012**).

L'absence d'étalon et de matériau de référence limite les études toxicologiques qui serviraient pourtant à mieux apprécier le risque sanitaire. A ce jour, seule l'activité de l'OVTX-a a été évaluée en laboratoire. Cependant, face au manque de données, il est difficile de définir clairement les effets toxiques et la dangerosité de l'OVTX-a. Par exemple, certains auteurs ont rapporté une toxicité de l'OVTX-a 100 fois inférieure à celle de la PLTX (**Pelin et al., 2016b**) alors que d'autres ne montrent pas de différence significative (**Poli et al., 2018**). La toxicité de cet analogue par les voies respiratoires chez le rat a été démontrée par **Poli et al. (2018)**, suggérant un risque sanitaire potentiel lors des efflorescences, surtout depuis que des OVTX ont été trouvées dans des aérosols (**Ciminiello et al., 2014**).

En plus de l'OVTX-a, les souches d'*O.cf. ovata* sont capable de produire une multitude d'autres OVTX dont les proportions relatives peuvent varier d'une souche à l'autre. Les OVTX-a à -e sont les toxines majoritairement rapportées dans les profils d'*O. cf. ovata* en Méditerranée (**Tartaglione et al., 2017**). Dans certains profils, la proportion relative de ces analogues peut être importante (e.g. entre 18 et 88 % pour l'OVTX-b) et peut donc représenter un risque d'intoxication si cette dernière était avérée.

Les travaux de thèse présentés ici s'inscrivent dans le cadre du projet ANR-OCEAN-15 (*Ostreopsis* Chemical Ecology and Allelopathy Network 2016-2020) composé de 4 objectifs principaux :

- Identifier les molécules de l'exo-métabolome d'*O. cf. ovata* pour comprendre le rôle des toxines et du métabolisme spécialisé dans leur relation avec les autres organismes marins ;
- Evaluer l'impact des changements globaux sur l'endo- et l'exo-métabolome (incluant les OVTX) d'*O. cf. ovata* ;
- Evaluer la médiation chimique entre *O. cf. ovata* et les autres organismes benthiques, la mieofaune et les échinodermes ;
- Déterminer les effets cytotoxiques de toxines et autres métabolites purifiés d'*O. cf. ovata* sur des lignées cellulaires intestinales et respiratoires.

C'est donc un projet interdisciplinaire sur « les risques sur la santé face aux changements globaux » en apportant des connaissances utiles à une politique intégrative de santé publique. Le consortium est composé de l'ICN-Université de Nice (coordination), du Laboratoire d'Océanographie de Villefranche

(LOV), de l'ANSES-Fougères et du laboratoire PHYC/Ifremer (laboratoire d'accueil de ce projet de thèse, avec un financement 100 % ANR OCEAN-15).

Les collaborations avec les partenaires du projet ANR s'articulent autour de 1) l'étude terrain avec le LOV et 2) la production d'OVTX purifiées en vue de i) évaluer la cytotoxicité, les effets et les mécanismes d'action de ces toxines avec l'ANSES-Fougères et ii) évaluer leur ecotoxicité sur différents modèles benthiques et planctoniques (i.e. microalgues, copépodes et oursins) avec le LOV.

Dans ce contexte, le sujet de thèse avait trois objectifs :

- 1) Suivre *in situ* la concentration cellulaire et le contenu en OVTX d'*Ostreopsis* i) au cours de la croissance du bloom, ii) selon la profondeur et le substrat macroalgal ;
- 2) Selon une approche écophysiological, étudier après acclimatation, les effets combinés de la température et de la lumière sur la croissance, le contenu en OVTX et le métabolome d'une souche d'*O. cf. ovata* ;
- 3) Evaluer la stabilité de la PLTX et purifier des OVTX à partir de deux souches d'*O. cf. ovata* aux profils toxiques différents, en vue de réaliser des études toxicologiques pour mieux apprécier le risque sanitaire et écologique.

La thèse comporte cinq chapitres :

Le **chapitre 1** comprend un état de l'art divisé en trois volets. Le premier s'intéresse à la présentation des algues nuisibles avec une description du genre *Ostreopsis* et plus précisément de l'espèce *O. cf. ovata*. Le second volet présente les molécules toxiques produites par *Ostreopsis* avec un focus sur la PLTX et les OVTX, leurs effets *in vitro*, *in vivo* et les risques sanitaires associés à la présence de ce dinoflagellé en Méditerranée. Enfin, le dernier volet décrit les effets des différents paramètres environnementaux (e.g. température, lumière, salinité, pH) sur la croissance, la prolifération et la production d'OVTX chez *Ostreopsis*.

Le **chapitre 2** présente les résultats de l'étude *in situ* réalisée à Villefranche-sur-Mer pendant l'été 2017, en collaboration avec le Laboratoire d'Océanographie de Villefranche (LOV). Il décrit la dynamique du bloom d'*Ostreopsis* ainsi que les effets du substrat et de la profondeur sur les abondances d'*Ostreopsis*, la concentration en OVTX intracellulaire et les profils toxiques associés. Ce travail a fait l'objet d'une publication dans le journal *Harmful Algae* en décembre 2019.

Le **chapitre 3** est consacré à l'évaluation des effets combinés de la température, de l'intensité lumineuse et du temps sur trois réponses : la croissance, la quantité d'OVTX intracellulaire et le métabolome d'une souche d'*O. cf. ovata* préalablement acclimatée à chaque condition. L'étude du métabolome a été réalisée en partenariat avec le laboratoire Mer, Molécules, Santé (MMS) de

l'Université des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Nantes. Ce travail a fait l'objet d'une publication soumise dans le journal *Harmful Algae*.

Le **chapitre 4** est divisé en 2 parties. La première s'intéresse à la stabilité de la molécule de référence, la PLTX commercialisée par Wako. Cette étude a pour but de mieux comprendre les pertes de toxines associées au processus de purification. Pour cela, plusieurs facteurs ont été évalués : le solvant de reprise, le type de contenant pour la conservation, le type d'évaporation, la présence de matrice et l'effet du temps de conservation. Ces travaux ont été réalisés dans le cadre du stage de master 2 de Maxime Tharaud (Université de Nantes). La seconde partie décrit l'ensemble des étapes qui nous ont permis de purifier un mélange d'OVTX ainsi que les OVTX-a et -d à partir de culots cellulaires issus de deux souches d'*Ostreopsis cf. ovata* (MCCV54 et 55). Ces solutions ont été fournies à nos collaborateurs pour réaliser des études d'écotoxicologie et de cytotoxicité ANR (i.e. LOV et ANSES).

Le **chapitre 5** propose une discussion sur l'ensemble des résultats de la thèse avec la conclusion et les perspectives associées à ces travaux.

Chapitre 1- Etat de l'art

1. Les efflorescences de microalgues nuisibles

1.1 Généralités sur les HAB

Les microalgues sont des organismes photosynthétiques unicellulaires qui constituent le phytoplancton avec les cyanobactéries. Les microalgues participent à la moitié de la production de l'oxygène terrestre et sont la base de la chaîne alimentaire aquatique (**Anderson, 2017**). Ces organismes, quand les conditions environnementales leur sont favorables, peuvent se multiplier et former des efflorescences appelées « blooms », qui peuvent se situer en surface, dans la colonne d'eau ou sur des substrats pour les espèces benthiques. La présence de ces blooms peut engendrer des effets néfastes sur l'environnement aquatique et aussi impacter l'Homme. On nomme ainsi HAB, pour « Harmful Algal Bloom » (efflorescences d'algues nuisibles), les proliférations excessives d'espèces de microalgues et cyanobactéries capables d'induire des effets toxiques ou nocifs sur l'Homme et la faune locale, engendrant des effets négatifs sur les activités économiques telles que l'aquaculture, la pêche ou le tourisme (**Anderson et al., 2012; Anderson, 2017**). A l'origine, les HAB étaient définies comme des « marées rouges », mais ce terme n'était pas assez spécifique car ces proliférations pouvaient également être le résultat d'efflorescences d'espèces non toxiques. De plus, la couleur des efflorescences dépend des pigments que les cellules renferment pouvant donner lieu à des colorations rouges, brunes, jaunes ou vertes selon les espèces. Certaines microalgues toxiques prolifèrent sans former d'efflorescence massive et visible comme pour le dinoflagellé *Dinophysis*, mais dont l'abondance de quelques milliers voire centaines de cellules par litre suffit pour rendre les mollusques impropres à la consommation sur les côtes françaises.

Wells et al. (2019) précisent que le terme HAB, bien que compris dans la plupart des contextes scientifiques, reste imprécis. De manière générale, les HAB ont été associés à de rapides proliférations, des fortes concentrations cellulaires ainsi que des métabolites toxiques (**Smayda, 1997; Anderson et al., 2012**). Néanmoins, aucun seuil de concentration cellulaire n'est défini pour considérer qu'une efflorescence (toxique ou non) est un bloom et ce terme ne fait référence qu'à une quantité élevée de cellules qui demeure relative. Les HAB sont considérés comme nuisibles compte tenu de la production de toxines par certaines espèces d'une part, et d'autre part du fait des effets néfastes sur l'environnement liés à leur densité élevée. Par exemple, les HAB peuvent diminuer la quantité de lumière disponible pour les végétaux aquatiques ou appauvrir le milieu en oxygène disponible pour les poissons (**Anderson, 2017**).

Les microalgues produisant des métabolites toxiques ont été très étudiées en raison : 1) des intoxications humaines (mortelles ou non) suite à la consommation de coquillages et de poissons qui concentrent les toxines algales ; 2) la mortalité des produits de la mer (e.g. coquillages, poissons) induite par les toxines (ichtyotoxines) libérées dans le milieu ; 3) des problèmes respiratoires et d'irritations cutanées liés aux aérosols contenant des cellules et/ou des toxines (**Masó and Garcés, 2006; Griffith and Gobler, 2019**).

Les risques posés par les microalgues toxiques et nuisibles ont entraîné, dans les pays concernés, la mise en place de réseaux de surveillance (e.g. le REPHY en France) et de seuils sanitaires lorsque suffisamment de données toxicologiques étaient disponibles.

1.2 Espèces de microalgues et toxines associées

Avec l'augmentation des activités de tourisme, de pêche et d'aquaculture, et afin de mieux prévenir les risques d'intoxications, les recherches sur les toxines algales (phycotoxines) ont considérablement augmenté et entraîné la découverte de plusieurs centaines de toxines depuis une cinquantaine d'année (**Anderson et al., 2012**). Aujourd'hui, environ 200 espèces de microalgues, majoritairement des dinoflagellés, ont été décrites comme toxiques (**Moestrup et al., 2009; Anderson, 2014, 2017**).

Historiquement, les toxines ont été classées en fonction des symptômes d'intoxications qu'elles induisaient chez les consommateurs suite à l'ingestion de chair de produits de la mer contaminés par des phycotoxines.

Ainsi, on retrouve six types d'empoisonnement : PSP (Paralytic Shellfish Poisoning) causées par les toxines paralysantes, ASP (Amnesic Shellfish Poisoning) par les toxines amnésiantes, DSP (Diarrethic Shellfish Poisoning) par les toxines diarrhéiques, CFP (Ciguatera Fish Poisoning) par les ciguatoxines, AZP (Azaspiracid Shellfish Poisoning) par les toxines du genre *Azadinium* et NSP (Neurotoxic Shellfish Poisoning) causées par des toxines ayant des effets sur le système neurologique (**Van Dolah, 2000; Amzil et al., 2001; Anderson et al., 2012; Berdalet et al., 2016; Luckas et al., 2017**).

Certaines toxines non réglementées n'ont pas été classées d'après les signes cliniques d'intoxication, comme par exemple la palytoxine et ses analogues les ovatoxines. C'est pourquoi, une seconde classification a été réalisée en fonction de la structure chimique (Tableau 1).

Tableau 1 : Phycotoxines rapportées dans la littérature, associées à leurs organismes producteurs, leur syndrome et leur structure chimique (Botana, 2016; Rasmussen et al., 2016; Basti et al., 2018; Farabegoli et al., 2018).

Phycotoxines	Famille	Syndrome avéré	Structure chimique	Genres producteurs
Acide domoïque (AD)	AD	ASP	Amines secondaires	<i>Pseudo-nitzschia</i> <i>Nitzschia</i> <i>Halamphora</i>
Acide okadaïque (AO)	AO	DSP	Polyéthers linéaires	<i>Dinophysis</i> <i>Prorocentrum</i>
Dinophysistoxines (DTX)				<i>Phalacrocoma</i>
Azaspiracides (AZA)	AZA	AZP	Polyéthers avec amine secondaire	<i>Azadinium</i> <i>Amphidoma</i>
Brévétoxines (BTX)	BTX	NSP	Polyéthers en forme d'échelle	<i>Karenia</i>
Ciguatoxines (CTX)		CFP	Polyéthers en forme d'échelle	<i>Gambierdiscus</i>
Maïtotoxines (MTX)	CTX	-	Polyéthers en forme d'échelle	<i>Gambierdiscus</i>
Acide gambierique (GA)		-	Polyéthers en forme d'échelle	<i>Fukuyoa</i>
Amphidinols		-	Polyalcools avec des cycles éthers	<i>Amphidinium</i>
Goniodomines		-	Polyéthers macrocycliques	<i>Alexandrium</i>
Gymnocines	Ichtyotoxines	-	Polyéthers en forme d'échelle	<i>Karenia</i>
Karlotoxines		-	Polyalcools avec des cycles éthers	<i>Karlodinium</i>
Prymnésines		-	Polyalcools avec des cycles éthers	<i>Prymnesium</i>
Gymnodimines (GYM)		-	Imines macrocycliques	<i>Alexandrium</i> <i>Karenia</i>
Pinnatoxines (PnTX)		-	Imines macrocycliques	<i>Vulcanodinium</i>
Portimines		-	Imines macrocycliques	
Prorocentrolides	Imines cycliques	-	Imines macrocycliques	<i>Prorocentrum</i>
Spiro-prorocentrimine		-	Imines macrocycliques	
Spirolides (SPX)		-	Imines macrocycliques	<i>Alexandrium</i>
Symbioimines		-	Imines Cycliques	<i>Symbiodinium</i>
Palytoxine isobarique (Isob-PLTX)				
Mascarénotoxines (MCTX)	PLTX	-	Polyalcools avec des cycles éthers	<i>Ostreopsis</i>
Ovatoxines (OVTX)				
Ostréocines (OST)				
Péctenotoxines (PTX)	PTX	DSP	Polyéthers macrocycliques	<i>Dinophysis</i>
Saxitoxines (STX)				<i>Alexandrium</i>
Gonyautoxines (GTX)	STX	PSP	Tétrahydropurines	<i>Pyrodinium</i> <i>Gymnodinium</i>
Yessotoxines (YTX)	YTX	DSP	Polyéthers en forme d'échelle	<i>Protoceratium</i> <i>Lingulodinium</i> <i>Gonyaulax</i>

Dans sa revue, **McGowan (2016)** recense des dizaines de cas d'intoxications par les différentes familles de toxines à travers le monde entre 1970 et 2010. Certaines intoxications peuvent être massives comme pour les 300 cas de PSP en Argentine/Chili entre 1991 et 1992 et 500 cas en Inde en 1994 ou encore les 1300 cas DSP au Japon entre 1976 et 1982 et 3000 cas en France rapportés pour la 1^{ère} fois en 1980. Ce dernier incident a conduit à la mise en place en 1984 par IFREMER d'un réseau de surveillance du phytoplancton et des Phycotoxines (REPHY).

1.3 Les problématiques associées aux HAB

Au niveau mondial et depuis plusieurs décennies, un nombre croissant de régions sont touchées par des proliférations de microalgues toxiques ou nuisibles (**Landsberg, 2002; Sarkar, 2018**). Ces dernières peuvent créer des dommages cellulaires, altérer la reproduction des espèces marines voire entraîner leur mort. En parallèle ou simultanément, les microalgues peuvent être accumulées dans le système digestif des organismes marins et les toxines dans leur chair pouvant ainsi se transmettre le long de la chaîne trophique et contaminer leurs prédateurs (Figure 1). Au niveau de l'Homme, les intoxications peuvent être indirectes via la consommation de produits de la mer contaminés ou directes via la respiration d'aérosols ou le contact cutané (e.g. ovatoxines produites par *Ostreopsis cf. ovata*) (**Anderson et al., 2012; Berdalet et al., 2016; Basti et al., 2018; Burkholder et al., 2018**).

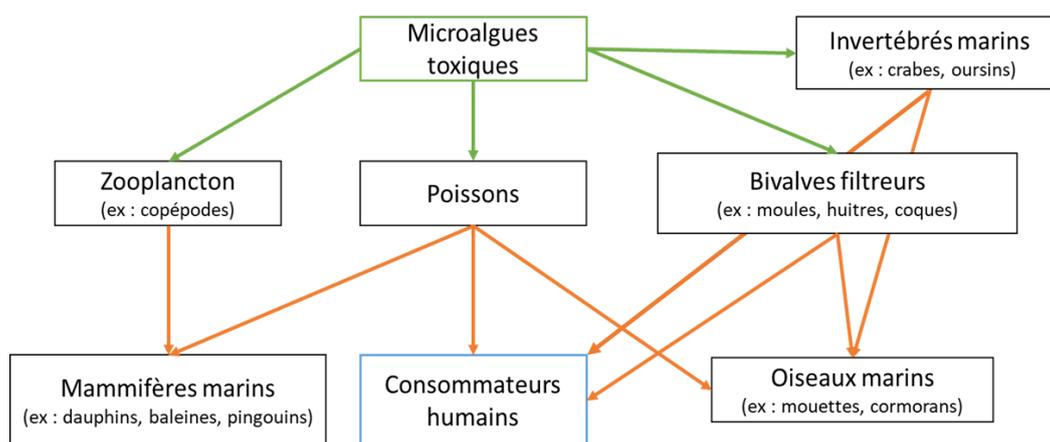


Figure 1 : Risque de transfert des phycotoxines dans la chaîne trophique. En vert : contaminations directes des organismes et bioaccumulation de toxines dans leurs tissus. En orange : contaminations indirectes via la consommation d'organismes contaminés. Schéma adapté de Burkholder et al. (2018).

Les principaux organismes affectés par les HAB sont les bivalves filtreurs comme les huîtres, les moules, les pétoncles, les coquilles Saint-Jacques ou les coques. Cette contamination représente un risque sanitaire étant donné que ces coquillages sont souvent exploités dans l'alimentation. C'est pourquoi, les zones de production des coquillages font l'objet d'une surveillance régulière et de contrôle sanitaire. Lorsque les seuils sanitaires 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. Ce qui se traduit par un impact économique sur le tourisme avec la fermeture de plages (**Lemée et al., 2012; Bechard, 2019**) et sur l'aquaculture avec des fermetures des zones de production conchylicoles (**McGowan, 2016; Adams et al., 2018; Sarkar, 2018**). En Méditerranée, des proliférations importantes du dinoflagellé toxique *Ostreopsis* ont eu lieu dans les années 2000, impliquant de nombreuses intoxications pouvant aller jusqu'à l'hospitalisation et provoquant la fermeture de plages en Italie et en France (**Durando et al., 2007; Kermarec et al., 2008**).

1.4 *Ostreopsis*, un dinoflagellé toxique émergent en Méditerranée

La consommation de produits de la mer contaminés est la voie la plus fréquente parmi les cas d'intoxication. Mais dans certains cas, comme celui d'*Ostreopsis cf. ovata* en mer Méditerranée, des problèmes sanitaires peuvent également avoir lieu via la respiration d'aérosols en plus d'éventuelles irritations lors de contact cutané ou avec les yeux (**Kermarec et al., 2008; Tubaro et al., 2011; Berdalet et al., 2016**). Depuis 2005, la prolifération et l'augmentation du nombre d'efflorescences de ce dinoflagellé d'origine tropicale dans les zones tempérées suscitent des préoccupations.

Ostreopsis cf. ovata est une espèce pouvant produire des ovatoxines (OVTX), des analogues de la palytoxine. Ces toxines ont été retrouvées dans les aérosols lors d'efflorescences ce qui pourrait expliquer l'origine des intoxications par voie aérienne (**Ciminiello et al., 2014**). Même si aujourd'hui, aucun cas d'intoxication humaine par ingestion n'a été rapporté, les OVTX sont capables de s'accumuler dans la chaîne trophique (**Amzil et al., 2012; Biré et al., 2013; Brissard et al., 2014; Biré et al., 2015**) et peuvent ainsi représenter un risque pour les consommateurs de produits de la mer. Les études sur la toxicité de ces molécules sont limitées, à cause à l'absence de molécules purifiées (**Ciminiello et al., 2012c; Pelin et al., 2016b**). Ainsi, la toxicité et le mode d'action des OVTX n'ont pas encore été élucidés.

L'origine d'*O. cf. ovata* et les facteurs environnementaux favorisant sa prolifération et la production de toxines en mer Méditerranée n'ont pas été clairement définis puisque de nombreux résultats

contradictaires sont rapportés dans la littérature (**Berdalet et al., 2013; Accoroni and Totti, 2016; Tester et al., 2020**).

La suite de l'état de l'art sera divisée en trois parties qui concerneront 1) la présentation du genre *Ostreopsis* et notamment l'espèce *O. cf. ovata*, 2) des toxines associées ou en lien avec cette espèce (i.e. palytoxines et ovatoxines) et 3) sur les effets des paramètres environnementaux sur la croissance et la production de toxines de l'espèce *O. cf. ovata*.

2. Le genre *Ostreopsis*

2.1 Taxonomie et description

Le genre *Ostreopsis* (Johs. Schmidt) appartient à la famille des Ostreopsidaceae (Lindemann) de l'ordre des Gonyaulacales (F.J.R.Taylor) et de la classe des Dinophyceae (F.E.Fritsch). A ce jour, ce genre comprend 11 espèces (**Chomérat et al., 2019; Tester et al., 2020**). Il a été décrit pour la première fois en 1901 par **Schmidt (1901)**, dans le Golfe de Siam (Thaïlande) avec l'espèce *Ostreopsis siamensis* comme type. Plus tard, **Fukuyo (1981)**, en étudiant les assemblages de dinoflagellés benthiques possiblement impliqués dans la ciguatera dans le Pacifique, découvre en plus de *O. siamensis*, des cellules de forme et taille différentes. Il distingue alors trois espèces dans le Pacifique : *O. siamensis* et deux nouvelles espèces : *O. ovata* et *O. lenticularis*. Par la suite, d'autres espèces ont été découvertes : *O. heptagona* (**Norris et al., 1985**) dans le golfe du Mexique ; *O. mascarenensis* (**Quod, 1994**) au sud de l'océan Indien ; *O. labens* (**Faust and Morton, 1995**) en mer des Caraïbes et en mer de Chine orientale ; *O. marina* (**Faust, 1999**), *O. belizeana* (**Faust, 1999**) et *O. caribbeana* (**Faust, 1999**) dans l'océan Indien et en mer des Caraïbes. Récemment, deux nouvelles espèces ont été découvertes et décrites sur des bases morphologiques mais également moléculaires, *O. fattorussoi* (**Accoroni et al., 2016**) en mer Méditerranée (Chypre et sur les côtes libanaises) et *O. rhodesae* (**Verma et al., 2016**) dans la grande barrière de corail australienne.

Comme pour la plupart des dinoflagellés et avant l'avènement de la biologie moléculaire (i.e. avant les années 2000) pour l'identification des espèces, la taxonomie d'*Ostreopsis* était uniquement fondée sur des critères morphologiques (i.e. nombre, taille, forme, position des plaques thécales, des cellules ou des pores, Figure 2). Cependant, il apparaît que les gammes de taille de chaque espèce sont étendues et se recouvrent, et que l'organisation des plaques est assez similaire pour de nombreuses espèces (**Chomérat et al., 2020**). L'identification uniquement morphologique constitue donc une source majeure de confusions ce qui a pu entraîner des erreurs (**Vila et al., 2001b; Parsons et al., 2012; David et al., 2013; Hoppenrath et al., 2014; Chomérat et al., 2019; Tester et al., 2020**).

Aujourd'hui, les techniques de biologie moléculaire permettent d'ajouter un critère pour l'identification des espèces, grâce au séquençage des diverses régions qui diffèrent selon les espèces d'*Ostreopsis* et permettent une bonne discrimination comme les ITS-5.8S rDNA (Internal Transcribed Spacers) ou les régions hypervariables (domaines D1-D3 ou D8-D10) de la grosse sous-unité de l'ADN ribosomique (LSU rDNA) (Penna et al., 2005; Sato et al., 2011; Chomérat et al., 2019). Pour les dernières espèces découvertes (i.e. *O. fattorussoi* et *O. rhodesae*), en plus des descriptions morphologiques les séquences LSU ont été fournies, conduisant à une identification fiable.

En revanche, face au manque de données moléculaires de référence pour les autres espèces dont la description est plus ancienne, l'identification ne repose que sur des critères morphologiques qui sont source d'ambiguïtés. En effet, bien que des séquences aient été obtenues, il est très difficile de les associer formellement à un nom. Ainsi, nous faisons actuellement face à une double taxonomie, soit fondée sur des critères morphologiques, soit fondée sur les séquences et pour laquelle chaque génotype a été associé à une morpho-espèce supposée en utilisant confer, « cf. » (e.g. *O. cf. ovata* et *O. cf. siamensis*) (Sato et al., 2011; Chomérat et al., 2019). Outre *O. fattorussoi* et *O. rhodesae*, seules *Ostreopsis lenticularis* et *Ostreopsis mascarenensis* ont été réétudiées et des séquences provenant de spécimens de la localité type ont été obtenues (Chomérat et al., 2019; Chomerat et al., 2020). Ce travail indispensable reste à faire pour *O. siamensis*, *O. ovata*, *O. heptagona*, *O. labens*, *O. belizeana*, *O. caribbeana* et *O. marina*.

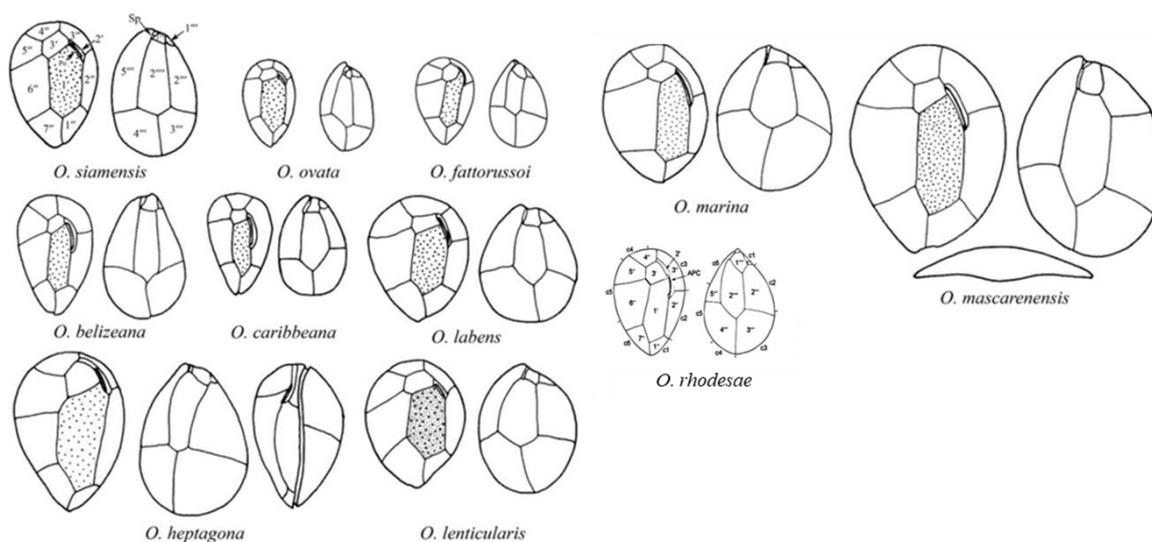


Figure 2 : Dessins des 11 espèces d'*Ostreopsis* repris d'Accoroni et al. (2016) et de Verma et al. (2016).

Ostreopsis ovata a été initialement décrite dans l'Archipel des Ryūkyū (sud-ouest du Japon) par Fukuyo (1981). Cette espèce se caractérise par une forme ovale, s'amincissant en pointe ventralement. Elle présente un diamètre dorso-ventral de 50-56 μm et fait 25-35 μm de large (Fukuyo, 1981). A l'époque

de sa description, ces données étaient amplement suffisantes pour la distinguer des autres espèces connues *O. siamensis* et *O. lenticularis*. Cependant la situation s'est complexifiée avec la description de plusieurs autres espèces ayant une gamme de taille quasiment identique, et des observations d'importantes variations de taille dans des populations naturelles (David et al., 2013; Tibiriçá et al., 2019). En Méditerranée, Penna et al. (2005) ont identifié génétiquement deux organismes ayant une forme ovale (voire une forme de goutte) avec une partie dorsale plate et plus arrondie, ayant une taille très similaire et donc difficiles à distinguer : *O. cf. ovata* et *O. cf. siamensis*. Un critère morphologique a été proposé par les auteurs pour permettre de distinguer les deux génotypes, le ratio du diamètre dorsoventral (profondeur) sur l'antéropostérieur (hauteur) (DV/AP). Pour *O. cf. siamensis*, les cellules étaient plus fines en hauteur (DV/AP > 4) tandis que celles d'*Ostreopsis cf. ovata* étaient plus hautes (DV/AP < 2) (Penna et al., 2005; Aligzaki and Nikolaidis, 2006). Cependant, ce critère d'identification reste sujet à débat étant donné que des cellules d'*O. cf. ovata* issue de mer Adriatique possèdent une morphologie légèrement différente (DV/AP = 2,3-2,4) (Accoroni and Totti, 2016).

L'absence d'information précise et de données moléculaires sur l'échantillon original étudié par Fukuyo (1981) pour décrire *O. ovata* est problématique. En effet, Sato et al. (2011) ont collecté des échantillons issus de la localité où *O. ovata* a été décrite par la première fois (i.e. Okinawa au Japon) et ont montré la présence de plusieurs génotypes : *O. cf. ovata* et *Ostreopsis* sp. 1. Puisque localement, il n'y a pas un seul génotype correspondant à la morphologie d'*O. ovata*, il est impossible, à ce jour, d'avoir une séquence de référence pour cette espèce. De ce fait, dans la situation actuelle, *O. ovata* n'est pas clairement définie et l'utilisation du confère (cf.) est une solution provisoire en absence de taxonomie stable. Des spécimens ayant une morphologie correspondant à *O. ovata* ont été trouvés dans de multiples régions du monde et les données de séquences de l'ADNr ITS-5.8S ont permis de définir deux ou trois clades selon les auteurs, à savoir : Méditerranée/Atlantique et Indopacifique (Penna et al., 2010) ou Atlantique/Méditerranée/Pacifique, mer de Chine Sud et golfe de Thaïlande (Tawong et al., 2014; Chomérat et al., 2019; Tibiriçá et al., 2019). Cependant, afin d'associer une séquence (un génotype) au nom *O. ovata* sans aucune ambiguïté, il sera absolument nécessaire de réétudier des spécimens de la localité type, d'où provenaient ceux qui ont servi à la description originale (Sato et al., 2011; Parsons et al., 2012; Chomérat et al., 2019).

Penna et al. (2010) ont montré que les populations d'*Ostreopsis cf. ovata* des zones tropicales et tempérées étaient différenciées génétiquement. Les cellules d'*O. cf. ovata* des régions Méditerranéenne/Atlantique et asiatiques auraient évolué indépendamment dans les deux régions du globe et leurs différences pourraient représenter deux espèces génétiquement distinctes. L'identification de l'espèce *O. ovata* reste donc à définir et l'association des données morphométriques

et génétiques permettra de définir la souche de référence et ainsi lever les incertitudes sur l'identification des *O. cf. ovata* présentes en mer Méditerranée et dans le reste du monde.

2.2 Distribution mondiale

Depuis une trentaine d'années, les publications montrent une augmentation du nombre de HAB à travers le monde, qui serait en lien avec le changement global (Hallegraeff, 1993; Glibert et al., 2014; Wells et al., 2015). *Ostreopsis* est un genre qui a été décrit pour la première fois en Thaïlande, mais depuis les années 80, de nouvelles espèces ont été décrites, dans d'autres zones tropicales comme la mer des Caraïbes, l'Océan Indien, le Golfe du Mexique, en Océanie, en Asie du sud-est ou à Hawaï (Rhodes, 2011; Tester et al., 2020). De plus, depuis les années 2000, certaines espèces du genre *Ostreopsis* sont retrouvées de plus en plus fréquemment dans les zones subtropicales et tempérées, comme en mer Méditerranée, en Nouvelle-Zélande, en mer du Japon ou au Portugal (Tognetto et al., 1995; Shears and Ross, 2009; Selina and Orlova, 2010; Rhodes, 2011; Accoroni et al., 2016; David et al., 2018).

Finalement, la distribution du genre *Ostreopsis* est très étendue, tout comme pour l'espèce *O. cf. ovata* (Figure 3 et Annexe 1 page 59). L'augmentation des campagnes de prélèvements et de leur fréquence à travers le monde ont permis de découvrir de nouvelles espèces et de mieux cartographier les zones de proliférations d'*Ostreopsis* spp., notamment en Méditerranée pour *O. cf. ovata*.

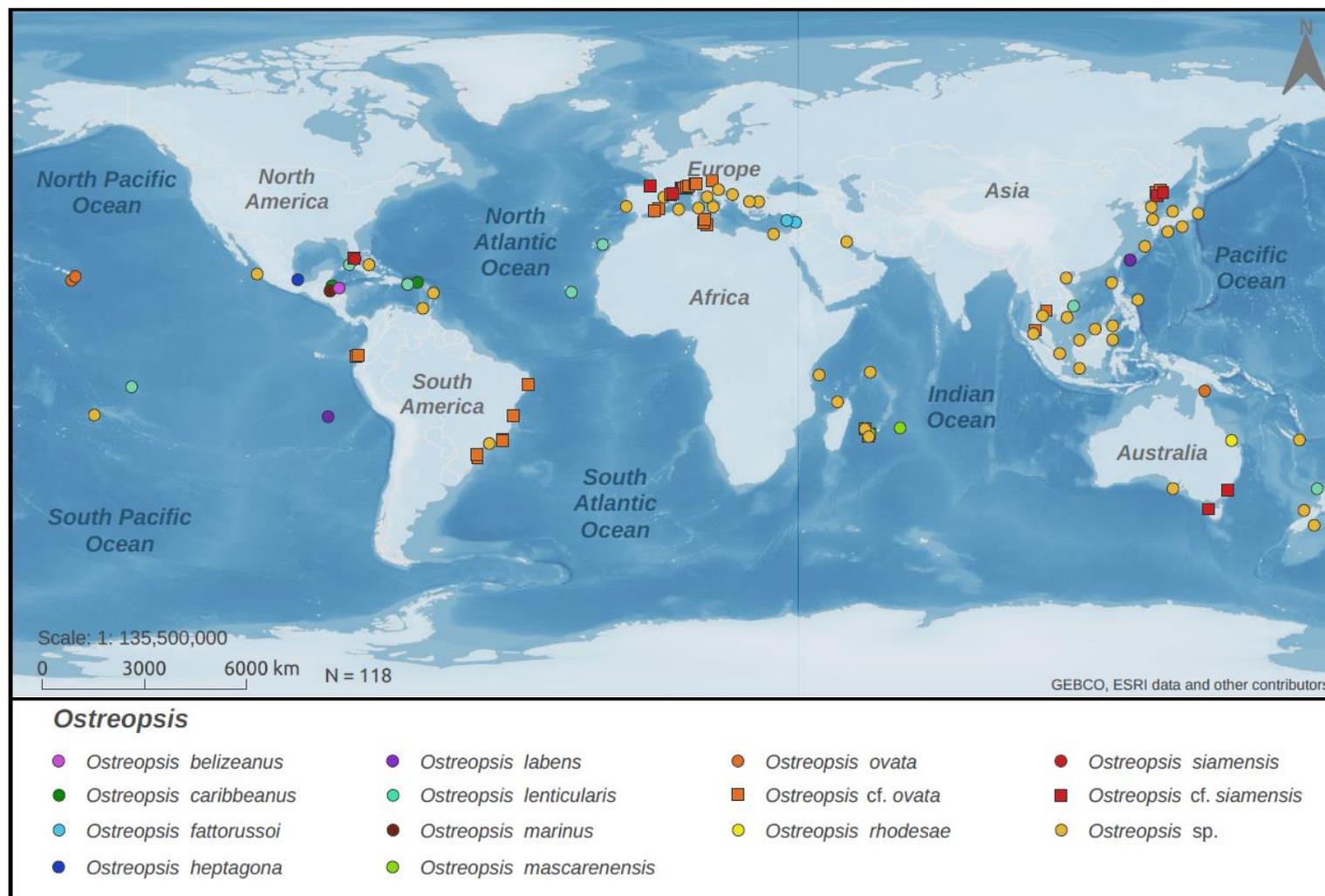


Figure 3 : Distribution connue d'*Ostreopsis* spp. dans le monde, repris de Tester et al. (2020).

Au niveau du bassin méditerranéen, *O. cf. ovata* a été observé pour la première fois à de très faibles concentrations dans les années 70 (Taylor, 1979) puis dans les années 90 successivement en mer Tyrrhénienne (Tognetto et al., 1995) et en mer Catalane (Vila et al., 2001a; Vila et al., 2001b). La majorité des efflorescences rapportées sont essentiellement situées dans les parties nord et nord-ouest de la Méditerranée (i.e. de la mer Catalane jusqu'en mer Egée en passant par la mer Adriatique) (Figure 4). Quelques proliférations sont reportées dans le Golfe de Gabès en Tunisie ou en Algérie mais les parties sud et est de la mer Méditerranée restent peu ou pas documentées.



Figure 4 : Distribution géographique des efflorescences d'*Ostreopsis cf. ovata* en mer Méditerranée d'après la littérature.

En mer Méditerranée, lors d'importantes efflorescences, des cas d'intoxication par voie aérienne ont été signalés (Ciminiello et al., 2006; Vila et al., 2008; Tichadou et al., 2010; Illoul et al., 2012). L'intérêt porté à l'espèce *O. cf. ovata* réside dans sa capacité à produire des ovatoxines, qui sont des analogues de l'une des toxines non protéiques les plus puissantes rapportée : la palytoxine. Ces toxines ont fait l'objet d'études afin de déterminer leur structure, d'évaluer leur toxicité et leur mode d'action afin de mieux appréhender le risque sanitaire liés à la présence de ce dinoflagellé.

3. Les toxines produites par *Ostreopsis*

3.1 Les molécules toxiques du type PLTX-like

3.1.1 L'origine historique de la PLTX

La palytoxine (PLTX) a été découverte à Hawaï dans le corail mou *Palythoa toxica* (**Moore and Scheuer, 1971**) par le biais d'une légende hawaïenne qui suscita l'intérêt des chercheurs. L'histoire raconte que les hawaïens du village de Hana (Îles de Maui) avaient connaissance d'une « mousse » empoisonnée, appelée « limu make o Hana » (l'algue tueuse d'Hana), qui poussait dans certains bassins près de l'océan. Selon la légende, un homme était suspecté d'être l'auteur de plusieurs assassinats de pêcheurs, un homme qui, pour l'heure du déjeuner, allait se baigner dans la mer. Le village, révolté, décida de passer à l'action, partant alors en quête du meurtrier. En lui arrachant ses vêtements, les habitants découvrirent que l'homme était doté d'une gueule de requin. Il s'agissait en fait d'un dieu requin déguisé en homme dans le but de dévorer les pêcheurs. Il fut exécuté et ses cendres furent répandues dans un bassin dont les parois se recouvrirent de petites anémones marrons et devint ainsi toxique. Les hawaïens comprirent qu'en enduisant la pointe de leurs lances avec ces anémones, ils pouvaient rendre ces armes extrêmement mortelles (**Moore and Scheuer, 1971; Morton, 2016**).

3.1.2 Structure chimique de la PLTX et de ses analogues

La PLTX (Figure 5) correspond à l'une des plus grosses toxines d'origine non protéique avec une masse molaire de 2652,17 g.mol⁻¹. La molécule a été isolée pour la première fois en 1971 à partir de *Palythoa toxica* (**Moore and Scheuer, 1971**), et sa structure a été élucidée par rayon-X et RMN en 1981 (Résonance Magnétique Nucléaire) (**Moore and Bartolini, 1981; Uemura et al., 1981b, a**).

Cette toxine est constituée d'une longue chaîne aliphatique associée à des éthers cycliques, une fonction amine primaire en C₁₁₅, 2 fonctions amides, 42 groupements hydroxyles, 8 insaturations et 64 carbones chiraux. La PLTX est une molécule amphiphile et possède un caractère basique conféré par son amine primaire. Elle se caractérise par deux maximums d'absorbance à 233 et 263 nm (Figure 5) dus à la présence de deux groupements chromophores (**Riobó et al., 2003; Riobó et al., 2006**). La fragmentation en C₈-C₉ de la molécule en spectrométrie de masse produit un fragment majoritaire et caractéristique, appelé fragment A ([M + H - fragment B - H₂O]⁺) correspondant à un rapport masse sur charge (*m/z*) de 327 (**Ciminiello et al., 2006**).

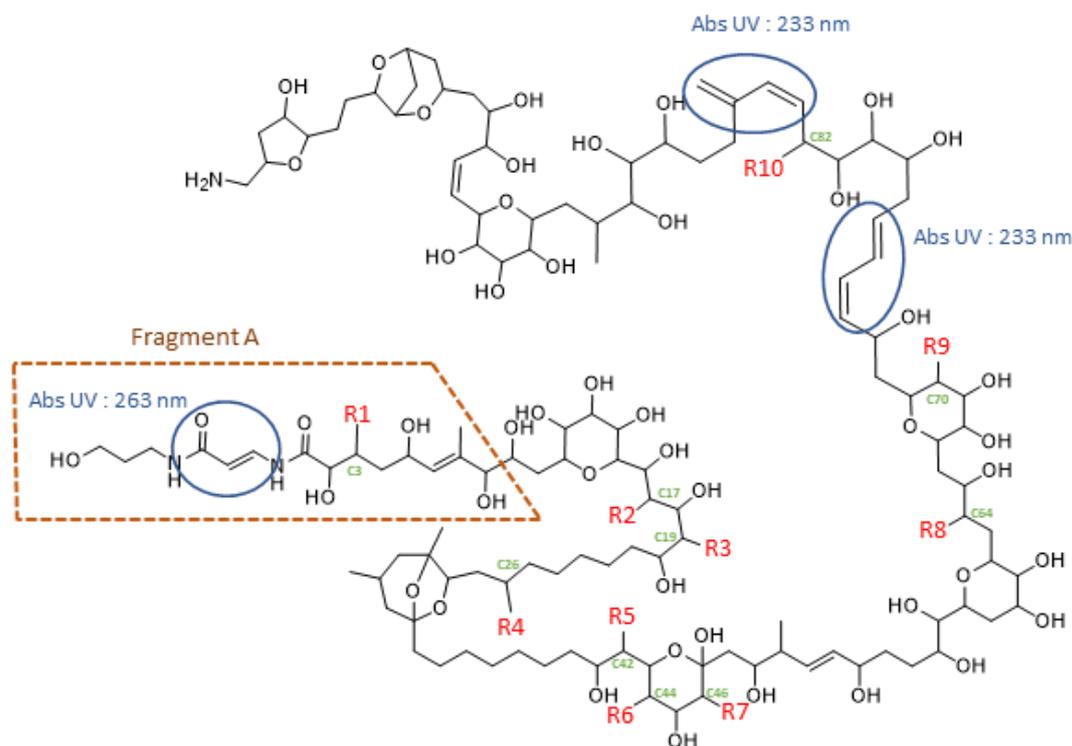


Figure 5 : Structure de la palytoxine (PLTX) ($C_{129}H_{223}O_{54}N_3$) avec ses sites d'absorbance à 233 et 263 nm (en bleu), le fragment A (en marron) et la position des modifications chimiques par rapport ses analogues (en rouge).

La présence de la PLTX est suspectée chez *Ostreopsis* sp. pour la première fois en 2003 (Taniyama et al., 2003) puis celle d'un analogue de la PLTX chez *Ostreopsis* cf. *ovata* en 2006 (Ciminiello et al., 2006). En raison de sa complexité structurale, les données obtenues via l'analyse chimique utilisant la spectrométrie de masse basse résolution (LC-MS/MS) n'ont pas permis de déterminer s'il s'agissait de la même molécule ou d'un isomère. Par conséquent, Ciminiello et al. (2006) ont nommé cette toxine « PLTX putative » (pPLTX). En 2015, la pPLTX est renommée « PLTX isobarique » (isob-PLTX) car il est confirmé par spectrométrie de masse haute résolution (LC-HRMS/MS) que la pPLTX correspondait bien à un isomère de la PLTX issue du *Palythoa* (García-Altres et al., 2015). Comparée à cette dernière, la pPLTX est hydroxylée en C₄₂, déshydroxylée en C₁₇ et C₆₄ et possède un oxygène supplémentaire entre le fragment A et le C₈ du fragment B.

Une multitude d'analogues de la PLTX ont été découverts chez les dinoflagellés du genre *Ostreopsis*, notamment les mascarénotoxines, les ostrécines, ainsi qu'une vingtaine d'ovatoxines.

3.1.3 La découverte des OVTX

Au cours de différents étés dans les années 2000, de nombreuses personnes sur les côtes espagnoles, italiennes et françaises (> 200 dans les deux premiers cas) ont développé des détresses respiratoires, des irritations cutanées et/ou oculaires ayant conduit jusqu'à l'hospitalisation (**Ciminiello et al., 2006; Kermarec et al., 2008; Vila et al., 2008**). En parallèle, des mortalités anormalement élevées parmi la faune et la flore benthique marine ont été constatées. Tous ces symptômes ont été observés lors d'une prolifération inhabituelle du dinoflagellé *O. cf. ovata*. Ce dernier faisait partie du genre *Ostreopsis* déjà connu pour comprendre au moins une espèce toxique : *O. cf. siamensis*, elle-même connue pour produire des ostréocines, dont l'ostréocine-D (**Usami et al., 1995**). A partir de 2005, de nombreux travaux de recherche ont débuté afin de mieux cerner la problématique émergente associée à *Ostreopsis* : e.g. déterminisme des efflorescences, profils toxiques, impacts sanitaires et économiques en résultant. Ces travaux se sont intéressés dans un premier temps à la PLTX (déjà suspectée d'être présente chez le genre *Ostreopsis* selon **Taniyama et al., 2003**) et à ses analogues identifiés chez *O. siamensis* (**Ukena et al., 2001**). Les premières analyses chimiques en LC-MS/MS ont suggéré qu'*O. cf. ovata* produisait deux analogues de la PLTX : la pPLTX (**Ciminiello et al., 2006**) et une nouvelle molécule l'ovatoxine-a (OVTX-a) (**Ciminiello et al., 2008**) dont la structure complète a été élucidée en 2012 par résonance magnétique nucléaire (RMN) (**Ciminiello et al., 2012b**).

Depuis 2010, de nombreux analogues de l'OVTX-a ont été découverts chez des souches d'*O. cf. ovata* méditerranéennes. Tout d'abord, les OVTX-b, -c, -d et -e (**Ciminiello et al., 2010**) puis l'OVTX-f (**Ciminiello et al., 2012d**), OVTX-g (**García-Altres et al., 2015**) et OVTX-h (**Brissard et al., 2015**) et enfin l'OVTX-l (**Tartaglione et al., 2017**). Parmi ces molécules, aucune structure chimique complète n'a été élucidée et seules les fragmentations par spectrométrie de masse haute résolution ont pu aboutir à des hypothèses de structures (Tableau 2).

Dernièrement, de nouvelles OVTX (OVTX-i, j1, j2 et k) ont été mises en évidence au sein d'une espèce d'*Ostreopsis* nouvellement décrite, nommée *O. fattorussoi* et isolée sur les côtes libanaises et chypriotes (**Tartaglione et al., 2016b**). Néanmoins, l'OVTX-i a été également retrouvée dans des souches d'*O. cf. ovata* (**Tartaglione et al., 2017**).

D'autres isomères d'OVTX méditerranéennes ont été identifiés dans des souches japonaises d'*Ostreopsis*, et nommés OVTX-a AC, -b AC, -d AC et -e AC (**Suzuki et al., 2012**) car provenant de cultures d'Adachi Masao ainsi que les OVTX-a IK2, -d IK2 et -e IK2 (**Uchida et al., 2013**) issues de souches originaires de l'île d'Ikei (Okinawa, Japon).

Tableau 2 : Palytoxine et ses analogues (palytoxine isobarique, ovatoxines, ostréocines et mascarénotoxines) retrouvés chez *Ostreopsis* : formule brute, masse molaire (théorique) et positions suspectées des modifications chimiques (annotées R1 à R10 sur la Figure 5).

Toxine	Formule brute	Masse molaire théoriques (g/mol)	R1 (C ₃)	R2 (C ₁₇)	R3 (C ₁₉)	R4 (C ₂₆)	R5 (C ₄₂)	R6 (C ₄₄)	R7 (C ₄₆)	R8 (C ₆₄)	R9 (C ₇₀)	R10 (C ₈₂)	Autres modifications par rapport à la PLTX	Références
<i>Palythoa toxica</i>														
Palytoxine	C ₁₂₉ H ₂₂₃ O ₅₄ N ₃	2680	Me	OH	OH	Me	H	OH	OH	OH	OH	H	-	Uemura et al., 1981b, a
<i>Ostreopsis cf. ovata et O. fattorussoi</i>														
Palytoxine isobarique	C ₁₂₉ H ₂₂₃ O ₅₄ N ₃	2680	Me	H	OH	Me	OH	OH	OH	H	OH	H	+ O (fragment A ou C ₁ -C ₈ fragment B)	García-Altare et al., 2015
Ovatoxine-a	C ₁₂₉ H ₂₂₃ O ₅₂ N ₃	2648	Me	H	OH	Me	OH	H	OH	H	OH	H	-	Ciminiello et al., 2008; Ciminiello et al., 2012a, b
Ovatoxine-b	C ₁₃₁ H ₂₂₇ O ₅₃ N ₃	2692	Me	H	OH	Me	OH	H	OH	H	OH	H	+ C ₂ H ₄ O (fragment A)	Ciminiello et al., 2010
Ovatoxine-c	C ₁₃₁ H ₂₂₇ O ₅₄ N ₃	2708	Me	H	OH	Me	OH	H	OH	H	OH	H	+ C ₂ H ₄ O (fragment A)	Ciminiello et al., 2010
Ovatoxine-d	C ₁₂₉ H ₂₂₃ O ₅₃ N ₃	2664	Me	H	OH	Me	OH	H	OH	H	OH	H	+ O (fragment B)	Ciminiello et al., 2010
Ovatoxine-e	C ₁₂₉ H ₂₂₃ O ₅₃ N ₃	2664	Me	H	OH	Me	OH	H	OH	H	OH	H	+ O (fragment A)	Ciminiello et al., 2010
Ovatoxine-f	C ₁₃₁ H ₂₂₇ O ₅₂ N ₃	2676	Me	H	OH	Me	OH	H	OH	H	OH	H	+ C ₂ H ₄ (C ₉₅ -C ₁₀₂)	Ciminiello et al., 2012d
Ovatoxine-g	C ₁₂₉ H ₂₂₃ O ₅₁ N ₃	2632	Me	H	OH	Me	OH	H	H	H	OH	H	-	García-Altare et al., 2015
Ovatoxine-h	C ₁₂₉ H ₂₂₅ O ₅₁ N ₃	2634	Me	H	OH	Me	OH	H	OH	H	OH	H	- O + 2H (C ₄₂ -C ₄₉)	Brissard et al., 2015
Ovatoxine-i	C ₁₃₁ H ₂₂₅ O ₅₃ N ₃	2690	Me	H	OH	Me	OH	H	OH	H	OH	H	+ C ₂ H ₂ O ₂ (C ₄₉ -C ₅₂) + 1 insaturation (C ₄₉ -C ₅₂) - O (C ₅₃ -C ₇₈)	Tartaglione et al., 2016b
Ovatoxine-j1	C ₁₃₁ H ₂₂₅ O ₅₄ N ₃	2706	Me	H	OH	Me	OH	OH	OH	H	OH	H	+ C ₂ H ₂ O ₂ (C ₄₉ -C ₅₂) + 1 insaturation (C ₄₉ -C ₅₂) - O (C ₅₃ -C ₇₈)	Tartaglione et al., 2016b
Ovatoxine-j2	C ₁₃₁ H ₂₂₅ O ₅₄ N ₃	2706	Me	H	OH	Me	OH	H	OH	H	OH	H	+ C ₂ H ₂ O ₂ (C ₄₉ -C ₅₂) + 1 insaturation (C ₄₉ -C ₅₂)	Tartaglione et al., 2016b
Ovatoxine-k	C ₁₃₁ H ₂₂₅ O ₅₅ N ₃	2722	Me	H	OH	Me	OH	OH	OH	H	OH	H	+ C ₂ H ₂ O ₂ (C ₄₉ -C ₅₂) + 1 insaturation (C ₄₉ -C ₅₂)	Tartaglione et al., 2016b
Ovatoxine-l	C ₁₃₀ H ₂₂₅ O ₅₂ N ₃	2659							?					Tartaglione et al., 2017
Ovatoxine-a AC	C ₁₂₉ H ₂₂₃ O ₅₂ N ₃	2648	Me	OH	OH	Me	OH	H	OH	OH	OH	H	- O (C ₁₆ -C ₂₀) - O (C ₂₀ -C ₇₃)	Suzuki et al., 2012
Ovatoxine-b AC	C ₁₃₁ H ₂₂₇ O ₅₃ N ₃	2692							?					Suzuki et al., 2012
Ovatoxine-d AC	C ₁₂₉ H ₂₂₃ O ₅₃ N ₃	2664							?					Suzuki et al., 2012
Ovatoxine-e AC	C ₁₂₉ H ₂₂₃ O ₅₃ N ₃	2664							?					Suzuki et al., 2012

Tableau 2 : Suite.

Toxine	Formule brute	Masse molaire théoriques (g/mol)	R1 (C ₃)	R2 (C ₁₇)	R3 (C ₁₉)	R4 (C ₂₆)	R5 (C ₄₂)	R6 (C ₄₄)	R7 (C ₄₆)	R8 (C ₆₄)	R9 (C ₇₀)	R10 (C ₈₂)	Autres modifications par rapport à la PLTX	Références
OVTX-a IK2	C ₁₂₉ H ₂₂₃ O ₅₇ N ₃	2648	Me	H	OH	Me	OH	H	OH	OH	H	H	-	Uchida et al., 2013
OVTX-d IK2	C ₁₂₉ H ₂₂₃ O ₅₃ N ₃	2664	Me	H	OH	Me	OH	OH	OH	OH	H	H	-	Uchida et al., 2013
OVTX-e IK2	C ₁₂₉ H ₂₂₃ O ₅₃ N ₃	2664	Me	OH	OH	Me	OH	OH	OH	OH	H	OH	-	Uchida et al., 2013
<i>Ostreopsis cf. siamensis</i>														
Ostréocine-A	C ₁₂₇ H ₂₁₉ O ₅₄ N ₃	2652	H	OH	H	H	OH	H	OH	OH	OH	OH	-	Terajima et al., 2018b
Ostréocine-B	C ₁₂₇ H ₂₁₉ O ₅₄ N ₃	2652	H	OH	H	H	OH	OH	OH	OH	OH	H	-	Terajima et al., 2018a
Ostréocine-D	C ₁₂₇ H ₂₁₉ O ₅₃ N ₃	2636	H	OH	H	H	OH	H	OH	OH	OH	H	-	Usami et al., 1995; Ukena et al., 2001; Ukena et al., 2002
Ostréocine-E1	C ₁₂₇ H ₂₁₇ O ₅₂ N ₃	2618	H	OH	H	H	OH	H	OH	OH	OH	H	-	Terajima et al., 2018b
<i>Ostreopsis cf. ovata et O. mascarenensis</i>														
Mascarénotoxine-a	C ₁₂₇ H ₂₂₁ O ₅₀ N ₃	2590							?					Lenoir et al., 2004; Lenoir et al., 2006; Rossi et al., 2010
Mascarénotoxine-b	*								?					Lenoir et al., 2004; Lenoir et al., 2006
Mascarénotoxine-c	C ₁₂₉ H ₂₂₁ O ₅₁ N ₃	2630							?					Rossi et al., 2010

3.2 Les molécules toxiques non PLTX-like

Les analogues de la PLTX représentent la majeure partie des toxines connues chez *Ostreopsis*. Cependant, d'autres molécules toxiques ne partageant pas de structure commune avec la PLTX ont été identifiées, parmi lesquelles les ostréols et les ostréotoxines.

Les ostréols-A et -B ont été identifiés dans des souches d'*O. cf. ovata* coréennes et leurs structures ont été élucidées par RMN (Hwang et al., 2013; Hwang et al., 2017) (Figure 6). Elles ressemblent partiellement aux amphidinols (Satake et al., 1991) produits par le dinoflagellé *Amphidinium*. Ces dernières sont connues pour leurs effets antifongiques et hémolytiques (Satake et al., 1991; Paul et al., 1995; Houdai et al., 2004; Echigoya et al., 2005; Morsy et al., 2005; Meng et al., 2010). De plus, d'autres analogues ont été identifiés par Kim et al., 2017, les ostréol-D et -E dont les structures n'ont pas encore été déterminées.

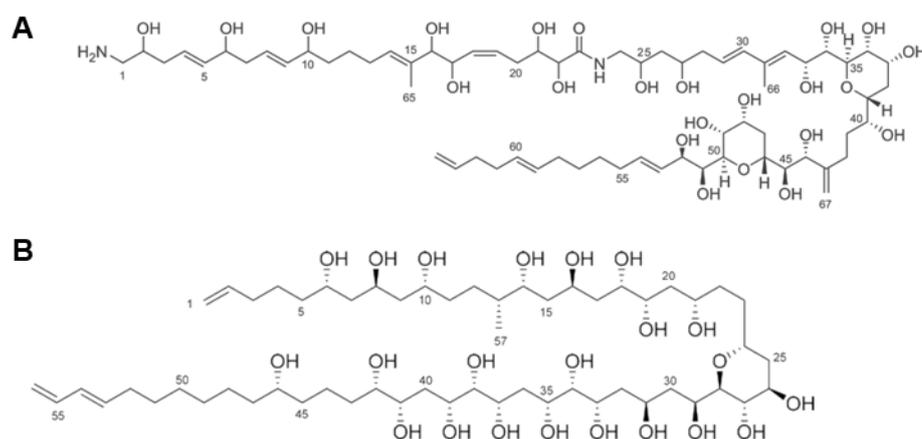


Figure 6: A : Structure chimique de l'ostréol-A (C₆₇H₁₁₂N₂O₂₃) et B de l'ostréol-B (C₅₇H₁₀₈O₂₂).

Des souches d'*Ostreopsis* issues des Caraïbes, initialement considérées à tort comme *O. lenticularis* et dont l'espèce reste à déterminer (Chomérat et al., 2019) sont capables de produire les ostreotoxines-1 et -3 (OTX) (Mercado et al., 1994). Aucune caractérisation chimique n'a été réalisée sur ces composés. Cependant, leur mode d'action est différent de ceux décrits pour la PLTX et ses analogues (e.g. OTX-3 agit sur les canaux sodium voltage dépendant d'après Meunier et al. (1997), Annexe 2 page 61) suggérant qu'il ne s'agit pas de molécules PLTX-like (Parsons et al., 2012).

4. Toxicité de la PLTX et de ses analogues

4.1 Les mécanismes d'action de la PLTX

La palytoxine exerce son activité toxique en se fixant sur la pompe $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$ des cellules de mammifères (Habermann, 1989). La pompe $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$ est essentielle pour le maintien de l'homéostasie dans les cellules. Cette protéine transmembranaire utilise une molécule d'ATP pour le transfert de trois ions Na^+ vers le milieu extracellulaire contre deux ions K^+ vers le milieu intracellulaire (Figure 7A). La fixation de la PLTX sur la pompe induit un changement de conformation de la protéine qui se transforme en canal de transport non spécifique (Artigas and Gadsby, 2004), laissant ainsi passer librement les cations en fonction de leur gradient naturel (i.e. Na^+ vers le cytoplasme et K^+ vers l'extérieur de la cellule, Figure 7B).

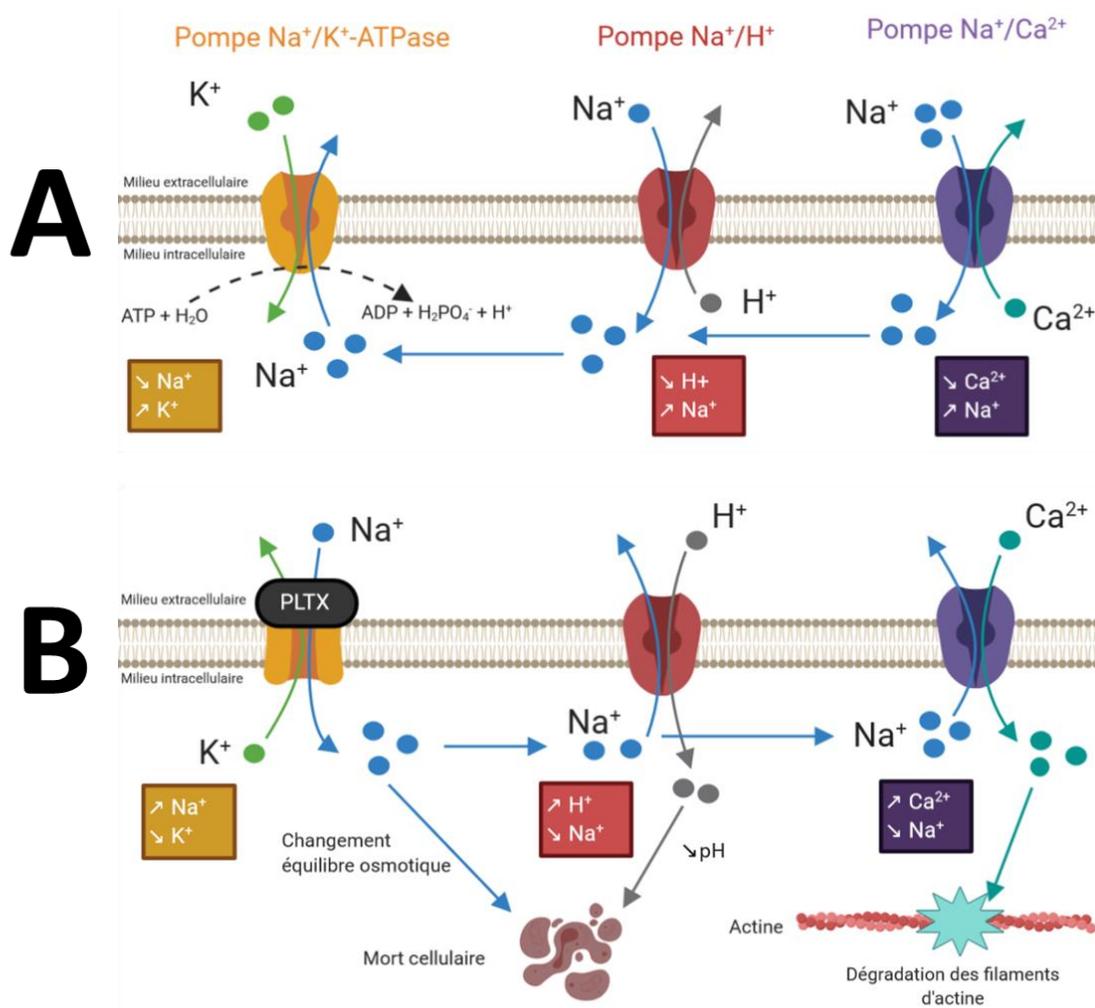


Figure 7 : A : Fonctionnement normal de la pompe $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$. B : Mécanisme d'action de la PLTX sur la pompe $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$.

L'altération de la pompe $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ par la PLTX peut entraîner indirectement une cascade d'autres effets sur la cellule, notamment une diminution du pH et l'altération des filaments d'actine du cytosquelette via les pompes Na^+/H^+ et $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, respectivement. En effet, la pompe Na^+/H^+ permet de réguler le pH du cytosol par l'expulsion d'un proton H^+ contre un ion Na^+ . En présence de PLTX, l'afflux de Na^+ dans la cellule via la pompe $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ peut activer la pompe Na^+/H^+ pour éliminer les ions Na^+ excédentaires et donc augmenter la concentration en proton H^+ , ce qui conduit à une acidification du cytosol (Frelin et al., 1990) aboutissant à la mort cellulaire (Figure 7B). La pompe $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ permet d'évacuer un ion Ca^{2+} contre trois ions Na^+ , ainsi, la conversion de la pompe $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ en canal ionique non sélectif, augmente les quantités de Na^+ intracellulaires, intensifiant la dépolarisation de la cellule et empêchant l'expulsion des ions Ca^{2+} qui s'accumulent dans la cellule. D'après l'étude de Louzao et al. (2007) sur des neuroblastomes humains, l'augmentation de la concentration en Ca^{2+} , via l'exposition des cellules à la PLTX conduirait à des dégradations des filaments d'actine et finalement à une altération de la morphologie de la cellule (Figure 7B).

En plus des effets précédemment décrits, il a été montré que la PLTX et ses analogues (i.e. OVTX) augmentaient le niveau d'ARNm codant pour des protéines impliquées dans les réactions inflammatoires (Crinelli et al., 2012), ce qui pourrait expliquer les symptômes retrouvés chez l'homme après inhalation ou contact cutané.

La PLTX semble agir directement ou indirectement à différents niveaux cellulaires, pouvant engendrer des effets allant des réactions inflammatoires jusqu'à la mort des cellules. Cependant, ces observations ne permettent pas de définir les doses pouvant entraîner des effets néfastes sur les organismes, ni d'estimer son potentiel toxique selon les voies d'expositions.

4.2 Evaluation de la toxicité *in vivo* de la PLTX

Vus les effets de la PLTX sur les cellules de mammifères (*in vitro*), des études ont été menées afin d'évaluer sa toxicité *in vivo*. Ainsi, différentes voies d'administration (e.g. intraveineuse, intratrachéale, intrapéritonéale, par ingestion) ont été testées sur différentes espèces animales (i.e. souris, rats, cochons d'Inde, lapins, chiens, chats et singes).

Le Tableau 3 résume les résultats des travaux menés depuis les années 1970 sur la toxicité *in vivo* de la PLTX (Deeds and Schwartz, 2010; Munday, 2011; Patocka et al., 2015). Pour la plupart des espèces testées, la palytoxine est plus toxique par voie intraveineuse (i.v.) avec des DL_{50} comprises entre 0,03 et 0,74 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Les injections intrapéritonéales (i.p.), intramusculaires (i.p.), sous cutanées (s.c.) et intradermiques (i.d.) montrent des DL_{50} plus élevées avec des valeurs comprises entre 0,18 à 0,71 $\mu\text{g}/\text{kg}$ chez le rat et 0,11 à 1,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ chez la souris.

Tableau 3 : Toxicité *in vivo* de la PLTX après 24 h d'exposition selon l'animal et la voie d'administration (d'après Deeds and Schwartz, 2010; Munday, 2011; Patocka et al., 2015).

Voie d'administration	DL ₅₀ à 24h (µg/kg)							DL ₁₀₀ à 24h (µg/kg)	
	Souris	Rat	Cochon d'inde	Lapin	Chien	Chat	Singe	Souris	Rat
Intraveineuse	0,15 - 0,74	0,089	0,11	0,025	0,03 - 0,06	0,20	0,078		
Intrapéritonéale	0,40 - 1,5	0,63 - 0,71						0,050-0,10	
Intramusculaire		0,24			0,08				
Sous cutanée	1,4	0,40							
Intratrachéale		0,18 - 0,36						> 2	5,0 - 7,5
Parentérale			0,025						
Intra rectale		> 10							> 10
Orale	510 -767*	> 40*						> 2500	
Sublinguale								> 235	
Percutanée								400 - 1700	
	Dose testées (µg)								
Intradermique	0,11 - 0,55		0,11 - 0,55	0,11 - 0,55					
Percutanée				0,25 - 0,50					
Oculaire				0,30 - 1,0					

DL₅₀ : Doses létales à 50 %DL₁₀₀ : Doses létales à 100 %

* Ingestion par gavage

L'administration par voie orale ou par gavage via la nourriture des rongeurs donne les toxicités les plus faibles (i.e. DL₅₀ > 40 µg/kg pour les rats et 510 à 767 µg/kg pour les souris). L'ingestion sans gavage par des souris d'une concentration supérieure à 2500 µg/kg tue en 24 h la totalité des individus. La plus faible toxicité obtenue par voie digestive pourrait s'expliquer par la taille importante de la partie hydrophile de la molécule qui la rend difficilement absorbable par le tractus gastro-intestinal (**Patocka et al., 2015**).

L'exposition à des concentrations comprises entre 0,11 et 1,0 µg par voie intradermique, contact percutanée et oculaire n'entraînent pas la mort des animaux testés (Tableau 3), cependant, des effets délétères, parfois irréversibles, sont observés (e.g. nécroses cutanées, lésions oculaires ou ulcérations) (**Deeds and Schwartz, 2010**).

De manière générale, la toxicité de la PLTX est plus élevée lorsque la toxine est administrée par injection (i.v., i.p., i.m. et parentérale) comparé aux voies intra rectale, orale, sublingual et percutanée. D'après les rapports de l'EFSA (European Food Safety Authority), parmi l'ensemble des phycotoxines, la PLTX est l'une des toxines les plus puissantes par injection i.p. (Tableau 4). Sa toxicité est 1000 fois supérieure à celle des brévéttoxines (BTX), de l'acide okadaïque (AO), de la pécténotoxine (PTX), de la dinophysitoxine (DTX), de l'acide domoïque (AD) ou de la gymnodimines-B (GYM-B) et 100 supérieures

à celle de la yessotoxine, de la pinnatoxine-E ou de la gymnodimines-A (GYM-A). Les ciguatoxines sont les toxines présentant les plus fortes toxicités par i.p. après la PLTX avec un facteur 2 à 30 d'écart.

Tableau 4 : Exemples de DL₅₀ de phycotoxines injectées par voie intrapéritonéale (i.p.) chez la souris d'après l'EFSA (European Food Safety Authority) (EFSA, 2008a, b, 2009a, b, c, d, e, f, 2010a, b, c).

Phycotoxines	LD ₅₀ i.p. (µg/kg)	Phycotoxines	LD ₅₀ i.p. (µg/kg)
AD	3 600 - 5 800	GYM-A	80 - 96
DTX-2	350	GYM-B	800
AO	204 - 225	PnTX-E	45
BTX-2	200	PLTX	0,12 - 0,72
BTX-3	170 - 250	PTX-2	219 - 411
P-CTX-1	0,25	STX	10
P-CTX-2	2,3	YTX	80 - 512
C-CTX-1	3,6		
C-CTX-2	1		

La majorité des études toxicologiques se sont focalisées sur des voies d'administration par injection, mais la plupart des intoxications humaines en lien avec la PLTX se produisent par ingestion ou inhalation alors que peu de données sont disponibles (**Munday, 2011; Patocka et al., 2015**). Des efforts supplémentaires doivent donc être faits afin de mieux évaluer le potentiel toxique de la PLTX par ces voies d'exposition, pour mieux appréhender le risque pour l'Homme.

Néanmoins, la PLTX (et plus précisément un isomère) n'est produite qu'à l'état de trace par *O. cf. ovata* alors que des analogues – les OVTX – constituent l'essentiel du profil toxinique. Ces dernières sont considérées comme des toxines émergentes (**Gerssen and Gago-Martinez, 2019**), et contrairement aux autres toxines algales (e.g. paralysantes, diarrhéiques), il n'existe pas assez de données toxicologiques ni d'études épidémiologiques pour définir une réglementation des OVTX et plus largement des PLTX-like produites par *Ostreopsis*.

4.3 Risques sanitaires et surveillance des PLTX-like produits par *Ostreopsis*

4.3.1 Les cas d'intoxications par ingestion de produits contaminés par la PLTX

En zone côtière tropicale (e.g. Caraïbes ou Philippines) la PLTX a été à l'origine d'intoxications alimentaires suite à l'accumulation de toxines dans des crabes, des oursins ou des poissons (**Deeds and**

Schwartz, 2010; Tubaro et al., 2011), dont deux cas mortels aux Philippines et à Madagascar (**Yasumoto et al., 1986; Alcalá et al., 1988; Mebs, 1998; Onuma et al., 1999**).

Les intoxications alimentaires à des concentrations de PLTX non létales peuvent entraîner l'apparition d'une multitude de symptômes résumés par **Patocka et al. (2015)**. Les symptômes décrits comprennent des troubles gastro-intestinaux, des crampes, des nausées, des vomissements, des diarrhées, des problèmes respiratoires, de la bradycardie ou l'apparition d'un goût métallique dans la bouche. Cependant, ces symptômes ne sont pas spécifiques et il est nécessaire de vérifier par analyse chimique ou bioessai (e.g. test hémolytique) la présence de PLTX dans les produits contaminés pour éviter d'associer à tort ces symptômes à des intoxications par la PLTX, comme cela a été le cas dans les années 1980 au Japon suite à la consommation de poisson-perroquet (*Scarus ovifrons*) (**Tubaro et al., 2011**).

En Europe, l'EFSA a recommandé que la teneur en palytoxine ne devait pas dépasser 30 µg PLTX/kg de chair de fruit de mer (**EFSA, 2009f**). Même si aucun cas d'intoxication n'a été rapporté en Europe suite à la consommation de produits de la mer contaminés par des PLTX-like, d'autres voies d'exposition sont à considérer, comme les intoxications par inhalations ou les irritations cutanées (**Pelin et al., 2018**). Dans ces cas, les patients ont montré une variété de symptômes parfois similaires à ceux observés pour des expositions à la PLTX (**Ciminiello et al., 2006; Durando et al., 2007; Kermarec et al., 2008; Vila et al., 2008; Tichadou et al., 2010; Illoul et al., 2012**). Cependant, ces symptômes pourraient aussi être le résultat de réactions allergiques liées à la présence de débris cellulaires (**Ciminiello et al., 2014**) donc l'origine exacte des réactions liées à une exposition aux aérosols reste à déterminer.

4.3.2 Accumulation de PLTX et OVTX dans les organismes marins

Dans les régions tropicales, certains organismes (poissons et crabes) ont été identifiés comme ayant accumulé de fortes concentrations de composés associés à la PLTX (cf. revue d'**Aligizaki et al., 2011**). Par exemple, dans les Caraïbes, des concentrations pouvant atteindre 127 mg/kg ont été détectées par test hémolytique dans les intestins de poissons-papillons (**Gleibs and Mebs, 1999**). Cette accumulation de toxine pourrait être liée au régime alimentaire de ce poisson qui se nourrit de vers et crustacés vivant sur les colonies de *Palythoa* (**Gleibs and Mebs, 1999**). D'autres exemples d'activités hémolytiques similaires à celle de la PLTX ont été observés chez les poissons herbivores et carnivores originaires d'Hawaï (**Wachi and Hokama, 2001**).

A ce jour, en Méditerranée, *Ostreopsis* est la source majeure de PLTX-like et notamment d'OVTX. L'accumulation des PLTX-like dans les produits de la mer a été constatée à de nombreuses reprises (Tableau 5). Parmi les organismes contaminés, les herbivores et omnivores possèdent les teneurs les plus élevées en toxines (**Biré et al., 2013; Biré et al., 2015**) puisqu'ils broutent directement les

macroalgues sur lesquels les cellules d'*Ostreopsis* prolifèrent (Brissard et al., 2014). Cette observation est appuyée par le fait que la majorité des toxines sont retrouvées dans le tube digestif des animaux (Brissard et al., 2014; Biré et al., 2015). Parmi les organismes contaminés, les oursins sont les organismes qui accumulent le plus de PLTX-like avec des concentrations 3 à 10 fois supérieures au seuil de 30 µg PLTX/kg défini pour la PLTX par l'EFSA (Tableau 5).

Tableau 5 : Concentrations maximales de PLTX-like retrouvées dans la chair totale d'organismes marins.

Méthode de dosage	Test hémolytique (µg eq.PLTX /kg)				LC-MS/MS (µg eq.PLTX/kg)			Injection i.p. sur souris (µg eq.PLTX/mL)
	Références	Aligizaki et al., 2008	Biré et al., 2013	Brissard et al., 2014	Biré et al., 2015	Amzil et al., 2012	Brissard et al., 2014	
Crabes		38			51			
Eponges					131			
Gastéropodes					7,5			
Mollusques	97	34			50	230	131	14
Oursins		180	270		108	450	423	
Poissons		230			72		152	
Pieuvres		2,8						

Même si aucune intoxication par la consommation de produits contaminés n'a été décrite, il existe un consensus dans la littérature montrant qu'il peut exister un risque réel d'intoxication (Aligizaki et al., 2008; Aligizaki et al., 2011; Tubaro et al., 2011; Amzil et al., 2012; Biré et al., 2013; Brissard et al., 2014; Biré et al., 2015). Il semblerait néanmoins que le principal risque d'exposition en Europe et notamment en Méditerranée soit associé aux aérosols et contacts cutanés, plus largement rapportés dans cette région (Lemée et al., 2012).

4.3.3 Les cas d'intoxications par inhalation ou contact cutané avec la PLTX du palythoa

Le palythoa est utilisé par certains aquariophiles comme élément d'ornementation. Le manque de précautions, d'informations et de prévention du personnel travaillant dans les magasins d'aquariophilie ont donné lieu à plusieurs cas d'intoxications de particuliers lors de la manipulation et du nettoyage de ces coraux. Les cas rapportés d'exposition à la PLTX dans ce contexte sont de plus en plus nombreux en Europe et aux Etats-Unis (Pelín et al., 2016a; Calon et al., 2019). La majeure partie de ces intoxications se fait par inhalation, par voie cutanée (Hoffmann et al., 2008; Tubaro et al., 2011; Patocka et al., 2015; Murphy et al., 2016; Tartaglione et al., 2016a; Tartaglione et al., 2016c; Beau et al., 2017; Thakur and Jha, 2017; Calon et al., 2019; Schulz et al., 2019) ou par contact oculaire (Chaudhry et al., 2016; Calon et al., 2019).

Les symptômes résultant de ces inhalations sont : fièvre, nausées, vomissements, toux, dyspnée, myalgie, maux de tête, tachycardie (Tartaglione et al., 2016c; Calon et al., 2019). Dans le cas d'un contact cutané, des gonflements peuvent apparaître avec de la paresthésie, de la myalgie, des irritations et lésions cutanées ainsi qu'un état de faiblesse générale (Hoffmann et al., 2008; Calon et al., 2019). En cas de contact avec les yeux, une conjonctivite et des kératites peuvent se développer (Chaudhry et al., 2016; Calon et al., 2019).

En Méditerranée, lors des blooms d'*Ostreopsis*, de nombreux cas d'intoxication par inhalation ou contact cutané ont eu lieu, entraînant une variété de symptômes similaires à ceux observés pour des expositions à la PLTX chez les aquariophiles (Ciminiello et al., 2006; Durando et al., 2007; Kermarec et al., 2008; Vila et al., 2008; Tichadou et al., 2010; Illoul et al., 2012). Ces cas d'efflorescences ont alors fait l'objet de nombreux travaux suite à une prise de conscience du risque sanitaire qu'elles représentent.

4.3.4 Risques sanitaires liés aux blooms d'*Ostreopsis* en Méditerranée

La prolifération d'*Ostreopsis* à faible profondeur peut avoir un impact sanitaire direct sur l'Homme car les toxines peuvent se retrouver dans des agrégats flottants (appelées « fleurs d'eau ») et même dans les aérosols dispersés par les vents (Ciminiello et al., 2014). En Méditerranée, les premières descriptions d'intoxications respiratoires chez l'Homme remontent à 2003 à Bari en Italie (Gallitelli et al., 2005) et en Grèce (Aligizaki and Nikolaidis, 2006). Trois épisodes d'intoxications majeurs (> 200 cas recensés) par les voies aériennes ont ensuite été recensés : en 2004 sur les côtes Catalanes (Sant Andreu de Llavaneres, Espagne) (Kermarec et al., 2008; Vila et al., 2008), en 2005 à Gênes en Italie dont une vingtaine d'hospitalisation (Brescianini et al., 2006; Ciminiello et al., 2006; Durando et al., 2007) et plus de 300 cas Algérie en 2009 (Illoul et al., 2012). En France, en Italie ou en Croatie, d'autres cas d'affection respiratoire moins importants ont été rapportés dans la littérature (Durando et al., 2007; Tichadou et al., 2010; Tubaro et al., 2011; Illoul et al., 2012; Pfannkuchen et al., 2012).

4.3.5 Risque sanitaire et réglementation en France

En France, début août 2006, plusieurs personnes fréquentant la calanque du Morgiret (îles du Frioul au large de Marseille) ont présenté des symptômes irritatifs au niveau de la bouche et de la gorge, avec ou sans fièvre, après s'être baigné pendant une efflorescence d'*Ostreopsis* (Kermarec et al., 2008). Une interdiction de **baignade et de consommation des produits locaux de la mer a été rapidement mise en œuvre dans cette zone par l'ARS (Agence Régionale de la Santé)**. Suite à cette alerte, la surveillance mise en place en été 2007 sur 9 départements du pourtour méditerranéen a confirmé la présence d'*O. cf. ovata* et en 2008-09, avec de nombreux blooms survenus sur le littoral des Bouches-du-Rhône, du Var et des Alpes-Maritimes (Kermarec et al., 2008; Amzil et al., 2012). Le

nombre d'intoxications observées est resté limité alors que les symptômes chez les baigneurs exposés à *Ostreopsis* étaient bénins (Kermarec et al., 2008 ; Tichadou et al., 2010). Cependant la météorologie clémente (i.e. peu de vent) des étés 2008-09 a évité la survenue de syndromes respiratoires collectifs liés à l'exposition aux aérosols comme à Gênes en 2005 (Ciminiello et al., 2006). En France, suite aux données acquises (terrain, en laboratoire) sur les épisodes d'efflorescences estivales depuis 2005-2006 dans le cadre de projets de recherche des équipes françaises interdisciplinaires (LOV, IFREMER, Université de Nice, Centre anti-poison...), la Direction Générale de la Santé (DGS) a mis en place en 2010 un protocole de surveillance et d'intervention pour prévenir l'apparition de cas humains liés à la présence d'*Ostreopsis* sp. dans les eaux de baignade méditerranéennes françaises (Lemée et al., 2012). Aussi, la DGS a établi des seuils sanitaires et/ou environnementaux de pré-alerte (30 000 cellules d'*Ostreopsis* par litre d'eau de mer) et d'alerte (100 000 cellules/L) basé sur les observations terrains effectuées les années précédentes. Ces seuils peuvent entraîner la fermeture de plages, la suspension des activités nautiques et l'interdiction de la consommation de produits de la mer (DGS/EA3/EA4, n°2010-238).

A titre de comparaison, en Italie, des directives ont aussi été mise en place par les autorités (Tableau 6) avec des seuils identiques à ceux définis en France basé sur la concentration cellulaire entraînant l'apparition de symptômes respiratoires (Funari et al., 2015). Les seuils français et italiens reposent tous les deux sur des seuils de concentrations cellulaires variant en fonction des conditions météorologiques (i.e. vent, température et hydrodynamisme). Les rafales de vent et une forte houle sont des facteurs favorisant la formation d'aérosols et donc augmentent les risques d'intoxications, c'est pourquoi les seuils de concentrations cellulaires sont plus faibles dans ces conditions.

Tableau 6 : Seuils d'alerte associés à leur niveau de risque pour la santé en fonction des densités cellulaires dans la colonne d'eau et des conditions environnementales, repris de Funari et al. (2015).

Seuil	Densité cellulaire	Conditions environnementales	Risques pour la santé
Routine	< 10 000 cell/L	Sans condition météo particulière	Négligeables
	10 à 30 000 cell/L	En période prolongée (7 à 10 jours) avec un hydrodynamisme modéré et des températures très inférieures aux températures optimales* de formation de blooms	Négligeables
Alerte	10 à 30 000 cell/L	En période prolongée (7 à 10 jours) avec un faible hydrodynamisme et une température optimale* pour la formation de blooms	Négligeables
	30 à 100 000 cell/L	En période sans vent	Présence possible de symptômes cutanés et/ou respiratoires légers
Urgence	> 30 000 cell/L	Conditions venteuses (formation d'aérosols) et température optimale* pour la formation d'efflorescence	Présence possible de symptômes cutanés et ou respiratoires
	> 100 000 cell/L	Sans condition météo particulière	Présence possible de symptômes cutanés ou d'effets systémiques en cas d'ingestion d'eau
	Présence de fleurs d'eau Identification d'effets sur la santé humaine lors d'une efflorescence		

* La température optimale peut changer en fonction des régions.

Dans leur rapport, **Funari et al. (2015)** ont défini, d'après les recommandations de l'EFSA pour la PLTX, un seuil de risque à 12 µg d'analogues (exprimé en équivalent PLTX) ingéré par un adulte de 60 kg, soit l'ingestion de 160 000 cellules contenant 75 pg/cellule d'ovatoxines.

Les efflorescences d'*Ostreopsis* représentent une menace pour la santé humaine, mais ces dernières sont également capables d'impacter la faune marine. La qualité sanitaire des zones de production de coquillages est sous l'autorité administrative de la DGAL (Direction Générale de l'Alimentation). Même si les toxines d'*Ostreopsis* ne sont pas réglementées, le réseau national de surveillance du phytoplancton et des phycotoxines de l'IFREMER (REPHY) a intégré depuis 2007 le taxon *Ostreopsis* sp. dans la liste des espèces phytoplanctoniques toxiques recherchées par les Laboratoires Environnementaux Ressources (LER) d'Ifremer. Ces derniers étant chargés de la surveillance des zones de production des coquillages le long du littoral métropolitain (**Belin and Soudant, 2018**). En cas de détection des espèces d'*Ostreopsis* dans la colonne d'eau, la recherche par analyse chimique (LC-MS/MS) de toxines d'*Ostreopsis* cf. *ovata* est déclenchée sur les coquillages de la zone touchée par analyse chimique. De plus, comme les oursins pouvant accumuler les toxines d'*Ostreopsis* pendant l'été, période d'interdiction administrative de la pêche, une vigilance a été mise en place qui consistait à chercher systématiquement ces toxines dans les oursins en Méditerranée avant et pendant la période d'ouverture de la pêche (octobre - avril) afin de détecter d'éventuelle toxines d'*Ostreopsis*

accumulées pendant l'été, et par conséquent assurer une protection du consommateur. Que ce soit dans le cadre du REPHY ou la vigilance (en automne-hiver), aucune OVTX n'a été détectée dans les produits de la mer et la recherche systématique de ces dernières a pris fin en 2017.

Par ailleurs, en complément du REPHY, un dispositif EMERGTOX « Veille d'émergence de biotoxines marines dans les coquillages » a été mis en place en janvier 2018 sous l'égide de la DGAL, coordonné par l'Ifremer et en partenariat avec l'ANSES, qui a pour objectif la mise en évidence d'un éventuel danger lié à la présence dans les coquillages de toxines connues réglementées et non réglementées, répertoriées en France ou pouvant être introduites en France via les eaux de ballast ou les échanges commerciaux entre pays. Il s'agit de la recherche systématique de toxines répertoriées au niveau international, dont les toxines d'*Ostreopsis* (PLTX et OVTX), dans les coquillages prélevés au niveau d'une douzaine de points répartis le long du littoral métropolitain. A ce jour, aucune toxine d'*Ostreopsis* ciblée n'a été détectée.

4.4 Effets toxiques sur la faune marine

Lors des efflorescences d'*Ostreopsis*, plusieurs auteurs ont remarqué une faune marine souffrante (e.g. mortalités inhabituelles d'oursins, de bivalves, de gastéropodes, de céphalopodes et de poissons) (Ciminiello et al., 2006; Vila et al., 2008; Shears and Ross, 2009; Accoroni et al., 2011; Illoul et al., 2012; Vila et al., 2012) ce qui a conduit à étudier les effets et la toxicité des cellules d'*Ostreopsis* sur ces organismes marins (Tableau 7).

Tableau 7 : Toxicité des cellules d'*Ostreopsis cf. ovata* sur la faune marine.

Organisme	Espèce	Toxicité	Référence
Balanes	<i>Amphibalanus amphitrite</i>	CL ₅₀ (cell/mL) à 24 h, 20 °C	1416
		CL ₅₀ (cell/mL) à 24 h, 25 °C	192
Copépodes	<i>Tigriopus fulvus</i>	CL ₅₀ (cell/mL) à 24 h, 20 °C	1486
		CL ₅₀ (cell/mL) à 24 h, 25 °C	250
	<i>Sarsamphiascus cf. propinquus</i>	CL ₅₀ (cell/mL) à 48 h	> 20 000
		TL ₅₀ (h) pour 20 000 cell/mL	120
Artémies	<i>Artemia salina</i>	CL ₅₀ (cell/mL) à 24 h, 20 °C	< 4
		CL ₅₀ (cell/mL) à 24 h, 25 °C	12
		TL ₅₀ (h) avec <i>Ostreopsis</i> en phase exponentielle	3
		TL ₅₀ (h) avec <i>Ostreopsis</i> en phase stationnaire	3,4
		CL ₅₀ (cell/mL) à 48 h (<i>O. ovata</i>)	< 4
		CL ₅₀ (cell/mL) à 48 h (<i>O. fattorussoi</i>)	43
	<i>Artemia sp.</i>	CL ₅₀ (cell/mL) à 24 h	8
		CL ₅₀ (pg/mL) à 24 h	115
	<i>Artemia franciscana</i> (larve)	CL ₅₀ (cell/mL) à 48 h	< 4
		TL ₅₀ (h) pour 4 000 cell/mL	1,3
Moules	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Mortalité à 24 h avec 500 cell/mL	13 %
		Mortalité à 24 h avec 1000 cell/mL	93 %
Poissons	<i>Dicentrarchus labrax</i> (juvéniles)	CL ₅₀ (cell/mL) à 96 h	541
		Mort de tous les individus après 31 h à 2367 cell/mL	
		Mort de tous les individus après 31 h à 425 cell/mL	
Polychètes	<i>Dinophilus gyrociliatus</i>	TL ₅₀ (h) avec 1 500 cell/mL	3,4
		TL ₅₀ (h) avec 3 500 cell/mL	2
Oursins	<i>Paracentrotus lividus</i> (larves)	CL ₅₀ (cell/mL) à 48 h, 20 °C	1820
		CL ₅₀ (cell/mL) à 48 h, 20 °C	> 4 000
		CL ₅₀ (cell/mL) à 48 h, 25 °C	1 265
		CL ₅₀ (cell/mL) à 48 h, 25 °C	1 302
		<i>Paracentrotus lividus</i> (juvéniles)	CL ₅₀ (cell/mL) à 48 h, 20 °C
	<i>Lytechinus variegatus</i>	Fertilisation des gamètes : - 48 % à 400 cell/mL	
		Fertilisation des gamètes : - 21 % à 4 000 cell/mL	

CL₅₀ : Concentration létale pour laquelle 50 % des individus sont morts.

TL₅₀ : Temps Létal pour lequel 50 % des individus sont morts.

Les études expérimentales montrent que les cellules d'*Ostreopsis* peuvent s'avérer mortelles pour les moules, les crustacés, les poissons, les copépodes, les oursins et les polychètes.

Les crustacés du genre *Artemia* ont montré une grande sensibilité envers les cellules d'*Ostreopsis* avec des CL₅₀ comprises entre 4 et 43 cellules/mL, ce qui en fait un modèle pertinent pour l'écotoxicité (Faimali et al., 2012; Pezolesi et al., 2012; Tartaglione et al., 2016b; Pavaux et al., 2019). Il semblerait que l'espèce *O. fattorussoi* (initialement identifiée en tant que *Ostreopsis* sp. à Chypre) soit moins toxique sur le modèle *Artemia* que *O. cf. ovata* selon Tartaglione et al. (2016b), probablement en raison d'une production d'OVTX moins importante (< 1 vs. 44 pg/cellule).

Il a été suggéré que la bonne résistance du copépode *Sarsamphiascus cf. propinquus* (CL₅₀ > 20 000 cellules/mL) proviendrait d'une acclimatation aux cellules d'*Ostreopsis* puisque cette espèce vit naturellement sur des macrophytes sur lesquels est aussi retrouvé le dinoflagellé benthique (Pavaux et al., 2019).

Les larves d'oursins, les balanes (*Amphibalanus amphitrite*) et les copépodes (*Tigriopus fulvus*) semblent posséder des sensibilités similaires avec des CL₅₀ entre 100 et 2000 cellules/mL. On peut noter que pour les balanes et les copépodes des CL₅₀ 6 à 7 fois plus faibles sont obtenues à plus haute température (i.e. 20 vs. 25 °C). Cette différence pourrait être expliquée par la quantité de toxine produite par *Ostreopsis* plus importante à 25 °C (Privitera et al., 2012). Néanmoins, cette observation reste discutable étant donné qu'il a été montré que l'effet de la température sur la production d'OVTX pouvait varier selon les études (cf partie 5 page 38).

La présence de cellules d'*Ostreopsis* peut engendrer jusqu'à 93 % de mortalité chez les moules pour des concentrations de 1000 cellules/mL (Carella et al., 2015). De plus, les moules exposées peuvent développer des réponses inflammatoires, observées à de faibles concentrations en dinoflagellé (i.e. 300 cellules/mL) (Carella et al., 2015). Ces mortalités et réactions inflammatoires ont été associées à la présence du mucus et éventuellement à des OVTX présentes dans ce dernier. Des observations similaires ont été faites chez des individus prélevés *in situ* lors de blooms d'*Ostreopsis* (Carella et al., 2015). Cependant, Gorbi et al. (2013) ont suggéré que les réponses immunitaires seraient non spécifiques de la présence d'*Ostreopsis* qui affecterait les moules de la même manière qu'une autre algue toxique comme *Prorocentrum minutum* ou *Karlodinium veneficum*. Les auteurs ont aussi montré qu'*Ostreopsis* modifiait le comportement des moules qui arrêtaient de se nourrir en sa présence, ce qui à terme peut amener les bivalves à consommer leurs réserves voire induire de l'autophagie afin de survivre.

Lors des efflorescences d'*O. cf. ovata*, les concentrations dans la colonne d'eau dépassent rarement les 200 cellules/mL, cependant, la majorité des cellules sont épiphytiques et leur abondance peut

atteindre plusieurs milliers voire plusieurs millions de cellules par gramme de substrat pouvant représenter un risque pour les autres organismes benthiques comme les moules ou les oursins (cf. Tableau 8 page 40).

L'absence d'étalon d'OVTX disponible dans le commerce ne permet pas de déterminer si la toxicité et les effets néfastes des cellules d'*Ostreopsis* observés sur les organismes marins sont dus uniquement aux OVTX ou à d'autres molécules. Selon certaines études, les toxines d'*Ostreopsis* lui permettraient en effet de se défendre contre les organismes brouteurs (Neves et al., 2018; Pavaux et al., 2019). A ce jour, aucune étude n'a été publiée sur la toxicité des OVTX sur les organismes marins. Un effort supplémentaire (notamment de purification en quantité notable) devra être fait pour mener des études toxicologiques afin de mieux comprendre les effets toxiques des OVTX pour l'Homme et la faune marine, ainsi que leur degré de toxicité par rapport à la PLTX.

Ostreopsis cf. ovata aurait également des effets reprotoxiques puisqu'il engendre des baisses de fécondation ainsi que des malformations chez des copépodes (Guidi-Guilvard et al., 2012; Pavaux et al., 2019) ou chez les oursins (Neves et al., 2018) testés en laboratoire. Dans le cas de l'oursin, la diminution de la fécondation pourrait être en partie due à une perte de mobilité des gamètes et la diminution de la fertilité liée à des malformations des larves lors du développement des embryons. Les effets reprotoxiques d'*Ostreopsis* sur ces organismes pourraient avoir des répercussions importantes qui conduiraient à une réduction des populations des organismes affectés, ce qui modifierait la composition de la communauté benthique et qui permettrait, par exemple, la prolifération de macroalgues.

4.5 Toxicité d'ovatoxines purifiées

Contrairement aux études de toxicité sur PLTX, celles sur les OVTX purifiées sont rares du fait de l'absence d'étalon dans le commerce et de la difficulté de leur obtention.

Abdennadher et al. (2017) ont testé la toxicité d'extraits d'*O. cf. ovata* par injection i.p. chez des souris et ont observé la mort de tous les individus lorsque les concentrations dépassaient l'équivalent en toxine de 40 000 cellules. Malheureusement, aucune quantification des toxines n'a été réalisée lors de cette étude et ces résultats sont discutables étant donné que les concentrations en toxines chez *O. cf. ovata* peuvent varier de indétectables à 468 pg/cell (Nascimento et al., 2012a; Tartaglione et al., 2017; Tibiriça et al., 2019).

La toxicité de l'OVTX-a purifiée par **Ciminiello et al. (2012c)** a été testée sur des souris par injection intrapéritonéale. Malheureusement, la quantité purifiée (i.e. 700 µg) n'a permis de tester qu'une seule concentration de 7 µg/kg. Il n'est pas possible de comparer le degré de toxicité entre PLTX et OVTX-a

d'après ces données (e.g. absence de DL₅₀). Après l'injection de cette dose, les souris ont commencé à se « tortiller » au bout de 1 à 3 min puis, après 30 min, tous les individus sont morts avec les membres paralysés.

Pelin et al. (2016b) ont comparé l'activité cytotoxique sur des cellules HaCaT (kératinocytes) de l'OVTX-a purifiée par **Ciminiello et al. (2012c)** avec celle de la PLTX (extraite et purifiée du *Palythoa tuberculosa* et commercialisée par la société Wako) et de l'OST-D (extraite et purifiée à partir d'*O. cf. siamensis* par le Laboratoire Japonais de Recherche sur l'Alimentation). Sur ce modèle cellulaire pour l'étude *in vitro* des molécules dermatotoxiques, il a été montré que la PLTX était 100 fois plus cytotoxique que l'OVTX-a et 1000 fois plus que l'OST-D (**Pelin et al., 2016b**). Les tests hémolytiques ont permis de montrer que la PLTX était seulement 10 fois plus active que l'OVTX-a (pas d'essais pour l'OST-D). D'après cette étude, la PLTX serait donc 10 à 100 fois plus toxique que l'OVTX-a.

En comparant la structure de l'OST-D avec celle de l'OVTX-a et la PLTX, **Pelin et al. (2016b)** ont émis l'hypothèse que l'absence de groupement hydroxyle en C₄₄ par rapport à la PLTX serait déterminante pour les mécanismes de toxicité. Cependant, les auteurs nuancent cette conclusion avec le fait que les différences de toxicité observées pourraient également être liées à d'autres modifications comme l'absence de groupement méthyle ou hydroxyle au niveau des carbones C₃, C₁₉ et C₂₆ ou la conformation stéréochimique des carbones C₁₇ et C₁₉.

Les concentrations cytotoxiques mesurées pour l'OVTX-a demeurent relativement faibles, de l'ordre du nanomolaire après seulement 4 h d'exposition, suggérant un risque pour l'homme après exposition cutanée. Cet analogue est la toxine majoritaire des profils toxiques d'*O. cf. ovata* observés en mer Méditerranée (**Tartaglione et al., 2017**). D'après **Pelin et al. (2016b)**, si sa toxicité est aussi démontrée *in vivo*, cela pourrait avoir un impact significatif sur l'évaluation des risques associées à *O. cf. ovata*.

L'étude récente de **Poli et al. (2018)** a confirmé une différence de degré de toxicité entre la PLTX et l'OVTX-a (i.e. plus précisément un mélange d'OVTX contenant majoritairement de l'OVTX-a) mais d'un facteur inférieur à 2, ce qui contredit le facteur 10 à 100 précédemment rapporté. En effet, les tests hémolytiques ont montré des concentrations efficaces (CE₅₀) de 0,43 et 0,56 ng/mL et des CL₅₀ par injection i.p. chez le rat de 1,8 et 3,3 µg/kg pour les PLTX et OVTX-a respectivement. Cet écart serait attribué à l'utilisation de protocoles différents (e.g. utilisation d'érythrocytes humains pour **Pelin et al. (2016b)** et de souris pour **Poli et al. (2018)**). L'origine géographique des souches utilisées pour la purification de l'OVTX-a pourrait également avoir joué un rôle puisque **Pelin et al. (2016b)** ont utilisé l'OVTX-a purifiée à partir d'une souche méditerranéenne alors que **Poli et al. (2018)** ont utilisé une souche japonaise connue pour produire les isomères AC des OVTX. Ces derniers possèdent une masse molaire identique mais un temps de rétention différent en chromatographie (**Suzuki et al., 2012**). Il

faut noter que les auteurs considèrent que les OVTX qu'ils ont obtenues sont bien les isomères AC (même si cela ne peut pas être prouvé à cause de l'absence d'étalon d'OVTX-a) mais la différence de toxicité entre ces isomères reste à déterminer.

De façon intéressante, **Poli et al. (2018)** ont également évalué sur des rats la toxicité d'aérosols contenant de la PLTX ou l'OVTX-a. Ainsi, ils ont obtenu des DL₅₀ de 0,041 et 0,031 µg/kg pour PLTX et OVTX-a et estimé que les aérosols contenant ces toxines constituent un danger pour les voies respiratoires. Cependant, ces résultats ne sont que des estimations puisque les auteurs n'ont pas pu évaluer les quantités réelles respirées par les rats. De plus, des dégénérescences cellulaires ainsi que des nécroses dans les cavités nasales des rats ont été constatées. Au niveau histopathologique, l'étude n'a pas montré de différence majeure de dégradation des tissus en fonction des toxines. Quelle que soit la voie d'administration (i.e. voie respiratoire ou i.p.), les effets les plus importants ont été observés au niveau des cellules pulmonaires, cardiaques et hépatiques alors que peu ou aucun effet n'ont été constaté sur les cellules musculaires ou gastro-intestinales. L'ensemble de ces résultats ont conduit **Poli et al. (2018)** de suggérer que la PLTX et l'OVTX-a avaient les mêmes mécanismes d'action sur les cellules, ce qui expliquerait les toxicités similaires obtenues.

Selon les études et les voies d'administration, la toxicité de l'OVTX-a est de similaire jusqu'à 100 fois plus faible que celle de la PLTX. Il semblerait donc que malgré des différences mineures de structures, les molécules présentent différents degrés de toxicité. Néanmoins, peu de données existent autour de la toxicité des OVTX (i.e. seules quelques études portant sur l'OVTX-a purifiée voire semi-purifiée), il reste donc important de poursuivre les travaux de purification des différents analogues pour mieux caractériser leur potentiel toxique et pour améliorer l'évaluation des risques liés à *O. cf. ovata*.

D'autres molécules toxiques ont été identifiées chez le genre *Ostreopsis*, certaines faisant partie des PLTX-like comme les ostrécines ou les mascarénotoxines et d'autres appartenant à des familles différentes comme les ostréoles et les ostréotoxines. L'étude de ces toxines ne faisant pas partie du projet de thèse, leur toxicité et effet toxiques sont décrits dans l'Annexe 2 (page 61).

5. Ecophysio­logie d'*Ostreopsis cf. ovata* dans un contexte de changement global

5.1 Le changement climatique en mer Méditerranée

Le changement climatique a été défini par les Nations Unies comme suit :

« Un changement de climat qui est attribué directement ou indirectement à l'activité humaine, qui altère la composition de l'atmosphère du globe et qui, en plus des variations naturelles du climat, est observé sur le long terme. » (IPCC, 2018).

Depuis l'ère préindustrielle (1880-1900), les gaz à effet de serre ont augmenté dans l'atmosphère (Meehl et al., 2007; IPCC, 2008) et seraient impliqués dans l'augmentation de la température de l'air et des océans, ainsi que dans l'acidification et la modification de fréquences des précipitations (Bindoff et al., 2007; Trenberth et al., 2007).

En région méditerranéenne, la température a augmenté de 1,5 °C entre 1900 et 2019 et pourrait encore augmenter de 2,3 °C d'ici 2100 (Cramer et al., 2019). Concernant la température de surface de la mer Méditerranée, une augmentation de 0,45 °C par décennie a été constatée entre 1985 et 2006 (Alexander et al., 2018; Cramer et al., 2019) et les projections pour 2100 prédisent des augmentations allant de 1,8 à 3,5 °C par rapport à celles relevées à la fin du XX^{ème} siècle (Shaltout and Omstedt, 2014; Cramer et al., 2019). Ces dérèglements pourraient conduire à des périodes chaudes et plus longues (Miraglia et al., 2009; Iona et al., 2018), à des diminutions des précipitations (Lelieveld et al., 2002; Lionello et al., 2012; Cramer et al., 2019) et à des augmentations de la salinité (Iona et al., 2018; Cramer et al., 2019).

Parmi ces changements climatiques, certains facteurs (e.g. température de l'eau) pourraient être plus favorables au développement de micro-algues toxiques (Aligizaki, 2009; Beardall et al., 2009) et notamment d'*Ostreopsis* dans les zones tempérées comme en Méditerranée (Tester et al., 2020).

5.2 Influence des paramètres environnementaux sur *Ostreopsis cf. ovata*

Ostreopsis cf. ovata est le sujet de nombreux travaux depuis 2005, et des efflorescences de plus en plus fréquentes ont été rapportées à travers le monde (cf. 2.2 page 14). Afin de mieux comprendre les facteurs qui régissent la formation de bloom et la production de toxines, des études ont été menées à la fois *in situ* et en laboratoire. Les travaux sur le terrain se sont intéressés à la dynamique de

développement des blooms et les facteurs pouvant favoriser leur croissance (e.g. température, hydrodynamisme, nutriments, type de substrat, salinité) et leur répartition spatio-temporelle (Tableau 8).

Tableau 8 : Recensement des efflorescences d'*Ostreopsis* en mer Méditerranée en fonction des régions, des températures lors des efflorescences et du pic, des concentrations maximales observées (en vert benthiques en cellules/g de poids frais et en bleu : planctoniques en cellules/L) et des espèces de macroalgues échantillonnées (vert : Chlorophyceae, rouge : Florideophyceae et brun : Phaeophyceae).

Mer	Pays	Fenêtre de température (°C) (pic)	Concentration maximale	Substrats (espèce de macroalgue)	Références
Mer des Baléares	Espagne	-	6,8 × 10 ⁵ cell/gPF	<i>Cladophora</i> sp., <i>Ulva rigida</i> , <i>Corallina elongata</i> , <i>Polysiphonia</i> sp., <i>Dictyota dichotoma</i>	Battocchi et al., 2010
		15,6-26 (25,2)	3,9 × 10 ⁵ cell/gPF 3,4 × 10 ⁴ cell/L	<i>Corallina elongata</i> , <i>Stypocaulon scoparium</i>	Mangialajo et al., 2011
		16,3-28,7	> 1,2 × 10 ⁶ cell/gPF	<i>Corallina elongata</i> , <i>Jania rubens</i>	Carnicer et al., 2015a
		-	2,3 × 10 ⁵ cell/gPF 1,7 × 10 ⁵ cell/L	<i>Halopteris scoparia</i>	Vassalli et al., 2018
Golfe du Lion	France	16,1-25,7 (16,1-21,5)	3,9 × 10 ⁵ cell/gPF 1,2 × 10 ⁵ cell/L	Corallinales, <i>Haliptilon</i> , <i>Jania</i> , <i>Dictyota</i>	Mangialajo et al., 2011
Golfe du Lion et Mer Ligurienne	France	13-28 (27,5)	8,5 × 10 ⁵ cell/gPF 6,8 × 10 ⁴ cell/L	<i>Corallina elongata</i> , <i>Jania rubens</i> , <i>Dictyota</i> spp., <i>Halopteris scoparia</i>	Cohu et al., 2013
		-	> 1,0 × 10 ⁵ cell/gPF	<i>Ulva lactuca</i> , <i>Corallina elongata</i> , <i>Jania rubens</i> , <i>Laurencia</i> spp., <i>Dictyota fasciola</i> , <i>Dictyota dichotoma</i> , <i>Halopteris scoparia</i> , <i>Taonia atomaria</i>	Blanfuné et al., 2015
Mer Ligurienne	France	18,0-27,3 (25-27,3)	1,6 × 10 ⁶ cell/gPF 1,0 × 10 ⁵ cell/L	<i>Stypocaulon scoparium</i>	Mangialajo et al., 2011
		20,2-22,2	> 1,0 × 10 ⁵ cell/gPF	-	Amzil et al., 2012
		-	-	<i>Haliptilon virgatum</i> , <i>Dictyota</i> sp., <i>Halopteris scoparia</i>	Séchet et al., 2012
		-	3,4 × 10 ⁵ cell/gPF	<i>Corallina</i> spp., <i>Halopteris scoparia</i>	Biré et al., 2013
		-	2,4 × 10 ⁵ cell/gPF	<i>Corallina</i> spp., <i>Halopteris scoparia</i>	Biré et al., 2015
		-	3,7 × 10 ⁶ cell/gPF 2,8 × 10 ⁴ cell/L	<i>Corallina elongata</i> , <i>Padina pavonica</i> , <i>Stypocaulon scoparium</i>	Brissard et al., 2014
		-	1,3 × 10 ⁶ cell/gPF 9,7 × 10 ⁴ cell/L	<i>Halopteris scoparia</i>	Vassalli et al., 2018
		2007 : 22-26 2008 : 22-27 (22,6)	1,6 × 10 ⁵ cell/gPF 2,1 × 10 ⁴ cell/L	<i>Corallina elongata</i> , <i>Stypocaulon scoparium</i>	Cohu et al., 2011
		18-25,4 (22,6)	1,6 × 10 ⁶ cell/gPF 2,1 × 10 ⁴ cell/L	<i>Stypocaulon scoparium</i>	Mangialajo et al., 2011
		Monaco			

Mer	Pays	Fenêtre de température (°C) (pic)	Concentration maximale	Substrats (espèce de macroalgue)	Références
Mer Ligurienne	Italie	23-30 (>26)	2,5 × 10 ⁶ cell/gPF 8,7 × 10 ⁴ cell/L	<i>Corallina elongata</i> , <i>Jania</i> spp., <i>Dictyota</i> spp., <i>Padina pavonica</i> , <i>Stypocaulon scoparium</i>	Mangialajo et al., 2008
		23-28,5	0,4 à 1,4 × 10 ⁵ cell/L	<i>Halopteris scoparia</i>	Asnaghi et al., 2012
		21-28 (> 24)	2,3 × 10 ⁶ cell/gPF 5,2 × 10 ⁵ cell/L	<i>Halopteris scoparia</i>	Giussani et al., 2015
		-	2,9 × 10 ⁶ cell/gPF 1,4 × 10 ⁵ cell/L	<i>Halopteris scoparia</i>	Vassalli et al., 2018
		> 24	2,9 × 10 ⁶ cell/gPF 8,1 × 10 ⁴ cell/L	<i>Halopteris scoparia</i>	Meroni et al., 2018e
		15,8-28 (23,8-26,7)	1,6 × 10 ⁶ cell/gPF 6,7 × 10 ⁴ cell/L	<i>Stypocaulon scoparium</i>	Mangialajo et al., 2011
		15,5-27,9 (18,8-27,9)	1,7 × 10 ⁶ cell/gPF 9,2 × 10 ⁴ cell/L	<i>Ulva</i> cf. <i>laetevirens</i> , <i>Hypnea musciformis</i> , <i>Polysiphonia</i> sp., <i>Dictyota dichotoma</i>	Mangialajo et al., 2011
Mer Adriatique	Italie	22,4	-	<i>Ulva rigida</i> , <i>Amphiroa rubra</i> , <i>Corallina officinalis</i> , <i>Laurencia obtusa</i> , <i>Cystoseira crinata</i> , <i>Padina pavonica</i>	Monti et al., 2007
		-	6,8 × 10 ⁵ cell/gPF	<i>Cladophora</i> sp., <i>Ulva rigida</i> , <i>Corallina elongata</i> , <i>Polysiphonia</i> sp., <i>Dictyota dichotoma</i> ,	Battocchi et al., 2010
		11,4-26 (16,8-21,8)	1,7 × 10 ⁵ cell/gPF 1,8 × 10 ⁴ cells/cm ² Mollusques : 2,8 × 10 ⁴ cells/cm ² Rochers : 1,1 × 10 ⁵ cells/cm ²	<i>Cystoseira barbata</i> , <i>Cystoseira compressa</i> , <i>Dictyopteris polypodioides</i> , <i>Dictyota dichotoma</i> , <i>Scytosiphon lomentaria</i> , <i>Aglaothamnion</i> sp., <i>Antithamnion plumula</i> , <i>Ceramium ciliatum</i> , <i>C. gracillimum</i> , <i>C. rubrum</i> , <i>C. virgatum</i> , <i>Chondracanthus acicularis</i> , <i>Chondria</i> sp, <i>Chylocladia verticillata</i> , <i>Compsothamnion thuyoides</i> , <i>Corallina officinalis</i> , <i>Gelidiella</i> sp., <i>Gelidium</i> cf. <i>crinale</i> , <i>Gelidium</i> sp., <i>Gracilaria bursa-pastoris</i> , <i>Halymenia floresia</i> , <i>Hypnea filiformis</i> , <i>H. musciformis</i> , <i>Nemalion helminthoides</i> , <i>Nitophyllum</i> sp., <i>Oligosiphonia</i> sp., <i>Polysiphonia</i> cf. <i>subulifera</i> , <i>Polysiphonia</i> sp., <i>Pterocladia capillacea</i> , <i>Scinaia furcellata</i> , <i>Sebdenia dichotoma</i> , <i>Bryopsis pennata</i> , <i>Cladophora</i> sp., <i>Ulva compressa</i> , <i>U. rigida</i> , <i>Chondrophycus papillosus</i>	Totti et al., 2010
		15-25 (23)	1,3 × 10 ⁶ cell/gPF 9,2 × 10 ⁴ cell/L 28 100 cell/cm ²	<i>Ulva rigida</i> , <i>Dictyopteris polypodioides</i> , <i>Dictyota dichotoma</i> , <i>Hypnea musciformis</i>	Accoroni et al., 2012
		-	6,0 × 10 ⁵ cell/gPF 1,5 × 10 ⁴ cell/L	<i>Halopteris scoparia</i>	Vassalli et al., 2018
		20,6	-	<i>Ulva rigida</i> , <i>Amphiroa rubra</i> , <i>Corallina officinalis</i> , <i>Laurencia obtusa</i> , <i>Cystoseira crinata</i> , <i>Padina pavonica</i>	Monti et al., 2007
		> 18	3,3 × 10 ⁵ cell/gPF 4,3 × 10 ⁴ cell/L	<i>Cystoseira crinita</i>	Pfannkuchen et al., 2012
		-	2,7 × 10 ⁶ cell/gPF 2,9 × 10 ⁴ cell/L	<i>Spyridia filamentosa</i>	Ninčević Gladan et al., 2019

Tableau 8 : Suite.

Mer	Pays	Fenêtre de température (°C) (pic)	Concentration maximale	Substrats (espèce de macroalgue)	Références
Mer Egée	Grèce	13,9-29,7	4,1 × 10 ⁴ cell/gPF 135 cell/g 1,6 × 10 ⁴ cell/L	-	Aligizaki and Nikolaidis, 2006
Est Méditerranée	Liban	-	1,9 × 10 ⁶ cell/gPF 5,0 × 10 ⁴ cell/L	<i>Halopteris scoparia</i>	Vassalli et al., 2018
Sud-est Méditerranée	Egypte	24,2-30 (28,7)	9,1 × 10 ⁴ cell/gPF	<i>Caulerpa racemosa</i> , <i>Eteromorpha</i> , <i>Ulva</i> spp., <i>Corallina</i> , <i>Hypnea musciformis</i> , <i>Jania rubens</i> , <i>Laurencia</i> sp., <i>Pterocladia capillacea</i> , <i>Padina pavonica</i> , <i>Colpomenia sinuosa</i> , <i>Sargassum</i>	Ismael and Halim, 2012
Sud Méditerranée	Tunisie	-	5,2 × 10 ⁵ cell/gPF 5,5 × 10 ⁴ cell/L	<i>Halopteris scoparia</i>	Vassalli et al., 2018
Golfe de Gabès	Tunisie	20-24	87 cell/L	-	Brahim et al., 2015
		11-30 (25)	> 7,0 × 10 ³ cell/L	-	Abdennadher et al., 2017

En parallèle, les travaux menés en laboratoire ont permis d'étudier dans des conditions contrôlées l'effet de facteurs (e.g. température, irradiance, salinité) sur la croissance ou la production de toxines de souches d'*O. cf. ovata* d'origines variées (e.g. Méditerranée, Brésil, Asie) (Tableau 9).

Tableau 9 : Recensement des taux de croissance d'*Ostreopsis cf. ovata* selon la température, la lumière (intensité et photopériode), la salinité et les nutriments obtenus en laboratoire.

Souche	Origine (Pays)	Température (°C)	Irradiance ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	Photopériode (h)	Salinité	Nutriments	Taux de croissance (j^{-1})	Référence
IRTA-SMM-11-09	Catalogne (Espagne)	19-24*-28	100	12	32*-36-38		Max*= 0,51	Carnicer et al., 2016b
IRTA-SMM-11-10		19-24-28*	100	12	32-36*-38		Max*= 0,61	
OST-IFR-0.3V	Rochambeau (France)	22	420	16	35		0,26	Brissard et al., 2014
OOAN0601	Ancona (Italie)	20	100-110	16	26-32-36-40		0,43-0,47	Pezzolesi et al., 2012
		20*-25-30	90	16	36		0,49-0,43-0,34	
OOAN0601	Ancona (Italie)	20	90	16	36	N limité (N/P = 5)	0,23	Vanucci et al., 2012
				16		P limité (N/P = 92)	0,30	
				16		Contrôle (N/P = 16)	0,39	
OOAB0801	Bari (Italie)	20	110-120	16	36	Contrôle (N = 176,6 μM ; P = 7,3 μM)	0,46	Pezzolesi et al., 2016
		20	110-120	16	36	N-P limité (N = 16,3 μM ; P = 0,69 μM)	0,27	
OOAB0801	Bari (Italie)	20	110-120	16	36		0,56	Pezzolesi et al., 2014
D483	Naples (Italie)							
CBA-T	Portonovo (Italie)	14-18-22-26*-30-34	50-200*	9-12*-15	36		Max*: 0,83	Scalco et al., 2012
OS2T	Trieste (Italie)							
D483	Naples (Italie)	25	10-100*-400-650	15	36		Max*= 0,41	
CBA-T	Portonovo (Italie)	25	10-100*-400-650	15	36		Max*= 0,36	Monti and Cecchin, 2012
OS2T	Trieste (Italie)	25	10-100*-400-650	15	36		Max*= 0,56	
KAC 85	Bari (Italie)	20-30*	140	16	38	N limité (N/P = 1,6)	Max*= 0,34	Vidyarathna and Granéli, 2013
		20-30*	140	16	38	Contrôle (N/P = 16,1)	Max*= 0,36	
		20-30*	140	16	38	P limité (N/P = 160)	Max*= 0,30	
OOTL0602	Lazio (Italie)	20	90	16	35		0,32	Guerrini et al., 2010
OOAN0601	Numana (Italie)	20	90	16	35		0,37	
OOAP1209	Passetto (Italie)	20	110-120	16	36		0,22	Guidi et al., 2018

* paramètres donnant un taux de croissance maximal

Tableau 9 : Suite.

Souche	Origine (Pays)	Température (°C)	Irradiance ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	Photopériode (h)	Salinité	Nutriments	Taux de croissance (j^{-1})	Référence
KAC85	Bari (Italie)	16-20-24-26-28-30*	140	16	38		Max* = 0,74	Granéli et al., 2011
Oso.1 à 7		22	50	12	40		0,36 à 0,51	
Oso.5	Golfe de Gabès (Tunisie)	22	50	12	10-15-20-25-30-35-40*-45-50		Max* = 0.51	Abdennadher et al., 2017
Oso.7		22	50	12	10-15-20-25-30-35-40*-45-50		Max* = 0.33	
T163	Thaïlande	25	90-100	12		IMK-IMK/2*-f/2-PES	Max* \approx 0,55	
TF5OS	Chine	25	90-100	12		IMK-IMK/2-f/2*-PES	Max* = 0,65	
T163	Thaïlande	20-25*-30-32,5-35	90-100	12	20-25-30*-35-40		Max* = 0,56	Tawong et al., 2015
TF5OS	Chine	20-25-30*-32,5-35	90-100	12	20-25*-30-35-40		Max* = 0,53	
s0662	Tosa (Japon)	15-17,5-20-25*-30-32,5-35			20-25-30*35-40		Max* = 1,03	Yamaguchi et al., 2012b
s0662	Tosa (Japon)	24-25**-.26-27-28-29-30	140	12	31	N = 160 μM ; P = 10 μM	Max** \approx 0,50	Vidyarathna and Granéli, 2012
LCA-B7	Armação dos Búzios (Brésil)	24	60	12			0,15	
LCA-E7		24	60	12			0,14	Nascimento et al., 2012a
UFBA013	Salvador (Brésil)	25	60	12		N/P : 4,2-12,3*-24,3-24,5-49-142	Max* = 1.0	
						N = 0 μM , P = 18 μM	0.36	Mendes et al., 2017
						N = 441 μM , P = 0 μM	1.3	

* paramètres donnant un taux de croissance maximal

5.2.1 Influence de la température

Dans la littérature, les blooms d'*Ostreopsis cf. ovata*, sont essentiellement rapportés lors des périodes chaudes, entre les mois de juin et d'octobre (Figure 8), suggérant qu'il existe une corrélation positive entre la température et les efflorescences. Ce facteur pourrait donc être un des paramètres les plus importants dans la régulation de l'apparition de bloom d'*Ostreopsis*, comme suggéré par plusieurs auteurs (Pistocchi et al., 2011; Parsons et al., 2012; Carnicer et al., 2015a).

En mer Méditerranée, il existe malgré tout différentes fenêtres temporelles selon les régions (Figure 8). *Ostreopsis cf. ovata* est observée durant la période juin-août dans le sud de la France (mer Ligurienne et golfe du Lion) alors qu'en mer Adriatique et Egée, les cellules sont observées un mois plus tard et les efflorescences persistent jusqu'au mois d'octobre. Le long des côtes catalanes, les blooms débutent au même moment que sur les côtes françaises, mais persistent plus longtemps, jusqu'en octobre. Dans les régions plus chaudes du sud de la Méditerranée, les efflorescences sont encore plus étendues, et sont observées dès le mois de juin jusqu'au mois de novembre.

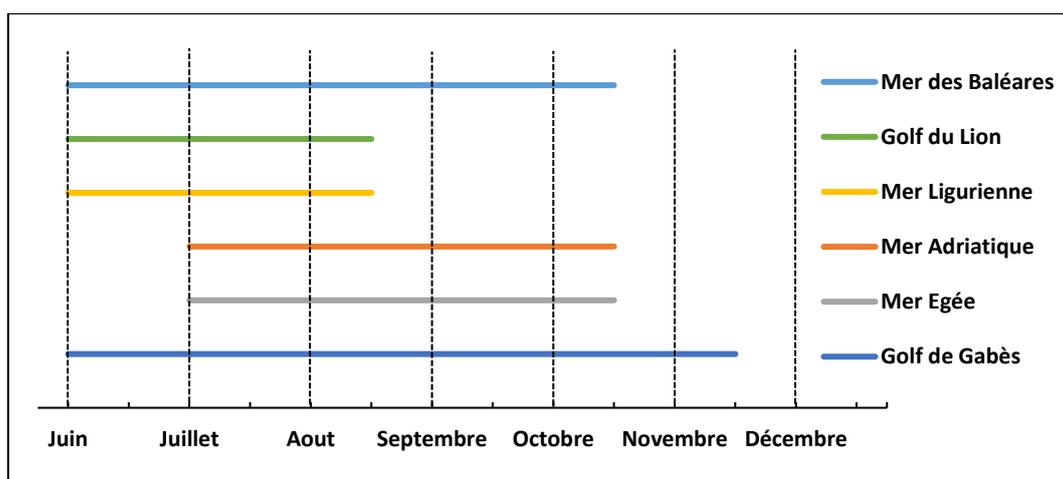


Figure 8 : Périodes d'efflorescences d'*Ostreopsis cf. ovata* en mer Méditerranée (d'après les données présentes dans la littérature, Tableau 8).

Des différences au niveau intraspécifique et la plasticité chez *O. cf. ovata* pourraient expliquer les différentes températures optimales de développement observées. En mer Méditerranée, il est possible de retrouver des cellules sur de larges plages de températures pouvant s'étendre de 11 à 30 °C (Tableau 8). De manière générale, la température pour la majorité des pics de proliférations d'*O. cf. ovata* est comprise entre 20 et 27 °C (Tableau 8) à l'exception de quelques cas entre 16 et 21 °C en mer Adriatique (Totti et al., 2010; Mangialajo et al., 2011) et dans le golfe du Lion (Mangialajo et al., 2011).

Certaines températures semblent déterminantes pour initier ou stopper une efflorescence et d'autres semblent favoriser largement les blooms. Par exemple, à Gênes en Italie, **Mangialajo et al. (2008)** ont constaté que les abondances d'*O. cf. ovata* les plus élevées étaient enregistrées lorsque la température de l'eau dépassait les 26 °C, à l'inverse de **Cohu et al. (2011)** qui n'ont pas observé de prolifération au-dessus de 25 °C à Monaco. En mer Adriatique, il semblerait que la température de l'eau doive dépasser les 25 °C pour permettre la germination des kystes et ainsi débiter la formation d'un bloom (**Accoroni et al., 2014; Accoroni et al., 2015a**). Ce constat a également été fait pour *Ostreopsis* spp. (comprenant *O. cf. ovata*) provenant de la mer du Japon, où **Selina et al. (2014)** ont suggéré que la température de l'eau devait dépasser une valeur minimale (i.e. 22 °C) pour que les kystes d'*Ostreopsis* puissent se développer. A l'inverse, quelques auteurs n'ont remarqué aucune corrélation claire entre la température et les abondances d'*Ostreopsis* avec des pics observés à des températures plus faibles, entre 17 et 22 °C (**Vila et al., 2001b; Totti et al., 2010**).

Lors de leurs suivis annuels à Ancona (mer Adriatique), **Accoroni et al. (2015a)** ont également observé des abondances maximales à plus faible température (i.e. < 25 °C, soit la température permettant la germination des kystes). Cependant, ils ont également constaté que ces pics avaient lieu environ 30 jours après que les températures aient atteint le seuil de 25 °C. Ces observations sont en accord avec celles de **Totti et al. (2010)** montrant que même si la concentration cellulaire n'est pas corrélée à la température, cette dernière reste essentielle pour l'initiation et le développement des efflorescences.

Ces observations *in situ* des effets de la température ont été vérifiées en laboratoire sur des souches isolées. Ainsi, des souches provenant de la mer Méditerranée sont capables de croître sur une large fenêtre de température, entre 16 et 30 °C (**Granéli et al., 2011; Scalco et al., 2012; Vidyarathna and Granéli, 2013; Carnicer et al., 2016b**), avec une gamme encore plus large pour des souches japonaises (15 et 32,5 °C) (**Yamaguchi et al., 2012b**). Tout comme les études *in situ*, les études en laboratoire sur l'impact de la température montrent des résultats contrastés. **Granéli et al. (2011)** montrent un effet positif de la température sur les taux de croissance et les abondances cellulaires avec des maximums enregistrés à 28 et 30 °C. A l'inverse, d'autres souches ont montré des taux de croissance à 30 °C plus faibles qu'à 20 et 26 °C (i.e. 0,30-0,34 j⁻¹ vs. 0,49 j⁻¹ et 0,55 j⁻¹ respectivement) (**Pezzolesi et al., 2012; Scalco et al., 2012**).

Plusieurs auteurs (**Guerrini et al., 2010; Pezzolesi et al., 2012; Vidyarathna and Granéli, 2012; Carnicer et al., 2016b**) suggèrent que les différences de température optimale de croissance des souches seraient dépendantes de leur origine géographique (e.g. souches Tyrrhéniennes vs. Adriatiques ou Méditerranéennes vs. Japonaises). Cependant, aucune étude ne s'est intéressée à la variabilité

intraspécifique d'*O. cf. ovata* et il est donc difficile de déterminer si ces différentes températures optimales ne sont pas dues à une plasticité de cette espèce.

Ces résultats ont amené certains auteurs à supposer que les populations d'*Ostreopsis* se sont adaptées à leur environnement et que le résultat de cette adaptation est observable en laboratoire (**Yamaguchi et al., 2012b**; **Carnicer et al., 2016b**) avec des fenêtres et des optima de températures similaires à ceux mesurés *in situ* dans leur localité d'origine. Par exemple, **Scalco et al. (2012)** concluent que leur souche d'*O. cf. ovata* était bien adaptée aux températures intermédiaires comme celles mesurées lors des efflorescences en début d'été et d'automne en Italie.

L'impact de la température sur la croissance d'*O. cf. ovata* semble varier en fonction des souches et de leur origine. Pour certaines souches, l'augmentation de la température de l'eau en lien avec le réchauffement global, pourrait favoriser le développement des blooms d'*Ostreopsis* et faciliter son expansion géographique (**Mangialajo et al., 2008**; **Granéli et al., 2011**), notamment dans les régions tempérées (**Tester et al., 2020**). Même si la température semble être un facteur déterminant (**Pistocchi et al., 2011**; **Accoroni and Totti, 2016**), elle n'est certainement pas l'unique facteur à prendre en compte pour comprendre les dynamiques des efflorescences. Ainsi, d'autres paramètres pouvant interagir avec la température sur le développement des cellules sont intéressants à étudier, comme la salinité, la lumière, l'hydrodynamisme ou la disponibilité en nutriments.

5.2.2 Effet de la salinité

Ostreopsis cf. ovata est une espèce qui est naturellement retrouvée dans des milieux avec des salinités différentes et variables, comme à Ancona en Italie (salinité : 31,3 à 39,3 (**Accoroni et al., 2015a**)), à Hawaï (salinité : 30 (**Parsons and Preskitt, 2007**)) ou en Espagne (salinité : 36,8 (**Carnicer et al., 2015a**)). Selon les études sur le terrain, aucune tendance claire de l'effet de la salinité n'a pu être mise en évidence. En effet, certains auteurs trouvent des corrélations positives entre les abondances et la salinité (**Carnicer et al., 2015a**), alors que d'autres montrent des corrélations négatives (**Parsons and Preskitt, 2007**) voire même aucune corrélation (**Ismael and Halim, 2012**).

En laboratoire, **Abdennadher et al. (2017)** ont montré une corrélation positive de la croissance avec la salinité pour des souches provenant du Golfe de Gabès, en Tunisie. Ils ont constaté une augmentation de la concentration cellulaire pour des salinités comprises entre 20 et 40 puis une diminution jusqu'à 50. A l'inverse, aucune différence de taux de croissance n'a été mise en évidence par **Pezzolesi et al. (2012)** en testant des salinités entre 26 et 40 sur des souches de l'Adriatique. Dans l'étude de **Tawong et al. (2015)**, des conditions optimales de croissance ont été mesurées à des salinités de 30 et 25 pour des souches d'*O. cf. ovata* provenant des clades du Golfe de Thaïlande et de mer de Chine, respectivement. Comme mentionné dans le chapitre taxonomie (cf. 2.1 page 11), *O. cf. ovata* n'est pas

une espèce clairement définie (i.e. absence de données moléculaires de référence) et il n'est pas possible à ce jour d'évaluer l'effet de cette incertitude taxonomique sur les différentes réponses observées (e.g. aux variations de salinité).

Le rôle de la salinité sur la croissance d'*Ostreopsis* n'est pas évident et la salinité pourrait alors être considérée comme un paramètre secondaire (Pistocchi et al., 2011). De plus, la réponse des cellules à la salinité semble également dépendre d'autres facteurs, comme la température (cf. 5.2.1 page 45) (Yamaguchi et al., 2012b; Tawong et al., 2015; Carnicer et al., 2016b).

Dans un contexte de changement global, la faible augmentation de la salinité de 0,3-0,4 unité en Méditerranée pourrait n'avoir aucun effet direct sur la prolifération des dinoflagellés benthiques tels qu'*Ostreopsis* (Tester et al., 2020).

5.2.3 Effet de l'intensité lumineuse

Dans le milieu naturel, l'intensité lumineuse diminue avec la profondeur (Cohu and Lemée, 2012; Tibiriçá et al., 2019). Certaines études ont constaté que les abondances cellulaires diminuaient aussi avec la profondeur et donc indirectement avec la lumière, étant maximales près de la surface à environ 1 mètre de profondeur (Totti et al., 2010; Cohu and Lemée, 2012; Cohu et al., 2013; Brissard et al., 2014; Hachani et al., 2018; Tibiriçá et al., 2019).

En laboratoire, ce facteur reste peu étudié, alors que la lumière est un élément indispensable pour la réalisation de la photosynthèse. Le point de compensation représente l'intensité lumineuse pour laquelle la respiration (i.e. production d' O_2) compense la photosynthèse (i.e. production de CO_2) et le point de saturation, l'intensité lumineuse pour laquelle l'activité photosynthétique est maximale. Pour deux souches du sud-est de la France, Séchet et al. (2012) ont mesuré un point de compensation de 90-100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ et un point de saturation de 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ montrant que les cellules d'*O. cf. ovata* ont besoin d'un fort niveau d'irradiance pour se développer.

D'après les études en laboratoire, *O. cf. ovata* est capable de croître à des irradiances comprises entre 50 et 650 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Monti and Cecchin, 2012; Scalco et al., 2012). Scalco et al. (2012) ont montré que la photopériode et l'irradiance (intensité de la lumière) avaient des effets significatifs sur la croissance, contrairement à la température. Les auteurs ont mesuré des taux de croissance légèrement plus élevés à plus forte irradiance (50 vs. 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) mais sans corrélation avec l'augmentation de la photopériode. D'autres auteurs (Monti and Cecchin, 2012) n'ont pas rapporté de d'augmentation significative de la croissance pour des irradiances de 100 à 650 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Ces résultats ne permettent pas alors de faire de conclusions robustes sur l'effet de l'intensité lumineuse sur les croissances d'*O. cf. ovata* et d'autres études devront être réalisées afin de clarifier ses effets.

5.2.4 Effet des nutriments

Ostreopsis est suspecté d'être mixotrophe, c'est-à-dire capable d'utiliser la photosynthèse mais aussi des sources de matière organique (e.g. urée) pour croître (**Burkholder et al., 2008**). *Ostreopsis cf. ovata* est capable d'utiliser plusieurs sources d'azote organique et inorganique mais avec différentes affinités (i.e. $\text{NH}_4^+ > \text{NO}_3^- > \text{urée}$) (**Jauzein et al., 2017**). Elle présente également une forte activité phosphatase qui permet de supposer que cette espèce peut utiliser de larges sources de phosphore organique et donc de croître dans des environnements carencés en phosphate (**Accoroni et al., 2017b**).

Dans l'environnement, l'influence des nutriments n'a pas été clairement démontrée. Certaines études n'observent pas de corrélation entre les concentrations mesurées *in situ* et la présence d'*Ostreopsis* (**Parsons and Preskitt, 2007; Accoroni et al., 2011; Coahu et al., 2011; Brahim et al., 2015**) tandis que d'autres, ont rapporté des concentrations en phosphate légèrement plus fortes que celles observées normalement pendant les efflorescences suggérant un potentiel effet positif de ce nutriment (**Coahu et al., 2013; Accoroni et al., 2015a**).

Des études *in vitro* ont montré qu'une limitation en nutriment (N et/ou P) diminuait les taux de croissance par rapport à une condition de contrôle (**Vanucci et al., 2012; Vidyarathna and Granéli, 2013; Pezzolesi et al., 2016**). Selon **Vanucci et al. (2012)**, une limitation en azote affecterait plus sévèrement les taux de croissance que la limitation en phosphate (N/P = 92 vs. 5 et $\mu = 0,23$ vs. $0,30 \text{ j}^{-1}$ respectivement). De plus, le phosphate dans les milieux de culture diminue plus rapidement que l'azote, permettant aux auteurs de conclure que les cellules ont une forte demande en phosphate. Cependant, et encore une fois, les effets des nutriments sur la croissance ne sont pas bien compris. En effet, lors de leur expérience sur l'impact des concentrations en N et P sur *O. cf. ovata*, **Mendes et al. (2017)** ont obtenu des taux de croissance élevés ($\mu > 1 \text{ j}^{-1}$) dans des conditions limitantes en phosphate (N/P > 142) et en azote (N/P = 12).

Ostreopsis se développe à faible profondeur le long des côtes et ces zones sont connues être plus sensibles aux apports de nutriments, en lien avec l'eutrophisation, pouvant ainsi promouvoir et prolonger la formation de HAB (**Glibert and Burkholder, 2018**). Il est donc nécessaire de mieux définir leurs effets sur la croissance du dinoflagellé afin d'appréhender les risques qui en découlent (**Accoroni and Totti, 2016; Tester et al., 2020**).

5.2.5 Effet de l'acidité

L'impact du changement de pH sur la formation de bloom d'*Ostreopsis cf. ovata* n'a été que très peu étudié. Seule une étude terrain suggère une bonne tolérance à l'acidification. En effet, dans la zone volcanique située au pied du Château Aragonaise en mer Tyrrhénienne (**Di Cioccio et al., 2014**), aucune

différence d'abondance entre les différents sites d'échantillonnages n'a été observée alors que le pH variait de 6,90 à 8,01.

Les prédictions sur l'évolution du pH en mer Méditerranée montrent des diminutions de pH allant de 0,08 à 0,1 en 2055 (Tester et al., 2020). Ces changements de pH n'auraient donc pas d'effet significatif sur le développement d'*Ostreopsis cf. ovata*, cependant, le manque d'études sur ce sujet ne permet pas de généraliser l'observation de Di Cioccio et al. (2014) à l'ensemble des souches d'*Ostreopsis*. A titre comparatif, pour d'autres genres comme *Alexandrium*, la diminution du pH liée à l'accumulation du CO₂ dissous a montré des résultats contrastés, liés à des variations intraspécifiques avec des croissances positivement ou négativement corrélées à la quantité de CO₂ (Griffith and Gobler, 2019).

Comme les paramètres vu précédemment (i.e. température, lumière et salinité) des interactions peuvent exister entre les différents paramètres. Dans ce sens et dans un contexte de changement climatique, il a été montré par Brandenburg et al. (2019) qu'une augmentation conjointe du CO₂ dissous et de la température pourrait favoriser la croissance des microalgues toxiques. Il reste à déterminer si cette hypothèse s'applique également à *Ostreopsis*.

5.2.6 Effet de l'hydrodynamisme sur les blooms

L'hydrodynamisme est souvent rapporté comme un facteur ayant un effet sur la prolifération du dinoflagellé benthique (Totti et al., 2010; Accoroni et al., 2012; Accoroni et al., 2015a). Des abondances cellulaires plus importantes ont été mesurées dans les zones abritées et peu exposées à la turbulence des vagues (Totti et al., 2010; Accoroni et al., 2012; Accoroni et al., 2015a; Mendes et al., 2017). Néanmoins, certaines études ont observé de plus fortes concentrations dans les zones les plus agitées (Vila et al., 2001b; Selina et al., 2014). Il est à prendre en compte que dans la plupart des études, la qualité de l'hydrodynamisme est définie de manière subjective (pas de mesure de vitesse du courant ou du vent) et son appréciation peut donc varier d'une étude à l'autre ce qui contribuerait à la variabilité des résultats.

Lorsque les cellules d'*Ostreopsis* sont abondantes, l'action des vagues peut entraîner un détachement de leur substrat (e.g. rochers, macroalgues, mollusques...) (Totti et al., 2010; Meroni et al., 2018; Ninčević Gladan et al., 2019) et les mettre en suspension dans la colonne d'eau, jusqu'à obtenir de fortes concentrations (Tableau 8). Les cellules peuvent alors se disperser grâce aux courants et étendre leur zone de prolifération (Bomber et al., 1989).

La dynamique des blooms semble reliée aux conditions hydrodynamiques avec d'une part, des conditions calmes favorisant la prolifération cellulaire, et d'autre part, des conditions plus agitées pouvant entraîner la diminution voire la fin d'une efflorescence (Accoroni and Totti, 2016; Meroni et al., 2018). Les conditions météorologiques sont donc importantes à prendre en compte lors des suivis

d'efflorescences afin de mieux comprendre les dynamiques observées. De plus, les évènements tels que les tempêtes peuvent diminuer la température de l'eau, affectant davantage la croissance d'*Ostreopsis*.

5.2.7 Etude des effets de facteurs environnementaux combinés

Les effets des facteurs environnementaux sur la croissance d'*Ostreopsis* ont majoritairement été étudiés indépendamment et ont montré des résultats contrastés avec des tendances régulièrement opposées. Dans un contexte où l'on cherche à mieux comprendre la dynamique des blooms, il est important de prendre en compte leur diversité ainsi que leurs interactions.

Dans l'étude sur l'interaction de la température, de l'intensité lumineuse et de la photopériode sur la croissance d'*Ostreopsis*, **Scalco et al. (2012)** ont montré le rôle majeur de ces deux dernières par rapport à la température. Les croissances maximales étaient enregistrées pour une photopériode et des températures intermédiaires (i.e. 12 h et 22-26 °C). De manière générale, les cellules régulaient plus efficacement leur photosynthèse dans des conditions jugées « intermédiaires », qui justifieraient leur bonne acclimatation aux conditions retrouvées en mer Adriatique au début et fin d'été et donc leurs efflorescences à ces périodes.

Plusieurs études en laboratoire sur l'effet de la température et de la salinité ont été menées sur des souches d'origine asiatique. En fonction des souches, différentes conditions semi-optimales de croissance ont été mises en avant : 25-30 °C et 30-35 de salinité pour la souche japonaise (**Yamaguchi et al., 2012b**), 22,7-27,4 °C et 28,7-30,8 de salinité pour la souche thaïlandaise (**Tawong et al., 2015**) et 28,7-32,5 °C et 23,8-30,8 de salinité pour la souche chinoise (**Tawong et al., 2015**). Pour l'étude de la souche japonaise, ces conditions sont proches de celles retrouvées *in situ* lors des efflorescences (**Sato et al., 2011**). Contrairement à **Tawong et al. (2015)**, au-delà des conditions semi-optimales, **Yamaguchi et al. (2012b)** ont pu constater que leur souche était relativement plastique et pouvait croître ($\mu > 0,3 \text{ j}^{-1}$) sur de larges plages de température (17,5 à 30 °C) et de salinité (25 à 40), ce qui lui permettrait de proliférer à la fois dans les zones tropicales, subtropicales et tempérées. **Tawong et al. (2015)** concluent alors que l'impact de la température sur la croissance est plus déterminant que la salinité ou que l'interaction température/salinité. Concernant des souches méditerranéennes, une étude a montré que deux souches espagnoles pouvaient croître entre 19 et 28 °C et entre 32 et 38 de salinité (**Carnicer et al., 2016b**). Pour **Tawong et al. (2015)** et **Carnicer et al. (2016b)**, la température jouerait un rôle plus important que la salinité sur la croissance. Cependant, **Carnicer et al. (2016b)** ont mis en évidence des croissances plus faibles à 32 et 38 de salinité dans la condition la plus chaude (i.e. 28 °C), ce qui leur permet de supposer que dans un contexte de changement climatique et dans la

mesure où de telles variations de température et de salinité surviendraient, l'interaction de ces deux paramètres pourraient limiter la croissance d'*O. cf. ovata*.

Les résultats des études citées précédemment montrent que les souches sont bien acclimatées à leurs conditions d'origine en termes de température, d'irradiance ou de salinité. Tous les auteurs montrent qu'il existe un effet de la température et qu'il serait prépondérant, laissant supposer le rôle majeur de la température dans le développement des blooms. Cependant, ces études en laboratoire ne prennent pas en compte la variabilité d'autres facteurs tels que la disponibilité en nutriment, le pH et ou l'hydrodynamisme. Dans l'objectif de mieux comprendre les effets des différents paramètres environnementaux sur la dynamique des efflorescences, **Accoroni et al. (2015a)** ont créé un modèle basé sur le suivi des variations de la température, du ratio N/P et de l'hydrodynamisme ainsi que le développement des kystes et des cellules en mer Adriatique.

Dans ce modèle, une température de 25 °C est un prérequis permettant la germination des kystes d'*Ostreopsis*. Ensuite, un apport de phosphate est essentiel pour que le ratio N/P passe de >1000 à 24. En effet, **Accoroni et al. (2015a)** expliquent que sans un ratio proche de celui de Redfield (N/P = 16/1), les kystes peuvent germer mais les cellules ne peuvent pas proliférer pour donner lieu à une efflorescence. Par la suite, l'efflorescence peut être maintenue à des températures inférieures 25 °C et à des ratios N/P plus élevés, expliquant notamment les pics d'abondances parfois observés à 20 °C. L'ensemble du modèle de formation des efflorescences d'**Accoroni et al. (2015a)** est résumé dans la Figure 9.

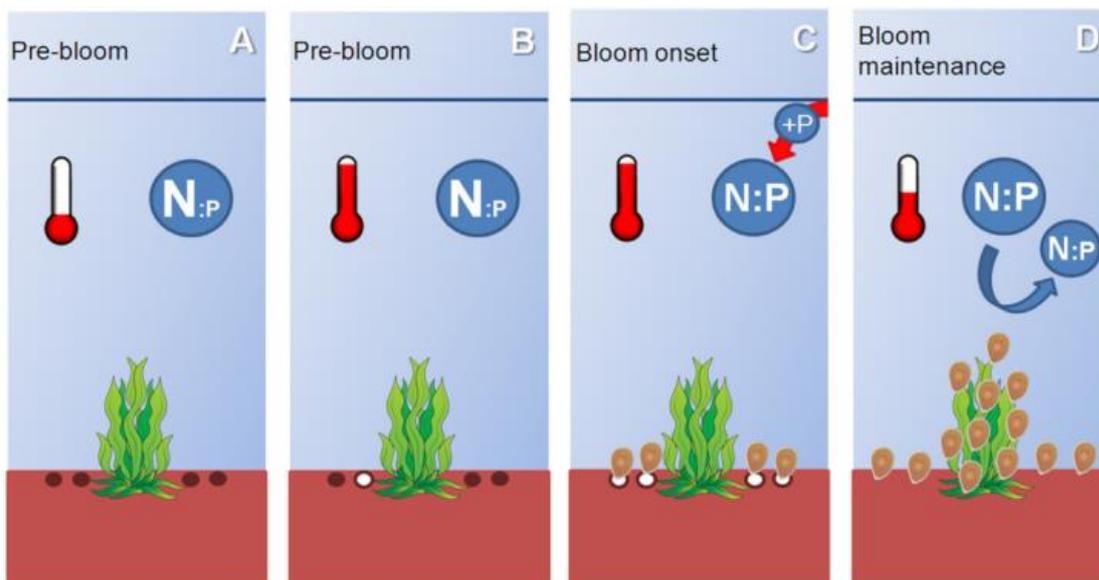


Figure 9 : Diagramme du modèle d'initiation des blooms en fonction de la température et du rapport N/P en mer Adriatique (d'après Accoroni et al. (2015a) Phase de pré-bloom (A) : à une température inférieure à 25 °C et un ratio N/P élevé (> 1000). Phase de pré-bloom juste avant l'initiation de l'efflorescence (B) : l'augmentation de la température (> 25°C) permet aux kystes de commencer à germer mais le ratio N/P reste trop élevé et ne permet pas aux cellules de se développer. Phase d'initiation du bloom (C) : un apport de phosphate dans le milieu réduit le ratio N/P (= 24) et le maintien de la température à plus de 25 °C permet aux cellules de continuer à germer et à proliférer. Phase de bloom (D) : Le bloom peut être maintenu et le pic peut avoir lieu à plus faible température (i.e. 20 °C) et jusqu'à 30 jours après le pic de température à plus de 25 °C. Le ratio N/P peut augmenter légèrement mais reste favorable à la prolifération des cellules.

Accoroni et al. (2015a) rajoutent que des conditions calmes (i.e. de faible hydrodynamisme) sont également indispensables pour la formation de bloom. La Figure 10 présente la synthèse de tous les paramètres prérequis et de leurs effets et rappelle que l'ensemble des conditions favorables est nécessaire pour initier une efflorescence, donc la variation d'un seul de ces paramètres peut empêcher son initiation ou avoir un effet sur les concentrations cellulaires obtenues. A ce jour, ce modèle proposé par **Accoroni et al. (2015a)** est le plus complet mais sa généralisation à d'autres régions qu'à Ancona en mer Adriatique reste à déterminer.

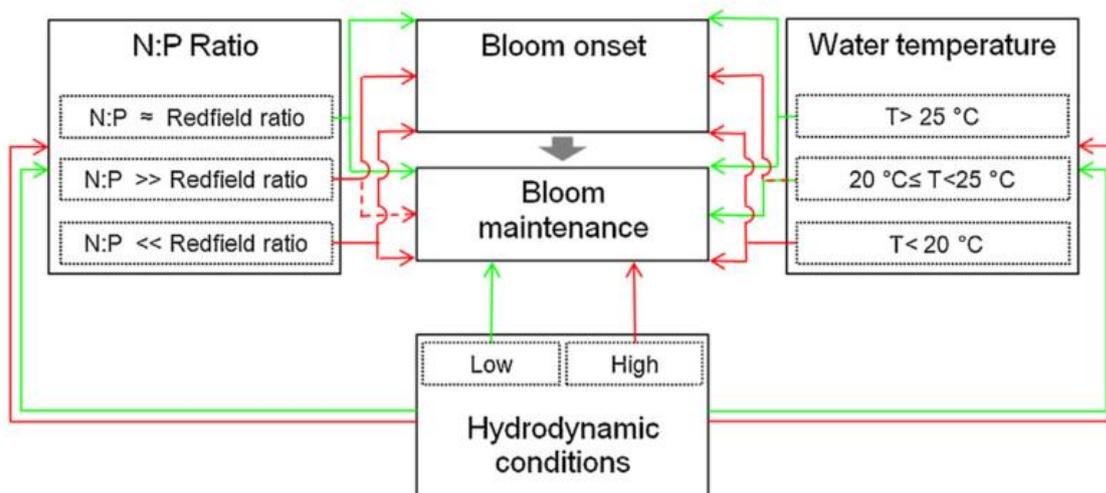


Figure 10 : Modèle sur les effets des ratios N/P, de la température de l'eau et de l'hydrodynamisme sur la formation et le maintien de blooms d'*Ostreopsis cf. ovata* (Accoroni et al. (2015a)). Les flèches symbolisent les effets positifs (vert) et négatifs (rouge). Les lignes pointillées représentent les effets moins significatifs.

Ostreopsis cf. ovata est une espèce benthique dont la prolifération est régie par une multitude de facteurs abiotiques. Mais, les facteurs biotiques ont probablement un impact sur la prolifération, comme le type de substrat et plus particulièrement les espèces de macroalgues sur lesquelles se fixent les cellules d'*Ostreopsis*.

5.2.8 Effet du type de substrat

Ostreopsis est un dinoflagellé benthique, ce qui signifie que les cellules ont besoin d'un substrat pour se développer. Des cellules d'*Ostreopsis* ont été observées sur de nombreux substrats comme les macroalgues, les herbiers mais aussi les mollusques, les rochers, les galets, des morceaux de plastiques ou le sédiment (Vila et al., 2001b; Aligizaki and Nikolaidis, 2006; Totti et al., 2010; Accoroni and Totti, 2016; Tibiriçá et al., 2019) ce qui en fait un organisme à la fois épiphyte, épilithe et épizoïque. D'après les études de Totti et al. (2010) et d'Accoroni et al. (2011), une plus grande densité de cellules d'*Ostreopsis* est retrouvée sur des substrats abiotiques (galets ou rochers) que sur les macroalgues, alors que plusieurs autres groupes ont observé de plus faibles abondances sur le sédiment (Aligizaki and Nikolaidis, 2006; Selina et al., 2014).

Les macroalgues peuvent adopter des formes et des degrés de ramifications variés. Il a été montré à plusieurs reprises qu'*Ostreopsis* préférerait les grandes algues avec une surface tridimensionnelle (i.e. ramifiée) et flexible (Vila et al., 2001a; Aligizaki and Nikolaidis, 2006; Totti et al., 2010; Selina et al., 2014) et que ces structures permettaient de mieux résister à l'hydrodynamisme (Totti et al., 2010).

Parmi les substrats biotiques, *Ostreopsis* a été retrouvé sur un large spectre de macroalgues (cf. Tableau 8), parmi les classes des Phaeophyceae, des Florideophyceae et des Chlorophyceae. Pour certains auteurs (**Totti et al., 2010; Cohu et al., 2013; Selina et al., 2014**), *Ostreopsis* n'aurait pas de préférence d'espèce de macroalgue, alors d'autres études ont montré que les cellules étaient plus abondantes sur des Phaeophyceae et des Florideophyceae que sur des Chlorophyceae (**Vila et al., 2001b; Aligizaki and Nikolaidis, 2006; Ismael and Halim, 2012**). A l'inverse, **Blanfuné et al. (2015)** ont trouvé des variations de concentration dépendantes des différentes espèces de macroalgues et non de leur classe (i.e. Phaeophyceae, Florideophyceae et Chlorophyceae). Ces observations ont conduit les auteurs à conclure que la morphologie et la classe des macroalgues n'étaient pas les seuls facteurs à influencer le développement des cellules. En effet, selon les espèces, la capacité de production de molécules allélopathiques pourrait être variable et induire différentes interactions. Par exemple, les Phaeophyceae sont connues pour produire des molécules algicides à l'encontre de microalgues toxiques comme les phlorotannins (**Nagayama et al., 2003**) ou des glycérolipides (**Hirao et al., 2012**). Plus spécifiquement, **Accoroni et al. (2015b)** ont testé les effets allélopathiques de *Dictyota dichotoma* (Phaeophyceae), *Rhodomenia pseudopalmata* (Florideophyceae) et *Ulva rigida* (Chlorophyceae) et les trois espèces ont eu un impact négatif sur la croissance d'*O. cf. ovata*, *D. dichotoma* ayant même montré un effet algicide sur *Ostreopsis*.

L'absence de consensus dans les observations ne permet pas de définir les préférences de substrats d'*Ostreopsis*. De nombreux facteurs sont à prendre en compte comme la morphologie ou les interactions allélopathiques mais d'autres comme le cycle de vie de l'hôte, les pathogènes et les prédateurs peuvent aussi participer à la variabilité des résultats observés.

5.3 Les facteurs régulant la production d'ovatoxines chez *O. cf. ovata*

5.3.1 Production d'OVTX en fonction de la température

L'impact des paramètres environnementaux sur la croissance d'*O. cf. ovata* a souvent été étudié, à la fois sur le terrain et en laboratoire. En revanche, peu d'études se sont focalisées sur l'effet de ces paramètres sur les concentrations en OVTX intracellulaires afin de mettre en évidence les conditions pouvant favoriser leur production.

L'effet de la température sur la production de toxines a été évalué à plusieurs reprises mais des résultats hétérogènes ont été rapportés. **Granéli et al. (2011)** mesurent des quantités de toxines deux fois plus importantes à 20 et 22 °C qu'à 30 °C alors que **Carnicer et al. (2016b)** constatent des concentrations en OVTX plus importantes à 28 qu'à 24 °C, tandis que **Pezzolesi et al. (2012)** estiment

que 25 °C serait une température optimale. D'autres résultats par tests hémolytiques réalisés par **Vidyarathna and Granéli (2012)** n'ont démontré aucun effet significatif de la température sur la toxicité des cellules entre 24 et 30 °C.

En mer Adriatique, des suivis de toxines lors des blooms ont permis de mettre en avant les mêmes divergences que celles observées en laboratoire. En effet, **Pfannkuchen et al. (2012)** n'ont mesuré aucune corrélation entre la température de l'eau et la quantité d'OVTX intracellulaire contrairement à **Accoroni et al. (2017a)** qui ont mis en évidence une corrélation positive avec des concentrations maximales atteintes à 27 °C (i.e. température maximale durant la période du bloom).

Dans un contexte de réchauffement des eaux lié à un changement climatique, il est difficile de prévoir si l'augmentation de la température aurait un impact sur la production de toxines et donc d'appréhender les risques sanitaires des efflorescences à venir.

5.3.2 Production d'OVTX en fonction de la salinité

Concernant l'effet de la salinité, **Carnicer et al. (2016b)** ont obtenu des résultats peu clairs sur leurs deux souches mais en prenant en compte la température et la salinité, les concentrations maximales de toxines sont toujours plus élevées à 28 °C. Sur une petite plage de salinité (i.e. 32 à 36), **Pfannkuchen et al. (2012)** n'ont mesuré aucune corrélation avec la concentration en toxines lors de leur suivi de bloom en mer Adriatique. Les données sur l'effet de la salinité sur la production de toxine restent limitées et malheureusement aucune quantification des toxines n'a été réalisée dans lors des plans d'expériences de **Tawong et al. (2015)** ou de **Yamaguchi et al. (2012b)** sur les effets de la température et de la salinité.

5.3.3 Effet de l'hydrodynamisme sur la production d'OVTX

Pour les effets de l'hydrodynamisme, une diminution de 30 % des concentrations en toxines intracellulaires a été mesurée en conditions agitées par **Vila et al. (2018)**. Cette tendance a été également observée par **Accoroni et al. (2017a)** qui montre une diminution à la fois de l'abondance cellulaire et des concentrations en toxines après une mer agitée.

5.3.4 Production d'OVTX en fonction des nutriments

La disponibilité en N et P dans le milieu peut s'avérer importante pour la production de toxines. Cependant, **Vanucci et al. (2012)** et **Pezzolesi et al. (2016)** ont montré qu'en fin de phase exponentielle dans les conditions en limitation d'azote et/ou de phosphate, les concentrations en OVTX ne différaient pas significativement du contrôle. Après avoir mesuré des taux de croissances plus bas dans les conditions limitantes (en N et P), les auteurs ont alors suggéré que la limitation en nutriment affectait d'avantage la croissance que la production de toxines. Cependant, lors de la phase

stationnaire, des écarts se creusent avec une accumulation de toxines dans la condition contrôle et presque aucune augmentation de toxines dans les conditions limitantes en N et P (ca. 50 % d'écart avec la condition contrôle). Les OVTX sont des molécules ayant besoin d'azote pour leur synthèse (i.e. 1 fonction amine et 2 fonctions amide) et selon **Vanucci et al. (2012)** une diminution de la disponibilité pourrait, lors de la phase stationnaire, avoir une influence négative sur leur production. Dans le cas de la limitation en phosphore, les auteurs pensent que la diminution de la production d'OVTX serait un reflet du manque de phosphore dans la cellule impliquant l'arrêt des voies de biosynthèse des toxines demandant par exemple de l'ATP.

Basé sur les résultats de **Pezzolesi et al. (2014)**, **Pinna et al. (2015)** ont développé un modèle pour prédire les quantités de toxines produites par *O. cf. ovata* en fonction des nutriments. Leur modèle a permis de montrer que les cellules étaient capables d'accumuler des molécules riches en carbone, comme les OVTX, lorsque les concentrations en N et P devenaient limitantes, augmentant ainsi les ratios carbone/azote (C/N) et carbone/phosphore (C/P). Plus tard, ce modèle a été confirmé par les résultats de **Pezzolesi et al. (2016)** qui ont montré des augmentations simultanées des toxines intracellulaires et des ratios C/P et C/N dans leur condition control suivi d'une diminution lorsque les ratios diminuaient. Ces ratios sont avant tout basé sur ceux retrouvés dans le milieu lors des différentes phases de croissances du dinoflagellé démontrant que cette dernière a une importance sur la production d'OVTX chez *O. cf. ovata*.

5.3.5 Production des OVTX en fonction de la phase de croissance d'*O. cf. ovata*

Les cultures de microalgues en batch sont divisées en plusieurs phases : i) la phase de latence ; ii) la phase exponentielle qui représente la période pendant laquelle la division cellulaire est maximale ; iii) la phase stationnaire qui est une phase de plateau où le nombre de cellules mourantes est en équilibre avec le nombre de nouvelles cellules et iv) enfin la phase de déclin qui correspond à une diminution de la population avec la mort des cellules et l'arrêt de leur division.

Lors de culture en batch en laboratoire, il a été montré que les quantités d'OVTX dans les cellules augmentaient tout au long de la croissance (**Guerrini et al., 2010; Pezzolesi et al., 2012; Vanucci et al., 2012; Vidyarathna and Granéli, 2012; Honsell et al., 2013; Brissard et al., 2014; Carnicer et al., 2016b; Pezzolesi et al., 2016; Vila et al., 2018**). Lors de leur croissance, les cellules ont besoin d'une certaine quantité d'énergie pour se diviser et le fait de produire des toxines aussi complexes que les OVTX pourrait exiger une quantité d'énergie supplémentaire pouvant expliquer la plus faible quantité d'OVTX produites lors la phase exponentielle (**Carnicer et al., 2016b**). Mais d'autres travaux n'ont pas mis en évidence de variations significatives de concentration d'OVTX en fonction de ces phases de

croissance (Nascimento et al., 2012b; Ben-Gharbia et al., 2016; Mendes et al., 2017). Pour Mendes et al. (2017), les toxines seraient une fraction constante des métabolites produits par *Ostreopsis*.

Seulement deux études en mer Adriatique se sont intéressées aux variations du contenu en OVTX en fonction de l'évolution des blooms. Accoroni et al. (2017a) ont montré une augmentation de la concentration en OVTX avec un maximum atteint avant le pic de concentration cellulaire alors que Pfannkuchen et al. (2012) ont mesuré des quantités stables pendant l'efflorescence avec une valeur maximale d'OVTX enregistrée après le pic du bloom. Dans les deux cas, les quantités de toxines intracellulaires diminuent après le pic lorsque, d'après Accoroni et al. (2017a), les conditions ne semblent plus optimales, dues à une diminution de la température, de disponibilité en nutriments ou à cause de l'hydrodynamisme.

5.3.6 Impact de la croissance et paramètres environnementaux sur les profils toxiques d'*O. cf. ovata*

Dans toutes les études, les concentrations relatives de chaque analogue ne sont pas affectées ni par les conditions de cultures *in vitro* (Pezzolesi et al., 2012; Vanucci et al., 2012; Brissard et al., 2014; Pezzolesi et al., 2014; Carnicer et al., 2016b; Pezzolesi et al., 2016; Mendes et al., 2017) ni par les différentes phases de blooms *in situ* (Pfannkuchen et al., 2012). Accoroni et al. (2017a) ont observé des variations de profils lors d'un suivi de bloom. Cependant, les quelques variations existantes entre ces derniers (e.g. disparition d'un analogue dans le profil) pourraient venir des limites de quantification des méthodes d'analyses lorsque les concentrations totales étaient déjà faibles. La stabilité des profils suggère que parmi tous les analogues connus à ce jour, aucun ne serait un précurseur pour la synthèse des autres et que le profil toxinique serait constitutif des cellules (Pezzolesi et al., 2014).

5.4 Conclusion

A ce jour, les résultats des différentes études ne permettent pas de statuer clairement sur l'impact des changements de température, de pH, d'intensité lumineuse, de salinité et des concentrations en nutriments liés au changement global sur la croissance ou la production de toxines. De plus, la diversité des souches utilisées lors des études en laboratoire (clades Méditerranée/Atlantique vs. Thaïlande vs. Mer de Chine) rend les comparaisons difficiles étant donné les conditions optimales pour la croissance ou la production de toxine, peuvent varier d'une souche ou d'une population à l'autre.

Les effets des facteurs environnementaux sur la production de toxines sont moins étudiés que sur la croissance des cellules. Pourtant, ces toxines présentent un risque sanitaire et la compréhension de leur production (et des facteurs la favorisant) est nécessaire pour mieux appréhender les risques qui en découlent.

6. Annexes

Annexe 1 : Localisations d'*Ostreopsis cf. ovata* dans les océans et mers du monde.

Région (Pays)	Références
Océan Atlantique	
Brésil	Penna et al., 2005; Nascimento et al., 2008; Nascimento et al., 2012b; Gómez et al., 2017; Tibiriçá et al., 2019; Nascimento et al., 2020
Canaries	García-Portela et al., 2016; Soler Onís et al., 2018
Portugal	Ramos et al., 2015; Santos et al., 2019
Rocher de Saint-Paul	Nascimento et al., 2012b
Océan Indien	
Ile de la Réunion	Quod et al., 1995; Hansen et al., 2001; Carnicer et al., 2015b
Kenya, Zanzibar	Hansen et al., 2001
Océan Pacifique	
Australie	Rhodes, 2011; Verma et al., 2016
Equateur	Carnicer et al., 2016a
Hawaï	Parsons and Preskitt, 2007
Iles Cook	Rhodes et al., 2010; Argyle et al., 2016
Iles Galápagos	Carnicer et al., 2019
Indonésie	Rhodes, 2011
Japon	Fukuyo, 1981; Adachi et al., 2008; Sato et al., 2011
Malaisie	Pin et al., 2001; Leaw et al., 2010
Nouvelle-Zélande	Chang et al., 2000; Rhodes et al., 2000; Shears and Ross, 2009; Selwood et al., 2012; Argyle et al., 2016
Polynésie française	Fukuyo, 1981
Russie	Selina and Orlova, 2010; Selina et al., 2014
Singapour	Holmes, 1998
Thaïlande	Tawong et al., 2014; Tawong et al., 2015
Vietnam	Chu Van, 2002a, b

Annexe 1: Suite.

Région (Pays)	Références
Mer de Chine	
Chine	Zhang et al., 2018
Mer des Caraïbes	
Colombie	Arbelaez M. et al., 2017; Quintana-M and Mercado Gomez, 2017
Ile de Saint Barthélemy	Besada et al., 1982
Iles Vierges	Tindall et al., 1990
L'archipel de Los Roques	Gamboa Marquez et al., 1994
Venezuela	Marchan et al., 2017
Mer Méditerranée	
Algérie	Illoul et al., 2012
Egypte	Ismael and Halim, 2012; Hosny and Labib, 2019
Espagne	Vila et al., 2001a; Vila et al., 2001b; Penna et al., 2005; Battocchi et al., 2010; Bravo et al., 2010; Carnicer et al., 2015a; Vila et al., 2016; Toldra et al., 2019
France	Taylor, 1979; Mangialajo et al., 2011; Amzil et al., 2012; Cohu and Lemée, 2012; Séchet et al., 2012; Cohu et al., 2013; Brissard et al., 2014; Jauzein et al., 2016
Grèce (Mer Egée)	Aligizaki and Nikolaidis, 2006; Aligizaki et al., 2008
Italie (Mer de Ligure)	Ciminiello et al., 2006; Mangialajo et al., 2008; Cohu et al., 2011; Mangialajo et al., 2011
Italie (Mer Tyrrhénienne)	Tognetto et al., 1995; Simoni et al., 2003; Penna et al., 2005; Zingone et al., 2006; Guerrini et al., 2010; Tartaglione et al., 2017
Italie et Croatie (Mer Adriatique)	Monti et al., 2007; Totti et al., 2007; Battocchi et al., 2010; Guerrini et al., 2010; Totti et al., 2010; Pfannkuchen et al., 2012; Honsell et al., 2013; Tartaglione et al., 2017; Ninčević Gladan et al., 2019
Liban	Abboud-Abi Saab, 1989
Monaco	Cohu et al., 2011
Tunisie	Turki, 2005; Turki et al., 2006; Drira et al., 2009; Aissaoui et al., 2012; Brahim et al., 2015; Ben-Gharbia et al., 2016; Abdennadher et al., 2017

Annexe 2 : Toxicité des molécules produites par le genre *Ostreopsis*.

1. Toxicité des autres analogues de la PLTX

1.1. Toxicité de l'ostréocine-D

L'OST-D, comme la PLTX, crée une dépolarisation des cellules, induisant une entrée d'ions Ca^{2+} dans le cytosol (Louzao et al., 2007) et qui agit ensuite sur le cytosquelette des cellules par réduction de la quantité d'actine (Ares et al., 2005; Louzao et al., 2007). En injection intrapéritonéale, l'OST-D montre une dose létale à 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ contre 1,5 pour la PLTX (Ito et al., 1996; Ito and Yasumoto, 2009), de 2 et 11 $\mu\text{g}/\text{kg}$ par injection intratrachéale (Ito and Yasumoto, 2009) et de 200 et 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ par la voie digestive (Ito and Yasumoto, 2009). A l'heure actuelle, aucune donnée de toxicité n'a été publiée sur les OST-A, -B et -E1.

1.2. Toxicité des mascalénotoxines

Les mascalénotoxines (MCTX) A et B possèdent une activité hémolytique dix fois moins importante que celle de la PLTX purifiée de *Palythoa toxica* (Lenoir et al., 2004). Même si les structures des mascalénotoxines n'ont pas encore été déterminées, les auteurs ont supposé que cette variabilité de toxicité tirerait son origine des différences structurales observées entre les MCTX et la PLTX, comme supposé par Pelin et al. (2016b) pour expliquer la différence de toxicité de la PLTX et OST-D

2. Toxicité des molécules non PLTX-like produites par *Ostreopsis*

2.1. Toxicité des ostréols

L'ostréol-A a démontré une activité cytotoxique contre *Artemia salina* avec une DL_{50} de 0,9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Hwang et al., 2013). A titre comparatif, la DL_{50} de la PLTX chez *Artemia franciscana* est de 0,12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Pavaux et al., 2020, soumis dans *Aquatic toxicology*). L'ostréol-B montre une légère activité cytotoxique contre différentes lignées cellulaires (i.e. hépatocarcinome HepG2, neuroblastome Neuro-2A et cellules cancéreuses de colon HCT-116) avec une CE_{50} (concentration efficace à 50 %) comprise entre 0,1 et 4,8 μM (Hwang et al., 2017). Pour des kératinocytes (HaCaT), Pelin et al. (2016b) ont obtenu une CE_{50} de 0,018 nM. Dans un poster présenté lors de la conférence DINO11 à Bordeaux, Kim et al. (2017) présentaient la structure de l'ostréol-C ($\text{C}_{64}\text{H}_{116}\text{O}_{23}$) qui possède une activité cytotoxique comprise entre celle de l'ostréol-A (i.e. le plus toxique) et -B.

2.2. Toxicité des ostréotoxines

Peu de données sont disponibles sur les effets des ostréotoxines (OTX), cependant ces dernières ont montré des activités neurotoxiques par injection intrapéritonéale chez des souris (DL_{50} de 32 mg/kg) (Mercado et al., 1994).

Tableau 10 : Toxicités des autres PLTX-like et non PLTX-like évaluées sur des lignées cellulaires, par tests hémolytiques ou par bioessais sur des souris ou des crustacés (*Artemia*).

Références	Kim et al., 2017			Hwang et al., 2017			Pelin et al., 2016b	Lenoir et al., 2004	Usami et al., 1995 Ciminiello et al., 2012c * Patocka et al., 2015 **	Ito and Yasumoto, 2009	Hwang et al., 2013
Type de test	Cellulaire			Cellulaire			Cellulaire	Hémolytique	Bioessai	Bioessai	Bioessai
	K562 EC ₅₀ (mM)	U937 EC ₅₀ (mM)	THP-1 EC ₅₀ (mM)	HepG2 EC ₅₀ (μM)	Neuro-2A EC ₅₀ (μM)	HCT-116 EC ₅₀ (μM)	HaCaT EC ₅₀ (nM)	Unité hémolytique (mg/mL)	i.p. souris DL ₅₀ (μg/kg)	i.t. souris DL ₁₀₀ (μg/kg)	<i>Artemia</i> DL ₅₀ (μg/mL)
Ostreol-A	0,10	0,06	0,005								
Ostreol-B	10	16	2,3	4,8	0,10	0,90					
Ostreol-C	2,1	1,4	2,1								
OTX-3									32 100		
MCTX-A								0,8			
MCTX-B								0,2			
isob-PLTX											
P-PLTX								8 × 10 ⁻⁶			
OST-D							23		0,75	11	
OVTX-a							1,1		7*		
PLTX							0,018		0,4-1,5**	2	0,9

Chapter 2 - Toxin content of *Ostreopsis cf. ovata* depends on bloom phases, depth and macroalgal substrate in the NW Mediterranean Sea

Abstract

Over the last fifteen years, blooms of the genus *Ostreopsis* have been reported more frequently and at higher abundances in the Mediterranean area. *Ostreopsis cf. ovata* is known to produce ovatoxins (OVTXs), structural analogues of palytoxin, which is one of the most potent non-polymeric toxins. However, the production of OVTXs is poorly characterized *in situ*. The present study focuses on toxin content and profile according to the bloom phase during summer 2017 in Villefranche-sur-Mer, France (NW Mediterranean Sea), depth (from 0.5 to 5 m) and three different macroalgal substrates of this epiphytic dinoflagellate (*Padina pavonica*, *Dictyota* spp. and *Halopteris scoparia*). Ovatoxin quantification of all samples was performed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The bloom started at the end of June and declined in mid-July, showing the typical seasonal pattern of the NW Mediterranean Sea area. The peak was observed on the 10 July with 1.8×10^6 cells/g FW and 1.7×10^4 cells/L for benthic and planktonic cells, respectively. Total toxin content of cells, collected using artificial substrates, increased during the exponential and stationary growth phases. After reaching a maximum concentration of 9.2 pg/cell on 18 July, toxin concentration decreased and remained stable from 25 July until the end of monitoring. A decreasing trend of the abundance and of the associated total toxin content was noted with depth. Finally, the decreasing order of maximal epiphytic concentration of *O. cf. ovata* was: *Dictyota* spp. (8.3×10^5 cells/g FW), *H. scoparia* (3.1×10^5 cells/g FW) and *P. pavonica* (1.6×10^5 cells/g FW). Interestingly, the highest OVTX quota was obtained in cells present on *Halopteris scoparia*, then on *Dictyota* spp. and *Padina pavonica*. This suggests that the nature of the macroalgal substrate influences both growth and toxin production of *O. cf. ovata* and further work will be required to understand the underlying mechanisms (e.g., competition for nutrition, pH or allelopathic interaction). However, the toxin profiles (i.e., the proportion of each ovatoxin analogue) were not affected by any of the studied parameters (bloom phase, depth, macroalgae or artificial substrates).

1. Introduction

The benthic dinoflagellate *Ostreopsis*, originally found in tropical areas (Ballantine et al., 1988; Morton et al., 1992; Faust et al., 1996; Parsons and Preskitt, 2007), has now spread markedly in temperate areas, as observed on the coasts of the Mediterranean or New Zealand (Mangialajo et al., 2011; Rhodes, 2011; Parsons et al., 2012; Vassalli et al., 2018).

In the Mediterranean Sea, *Ostreopsis* has been reported in Spain, France, Italy, Croatia, Greece, Cyprus, Lebanon and Tunisia (e.g., **Aligizaki and Nikolaidis, 2006; Turki et al., 2006; Totti et al., 2010; Mangialajo et al., 2011; Amzil et al., 2012; Accoroni et al., 2016; Vassalli et al., 2018**) and three species have been identified: *O. cf. ovata*, *O. cf. siamensis* and *O. fattorussoi* (**Penna et al., 2010; Accoroni et al., 2016**).

Different time windows of blooms can be observed in the northwest Mediterranean Sea from late June to August in southeast France and the Ligurian Sea (**Mangialajo et al., 2008; Biré et al., 2013; Cochu et al., 2013; Brissard et al., 2014; Giussani et al., 2017; Meroni et al., 2018**) and from July to mid-October on Catalan coasts (**Carnicer et al., 2015a; Vila et al., 2016**), while blooms in the Adriatic Sea tend to occur from the end of July to October (**Monti et al., 2007; Totti et al., 2010; Accoroni et al., 2011; Mangialajo et al., 2011; Accoroni et al., 2012; Pfannkuchen et al., 2012; Accoroni et al., 2015a**).

Regarding vertical spatial distribution, *Ostreopsis* has mainly been observed between depths of 0.5 and 1 m (**Cochu and Lemée, 2012; Brissard et al., 2014**) and, although predominantly epiphytic, cells were found on both biotic and abiotic substrates (e.g., macroalgae, seagrass, sediment, rocks or pebbles) without any clear preference, as well as in the water column (**Bomber et al., 1989; Vila et al., 2001b; Totti et al., 2010; Accoroni et al., 2011; Hachani et al., 2018**).

Blooms of *O. cf. ovata* have been associated with mortality and a possible reprotoxic effect in marine organisms (**Simoni et al., 2003; Accoroni et al., 2011; Faimali et al., 2012; Guidi-Guilvard et al., 2012; Neves et al., 2018; Pavaux et al., 2019**) as well as various mild health symptoms in humans, including skin irritation, respiratory distress, or a cough caused by direct contact with water or exposure to marine aerosols (e.g., **Gallitelli et al., 2005; Kermarec et al., 2008; Vila et al., 2008; Tichadou et al., 2010; Tubaro et al., 2011; Pfannkuchen et al., 2012**).

Toxicity may result from the production of palytoxin-like molecules, a family of highly potent marine toxins (**Poli et al., 2018**) including isobaric palytoxin (isob-PLTX) and more than a dozen ovatoxins (OVTX-a to -l) (**Ciminiello et al., 2008; Ciminiello et al., 2010; Ciminiello et al., 2012a; Ciminiello et al., 2012c; Brissard et al., 2015; García-Altare et al., 2015; Tartaglione et al., 2016b; Tartaglione et al., 2017**). OVTXs are produced by both *O. cf. ovata* and *O. fattorussoi*, but OVTX-j1, -j2 and -k have only been reported in the latter (**Tartaglione et al., 2016b; Tartaglione et al., 2017**).

O. cf. ovata therefore shows high chemodiversity. Indeed, four different toxin profiles were reported for strains isolated from the Mediterranean Sea, differing qualitatively (i.e., in the number of OVTXs) and thus in terms of analogue proportions (**Tartaglione et al., 2017**). The most common strain contains OVTX-a as the major analogue, followed by OVTX-b (**Brissard et al., 2014; Ciminiello et al., 2014**;

García-Altarets et al., 2015; Carnicer et al., 2016b; Ninčević Gladan et al., 2019). The two other profiles were restricted to only four strains out of the fifty-five that were screened including non OVTX-producing strains (Tartaglione et al., 2017). Effects of growth and OVTX-modulating factors on *O. cf. ovata* toxin content have been largely studied in laboratory experiments (Guerrini et al., 2010; Pistocchi et al., 2011; Nascimento et al., 2012a; Pezolesi et al., 2012; Brissard et al., 2014; Carnicer et al., 2016b). However, data on OVTX content from field studies (e.g., to look at how content depends on bloom phases and biotic or abiotic factors) are scarcer (Pfannkuchen et al., 2012; Accoroni et al., 2017a; Ninčević Gladan et al., 2019). Most monitoring studies have focused only on cell abundances during blooms (Brissard et al., 2014; Carnicer et al., 2015a; Giussani et al., 2017; Meroni et al., 2018), depending on the depth (Totti et al., 2010; Richlen and Lobel, 2011; Cohu and Lemée, 2012; Cohu et al., 2013; Brissard et al., 2014; Accoroni et al., 2015b; Hachani et al., 2018) or on the macrophyte species used as substrate (Vila et al., 2001b; Accoroni et al., 2015b). Toxin content was not analysed in those studies although total OVTX content in field samples shows high variability, with concentrations ranging from undetectable to 75 pg/cell (Accoroni et al., 2011; Pfannkuchen et al., 2012; Brissard et al., 2014; Ninčević Gladan et al., 2019).

This study therefore focused on toxin content and profile at different bloom phases and depths and on different macroalgal host species (substrates) in Villefranche-sur-Mer, France (NW Mediterranean Sea) during the bloom in summer 2017.

2. Material and methods

2.1 Sampling area and methods

Ostreopsis cf. ovata cells were sampled in the small creek at Rochambeau, Villefranche-sur-Mer, France (Figure 11), on the French Mediterranean coast (43°41'34.83" N; 7°18'31.66" E) where blooms have been observed regularly since 2006 (Mangialajo et al., 2011; Cohu et al., 2013; Jauzein et al., 2016; Jauzein et al., 2018). This site is a sheltered environment with a rocky shore and a macroalgal community dominated by *Padina pavonica*, *Halopteris scoparia*, *Dictyota* spp. (Phaeophyceae) and *Ellisolandia elongata* (Florideophyceae). The monitoring of *Ostreopsis cf. ovata* was realized at three different sampling points, A, B and C, on the Rochambeau shore (Figure 11).

The monitoring of planktonic and benthic cells of *O. cf. ovata* was conducted between 6 June and 30 August 2017. For planktonic cell counts, water was sampled 20 cm above the most abundant macroalgae of the station, with a 250-mL plastic bottle. For benthic cell counting, 5–10 g from one

individual of the most abundant macroalga located at 0.5 m depth were carefully collected in 250-mL plastic bottles. The sampling was done each week at the three stations (A, B and C), which are situated 10–30 m apart. Depending on the station and time, the most abundant macroalgae was either *Padina pavonica*, *Halopteris scoparia*, *Dictyota* spp. or *Ellisolandia elongata*. *Dictyota* species were limited to genus determination in order to avoid species misidentification because large intraspecific morphological plasticity of this genus can lead to ambiguous morphological identification criteria (Tronholm et al., 2010).

The methods for sampling, cell collection and counting were as described in Jauzein et al. (2018). Briefly, cells on the macroalgae or artificial substrate were vigorously shaken in the sampling bottle, rinsed twice with 100 mL filtered seawater then filtered through a 500 µm mesh. A 50-mL sub-sample was fixed with acidic Lugol's solution (1% final concentration) before counting. Enumeration was performed using a 1-mL Sedgewick Rafter Counting Cell and a light microscope. For planktonic cells, a sedimentation chamber (50 or 100 mL depending on the abundances) was used before enumeration according to Utermöhl's method (Utermöhl, 1958).

In order to quantify total toxin content per cell during the bloom period, artificial substrates were used to collect cells from 23 June to 17 August 2017. This method, standardized by Jauzein et al. (2016), consists in collecting cells of *O. cf. ovata* from the water column on a rectangular piece of window screen (20 × 20 cm and 1.3 mm porosity) fixed on a plastic frame at 50 cm depth and immersed for 24 h. Artificial substrates proved to be particularly suited as they made it possible to obtain a high concentration of *Ostreopsis* cells, with less other microalgae (including diatoms or other dinoflagellates).

To investigate the effects of the macroalgal species on cell abundance and OVTX content, *P. pavonica*, *H. scoparia* and *Dictyota* spp. were collected in triplicate on 7 July 2017 at 0.5 m depth in the same rocky area (station B), and in less than 1 square metre in order to reduce effects of other biotic and abiotic parameters.

Finally, the importance of depth effect on both cell abundance and OVTX content was assessed by collecting *Ostreopsis* cells from *P. pavonica* at six different depths (0.5, 1, 2, 3, 4 and 5 m from the surface), in triplicate samples for each depth, along a rocky slope on 11 July 2017 (see the transect on Figure 11). *Padina pavonica* was the only macroalga found in abundance along this transect.

To assess the effects of macroalgal substrate and depth on *Ostreopsis cf. ovata* abundance, the same methods as described above were used for sampling, cell collection and counting (Jauzein et al., 2018).

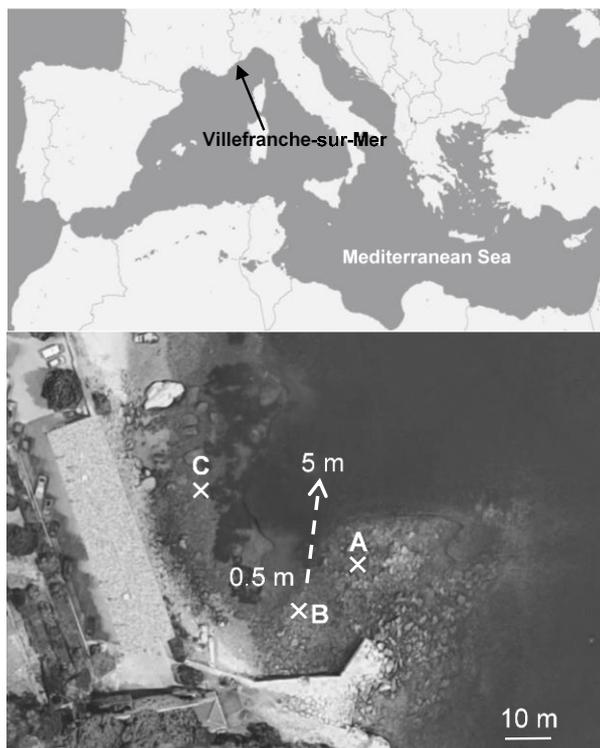


Figure 11 : Sampling was performed at three stations (A, B, and C) at Rochambeau, Villefranche-sur-Mer, France (NW Mediterranean Sea). Dotted line shows the slope where *Padina pavonica* was sampled from 0.5 m to 5 m depth.

2.2 Toxin extraction and analysis by LC-MS/MS

Ostreopsis cf. ovata cells were filtrated on GF/F glass microfibre filters (diameter 47 mm, Whatman). Filtrate volume and cell concentration were determined to allow the calculation of toxin content per cell.

Ovatoxins were extracted according to **Brissard et al. (2014)**, with slight modifications. Cells on the filter were extracted with 5 mL MeOH/H₂O (1:1, v/v) with an ultrasonic probe (Vibra Cell 75115, Bioblock Scientific) for 5 min in an ice bath at 30% amplitude (10 sec on, 5 sec off). After centrifugation (4000 g for 5 min at 4 °C), the resulting pellet was extracted again and both supernatants were pooled. A 150- μ L aliquot was ultrafiltered (0.2 μ m, Nanosep MF, Pall) for toxin quantification by LC-MS/MS.

LC-MS/MS analysis was performed following **García-Altres et al. (2015)** for the chromatography and following **Brissard et al. (2014)** for the MS/MS detection on an LC system (UFLC XR, Shimadzu) coupled to a hybrid triple quadrupole/linear ion-trap mass spectrometer (API 4000 Qtrap, AB SCIEX) equipped with an ESI turbospray interface. Detection was carried out by Multiple Reaction Monitoring using the positive mode of acquisition. Three transitions per analogue were monitored for OVTX-a to -f and isob-PLTX: $[M+2H]^{2+}$, $[M+2H-H_2O]^{2+}$ and $[M+3H-H_2O]^{3+} \rightarrow$ fragment A (**Brissard et al., 2014**), with a

declustering potential of 56 V, collision energy of 31 and 47 eV for doubly and triply charged ions, respectively, and a dwell time of 180 ms. Toxins were separated on a Poroshell 120 EC-C18 column (100 × 2.1 mm, 2.7 μm, Agilent) with its pre-column maintained at 25°C with a flow rate of 0.2 mL/min. Mobile phases consisted of water (A) and acetonitrile/water (95:5, v/v) (B), both containing 0.2% acetic acid. The gradient used was modified from **García-Altare** *et al.* (2015): 28–29% B over 10 min, 29–30% B over 5 min, 30–100% B for 1 min and maintained 5 min, then 100–28% B over 1 min, held 4 min for equilibration. Injection volume was 5 μL. In the absence of standards for OVTXs, these were quantified relative to a palytoxin standard (Wako Chemicals GmbH), assuming similar molar response, and expressed in PLTX equivalents. Limit of detection (LOD) and of quantification (LOQ) of the system were 20 and 40 ng/mL, respectively. A minimum of 6.0×10^4 cells per artificial substrate was necessary for toxin quantification (i.e., to obtain results >LOD with the sensitivity of our LC-MS/MS method).

2.3 Statistical analysis

SigmaPlot (version 14.0) software was used to perform statistical analyses. Normality and homoscedasticity were ascertained by the Shapiro-Wilk and Brown-Forsythe tests. Significant differences of cell abundances and toxin content according to macroalgae and depth were estimated by the analysis of variance (ANOVA) followed by multiple comparison Tukey's HSD post hoc tests.

3. Results

3.1 *Ostreopsis cf. ovata* bloom development and cellular toxin content

The benthic bloom (Figure 12A) showed an increase of cell abundance between 6 and 27 June, corresponding to the exponential growth phase. It then entered a stationary phase divided into two sub-phases, the first corresponding to a plateau with maximal cell abundance between 10 July ($9.2 \pm 7.5 \times 10^5$ cells/g FW) and 18 July. Then, because of a heavy swell event (>1 m, see Discussion), abundances decreased and remained low but quite stable ($3.7\text{--}8.0 \times 10^3$ cells/g FW) until 30 August.

Planktonic abundance mirrored benthic abundance, increasing from 6 June to reach $6.0 \pm 7.3 \times 10^3$ cells/L on 27 June. Planktonic abundance gradually decreased after 12 July and remained quite low until 30 August from 33 ± 30 to 100 ± 34 cells/L.

Chapter 2 - Toxin content of *Ostreopsis cf. ovata* depends on bloom phases, depth and macroalgal substrate in the NW Mediterranean Sea

Total toxin content (Figure 12B) increased linearly from the beginning of monitoring on 23 June until 18 July, thus during the exponential phase and the first 3 weeks of the stationary growth phase of both benthic and planktonic cells. The maximum concentration was 9.2 pg/cell on 18 July, i.e., before the decrease in cell abundances. Then, total toxin content decreased to 3.2 ± 0.7 pg/cell on 25 July and remained low from 1.5 to 3.2 pg/cell until the end of monitoring.

It should be noted that OVTXs were not detected (<LOD) on the 21 July, as the cell abundance on the three artificial substrates was insufficient. Similarly, OVTXs could only be quantified in cells of one replicate on 18 July, and 9 and 17 August, which is the reason that no standard deviation is given for these dates.

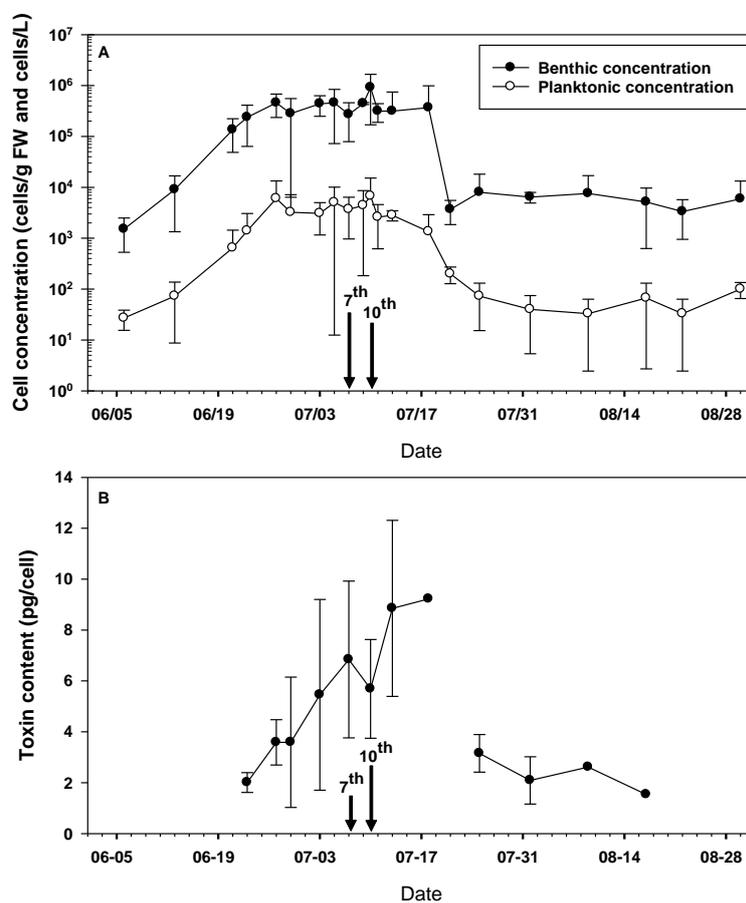


Figure 12 : (A) Monitoring *Ostreopsis cf. ovata* blooms during summer 2017 in Rochambeau. Means stations A, B and C were expressed in cells/g FW and cells/L for benthic and planktonic abundances. (B) Mean total toxin content of epiphytic cells sampled on artificial substrate (pg/cell). Error bars represent standard deviations (n = 3). Arrows show the day of sampling to study the importance of the macroalgae (7th) and the depth (10th) on abundance and toxin content.

3.2 Variability of *Ostreopsis* toxin content with the depth

The depth experiment was performed on 10 July, i.e., during the stationary phase (Figure 12 A and B). Cellular abundance (Figure 13A) was found to decrease from 0.5 to 5 m depth ($2.8 \pm 1.8 \times 10^4$ to $1.9 \pm 1.2 \times 10^3$ cells/g FW). Three toxin levels were observed depending on the depth. Maximal abundance was observed at 0.5 m depth, sharply decreased at 1 m depth and remained stable between 1 and 3 m ($1.3 \pm 0.9 \times 10^4$, $1.2 \pm 1.5 \times 10^4$, $1.4 \pm 1.0 \times 10^4$ cells/g FW at 1, 2 and 3 m, respectively). Finally, the cell abundance decreased slightly at 5 m depth to reach $1.9 \pm 1.2 \times 10^3$ cells/g FW.

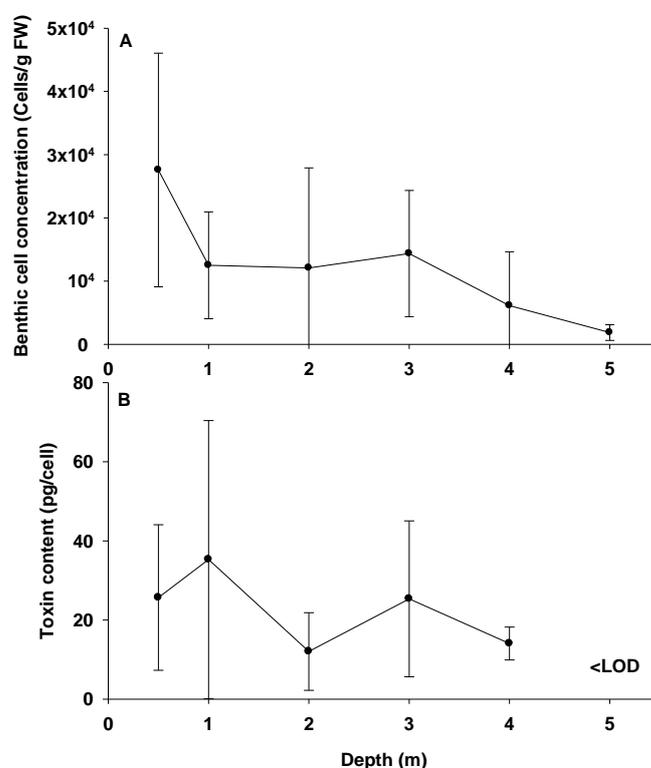


Figure 13 : (A) Mean benthic cell abundance and (B) mean OVTX content of the epiphytic *O. cf. ovata* cells on *P. pavonica* from 0.5 m to 5 m depth. No significant difference was observed (p -value = 0.30 and 0.20, $n = 3$, for toxin and cell concentration). Error bars represent standard deviations.

The trend of total toxin content (Figure 13B) decreased with depth from 25 ± 18 pg/cell at 0.5 m to 14 ± 4.1 pg/cell at 4 m, while no OVTX was detected at 5 m (<LOD), although the large standard deviations mean that no significant difference was observed.

The OVTX profile did not change with depth (Figure 14) except at 2 and 4 m where the quantity of cells was too low for the detection of all analogues (<LOD). The main OVTX produced was OVTX-a followed by OVTX-b (48–56% and 16–32% respectively). Between 0.5 and 3 m, OVTX-c varied from 16 to 9%, OVTX-d from 22 to 9% and OVTX-e from 10 to 17%, without any clear trend. OVTX-c and OVTX-d were

not quantifiable (<LOQ) at 2 and 4 m depth. The concentration of all toxins was below LOD at 5 m depth. Neither isob-PLTX nor OVTX-f were detected (<LOD).

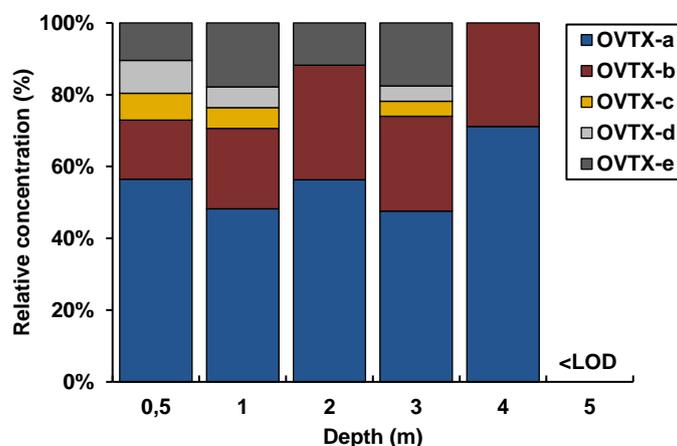


Figure 14 : Relative concentration (%) of OVTX-a to -e for each depth (isob-PLTX and OVTX-f < LOD).

3.3 Variation of *Ostreopsis* toxin content with macroalgal substrate

The abundance of epiphytic *O. cf. ovata* cells (Figure 15A) on *Halopteris scoparia* and *Padina pavonica* was significantly lower than on *Dictyota* spp. ($3.1 \pm 2.5 \times 10^5$ and $1.6 \pm 0.6 \times 10^5$ vs. $8.3 \pm 2.4 \times 10^5$ cells/g FW, respectively, p -values = 0.01 and 0.04). No significant difference was observed between the abundances of epiphytic *O. cf. ovata* cells on *Halopteris scoparia* and *Padina pavonica* (p -value = 0.53).

Toxin quantification (Figure 15B) showed that OVTX content was significantly higher in epiphytic cells found on *H. scoparia* with 29 ± 6.1 pg/cell (p -value = 0.002 and 0.01 when compared with *P. pavonica* and *Dictyota* spp., respectively). The cells collected on *P. pavonica* and *Dictyota* spp. contained 19 and 4% less OVTXs, respectively, and no significant difference was found between these two macroalgae (p -value = 0.29).

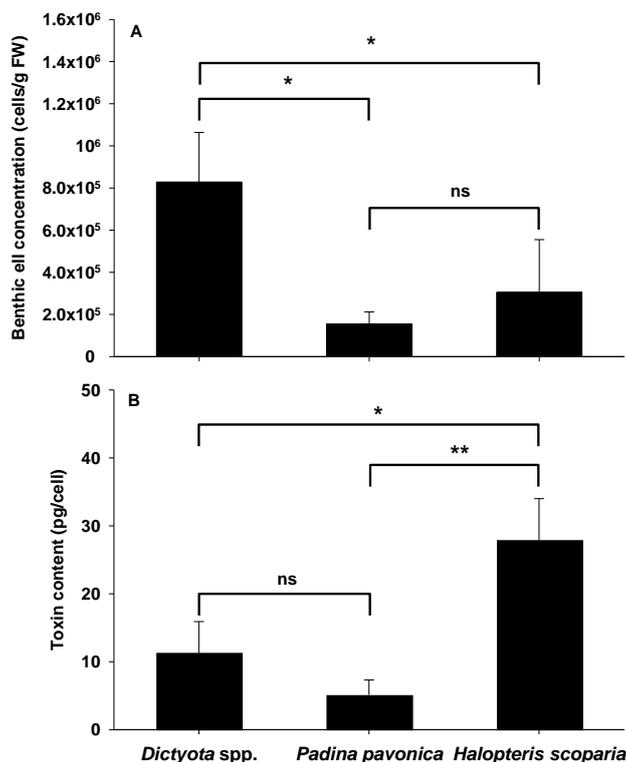


Figure 15 : (A) Mean epiphytic cell abundance (cells/g FW) sampled on *Dictyota* spp., *Padina pavonica* and *Halopteris scoparia* (n = 3) and (B) mean total toxin content of the associated *Ostreopsis* cells (n = 3) on 7 July 2017. ns: non-significant, * p < 0.05, ** p < 0.01. Error bars represent standard deviations.

For all samples, the main toxin quantified was OVTX-a (74–87%) followed by OVTX-b and -e (Figure 16). Traces of ovatoxin-c and -d were only detected for the epiphytic cells on *H. scoparia* and *Dictyota* spp. (2.5 and 2.7%, 1.9 and 2.0% for *Dictyota* spp. and *H. scoparia*) while no OVTX-c and -d were detected for cells on *P. pavonica*. Neither isob-PLTX nor OVTX-f were detected (<LOD).

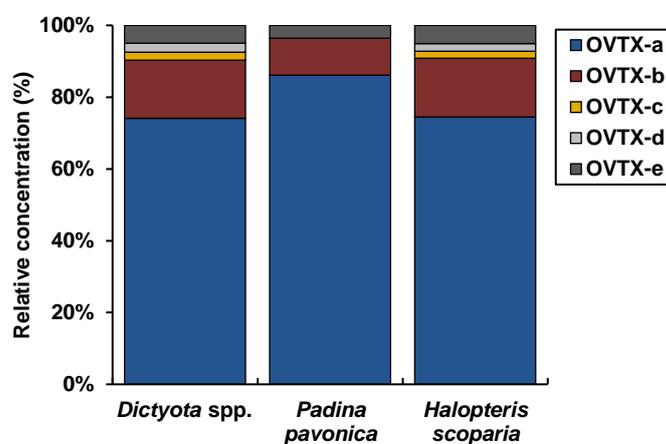


Figure 16 : Relative concentration (%) of OVTX-a to -e for cells epiphytic collected on *Dictyota* spp., *P. pavonica* and *H. scoparia* (isob-PLTX and OVTX-f < LOD).

4. Discussion

In the present study, the high variability of results (shown by the large standard deviations) could be explained by the extremely patchy benthic distribution of *Ostreopsis*, affecting the replicability of sampling and ultimately the results (i.e. counts, toxin content per cell, statistical analysis) (**Mangialajo et al., 2008; Cochu et al., 2013; Jauzein et al., 2018**). Indeed, **Jauzein et al. (2018)** observed that *Ostreopsis* abundance could vary by up to a factor of four among replicates collected on the same macroalgal species in the same 1 m² of seabed.

4.1 Temporal development of the bloom

Ostreopsis has been described as having a clear seasonality pattern in the Mediterranean area (**Rhodes et al., 2000; Vila et al., 2001b; Aligizaki and Nikolaidis, 2006; Pistocchi et al., 2011; Cochu et al., 2013**). In the present study, the benthic bloom was initiated in late June and reached a maximum benthic and planktonic cell concentration on 10 July 2017.

Rochambeau is one of the most monitored locations on French coasts where *Ostreopsis* blooms have regularly been observed (**Mangialajo et al., 2011; Biré et al., 2013; Cochu et al., 2013; Brissard et al., 2014; Jauzein et al., 2016**). During the last decade, blooms have seemed to follow the same seasonal pattern each year. Indeed, between 2009 and 2015, the peaks occurred during the last two weeks of July (**Biré et al., 2013; Brissard et al., 2014; Biré et al., 2015; Vassalli et al., 2018**). The bloom of 2017 was therefore somewhat early and was also observed in Genoa (Ligurian Sea, Italy) the same year with maximal abundance (2.9×10^6 cells/g FW) recorded on 4 July (**Meroni et al., 2018**). Similarly, both blooms declined after mid-July, thus during the expected bloom peak period. **Meroni et al. (2018)** observed the same decrease in Genoa and suggested that the decrease could be linked to a stormy event. Indeed, hydrodynamism is known to adversely affect the bloom development (**Mangialajo et al., 2008; Totti et al., 2010; Accoroni et al., 2012; Meroni et al., 2018**) and a turbulent sea (i.e., swell > 1 m) was observed in Rochambeau on 21 July (i.e., bloom decline).

In the present case, there was a good correlation between planktonic and benthic abundances ($R^2 = 0.86$, see Annex 3 page 81) as regularly observed in previous studies (**Aligizaki and Nikolaidis, 2006; Mangialajo et al., 2008; Mangialajo et al., 2011; Cochu et al., 2013; Jauzein et al., 2018**).

During the bloom of summer 2017, the OVTX content increased during both exponential and stationary phases until the 18 July, which is similar to several laboratory studies (**Guerrini et al., 2010; Vanucci et al., 2012; Brissard et al., 2014**). This was not, however, in agreement with **Mendes et al. (2017)** who

reported no difference. Contrasting results were also observed in field studies. Indeed, **Accoroni et al. (2017a)** reported a maximum toxin concentration before the bloom peak, and **Pfannkuchen et al. (2012)** observed a constant concentration during the bloom. Variation of toxin content according to bloom phase is still not clear from either laboratory or field studies, suggesting that some other factors could modulate the production of OVTXs.

4.2 Variability of *Ostreopsis* abundances and total toxin content with depth

In the present study, the highest cell concentration was observed at the shallowest depth (0.5 m), in agreement with previous studies in Rochambeau (**Cohu and Lemée, 2012; Cohu et al., 2013; Brissard et al., 2014**) and on Italian (**Totti et al., 2010**) and Tunisian coasts (**Hachani et al., 2018**). The decrease in *Ostreopsis* abundance below 3 m depth seems to be common as this trend has already been reported by several authors (**Totti et al., 2010; Cohu and Lemée, 2012; Cohu et al., 2013**). This trend was also reported in the Caribbean Sea for *Ostreopsis* spp. by **Boisnoir et al. (2018)** who found a 14-fold difference between 0.5 and 1 m. Then, between 3 and 10 m, no cells were observed on some of the sites.

Brissard et al. (2014) showed a decrease in toxin content with depth in cells sampled on *Padina pavonica*. They reported 23, 11 and 9 pg/cell of OVTXs at 0.5, 1 and 3 m depth, although no similar decreasing trend was observed with depth in the present study. Nevertheless, the total toxin content was still of the same order, with average concentrations varying from 12 to 35 pg/cell. Differences in *Ostreopsis* abundance and toxin content from 0.5 to 5 m depth may be caused by differences in temperature or light availability (**Granéli et al., 2011; Cohu and Lemée, 2012; Scalco et al., 2012**). In the bay of Villefranche-sur-mer, Cohu and Lemée (2012) reported photosynthetically available radiation values ranging from around 950 and 400 $\mu\text{mol photon/m}^2/\text{s}$ between the sub-surface and 5 m depth. Moreover, they noted that the water column was stratified with the first thermocline between 3 and 8 m depth.

4.3 Variation in *Ostreopsis* toxin content with macroalgal substrate

The benthic cells of *Ostreopsis cf. ovata* can be found on sediments, rocky substrates, molluscs, macroalgae or seagrass, meaning that this dinoflagellate is not an obligate epiphyte (**Bomber et al., 1989; Vila et al., 2001b; Aligizaki and Nikolaidis, 2006; Totti et al., 2010**). Benthic blooms are routinely monitored on macroalgae and a huge diversity of species has been sampled to date among the Phaeophyceae, Florideophyceae and Chlorophyceae classes.

Some studies investigated substrate preferences of *O. cf. ovata* in detail (e.g., **Aligizaki and Nikolaidis, 2006; Totti et al., 2010; Blanfuné et al., 2015; Yong et al., 2018**); however, to our knowledge, there are as yet no publications examining the impact of the substrate on OVTX production. The present study therefore focused on the three most common macroalgae encountered in Rochambeau (Villefranche-sur-Mer, France) in July 2017, namely the Phaeophyceae *Dictyota* spp., *Halopteris scoparia* and *Padina pavonica*, which have different morphologies, to study the effect of substrate species on cellular abundance and OVTX content and profile.

On 7 July (i.e., during the first part of stationary growth phase of the 2017 bloom in Rochambeau), *O. cf. ovata* was significantly more abundant on *Dictyota* spp. as on *P. pavonica* (around 3–5 times), and twice as abundant on *H. scoparia*. In some studies of *Ostreopsis* sp., however, no clear substrate preference was reported (**Vila et al., 2001b; Cochu et al., 2013; Shah et al., 2013; Selina et al., 2014**). The results of the present study confirm the ability of *Dictyota* spp., and to a lesser extent *H. scoparia*, to support a high abundance of *O. cf. ovata* on the eastern part of the French Mediterranean coastline during summer blooms (**Cochu et al., 2013; Blanfuné et al., 2015**).

In the rest of the Mediterranean Sea, contrasting results have been reported with, for example, the highest abundance of *Ostreopsis* spp. on *H. scoparia* on the Catalan coast of Spain (**Vila et al., 2001b**) or a higher abundance on *P. pavonica* than on *Dictyota dichotoma* in the Gulf of Tunis (**Hachani et al., 2018**). These differences may have been caused by the experimental protocols, the presence of an *Ostreopsis* species that is not *O. cf. ovata* (e.g., *O. cf. siamensis* in **Penna et al. (2005)**, according to **Pistocchi et al. (2011)**), different assemblages of macroalgae or hydrodynamism in distinct regions of the Mediterranean Sea, or the spatial (i.e., from local to regional scale) and temporal variability of *Ostreopsis* blooms (**Vila et al., 2001b; Mangialajo et al., 2011; Cochu et al., 2013; Blanfuné et al., 2015**). Indeed, in this last case, **Cochu et al. (2013)** did show a significant interaction between macroalgae and time, meaning that abundances of *O. cf. ovata* varied according to the sampling period. Another factor

that may contribute to controversies is the level and confidence of species identification within the *Dictyota* genera. This was highlighted by **Blanfuné et al. (2015)**, who observed negative correlations depending on the species (i.e., two species of *Dictyota dichotoma* and *Dictyota fasciola*) when analysing the abundance of *Ostreopsis* on macroalgae.

Factors controlling the settlement of *Ostreopsis* on macroalgae are still poorly understood (**Blanfuné et al., 2015**). Some authors have suggested that *Ostreopsis* prefers macroalgae with branched, three-dimensional thalli and a high surface/volume ratio over non- or less branched macrophytes (**Lobel et al., 1988; Vila et al., 2001b; Aligizaki and Nikolaidis, 2006; Totti et al., 2010; Selina et al., 2014**). The present study confirms this hypothesis as there was a higher abundance of *Ostreopsis* on the two branched macroalga compared with *P. pavonica*, which displays fan-shaped thalli. Allelopathic interactions have also been suggested to play a role (**Accoroni et al., 2015b; Blanfuné et al., 2015**) and may explain the significant difference of OVTX content among cells collected on the three Phaeophyceae on the same day and in the same area in this study. Indeed, OVTX concentration was higher for epiphytic cells on *H. scoparia* than on *Dictyota* spp. and *P. pavonica*, with concentrations of 29, 11 and 5.1 pg/cell, respectively. It should be noted that three days later (i.e., when studying the impact of depth at the bloom peak), OVTX content in cells collected on *P. pavonica* at 0.5 m depth was found to reach 25 pg/cell. On 10 June, cells on artificial substrates contained five times less toxin than those on *P. pavonica*, supporting the idea that other factors could influence toxin production. We hypothesized that, as the artificial substrates caught *Ostreopsis* cells coming from a diversity of macroalgae (which can have different OVTX contents), this may have increased the variability and difference in toxin content per cell compared with levels in *Ostreopsis* from only one species of macroalgae.

Comparison of the variation of OVTX content among substrates with previous research is hampered by the scarcity of available data and the diversity of macroalgae sampled. A wide range of concentrations was reported, from undetected to 75 pg/cell (**Accoroni et al., 2011; Pfannkuchen et al., 2012; Brissard et al., 2014; Accoroni et al., 2017a; Ninčević Gladan et al., 2019**). The only study that used one of the macroalgae sampled here (**Brissard et al. (2014)**) found a toxin concentration of 23 pg/cell on *Padina pavonica* in 2011 in Rochambeau (i.e., a level of concentration similar or up to five times higher than the current study). In order to improve assessments of the way substrate effects OVTX production, quantification of OVTXs should be systematic in future studies.

Allelopathy is a natural and complex phenomenon to study *in situ* due to the effect of other environmental parameters (e.g., nutrient competition, pH, light availability, temperature or hydrodynamism) that could interfere or hide the allelopathic effect (**Keating, 1977**). However,

Phaeophyceae are known to produce algicidal molecules, e.g., diterpens production by *Dictyota dichotoma* (Kim et al., 2014), phlorotannins by *Ecklonia* (Nagayama et al., 2003) or glycerolipids by *Ishige sinicola* (Hirao et al., 2012), with the last two classes of molecules showing algicidal activity on five different HAB species. Interestingly, in a controlled laboratory co-culture experiment, Accoroni et al. (2015b) showed that *Dictyota dichotoma* induced a complete algicidal effect on *Ostreopsis cf. ovata*. This bioactivity cannot explain the maximal abundance observed on *Dictyota* spp. in the current study. However, the species or variety of *Dictyota* present in Rochambeau may differ from the one growing in the Adriatic Sea. It was also hypothesized that both the changing of environmental conditions affecting the health of the host (e.g., epiphytes, herbivores and pathogens) and *Dictyota* life stage may change the bioactive compounds released, allowing a suitable environment for epiphyte growth or not (Parsons et al., 2011).

The overall divergent results on *Ostreopsis* preferred substrates show that interactions between macroalgae and *Ostreopsis* are still unclear, suggesting that other parameters than morphology of the macroalgae and allelopathic interaction should be studied, including predation (Fraga et al., 2012; Blanfuné et al., 2015). Ultimately, the chemical ecology between *Ostreopsis* and its substrates should be investigated further.

4.4 Toxin profiles

In this study, the OVTX content was assessed according to bloom phase and to the depth and species of the hosting macroalgae. The toxin profiles of cells collected on artificial substrates and macroalgae were typical, with a major proportion of OVTX-a (48–75%), followed by OVTX-b (12–26%), OVTX-e (5–17%), OVTX-d (2–9%) and OVTX-c (2–8%). In some cases (e.g., profiles for cells on *P. pavonica* sampled at 2 and 4 m depth on 7 July, Figure 14 and profile for cells on *P. pavonica* sampled on 10 July, Figure 16), OVTX-c, -d or -e could not be quantified due to either the low amount of cells or a combination of low amount of cells and low OVTX content. Such an issue has already been reported (Accoroni et al., 2017a) and may bias comparisons of OVTX profiles if not properly taken into consideration.

In a valuable study by Tartaglione et al. (2017), the chemodiversity of OVTXs in the Mediterranean Sea was well characterized and the strains clustered into four profiles. The profile obtained here corresponds to the “profile 1” described by Tartaglione et al. (2017), which seems predominant for both lab-cultured strains (67% of the strains screened in Tartaglione et al., 2017) and cells collected *in situ*, including from Villefranche-sur-mer (Accoroni et al., 2011; Pfannkuchen et al., 2012; Brissard et al., 2014; Ninčević Gladan et al., 2019).

However, the proportion of each analogue was different between cells collected on *P. pavonica* on 10 July (Figure 14) and on *Dictyota* spp. and *H. scoparia* on 7 July (Figure 16). The first profile was in good agreement with “profile 1” defined by **Tartaglione et al. (2017)** but the second was somewhat different, with a higher proportion of OVTX-a compared with other analogues (i.e., mean of 78% vs. 56% in **Tartaglione et al. (2017)**).

Some other differences were noted between the profiles obtained here and those previously reported. Indeed **Brissard et al. (2014)** observed two analogues (isob-PLTX and OVTX-f) in cells from Rochambeau that were screened for but not detected in the present work. OVTX-f is not common, only being observed in minor amounts in some strains (**Brissard et al., 2014; Tartaglione et al., 2017**); it is therefore not surprising that it was not detected here. Concerning isob-PLTX, previous *in situ* studies reported concentrations of less than 1% (**Pfannkuchen et al., 2012**) and up to 15% (**Accoroni et al., 2011; Brissard et al., 2014; Accoroni et al., 2017a**).

The factors influencing OVTX profiles and explaining these discrepancies and potential differences between cells growing in a natural environment compared with the lab should therefore be investigated more thoroughly.

Toxin profiles did not vary significantly among cells collected during the bloom (i.e., on artificial substrates, see Annex 4 page 81), among cells collected on *P. pavonica* according to depth or among cells attached to the three macroalgae. Similar observations have previously been made *in situ* (**Accoroni et al., 2011; Pfannkuchen et al., 2012; Brissard et al., 2014**) and in controlled experiments (**Pezzolesi et al., 2012; Vanucci et al., 2012; Pezzolesi et al., 2014; Carnicer et al., 2016b; Pezzolesi et al., 2016; Mendes et al., 2017**). Taken together, these past and present results suggest that OVTX profiles may be constitutive, as neither abiotic nor biotic factors studied so far modify them, although this hypothesis requires further investigation.

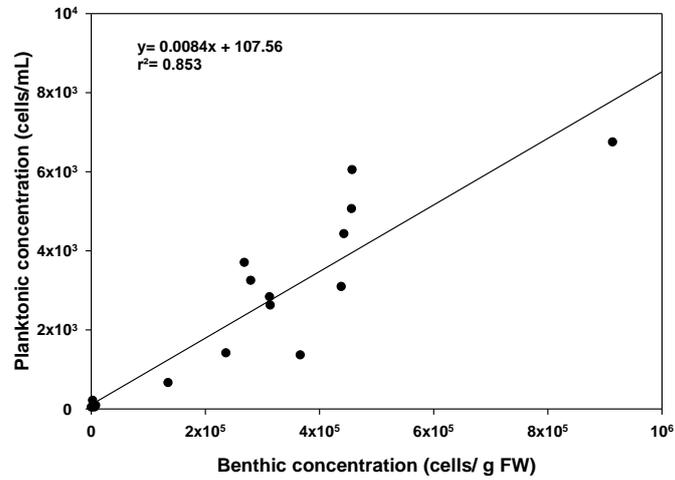
5. Conclusion

The present study confirmed the seasonal pattern of recurrent *Ostreopsis* blooms in the NW Mediterranean area even though the bloom of 2017 in Rochambeau appeared earlier, with a proliferation from the end of June to August in 2017. Cells collected using artificial substrates accumulated OVTXs during exponential and stationary phases of the bloom. Concerning the effect of depth, *Ostreopsis* mainly grows in shallow areas with a highest toxin content near the surface. The comparison of macroalgae highlighted that when monitoring a bloom, a change in macroalgal substrate (e.g., due to disappearance or mortality) may have a significant impact on both cellular

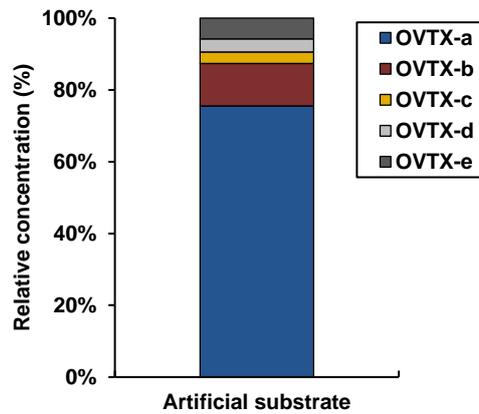
abundance and OVTX content, with up to a six-fold change observed in this study. Alternatively, the deployment of artificial substrates proved to be a highly robust and representative method for bloom monitoring (**Jauzein et al., 2018**) and for total toxin content analysis in this study. Overall, relative proportions of each analogue seemed not to be affected by the bloom phase, depth or macroalgal substrate, suggesting that OVTXs might be constitutive.

Further investigations will be needed to understand the influence of macroalga species on toxin content and to evaluate the risk arising from different macroalgal assemblages in the Mediterranean Sea. Moreover, the present work provides new toxin content data depending on the bloom phase that may help decision-makers make better assessments of exposure-derived risks during blooms that coincide with the tourist season.

6. Supplementary data



Annex 3 : Linear regression between mean of benthic and planktonic abundances of cells sampled on site A, B and C in Rochambeau.



Annex 4 : Relative concentration (%) of OVTX-a to -e for cells collected on artificial substrates (isob-PLTX and OVTX-f < LOD).

Chapter 3 - Combined effects of temperature and light
intensity on growth, metabolome and ovatoxins
content of *Ostreopsis* cf. *ovata* strain from the
Mediterranean Sea

Abstract

Ostreopsis cf. ovata is benthic toxic dinoflagellate spreading yearly along the Mediterranean coasts. This dinoflagellate is known to produce ovatoxins, analogue of the most potent and non proteic palytoxin from the soft coral *Palythoa*. Blooms of *O. cf. ovata* have been related to human illness and unhabitual mortality of marine organisms in Mediterranean area. The proliferation in this temperate area has been linked to global changes and its consequences with the increase of temperature, salinity and high light intensities. In the present study, a specific experimental design was performed to investigate the combined effect of temperature and light intensity on *O. cf. ovata* growth, OVTX content and metabolome using a strain from Villefranche-sur-Mer (NW Mediterranean Sea, France) previously acclimated. The highest growth rates were obtained under 400 and 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and especially at 27 °C where the maximum values were obtained (0.48 d^{-1}). The maximum OVTX contents were obtained at 23 °C whereas no significant effect of light intensity was measured. In a context of global changes, those results suggest that the increase of temperature could favour the proliferation of less toxic cells. But, this assumption still limited to the laboratory study and to the strain tested herein. Metabolomic analyses performed by LC-HRMS highlighted a clear effect of temperature showing two different strategy of acclimation to suboptimal temperatures. Metabolomic changes have been observed at low light intensity in contrast to intermediate and high light. Finally, significant features depending of temperature and/or light conditions were discussed. This study also highlights that such non-model organisms lack from metabolome data, which impairs data interpretation. This points out the need for studying in depth toxic dinoflagellates metabolome to better understand and anticipate their behaviour.

1. Introduction

Ostreopsis is a benthic dinoflagellate originally found in tropical areas that is spreading in higher latitudes, as observed on the Mediterranean coasts (Shears and Ross, 2009; Rhodes, 2011) where *Ostreopsis cf. ovata*, *O. cf. siamensis* and *O. fattorussoi* have been reported so far (Penna et al., 2010; Mangialajo et al., 2011; Accoroni et al., 2016). Global changes are considered as contributing factors to the likely expansion of harmful algal blooms (HABs), including for toxin-producing species of *Ostreopsis* (Aligizaki, 2009; Hallegraef, 2010; Anderson et al., 2012; Botana, 2016; Tester et al., 2020).

Ostreopsis cf. ovata is a species known to produce analogues of the palytoxin (PLTX), including isobaric-palytoxin (isob-PLTX) and ovatoxins (OVTX-a to-l) (Ciminiello et al., 2008; Ciminiello et al., 2010; Ciminiello et al., 2012d; Brissard et al., 2015; García-Altres et al., 2015; Tartaglione et al., 2017). These polyketides are supposed to be linked to the symptoms (e.g. cough, dyspnea, fever, skin irritation) observed in humans (Tichadou et al., 2010; Illoul et al., 2012) especially since they were detected in aerosols (Ciminiello et al., 2014). Despite a recent study (Poli et al., 2018) reported the toxic potent of OVTX-a in aerosols on rats (i.e. LD₅₀ = 0.031 µg/kg), the correlation between respiratory symptoms and toxins still to be proved.

Ostreopsis can also affect marine organisms as abnormal mortalities were observed *in situ* (Ciminiello et al., 2006; Vila et al., 2008; Shears and Ross, 2009; Accoroni et al., 2011; Illoul et al., 2012; Vila et al., 2012) while lab-studies showed some reprotoxic effect, mortalities, inflammatory responses, on mussels, fishes, crustaceans and echinoderms (Pezzolesi et al., 2012; Privitera et al., 2012; Carella et al., 2015; Neves et al., 2018; Pavaux et al., 2019).

Hitherto, many studies in relation with the global change reported contrasting results about the effect of light, temperature, salinity or nutrients on the growth and OVTX production of *O. cf. ovata* (Accoroni and Totti, 2016; Tester et al., 2020). *Ostreopsis cf. ovata* is blooming yearly during warm period along the Mediterranean coasts (Mangialajo et al., 2008; Pfannkuchen et al., 2012; Cohu et al., 2013; Accoroni et al., 2015a; Vila et al., 2016). Consequently, the sea temperature is suggested to be one of the most important factor triggering the bloom development (Totti et al., 2010; Accoroni et al., 2015a). However, there is no consensus in the literature, and the role of temperature is not fully understood yet. Indeed, in laboratory studies, *O. cf. ovata* strains from the Mediterranean Sea seemed to tolerate temperatures between 15 and 30 °C but exhibited different optima for growth varying from

20 (Pezzolesi et al., 2012) to 30 °C (Granéli et al., 2011; Vidyarathna and Granéli, 2013) and the temperature was not always significant (Pezzolesi et al., 2012; Carnicer et al., 2016b).

Blooms are reported to occur mainly between 15 and 30 °C, reflecting lab-studies (Mangialajo et al., 2008; Totti et al., 2010; Cochu et al., 2011; Mangialajo et al., 2011; Asnaghi et al., 2012; Ismael and Halim, 2012; Cochu et al., 2013; Brahim et al., 2015). On a more regional scale, the highest abundances were observed when temperature was above 22 °C in Ligurian Sea (Mangialajo et al., 2008; Mangialajo et al., 2011; Cochu et al., 2013; Meroni et al., 2018), 26 °C in Aegean Sea (Aligizaki and Nikolaidis, 2006), 25 °C on Catalan coast (Mangialajo et al., 2011; Carnicer et al., 2015a) or 20 °C in Adriatic Sea (Totti et al., 2010; Accoroni et al., 2011; Pfannkuchen et al., 2012). Accoroni et al. (2015a) conceived a model in which temperature in the Adriatic Sea should exceed 25 °C for cyst germination, then the bloom can proliferate but maximum abundances can still be observed at lower temperatures (< 20 °C). Finally, in some field studies, the temperature was correlated to the cell abundances (Mangialajo et al., 2011; Cochu et al., 2013) and conversely, no clear effect was reported in some others (Totti et al., 2010; Cochu et al., 2011).

As for growth, temperature seems to influence toxin production without any clear pattern, with highest toxicity, measured by haemolytic test, recorded at 20 and 30 °C for Adriatic strains (Granéli et al., 2011; Vidyarathna and Granéli, 2013) and 28 °C for Balearic strains (Carnicer et al., 2016b) and highest OVTX content, measured by liquid chromatography coupled to a mass spectrometer (LC-MS/MS), recorded at 25 °C for an Adriatic strain (Pezzolesi et al., 2012). In contrast to those studies, a Japanese strain did not show any optimal temperature for haemolytic activity (Vidyarathna and Granéli, 2012). The variability of toxicity depending on the temperature could be related to genetic variations between strain from different clade (e.g. Mediterranean/Atlantic vs. Indo-Pacific) as explained by Vidyarathna and Granéli (2012) or intraspecific variations (Guerrini et al., 2010). Monitoring studies focus their works on the evolution of abundances but did not take into account toxin content. Even if, Accoroni et al. (2017a) measured a positive correlation between temperature and toxin content with the maximum reached at 27 °C, it is difficult to assess the effect of temperature on toxin content during a bloom and especially since Pfannkuchen et al. (2012) did not measured any significant change during the bloom and indirectly through the evolution of temperature.

Among the effect of environmental factors on growth and toxicity, light intensity was surprisingly overlooked despite that highest abundances of *O. cf. ovata* were observed at relatively low depth where the light intensity is high (Totti et al., 2010; Cochu and Lemée, 2012; Brissard et al., 2014; Tibirićá et al., 2019; Gémin et al., 2020) in contrast to *Gambierdiscus* (Tester et al., 2020) or *Prorocentrum* which are found deeper (Boisnoir et al., 2018). *In vitro*, the effect of light intensity on growth of *O. cf.*

ovata and OVTX content is still unclear since authors found no clear pattern between 50 and 650 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Monti and Cecchin, 2012; Scalco et al., 2012). Toxin content depending on the light intensity did not investigated deeply. Unfortunately, even if Scalco et al. (2012) measured toxin content depending on temperature and photoperiod, they did not investigated effect of light intensity.

In batch cultures, variations of toxin content depending on the growth phase were observed and globally a higher toxin content was reached during the stationary phase (Guerrini et al., 2010; Vanucci et al., 2012; Brissard et al., 2014). However, this cannot be generalized as some studies reported no clear differences between the exponential and stationary phases (Nascimento et al., 2012a; Scalco et al., 2012; Mendes et al., 2017). On field studies, it has been shown by Gémin et al. (2020) that OVTX content increase during both exponential and stationary phases of the bloom as in previously cited lab works, whereas Accoroni et al. (2017a) measured the highest OVTX content in cell before the bloom peak. In contrast to those results, Pfannkuchen et al. (2012) did not highlighted any significant change in toxin content during the whole bloom period. Those results suggest that toxin production on field still not fully understood and other factor as nutrient could be involved in toxin production (Pezzolesi et al., 2016).

Metabolomics is a useful and valuable tool to get a fingerprint of a large set of relatively small metabolites (as much comprehensive as possible) affected by the environmental changes in any organism (Fiehn, 2002; Rochfort, 2005; Bundy et al., 2008; Dayalan et al., 2019). Among the different techniques available, LC-MS offers an interesting sensitivity and resolution (Theodoridis et al., 2012; Viant and Sommer, 2012). Liquid chromatography high resolution mass spectrometry (LC-HRMS) based metabolomic approaches on microalgae have already been used successfully to investigate the effect of environmental parameters such as salt (Georges des Aulnois et al., 2019; Georges des Aulnois et al., 2020), acidification (Jiang and Lu, 2019) or nitrogen deprivation (Vello et al., 2018). In the literature, the effects of environmental factors on *Ostreopsis* were restricted to growth, cell abundance, biovolume and chlorophyll, carbohydrate, carbon, nitrogen, phosphorus and OVTX content, while no attention has been paid to the metabolic changes occurring within the cells. Moreover, application of metabolomics in dinoflagellates studies still very new and data on the impact of environmental parameters on the metabolome are scarce (Bi et al., 2019).

Several laboratory studies (i.e. Granéli et al., 2011; Pezzolesi et al., 2012; Vidyarathna and Granéli, 2012; Vidyarathna and Granéli, 2013) did not performed (or mentioned) any acclimation before to perform their experiments on the effect of environmental parameters, thus their results corresponded to stress-response. It seems more appropriate to pre-acclimate cells before assessing the effects of any parameter in the context of global changes. In this study, we performed an experimental design

to gain insight into the cellular physiology and toxicity depending on the temperature and light intensity on acclimated cells of *O. cf. ovata*. Moreover, an LC-HRMS based metabolomic approach was performed to study the effects of both environmental factors on the endo-metabolome of this benthic dinoflagellate. Such approach is useful to highlight metabolites differentially expressed according to the different factors, in an attempt to better understand the acclimation processes.

2. Materials and methods

2.1 Culture conditions, acclimation and experimental setup

The *Ostreopsis cf. ovata* strain (MCCV54) was isolated in 2014 at Villefranche-sur-Mer, France, NW Mediterranean Sea and routinely cultivated in L1 medium (**Guillard and Hargraves, 1993**) without silicate (L1-Si, salinity 38), at 27 °C and 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ under a 14:10 h light:dark cycle. Before conducting the experiments, cells were acclimated at the 3 temperatures (23, 27 and 30 °C) combined with the 3 light intensities (200, 400 or 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). It should be noted that we could not acclimate cells at 31 °C, thus we chose 30 °C as the higher temperature level.

For acclimation, 3 glass Fernbachs containing 0.5 L of L1-Si medium were inoculated with 1.0×10^5 cells. Sub-samples were collected after 5 and 10 days of growth for counting. Cultures were kept in semi-continuous mode and considered acclimated after 3 consecutive stable growth rates (tolerance of $\pm 10\%$) were obtained (**Wood et al., 2005**). The acclimation process required approximately 2 months per condition. To conduct the experiments, plastic flasks of 75 cm² (Cell Bind, Corning) containing L1-Si medium were inoculated with 4.0×10^4 previously acclimated cells (final volume 100 mL). For each temperature-light intensity combination, 15 flasks were used while 3 were harvested at each sampling time (after 6, 10, 14, 18 and 21 days of growth) (Annex 5 page 108).

The entire flask was collected, 5 mL were taken to carry out counting while the remaining volume was centrifuged (2000 g, 10 min, room temperature). The cell pellet was used for both LC-MS/MS analysis of OVTXs and LC-HRMS metabolomics. The supernatant was filtered on 0.2 μm for nutrient analyses. Cell counting was performed directly after sampling while all other samples were stored at -20 °C until analysis.

2.2 Analyses

2.2.1 Cell counting and growth rate

Before counting, samples were treated with hydrochloric acid at a final concentration of 6.4 mM to dissolve the mucus aggregates (**Brissard et al., 2014**). Cell concentration was obtained with a Coulter counter (Multisizer 3, Beckman). Growth rate was calculated with the following equation:

$$\mu = \frac{\ln N_1 - \ln N_2}{t_2 - t_1}$$

where N_1 and N_2 were the number of cells at the day t_1 and t_2 during the exponential growth phase.

2.2.2 Extraction of cells for OVTX analysis

Cell pellets were extracted with MeOH 100% (ratio: 1.33 mL/ 10^6 cells) in an ultrasonic bath (Transsonic TI-H-15, Elma) for 20 min at 45 kHz. Extracts were centrifuged (4000 g, 5 min), ultrafiltered (8000 g, 30 s, 0.2 μ m, modified nylon, Nanosep MF, Pall) and stored in polypropylene tubes at -20 °C until LC-MS analyses.

2.2.3 Photosynthetic efficiency (Fv/Fm)

The maximum quantum yield of photosystem II was measured by pulse amplitude modulation fluorometry using an Aquapen-C-AP-C-100, (Photon Systems Instruments), after incubating samples for 15 min in the dark, followed by a quick manual agitation.

2.2.4 Bacteria enumeration

Samples were fixed with glutaraldehyde (0.1% final volume) and stored at -20 °C. Before enumeration, 1 μ L of Tween80 was added with 200 μ L of pyrophosphate sodium buffer (10 nM) and 800 μ L of sterilised sea water. Samples were sonicated 3 min then put in ice for 15 min. SYBR green (1000 X, Invitrogen) was added to the sample for final concentration of 10 X then put into the dark for 15 min at room temperature. Bacteria were enumerated by using flow cytometer BD-Accury C6 (Becton Dickinson).

2.2.5 Nutrients analysis

Nitrate, nitrite, ammonium and phosphate concentrations were determined by using segmented flow analysis, following the methods described in **Aminot et al. (2009)**.

2.2.6 LC-HRMS analyses for metabolomics

Metabolomic profiles were acquired by Ultra-high-pressure Liquid Chromatography – High Resolution Mass Spectrometry (UHPLC-HRMS), based on **Georges des Aulnois et al. (2019)**, with slight modifications. Briefly, the instrumentation consisted of a UHPLC system (1290 Infinity II, Agilent) coupled to a quadrupole-time of flight mass spectrometer (QTOF 6550, Agilent) equipped with a Dual Jet Stream electrospray ionization (ESI) interface. The analytical column was a core-shell Kinetex C₁₈ (100 x 2.1 mm, 1.7 μm, Phenomenex) with a suited guard column. Mobile phases consisted of water (A) and acetonitrile/water (95:5, v:v) (B), both containing 2 mM ammonium formate and 50 mM formic acid. The flow rate was 0.4 mL min⁻¹ and the injection volume were 5 μL. The following elution gradient was used: 5% B (0-1 min), 5-100% B (1-11 min), 100% B (11-13 min), 5% B (13-18 min). Mass spectra were recorded in both positive and negative full-scan modes from *m/z* 100 to 1700 (500 ms scan time) at a mass resolving power of 25 000 full-width at half-maximum (fwhm, *m/z* = 922.0099) and an acquisition rate of 2 spectra s⁻¹. Auto-MS/MS data were acquired as in **Georges des Aulnois et al. (2019)**, on the 3 most intense ions above an absolute threshold of 2000 counts.

A quality control sample (QC) was prepared by pooling all samples and injected ten times at the beginning of the batch sequence and then every ten samples (including blank), and all samples were injected randomly. Blanks were prepared as cell pellets. Data were deposited on DATAREF.

Raw data were converted into .mzxml format by using MS-Convert (Proteowizard 3.0, **Chambers et al. (2012)**). Automatic feature detection was performed between 0.5 and 14 min with MZmine 2.53 software (**Pluskal et al., 2010**) using parameters optimised specifically for the used LC-HRMS method and described below. The Chromatogram builder step was achieved with ADAP algorithm (**Myers et al., 2017**) using appropriate parameters: Min group size 5 scans, *m/z* tolerance 30 ppm, intensity threshold 5×10^5 or 1×10^4 counts for positive ions (PI) and negative ions (NI), respectively, and a Min highest intensity of 3.5×10^3 or 1×10^3 counts PI and NI, respectively. The Chromatogram deconvolution step was achieved with ADAP algorithm (**Myers et al., 2017**) using appropriate parameters: *s/n* 10, features height 5×10^5 or 1×10^4 counts for PI and NI, respectively, coef. 15, peak duration between 0.05 and 1.0 min and RT wavelet between 0 and 0.02. Deisotope filtering was applied using the “isotopic peaks grouper” module with tolerance parameters adjusted to 0.05 min and 30 ppm. Feature alignment and gap filling were achieved with a *m/z* tolerance of 30 ppm and a RT tolerance of 0.2 min. The features detected from blank extraction samples were removed by using a 2-fold-intensity threshold and a significant *p*-value (≤ 0.05) based on a student test. The analytical drift was corrected using the QC sample with the statTarget algorithm (**Luan et al., 2018**). Finally, the LC-HRMS data matrix was obtained by direct concatenation of both PI and NI data, which correspond to

low-level data fusion (Castanedo, 2013; Boccard and Rudaz, 2014). This data processing allowed to extract 8246 compounds in negative and 711 in positive mode.

2.2.7 LC-MS/MS quantification of ovatoxins

Quantification of toxins (isob-PLTX, OVTX-a, -b, -c, -d, -e and -f) was performed as in Gémin et al. (2020). Briefly, the LC system (UFLC XR, Shimadzu) was coupled to a hybrid triple quadrupole/linear ion-trap mass spectrometer (API 4000 Qtrap, AB SCIEX) equipped with an ESI turbospray interface. Positive ion mode with MRM (Multiple Reaction Monitoring) acquisition were used and the ions $[M+2H]^{2+}$, $[M + 2H - H_2O]^{2+}$ and $[M + 3H - H_2O]^{3+}$ were researched. Elution was performed through a Poroshell 120 EC-C₁₈ column (100 x 2.1 mm, 2.7 μ m, Agilent) kept at 25 °C with a 0.2 mL/min flow rate. The mobile phases were water (A) and acetonitrile/water (95:5, v/v) (B) both containing 0.2% of acetic acid. Gradient was 28-29% B over 10 min, 29-30% B over 5 min, 30-100% B for 1 min and maintained 5 min, then 100-28% B over 1 min, held 4 min for equilibration. Injection volume was 5 μ L. Results are expressed in PLTX equivalent due to use of Palytoxin standard (Wako Chemicals GmbH, Neuss), assuming similar molar response between OVTXs and PLTX.

2.3 Statistical analysis

SigmaPlot 14.0 software was used to perform statistical analyses. Normality and homoscedasticity were ascertained by the Shapiro-Wilk and Brown-Forsythe tests. Comparison of the maximum cell concentrations was performed by a one-way ANOVA while growth rates and maximum toxin contents were compared using two-way ANOVA. The post hoc Tukey test was used for all pairwise comparisons. The statistical analyses of the experimental plan were ascertained with an ANOVA performed using Statgraphics 18 software.

For metabolomics, variance decomposition (ANOVA) of the LC-HRMS data matrix was achieved using R version 3.5.1 (CRAN) (R Core Team, 2019) and the lmdme package (Fresno et al., 2014). The resulting decomposed matrixes were further analysed by principal component analysis (PCA) and orthogonal projection of latent structures discriminant analysis (OPLS-DA) using the ropls package (Thévenot et al., 2015) and Unit Variance (UV) scaling (van den Berg et al., 2006). Features were selected based on the variable importance in projection (VIP) score (VIP > 1.5). The feature selection using multiple OPLS-DA models was achieved and visualised by a SUS-plot (share and unique structure plot) (Wiklund et al., 2008).

2.4 LC-HRMS feature annotation

The feature annotation was achieved according to traditional strategy for HRMS (Wolfender et al., 2019). The GNPS spectral database was used for annotation of MS/MS spectra available (Wang et al., 2016; Aron et al., 2019) providing Level 2 of identification confidence based on the Metabolomic Standard Initiative (Sumner et al., 2007a). High accuracy MS spectra were also used to identify compounds using the Lipid Maps database (O'Donnell et al., 2019), providing Level 3 of identification confidence.

3. Results

3.1 Growth pattern

Mean maximum cell concentrations at 27 °C were significantly higher than at 23 and 30 °C (one-way ANOVA, p -value < 0.05, Figure 17) under the three irradiances. At all tested temperature, intermediate and high light intensities (400 and 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectively) did not showed any significant effect on maximum cell concentration (one-way ANOVA, p -value < 0.05). At 30 °C and 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mean maximum cell concentration ($4.5 \pm 1.3 \times 10^6$ cells/L) was significantly lower than at 400 and 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ followed by cell concentration at 23 °C at 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($2.3 \pm 2.4 \times 10^6$ cells/L). Maximum cell concentrations were reached at 27 °C and especially under 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($6.4 \pm 0.23 \times 10^7$ cells/L).

Chapter 3 - Combined effects of temperature and light intensity on growth, metabolome and ovatoxins content of *Ostreopsis cf. ovata* strain from the Mediterranean Sea

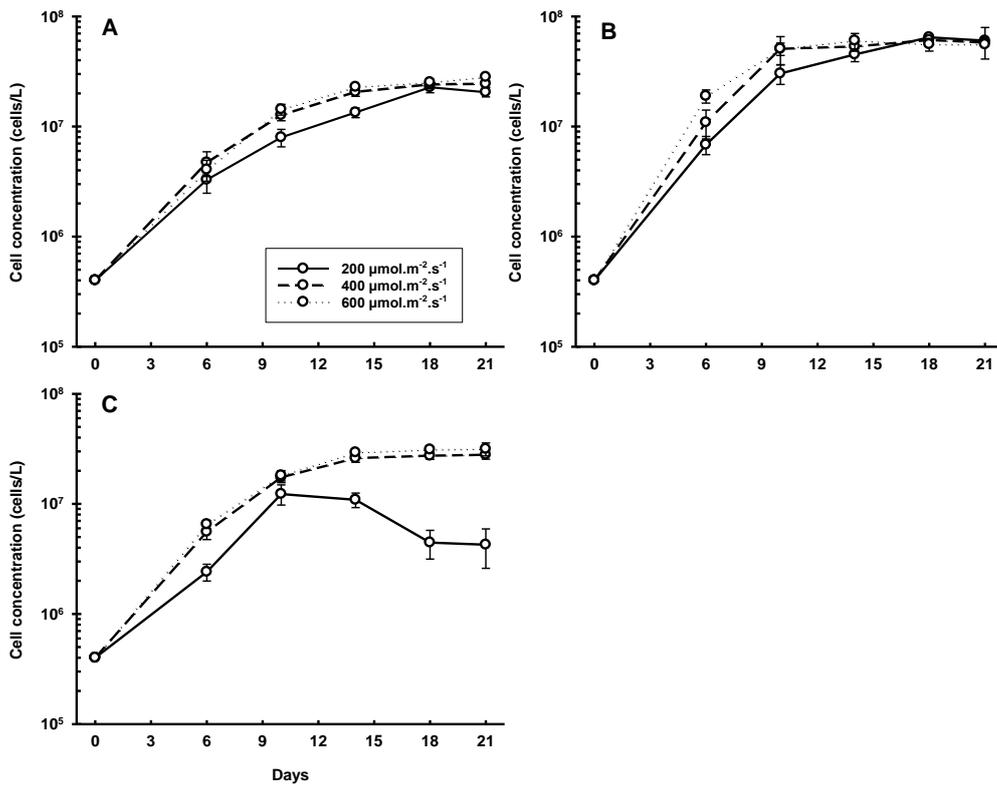


Figure 17: Growth patterns of acclimated cultures of *O. cf. ovata* (MCCV54) at 23 (A), 27 (B), 30 °C (C) and 200 (solid), 400 (dashed), 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (dotted lines). Error bars represented the standard deviation (n = 3).

In general, the exponential growth phase was maintained for 10 days, then cells entered in stationary phase due to nutrient depletion (Annex 6C page 109), until the end of the experiment. Surprisingly, a senescence phase was only observed at 30 °C – 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, after 14 days of growth (Figure 17) without any complete nutrient depletion.

The highest growth rates were obtained at 27 °C, irrespective of the irradiance (Figure 18). At 27 °C, maximum growth rates were obtained at 400 and 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($0.48 \pm 0.01 \text{ d}^{-1}$ and $0.48 \pm 0.03 \text{ d}^{-1}$). In contrast, for each temperature, growth rates were significantly lower at 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and the lowest was obtained at 23 °C – 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($0.3 \pm 0.02 \text{ d}^{-1}$).

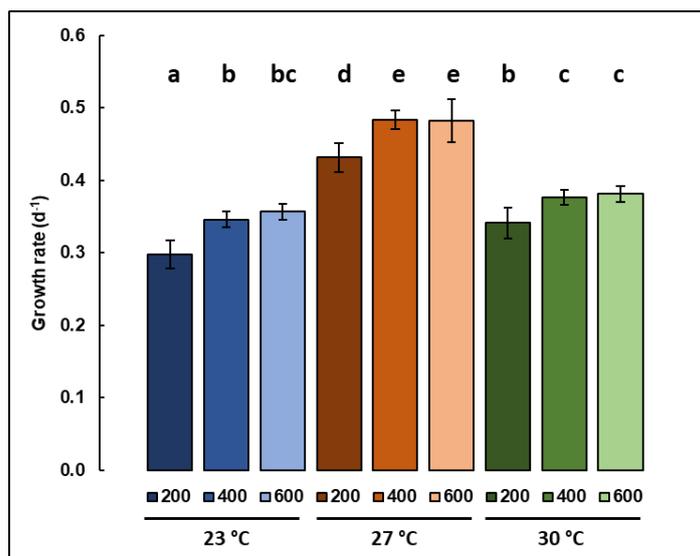


Figure 18 : Growth rates of *O. cf. ovata* (MCCV54) at the different temperatures (23 °C, 27 °C, 30 °C) and irradiances (200, 400, 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). No significant difference was found between values with the same letters (two-way ANOVA p -value < 0.05).

3.2 Metabolomics analyses

3.2.1 Effect of temperature, light intensity and time of growth on global *O. cf. ovata* metabolome

To evaluate data consistency and the overall organisation of the dataset, an unsupervised multivariate principal component analysis (PCA) was first performed (Annex 7 page 110). The first two components of the PCA accounted for 27% of the variability (16.4% for PC1 and 11.1% for PC2). However, no well-defined clusters of the samples were noticeable according to light, temperature or growth time.

To highlight metabolic trends associated to the three different factors, the concatenated data matrix was analysed by ANOVA-PCA (Harrington et al., 2005; de Haan et al., 2007). Such an approach allows to consider the specific experimental design within a more traditional metabolomics data analysis (Boccard and Rudaz, 2014), providing a visualisation of the decomposed variance of each specific factor. As an example, Figure 19A corresponded to the loading plot of all samples focusing on the effect of temperature variation on the metabolome of *O. cf. ovata*; the trends associated to light and growth time being excluded.

Chapter 3 - Combined effects of temperature and light intensity on growth, metabolome and ovatoxins content of *Ostreopsis cf. ovata* strain from the Mediterranean Sea

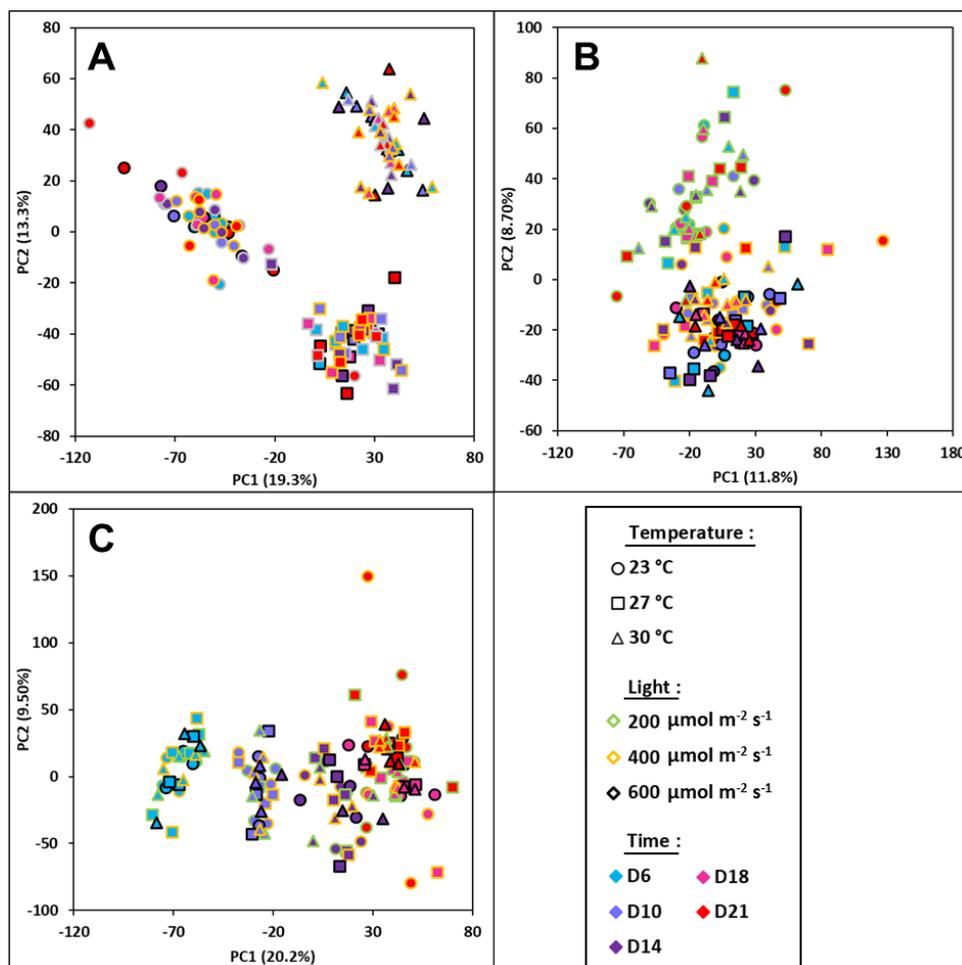


Figure 19 : ANOVA-PCA (UV scaling) from LC-HRMS data corresponding to *Ostreopsis cf. ovata* cultivated at 23, 27, 30 °C, under a light intensity of 200, 400 and 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and after 6, 10, 14, 18 and 21 days of growth. The loading plots represented the specific effects of temperature (A), light intensity (B) and time of growth (C).

Regarding temperature, Figure 19A showed a clear clustering with a non-linear response associated to a temperature increase. Indeed, within the specific ANOVA-PCA, samples at 27 °C were not located between those growing at 23 °C and 30 °C. Interestingly, the low temperature (23 °C) growth effect was observed along PC1 (19.3%) while the effects of 27 and 30 °C were separated along PC2 (13.3%).

Concerning the effect of light intensity (Figure 19B), the ANOVA-PCA (PC1 and PC2 explained 11.8 and 8.7% of the variability) showed a clear linear distribution along the PC2 according to the irradiance levels; with the low irradiance (200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) cluster (outlined in green) in the higher part of the ANOVA-PCA (Figure 19B) and the cluster of both intermediate (400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, outlined in yellow) and high (600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, outlined in black) irradiances in the bottom part. Even if intermediate and high irradiances were not well separated, a clear trend located the intermediate light intensity between the low and high intensities.

Regarding the growth time effect (Figure 19C), ANOVA-PCA showed a horizontal linear distribution along the PC1 (20.2%) with an additional separation trend along PC2 (9.5%) for samples corresponding to latter growth time (i.e. 18 and 21 days of growth). As expected, time of growth shows a linear response and that distribution is typical of time effect in PCA (**Roullier et al., 2016**) and reflects metabolic dynamics in relation to compound disappearance and accumulation within *O. cf. ovata* cells.

3.2.2 Specific features impacted by temperature and light intensity modification

To determine features characteristic of the modifications associated to light intensity and temperature, a supervised strategy corresponding to ANOVA-OPLS was adopted (**Boccard and Rudaz, 2016; Rådjursöga et al., 2019**). Two ANOVA-OPLS models were constructed, focusing on either temperature (Figure 20A) or light intensity (Figure 20B). From these two models, a share and unique structure plot (SUS plot) (**Wiklund et al., 2008**) was constructed (Figure 20C) to reveal features commonly or specifically related to modifications of light intensity, temperature or both. Such features are located in the extreme top, bottom, left and right location in the case of high irradiance, low irradiance, low temperature and high temperature, respectively. In addition, features located in the corners are considered to be altered by both effects; top left, top right, bottom left and bottom right corners corresponding to features related to high irradiance and low temperature, high irradiance and high temperature, low irradiance and low temperature, low irradiance and high temperature, respectively.

Chapter 3 - Combined effects of temperature and light intensity on growth, metabolome and ovatoxins content of *Ostreopsis cf. ovata* strain from the Mediterranean Sea

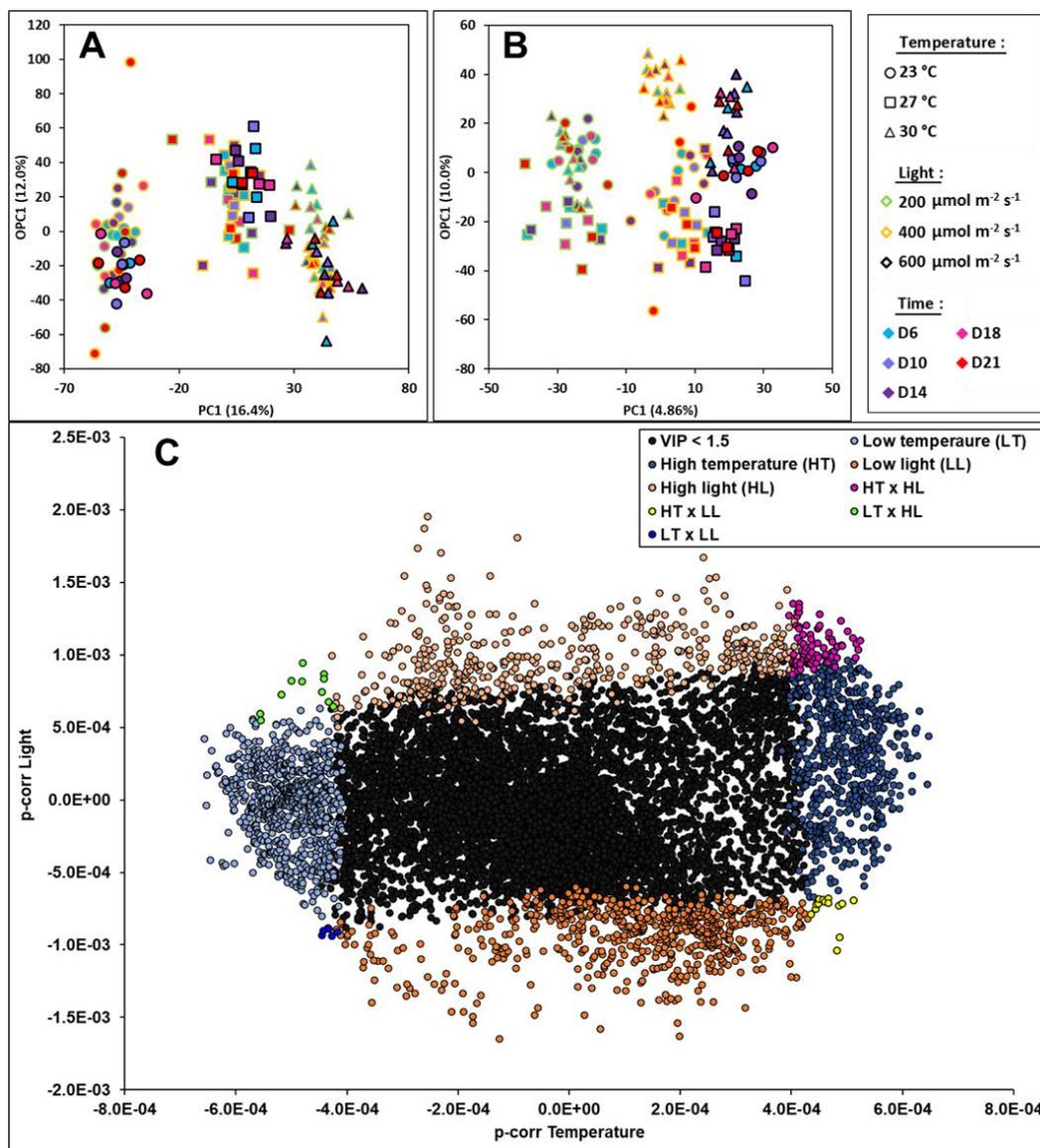


Figure 20 : ANOVA-OPLS from LC-HRMS data corresponding to *Ostreopsis cf. ovata* cultivated at 23, 27, 30 °C, under a light intensity of 200, 400 and 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and after 6, 10, 14, 18 and 21 days of growth. The loading plots represented the ANOVA-OPLS models of temperature (A, $R^2 = 0.97$, $Q^2 = 0.95$) and light intensity (B, $R^2 = 0.91$, $Q^2 = 0.80$). A share and unique structures plot (SUS-plot, C) highlight features with VIP (Variable Importance in Projection) ≥ 1.5 according to both models. Temperature is represented on the X-axis and the light intensity on the Y-axis.

Based on both ANOVA-OPLS models, features of interest were selected using a VIP value higher than 1.5 in the SUS-plot (Figure 20C). Finally, 8.3% and 7.7% (746 and 692 compounds) of the features were affected at low and high temperature, respectively, 7.1% and 6.2% (632 and 552 compounds) under low and high light intensity, and 1.3% (115 compounds) of all overexpressed compounds were shared by the combination of low/high temperature and low/high light intensity (see details in Annex 8 page 110). Most of these 115 features corresponded to high light intensity in combination to high temperature as only 27% were characteristic of the other temperature – light associations.

Chapter 3 - Combined effects of temperature and light intensity on growth, metabolome and ovatoxins content of *Ostreopsis cf. ovata* strain from the Mediterranean Sea

3.2.3 Putative identification of compounds depending on the temperature and/or light intensity

All highlighted features were tentatively identified based on MS and MS/MS spectra (**Wolfender et al., 2019**) and those putatively identified are presented in Table 1.

Table 1 : List of putatively identified features with VIP value > 1.5 according to both ANOVA-OPLS models. Putative identification (ID) was achieved using the GNPS database when MS/MS data were available (level of confidence: 2) and Lipid Maps otherwise (level of confidence: 3). Levels of confidence were defined according to the Metabolomic Standard Initiative (Sumner et al., 2007a).

Ret. time (min)	m/z	Score SUS Temperature	Score SUS Light	Adduct	Putative ID	Family	Level of confidence
Low temperature (LT)							
10.92	975.5367	-5.49E-04	-8.20E-06	[M+Fa-H] ⁻	DGDG (18:5/18:4)	Glycerolipids	3
10.24	901.6314	-5.26E-04	-4.86E-05	[M-H] ⁻	Fucoxanthinol 3-arachidonate	Carotenoids	3
10.96	969.5287	-5.23E-04	2.90E-04	[M+Fa-H] ⁻	Oscilloid diglycoside (Oscillaxanthin)	Carotenoids	3
8.77	474.342	-4.73E-04	-2.06E-04	[M+Na-2H] ⁻	LysoPE (16:0)	Glycero-phospholipids	2
8.42	478.294	-4.15E-04	-1.97E-04	[M-H] ⁻	LysoPE (18:1)	Glycero-phospholipids	2
Low light (LL)							
11.67	600.4660	4.31E-05	-1.09E-03	[M-H] ⁻	Sulpho Cer(18:1/16:0)	Sphingolipids	3
9.56	275.2	9.65E-05	-8.38E-04	[M-H] ⁻	Stearidonic Acid (18:4(n-3))	Fatty Acyls	2
High light (HL)							
0.73	219.0133	-1.15E-04	8.67E-04	[M-H] ⁻	2-hydroxy-4-oxobutane-1,2,4-tricarboxylic acid	Fatty Acyls	3
9.19	465.3058	-2.14E-04	1.42E-03	[M-H] ⁻	Cholesterol sulfate	Sterol Lipids	3
High temperature (HT)							
11.64	592.4349	4.51E-04	7.13E-04	[M-H] ⁻	LysoPE (methoxy-25:1)	Glycero-phospholipids	3
8.34	452.278	4.55E-04	4.22E-04	[M-H] ⁻	LysoPE (16:0)	Glycero-phospholipids	2
10.43	303.2512	4.59E-04	2.44E-04	[M-H] ⁻	MG (OH-14:0)	Glycerolipids	3
High temperature and high light (HT x HL)							
11.33	743.4042	4.11E-04	1.12E-03	[M+Fa-H] ⁻	PI (24:0)	Glycero-phospholipids	3

The selected features contain mainly lipids. Among all features, lysophosphatidylethanolamines (LysoPE 16:0, LysoPE 18:1) and stearidonic acid (18:4(n-3)) (**Leblond and Chapman, 2000**) corresponded to the significant features putatively identified based on exact mass and MS/MS data available in database (Level of confidence 2 (**Sumner et al., 2007b**)). As a complement, some of the highlighted features were also putatively identified based on high mass accuracy and biological source information available from the literature (Level of confidence 3 (**Sumner et al., 2007b**)).

Five features have been putatively identified under low temperature (LT) and containing two carotenoids: fucoxanthinol 3-arachidonate (**Takaichi, 2011; Zapata et al., 2012; Bjørnland et al., 2003**) and oscillol diglycoside (oscillaxanthin) (**Rønneberg et al., 1980; Hickman and Schweger, 1991;**

Takaichi and Mochimaru, 2007). Among other features, two were detected at low (LL) and high light intensity (HL) then, three at high temperature (HT). Finally, one feature was identified with VIP > 1.5 in a combination of high temperature and high light intensity (HT × LT).

3.3 Intracellular OVTX content

The total OVTX content (here sum of OVTX-a to -e) was quantified by LC-MS/MS and represented on a per cell basis (Figure 21) and on a cell biovolume basis (Annex 9 page 114). Only temperature and time had a significant effect on OVTX content (ANOVA, p -value < 0.01) while neither light nor temperature/light interaction were significant (ANOVA, p -value = 0.38 and p -value = 0.93 respectively).

Two-way ANOVA revealed that light intensity did not have any significant effect on maximum toxin content (p -value < 0.18) compared to temperature (p -value < 0.001) and that toxin contents were significantly higher at 23 °C in all conditions.

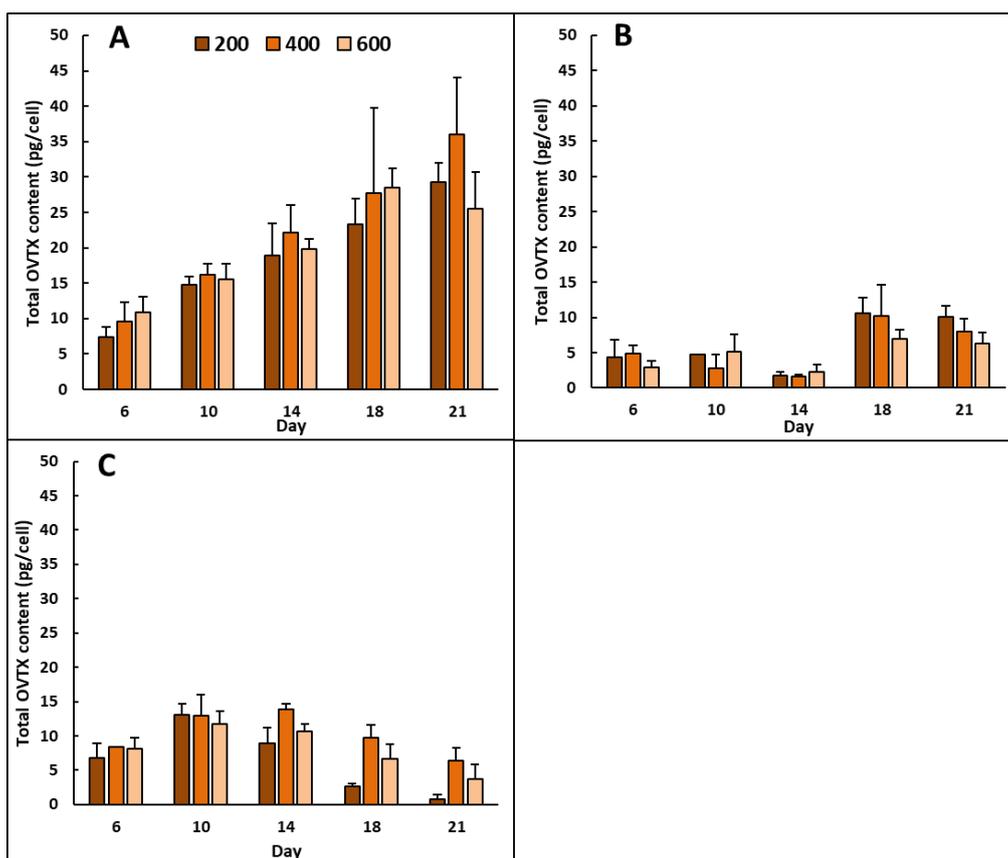


Figure 21 : Total intracellular ovatoxins concentration (pg/cell) measured by LC-MS/MS during the growth at 23 (A), 27 (B) and 30 °C (C) and at 200, 400 and 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

In more details, toxin contents increased significantly with time and the maximum was reached after 18 or 21 days of growth at 23 and 27 °C. The only exception was found at 27 °C – 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

where the maximum toxin content was not significantly higher than at day 6 (One-way ANOVA p -value = 0.12, Annex 10 page 114). However, at 30 °C the maximum was reached earlier, and toxin content was significantly higher after 10 and 14 days of growth at 200 and 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ but not at 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Then, the toxin content significantly decreased until the end of the experiment (Figure 21). Finally, the highest OVTX quota was recorded at 23 °C – 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ with 36 pg cell^{-1} , and the lowest at 27 °C – 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ with 7.0 pg cell^{-1} .

The OVTX profile was not significantly affected by any factor (Annex 13 page 116) and dominated by OVTX-a (57 \pm 6.0%) and OVTX-b (31 \pm 4.0%), followed by OVTX-c (3.5 \pm 0.88%), OVTX-d (3.7 \pm 0.88%) and OVTX-e (4.1 \pm 0.84%).

4. Discussion

4.1 Effect of environmental parameters on growth of *O. cf. ovata*

In the present study, cultures had previously been acclimated before conducting the experiments, thus any observed effect should not reflect a stress response. Change of optimal parameters can disrupt cells functions, metabolism or growth (**Borowitzka, 2018**). Among the studies on the effect of environmental factors, the majority did not mention or use acclimated culture to perform their experiments (**Granéli et al., 2011; Monti and Cecchin, 2012; Pezzolesi et al., 2012; Vidyaratna and Granéli, 2012; Vidyaratna and Granéli, 2013**) in comparison to those doing it (**Scalco et al., 2012; Carnicer et al., 2016b**).

Cells were successfully acclimated at 23, 27 (routine condition) and 30 °C. However, no growth could be observed at 31 °C during the acclimation process, even by applying a progressive acclimation from 27 °C. Similarly, **Scalco et al. (2012)** did not succeed to cultivate and acclimate three Italian strains of *O. cf. ovata* above 30 °C, suggesting that this temperature could be a threshold.

While many other studies on Mediterranean strains observed a growth at 30°C (**Granéli et al., 2011; Pezzolesi et al., 2012; Vidyaratna and Granéli, 2013**), they unfortunately did not test at a higher temperature. Thus, further ecophysiological studies should be performed to confirm this hypothetical threshold for Mediterranean strains of *O. cf. ovata*.

Interestingly, strains from tropical areas seem to endure higher temperatures as **Tawong et al. (2015)** successfully acclimated a Chinese and a Thai strain at 32.5 °C. Authors suggest that the temperature

tolerance depends on the geographical origin of the strains and mirrors the natural conditions. In their case, seawater temperature often reached 32.5 °C in the original tropical areas where their Thai and Chinese strains come from (Tawong et al., 2015). On the contrary, maximum temperature in the Mediterranean Sea rarely exceeds 28 °C (Shaltout and Omstedt, 2014) and *Ostreopsis* cells are barely reported above this temperature (Mangialajo et al., 2011; Accoroni and Totti, 2016) suggesting our strain was not used to growth at temperatures exceeding 30 °C.

The growth rate and maximal abundance of *O. cf. ovata* were clearly affected by the temperature. The optimal temperature for the strain MCCV54 was 27 °C (i.e. maximum abundance and growth rate). At low (23 °C) and high (30 °C) temperatures, maximal density and growth rates were ca. twice and 20-40% lower, respectively. It should be noted that 27 °C is the routine temperature for the maintenance of this strain since it was isolated in 2015. According to Borowitzka (2018) who considered that long-term acclimation could lead to an adaptation of a strain to its new growth conditions, we may adapted the strain MCCV54 to the routine conditions during approximately 3 years and could explain the lower growth rates obtained at 23 and 30 °C.

In the literature, there are discrepancies about the effect of temperature on the growth of *O. cf. ovata*. For example, some authors measured the best growth rate at 20, 26 and 30 °C for Adriatic strains (Granéli et al., 2011; Pezzolesi et al., 2012; Scalco et al., 2012; Vidyarthna and Granéli, 2013), 24 and 28 °C for Catalan strains (Carnicer et al., 2016b) or between 25 and 30 °C for Asian strains (Vidyarthna and Granéli, 2012; Yamaguchi et al., 2012a; Tawong et al., 2015). Moreover, in the Mediterranean area, bloom peaks has been measured between 16 and 29 °C (Mangialajo et al., 2008; Totti et al., 2010; Accoroni et al., 2011; Coahu et al., 2011; Mangialajo et al., 2011; Ismael and Halim, 2012; Coahu et al., 2013; Carnicer et al., 2015a; Abdennadher et al., 2017; Giussani et al., 2017; Meroni et al., 2018). This high variability of optimal temperature for growth or bloom meaning that *Ostreopsis* may have a great plasticity or intraspecific variations leading to different optimal temperature for growth as already suggested by Ben-Gharbia et al. (2016).

In our study, it should be noted that at 30 °C and low irradiance, cultures entered in stationary phase without any nutrient limitation in contrast to other conditions where stationary phase was associated to nitrogen and/or phosphorus limitations (Annex 6C page 109). Moreover, enumeration of bacteria in this condition did not showed any clear differences with other conditions (Annex 11 page 115) suggesting that *Ostreopsis* cells stop for other reason than competition with bacteria. Unfortunately, we cannot explain this behaviour and other parameters we did not measured as pH, could have a negative impact on culture.

In the present study, we acclimated the *O. cf. ovata* strain at three different irradiances without any inhibition of growth suggesting that this strain can tolerate light intensities from 200 to 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Growth rates in our study were significantly lower at 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (i.e. the lowest irradiance). By comparison with Tyrrhenian and Adriatic strains, **Monti and Cecchin (2012)** obtained higher growth rates at the lowest irradiance but observed no significant difference from 100 to 650 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. However, it is likely that **Monti and Cecchin (2012)** performed stress experiments (i.e. no acclimation mentioned) and this may contribute to the differences observed between these two studies. As for temperature, the absence of acclimation can disrupt cell metabolome and physiology (**Borowitzka, 2018**) leading to an unrepresentative effect of light on the growth rates. With the similar photoperiod as in the present study (i.e. 14:10 h light:dark), **Scalco et al. (2012)** measured higher growth rates under 200 than at 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ only at 22 °C. This suggest that combination of light and temperature could have an effect on growth of *Ostreopsis*. In our case, we did not found effect such as reported by **Scalco et al. (2012)** at the three temperatures, suggesting that in our window of tested light intensity no interaction occurred with temperature.

Ostreopsis cf. ovata is a benthic species growing mainly from 0 to 3 m where light is more intense (**Totti et al., 2010; Cochu and Lemée, 2012; Brissard et al., 2014; Tibirićá et al., 2019; Gémin et al., 2020**). Several authors showed the abundances decreased with depth and may be due to a light intensity that also decrease (**Cochu and Lemée, 2012; Tibirićá et al., 2019**). In our case, the decrease in light intensity affected the growth rate suggesting that low light could limit the cell growth at greater depth where those irradiances were measured. However, it should be keep in mind that *in situ*, other factors such as nutrients and temperature can have an impact the development of this dinoflagellate (**Accoroni and Totti, 2016**) and have an impact on abundances.

4.2 Effect of temperature and light intensity on the metabolome of *O. cf. ovata*

Metabolomic is a useful tool to assess the effect of environmental parameters on living organisms and their metabolism (**Bundy et al., 2008; Viant, 2008; Pereira Braga and Adamec, 2019**). Especially, untargeted metabolomics approach allowed to measure hundreds of metabolites, giving a fingerprint of the organism or cells in a particular condition (**Viant, 2008; Pereira Braga and Adamec, 2019**). In the present study, the metabolomic approach has been performed to evaluate the effects of light and

temperature on the metabolome of *O. cf. ovata*. Regarding the specific effect of factors, temperature had a more pronounced effect than light intensity.

4.2.1 Effect of temperature on the metabolome

Temperature induced a non-linear response, as observed in the ANOVA-PCA (Figure 19A). Therefore, two different metabolic modifications are highlighted, corresponding to distinct responses of *O. cf. ovata* after an acclimation to the lower (23 °C) and to the higher temperature (30 °C) studied. This indicates that different molecules may be induced to maintain the growth at the non-optimal temperature conditions. In microalgae, it has been reported that temperature exceeding the optimum for growth was more deleterious than a lower one (Ras et al., 2013). Indeed, a higher temperature could imbalance energy demand and ATP production causing inactivation and denaturation of proteins involved in photosynthesis (Raven and Geider, 1988) which may explain the differences of metabolism observed here for the three temperatures.

In literature, it was shown that *Isochrysis galbana* under high temperature could enhance the production of fatty acids (FA), independently of the light condition (Aguilera-Sáez et al., 2019). This is in opposition to the present study, as no FA were highlighted to be overproduced under high light conditions. As an example, stearidonic acid, a PUFA precursor, was not altered by temperature changes. However, looking into glycolipids (FAs derivatives), the DGDG (18:5/18:4) which was previously reported in dinoflagellates (Leblond and Chapman, 2000; Gray et al., 2009b), shows to be more abundant at low temperature, such compounds may participate in the fluidity regulation of the thylakoid membrane (Gray et al., 2009a).

4.2.2 Effect of light intensity on metabolome

In contrast to temperature, the effect of light was linear and no clear difference on the whole metabolome was observed between 400 and 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ suggesting that 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ could be close to light saturation value as already shown by Séchet et al. (2012) for two *Ostreopsis* strains from Villefranche-sur-Mer and Morgiret, France. This suggest one unique regulation phenomenon in the studied light intensity range in *O. cf. ovata*.

Stearidonic acid (18:4(n-3)) is one of the most abundant fatty acid in dinoflagellate (Leblond and Chapman, 2000). In the present study, it was more abundant under low light intensity. As this fatty acid (FA) is a precursor of many polyunsaturated FAs (PUFAs), such as eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5 (n-3)) and docosahexanoic acid (DHA, 22:6 (n-3)) (Guil-Guerrero, 2007) already found in dinoflagellates (Leblond and Chapman, 2000), this is consistent with previous observations showing that more PUFAs were observed at low irradiance (Hu, 2003).

In addition, the metabolomic approach highlighted the overexpression of cholesterol sulphate under higher light intensity. As sterol sulphates (such as cholesterol, dihydrobrassicasterol, and β -sitosterol sulfates) were demonstrated to be accumulated during cell growth of microalgae (Gallo et al., 2017), this observed increase could reflect an improved growth (Figure 17).

Dinoflagellates are also known to produce peridinin as a major pigment, as well as a great diversity of carotenoids (i.e. 47 mentioned in Zapata et al. (2012)). Herein, two of the highlighted features associated to low temperature, could be putatively identified as carotenoids. Fucoxanthin and derivatives have already been detected in dinoflagellates (Takaichi, 2011; Zapata et al., 2012; Bjørnland et al., 2003) and oscillol diglycoside has already been observed in cyanobacteria (Rønneberg et al., 1980; Hickman and Schweger, 1991; Takaichi and Mochimaru, 2007). In addition, a feature ($t_R = 10.20$, $m/z = 675.3582$ [M+Fa-H]⁻) that may correspond to peridinin, the predominant carotenoid in *O. cf. ovata* (Honsell et al., 2013)), was observed but without any significant variation related to temperature or light intensity. Interestingly, within the light intensity range studied here, none of the putatively identified pigments – peridinin, fucoxanthinol 3-arachinodate and oscillol diglycoside (oscillaxanthin) – were significantly altered, even though carotenoids are known to play a role in photosynthesis, to protect the cells from an excess of light leading to free radicals and are mainly produced under stress conditions (Faraloni and Torzillo, 2017). This would mean that the light intensities applied in this study may not represent a significant stress or, more likely, the absence of stress was a result of the acclimation.

4.2.3 Combined effect of temperature and light intensity on metabolome

The SUS plot clearly highlighted the low synergistic modifications due to the combination of temperature and light intensity and suggested that the metabolic modifications related to both effects were of a different nature. Such independence between the two studied effects was previously mentioned for FA accumulation in *I. galbana* (Aguilera-Sáez et al., 2019).

Unfortunately, only a limited number of significant features were successfully putatively annotated (0.6% with VIP > 1.5). This reflects the current lack of knowledge about the metabolome of marine microalgae and dinoflagellate in general, as previously reported (Zendong et al., 2016).

4.3 Effect of temperature and light on OVTX content and profile

The maximum toxin content of the strain used here varied from 7 to 36 pg/cell depending on the culture conditions. For Mediterranean strains growing in laboratory, **Tartaglione et al. (2017)** obtained concentrations varying from < LOD to 238 pg/cell and from 11 to 171 pg/cell for strains specifically isolated from Villefranche-sur-Mer. **Brissard et al. (2014)** also recorded a high OVTX contents (70 - 251 pg/cell) for another strain isolated from the same area and with similar culture conditions (i.e. 25 °C, 420 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in L1 medium). Altogether, these results reveal an important intraspecific variability concerning OVTX content of *O. cf. ovata*.

In the literature, the effect of temperature on toxin production is not fully understood, due to the few data available and the inconsistent results. Indeed, **Granéli et al. (2011)** and **Vidyarathna and Granéli (2013)** recorded a higher haemolytic activity at 20 °C than at 30 °C whereas **Carnicer et al. (2016b)** measured it at 28 °C compared to 24 °C. In some cases, no clear effect of the temperature was measured on both toxicity (**Vidyarathna and Granéli, 2012**) and toxin content (**Scalco et al., 2012**). In their works, **Pezzolesi et al. (2012)** recorded the maximum toxin content at 25 °C and no significant difference in OVTX content at 20 and 30 °C. In the present study, the highest OVTX content was obtained at 23 °C in agreement with **Granéli et al. (2011)** and **Vidyarathna and Granéli (2013)**.

Unfortunately, OVTX content of *Ostreopsis* cells in laboratory studies was overlooked and the discrepancy of the results could not allow to give a robust conclusion about the effect of temperature on OVTX production.

As for growth, the effect of light on OVTX production is relatively unknown due to the lack of studies. The results obtained herein are in agreement with **Scalco et al. (2012)** who did not observe a clear effect of light intensity on OVTX content. This could suggest that biosynthesis pathway for OVTX was not impacted by light intensity in the range we tested.

However, in field studies, light availability decreases with the depth (**Cohu and Lemée, 2012; Tibiriçá et al., 2019**) as toxin content does (**Brissard et al., 2014; Gémin et al., 2020**). According to **Cohu and Lemée (2012)**, the tested light intensities used in this study (i.e. 400 and 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) correspond approximately to 5 m of depth at Villefranche-sur-Mer where the lowest toxins contents were reached in most of the studies. Thus, it could be hypothesized that toxins content could be enhanced at higher light intensity and until 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ corresponding to irradiance measured at the surface

in this area. But, other parameters such as temperature and nutrient availability could also have an impact on toxins production and could explain the decrease of toxin with depth.

The effect of light intensity should be more investigated to clarify its role on OVTX content of *O. cf. ovata* and especially at higher intensities corresponding to the surface where most of cells were concentrated and where the risk of exposure to swimmers or walkers (cause of aerosol formation) is higher.

Toxin content increased during the growth and was maximal during the stationary phase, in agreement with many laboratory studies (e.g. **Guerrini et al., 2010; Vanucci et al., 2012; Vidyarathna and Granéli, 2012; Brissard et al., 2014**) but not all (**Nascimento et al., 2012b; Ben-Gharbia et al., 2016; Mendes et al., 2017**).

According to **Carnicer et al. (2016b)**, during the exponential growth phase cells could favour growth over toxin production that cost too much energy, explaining the lower OVTX content on a per cell basis we obtained during this phase. **Nascimento et al. (2012a)** suggested that a high toxin content could be reached when the growth rate is low, as it was observed in the present study at 23 °C. However, this would not explain that despite similar growth rates were obtained at 30 °C (i.e. 0.34-0.38 d⁻¹), the toxin content was twice lower and even decreased. This might suggest that highest temperatures could have a negative effect on the biosynthesis of OVTXs. Measurement of maximum photochemical yield of photosystem II (Annex 12 page 115) showed a decrease of photosynthetic activity at 30 °C when low growth rates and low toxin content occurred. The decrease of photosynthesis related to increase of temperature has already been reported in literature (**Ras et al., 2013**). Thus, this decrease may limit the amount of energy required to growth or to produce C-rich toxin (i.e. OVTX), explaining our results at 30 °C.

Moreover, the decrease of N and P in the media, that could lead to an increase of C:N and C:P ratio in the cells due to an accumulation of C-rich molecules could enhance the toxin production as shown by **Pinna et al. (2015)** and **Pezzolesi et al. (2016)**. This, could explain the increase of OVTX content during all growth and especially during the stationary phase when N and P were not available in the media.

Toxin profile of the *O. cf. ovata* strain (MCCV 54) showed a classic composition with a major amount of OVTX-a (> 50%), then OVTX-b (> 25%), and followed by OVTX-c, OVTX-d and OVTX-e that had been largely observed in strains from the Mediterranean Sea (**Ciminiello et al., 2010; Brissard et al., 2014; Tartaglione et al., 2017; Gémin et al., 2020**) or from the Brazilian coasts (**Nascimento et al., 2012a; Tibiriçá et al., 2019**).

Light, temperature and growth time did not affect the toxin composition but the total toxin content as previously reported by several authors (Pezzolesi et al., 2012; Vanucci et al., 2012; Carnicer et al., 2016b). In contrast, Scalco et al. (2012) reported an increase of OVTX-a and a decrease of OVTX-d/e when both temperature and photoperiod increased but no significant changes were observed during the growth as we observed. When compared to other studies, it seems that toxin profiles are constitutive, as not influenced by either N and P concentration (Vanucci et al., 2012; Pezzolesi et al., 2016; Mendes et al., 2017) or salinity (Pezzolesi et al., 2012; Carnicer et al., 2016b). Similar observations were made in field studies, where many different environmental factors (e.g. temperature, salinity, substrates or nutrients) could vary during the bloom (Pfannkuchen et al., 2012; Gémin et al., 2020).

5. Conclusion

The present study highlighted that temperature has the most pronounced effect on growth, metabolome and toxin content compared to the light intensity. Highest toxin content was found at the lowest temperature (i.e. 23°C) whereas highest growth rates were found at optimal temperature (i.e. 27 °C). At low light intensity, growth rates were significantly lower while no clear effect on toxin content was observed. The metabolome of *O. cf. ovata* was affected differently at sub-optimal temperature (i.e. 23 and 30 °C) for growth whereas light intensity shows a clear effect only at low irradiance. Analyses of metabolic features significantly affected by both parameters highlighted a very low number of molecules induced by a combination of low/high temperature and light intensity suggesting that both temperature and light intensity seemed to act independently on metabolome.

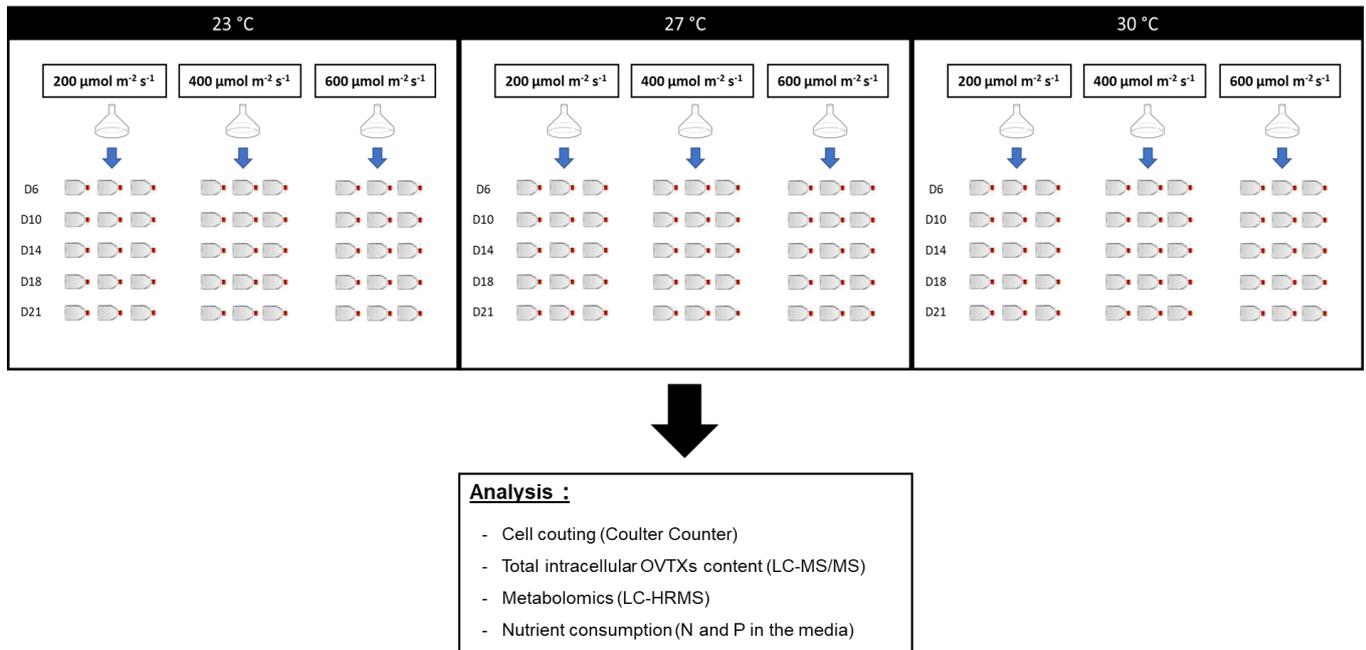
In the present study, only a very limited number of significant features were successfully putatively annotated. This reflects the current lack of knowledge about the metabolome of marine microalgae (Zendong et al., 2016) and suggest that a huge effort needs to be achieved on describing microalgae, and especially on dinoflagellate, metabolome. Such knowledge is unfortunately mandatory to completely interpret metabolomic data, thus allowing a better comprehension of environmental parameters effects.

In a context of a global change, the present study, shows that *O. cf. ovata* (MCCV54) could be less toxic and more abundant with higher temperature. Such results, obtained in laboratory, should be confirmed using more *O. cf. ovata* strains isolated worldwide, and also and using environmental conditions encountered in other locations. Further, investigation should be performed to clarify the

Chapter 3 - Combined effects of temperature and light intensity on growth, metabolome and ovatoxins content of *Ostreopsis cf. ovata* strain from the Mediterranean Sea

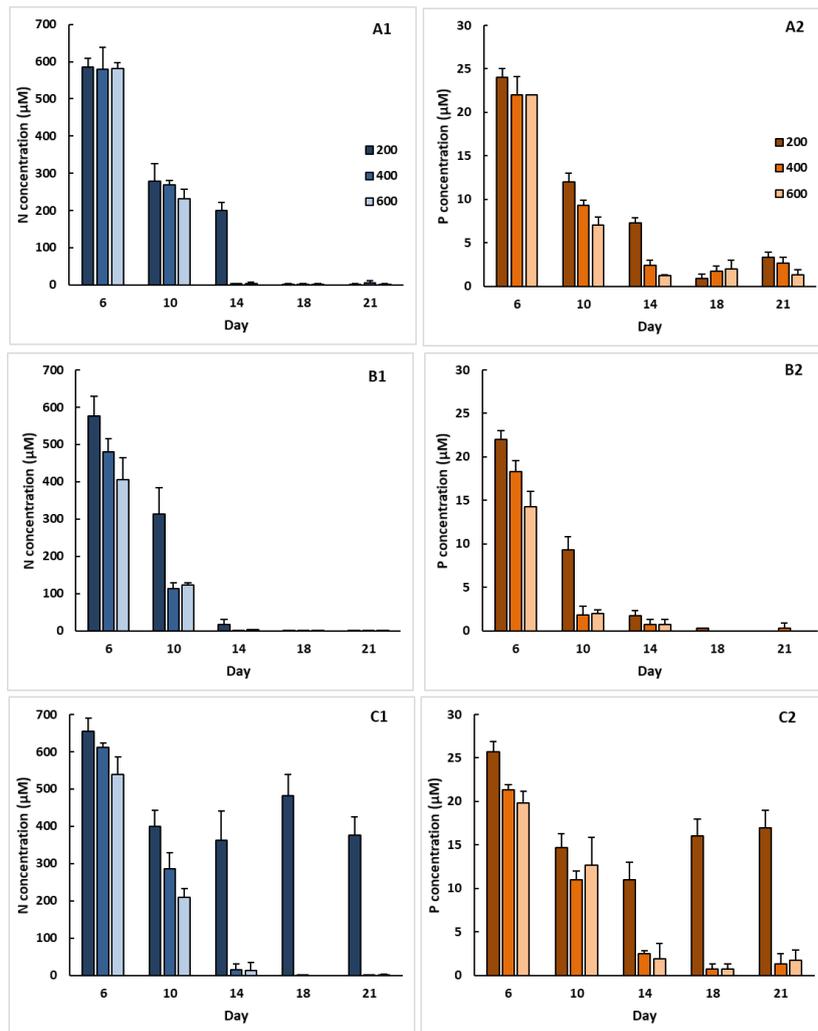
effect of temperature and/or light on *O. cf. ovata* physiology and gain insights into environmental parameters regulation in such toxic dinoflagellates.

6. Supplementary data



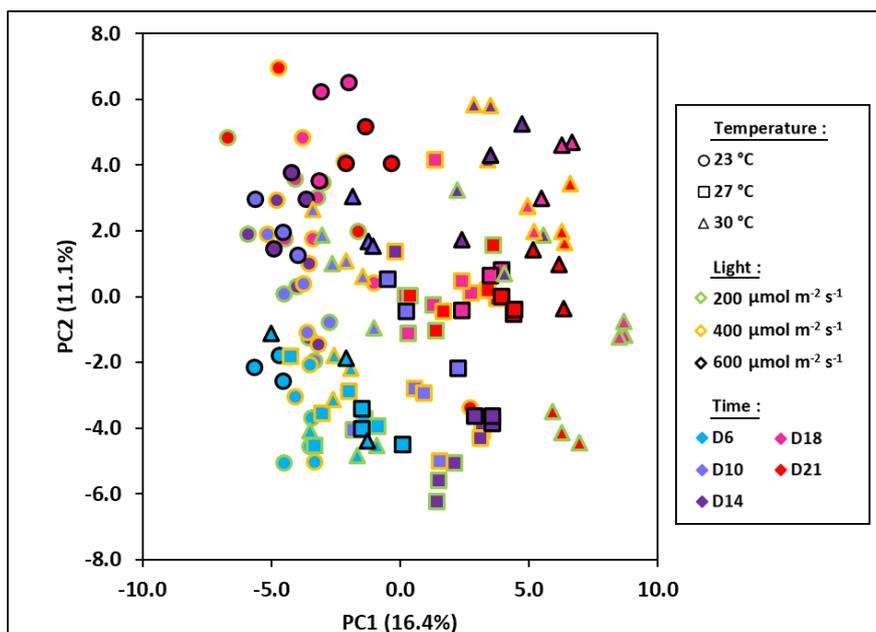
Annex 5 : Design of experiments to study the combined effects of temperature and light intensity on the growth, metabolome and ovatoxins content of pre-acclimated cells.

Chapter 3 - Combined effects of temperature and light intensity on growth, metabolome and
 ovatoxins content of *Ostreopsis cf. ovata* strain from the Mediterranean Sea



Annex 6 : Nutrient concentration in the culture media of nitrogen (blue) and phosphorus (orange) during the growth at 23 (A1-A2), 27 (B1-B2) and 30 °C (C1-C2) at 200, 400 and 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Chapter 3 - Combined effects of temperature and light intensity on growth, metabolome and ovatoxins content of *Ostreopsis cf. ovata* strain from the Mediterranean Sea



Annex 7 : PCA (UV scaling) from LC-HRMS data obtained after the growth of *Ostreopsis cf. ovata* at 23, 27, 30 °C, under a light intensity of 200, 400 and 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and after 6, 10, 14, 18 and 21 days of growth.

Annex 8 : Retention time, acquisition mode, masse (m/z) and VIP score of the 115 features identified in a combination of low/high temperature and light.

RT (min)	Mode	m/z	VIP temperature	VIP light
9.33	NEG	257.2108	1.68	1.61
9.32	NEG	463.2909	1.60	1.85
8.43	NEG	429.2970	1.51	1.98
11.23	NEG	761.4538	1.58	2.22
11.30	NEG	7.4263	1.58	1.62
10.49	NEG	841.5810	1.54	2.12
7.48	NEG	509.2761	1.55	1.97
7.22	NEG	432.1698	1.53	1.74
11.36	NEG	607.4269	1.55	1.90
8.65	NEG	491.1838	1.59	1.61
11.16	NEG	558.4193	1.72	1.69
9.46	NEG	529.0948	1.55	1.62
9.89	NEG	471.1742	1.72	1.65
9.47	NEG	527.0962	1.60	1.54
9.54	NEG	471.1740	1.61	1.71
7.63	NEG	579.3262	1.62	1.56
9.33	NEG	325.1989	1.67	1.89
8.61	NEG	489.1857	1.65	1.62
9.55	NEG	473.1730	1.52	1.72
8.56	NEG	491.1840	1.72	1.67

**Chapter 3 - Combined effects of temperature and light intensity on growth, metabolome and
ovatoxins content of *Ostreopsis cf. ovata* strain from the Mediterranean Sea**

9.45	NEG	493.1346	1.53	1.56
9.23	NEG	460.1609	1.52	1.66
9.23	NEG	458.1618	1.58	1.73
9.02	NEG	458.1620	1.64	1.82
7.99	NEG	476.1736	1.50	1.60
9.46	NEG	531.0930	1.64	1.51
10.69	NEG	855.4922	1.53	1.72
9.89	NEG	473.1723	1.73	1.57
9.51	NEG	471.1738	1.52	1.71
9.12	NEG	410.2533	1.82	1.73
7.21	NEG	497.1749	1.68	1.59
9.24	NEG	1099.6655	1.67	1.79
7.21	NEG	503.1920	1.64	1.73
11.32	NEG	608.4288	1.68	1.61
11.32	NEG	608.4287	1.68	1.60
9.05	NEG	477.1687	1.55	1.52
9.52	NEG	471.1741	1.54	1.73
8.43	NEG	429.2961	1.61	2.09
8.74	NEG	328.2481	1.50	1.71
10.20	NEG	485.1893	1.76	1.95
10.19	NEG	487.1875	1.77	1.83
9.25	NEG	697.4737	1.50	2.38
9.24	NEG	1099.6653	1.73	1.90
9.33	NEG	211.2226	1.51	1.93
9.90	NEG	474.1744	1.80	1.63
7.21	NEG	497.1744	1.60	1.55
10.74	NEG	576.4292	1.65	1.80
7.20	NEG	503.1909	1.68	1.74
13.73	NEG	665.5101	1.58	1.55
7.52	NEG	441.1943	1.59	1.58
10.16	NEG	1017.5446	1.64	1.58
10.99	NEG	678.4951	1.91	1.82
11.34	NEG	675.4141	1.88	1.70
11.50	NEG	645.4034	1.63	1.65
11.59	NEG	621.4407	1.77	1.51
12.32	NEG	630.4779	1.51	2.13
9.16	NEG	493.1346	1.60	1.83
9.16	NEG	493.1346	1.60	1.83
9.11	NEG	457.1587	1.58	1.67
8.58	NEG	595.3170	1.62	1.68
9.31	NEG	517.2161	1.57	1.96
11.46	NEG	700.4583	1.85	2.02
11.46	NEG	700.4573	1.71	2.05
8.39	NEG	461.1576	1.62	1.50
11.42	NEG	710.4830	1.80	1.52

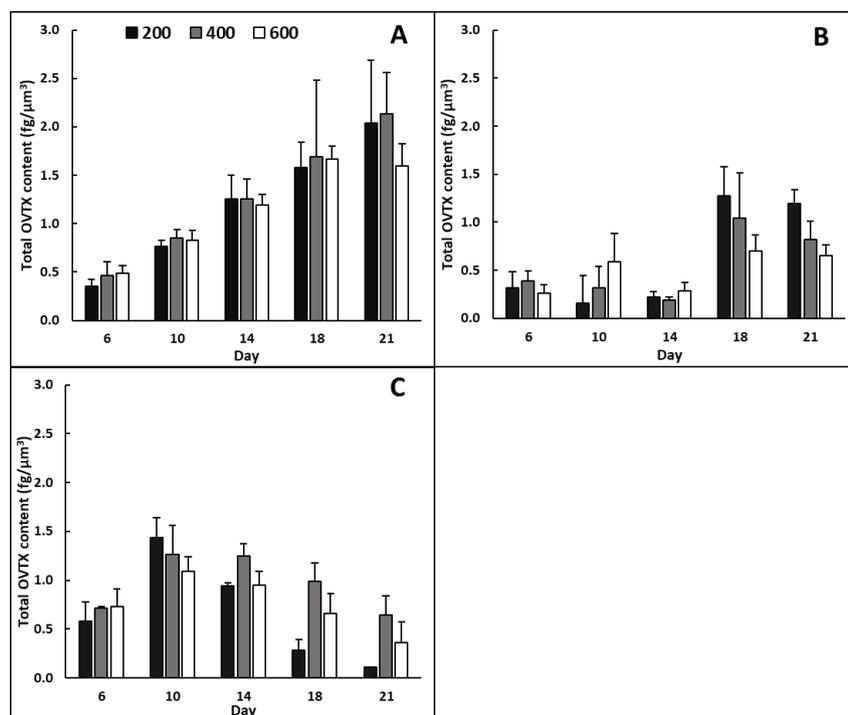
**Chapter 3 - Combined effects of temperature and light intensity on growth, metabolome and
ovatoxins content of *Ostreopsis cf. ovata* strain from the Mediterranean Sea**

8.44	NEG	565.2773	1.78	2.20
9.19	NEG	457.1584	1.53	1.63
9.47	NEG	527.0960	1.51	1.65
9.31	NEG	517.2160	1.61	2.07
8.34	NEG	476.1738	1.54	1.60
13.13	NEG	855.4620	1.68	1.55
9.87	NEG	485.1888	1.57	1.69
10.99	NEG	668.4625	1.74	1.57
9.89	NEG	475.1724	1.56	2.00
7.56	NEG	456.3440	1.90	1.52
9.52	NEG	471.1737	1.52	1.75
7.38	NEG	563.3473	1.83	1.56
11.63	NEG	727.4127	1.55	1.62
11.61	NEG	257.2115	1.71	1.87
13.49	NEG	801.4899	1.66	1.56
8.92	NEG	243.1952	1.58	1.62
9.89	NEG	471.1740	1.67	1.77
9.35	NEG	587.5064	1.84	1.53
7.20	NEG	435.2058	1.64	1.67
9.33	NEG	325.1986	1.61	1.81
9.71	NEG	541.1122	1.51	2.05
9.12	NEG	478.2392	1.80	1.98
9.30	NEG	519.2140	1.61	2.19
11.33	NEG	743.4042	1.56	1.89
9.33	NEG	393.1860	1.64	1.93
11.04	NEG	743.4079	1.82	1.73
8.43	NEG	859.6027	1.62	1.93
9.33	NEG	211.2054	1.64	1.62
11.16	NEG	558.4179	1.76	1.62
9.12	NEG	457.1587	1.59	1.67
9.13	NEG	511.1470	1.50	1.68
10.19	NEG	489.1860	1.77	1.83
9.87	NEG	488.1894	1.52	1.81
7.25	NEG	270.0719	1.80	1.57
7.25	NEG	270.0719	1.80	1.57
10.49	NEG	842.5812	1.54	2.02
12.49	NEG	833.5483	1.73	1.59
10.39	NEG	257.2109	1.53	1.51
8.50	NEG	474.1642	1.57	1.85
9.92	NEG	329.2670	1.87	1.53
9.30	NEG	519.2143	1.61	2.04
11.36	NEG	467.3366	1.80	1.93
9.34	NEG	529.1578	1.63	1.62
11.41	NEG	710.4828	1.86	1.86
9.24	NEG	459.1585	1.53	1.62

**Chapter 3 - Combined effects of temperature and light intensity on growth, metabolome and
ovatoxins content of *Ostreopsis cf. ovata* strain from the Mediterranean Sea**

9.24	NEG	459.1585	1.52	1.62
10.20	NEG	485.1897	1.80	1.95
9.45	NEG	493.1348	1.66	1.59
9.38	NEG	495.1334	1.66	1.61
9.46	NEG	531.0932	1.58	1.81
10.63	NEG	585.5228	1.59	1.84
10.63	NEG	583.5154	1.68	1.66
11.32	NEG	607.4257	1.59	1.63
8.47	POS	431.3099	1.54	1.98

Chapter 3 - Combined effects of temperature and light intensity on growth, metabolome and ovatoxins content of *Ostreopsis cf. ovata* strain from the Mediterranean Sea

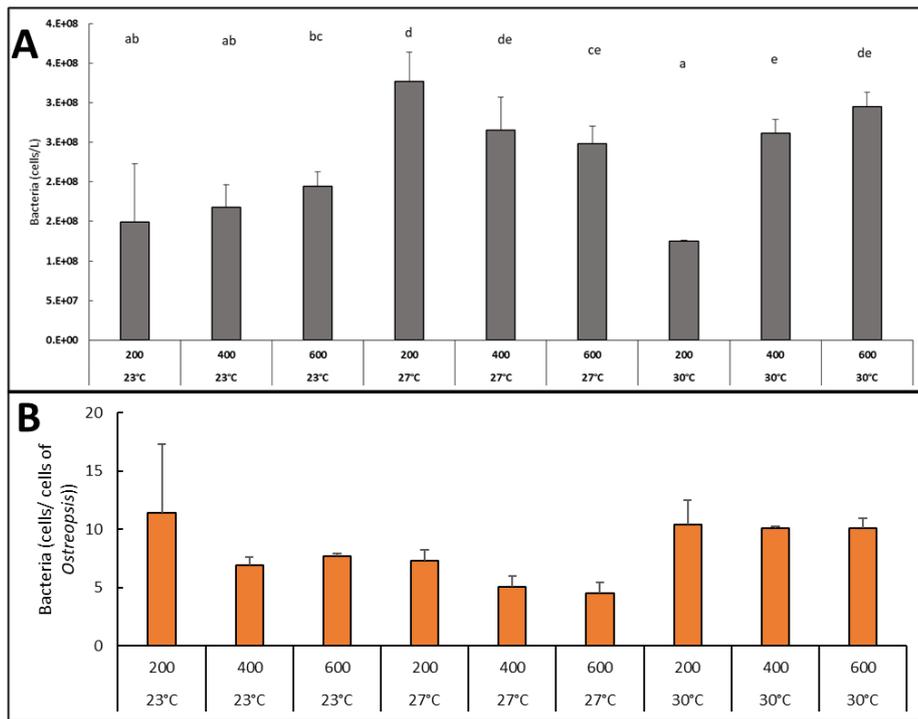


Annex 9 : Total intracellular ovatoxin concentration basis on cell biovolume (fg/μm³) during the growth at 23 (A), 27 (B) and 30 °C (C) at 200 (black), 400 (grey) and 600 μmol m⁻² s⁻¹ (white).

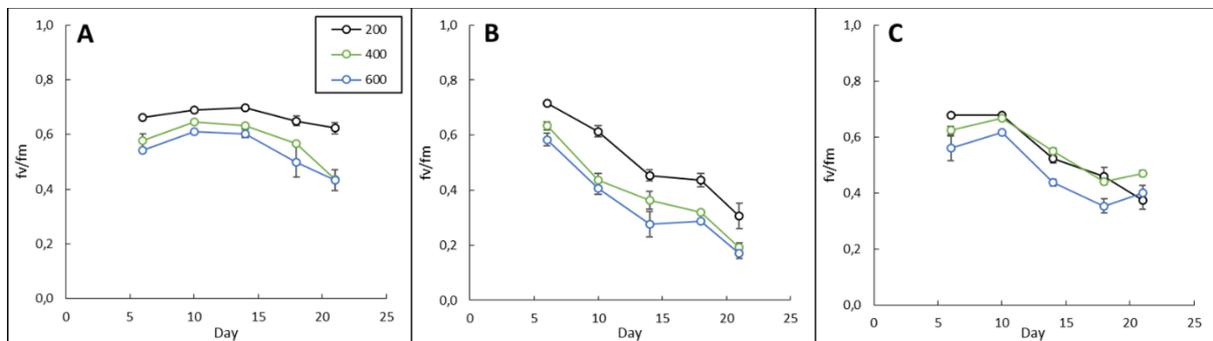
Annex 10 : *p*-value of the one-way ANOVA (n = 3) on toxin content between day 6 and the day where the maximum toxin content was reached.

Irradiance (μmol m ⁻² s ⁻¹)	23 °C		27 °C		30 °C			
	200	J6 vs. J21	0.016	J6 vs. J18	0.028	J6 vs. J10	0.015	J10 vs. J21
400	J6 vs. J21	0.006	J6 vs. J18	0.115	J6 vs. J14	< 0.001	J14 vs. J21	0.004
600	J6 vs. J18	< 0.001	J6 vs. J18	0.012	J6 vs. J10	0.058	J10 vs J21	< 0.001

Chapter 3 - Combined effects of temperature and light intensity on growth, metabolome and ovatoxins content of *Ostreopsis cf. ovata* strain from the Mediterranean Sea

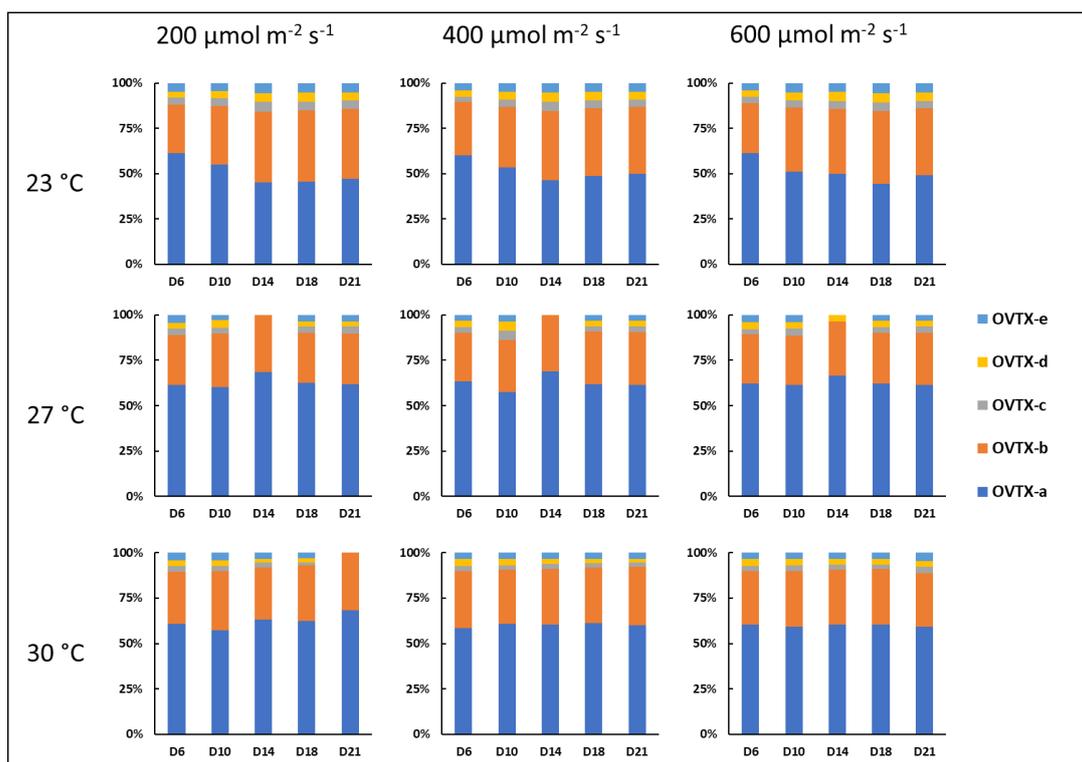


Annex 11 : Total bacteria basis on volume media (A) and on *Ostreopsis* cell calculated by flux cytometry.



Annex 12 : Activity of photosystem II (fv/fm) measured with Aquapen at 23 (A), 27 (B) and 30 (C) under 200 (black), 400 (green), 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (blue) at day 6, 10, 14, 18 and 21.

Chapter 3 - Combined effects of temperature and light intensity on growth, metabolome and ovatoxins content of *Ostreopsis cf. ovata* strain from the Mediterranean Sea



Annex 13 : Relative concentration of intracellular OVTX-a to -e (%) growing at 23, 27 and 30 °C, under 200, 400 and 600 μmol m⁻² s⁻¹ and during 21 days. Concentrations of OVTX-c, -e and/or -d at 27 °C – 200/400/600 μmol m⁻² s⁻¹ – D14 and at 23 °C – 200 μmol m⁻² s⁻¹ – D21 are under the limit of detection.

Chapitre 4 - Etude de stabilité de la palytoxine et purification des ovatoxines

1. Introduction

Ostreopsis est un genre de dinoflagellé benthique et toxique, d'origine tropicale mais dont les blooms sont de plus en plus fréquents et intenses au cours des périodes chaudes dans les zones tempérées (Rhodes, 2011). Les efflorescences de l'espèce *Ostreopsis* cf. *ovata* ont été associées à l'apparition de problèmes respiratoires, de toux et d'irritations cutanées chez l'Homme (Gallitelli et al., 2005; Durando et al., 2007; Kermarec et al., 2008). De plus, dans l'environnement, des épisodes de mortalité d'invertébrés marins ont été constatés suite à des efflorescences d'*Ostreopsis* (Simonini et al., 2011; Guidi-Guilvard et al., 2012).

Après des épisodes importants d'intoxications en Espagne et en Italie lors d'efflorescences d'*Ostreopsis*, des équipes de recherche se sont intéressées aux toxines produites par ce dinoflagellé. En 2006 Ciminiello et al. (2006) ont mis en évidence qu'*O.* cf. *ovata* était productrice d'une molécule semblable à la palytoxine (PLTX), une toxine connue pour être produite par le corail mou *Palythoa toxica* (Moore and Scheuer, 1971). En 2008, ce groupe a découvert une nouvelle famille de toxines analogues de la PLTX, avec la description de l'ovatoxine-a (OVTX-a) (Ciminiello et al., 2008). Depuis, douze autres analogues ont été découverts dans les souches méditerranéennes (nommés OVTX-a à -l) (Ciminiello et al., 2008; Ciminiello et al., 2010; Ciminiello et al., 2012d; Brissard et al., 2015; García-Altare et al., 2015; Tartaglione et al., 2016b; Tartaglione et al., 2017) ainsi qu'un isomère de la PLTX appelé palytoxine isobarique (isob-PLTX) (García-Altare et al., 2015). *Ostreopsis* cf. *ovata* présente donc une chimiodiversité importante.

En mer Méditerranée, Tartaglione et al. (2017) ont ainsi montré l'existence de quatre profils toxiques à partir de 55 souches, isolées principalement sur les côtes italiennes (Tableau 11). Le profil 1 est le plus fréquent (67% des souches) et est caractérisé par l'abondance d'OVTX-a et -b (> 80%) puis des plus faibles quantités des autres analogues (dont l'isob PLTX). Le profil 2 se démarque car il ne contient pas d'OVTX-b ni d'OVTX-c (et donc une proportion d'OVTX-a qui monte à environ 80%). Enfin, les deux derniers profils sont beaucoup plus rares : le profil 3 ne contient que les OVTX-b (88%) et -c et pas d'isob-PLTX alors que le profil 4 contient une majorité d'OVTX-f (50%) suivie des OVTX-a et -b puis les autres en plus faibles quantités. Il faut également noter l'existence de souche non toxique (n = 1/55 souches criblées). La prépondérance du profil 1 parmi les souches méditerranéennes est également confirmée dans la littérature, que ce soit sur des souches en laboratoire ou pour des échantillons naturels (Accoroni et al., 2011; Pfannkuchen et al., 2012; Brissard et al., 2014; Ninčević Gladan et al., 2019; Gémin et al., 2020).

Tableau 11 : Proportions (%) des OVTX-a à -g et d'isob-PLTX dans les profils 1 à 4 identifiés par Tartaglione et al. (2017) et le nombre de souches associées à ces profils.

Proportion (%)	Profil 1	Profil 2	Profil 3	Profil 4	Non-toxique
OVTX-a	56	77		24	
OVTX-b	26		88	18	
OVTX-c	3,8		11	2,4	
OVTX-d	6,9	12		2,9	
OVTX-e	4,1	6,3		2,9	
OVTX-f				50	
OVTX-g	0,6	0,9			
Isob-PLTX	0,3	0,8		0,3	
n	37	14	2	1	1

La PLTX montre une forte toxicité, liée à son interaction avec les canaux Na^+/K^+ des cellules de mammifères. En effet, elle se fixe sur la pompe Na^+/K^+ -ATPase la transformant en canal non spécifique, ce qui induit un déséquilibre ionique dans la cellule pouvant mener à la mort cellulaire (Habermann, 1989). En raison de leur ressemblance structurale, les OVTX sont suspectées de posséder un mécanisme d'action similaire, mais leur toxicité chez l'homme demeure méconnue. Pourtant, leur présence dans les aérosols le long des côtes (Ciminiello et al., 2014) soulève des inquiétudes. Il est donc important et urgent de mieux appréhender la toxicité des OVTX et donc les risques liés à aux efflorescences d'*Ostreopsis*. Mais cela nécessite d'obtenir des toxines purifiées, or, aucun étalon d'OVTX n'est commercialisé actuellement. Face à ce manque, la quantification d'extraits ainsi que les études de toxicité sont réalisées à l'aide d'un étalon de PLTX (fourni par Wako) issu de *Palythoa tuberculosa*, en assumant que les OVTX possèdent le même facteur de réponse molaire en spectrométrie de masse et le même mécanisme d'action sur les cellules que la PLTX.

La difficulté d'obtention d'OVTX pures réside dans la diversité des analogues produits par *O. cf. ovata* et leur forte similarité structurale (cf. Tableau 2 page 20 dans état de l'art) qui rend les OVTX difficiles à séparer par chromatographie liquide (Ciminiello et al., 2012c; Brissard et al., 2015). De plus, des pertes non négligeables ont été observées lors de leur purification, comme Ciminiello et al. (2012c) qui ont obtenu un rendement final de seulement 12 % lors de la purification de l'OVTX-a. Cela a nécessité de la biomasse issue de 80 L de culture d'une souche produisant 77 % d'OVTX-a, 20 % d'OVTX- d/-e et 3 % d'isob-PLTX. Il faut préciser que cette souche ne produisait pas d'OVTX-b et -c qui sont les analogues élués juste avant l'OVTX-a en chromatographie liquide en phase inverse, simplifiant ainsi le processus de purification (i.e. meilleure résolution). Il semblerait notamment que les étapes d'évaporation de solvants soient critiques, comme observé par Brissard (2014) avec des pertes

pouvant atteindre 30 %. Malheureusement, ces étapes d'évaporation sont incontournables et la purification finale d'ovatoxines en requiert de nombreuses.

Malgré ces observations, il n'existe pas d'étude publiée portant sur la stabilité des OVTX, en particulier sur l'effet des matériaux utilisés, ni sur les rendements associés au processus de purification. Les principales informations dont nous disposions provenaient d'observations rapportées par des collaborateurs internes et externes du laboratoire Phycotoxines (e.g. pertes dans le temps, liées au solvant, au contenant et aux évaporations). Dans ce contexte, il a été décidé d'évaluer la stabilité des OVTX afin notamment de minimiser les pertes lors de la purification. A défaut d'étalons d'OVTX disponibles dans le commerce, l'étude de stabilité doit être réalisée sur la palytoxine (PLTX), possédant vraisemblablement un comportement physico-chimique similaire. Cela permettra d'avoir des éléments de réponses sur : 1) les effets des solvants utilisés sur la solubilité ; 2) les contenants à privilégier pour minimiser l'adsorption/les pertes ; 3) la stabilité des toxines dans différentes matrices (e.g. solvants, extraits de microalgues) et dans le temps.

A ce jour, l'OVTX-a, qui est l'analogue généralement majoritaire, est le seul analogue le quel l'élucidation structurale a pu être faite par RMN (**Ciminiello et al., 2012a; Ciminiello et al., 2012c**). La structure des autres OVTX a été proposée en utilisant la spectrométrie de masse haute résolution (**Ciminiello et al., 2010; Ciminiello et al., 2012d; Brissard et al., 2015; García-Altres et al., 2015; Tartaglione et al., 2016b**).

L'obtention d'OVTX-a (700 µg) purifiée par l'équipe de Ciminiello a également permis de réaliser des tests de toxicité sur souris par injection intrapéritonéale (**Ciminiello et al., 2012c**), des tests hémolytiques et des tests cytotoxicités (**Pelin et al., 2016b**). Dans le premier cas, l'injection d'une dose unique de 7 µg/kg a entraîné la mort de toutes les souris après 30 min (avec l'observation préalable de 'frétillements' entre 1 et 3 min après injection). Dans le second cas, **Pelin et al. (2016b)** ont testé la cytotoxicité de l'OVTX-a sur des cellules HaCat (kératinocytes de la peau humaine) et ont mesuré une concentration efficace à 50 % de 1,1 µM ce qui est 100 fois plus élevée que celle obtenue pour la PLTX (i.e. 0,018 µM). Cependant, cette différence de toxicité n'a pas été observée par **Poli et al. (2018)** qui ont mesuré des doses létales à 50 % de 3,3 µg/kg pour un mélange d'OVTX (OVTX-a AC avec des traces d'OVTX-d et -e AC) et de 1,8 µg/kg pour la PLTX par voie intrapéritonéale chez le rat. Ces quelques résultats montrent que l'OVTX-a possède un potentiel toxique et que de nouvelles données sur la toxicité sont nécessaires pour clarifier la toxicité des OVTX et mieux apprécier le risque sanitaire lié à la prolifération d'*Ostreopsis*.

Le troisième objectif de la thèse était de purifier des OVTX et de tenter d'isoler le maximum d'analogues afin que les partenaires du projet ANR OCEAN-15 (LOV et ANSES) puissent réaliser des

tests de cytotoxicité et d'écotoxicité. Dans un premier temps, les méthodes de quantification par LC-MS/MS ont été mises à jour. En parallèle, nous avons utilisé un plan factoriel pour étudier les effets du solvant, du contenant (verre ou polypropylène, PP), de la présence de matrice et/ou d'acide et de l'évaporation (concentration ou évaporation à sec) sur la stabilité de la PLTX. Dans un second temps, la méthode d'extraction des OVTX à partir de la biomasse a été optimisée et deux méthodes de fractionnement des extraits bruts ont été comparées. Enfin, nous avons décrit l'ensemble des étapes qui nous ont permis d'obtenir un mélange d'OVTX et des extraits d'OVTX-a et -d purifiés à partir des culots cellulaires accumulés pendant toute une année de thèse.

2. Matériel et méthode

2.1 Méthodes d'analyse par LC-MS/MS

Les méthodes d'analyse de la PLTX et des OVTX sont dérivées de celles décrites par **García-Altare** **et al. (2015)** et **Brissard et al. (2014)**, avec quelques ajustements. L'analyse est réalisée en utilisant un système de chromatographie liquide (UFLC XR, Shimadzu) couplé à un spectromètre de masse hybride triple quadripôle/piège d'ions (API 4000 Qtrap, AB SCIEX) équipé d'une source turbospray. La colonne analytique est une Poroshell 120 EC-C18 (100 × 2,1 mm 2,7 µm, Agilent) thermostatée à 25 °C. Le débit d'élution est fixé à 0,2 mL/min. Les phases mobiles sont composées d'eau (A) et d'un mélange acétonitrile/eau (95:5 v/v) (B) toutes les deux contenant 0,2 % d'acide acétique. Le volume d'injection est de 5 µL.

La détection en spectrométrie de masse est menée en mode MRM (Multiple Reaction Monitoring) en mode positif. Les paramètres sources sont les suivants : gaz curtain 30 psi, spray d'ion à 5000 V, température du turbogaz à 300 °C, gaz 1 et 2 paramétrés à 30 et 40 psi respectivement. Une énergie de collision de 31 eV est appliquée aux ions di-chargés $[M+2H]^{2+}$, $[M + 2H - H_2O]^{2+}$ (declustering potential, DP= 56 V) et 47 eV pour les ions tri-chargés ions $[M + 3H - H_2O]^{3+}$ (DP = 56 V) pour produire les fragments caractéristiques m/z 327, 343 et 371 (Fragment A).

La quantification de la PLTX et des OVTX (en équivalent PLTX) est réalisée par étalonnage externe en utilisant l'étalon de PLTX fourni par Wako Chemicals GmbH. Les limites de détection (LD) et de quantification (LQ) sont déterminées pour les concentrations dont les rapports signal sur bruit (S/N) sont supérieurs ou égaux à 3 et 10 respectivement.

Dans le cas de notre méthode, le ratio d'ion des différentes OVTX peut changer par rapport à celui observé pour la PLTX. En l'absence d'étalon, afin de compenser ces différences d'ionisations et

d'estimer la concentration des différents analogues, nous avons défini le signal comme étant la somme des trois transitions mesurées.

2.1.1 Méthode d'analyse de la PLTX seule (« méthode PLTX »)

Le gradient d'élution suivant est utilisé : 20-100 % de B en 7 min, maintenu 1 min à 100 %, 100-20 % de B en 1 min et maintenu pendant 4 min pour rééquilibrer la colonne (durée totale : 12 min). Dans ces conditions, le temps de rétention de la PLTX est de 4 min. Les transitions utilisées pour la détection de la PLTX sont rapportées dans le Tableau 12. Le dwell time a été optimisé à 1000 ms.

Ainsi, la LD et LQ de la méthode sont respectivement de 1 et 2 ng/mL.

2.1.2 Méthodes d'analyse des OVTX et de la PLTX (« méthodes multi-toxines »)

Le gradient d'élution est le même que **García-Altare et al. (2015)** à savoir : 28-30 % de B pendant 15 min, 30-100 % B pendant 1 min et maintenu pendant 3 min avant de revenir à 28 % en 1 min et maintenu pendant 3 min (durée totale : 23 min).

La quantification en équivalent PLTX est réalisée en utilisant une gamme de PLTX de 9,8 ng/mL à 10 µg/mL, en estimant que les OVTX et la PLTX ont le même facteur de réponse molaire. Les transitions utilisées pour la détection des 12 OVTX sont résumées dans le Tableau 12. Le dwell time, fixé à 180 ms, est apparu critique pour avoir une sensibilité optimale. C'est pourquoi deux méthodes ont été créées (Tableau 12) : 1) pour les OVTX -a à -f et l'isob-PLTX (toxines retrouvées dans les souches au laboratoire) et 2) pour les autres OVTX (OVTX-g, -h, -i, -j1/2, -k) et l'isob-PLTX.

Ainsi, les LD et LQ des méthodes « Multi-toxines » sont respectivement de 20 et 30 ng/mL.

Tableau 12 : Transitions utilisées pour la quantification de la palytoxine et des ovatoxines par LC-MS/MS.

Analogue	$[M+2H]^{2+}$	→	Fragment A	$[M+2H-H_2O]^{2+}$	→	Fragment A	$[M+3H-H_2O]^{3+}$	→	Fragment A
Méthode PLTX									
PLTX	1340,3	→	327,3	1331,3	→	327,3	887,8	→	327,3
Méthode Multi-toxines 1									
Isob-PLTX	1340,3	→	327,3	1331,3	→	327,3	887,8	→	327,3
OVTX-a	1324,3	→	327,3	1315,3	→	327,3	877,2	→	327,3
OVTX-b	1346,3	→	371,2	1337,3	→	371,2	891,8	→	371,2
OVTX-c	1354,3	→	371,2	1345,3	→	371,2	897,2	→	371,2
OVTX-d	1332,3	→	327,3	1323,3	→	327,3	882,5	→	327,3
OVTX-e	1332,3	→	343,2	1323,3	→	343,2	882,5	→	343,2
OVTX-f	1338,3	→	327,3	1329,3	→	327,3	886,5	→	327,3
Méthode Multi-toxines 2									
Isob-PLTX	1340,3	→	327,3	1331,3	→	327,3	887,8	→	327,3
OVTX-g	1316,3	→	327,3	1307,2	→	327,3	871,8	→	327,3
OVTX-h	1317,6	→	327,3	1308,8	→	327,3	872,5	→	327,3
OVTX-i	1345,3	→	327,2	1336,3	→	327,2	885,2	→	327,2
OVTX-j1/j2	1353,2	→	327,2	1344,3	→	327,2	890,5	→	327,2
OVTX-k	1361,2	→	327,2	1352,2	→	327,2	865,8	→	327,2

2.1.3 Analyse d'extraits contenant du DMSO

Les extraits contenant du DMSO (diméthylsulfoxyde) représentent un cas particulier d'analyse à cause de la forte viscosité et de la température de solidification (18,5 °C) de ce solvant. Les échantillons dans du DMSO sont donc dilués dans du méthanol pour avoir une concentration finale de 20 % en DMSO. Il est apparu que le DMSO modifiait les ratios d'ions observés pour la PLTX (cf. 3.1.1 page 135), ainsi, la gamme de PLTX utilisée doit contenir la même proportion de DMSO que les échantillons après dilution (i.e. 20 %).

2.2 Etude de stabilité

Pour estimer la stabilité des OVTX, nous avons utilisé l'étalon de PLTX commercialisé par Wako, considéré comme étant représentatif des propriétés physico-chimiques des OVTX. Nous nous sommes concentrés sur le niveau de perte de la PLTX lié au solvant de solubilisation et conservation (e.g. MeOH 100 %, MeOH 50 %, DMSO), au type de contenant (verre ou polypropylène), à la concentration, à la présence de matrice et au type d'évaporation.

Toutes les solutions ont été préparées aléatoirement et leur analyse a été réalisée avec la méthode LC-MS/MS dédiée à la PLTX (méthode PLTX) décrite en 2.1.1 (page 122).

Ce travail a été réalisé dans le cadre du stage de Master 2 de Maxime Tharaud (2018).

2.2.1 Plan d'expériences n°1 – Effet du solvant de reprise, du type de contenant et de la concentration en PLTX

Les effets de trois solvants et de deux types de contenant ont été évalués sur la reprise et la conservation d'étalon de PLTX, et ceci à deux concentrations selon un plan factoriel mixte (Tableau 13). Trois étalons de PLTX vendus sous la forme d'un microfilm de 100 µg, dans un vial ambré, ont fait l'objet d'une solubilisation dans trois solvants : le MeOH/eau (1:1, v/v) et le MeOH 100%, utilisés dans la littérature pour l'extraction et le fractionnement des OVTX ; et le DMSO utilisé lors des tests de toxicité *in vitro*. Pour chacun des solvants testés, des solutions de 2 mL aux concentrations de 0,2 et 2 µg/mL ont été placées soit dans des tubes en verre silanisé (CTS 1275, Thermo Scientific), soit dans des tubes en polypropylène (PP, Eppendorf) et en triplicat soit 36 expériences au total (Tableau 13).

Tableau 13 : Plan d'expériences numéro 1 : effet du solvant (MeOH 50 %, MeOH 100 % et DMSO), du contenant (verre et polypropylène) et de la concentration (0,2 et 2 µg/mL).

Solvant	Contenant	Concentration (µg/mL)
MeOH 100 %	Verre	0,2
		2
	PP	0,2
		2
MeOH 50 %	Verre	0,2
		2
	PP	0,2
		2
DMSO	Verre	0,2
		2
	PP	0,2
		2

Les solutions sont conservées à -20 °C et analysées à J0, 1, 4, 7, 15 et 28 en prélevant un aliquot de 100 µL qui est transféré dans un vial du même type (i.e. verre ou PP). Les solutions dans le DMSO sont préalablement diluées au 1/5 avec du MeOH 50 % pour éviter que l'échantillon ne se solidifie dans le passeur d'échantillons réfrigéré à 4 °C (rappel : température de fusion du DMSO : 18,5 °C) et diminuer sa viscosité.

2.2.2 Plan d'expériences n°2 – Etude de l'effet de la matrice sur la conservation de la PLTX

Sur la base des résultats du premier plan factoriel, l'influence de la présence de la matrice « *Ostreopsis* » a été testée dans des extraits MeOH 50 % et 100 % et dans des tubes en verre ou en PP selon un plan factoriel 2³ (Tableau 14). La concentration a été fixée à 2 µg/mL.

Tableau 14 : Plan d'expériences numéro 2 : effet du solvant (MeOH 50 % et MeOH 100 %) et du contenant (verre ou PP) avec ou sans matrice « *Ostreopsis* ».

Solvant	Contenant	Matrice
MeOH 50 %	Verre	Oui
		Non
	PP	Oui
		Non
MeOH	Verre	Oui
		Non
	PP	Oui
		Non

A défaut de disposer d'une souche d'*Ostreopsis cf. ovata* ne produisant pas d'OVTX, une autre espèce d'*Ostreopsis* ne contenant pas d'OVTX a été utilisée : *O. fattorussoi* MCCV57 (isolée au Liban en 2015) fournie gracieusement par le LOV. Les culots d'*O. fattorussoi* ont été extraits avec du MeOH 50 % au vortex selon la procédure décrite en 2.4 (page 128), puis les extraits sont évaporés à sec et repris dans du MeOH 50 ou 100 % en fonction de la condition à tester.

Finalement, 800 µL d'extrait de matrice dans le solvant adéquat ont été ajoutés à 200 µL d'une solution de PLTX à 10 µg/mL (préparée soit dans le MeOH soit dans le MeOH 50 %). Dans un souci d'économie de solution étalon, l'expérience a été réalisée en duplicat et des aliquots ont été prélevés extemporanément puis après 1, 5, 8, 15 et 41 jours de conservation à -20 °C.

2.2.3 Plan d'expériences n°3 – Etude de l'effet de l'évaporation

Lors du processus de purification, plusieurs étapes d'évaporation sont nécessaires puisque les extraits bruts et les fractions obtenues après chromatographies d'exclusion stérique (SEC) et semi-préparative doivent être évaporés pour les étapes suivantes (i.e. 3 à 4 évaporations utilisées à PHYC).

Dans ce plan d'expériences, les effets du type d'évaporation (à sec ou concentration par réduction de volume de solvant à 200 µL) ont été testés à partir de 2 solvants (MeOH 50 % et 100 %), selon la présence d'acide acétique (i.e. retrouvé dans les phases mobiles pour la chromatographie semi-préparative) et de la matrice « *Ostreopsis* » avec un plan factoriel 2⁴ (Tableau 15).

Tableau 15 : Plan d'expériences numéro 3 : pertes de PLTX liées à l'évaporation en fonction du solvant (MeOH 50 % ou 100 %), de la présence d'acide acétique (AA), de la présence de matrice « *Ostreopsis* » et du type d'évaporation (à sec ou réduction du volume).

Solvant	Acide	Matrice	Type d'évaporation
MeOH 50 %	0,2 % AA	Oui	Concentration
			A sec
	Non	Non	Concentration
			A sec
	Non	Oui	Concentration
			A sec
Non	Non	Concentration	
		A sec	
MeOH 100 %	0,2 % AA	Oui	Concentration
			A sec
	Non	Non	Concentration
			A sec
	Non	Oui	Concentration
			A sec
Non	Non	Concentration	
		A sec	

D'après les résultats des plans factoriels 1 et 2 (cf. 3.1.1 et 3.1.2), nous avons décidé ici d'utiliser uniquement des tubes en polypropylène (PP). Le volume de chaque solution est de 1,5 mL à une concentration de 0,5 µg/mL.

Pour les expériences incluant la matrice « *Ostreopsis* », les extraits sont évaporés à sec et repris dans du MeOH 50 ou 100 %. Pour l'évaporation à sec et la concentration, les tubes sont placés sous flux d'azote dans un bain marie à 30 °C. Les solutions sont analysées avant évaporation (100 µL transférés dans un vial en PP) et après évaporation/reprise en ajustant le volume final à 1,5 mL.

2.2.4 Tests complémentaires

2.2.4.1 Effet de l'évaporation sur la concentration en PLTX dans de l'eau et un mélange ACN/eau

La purification des OVTX fait intervenir deux étapes de séparation sur une colonne semi-préparative. Les fractions obtenues sont un mélange d'eau et d'acétonitrile et doivent être concentrées pour procéder à l'étape suivante. Dans ce plan d'expériences, l'évaporation (concentration jusqu'à 200 µL ou à sec) de deux solutions de PLTX (1 µg/mL), dans l'eau et dans un mélange ACN/eau (70:30, v/v) ont été réalisées en duplicat. L'analyse par LC-MS/MS a été réalisée avant évaporation et après reprise pour calculer les pertes.

2.2.4.2 Effet des solvants de reprise sur la réponse en LC-MS/MS d'un extrait préalablement évaporé à sec

Lors de certains essais préliminaires du plan d'expériences n°3 (non décrits dans ce manuscrit) nous avons constaté des rendements différents selon la manière dont était repris le résidu évaporé à sec. Afin de clarifier ces résultats, nous avons décidé de tester l'impact du solvant de reprise sur la réponse obtenue en LC-MS/MS. Ainsi, pour une solution de MeOH 50 % évaporée à sec, nous avons repris le résidu sec avec soit 1 mL de MeOH 50 %, soit avec 0,5 mL d'eau puis 0,5 mL de MeOH 100 %, soit inversement (Annexe 14 page 160). L'expérience a été réalisée en duplicat. Les pertes ont été calculées en quantifiant la PLTX avant évaporation puis après reprise dans les différentes conditions.

2.3 Culture d'*Ostreopsis cf. ovata*

Les souches d'*Ostreopsis cf. ovata* MCCV54 et MCCV55, isolées en 2014 en Méditerranée (Villefranche-sur-Mer), ont été cultivées dans 500 mL de milieu L1 sans silice (Guillard, 1975) avec 1 mL d'extrait de terre (Séchet et al., 2012). Les cultures sont incubées dans des Fernbachs en verre à 27 °C avec une irradiance de 300 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ et une photopériode 14/10 h (Figure 22). Les cellules sont récoltées au bout de 21 jours et sont filtrées sur un tamis de 11 μm (Plastique-TAMIS Nylon DIN4197 w : 11 μm , Mougel) puis les culots sont stockés dans des tubes Falcon à -20 °C. Au total, 35 et 95 g de culots cellulaires des souches MCCV55 et MCCV54 ont été accumulés pour la purification des toxines, ce qui représente environ 35 et 95 L de culture (c.a. 70 à 180 Fernbachs).



Figure 22: Cultures d'*Ostreopsis cf. ovata* en Fernbachs au laboratoire PHYC.

2.4 Optimisation de la durée d'extraction des OVTX intracellulaires

Le protocole d'extraction des toxines à partir de culots cellulaires est basé sur celui de **Brissard et al. (2014)** avec quelques modifications. L'extraction a été réalisée avec un mélange de MeOH/H₂O (1:1, v/v) selon un ratio de 4 mL/g de culot. Pour optimiser l'extraction des OVTX, un même culot d'*Ostreopsis cf. ovata* (MCCV55) a été divisé en portions de 0,5 g (dans des tubes en polypropylène, n = 3 pour chaque condition). Les extractions ont été réalisées à l'aide d'une sonde à ultrasons (Vibra Cell 75115, Bioblock Scientific) pendant 5, 15, 30, 60 et 120 min en mode pulsé (alternance de 10 sec de sonication, 5 sec de pause) et avec une amplitude de 30 % dans un bain de glace. Un essai a également été réalisé sans ultrason en utilisant un agitateur vortex pendant 1 min à 2500 rpm. Les extraits bruts sont ensuite centrifugés (4000 g, 5 min, 4 °C) puis les surnageants sont prélevés. Dans le cas de la sonication, les culots sont rincés deux fois en ajoutant 2 mL de MeOH 50 % et en agitant 5 sec manuellement. Puis les solvants de rinçage sont récupérés après centrifugation (4000 g, 5 min, 4 °C). Dans le cas du vortex, l'extraction est réalisée deux fois supplémentaire comme décrit précédemment. Les surnageants d'un même échantillon sont rassemblés constituant ainsi un extrait brut, puis un aliquot est ultrafiltré sur 0,22 µm (Nanosep MF, Pall) et quantifié par LC-MS/MS. L'ensemble de la procédure est résumé dans le schéma Annexe 15 (page 161).

2.5 Comparaison des méthodes de fractionnement

2.5.1 Présentation des méthodes de fractionnement

Deux techniques de fractionnement des extraits bruts ont été comparées : la chromatographie d'exclusion stérique (SEC) réalisée avec la résine Sephadex LH-20 et la chromatographie flash sur cartouche C₁₈.

La résine Sephadex™ LH-20 (GE Healthcare) est une résine basée sur des molécules de dextran hydroxypropylés formant un maillage polysaccharidique permettant d'obtenir une limite d'exclusion stérique théorique de 4000-5000 Da selon la nature du solvant utilisé pour le conditionnement du gel. C'est donc une approche idéale puisque les OVTX (2632-2722 Da) sont éluées dans les premières fractions chromatographiques mais collectées manuellement (**Brissard et al., 2014**).

La chromatographie flash est une technique de chromatographie (ici en phase inverse) rapide et automatisée qui a l'avantage de supporter de grandes capacités de charge (jusqu'à 1 g d'extrait sec) pouvant permettre de minimiser le nombre de fractionnements. Le CombiFlash est couplé à

un détecteur UV permettant l'identification de fractions d'intérêts (ici les OVTX). L'automatisation permet également d'augmenter la reproductibilité du fractionnement.

2.5.2 Procédures de fractionnement par SEC et chromatographie flash

Les essais de fractionnement ont été effectués avec un même extrait brut divisé en 2, obtenu à partir de 4 g de culots cellulaires de la souche MCCV54 en utilisant la technique d'extraction par vortex décrite précédemment (cf. 2.4). Chacune des méthodes de fractionnement nécessite une préparation particulière des extraits.

Pour le fractionnement par SEC, l'extrait brut MeOH 50 % a été évaporé sous flux d'azote à 30 °C jusqu'à obtenir 1 mL (i.e. l'extrait déposé doit correspondre à 1-2 % du volume total de la colonne) qui est déposé en tête de la colonne ouverte contenant de la résine Sephadex LH-20 (masse : 30 g, hauteur : 72,5 cm ; diamètre : 1 cm). L'élution est réalisée avec du méthanol 100 % (V = 136 mL, pendant 6 heures) et des fractions de 2 mL sont récupérées puis analysées par LC-MS/MS afin de détecter celles contenant les OVTX.

Pour le fractionnement par affinité avec le système CombiFlash, nous avons préparé un dépôt solide. Pour cela, l'extrait brut MeOH 50 % est évaporé à sec en présence de 1,5 g de silice C₁₈ (C₁₈ ODS SPE bulk Sorbent, Agilent) dans un évaporateur rotatif (R-200, Buchi). La masse d'extrait brut sec obtenue était de 103 mg (5,2 % de rendement). L'extrait sec adsorbé sur la silice est déposé dans une cartouche vide (RediSep Rf, Teledyne Isco) puis placé dans le module de chromatographie (CombiFlashRf+, Teledyne Isco). L'extrait est élué au travers d'une colonne Puriflash C₁₈ HP (6 g, Interchim, équilibrée avec du MeOH 30 %) à un débit de 4 mL/min avec le gradient d'eau (solvant A) et de MeOH 100 % (solvant B) suivant : 30 % de B pendant 15 min, 30 à 100 % MeOH pendant 50 min, maintenu à 100 % pendant 35 min, 100 à 30 % pendant 4 min et maintenu à 30 % pendant 10 min (durée totale : 114 min). Ainsi, 100 fractions de 4 mL sont collectées par l'automate dans des tubes en verre. Les fractions obtenues sont ensuite analysées par LC-MS/MS.

Les rendements sont obtenus par comparaison entre la quantité d'OVTX dans l'extrait brut MeOH 50 % et dans les fractions (contenant les OVTX) générées soit par SEC, soit par fractionnement par chromatographie flash.

2.6 Extraction et purification des OVTX

Deux souches d'*O. cf. ovata* avec des profils toxiques différents ont fait l'objet d'étapes d'extraction et de purification : MCCV54 (75 g de biomasse fraîche) qui présente un profil complexe et MCCV55 (35 g) dont le profil est dominé par les OVTX-a et OVT-d (respectivement profils 1 et 2 définis par

Tartaglione et al. (2017)). L'ensemble des procédures d'extraction et de purification sont résumées dans les schémas Figure 23 et Figure 24. A chaque étape, un aliquot est prélevé pour la quantification des OVTX par LC-MS/MS.

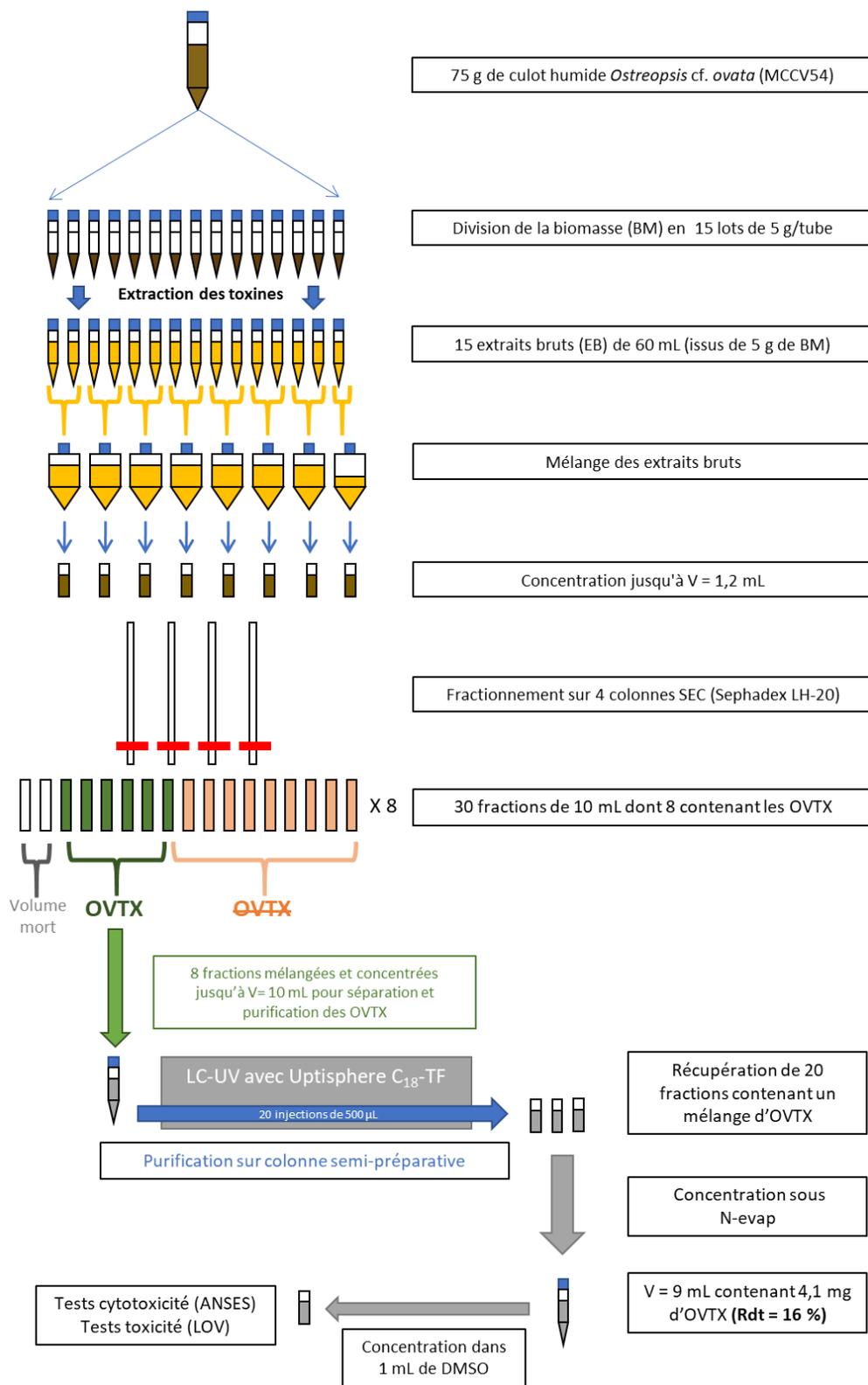


Figure 23 : Procédure d'extraction, de fractionnement et de purification des OVTX pour la souche MCCV54 : mélange d'OVTX.

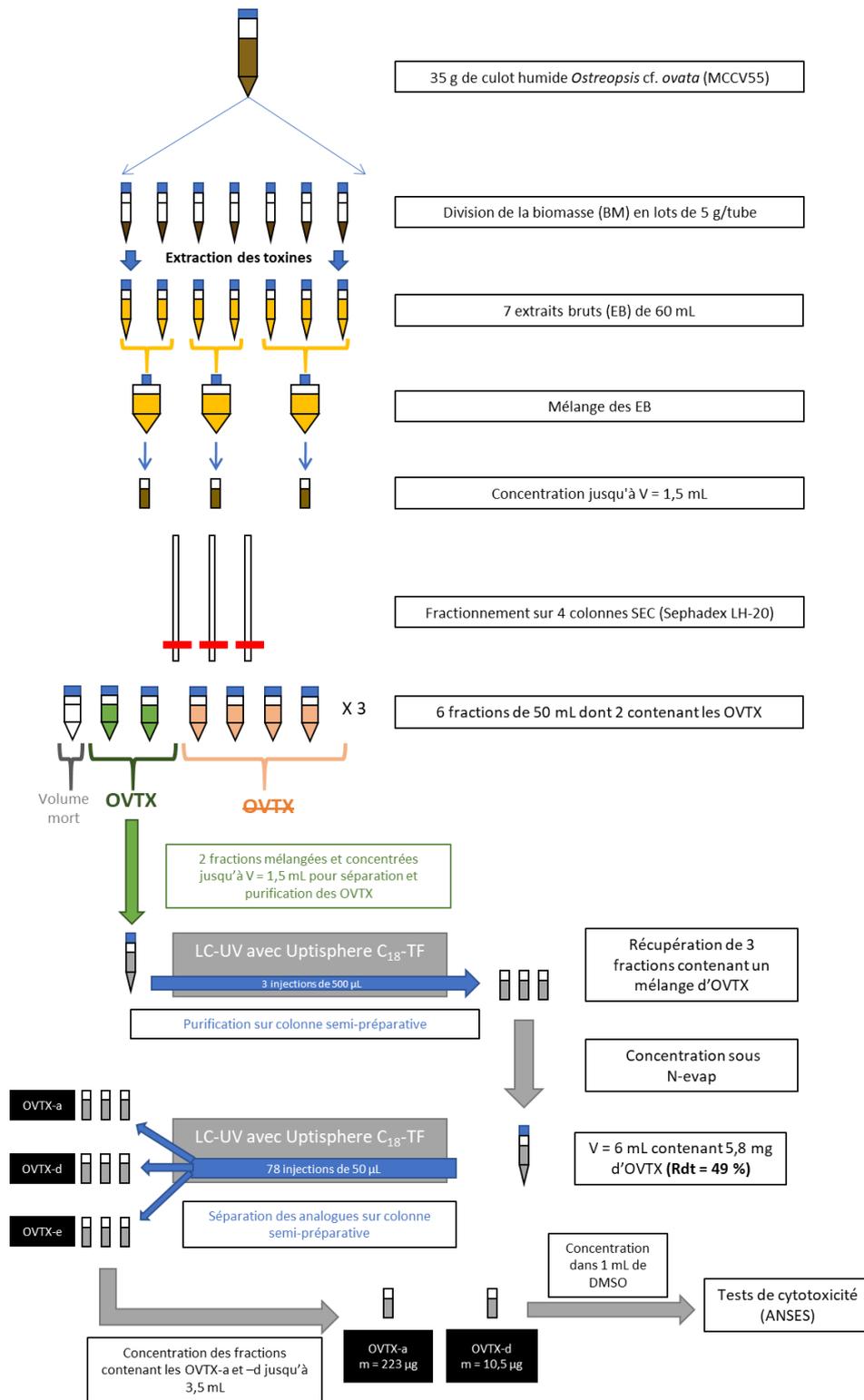


Figure 24 : Procédure d'extraction, de fractionnement et de purification des OVTX pour la souche MCCV55 : OVTX-a et -d.

2.6.1 Extraction des OVTX à partir des culots cellulaires

Les culots humides ont été divisés en lots de 5 g dans des tubes Falcon de 50 mL. Ils ont été extraits avec 20 mL de MeOH/Eau (1:1, v/v), agités par vortex pendant 1 min à 2500 rpm, puis centrifugés (5 min, 4000 g, 4 °C). Le surnageant est collecté, puis les culots sont extraits deux fois supplémentaires selon cette procédure (volume final de 60 mL pour 5 g de biomasse, soit un ratio 1:12). Les extraits sont finalement rassemblés deux à deux, puis stockés 48 h à -20 °C pour permettre la floculation des débris cellulaires. Les extraits sont ensuite centrifugés (20 min, 4000 g, 4 °C) pour éliminer le floculat et évaporés sous azote dans un bain-marie à 30 °C (N-evap, Organomation).

2.6.2 Fractionnement par SEC des extraits bruts pour la purification

Les extraits bruts équivalents à 10 g de culot humide (V = 120 mL) sont concentrés sous flux d'azote à 30 °C jusqu'à obtention d'un volume d'environ 1,2 mL (pour information, cette étape a nécessité 10 jours). Les extraits bruts concentrés sont ensuite fractionnés sur des colonnes ouvertes de SEC (LH-20, 70 x1 cm ; 30 g de résine conditionnés dans du MeOH 100 %) et élués avec du MeOH 100 %. Les débits des colonnes ont été évalués à 0,6-0,7 mL/min.

Les fractions contenant des OVTX sont récupérées, les toxines sont quantifiées par LC-MS/MS, puis concentrées sous flux d'azote à 30 °C.

2.6.3 Purification des OVTX par chromatographie semi-préparative

2.6.3.1 Purification d'un mélange d'OVTX à partir de la souche MCCV54

Le profil de la souche MCCV54 est composé de 5 OVTX (OVTX-a à -e) et compte tenu de leur structure chimique très proche et donc leur comportement physico-chimique similaire, il est difficile de les séparer efficacement (**Ciminiello et al., 2012c**), d'autant plus qu'en chromatographie semi-préparative, la résolution est moins performante qu'en chromatographie analytique. C'est pourquoi, toutes les OVTX issues de la souche MCCV54 ont été récupérées dans une seule fraction, en utilisant des conditions chromatographiques similaires à celles utilisées par **Ciminiello et al. (2012c)** et **Brissard et al. (2015)**.

La purification a été réalisée en utilisant une colonne Uptisphere C₁₈-TF (250 mm x 10 mm, 5 µm, Interchim) maintenue à 25 °C avec un système de chromatographie liquide (Agilent 1160) comprenant un collecteur de fractions et un détecteur UV (1260 Infinity II DAD WR, λ= 233 nm et 263 nm). La détection par UV est une méthode non destructive permettant un suivi de l'éluion des OVTX sans perte, et leur récupération via un collecteur de fractions. Les phases mobiles sont classiques (i.e. solvant A : eau et solvant B : ACN 95% contenant tous les deux 0,2 % d'acide acétique) et le débit de 4 mL/min avec le gradient d'éluion suivant : 20 à 100 % de B pendant 30 min, maintenu 5 min à 100 %

de B, 100 à 20 % de B pendant 5 min et maintenu pendant 5 min pour rééquilibrer la colonne. Des injections successives de 500 µL sont effectuées à partir du concentrat obtenu après l'étape SEC. Les fractions contenant les OVTX, selon le détecteur UV, sont récoltées, puis quantifiées par LC-MS/MS.

Les fractions contenant les OVTX issues de la souche MCCV54 sont finalement concentrées dans 1 mL de DMSO (cf. Annexe 16 page 162) afin d'être utilisées pour les tests de toxicité par l'ANSES et le LOV.

2.6.3.2 Purification des analogues d'OVTX à partir de la souche MCCV55

Le mélange de toxines issues de la souche MCCV55 étant moins complexe a été utilisé afin de purifier individuellement les OVTX-a, -d et -e présentes majoritairement dans ce profil, en utilisant le même système LC-UV et les mêmes conditions d'élution que pour la souche MCCV54. Les OVTX du mélange obtenu ont ensuite été séparées via une nouvelle étape de chromatographie avec un gradient plus lent permettant d'isoler les différents analogues. La pente du gradient a ainsi été significativement réduite : 30 à 33 % de solvant B en 35 min, puis 33 à 90 % de B en 1 min, maintenu 5 min à 90 %, puis 90 à 30 % pendant 1 min et enfin maintenu 5 min à 30 % pour rééquilibrer la colonne. Des injections successives de 50 µL ont été effectuées.

Les fractions 1, 3, 4 et 5 contenant respectivement les OVTX-d, -e, -b et -a sont récoltées en sortie de chromatographie après détection UV (Figure 34 page 154). Comme les OVTX-e et -b n'étaient pas suffisamment résolues (cf.3.4.4), seules les fractions correspondant à l'OVTX-a et l'OVTX-d ont été rassemblées, puis évaporées sous flux d'azote à 30°C (pour information : 8 h/jour pendant environ 3 semaines ont été nécessaires) jusqu'à un volume final de 3,5 mL.

Les deux solutions d'OVTX sont ensuite concentrées dans 1 mL de DMSO (cf. Annexe 16 page 162) pour être utilisées pour des tests de cytotoxicité par l'ANSES dans le cadre du projet ANR Ocean-15.

2.7 Analyses statistiques

La conception et le traitement statistique des plans factoriels sont réalisés avec le logiciel Statgraphics Centurion XV. II.

Pour les données de l'optimisation de la durée d'extraction, la normalité et l'homoscédasticité des données ont été validées avec les tests de Shapiro-Wilk (p -value = 0,35) et Brown-Forsythe (p -value = 0,66) avec le logiciel Sigmaplot 14.0.

3. Résultats et discussion

3.1 Etude de stabilité

3.1.1 Effet du type de solvant, du contenant et de la concentration sur la réponse en LC-MS/MS de la PLTX et sa conservation dans le temps

A J0, seul le solvant de reprise a un effet significatif sur l'aire du pic chromatographique de la PLTX détectée en LC-MS/MS (Figure 25). Après 24 h de conservation à -20 °C, tous les facteurs deviennent significatifs et ces tendances sont conservées jusqu'à la fin de l'expérience après 28 jours (Figure 25). La différence notable entre les données statistiques de J0 et J1 réside dans la significativité des facteurs « contenant » et « concentration ». Donc les phénomènes d'adsorption ou dégradation ou transformation de la PLTX ont lieu rapidement, en moins de 24 h.

Parmi les interactions, seule celle solvant/contenant (AC) a un effet significatif sur les réponses obtenues en LC-MS/MS, dès J0. En dehors de J0, les meilleures réponses (i.e. la plus grande aire du pic de PLTX en LC-MS/MS) obtenues pour chaque facteur sont : l'utilisation de DMSO comme solvant de solubilisation de l'étalon, la concentration « forte » de 2 µg/mL et l'utilisation d'un contenant en polypropylène (PP).

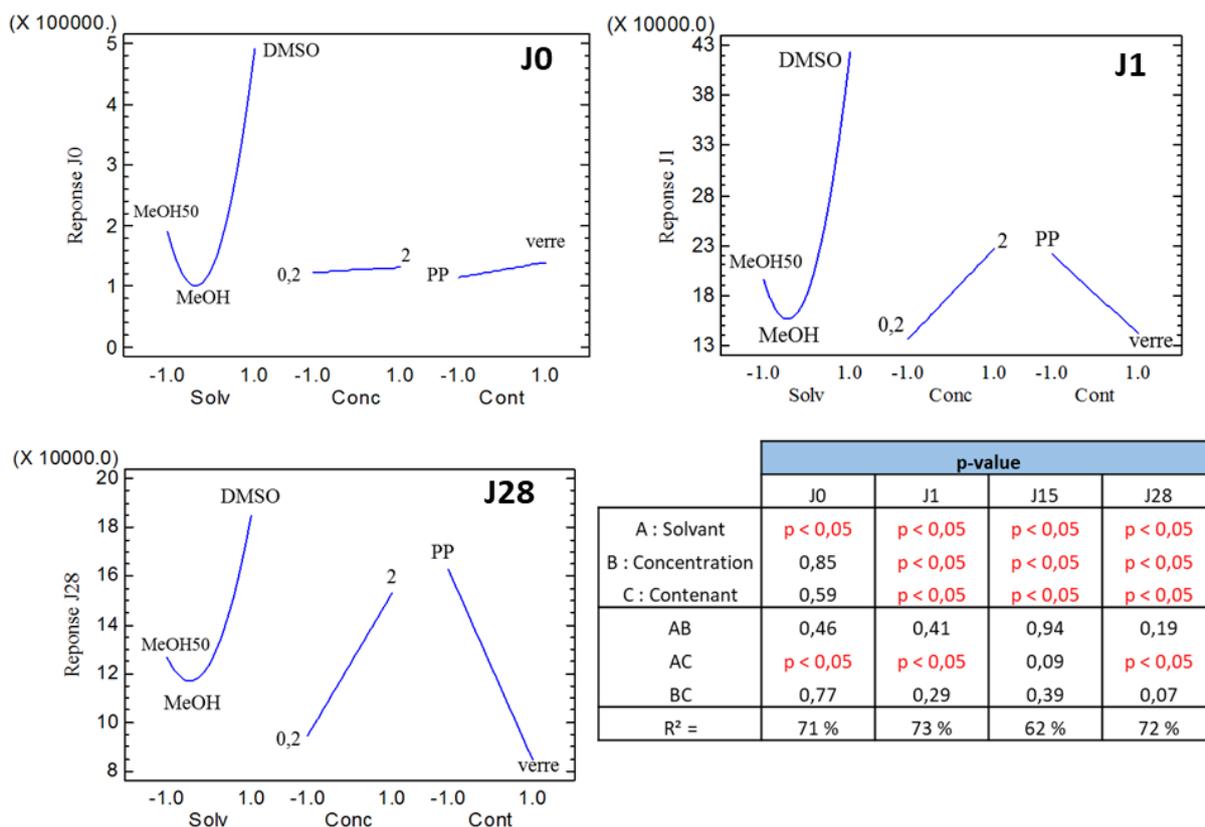


Figure 25 : Graphiques des effets directs sur les aires du pic chromatographique de la PLTX mesurées en fonction des trois facteurs considérés (solvant, contenant, concentration) à J0, J1, J28 et le tableau des ANOVA avec les p-values et R² associés aux différents facteurs et leurs interactions : solvant (MeOH 50 %, MeOH 100 % ou DMSO), concentration (0,2 ou 2 µg/mL) et le contenant (verre ou PP) avec en rouge les facteur significatifs (p-value < 0,05, n = 3).

Les solvants peuvent avoir un effet directement sur la solubilisation de la toxine mais également sur la réponse en LC-MS/MS. Dans notre expérience, la reprise de la PLTX avec du DMSO montre une forte augmentation du signal de la PLTX, mais qui n'est pas nécessairement associée à une meilleure solubilité (Figure 26).

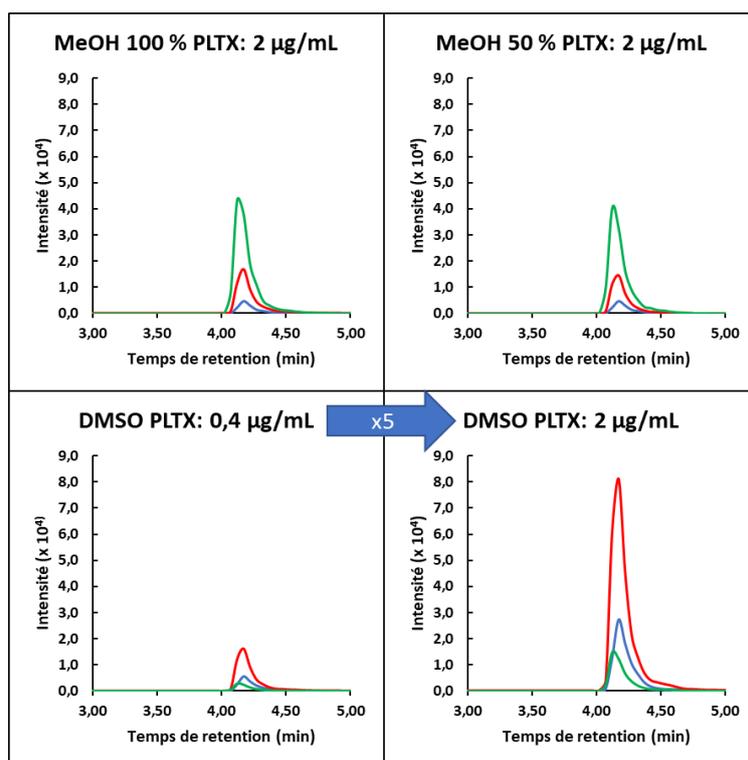


Figure 26 : Chromatogrammes montrant les différences de ratios d'ions pour la PLTX selon le solvant : $[M+2H]^{2+}$ (bleu), $[M+2H-H_2O]^{2+}$ (rouge) et $[M+3H-H_2O]^{3+}$ (vert) dans des vials en PP à des concentrations de 2 µg/mL. Pour le DMSO, la solution a été diluée au 1/5 pour permettre l'injection en LC-MS/MS puis les résultats ont été multipliés par 5 pour obtenir une concentration équivalente à 2 µg/mL.

Dans notre cas, la transition majoritaire observée ($1331 \rightarrow 327 m/z$, ion $[M+2H-H_2O]^{2+}$, en rouge sur la Figure 26) est différente de celle obtenue dans le MeOH 50 et 100 % ($887 \rightarrow 327 m/z$, ion $[M+3H-H_2O]^{3+}$, en vert sur la Figure 26) : ce changement de transition majoritaire, accompagné d'une augmentation du signal, peut s'expliquer par un phénomène de « charge stripping » décrit par **Hahne et al. (2013)**. Celui-ci explique que la faible tension de surface du DMSO, présent en faible quantité dans les phases mobiles, permet d'obtenir des gouttelettes plus uniformes lors de la formation du spray pendant l'étape d'ionisation avec un système de type ESI (Electrospray ionization) en spectrométrie de masse, permettant ainsi d'homogénéiser la répartition des charges. De la sorte, le DMSO induit une diminution des états de charge lors de l'ionisation, favorisant ainsi l'obtention d'ions de charge réduite (ici **dichargés**) par rapport aux ions de charge plus élevée (ici **trichargés**), ce qui se traduit par une augmentation de signal. Pour ces raisons, une transition issue d'un ion précurseur dichargé constitue l'essentiel du signal LC-MS/MS de la PLTX en présence de DMSO (dans l'échantillon ou les phases mobiles) au cours de l'analyse. Ce phénomène a déjà été décrit pour des molécules multi-chargées comme les peptides (**Hahne et al., 2013; Judak et al., 2017**).

Comme le solvant peut avoir un impact sur la solubilité et/ou sur la réponse en LC-MS/MS (i.e. effet de « charge stripping » du DMSO), il est difficile de faire la part de choses parmi les résultats de ce plan

d'expériences et de dissocier l'effet d'une moins bonne solubilité de la PLTX de celui d'un comportement différent lors de l'ionisation par ESI.

En utilisant du DMSO comme solvant, nous avons remarqué que ce dernier pouvait persister dans l'appareil (même dilué à 20 %). L'analyse des solutions de PLTX s'est faite dans un ordre aléatoire et certains échantillons sans DMSO ont été analysés juste après d'autres qui en contenaient. Comme nous avons montré que le DMSO pouvait augmenter le signal obtenu, la persistance de ce solvant dans le système a pu augmenter l'intensité de certaines réponses et ainsi augmenter la variabilité des résultats obtenus pouvant expliquer les R^2 de 60-70 % obtenus.

Les données décrites précédemment nous informent des meilleures conditions à un moment précis (e.g. à J0 ou à J28) mais ne prennent pas en compte l'effet temporel de la réponse et donc la stabilité de la PLTX dans ces différentes conditions. En prenant en compte l'effet temps dans notre analyse statistique, nous avons constaté que ce dernier était significatif (Figure 27). Cette diminution du signal au cours du temps pourrait refléter une possible adsorption, dégradation ou transformation de la PLTX durant l'expérience.

L'interaction solvant/contenant (AC) reste significative, tandis que l'interaction concentration/contenant (BC) devient significative suggérant qu'il existe des variations importantes dans les résultats liés aux autres facteurs (i.e. temps et solvant).

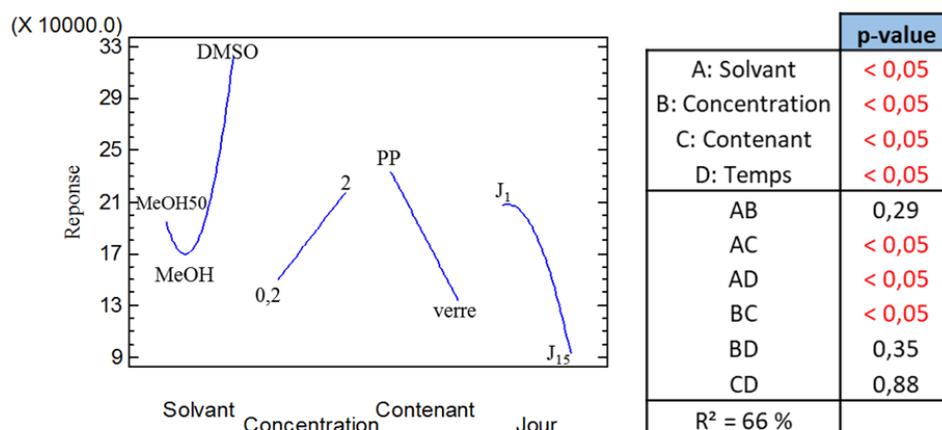


Figure 27 : Graphique des effets directs sur les aires de pics de la PLTX en LC-MS/MS en fonction des quatre facteurs considérés entre J1 et J15 et tableau des ANOVA avec les p-values et R^2 associés aux différents facteurs (solvant, contenant, concentration et temps) et leurs interactions.

Concernant les pertes relatives, on observe une diminution significative du signal de la PLTX au cours du temps avec des pertes allant de 26 à 69 % (Tableau 16) après 28 jours. De façon similaire, **Brissard et al. (2015)** rapportent des pertes de 30 % et de 83 % pour des OVTX conservées dans du MeOH 50

et 100 %, dans des contenants en verre pendant 2 mois. Dans notre cas, les pertes dans les mêmes conditions sont respectivement de 32-39 % et de 27-50 % pour le MeOH 50 et 100 %. Selon **Brissard (2014)**, la présence d'un groupement amine sur la molécule pourrait favoriser les interactions avec le verre et engendrer des phénomènes d'adsorption. Ainsi, les pertes constatées pourraient correspondre à une adsorption progressive de la PLTX sur les parois du contenant.

Lors de notre expérience, nous avons utilisé du verre silanisé pour diminuer les interactions qui auraient pu avoir lieu. Malgré ça, des pertes semblent tout de même avoir lieu. Des pertes moins importantes ont également lieux dans les contenants en PP, suggérant que l'adsorption n'est pas le seul facteur pouvant entraîner des pertes.

Tableau 16 : Pertes relatives (%) en PLTX à J4, J15 et J28 par rapport à J1 pour les différentes conditions de conservation.

Solvant	Contenant	Concentration (µg/mL)	Pertes relatives au cours du temps (%)		
			J4	J15	J28
MeOH 100 %	Verre	0.2	-14%	-2%	27%
MeOH 100 %	Verre	2	16%	39%	50%
MeOH 100 %	PP	0.2	1%	7%	27%
MeOH 100 %	PP	2	6%	15%	26%
MeOH 50 %	Verre	0.2	24%	21%	39%
MeOH 50 %	Verre	2	7%	15%	32%
MeOH 50 %	PP	0.2	5%	16%	34%
MeOH 50 %	PP	2	8%	20%	37%
DMSO	Verre	0.2	19%	49%	69%
DMSO	Verre	2	30%	54%	53%
DMSO	PP	0.2	16%	33%	51%
DMSO	PP	2	26%	38%	54%

Même si le DMSO offrait une meilleure réponse en LC-MS/MS, c'est le solvant dans lequel la conservation de la PTLX est la moins bonne (Tableau 16) avec des pertes de 51-69 % en 28 jours. Le fait que le DMSO engendre le plus de pertes peut s'avérer problématique pour la réalisation des tests de toxicité, où les toxines sont généralement solubilisées dans le DMSO puisque les concentrations réelles d'exposition risquent d'être surestimées.

Le solvant offrant une meilleure conservation de la PLTX au cours du temps semble être le MeOH 100 %, dans un contenant en PP, où 26-27 % de pertes ont été observés en 28 jours. La combinaison MeOH 100 % dans un contenant en verre montre jusqu'à 50 % de pertes en fonction de la concentration et serait donc à éviter. Concernant le MeOH 50 %, il s'agit du solvant qui montre les

perdes les plus homogènes selon les facteurs testés, variant de 32 à 39 % selon les conditions (Tableau 16).

Ce premier plan d'expériences nous révèle que des pertes du signal de la PLTX sont systématiquement observées au cours du temps, quel que soit le solvant, le contenant ou la concentration de départ. Par rapport au MeOH 50 et 100 %, le DMSO semble produire la meilleure réponse de la PLTX en LC-MS/MS mais provoque les pertes les plus importantes dans le temps. De plus, nous avons pu montrer que la PLTX conservée dans du MeOH 100 % et un contenant en verre était également à éviter. Parmi ces conditions, le PP semble être le contenant le plus adéquat.

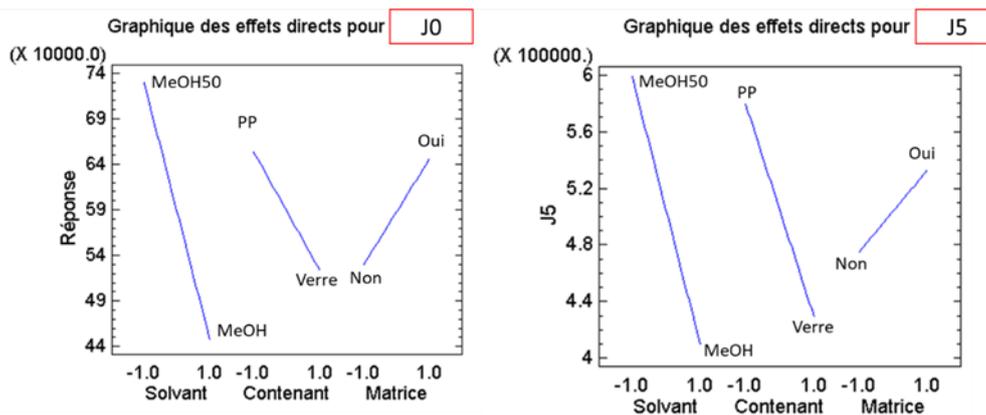
Nos résultats permettent aussi d'estimer qu'une gamme de PLTX utilisée pour la quantification en LC-MS/MS ne devrait pas être conservée plus de 15 jours si l'on estime que des pertes jusqu'à 20 % sont acceptables.

Finalement, ces résultats basés sur la stabilité d'une molécule pure ne sont peut-être pas représentatifs des extraits d'*Ostreopsis* qui contiennent de nombreuses autres molécules composant cette matrice.

3.1.2 Etude de l'effet matrice sur la stabilité de la PLTX

Lors du processus de purification, les OVTX sont progressivement isolées des autres molécules intracellulaires composant la matrice. Or, l'effet de cette matrice sur la conservation n'a jamais été rapporté dans la littérature. Le but de ce plan d'expériences était de vérifier si les molécules d'une matrice *Ostreopsis* pouvaient avoir un effet sur la conservation de la PLTX dans du MeOH 50 ou 100 % et selon le type de contenant, verre ou PP.

Dès J0, tous les facteurs sont significatifs (Figure 28) mais à partir de J5, l'effet matrice ne l'est plus. Ces tendances sont conservées jusqu'à J41. Cela nous permet de déduire que la matrice n'a alors pas d'effet sur la réponse de la PLTX en LC-MS/MS.



	p-value						
	J0	J1	J5	J8	J15	J28	J41
A: Solvant	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05
B: Contenant	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05
C: Matrice	< 0,05	< 0,05	0,06	0,18	0,06	0,17	0,14
AB	< 0,05	0,08	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05
AC	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05
BC	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05
R ² =	93 %	91 %	95 %	96 %	94 %	93 %	94 %

Figure 28 : Graphiques des effets directs sur les aires du pic de la PLTX mesurées à J0, J5 et les p-values et R² associés aux différents facteurs et leurs interactions : solvant (MeOH 50 % ou MeOH 100 %), contenant (Verre ou PP) et présence de matrice avec en rouge les facteurs significatifs (p -value < 0,05, $n = 2$).

Concernant les interactions, elles sont toutes significatives au cours du temps (sauf à J1 pour l'interaction AB, sûrement due à une variabilité analytique). Ces résultats montrent que tous les facteurs sont donc liés entre eux.

Dans ce plan d'expériences, le modèle explique entre 91 et 96 % de la variabilité des résultats contrairement au plan précédent dont les R² variaient entre 62 et 73 % (Figure 25 et Figure 27). Cette différence peut s'expliquer par l'absence de DMSO dans ce second plan d'expériences, limitant l'impact sur le signal et la variation d'un échantillon à l'autre.

De la même manière que le premier plan d'expériences, l'ajout du facteur temps révèle qu'il est significatif (Figure 29), ce qui signifie que des pertes ont bien lieu pendant toute la durée de l'expérience. Pour chacun des facteurs, la réponse la plus élevée a été mesurée dans du MeOH 50 %, dans un contenant en PP (conformément au premier plan factoriel) et en présence de matrice.

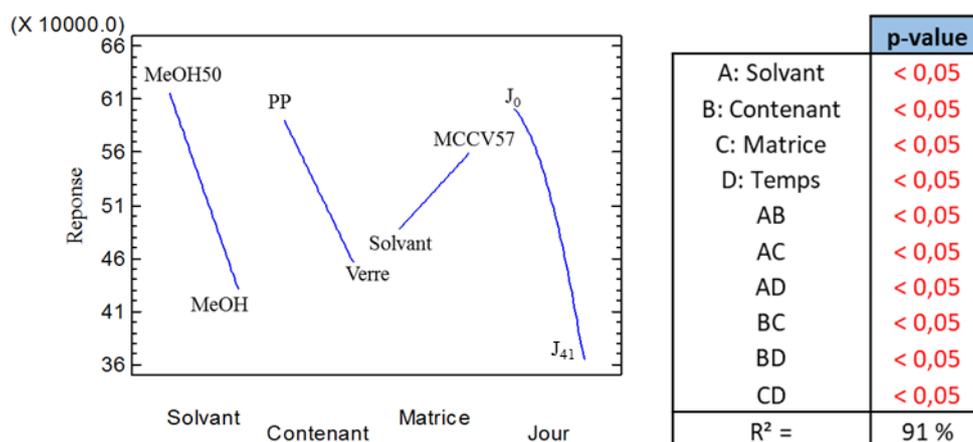


Figure 29 : Graphique des effets directs sur les aires de pics de la PLTX en LC-MS/MS en fonction des quatre facteurs considérés entre J0 et J41 et tableau des ANOVA avec les p-values associés aux différents facteurs (solvant, contenant, présence de matrice MCCV57 et durée de conservation) et leurs interactions.

D'après le Tableau 17, des pertes sont observées dans le temps quel que soit le type de conservation. A 41 jours, les pertes varient de 27 % (MeOH 100 % - sans matrice - contenant en PP) à 44 % (MeOH 50 % - sans matrice - contenant en verre).

Tableau 17 : Pertes relatives en PLTX à J28 par rapport à J0 pour les différentes conditions de conservation. n.c. : résultats non calculés.

Solvant	Contenant	Matrice	Pertes relatives au cours du temps (%)				
			J1	J5	J8	J15	J41
MeOH 50 %	Verre	Oui	1%	20%	24%	15%	43%
MeOH 50 %	Verre	Non	12%	23%	39%	30%	44%
MeOH 50 %	PP	Oui	0%	22%	46%	23%	42%
MeOH 50 %	PP	Non	-4%	6%	18%	9%	32%
MeOH 100 %	Verre	Oui	-5%	15%	21%	9%	39%
MeOH 100 %	Verre	Non	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
MeOH 100 %	PP	Oui	-7%	10%	17%	8%	35%
MeOH 100 %	PP	Non	-13%	6%	7%	3%	27%

La condition MeOH 100 % - sans matrice - contenant en verre montrait tout au long de l'expérimentation des intensités 6 fois plus faibles et beaucoup plus variables que les autres conditions (Figure 30), les pertes n'ont donc pas été évaluées (n.c. dans la Tableau 17). De plus, d'après le premier plan d'expériences, il s'agit d'une des conditions les moins favorables à la conservation de la PLTX avec 50 % de pertes mesurées (cf. Tableau 16).

Malgré l'effet positif de la matrice sur le signal, ce dernier s'estompe rapidement et nous avons remarqué que le seul véritable intérêt de la présence de matrice était pour la condition MeOH 100 % dans un contenant en verre (en gris sur la Figure 30) où elle pourrait empêcher ou réduire la dégradation ou l'adsorption de PLTX sur le verre. Comme lors du premier plan d'expériences, cette combinaison de facteurs induit des résultats très variables entre réplicats, difficiles à interpréter.

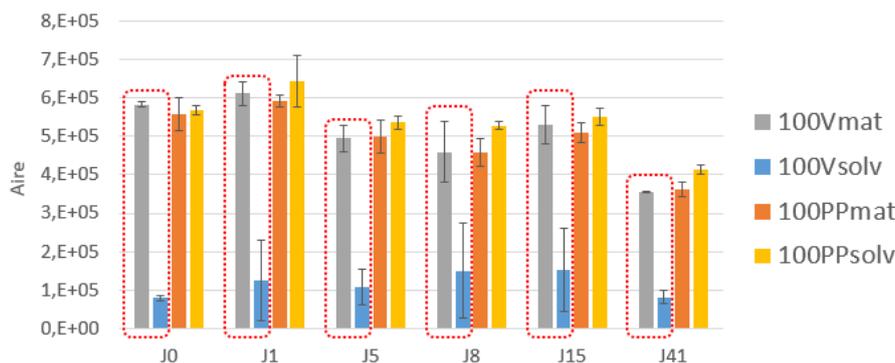


Figure 30 : Aires des pics de PLTX en fonction du temps dans du MeOH 100%, selon le contenant (V = verre et PP) et la présence ou non de matrice (mat vs. solv). Les barres d'erreurs représentent les écart-types (n = 2).

Les résultats correspondant à notre protocole d'extraction des culots cellulaires lors du processus de purification (i.e. MeOH 50 % - avec matrice) montrent des pertes de 42-43 % en 41 jours quel que soit le contenant. Ce qui signifie que dans la mesure du possible, les extraits bruts ne doivent pas être conservés sur une longue durée et qu'ils doivent être fractionnés et analysés rapidement afin de limiter les pertes.

La meilleure stabilité sur 41 jours (i.e. 27 %) a été obtenue lorsque la PLTX était diluée dans du MeOH 100 % - contenant en PP - sans matrice. Cette condition s'apparente aux fractions obtenues après le fractionnement par SEC, lorsque les OVTX sont diluées dans du MeOH 100 % avec une partie de la matrice purifiée. Même s'il s'agit de la meilleure condition de conservation, il est préférable de traiter ces échantillons dans des délais réduits afin de limiter les pertes (dans l'idéal sous 15 jours).

Cette expérience nous montre également qu'avec l'avancée de la purification, la présence ou non de matrice, n'accentuera pas de manière significative les pertes liées à la durée de conservation. Autrement dit, les molécules de la matrice ne protègent pas des dégradations, transformations ou adsorption occasionnées et révélées par le facteur temps.

3.1.3 Effet de l'évaporation

Les évaporations constituent des étapes clés et sensibles dans le processus de purification des OVTX. Elles interviennent notamment pour concentrer les extraits bruts MeOH 50 % avant dépôt sur SEC et après l'étape de SEC pour concentrer les fractions MeOH 100 % et réduire le volume à injecter pour la chromatographie semi-préparative.

Dans ce plan factoriel, la concentration (réduction du volume) et l'évaporation à sec sous flux d'azote ont été comparées en fonction du solvant (MeOH 50 % ou 100 %) de la présence de matrice et d'acide acétique. Ici, la réponse mesurée était les pertes contrairement aux plans factoriels précédents qui s'intéressaient à l'aire du pic chromatographique (i.e. une réponse plus forte signifie plus de perte).

Le solvant (MeOH 50 %), l'absence de matrice et l'évaporation à sec engendrent des pertes significatives (Figure 31). On notera que la présence d'acide acétique n'a pas d'effet notable sur les pertes alors, qu'à l'origine, nos collaborateurs avaient vivement déconseillé d'utiliser de l'acide (i.e. nombreux groupements hydroxyles sensibles à l'acidité pour la PLTX). De plus, l'interaction solvant/matrice (AC) reste toujours significative comme pour les plans d'expériences précédents.

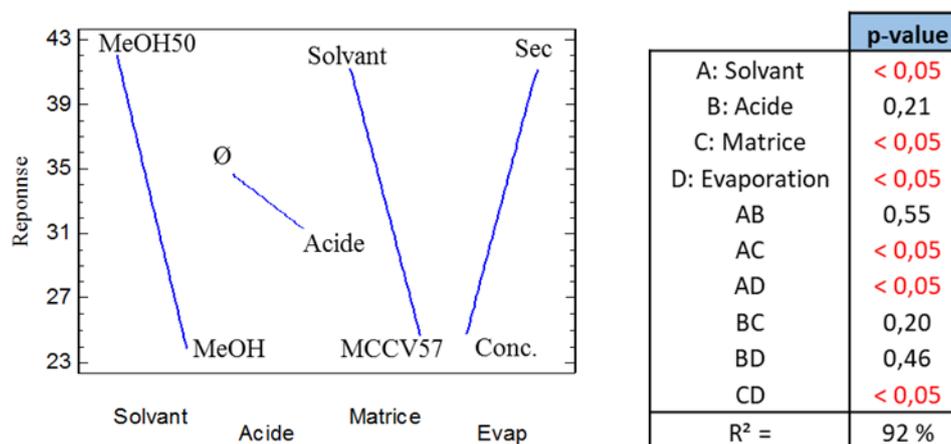


Figure 31 : Graphique des effets directs sur les pertes obtenues lors de l'évaporation (différence des aires avant et après évaporation/reprise) et le tableau des ANOVA avec les p-value associées aux différents facteurs : Solvant, présence d'acide acétique, de matrice (MCCV57) et du type d'évaporation (i.e. concentration jusqu'à V = 200 µL ou évaporation à sec) avec en rouge les facteur significatif ($p\text{-value} < 0,05$, $n = 2$).

Dans l'ensemble, les pertes de PLTX sont comprises entre 20 et 34 % (Tableau 18), sauf pour les 2 combinaisons MeOH 50 % - sans matrice - évaporation à sec, avec et sans acide, où des pertes importantes de 78-90 % ont été mesurées. Ce dernier résultat peut expliquer la significativité des interactions solvant/évaporation (AD) et matrice/évaporation (CD) vues précédemment.

Tableau 18 : Pertes relatives en PLTX (moyennes et écart-types, n = 2) observées lors de concentration (en gris) ou l'évaporation à sec (en blanc) à partir de solutions de de PLTX dans du MeOH 50 % et MeOH 100 %, avec/sans acide acétique et avec/sans matrice.

Solvant	Acide	Matrice	Type évaporation	Pertes relatives (%)	
				Moyenne	Ecart-type
MeOH 50 %	0,2%	Oui	concentration	20	6,8
MeOH 50 %	0,2%	Oui	à sec	29	3,5
MeOH 50 %	0,2%	Non	concentration	32	0,3
MeOH 50 %	0,2%	Non	à sec	78	0,3
MeOH 50 %	-	Oui	concentration	24	4,6
MeOH 50 %	-	Oui	à sec	30	2,5
MeOH 50 %	-	Non	concentration	34	0,0
MeOH 50 %	-	Non	à sec	90	0,7
MeOH 100 %	0,2%	Oui	concentration	24	4,9
MeOH 100 %	0,2%	Oui	à sec	27	1,8
MeOH 100 %	0,2%	Non	concentration	20	4,5
MeOH 100 %	0,2%	Non	à sec	21	9,8
MeOH 100 %	-	Oui	concentration	23	3,4
MeOH 100 %	-	Oui	à sec	22	14,5
MeOH 100 %	-	Non	concentration	22	4,8
MeOH 100 %	-	Non	à sec	33	0,4

Lors de l'évaporation à sec de la PLTX en solution dans du MeOH 50 % en présence de matrice, nous avons observé des pertes de 29 %. Nos résultats concordent avec ceux de **Brissard et al. (2015)** qui observait 33 % de pertes d'OVTX dans les mêmes conditions. Cependant, en absence de matrice, nos pertes s'élèvent à 78 %, suggérant que la matrice a pu avoir un effet de protecteur. Cette conclusion reste à nuancer, étant donné que des réponses variables peuvent être obtenues selon la façon dont est resolubilisé le résidu sec. En effet, lors des tests complémentaires nous avons pu constater que la reprise d'un résidu sec dans du MeOH 50 % pouvait engendrer jusqu'à 100 % de perte. Alors qu'en ajoutant successivement de l'eau puis MeOH 100 % et inversement, les pertes obtenues s'élevaient à $47 \pm 7,4$ % et $36 \pm 1,4$ % (Tableau 8). Les mécanismes expliquant ces observations restent à définir.

Tableau 19 : Pertes en PLTX après évaporation d'une solution de PLTX dans du MeOH 50 % et repris avec du MeOH 50 %, de l'eau puis du MeOH 100 % et du MeOH 100 % puis de l'eau (n=2).

	Pertes relatives (%)		
Reprise : 1 mL MeOH 50 %	100	±	0,0
Reprise : 0,5 mL d'eau puis 0,5 mL MeOH 100 %	47	±	7,4
Reprise : 0,5 mL MeOH 100 % puis 0,5 mL d'eau	36	±	1,4

Les pertes mesurées lorsque le résidu sec est repris avec du MeOH 100 % puis de l'eau (i.e. pertes minimales) sont du même ordre de grandeur que celles observées pour un extrait concentré sans matrice dans le plan factoriel sur l'effet de l'évaporation (i.e. 32-34 % dans le Tableau 18). Finalement,

le type d'évaporation ne semble pas avoir d'impact sur les pertes et seule la reprise du résidu sec semble être critique. Cette constatation va à l'encontre de **Brissard et al. (2015)** qui recommandait d'éviter l'évaporation à sec des extraits.

En sortie de chromatographie semi-préparative, les fractions contenant les OVTX correspondent à un mélange d'acétonitrile et d'eau. Nous avons donc effectué une expérience complémentaire, pour évaluer les pertes de PLTX liées à l'évaporation de ce mélange. Puisqu'en fin d'évaporation le mélange ne contient plus que de l'eau (comme pour le MeOH 50%) nous avons ajouté une condition à notre étude ou la PLTX est évaporé dans de l'eau.

Pour l'évaporation du mélange ACN/eau, les pertes constatées sont faibles, de l'ordre de $14 \pm 6\%$ et $8 \pm 4\%$ respectivement pour l'évaporation à sec et la concentration (Tableau 20). Ces dernières sont plus faibles que celles observées dans du MeOH 50 et 100 % sans matrice (i.e. 20-34 % selon les conditions Tableau 18).

Tableau 20 : Pertes associées à l'évaporation (concentration ou à sec) puis la reprise de PLTX dans un mélange ACN/Eau (70 : 30 v/v) et d'eau.

Solvant	Evaporation	Pertes relatives (%)		
ACN/Eau (70:30 v/v)	À sec	14	±	6
ACN/Eau (70:30 v/v)	Concentration	8	±	4
Eau	À sec	-13	±	53
Eau	Concentration	-34	±	14

Pour les solutions contenant de l'eau, les aires mesurées même avant évaporation étaient 17 fois moins importantes que celles dans l'ACN/Eau et proches de la limite de détection (1 ng/mL). Après évaporation, elles étaient légèrement supérieures d'où les « gains » observés. Les rendements et donc les pertes, pour cette condition, ne peuvent pas être interprétés.

Le très faible signal obtenu lors du dopage de la PLTX dans l'eau pourrait s'expliquer par sa mauvaise solubilisation dans ce solvant. De plus, la PLTX pourrait adopter différentes formes ou espèces ioniques en solution aqueuse, la formation de dimère a notamment été suggérée (**Inuzuka et al., 2007**), ce qui ne la rendrait pas détectable par la méthode MRM utilisée. Cependant, dans l'expérience complémentaire précédente, nous avons vu que l'ajout d'eau puis de MeOH 100 % engendrait moins de perte après évaporation par rapport au MeOH 50 %. Le méthanol pourrait alors avoir un effet positif sur la formation des ions recherchés en MRM ou favoriser la solubilisation de PLTX ayant éventuellement été adsorbée au contenant. Malheureusement, dans la présente expérience, l'ajout de MeOH n'a pas été envisagé pour tester cette hypothèse.

Même si ces résultats montrent des pertes à l'évaporation relativement faibles par rapport à celles observées lors du plan d'expériences numéro 3 (i.e. < 20 %), ces dernières n'ont pas été évaluées sur de longues périodes.

Malheureusement, dans ces expériences, le temps d'évaporation n'a pas pu être testé comme facteur, alors qu'il pourrait expliquer certaines pertes (dégradation, adsorptions ou transformations) constatées durant le processus de purification. En effet, les évaporations du MeOH 50 % et de l'ACN/eau restent longues (plusieurs jours ou semaines) à cause de la présence d'eau. La longue exposition des extraits à la température de 30 °C pourrait également être la cause des d'une des parties des toxines.

3.2 Optimisation de la durée d'extraction des OVTX

Le protocole d'extraction des OVTX à partir de cellules d'*Ostreopsis* utilisé initialement au laboratoire reposait sur une sonication de 80 min (2 × 40 min) en mode pulsé (10 sec on et 5 sec off), soit une durée totale de 120 min (Amzil et al., 2012; Brissard et al., 2014; Brissard et al., 2015). De plus, dans la littérature, de nombreuses études utilisent les ultrasons avec des durées très variables allant de 2 à 120 min pour lyser les cellules et extraire les OVTX (Tableau 21). Avec cette optimisation, nous avons cherché à réduire la durée de sonication pour améliorer le débit d'extraction des échantillons.

Tableau 21 : Temps de sonication utilisé dans la littérature pour extraire les OVTX à partir de culots cellulaires.

Durée de sonication en mode pulsé (min)	Références
2	Pezzolesi et al., 2016
3	Ciminiello et al., 2006; Ciminiello et al., 2008
5	Pavaux et al., 2019
6	Ciminiello et al., 2010
10	Tartaglione et al., 2016b; Tartaglione et al., 2017
15	Pavaux et al., 2019; Tibirićá et al., 2019
30	Guerrini et al., 2010; Accoroni et al., 2011; Ciminiello et al., 2012c; Ciminiello et al., 2012d; Pezzolesi et al., 2012; Honsell et al., 2013
40	Ternon et al., 2018
105	García-Altare et al., 2015
120	Amzil et al., 2012; Séchet et al., 2012; Brissard et al., 2014

Les résultats (Figure 32) montrent une diminution de la quantité d'OVTX avec l'augmentation de la durée de sonication, notamment après de 30 min (ANOVA, *p-value* < 0,05, *n* = 3). Les concentrations mesurées diminuent de 52 ± 4,3 µg/mL pour la condition sans sonication (3 min au vortex) à 31 ± 2,6

µg/mL pour l'extraction avec 120 min de sonication, soit une diminution de 40 %. L'extraction au vortex est plus pratique et tout aussi efficace que 5 ou 10 min de sonication.

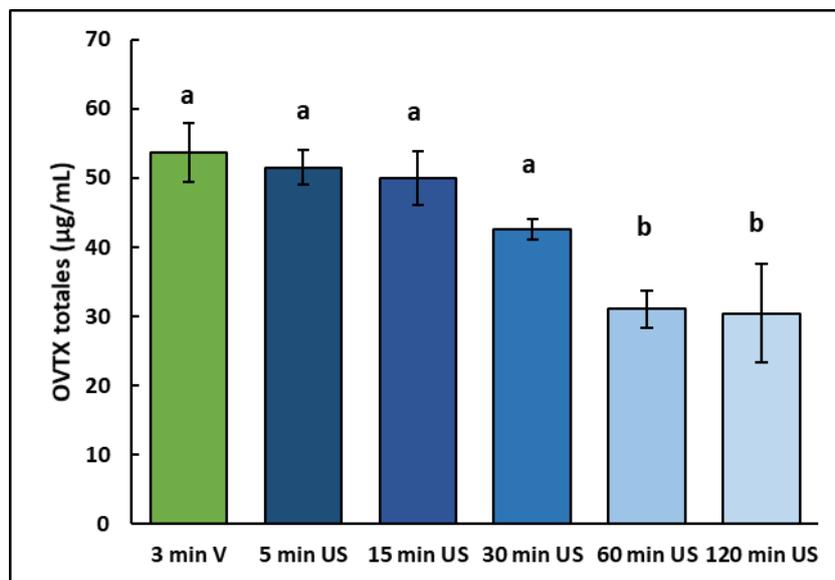


Figure 32 : Concentrations en OVTX totales dans des extraits obtenus à partir de 0,5 g de biomasse de la souche MCCV55 selon différentes conditions d'extraction : en vert 1 min de vortex (V) (sans sonication) et en bleu 5, 15, 30, 60 et 120 min sous ultrasons (US) en mode pulsé (10 sec on, 5 sec off). Les lettres montrent une différence significative (p -value < 0,05, $n = 3$).

Selon un protocole d'extraction similaire au notre (i.e. extraction solide-liquide avec du MeOH 50 %, 3 min de sonication puis deux étapes de rinçage), **Ciminiello et al. (2006)** ont évalué des pertes de 2 à 9 %, en accord avec nos résultats, confirmant qu'une courte période d'ultrasons ne dégrade pas ou peu les toxines.

Dans un certain nombre de publications (e.g. **Guerrini et al., 2010; Accoroni et al., 2011; Pezolesi et al., 2012**), les auteurs utilisent la même procédure que **Ciminiello et al. (2006)** mais avec une durée de sonication de 30 min (au lieu de 3 min) et considèrent que leur rendement reste. Même si elle n'est pas significative, nous observons quand même une diminution des quantités de toxines détectées après 30 min de sonication. Il est donc important d'évaluer les pertes ou rendements d'un protocole précis pour éviter les biais dans les quantifications rapportées (e.g. une possible surestimation des rendements d'extraction induisant une sous-estimation des quantités rapportées pour les travaux cités précédemment). Cependant, d'autres facteurs pourraient avoir un impact sur les quantifications des toxines comme le ratio nombre de cellules/volume de solvant ou l'amplitude sélectionnée ainsi que l'intensité de la sonication.

Les extractions assistées par ultrasons peuvent provoquer des points de chaleur intense (> 5000 °C) au niveau de la sonde (**Suslick, 1994**) et des réactions radicalaires pouvant oxyder les molécules (**Petrier**

et al., 1992). Ces deux mécanismes pourraient avoir participé à la dégradation des OVTX et expliquer les diminutions observées pour des durées plus longues de sonication.

La sonication est une étape qui peut s'avérer chronophage. Au-delà de sa durée, la disponibilité du matériel et son nettoyage entre chaque utilisation sont nécessaires. A l'inverse, les agitateurs vortex sont peu coûteux et ne nécessitent pas d'étape de nettoyage entre chaque utilisation. Cette technique a donc été conservée au laboratoire pour les extractions routinières d'OVTX.

Cependant, l'usage de la sonication d'une durée inférieure à 30 min peut être envisagé pour les extractions de toxines issues de cellules récupérées sur des filtres (e.g. en microfibres de verre de type GF/F, Whatman). La sonication permet ainsi de désagréger les filtres et de favoriser la mise en contact de cellules avec le solvant, ce qui n'est pas possible avec l'agitation par vortex puisque les filtres se collent aux parois des contenants. Cette procédure de sonication des filtres a été utilisée dans **Gémin et al. (2020)** de cette thèse pour extraire les toxines des échantillons terrains.

3.3 Comparaisons des méthodes fractionnement des extraits bruts : SEC vs. Chromatographie flash

Dans la littérature, deux méthodes de fractionnement ont été décrites comme première étape de purification après l'extraction des toxines : la chromatographie d'affinité (**Ciminiello et al., 2012c**) et la chromatographie d'exclusion stérique (SEC) (**Brissard et al., 2014; Brissard et al., 2015**).

La chromatographie d'affinité, avec le système CombiFlash, présente les avantages de réaliser une élution en un temps raisonnablement court (2 heures), d'avoir une collecte des fractions automatisée et une capacité de charge jusqu'à 1 g d'extrait sec. Avec cette technique, les molécules sont séparées en fonction de leur affinité avec la phase stationnaire (ici, phase inverse de type C₁₈). Pour la SEC sur colonne ouverte, la récupération des fractions est manuelle et longue (entre 6 et 7 heures) mais permet de fractionner les molécules en fonction de leur taille. Les OVTX sont des grosses molécules (2680 Da pour l'OVTX-a) qui sont donc éluées en premier avec la phase Sephadex LH-20 dont le seuil de coupure est compris entre 4000 et 5000 Da. Cette technique a déjà été utilisée avec succès au laboratoire lors de la purification d'OVTX (**Brissard et al., 2014; Brissard et al., 2015**), puisque de bons rendements de l'ordre de 85 % ont été obtenus.

Le fractionnement avec la colonne SEC a permis de récupérer 323 µg de toxines dans 88 mL de MeOH 100 % alors que 411 µg dans 26 mL ont été récupérés avec la chromatographie d'affinité dans un mélange de MeOH et d'eau (79 à 96 % de MeOH) (Figure 33). Les rendements respectifs sont de 79 et 84 %, soit similaires à **Brissard et al. (2014)** (i.e. 85 %).

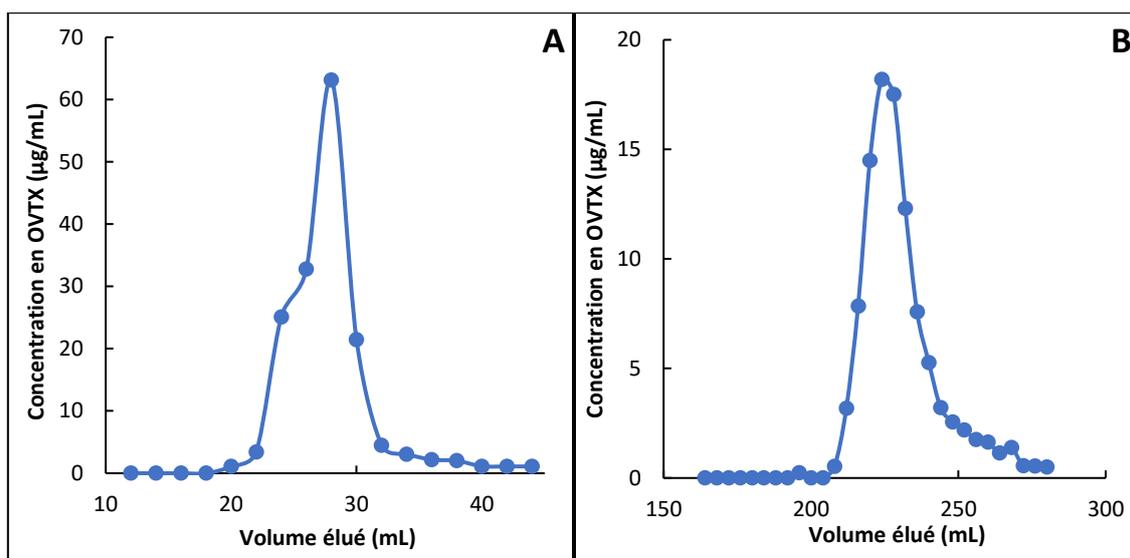


Figure 33 : Profils d'élution des OVTX à partir d'extraits brut issus de l'extraction de 2 g de culot humide par chromatographie d'exclusion stérique (A) et d'affinité (B).

Dans un premier temps, nous avons donc choisi de fractionner les extraits bruts MeOH 50 % d'*O. cf. ovata* avec la chromatographie flash pour sa durée d'élution relativement courte et son automatisation. Cependant, le rendement obtenu après un premier fractionnement d'extraits bruts issus de 20 g de culots cellulaires (vs. 2 g pour la comparaison avec la LH-20) n'a pas donné le rendement attendu (i.e. seulement 40 %, cf. Annexe 17 page 163). Nous avons donc décidé d'abandonner cette méthode au profit de la SEC que le laboratoire avait déjà utilisée auparavant pour la purification des OVTX, avec des rendements satisfaisants (Brissard et al., 2014; Brissard et al., 2015).

3.4 Purification des ovatoxines

3.4.1 Profils d'*Ostreopsis cf. ovata* : MCCV54 et MCCV55

Le Tableau 22 regroupe les profils toxiques d'extraits bruts issus des deux souches d'intérêt. MCCV54 montre la présence des OVTX-a à -e alors que MCCV55 est caractérisée par l'absence des OVTX-b et -c. Ces profils correspondent bien aux profils 1 et 2 d'*O. cf. ovata* décrits par Tartaglione et al. (2017) en mer Méditerranée (cf. Tableau 11, page 119). On peut néanmoins noter des différences mineures, tout d'abord l'absence d'isob-PLTX (< LD) mais qui reflète vraisemblablement la meilleure sensibilité (LQ 6,25 vs. 30 ng/mL) du système LC-HRMS (LTQ Orbitrap) utilisé par les italiens puisque l'isob-PLTX correspond à < 1 % de leurs profils toxiques. Ensuite, dans notre profil 2, l'OVTX-d est moins abondante (i.e. 5.8 vs. 12 %), au profit de l'OVTX-a.

Tableau 22 : Profil toxinique (%) des souches d'*Ostreopsis cf. ovata* MCCV54 et 55 utilisées pour la purification.

Extrait brut MCCV54								
	Isob-PLTX	OVTX-a	OVTX-b	OVTX-c	OVTX-d	OVTX-e	OVTX-f	Total
Moyenne	< LD	57	24	6,3	5,8	6,5	< LD	100
Ecart-type	-	6	5	1	0,4	0,5	-	
Extrait brut MCCV55								
	Isob-PLTX	OVTX-a	OVTX-b	OVTX-c	OVTX-d	OVTX-e	OVTX-f	Total
Moyenne	< LD	88	< LD	< LD	5,8	6,7	< LD	100
Ecart-type	-	0,1	-	-	0,2	0,2	-	

3.4.2 Fractionnement des extraits bruts concentrés par SEC (Sephadex LH-20)

En comparant l'ensemble des fractionnements d'extraits d'*O. cf. ovata* par SEC LH-20 réalisés au laboratoire ces dernières années, nous avons pu observer que les OVTX étaient éluées dans des fractions comprises entre 32 et 61 % du volume de la colonne utilisée (Annexe 18 page 165).

Pour la souche MCCV54, l'ensemble des extraits bruts MeOH 50% obtenus à partir de 75 g de biomasse humide contenait 25 mg d'OVTX, dont la composition est décrite dans le Tableau 22. Ces extraits bruts concentrés avant dépôt sur LH-20 n'ont pas été quantifiés, donc les pertes éventuelles associées à l'évaporation n'ont pas pu être évaluées ici. La quantification des fractions issues de la SEC montre que les toxines ont été éluées entre les fractions 2 et 8, soit entre 33 et 83 % du volume de la colonne. Le rendement (i.e. évaporation suivie du fractionnement) a donc été de $48 \pm 8 \%$, soit 1,8 fois plus faible que celui obtenu par **Brissard et al. (2014)** (i.e. 85 %) et correspond à 12 mg d'OVTX.

Pour la souche MCCV55, nous avons obtenu un rendement similaire de $50 \pm 3 \%$ (correspondant à 6 mg d'OVTXs), donc toujours inférieur à celui obtenu lors de notre comparaison de méthodes de fractionnement (i.e. 79 %) et celui obtenu par **Brissard et al. (2014)**.

Dans l'étude de stabilité, outre l'effet négatif de la durée de stockage, nous avons montré que l'évaporation (i.e. concentration) d'un extrait dans du MeOH 50 % en présence de matrice pouvait induire entre 20 et 24 % de pertes, ce qui participe au faible rendement obtenu ici. Cependant, cela n'explique pas totalement l'écart de rendement observé avec **Brissard et al. (2014)**.

Les protocoles utilisés (préparation d'échantillons et fractionnement par SEC) pour le comparatif de méthode de fractionnement et pour la purification sont identiques. Cependant, nous pouvons noter une durée d'évaporation des extraits bruts à 30 °C beaucoup plus importante pour la purification : 2-3 jours vs. 6-10 jours. Cette durée est dépendante des volumes à évaporer et de la composition du solvant. Une étude sur l'effet de la durée d'évaporation à 30 °C aurait pu nous aider à mieux apprécier les pertes observées. Cependant, une extraction avec un solvant plus volatil tel que du MeOH 100 %

pourrait être envisagée afin de considérablement réduire le temps nécessaire à la concentration des extraits bruts sous flux d'azote et à faible température. De même, le ratio quantité de biomasse/volume de solvant pourrait être réduit. En effet, pour extraire 1 g de culot 12 mL (3 extractions successives de 4 mL) de solvant sont utilisés dans notre procédure contre 4,5 (une extraction de 2,5 mL puis deux rinçages avec 1 mL) dans celle de **Brissard et al. (2015)**. Cependant, dans notre procédure par agitation vortex, il était important que la part de liquide soit suffisamment importante pour créer une agitation constante et éviter d'obtenir un extrait trop visqueux pouvant adhérer sur toute la surface du contenant. Dans le cas de la sonication, ce problème n'existe pas, étant donné que lors de l'extraction, le tube est immobile. Un compromis reste donc à trouver entre le volume de solvant à utiliser et la viscosité d'un extrait.

La SEC a permis d'éliminer une partie des molécules notamment celles de petites et moyennes tailles. Cependant, l'absence de calibration de notre procédure de fractionnement par SEC LH-20 ne permet pas de définir la limite de tailles des molécules éliminées. Une nouvelle étape de séparation à l'aide d'une chromatographie semi-préparative en phase inverse a donc été utilisée, afin d'éliminer des molécules de la matrice en fonction de leur polarité.

3.4.3 Séparation par chromatographie semi-préparative d'un mélange d'OVTX

Pour cette étape de purification par chromatographie semi-préparative, nous avons choisi un gradient permettant de récolter un mélange d'OVTX.

Des injections successives de 500 μ L nous ont permis d'obtenir un mélange contenant 4,1 mg d'OVTX pour la souche MCCV54. Ce qui correspond à un rendement de 35 % pour cette étape de purification et à un rendement total de 16 % pour la purification d'un mélange de 5 OVTX. Pour la souche MCCV55, nous avons obtenu 5,8 mg d'OVTX, ce qui correspond à un rendement de 97 % pour l'étape de chromatographie semi-préparative et à un rendement total de 49 % pour ce mélange de 3 OVTX.

Notre rendement pour la souche MCCV55 est du même ordre de grandeur que celui obtenu par **Brissard (2014)** qui avait également obtenu 97 % en utilisant la même procédure. Le rendement 2,8 fois plus faible pour la souche MCCV54 peut s'expliquer par le temps écoulé entre les étapes de fractionnement par SEC et la chromatographie semi-préparative. En effet, la première purification a été réalisée sur la souche MCCV54 sur une durée 3 mois alors que la seconde effectuée sur la souche MCCV55 a duré deux fois moins longtemps. L'écart de temps provient du temps pour réaliser des pré-tests (e.g. débit d'élution, volume injecté) sur le système de chromatographie semi-préparative (3 semaines). En effet, lors des tests de stabilité (cf. 3.1.2), nous avons montré que des pertes de 27 à 35 % pouvaient être occasionnées dans le temps pour une solution de PLTX dans du MeOH 100 % et un contenant en PP, correspondant aux conditions de stockage de nos toxines après fractionnement par

SEC. Cette phase d'attente a donc engendré des pertes plus importantes dans nos échantillons issus de la souche MCCV54.

La quantification toxines à ce stade a permis de montrer des compositions similaires (Tableau 23) avec les extraits bruts de départ (cf. Tableau 22). De façon intéressante, on peut néanmoins noter la présence d'OVTX-b dans le mélange issu de la souche MCCV55, qui n'était pas détectable jusque-là (i.e. facteur 70 de concentration à l'issue de cette étape).

Tableau 23 : Proportions (%) des OVTX issues des souches MCCV54 et MCCV55 après de la première étape de chromatographie semi-préparative.

	Isob-PLTX	OVTX-a	OVTX-b	OVTX-c	OVTX-d	OVTX-e	OVTX-f	Total
MCCV54	< LD	61	25	3,6	5,4	4,5	< LD	100
MCCV55	< LD	86	0,41	< LD	6,9	6,8	< LD	100

La complexité du profil provenant du mélange de la souche MCCV54 rend la séparation des 5 OVTX très délicate à cause d'un risque de co-élution). De plus, ajouter une nouvelle étape de purification signifie ajouter une nouvelle étape d'évaporation pouvant entraîner de nouvelles pertes. Afin d'éviter de dégrader le mélange d'OVTX de la souche MCCV54, nous avons décidé d'envoyer ce premier mélange aux partenaires du projet ANR pour leur étude de toxicité. Même si les toxines ne sont pas séparées, le mélange pourrait refléter la toxicité de l'ensemble des OVTX et dans des proportions proches de celles retrouvées dans les cellules en culture et *in situ* permettant ainsi une meilleure appréciation des risques liés à l'ensemble des toxines produites par *O. cf. ovata*.

Dans le but d'obtenir des OVTX purifiées, nous avons réalisé une nouvelle purification à partir du mélange purifié de la souche MCCV55, dont le profil est moins complexe (i.e. contient les OVTX-a, -d et -e). L'utilisation de ce mélange rend alors le processus de séparation des analogues plus simple.

3.4.4 Purification des OVTX-a et -d à partir du mélange d'OVTX obtenu de la souche MCCV55

Cette dernière étape de purification avait pour but d'isoler les 3 toxines majeures du mélange d'OVTX obtenu précédemment à partir de la souche MCCV55, à savoir les OVTX-a, -d et -e (Tableau 23).

Le gradient utilisé par **Brissard (2014)** sur la colonne Uptisphere C₁₈-TF lui avait permis de purifier des fractions contenant des mélanges d'analogues (e.g. OVTX-c et -d dans une fraction, OVTX-b, -c, -d et -e dans une autre fraction). En modifiant la pente du gradient (i.e. 0,09 vs. 1 % d'ACN/min) et en ayant recours à une souche au profil moins complexe, nous avons obtenu une résolution chromatographique suffisante pour purifier l'OVTX-a, -d et -e (Figure 34).

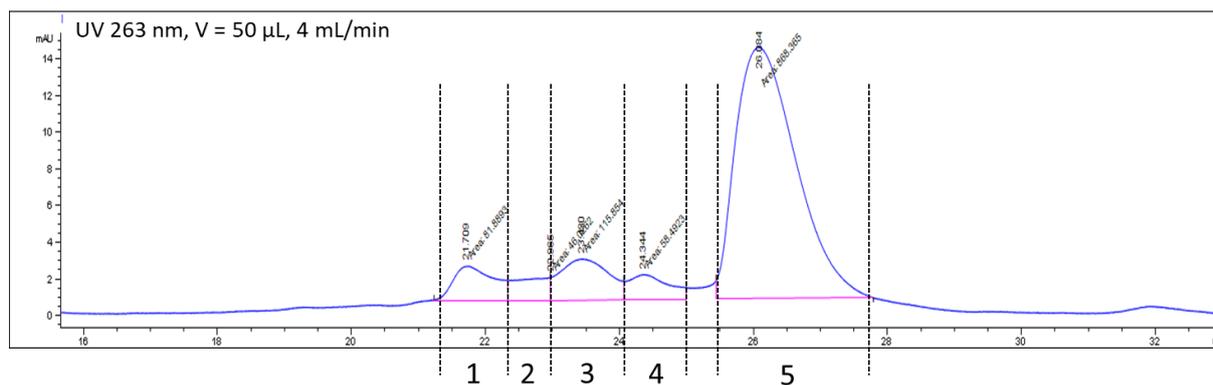


Figure 34 : Chromatogramme LC-UV avec gradient lent obtenu à partir du pool d'OVTX issu de la souche MCCV55. Les numéros indiquent les fractions qui ont été récoltées. Les fractions 1, 3, 4 et 5 correspondent respectivement à l'OVTX-d, -e, -b et -a.

Après analyses LC-MS/MS, nous avons pu déterminer que les fractions 1, 3, 4 et 5 correspondaient respectivement aux OVTX-d, -e, -b et -a. Au total, D'après le chromatogramme obtenu par LC-UV (Figure 34), l'OVTX-d et -a étaient les toxines les mieux séparées du reste des OVTX. Pour les OVTX-e et -b, les pics étaient parfois moins bien résolus selon les injections, entraînant des contaminations croisées. A l'issue de la purification, nous avons isolé 223 µg d'OVTX-a et 10,5 µg d'OVTX-d, ce qui représente des rendements finaux de 2,1 et 1,5 % (Tableau 24). Les quantités n'étant pas importantes, nous avons décidé de ne pas évaluer leur pureté qui impliquerait une évaporation à sec et une re-solubilisation pouvant engendrer de nouvelles pertes (i.e. évaporation à sec puis reprise avec ACN/EAU : 14 %).

De manière générale, les rendements expérimentaux obtenus pour la souche MCCV55 correspondent aux valeurs théoriques. On notera pour la souche MCCV54 un rendement de 16 % a été obtenu contre 30 % théorique. D'après les résultats, les pertes ont surtout eu lieu pendant l'évaporation et la première chromatographie semi-préparative. Pour les toxines de la souche MCCV55, nous avons un très faible écart entre les rendements expérimentaux et théoriques (i.e. 48 vs 46 %). La seule différence entre les deux mélanges de toxines provient du mois de conservation supplémentaire pour celles issues de la souche MCCV54. Malgré la prise en compte de ce paramètre dans le calcul des rendements théoriques, nous n'avons obtenu des rendements expérimentaux plus bas. Cela suggère que d'autres paramètres ont pu augmenter les pertes et notamment l'adsorption sur les parois des contenant qui était 4 fois plus nombreux à l'issue du fractionnement par SEC, soit 64 tubes de 10 mL pour les fractions de la souche MCCV54 et 16 tubes de 50 mL pour les fractions de la souche MCCV55.

Les rendements des OVTX-a et -d (Tableau 24) issues de la souche MCCV55 montrent qu'il y a eu des pertes de 95 à 98 % (i.e. 4,5 et 2,6 % de rendements) lors de la seconde étape de séparation sur colonne semi-préparative, incluant l'évaporation finale des fractions purifiées. La dernière étape de purification a donc été critique. Comme déjà supposé précédemment, les longues périodes d'évaporation à 30 °C

(i.e. 2 × 3 semaines par OVTX) pourraient être à l'origine des pertes importantes observées. L'étude de stabilité sur les effets de l'évaporation de PLTX dans de l'ACN/eau a été réalisée sur de petits volumes et donc sur de courtes durées (i.e. 1 journée). De plus, les pertes dans le temps n'ont pas été évaluées pour ce mélange de solvant. Les résultats de l'étude stabilité sur ce solvant ne permettent donc pas de conclure sur les pertes observées après 6 semaines d'évaporation. Il est donc important que cette étude soit réalisée afin de mieux apprécier et prévenir les pertes lors de futures purifications.

Tableau 24 : Bilan de la purification des OVTX : masses et rendements expérimentaux (mesurés par LC-MS/MS) vs. théoriques (calculés d'après les pertes observées lors de l'étude de stabilité).

	Rendements expérimentaux				Rendements et masses théoriques (d'après les pertes théoriques observées pour la PLTX)			
	MCCV54	MCCV55			MCCV54	MCCV55		
	Total	Total	OVTX-a	OVTX-d	Total	Total	OVTX-a	OVTX-d
Extraction des culots								
A: Masse OVTX dans les extraits bruts (mg)	25	12	10	0,69	25	12	10	0,69
Evaporation (6 à 10 jours)					Pertes : temps + évaporation MeOH 50 % = - 20 et - 23 %			
Fractionnement par SEC LH-20								
B: Masse totale d'OVTX dans les fractions récoltées (mg)	12	6,0	5,1	0,40	15	7,4	6,2	0,43
Rendement évaporation + SEC B/A (%)	48	50	51	58	62	62	62	62
Evaporation (6h)					Pertes : évaporation MeOH 100 % = - 25 %			
Chromatographie semi-préparative	+ 1 mois de conservation				Pertes : temps = - 35 %			
C: Masse d'OVTX dans la totalité des fractions récoltées (mg)	4,1	5,8	5,0	0,4	7,5	5,5	4,6	0,32
Rendement C/B (%)	34	97	98	100	49	75	75	75
Rendement pour l'obtention des mélanges C/A (%)	16	48	50	58	30	46	46	46
Proportion d'OVTX dans le mélange			OVTX-a (86 %)	OVTX-d (6,9 %)			OVTX-a (83 %)	OVTX-d (6,9 %)
D: Masse dans le mélange (mg)			5,0	0,4			4,6	0,32
Evaporation (3 semaines)					Evaporation ACN/Eau = - 8 %			
Chromatographie semi-préparative								
Evaporation (3 semaines)					Evaporation ACN/Eau = - 8 %			
E: Masse OVTX (µg)			223	10,5			3893	271
Rendement E/D (%)			4,5	2,6			92,0	84,6
Rendement pour l'obtention des OVTX isolées E/A (%)			2,2	1,5			42,3	39,3

Les analyses LC-MS/MS (Figure 35) ont permis de confirmer que les OVTX-a et -d ont bien été séparées des autres OVTX. En effet, la recherche de l'ensemble des OVTX sur les solutions purifiées n'ont montré qu'un seul pic pour l'OVTX-a et l'OVTX-d.

Compte tenu des pertes potentielles, du temps nécessaire au processus d'évaporation (3 semaines/OVTX) et par manque de temps, nous avons décidé de ne pas concentrer l'OVTX-e qui risquait de contenir des traces d'OVTX-b. Si cela avait été le cas, une troisième étape de séparation aurait pu être envisagée sur ce mélange en utilisant un des colonnes recommandées par **Brissard et al. (2015)** pour séparer les OVTX-b et -e (i.e. Kinetex C₁₈ ou Kinetex PFP). Après cette 3^{ème} étape de séparation, une nouvelle phase d'évaporation de 3 semaines serait nécessaire et d'après les pertes

mesurées pour les extraits d'OVTX-a et -d, nous aurions obtenu 0,01 µg d'OVTX-e. Cette quantité aurait été trop faible pour envisager d'évaluer la toxicité de la molécule.

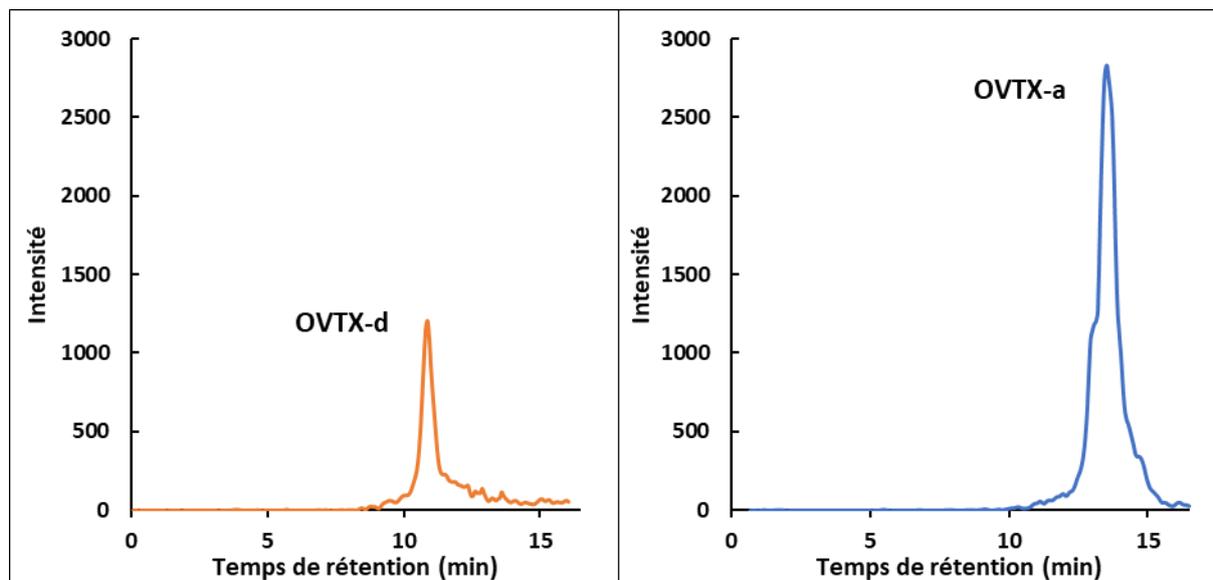


Figure 35 : Chromatogramme (TIC) des extraits d'OVTX-d et -a isolé à partir du mélange d'OVTX. Les extraits ont été analysés avec la méthode « multi-toxines 1 ».

A ce jour, **Ciminiello et al. (2012c)** ont été les premiers et les seuls à avoir purifié une OVTX et notamment à partir d'une souche produisant majoritairement de l'OVTX-a. Les auteurs ont obtenu 700 µg d'OVTX-a à partir de 80 L de culture, soit un équivalent de 8,8 µg de toxine par litre de culture. Dans notre cas, nous avons obtenu 6,4 µg/L, soit 27 % de moins d'OVTX-a que l'équipe italienne. Leur processus de purification leur a permis d'atteindre un rendement final de 12 % pour l'OVTX-a, soit 6 fois supérieur au nôtre, avec une procédure néanmoins différente qui comprenait une chromatographie flash, une chromatographie semi-préparative, puis analytique. Le manque de détails dans la publication italienne ne nous permet pas de comparer les procédures en détails et donc de comparer les étapes qui ont été critique dans leur processus de purification.

Comme suggéré précédemment, le temps est un facteur clef lors de la purification des OVTX et notamment pendant les étapes d'évaporations. Lors de notre processus, les pertes les plus importantes ont été obtenues lors de la dernière étape de purification, ce qui pourrait probablement expliquer la différence de rendement avec l'équipe italienne. La dernière étape de notre processus est donc impérativement à optimiser afin de limiter les pertes pour de futures purifications.

4. Conclusions générales

Au cours de ce chapitre nous avons d'abord étudié la stabilité de la PLTX au cours du temps, dans différentes conditions de stockage (solvant, contenant, concentration, présence de matrice et/ou d'acide) et en fonction du mode d'évaporation.

- Le solvant permettant d'obtenir les meilleures réponses en LC-MS/MS est le DMSO mais les résultats du plan d'expériences n'ont pas permis de mettre en évidence une meilleure solubilité de la PLTX dans ce solvant. Parmi les trois solvants, les pertes maximales dans le temps ont été observées dans le DMSO et il s'agit donc d'un solvant à éviter pour conserver des extraits.
- Les contenants en PP permettent d'obtenir une meilleure réponse en LC-MS/MS et des pertes moins importantes qu'avec un contenant en verre. Le PP est donc à privilégier pour stocker les solutions et les extraits de PLTX et d'OVTX.
- La présence de matrice dans les extraits n'a pas montré d'effet protecteur sur la PLTX, suggérant que la diminution de celle-ci avec l'avancée de la purification ne devrait pas augmenter les pertes.
- La présence d'acide dans les solutions n'a pas montré d'effet significatif.
- Les pertes en fonction du mode d'évaporation varient globalement de 20 à 33 % et la significativité de ce facteur semble uniquement résider dans la condition : évaporation à sec - verre - MeOH50 % - sans matrice, où 78-90 % de perte ont été obtenues. Ces pertes ont été associées à des difficultés de re-solubilisation de l'extrait sec, avec des pertes mesurées plus importantes quand le résidu sec était repris directement avec du MeOH 50 % que lorsqu'il était repris d'abord avec de l'eau puis du MeOH 100 % ou inversement. Ces données montrent l'importance du choix du solvant pour solubiliser les extraits et l'impact que cela peut avoir sur les rendements de purification.
- Dans tous les plans d'expériences et pour toutes les conditions, nous avons observé des pertes de PLTX lié au temps de conservation ce qui en fait un des facteurs les plus important à prendre en compte.

La méthode d'extraction des OVTX à partir de culots cellulaires a été simplifiée, puisque nos expériences ont montré que la sonication n'était pas plus efficace qu'une agitation au vortex (i.e. pas de pertes significatives entre 3 min d'agitation au vortex et 5, 15 et 30 min de sonication). Par contre, la sonication peut entraîner des pertes de 40 % d'OVTX au-delà de 60 min. La procédure faisant intervenir l'agitation au vortex a donc été retenue pour l'extraction des OVTX à partir de culots cellulaires.

Pour fractionner les extraits bruts d'*Ostreopsis*, deux méthodes ont été comparées et ont donné des rendements similaires de ca. 80 % : la chromatographie d'exclusion stérique (Sephadex LH-20) et la chromatographie flash (C₁₈). La chromatographie SEC a été sélectionnée mais de plus faibles rendements (ca. 50 %) ont été obtenus que lors de la comparaison de méthodes (ca. 80 %). Ces pertes ont été associées à une durée d'évaporation plus longue pour les extraits bruts que pour les essais.

Les extraits bruts MeOH 50 % de 75 et 35 g de culots cellulaires des souches d'*O. cf. ovata* MCCV54 et 55 ont été fractionnés par SEC puis, les OVTX ont été purifiées par chromatographie semi-préparative. A partir des deux souches, nous avons ainsi obtenu deux mélanges d'OVTX purifiées : un premier contenant les OVTX-a à -e et un second avec les OVTX-a, -d et -e.

La séparation des 3 analogues du mélange de la souche MCCV55 a été effectuée via une seconde étape de chromatographie semi-préparative, en modifiant le gradient. Nous avons pu récupérer 223 et 10,5 µg d'OVTX-a et -d, représentant des rendements finaux de 2,1 et 1,5 %. La dernière étape faisant intervenir 6 semaines d'évaporation et 2 semaines d'injection a été critique puisque des rendements de 4,5 et 2,6 % ont été obtenus pour les deux analogues. L'absence d'un test de stabilité de la PLTX lors d'évaporation prolongée (sur plusieurs jours) à 30 °C dans un mélange d'ACN/Eau ne permet pas de statuer avec certitude sur les pertes mesurées lors la purification finale des OVTX-a et -d mais semble vraisemblablement liée aux conditions de l'évaporation.

Le mélange des 5 OVTX issu de la souche MCCV54 et les OVTX-a et -d obtenues à partir de MCCV55 ont été envoyés à l'ANSES afin de tester leur cytotoxicité sur plusieurs lignées cellulaires (pulmonaires et intestinales) dans le cadre du projet ANR Ocean-15. Leurs résultats permettront de compléter les données limitées sur la toxicité des OVTX (cf. **Ciminiello et al., 2012b; Pelin et al., 2016b; Poli et al., 2018**) et participeront à mieux évaluer les risques associés aux blooms d'*O. cf. ovata*.

Le mélange d'OVTX issu de la souche MCCV54 a été utilisé par le LOV dans le cadre du projet ANR Ocean-15 pour des études de d'écotoxicité sur *Artemia franciscana* par **Pavaux et al., (2020)** (accepté dans le journal *Aquatic Toxicology* en avril 2020) et sur les effets des toxines sur des compétiteurs d'*Ostreopsis* (i.e. autres microalgues benthiques des genres *Coolia*, *Navicula*, *Licmophora* et *Prorocentrum*) par **Ternon et al., (2019)** (soumis dans le journal *Aquatic Microbial Ecology* en février 2020).

A l'aide des pertes mesurées lors de l'étude de stabilité, nous avons pu estimer les quantités de toxines obtenues à chaque étape de la purification. Les pertes théoriques permettent d'expliquer la majorité des rendements expérimentaux observés sauf ceux de l'évaporation des extraits dans le mélange ACN/eau lors de la dernière étape de purification. L'effet des longues périodes d'évaporation et de

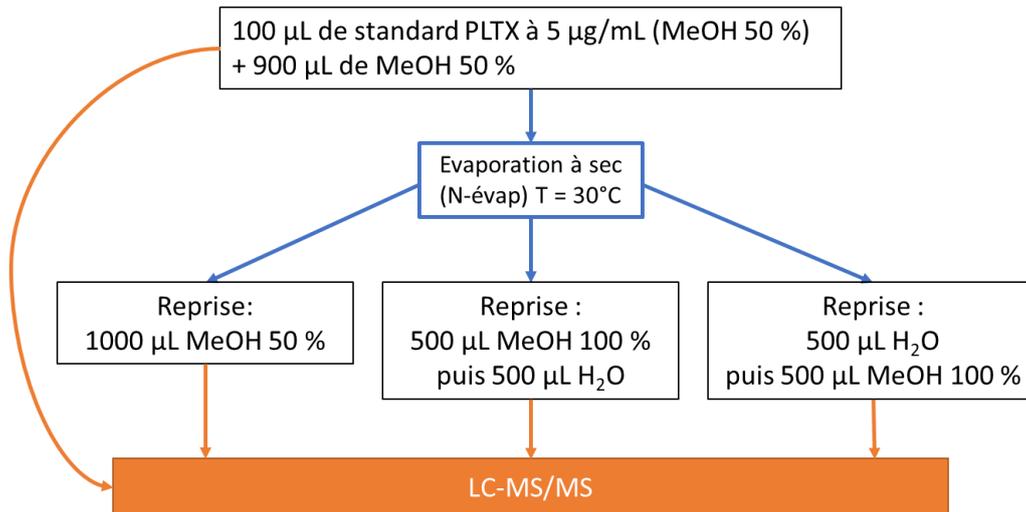
conservation des toxines dans ces conditions restent donc à déterminer afin de mieux appréhender la dernière étape de purification et de limiter les pertes.

Afin de faciliter le travail de purification des OVTX, il conviendrait d'utiliser des souches ne produisant qu'un faible nombre d'analogues afin de s'affranchir des problèmes de co-élutions lors des dernières étapes de purification. Des souches avec des profils toxiques rares et atypiques comme les profils 3 et 4 décrits par **Tartaglione et al. (2017)** (produisant majoritairement des OVTX-b et -f) pourraient permettre d'obtenir des quantités intéressantes d'OVTX qui n'ont pas encore été purifiées à ce jour. L'OVTX-b est la seconde toxine majoritaire dans la majorité des profils toxiques d'*O. cf. ovata* en mer Méditerranée et notre étude n'a pas permis d'isoler cet analogue qui pourrait jouer, en plus de l'OVTX-a, un rôle non négligeable dans la toxicité d'*Ostreopsis* si son activité toxique était confirmée.

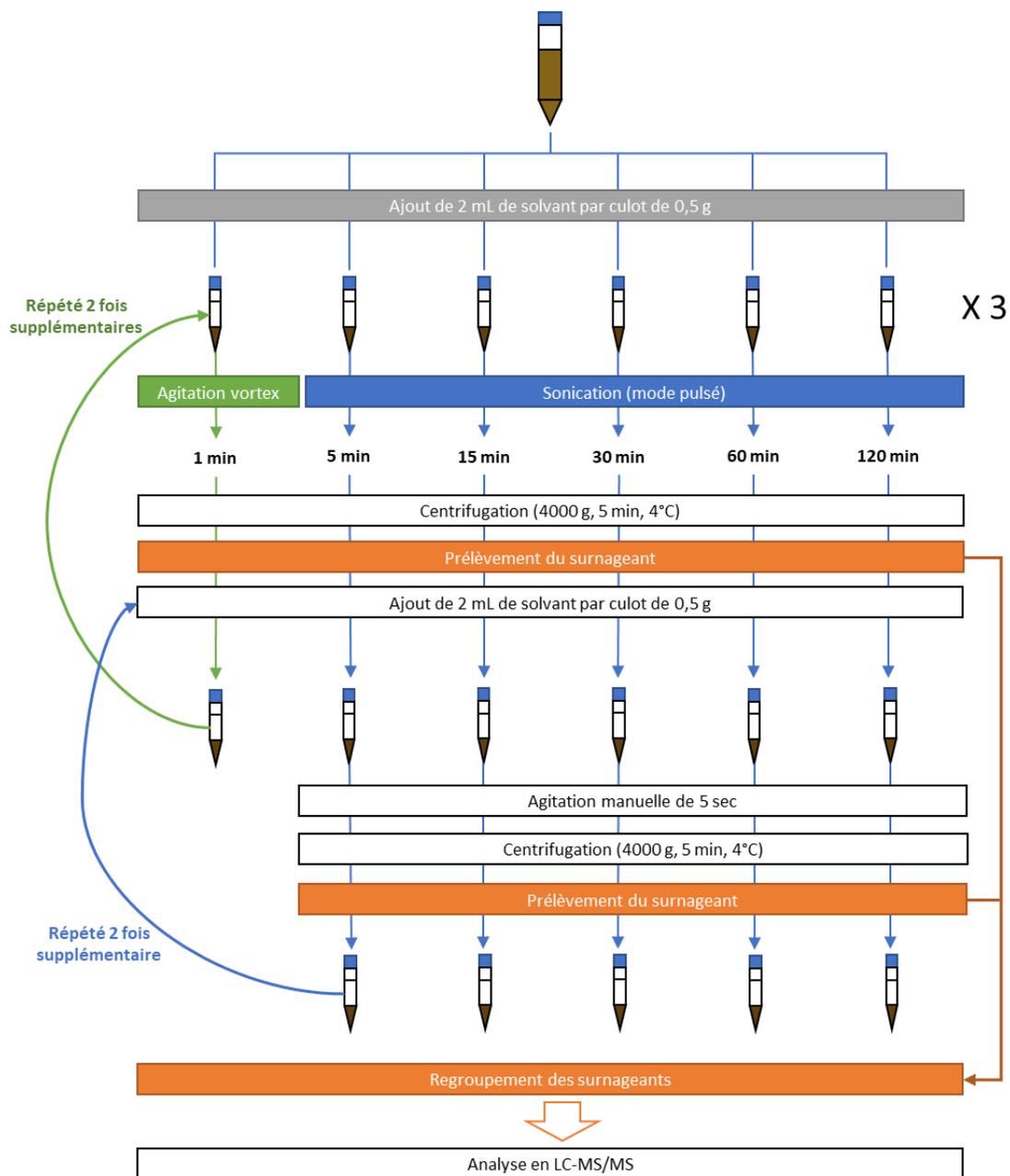
Les résultats de ce chapitre permettent de mieux appréhender la purification et la conservation des OVTX. Ils pourront servir de bases pour envisager d'isoler de nouveaux analogues en minimisant les pertes et ainsi, de déterminer la structure complète et l'activité toxique des toxines d'*O. cf. ovata*.

5. Annexes

Annexe 14 : Protocole du plan d'expériences sur l'effet de la reprise d'une solution de PLTX à 0,5 µg/mL dans du MeOH 50 % évaporée à sec à 30 °C sous flux d'azote.



Annexe 15 : Schéma du protocole d'optimisation de la durée d'extraction des OVTX par agitation vortex ou sonication.



Annexe 16 : Procédure de préparation des échantillons d'OVTX purifiées dans du DMSO pour les tests de toxicité.

Les tests de cytotoxicité utilisés par les partenaires du projet ANR nécessitaient de fournir des toxines dans du DMSO. Ce dernier est un solvant qui possède une température d'évaporation (190,8 °C) plus élevée que l'eau ou le méthanol. Dans un bain marie à 30 °C sous flux d'azote, l'acétonitrile, l'eau et le méthanol s'évaporent, contrairement au DMSO. Dans ces conditions, l'ajout d'un volume connu de DMSO permet de concentrer les molécules dans ce solvant sans évaporer à sec nos extraits.

Ainsi, pour le mélange d'OVTX de la souche MCCV54 et les OVTX-a et -d de la souche MCCV55, 1 mL de DMSO a été ajouté aux solutions, qui ont ensuite été concentrées jusqu'à l'obtention d'un volume final de 1 mL.

Le mélange des 5 OVTX isolées de la souche MCCV54 a été évaporé en présence de DMSO avec une concentration en OVTX totales de $7,8 \pm 0.1$ mg éq. PLTX/mL. De même pour les OVTX-a et -d issues de la souche MCCV55 à des concentrations respectives de 116 µg/mL et de 3,6 µg/mL.

Annexe 17 : Essais de fractionnement des extraits bruts par chromatographie flash.

1) Procédure de fractionnement

Dans un premier temps, nous avons opté pour la chromatographie flash qui était un système automatisé au laboratoire et dont la préparation d'échantillon était moins complexe (évaporation à sec dans de la silice vs. Concentration en petit volume pour la SEC) et plus courte.

Un extrait brut MeOH 50 % de 240 mL issu de l'extraction de 20 g de culot de MCCV54 a été évaporé dans un évaporateur rotatif (R-200, Buchi) avec 7,5 g de silice C₁₈ (C₁₈ ODS SPE bulk Sorbent, Agilent) afin de procéder à un dépôt solide. L'extrait sec (1,12 g soit un rendement de 5,6 %) adsorbé sur la silice a été déposé dans une cartouche vide RediSep Rf. L'extrait sec est fractionné avec un CombiFlashRf+ (Teledyne Isco) grâce à un gradient d'eau (solvant A) et de MeOH (solvant B) à un débit de 20 mL/min à travers une colonne RediSep C₁₈ Gold 50 g (équilibrée dans du MeOH 70 %). Le gradient utilisé est de 50 % de B pendant 6 min, 50 à 100 % de B pendant 60 min, maintenu 11 min à 100 %, 100 à 50 % de B en 7 min et maintenu pendant 21 min pour reconditionner la colonne pour les prochains fractionnements (durée totale : 115 min). Parmi les 70 fractions de 25 mL collectées, aucune n'a montré de pics d'absorbance à 233 nm et 266 nm (i.e. maximum d'absorbance des OVTX). Les OVTX ont donc été quantifiées en LC-MS/MS à partir d'un aliquot.

2) Résultats du premier fractionnement par chromatographie flash

Un premier extrait brut obtenu à partir de 20 g de culot humide d'*O. cf. ovata* (MCCV54) a permis d'obtenir un extrait sec de 1 mg correspondant à la capacité de charge maximale pouvant être supportée par notre système de chromatographie flash. Le rendement du fractionnement obtenu a été de 40 %, soit deux fois plus faible que celui attendu (i.e. 84 % obtenus lors de la comparaison des méthodes de fractionnement).

Le temps nécessaire pour préparer le dépôt sec a été plus que celui réalisé lors de la comparaison de méthodes. En effet, l'évaporation à sec de l'extrait issu de 20 g de biomasse a duré plus de 3 jours contrairement à l'extrait issu de 2 g de biomasse dont l'évaporation a duré une journée (240 vs. 24 mL de MeOH 50 % à évaporer). Le mélange MeOH/eau n'est pas un azéotrope et le méthanol est le solvant qui s'évapore rapidement et en premier, au contraire de l'eau qui demande plus de temps à cause de sa température d'évaporation plus élevée.

Lors des tests de stabilité de la PLTX, nous avons observé qu'un extrait de MeOH 50 % contenant de la matrice évaporée à sec pouvait engendrer des pertes de 30 à 31 %. De plus, nous avons observé un effet négatif significatif du temps sur la conservation de cette dernière (3.1.1 et 3.1.2). L'effet d'une évaporation prolongée à 30 °C n'a pas été testée lors de l'étude de stabilité de la PLTX mais le facteur

temps est le seul facteur ayant varié entre les deux fractionnements par chromatographie flash pouvant expliquer la diminution du rendement.

Le nouveau rendement de 40 % n'étant pas satisfaisant, nous avons décidé d'utiliser la technique de SEC (LH-20) pour poursuivre le fractionnement des extraits bruts d'*O. cf. ovata*. En effet, bien que plus chronophage et demandant une surveillance accrue liée à la récupération manuelle des fractions, cette méthode est néanmoins celle utilisée historiquement par le laboratoire pour la purification d'OVTX avec un rendement attendu de 85 % (cf. **Brissard et al., 2014 ; Brissard et al., 2015**).

Annexe 18 : Caractéristiques et calculs des volumes d'élutions des OVTX par chromatographie d'exclusion stérique (SEC).

Tableau A : caractéristiques des colonnes de SEC utilisée au laboratoire PHYC pour la purification des OVTX.

	Marin-Pierre Gémin (2016-2019)		Charline Brissard (2010-2014)			Stéphanie Dannevald (2016)
Diamètre de la colonne (cm)	1,5	1,0	1,0	1,0	2,0	1,5
Hauteur de la colonne (cm)	78,5	74,0	34,0	50,0	76,0	73,0
Masse résine LH-20 (g)	33,7	13,7	6,0	10,0	60,0	30,0
Volume de la colonne (mL)	139	58	27	39	239	129
2 × Volumes de colonne (ml)	278	116	53	79	477	258

Tableau B : volumes d'élution (en mL et en %) contenant les OVTX avec les différentes colonnes utilisées au laboratoire.

Marin-Pierre Gémin (2016-2019)				Stéphanie Dannevald (2016)	
1,5 cm (MCCV55)		1 cm (MMCV54)		1,5 cm (03 VLF)	
V élué (mL)	% du V colonne	V élué (mL)	% du V colonne	V élué (mL)	% du V colonne
47	34	20	35	42	33
87	63	36	62	80	62
Charline Brissard (2010-2014)					
1 cm (03 VLF)		1 cm (03 VLF)		2 cm (03 VLF)	
V élué (mL)	% du V colonne	V élué (mL)	% du V colonne	V élué (mL)	% du V colonne
7	26	14	36	75	31
15	56	23	59	150	63

Fraction contenant les OVTX	Moyenne (%)	Ecart-type
Première fraction	32	3,4
Dernière fraction	61	2,7

Tableau C : volumes d'élution théoriques contenant les OVTX avec les caractéristiques des colonnes SEC utilisées pour la purification.

	Volume d'élution (mL)	% du volume d'une colonne	Caractéristiques des colonnes utilisées pour la purification
	20	17	
	30	25	Hauteur = 70 cm
Volumen théoriques contenant les OVTX (entre 31 et 61 % d'après le Tableau B)	40	33	Masse résine = 30 g
	50	42	Facteur (MeOH) = 4
	60	50	Volume colonne = 124 mL
	70	58	Volume cylindre résine = 120 mL
	80	67	
	90	75	
	100	83	
	110	92	
	120	100	

Chapitre 5- Discussion générale, conclusion et perspectives

1. L'effet du substrat macroalgale sur *Ostreopsis*

Dans le **chapitre 2 (Gémin et al., 2020)**, nous avons étudié l'effet de trois espèces de macroalgues de la classe des Phaeophyceae (i.e. *Dictyota* spp., *Halopteris scoparia* et *Padina pavonica*) sur les abondances d'*Ostreopsis* et le contenu en ovatoxines (OVTX) associé. Ainsi, nous avons mesuré les plus fortes abondances sur *Dictyota* spp. alors que les plus fortes concentrations en OVTX intracellulaires ont été retrouvées dans les cellules épiphytiques sur *Halopteris scoparia*. Dans la littérature, il n'existe pas de consensus de l'effet des macroalgues sur les abondances d'*Ostreopsis* et aucune donnée de leur effet sur le contenu en OVTX. Ainsi, des études ont mesuré des abondances d'*Ostreopsis* plus importantes sur des Phaeophyceae et des Florideophyceae que sur des Chlorophyceae (**Vila et al., 2001b; Aligizaki and Nikolaidis, 2006; Ismael and Halim, 2012**) et à l'inverse, d'autres travaux montrent que les abondances varient avant tout en fonction de l'espèce de macroalgue et non en fonction de leur classe (**Blanfuné et al., 2015**). Par exemple, des abondances maximales peuvent être retrouvées sur *Dictyota dichotoma* (Phaeophyceae) ou *Corallina amentacea* (Florideophyceae) et minimales sur *D. fasciola* et *Corallina elongata* (**Blanfuné et al., 2015**). Enfin, certaines études n'ont pas mis en évidence d'effet significatif de l'espèce de macroalgue comme substrat sur les abondances d'*Ostreopsis* (**Totti et al., 2010; Cochu et al., 2013; Selina et al., 2014**).

Dans toutes ces études, des dizaines d'espèces différentes provenant de classes différentes et avec des morphologies variables (e.g. taux de ramification, rigidité) ont été étudiées. Cependant, certaines macroalgues sont retrouvées de manière systématique à travers les différentes études comme *Dictyota dichotoma* ou *Jania rubens*. Malgré ces espèces communes, les résultats obtenus ne sont pas homogènes. Cette variation pourrait être liée aux conditions environnementales variant d'un lieu géographique (e.g. température, nutriments) ou d'une période à l'autre (e.g. température en début, milieu ou fin d'été), au stade de développement des macroalgues, à la phase de développement du bloom d'*Ostreopsis* (i.e. phase exponentielle, stationnaire ou déclin). Aussi, les techniques d'échantillonnage et de comptage (e.g. microscope optique vs. compteur de particules) peuvent également participer à cette variation.

Pour aller plus loin sur l'étude des interactions entre *Ostreopsis* et son substrat macroalgale, il pourrait être intéressant d'évaluer en laboratoire les effets des macroalgues présentes à Rochambeau (Villefranche-sur-mer) avec des protocoles similaires à ceux décrits dans la littérature sur d'autres microalgues (**Jeong et al., 2000; Jin and Dong, 2003; Nan et al., 2004; Jin et al., 2005; Wang et al., 2007a; Wang et al., 2007b; Nan et al., 2008; Ye and Zhang, 2013; Accoroni et al., 2015b**). Dans ces études, les auteurs ont mesuré la croissance des microalgues en présence de : i) thalles frais, ii) du milieu ayant servi à la culture des macroalgues (i.e. contenant des molécules excrétées) ou iii) avec de

la poudre de macroalgue séchée (i.e. contenant les métabolites intracellulaires). De manière générale, les macroalgues semblent avoir un effet négatif sur la croissance des microalgues ce qui, pour une espèce benthique en contact avec son substrat, peut s'avérer néfaste.

Dans le cas d'*O. cf. ovata*, **Accoroni et al. (2015b)** ont mis en évidence un effet négatif des macroalgues (i.e. *Dictyota dichotoma*, *Rhodymenia pseudopalmata* et *Ulva rigida*) sur la croissance du dinoflagellé. Pour l'espèce *D. dichotoma*, la macroalgue provoque un effet négatif sur la croissance d'*O. cf. ovata* sous les trois formes (i.e. thalle frais, milieu de culture, poudre d'algues) suggérant ainsi que l'algue produirait des molécules allélopathiques en continu sans stimuli extérieur (**Accoroni et al., 2015b**). Pour la macroalgue *R. pseudopalmata*, un effet négatif sur la croissance d'*O. cf. ovata* n'est observé qu'en présence d'une forte concentration de poudre de macroalgue. La présence de thalles frais d'*Ulva rigida* ou de poudre d'algue diminue la croissance d'*O. cf. ovata* alors que le milieu de culture ne provoque aucun effet. Les effets négatifs des thalles et de la poudre d'algues du genre *Ulva* ont déjà été montrés sur de nombreuses espèces de microalgues dont des dinoflagellés comme *Prorocentrum micans*, *P. lima*, *P. donghaiense*, *Coolia monotis* ou *Alexandrium tamarense* (**Jin and Dong, 2003; Nan et al., 2004; Jin et al., 2005; Wang et al., 2007a; Nan et al., 2008; Tang and Gobler, 2011; Ben Gharbia et al., 2017**). Dans ces études, les auteurs suggèrent que l'absence d'effet du milieu de culture ayant servi à la culture des macroalgues, serait dû à une dégradation des molécules allélopathiques produites par les macrophytes. D'après **Ben Gharbia et al. (2017)**, les acides gras poly-insaturés (PUFA) provenant des ulves semblent être de bons candidats expliquant l'inhibition de la croissance des dinoflagellés comme *O. cf. ovata*. Cependant, peu de données sont disponibles sur les molécules (e.g. polyphénols, PUFA) régissant les interactions allélopathiques avec les microalgues et leur identification reste à définir (**Tang and Gobler, 2011; Ben Gharbia et al., 2019**).

La majorité des études se sont focalisées uniquement sur la croissance des microalgues et à ce jour, il existe peu de données sur l'effet des macroalgues sur la production de toxines chez les dinoflagellés et notamment *Ostreopsis* (**Ben Gharbia et al., 2017; Gémin et al., 2020**). **Ben Gharbia et al. (2017)** ont montré un effet positif de l'algue *Ulva rigida* sur la production de toxines d'*O. cf. ovata* et de *Prorocentrum lima*. Les auteurs ont émis l'hypothèse que l'augmentation de la quantité de toxines intracellulaires pourrait être liée à une réponse au stress des cellules mais sans identifier clairement la cause de ce dernier. Comme pour les molécules ayant un effet négatif sur la croissance, il pourrait être intéressant de rechercher les molécules induisant une diminution des quantités de toxines intracellulaires.

Des études comme celles de **Jin et al. (2005)** et d'**Accoroni et al. (2015b)** sur les effets des macroalgues présentes majoritairement à Villefranche-sur-Mer (i.e. *Dictyota* sp., *Padina pavonica*, *Halopteris scoparia* et *Ellisolandia elongata* (ex-*Corrallina elongata*)) pourraient permettre de mieux apprécier les

variations d'abondances d'*Ostreopsis*, leur distribution spatiale et les concentrations en OVTX intracellulaires mesurées *in situ*. Les études montrant des effets négatifs des macroalgues sur la croissance des dinoflagellés suggèrent alors que ces dernières pourraient être utilisées afin de contrôler les efflorescences de HAB (Jeong et al., 2000; Jin et al., 2005; Tang and Gobler, 2011; Accoroni et al., 2015b) par exemple via la mise en place de cultures de ces macroalgues (Tang and Gobler, 2011). Cependant, il est important de vérifier en amont si ces algues n'ont pas un effet indésirable sur le reste de l'écosystème et par exemple sur la reproduction de crustacés ou d'échinodermes.

L'effet négatif des macroalgues sur *Ostreopsis* peut avoir son importance puisque cela peut apporter un biais lors des suivis d'efflorescences qui sont réalisés à partir de cellules prélevées sur une ou plusieurs espèces de macroalgues. Ainsi, d'autres méthodes de suivi ont été mises en place afin de s'abstenir de ces effets et d'obtenir une meilleure reproductibilité des résultats.

2. L'évolution des méthodes de suivis des efflorescences

Les suivis de blooms d'*Ostreopsis* sont majoritairement réalisés en comptant le nombre de cellules par quantité de macroalgues prélevée (e.g. cellules/g de poids frais). Cette approche présente des inconvénients pouvant mener à des biais étant donné qu'au cours d'un bloom la communauté et/ou le stade de développement des macroalgues peuvent changer et ainsi avoir un impact sur les quantités d'*Ostreopsis* rapportées (Lobel et al., 1988; Tester et al., 2014). Il est important de rappeler que dans notre étude terrain (Gémin et al., 2020), le suivi des abondances lors de l'efflorescence a été réalisé en dénombrant les cellules épiphytiques sur quatre espèces de macroalgues : *Padina pavonica*, *Halopteris scoparia*, *Dictyota* spp. et *Ellisolandia elongata*, et que, parmi ces dernières et pour un jour donné, nous avons constaté des variations d'abondance et de concentration en OVTX intracellulaires suggérant un possible effet du substrat.

De nouvelles approches comme les substrats artificiels ont été développées ces dernières années dans l'optique de standardiser le dénombrement des cellules benthiques (e.g. *Ostreopsis*, *Gambierdiscus*, *Prorocentrum*) par unité de surface plutôt que par masse de macroalgue (Tester et al., 2014; Jauzein et al., 2016; Jauzein et al., 2018; Fernández-Zabala et al., 2019). Cette méthode permet d'obtenir des résultats plus reproductibles en s'abstenant i) des variations de la communauté macroalgale en fonction des lieux et de la période d'étude, ii) des préférences liées à la structure tri-dimensionnelle des macroalgues (Totti et al., 2010) et iii) des effets des molécules allélopathiques qu'elles produisent

(Accoroni et al., 2015b). On peut aussi noter que cette méthode présente l'avantage d'être non destructrice puisqu'elle ne fait pas appel au prélèvement de macroalgues (Tester et al., 2014). L'utilisation des substrats artificiels pour le suivi des blooms semble prometteur et reste à comparer à d'autres techniques récentes de prélèvement (Jauzein et al., 2018) comme l'intégrateur de dinoflagellé benthique (BEDI) développé par Mangialajo et al. (2017). Le BEDI est une procédure de prélèvement non destructive puisque le prélèvement des cellules se fait via leur remise en suspension par agitation manuelle. Le système repose sur un cylindre déposé sur le fond marin (avec l'extrémité opposée au-dessus de la surface, cf. Figure 36) de 25 cm de diamètre (surface 491 cm²). Un premier prélèvement dans ce cylindre permet d'obtenir les abondances planctoniques et un second après agitation permet d'avoir le nombre de cellules benthiques par unité de surface. L'utilisation du BEDI présente l'avantage de pouvoir prélever immédiatement les cellules dans un lieu donné contrairement aux substrats artificiels qui nécessitent 24 heures d'incubation et de réaliser deux sorties en mer (i.e. pour la pose et la récupération des substrats).

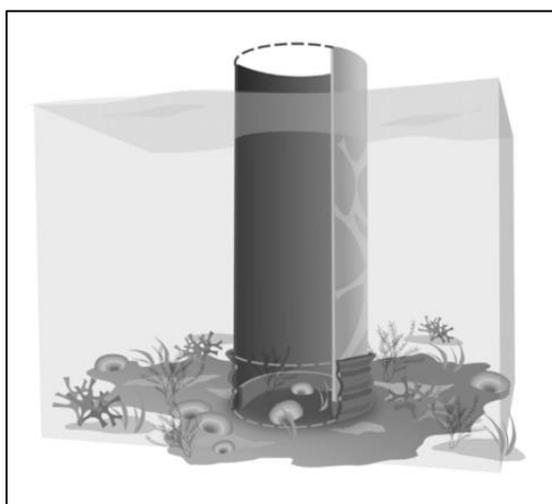


Figure 36 : Système BEDI (Benthic Dinoflagellate Integrator) développé par Mangialajo et al. (2017) utilisé pour le dénombrement des dinoflagellés benthiques.

Ces deux méthodes de prélèvement par substrats artificiels et par BEDI s'avèrent toutes les deux intéressantes et leur mise en place dans les suivis annuels pourrait permettre d'affiner les résultats des suivis des dynamiques de bloom et de les rendre comparables en fonction des lieux et des périodes d'études.

Contrairement au suivi des abondances, peu d'études se sont intéressées à la quantité d'OVTX intracellulaires au cours du développement d'une efflorescence d'*Ostreopsis*. A ce jour, seules les études à Villefranche-sur-Mer (Gémin et al., 2020) et en mer Adriatique (Pfannkuchen et al., 2012; Accoroni et al., 2017a) s'y sont intéressées, avec des résultats variables selon les études. Lors de notre

suivi à Villefranche-sur-Mer, nous avons montré que la quantité d'OVTX augmentait lors de la phase exponentielle et la phase stationnaire du bloom. En mer Adriatique, les concentrations maximales en OVTX ont été enregistrées avant le pic du bloom par **Accoroni et al. (2017a)** sur les côtes italiennes alors qu'aucune variation significative n'a été mesurée pendant toute la durée du bloom par **Pfannkuchen et al. (2012)** en Croatie. Le peu de données disponibles ne permet pas de statuer clairement sur la dynamique de production des OVTX lors des efflorescences *in situ*, d'autant plus que les substrats prélevés (i.e. macroalgue ou substrats artificiels) d'une étude à l'autre peuvent apporter un biais sur les concentrations mesurées (**Gémin et al., 2020**). En effet, dans notre étude à Villefranche-sur-Mer, les OVTX sont extraites de cellules récoltées sur des substrats artificiels permettant de s'affranchir d'éventuels effets allélopathiques des macroalgues, alors que dans les études italiennes et croates, les toxines sont quantifiées à partir de cellules épiphytiques provenant de macroalgues : *Hypnea musciformis* (Rhodophyceae) et *Dictyopteris polypodioides* (Phaeophyceae) pour la première et de *Cystoseira crinita* (Phaeophyceae) pour la seconde. Même si les tendances de productions de toxines peuvent être comparées d'une méthode à l'autre, il est important de prendre les quantités de toxines rapportées avec beaucoup de précaution étant donné que ces dernières peuvent varier en fonction du substrat des cellules (**Gémin et al., 2020**). De plus, les paramètres environnementaux et la variabilité intraspécifique d'*Ostreopsis* peuvent également participer aux variations du contenu en toxines observées dans les différentes études (**Accoroni and Totti, 2016**).

La mise en place plus systématique de la quantification des toxines dans le suivi des efflorescences, et sur plusieurs années, pourrait permettre de clarifier les dynamiques de production d'OVTX en fonction du développement du bloom et des conditions environnementales associées (e.g. température, salinité, hydrodynamisme). Cependant, comme pour le suivi des abondances, il paraît important de réaliser le suivi des toxines intracellulaires avec des protocoles d'échantillonnages standardisés, permettant une meilleure comparaison entre les études. Dans ce contexte, l'utilisation des substrats artificiels ou du BEDI semblent être des techniques les plus appropriées.

3. Les effets des paramètres environnementaux sur

Ostreopsis cf. ovata

3.1 Effets de la température

L'étude des paramètres environnementaux sur la croissance et la production d'OVTX chez *O. cf. ovata* a généré des résultats contradictoires jusque-là (cf. revue d'**Accoroni and Totti (2016)** et de **Tester et**

al. (2020)). Par exemple, l'effet de la température (qui est supposée être un facteur clé vu la fenêtre d'apparition des blooms) reste mal compris car des effets positifs et négatifs sur la croissance et/ou la production d'OVTX ont été rapportés (**Accoroni and Totti, 2016**).

Dans notre étude expérimentale au laboratoire (**Chapitre 3**), nous avons montré une température optimale de croissance à 27 °C et de production d'OVTX à 23 °C. En mer Méditerranée, les blooms d'*Ostreopsis* ont été majoritairement observés à des températures comprises entre 20 et 30 °C avec des pics d'abondances mesurés principalement au-dessus de 24 °C, en accord avec les abondances maximales observées à 27 °C dans notre étude. La souche d'*O. cf. ovata* MCCV54 utilisée dans notre plan d'expériences provenant de Villefranche-sur-Mer, il n'est pas étonnant de voir qu'elle montre de meilleures abondances cellulaires dans des conditions de températures similaires à celles retrouvées dans son environnement d'origine, comme cela a déjà été supposé dans la littérature (**Scalco et al., 2012; Tawong et al., 2015**). Même après une acclimatation à 23 et à 30 °C, la température optimale de croissance observée demeurait 27 °C. D'ailleurs, depuis son isolement de Villefranche-sur-Mer en 2015, cette souche est maintenue à 27 °C au laboratoire PHYC et aurait pu s'adapter à cette température expliquant cette observation.

Contrairement au suivi de croissance en fonction des paramètres environnementaux, les concentrations en toxines intracellulaires sont rarement évaluées. Les résultats obtenus en laboratoire montrent des tendances divergentes sur l'effet de la température, avec des concentrations en toxines ou des toxicités (i.e. activités hémolytiques) maximales mesurées entre 20 et 30 °C (**Granéli et al., 2011; Vidyarathna and Granéli, 2012; Vidyarathna and Granéli, 2013; Carnicer et al., 2016b**). Dans notre étude, les concentrations maximales de toxines sont mesurées à 23 °C en accord avec **Granéli et al. (2011)** et **Vidyarathna and Granéli (2013)**. La diversité des résultats peut notamment s'expliquer par la diversité des souches utilisées qui, comme pour la croissance, peuvent produire des quantités de toxines différentes selon les conditions environnementales (**Carnicer et al., 2016b**). L'effet de la température sur la production de toxines reste donc à éclaircir. L'utilisation de la génomique et de la transcriptomique permettrait de montrer si la température peut avoir un effet sur l'activation des voies de biosynthèse des OVTX lorsque ces dernières seront identifiées. Etant donné que les OVTX sont des polycétides (**Verma et al., 2019**), l'effet de la température sur les enzymes intervenant dans la formation de cette famille de molécules pourrait être une première piste.

L'analyse métabolomique, relative au plan expérimental mené, a montré que le métabolisme des cellules variait davantage en fonction de la température, par rapport à l'intensité lumineuse ou la durée de croissance. En effet, l'analyse en composante principale de la température, après décomposition des variances (ANOVA-PCA), a suggéré que les cellules pouvaient mettre en place deux métabolismes distincts à 23 et 30 °C. Par exemple, la composition de la double couche lipidique de la

membrane peut varier en fonction de la température, avec notamment une augmentation de la proportion des lipides insaturés pour conserver une bonne fluidité membranaire lorsque la température diminue et inversement (**Leblond et al., 2010**). Ce qui a été retrouvé dans notre étude grâce à l'annotation du DGDG (digalactosyldiacylglycerol 18:5/18:4), un lipide de la membrane des thylakoïdes, retrouvé majoritairement à 23 °C.

Aussi, à forte température, des ROS (Reactive Oxygen Species) peuvent s'accumuler dans les cellules et par oxydation, dégrader les pigments comme la chlorophylle a et la RUBISCO (**Ras et al., 2013**) pouvant induire des variations du métabolome. Ces dégradations affectent alors la photosynthèse et réduisent ainsi le taux de croissance des microalgues comme cela a été montré pour *Trachydiscus minutus* (**Gigova et al., 2012**). Les OVTX sont des molécules de taille importante et dont la synthèse nécessiterait un apport d'énergie important (**Scalco et al., 2012; Pinna et al., 2015**). Le manque d'énergie résultant d'une photosynthèse défaillante pourrait, dans notre étude, expliquer la diminution des quantités de toxines intracellulaires et des taux de croissance à 30 °C. De plus, la mesure de l'activité des photosystèmes II (fv/fm) montrait une diminution au cours de la croissance à 27 et 30 °C, lorsque les concentrations en OVTX intracellulaires étaient faibles, contrairement à 23 °C où les valeurs de fv/fm étaient stables dans le temps, avec de fortes concentrations en toxines intracellulaires. Dans notre cas, l'augmentation de la température semble affecter négativement la production d'OVTX via la diminution de la photosynthèse.

Parmi les changements dans le métabolome dans la littérature, on peut noter la variation des taux de chlorophylle et des caroténoïdes en fonction de la température. En effet, il a été montré à de nombreuses reprises l'effet négatif de l'augmentation de la température sur la production de chlorophylle et inversement, son effet positif sur la production de caroténoïdes (**Ras et al., 2013**).

Une analyse ciblée de ces acides gras et des pigments dans un plan d'expérience similaire pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes mis en place par *O. cf. ovata* pour pallier aux changements environnementaux et notamment de la température.

3.2 Effets de l'intensité lumineuse

L'influence de la lumière sur la croissance d'*O. cf. ovata* et la production d'OVTX a été très peu étudiée en laboratoire avec seulement deux publications (i.e. **Monti and Cecchin, 2012; Scalco et al., 2012**). Sur le terrain, quelques travaux montrent la diminution des abondances cellulaires avec la profondeur, que les auteurs associent à une diminution de l'intensité lumineuse disponible (**Totti et al., 2010; Cohu and Lemée, 2012; Brissard et al., 2014; Tibiriçá et al., 2019**). Dans **Gémin et al. (2020)**, nous avons également pu observer et confirmer cette diminution avec la profondeur à Villefranche-sur-Mer.

Malheureusement, nous n'avons pas pu mesurer l'intensité lumineuse disponible entre 0 et 5 m, il est donc difficile de faire un parallèle direct avec les conditions de lumière qui ont pu techniquement être appliquées dans le **chapitre 3** (i.e. 200 à 600 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) pour l'étude écophysologique en laboratoire.

A titre de comparaison, **Cohu and Lemée (2012)** rapportent une luminosité d'environ 200 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ à 10 m de profondeur, d'environ 500 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ à environ 5 m et supérieure à 900 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ à la surface. Ces mesures permettent d'avoir une idée des intensités lumineuses à différentes profondeurs mais ne sont pas représentatives de celles retrouvées à l'endroit de l'efflorescence (i.e. le long des plages) étant donné qu'elles ont été prises au large de Villefranche-sur-Mer.

Dans le **chapitre 3**, nous avons montré une diminution de la croissance des cellules à faible irradiance (200 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) aux trois températures. L'effet de cette faible intensité lumineuse est également distinguable sur le métabolome des cellules (par comparaison aux intensités moyennes et fortes) contrairement au contenu en OVTX où aucune différence significative n'a été mesurée entre les trois irradiances. Dans **Gémin et al. (2020)**, le contenu en OVTX des cellules n'a pas varié entre 0 et 4 m suggérant également une absence de l'effet de la lumière sur la production de toxines contrairement à **Brissard et al. (2014)** qui ont mesuré une baisse des concentrations en OVTX dans les cellules avec l'augmentation de la profondeur. Ces résultats suggèrent que d'autres paramètres pourraient intervenir dans la production de toxines en fonction de la profondeur comme la température. Aussi, la disponibilité en nutriments pourrait avoir son importance surtout depuis que des études (**Vanucci et al., 2012**) ont montré des diminutions importantes (i.e. -53 à -40 %) de la production de toxines chez *O. cf. ovata* lorsque l'azote ou le phosphate étaient limitants.

Ostreopsis est capable de tolérer de fortes irradiances (i.e. jusqu'à 1000 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ *in situ*, **Cohu and Lemée (2012)**). Cette tolérance pourrait être rendue possible aussi par la production de pigments photoprotecteurs comme les caroténoïdes ou de mycosporines (MAA : mycosporine like amino acid) protégeant les cellules des rayons UV comme cela a déjà été rapporté chez d'autres dinoflagellés formant des blooms en surface (**Jeffrey et al., 1999; Carreto et al., 2001**). Dans le cas d'*O. cf. ovata*, la péridinine (caroténoïde) a été déjà été rapportée par **Honsell et al. (2013)** et a été annotée dans notre étude métabolomique sans mettre en évidence de tendance en fonction de l'irradiance. La recherche et la mesure spécifique par HPLC des caroténoïdes (**Bidigare et al., 2005; Zapata et al., 2012**) et des MAA (**Llewellyn and Ains, 2010**) en fonction de l'intensité lumineuse permettraient de confirmer leur présence et leur rôle au sein des cellules d'*Ostreopsis*.

De manière générale, l'effet de la lumière sur la croissance, et surtout la production d'OVTX et le métabolisme d'*O. cf. ovata* restent méconnus et les recherches sur leurs effets nécessitent d'être

poursuivie. Par exemple, l'effet de la lumière pourrait être investigué sur de plus larges plages d'intensité lumineuse (e.g. de 50 à > 1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Aussi, la mesure de la température et des nutriments *in situ* lors d'études sur la profondeur pourraient permettre de mieux comprendre leurs effets sur les abondances cellulaires et la production des OVTX (Cohu and Lemée, 2012).

3.3 Effets des facteurs combinés

L'étude écophysiological avait pour objectif de mettre en évidence les effets de la température, de la lumière et leurs effets combinés sur la croissance, le contenu en OVTX et le métabolome d'*O. cf. ovata*. Les résultats de cette étude nous ont montré que les effets individuels étaient plus forts que les effets combinés. Seule la croissance semble avoir été impactée par les deux paramètres avec des taux maximaux mesurés à 27 °C et à 400 et 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Pour le contenu en OVTX, aucun effet combiné n'a été mis en évidence étant donné qu'aucune intensité lumineuse ne semblait montrer d'effet significatif sur leur concentration contrairement à la température. Les effets dissociés de la température et de la lumière ont également été constatés lors de l'analyse du métabolome (SUS-plot, **Chapitre 3**) qui a permis de mettre en évidence un nombre limité de composés significativement affectés à la fois par la température et la lumière (i.e. 1,3 % des composés totaux avec un score VIP > 1,5).

Ces observations nous permettent de conclure que pour notre souche et dans l'intervalle des valeurs des facteurs testés, les effets de l'intensité lumineuse et de la température semblent agir principalement de manière indépendante et que l'effet de cette dernière est prédominant.

3.4 Des biomarqueurs du changement de température et de lumière

L'identification de métabolites chez les microalgues et notamment chez les dinoflagellés reste un véritable challenge, à cause du nombre limité d'études menées. En effet, chaque année moins d'une vingtaine de nouveaux composés ont été identifiés chez les dinoflagellés entre 2012 et 2017 contre environ 600, 250 et 370 pour les invertébrés, bactéries et champignons marins (Carroll et al., 2019).

L'étude du métabolome d'*O. cf. ovata* (souche MCCV54) du **Chapitre 3**, nous a permis de montrer qu'il existait des différences de métabolisme en fonction de la température et/ou de la lumière. Nous avons tenté d'annoter certaines molécules afin de déterminer de potentiels biomarqueurs associés à une acclimatation à ces différentes conditions.

Parmi les métabolites annotés, le DGDG (digalactosyldiacylglycerol 18:5/18:4), déjà identifié chez les dinoflagellés (**Leblond and Chapman, 2000**), est retrouvé majoritairement à 23 °C. Sa présence dans la membrane des thylakoïdes permet grâce à ses insaturations de maintenir la fluidité membranaire qui se retrouve réduite lorsque la température diminue (**Gray et al., 2009a; Leblond et al., 2010**). Le maintien de la fluidité de cette membrane est primordial afin de maintenir la photosynthèse (**Yamamoto, 2016**). Si la présence de cette molécule devait être avérée, elle pourrait être biomarqueur du succès de l'acclimatation des cellules à de plus faibles températures que la condition optimale de croissance (i.e. 27 °C). La présence plus importante d'un dérivé de la fucoxanthine a été trouvée à faible température plutôt qu'à forte irradiance, ce qui est inattendu puisque les caroténoïdes sont généralement produits à forte irradiance pour protéger les cellules des UV et des ROS.

L'acide stéaridonique, est un acide gras retrouvé chez les dinoflagellés (**Leblond and Chapman, 2000**) et dont l'abondance semble plus importante à la plus faible luminosité testée (i.e. 200 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Cet acide gras est un précurseur de l'EPA (acide eicosapentaénoïque) et du DHA (acide docosahexaénoïque) qui ont été retrouvés majoritairement dans des microalgues limitées en lumière (**Hu, 2003; Conceição et al., 2020**), ce qui pourrait expliquer sa présence à faible intensité lumineuse.

Lors de notre étude, la quantité d'OVTX intracellulaire était plus importante à 23 °C qu'à 27 et 30 °C. Cependant, d'après la bibliographie, il n'y a pas de consensus sur l'effet de la température ou de la lumière sur la production de ces toxines. Compte tenu de la variabilité intraspécifique connue de la production des toxines, on peut se demander si cette variabilité ne pourrait pas également être observée pour d'autres molécules comme celles que nous avons annotées. A titre d'exemple, **Calbet et al. (2011)** ont montré des variations des concentrations et des profils lipidiques (acides gras mono et poly insaturés) chez *Karlodinium veneficum*.

La majorité des molécules de notre étude métabolomique a été putativement identifiée en comparant leur masse aux banques de données (niveau de confiance : 3) et sans prendre en compte leur fragmentation en MS/MS comme pour les molécules identifiées via la plateforme GNPS (niveaux de confiance : 2). Il est donc possible que ces molécules partagent leur masse avec des molécules différentes et leur annotation reste donc hypothétique. L'identification formelle en réalisant des extractions et des quantifications ciblant ces molécules devrait aider à vérifier ces résultats afin d'obtenir le niveau de confiance le plus élevé d'après **Sumner et al. (2007b)** (i.e. niveau de confiance : 1). Cette étape de vérification permettrait de déterminer si ces molécules pourraient être considérées comme des biomarqueurs caractéristiques du succès de l'acclimatation à des changements environnementaux pour cette espèce.

Dans notre étude métabolomique, nous avons annoté une douzaine de molécules sur les milliers de variables détectées. Cela reflète un manque de connaissance sur le métabolome des microalgues marines et notamment des dinoflagellés (**Zendong et al., 2016**). Des efforts restent donc à poursuivre afin d'identifier un plus large panel de molécules comme les glycolipides (e.g. MGDG, DGDG) ou les pigments (e.g. péridinine) propres aux dinoflagellés et notamment à *Ostreopsis* afin de suivre plus finement leur présence et dans les cellules et de mieux comprendre comment les cellules s'acclimatent aux variations des paramètres environnementaux

3.5 L'impact de la température dans un contexte de changement global

Dans un contexte de réchauffement climatique, la température de l'océan et notamment de la mer Méditerranée est susceptible d'augmenter de 2-3 °C d'ici 2100 (**Cramer et al., 2019**). Les efflorescences d'*O. cf. ovata* pourraient alors s'étendre sur de plus longues périodes que celles observées actuellement (i.e. entre juin et août) (**Tester et al., 2020**).

D'après le modèle d'**Accoroni et al. (2015a)**, en mer Adriatique, le rôle clé de la température intervient essentiellement avant le début de l'efflorescence, au moment de la germination des kystes. En effet, les kystes ne peuvent germer et les cellules commencer à proliférer que lorsque la température dépasse 25 °C. Quand le bloom est initié, celui-ci peut se maintenir à des températures supérieures ou inférieures à 25 °C (i.e. jusqu'à 20 °C). Dans le reste de la Méditerranée, aucun autre modèle de ce type n'a encore été proposé. Il est possible que le modèle d'**Accoroni et al. (2015a)** ne puisse pas être transposé aux cellules dans les autres régions comme en mer Ligurienne ou Tyrrhénienne. En effet, ce modèle prend en compte les températures optimales pour la germination des kystes d'*Ostreopsis* mais aussi les ratios en azote et phosphore présents dans le milieu. Compte tenu de la variabilité intraspécifique d'*Ostreopsis* on pourrait s'attendre à des températures de germination et de croissance différentes en fonction des régions.

Sur la base des résultats obtenus avec notre souche d'*O. cf. ovata*, une température supérieure à 27 °C serait moins favorable à la prolifération des cellules. Concernant le contenu en OVTX, notre souche MCCV54 produit le plus de toxines à 23 °C qu'à 27 ou 30 °C, ce qui entrainerait des efflorescences moins toxiques. Toutefois, gardons à l'esprit que ces résultats sont obtenus à partir de plans expérimentaux sur des cultures monoclonales acclimatées d'une seule souche d'*O. cf. ovata* en conditions contrôlées, en étudiant uniquement deux facteurs environnementaux. Il est donc difficile d'extrapoler ces résultats à ce qui se passerait dans le milieu naturel avec les effets combinés d'autres facteurs comme la salinité, le pH, la disponibilité en nutriments et les interactions biotiques. De plus,

il serait nécessaire d'affiner nos résultats au moins avec l'étude des réponses d'un ensemble de souches d'*Ostreopsis* provenant d'une ou plusieurs populations géographiques (e.g. mer des Baléares, Tyrrhénienne, Ligurienne, Adriatique et/ou golfe de Gabès). En allant vers des degrés de complexités croissantes, d'autres facteurs seront à prendre en considération comme la salinité, la disponibilité en nutriments ou l'hydrodynamisme qui sont connus pour avoir des effets sur la croissance d'*O. cf. ovata* et la production d'OVTX (Accoroni and Totti, 2016; Tester et al., 2020).

4. La variabilité intraspécifique d'*Ostreopsis cf. ovata*

4.1 Les variations intraspécifiques d'*Ostreopsis cf. ovata* en fonction des paramètres environnementaux

D'après la littérature, la variabilité intraspécifique d'*O. cf. ovata* est déjà remarquable, compte tenu des variations de taille cellulaire (Guerrini et al., 2010; Accoroni et al., 2012), de quantité de toxines produites (Brissard et al., 2014; Carnicer et al., 2016b; Tartaglione et al., 2017), de profils toxiques existants (Tartaglione et al., 2017), de taux de croissance (Guerrini et al., 2010) et de réponses aux facteurs abiotiques (Totti et al., 2010; Cohu et al., 2013; Blanfuné et al., 2015; Accoroni and Totti, 2016; Gémin et al., 2020; Tester et al., 2020). Par conséquent, nos conclusions du plan d'expérience en écophysiologie (Chapitre 3) ne permettent pas, en l'état, d'être extrapolées à l'ensemble de l'espèce *O. cf. ovata* étant donné que nous avons travaillé sur une seule souche. Les résultats de l'effet de la température ou de la lumière sur la croissance et le contenu en OVTX sur les souches méditerranéennes sont parfois contradictoires et ne permettent pas d'établir de tendances claires au niveau de l'espèce (Accoroni and Totti, 2016; Tester et al., 2020). En Méditerranée, plusieurs génotypes d'*O. cf. ovata* (Penna et al., 2005; Abdennadher et al., 2017; Tartaglione et al., 2017) ont été identifiés et il n'est donc pas surprenant de voir qu'il existe une diversité de réponses face aux paramètres environnementaux, participant à la variabilité des résultats observés en laboratoire et sur le terrain.

4.2 La variabilité intraspécifique d'*Ostreopsis cf. ovata* au sein d'une population

Les plans expérimentaux sur l'effet des paramètres environnementaux sont souvent effectués sur un nombre restreint, voire sur une seule souche. Or, celle-ci ne peut vraisemblablement pas être représentative de la population retrouvée lors des efflorescences, ces dernières pouvant être

composées d'une multitude de souches réagissant différemment à l'égard des paramètres environnementaux testés (**Kremp et al., 2012; Godhe and Rynearson, 2017; Martens et al., 2017**). Par exemple, **Martens et al. (2017)** ont isolé 68 souches d'*Alexandrium ostenfeldii* lors d'un bloom aux Pays-Bas, révélant qu'au sein d'une efflorescence pouvait exister une forte variabilité intraspécifique sur les quotas de toxines intracellulaires (e.g. variation d'un facteur 18 pour la saxitoxine). **Brandenburg et al. (2018)** ont également mis en évidence une large variabilité intraspécifique des traits d'expressions (i.e. taux de croissance, biovolume cellulaire, contenu toxinique, contenu en C, N et P) à la fois au sein d'une même population et de deux populations d'*A. ostenfeldii*. Les auteurs ont mesuré des variations comparables à celles qui pourraient être retrouvées en comparant différentes espèces. Un autre exemple avec **Kremp et al. (2012)** qui ont mesuré les taux de croissance de plusieurs souches de diatomée (*Skeletonema marinoi*) issues de la même population, en fonction de la température et de la concentration en CO₂. Les auteurs ont démontré qu'en fonction de la souche utilisée, les taux de croissance pouvaient varier de manière importante et même produire des tendances contradictoires en fonction de la température et de la concentration en CO₂. **Kremp et al. (2012)** soulignent alors l'importance du choix de la souche utilisée pour l'étude des effets des paramètres environnementaux et confirment également qu'une souche n'est pas représentative de sa population et suggèrent que les résultats des études sur l'effet des paramètres environnementaux doivent être pris avec précaution. Compte tenu de la variabilité intraspécifique d'*O. cf. ovata*, cela pourrait donc expliquer une partie des différences obtenues entre les données mesurées en laboratoire et *in situ*.

Pour *Ostreopsis* en Méditerranée, **Tartaglione et al. (2017)** ont déjà mis en évidence des différences de concentration en OVTX intracellulaires en fonction des régions avec des cellules contenant plus d'OVTX majoritairement en mer Ligurienne et au sud de la mer Adriatique par rapport à celles trouvées en mer Tyrrhénienne, Ionienne et nord Adriatique. Les auteurs n'excluent pas que ces variations du contenu en toxine soient dues à des adaptations aux différentes conditions environnementales (e.g. température, salinité, nutriment ou interaction allélopathiques). De plus, ils soulignent qu'il s'agit de résultats obtenus en laboratoire et qu'ils restent à comparer avec des mesures sur des cellules prélevées *in situ*.

A l'instar de ces auteurs cités précédemment, il pourrait être envisagé de rechercher ces variations (i.e. croissance, contenu en toxine, biovolumes) chez *O. cf. ovata* afin de mieux évaluer l'amplitude des variations intraspécifiques de cette espèce au sein d'une ou plusieurs populations et en fonction des conditions des paramètres environnementaux. Actuellement, ces études sur *Ostreopsis* sont réalisées sur une à trois souches différentes (cf. Tableau 9 page 43). Une étude élargie sur plusieurs souches

pourrait permettre de clarifier les tendances des paramètres environnementaux sur cellules provenant d'une et/ou plusieurs populations.

De la même façon que **Tartaglione et al. (2017)** ont montré la diversité des profils toxiques d'*Ostreopsis cf. ovata* en France et en Italie, il pourrait être envisagé de réaliser une étude du métabolome sur des souches issues de différentes régions méditerranéennes (e.g. côtes catalanes vs. golfe du Lion vs. mer Ligurienne vs. mer Tyrrhénienne vs. mer Adriatique vs. Est mer Méditerranée vs. golfe de Gabès) ou au sein d'un même bloom. Les résultats permettraient de se rendre compte de la variabilité intraspécifique, au-delà des variations morphologiques, des taux de croissance et des quantités de toxines intracellulaires qui ont déjà été comparés depuis 2005 (**Guerrini et al., 2010; Accoroni et al., 2012; Carnicer et al., 2016b; Tartaglione et al., 2017**). Chercher à identifier des molécules induisant des différences entre les profils métabolomiques de souches provenant de différentes régions pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes (e.g. productions de pigments, d'acides gras saturés ou insaturés) qui ont été mis en place par les cellules pour s'adapter à leur environnement.

Ostreopsis cf. ovata représente un risque sanitaire en Méditerranée à cause de la production d'OVTX. Mais déterminer la variabilité entre les régions des souches et l'effet des paramètres environnementaux sur la production de ces toxines n'est pas suffisant pour déterminer le risque réel que représente ces dinoflagellés. Il est donc important de compléter ces données avec des tests de toxicologie afin d'évaluer l'effet des toxines sur les autres organismes (e.g. échinodermes et crustacés) ou chez l'homme. Ces données pourront être associées aux quantités par cellules et permettront de mieux apprécier le risque lié à une efflorescence quel que soit la souche d'*Ostreopsis*.

5. Faisabilité de la purification des ovatoxines en vue d'études toxicologiques

5.1 Bilan des tests de stabilité de la palytoxine

L'étude de stabilité d'une solution étalon de la PLTX (à défaut d'étalon d'OVTX) a été menée dans les différentes conditions expérimentales rencontrées lors du processus de purification et de conservation utilisé pour les toxines. Les pertes ainsi constatées lors de cette étude ont été associées à des dégradations des molécules, des adsorptions sur les parois des contenants ou à la formation d'adduits non suivis par LC-MS/MS en analyse MRM. Ces résultats ont été extrapolés au comportement des OVTX compte tenu des similarités de leur structure.

L'effet du solvant (i.e. MeOH 50 %, MeOH 100 % et DMSO), de contenant (i.e. verre et polypropylène) et de la concentration (i.e. 0,2 et 2 µg/mL) sur la réponse de la PLTX en spectrométrie de masse a permis de montrer que les meilleures réponses étaient obtenues en utilisant un contenant en polypropylène, avec une forte concentration en PLTX et en utilisant du DMSO. Bien que la réponse de la PLTX dans du DMSO soit la plus élevée en LC-MS/MS, elle ne reflète pas forcément une meilleure solubilité dans la PLTX mais une augmentation du signal avec une modification des ratios d'ions liés à un phénomène de « charge stripping ». De plus, le DMSO est le solvant qui entraîne le plus de pertes de toxines lors de la conservation (51 à 69 % de pertes en 28 jours). Il s'agit donc d'un solvant à éviter pour la conservation des OVTX sur plusieurs semaines et surtout pour des durées supérieures à un mois. Par conséquent, l'utilisation des solutions de PLTX (voir d'OVTX) dans du DMSO pour les tests de cytotoxicité doit se faire le plus rapidement possible après la préparation des solutions au risque de sous-estimer l'activité des toxines. Concernant le type de contenant, le PP est le contenant le plus approprié, comparé au verre, pour conserver les solutions de PLTX.

Concernant l'effet de la matrice algale d'*Ostreopsis*, nous avons montré qu'elle n'avait pas d'effet significatif sur la réponse en LC-MS/MS au cours du temps. Par contre, des pertes ont systématiquement été observées au cours du temps, avec une diminution des quantités détectées en 41 jours de 27 à 44 %. La seule condition pour laquelle la présence de la matrice s'avérait favorable était pour les solutions de PLTX dans du MeOH 100 % dans un contenant en verre. L'élimination progressive des composants de la matrice au cours des étapes de la purification des OVTX ne devrait donc pas accentuer les pertes.

D'après les deux premiers plans d'expériences, le temps de conservation avait une importance capitale sur la stabilité des solutions de PLTX puisque des pertes semblent inévitables quelles que soient les conditions de conservation testées.

D'autres pertes conséquentes de toxines ont également été observées lors des étapes d'évaporation (à sec ou concentration) des solutions de PLTX dans du MeOH 50 et 100 %, avec/sans acide acétique, avec/sans matrice algale. Les résultats ont montré que l'acide acétique n'avait pas d'effet significatif sur les pertes observées. Quelles que soient les conditions testées, des pertes comprises entre 20 et 34 % ont été observées. Il est à noter qu'une expérience complémentaire a permis de confirmer que le pourcentage de méthanol pouvait avoir une importance cruciale sur la reprise du résidu sec. En effet, en reprenant ce dernier directement avec du MeOH 50 %, près de 100 % de pertes ont été observées alors qu'en reprenant le résidu d'abord avec du MeOH 100 % puis de l'eau, seulement 36 % de pertes ont été constatées. De manière générale, l'évaporation est donc une étape qui peut engendrer des pertes mais aucune des méthodes testées ne semble à privilégier. L'effet de la durée d'évaporation n'a pas été testé, mais ne semble pas à être à négliger puisque nous avons obtenu des

perdes importantes lors de la purification suite à de longues étapes d'évaporation. Il semble donc important dans le cadre de la purification, de limiter le nombre et la durée des étapes d'évaporation. Les pertes avec d'autres méthodes d'évaporation comme via un évaporateur rotatif (malgré l'utilisation de verre) ou la lyophilisation pourraient être évaluées afin de convenir d'une nouvelle méthode rapide limitant les pertes. Aussi, l'effet de la température d'évaporation pourrait être investiguée afin de déterminer une température maximale à ne pas dépasser et faciliter l'évaporation des solvants.

L'ensemble de ces résultats nous ont permis de lister une série de recommandations permettant de prendre les précautions nécessaires pour limiter les pertes de PLTX et d'OVTX lors des prochaines expériences ou purifications :

- La conservation de la PLTX sur des périodes supérieures à 1 mois dans le DMSO est à éviter malgré un effet positif sur l'intensité du signal en LC-MS/MS,
- Les contenants en polypropylène sont à privilégier pour la conservation des toxines,
- La présence de matrice et d'acide n'ont pas d'effet sur la conservation de la PLTX,
- L'évaporation à sec ou la concentration en petit volume engendrent des pertes similaires,
- Des pertes de PLTX sont constatées dans le temps quelle que soit la condition de conservation,
- Le choix du solvant de reprise d'un extrait sec a une importance sur la reprise des toxines en solution.

5.2 Bilan de la purification des OVTX

Dans la littérature, on peut retrouver plusieurs procédures de purification de PLTX-like à partir de culots cellulaires, comme les ostréocines (OST) (**Usami et al., 1995; Ukena et al., 2001; Uchida et al., 2013; Terajima et al., 2018a, b**). Cependant, même si les auteurs mentionnent les quantités de toxines finales obtenues, la majorité ne mentionne pas les rendements associés ni les quantités de cellules utilisées (Tableau 25). Ce constat ne permet pas de comparer l'efficacité de notre processus de purification par rapport aux données de la littérature.

Tableau 25 : Résumé des quantités de PLTX-like purifiées d'après la littérature

Volume de culture (L)	Nombre de cellules	Toxine (pg/cell)	Organisme	Souche	Toxine purifiée	Masse (mg)	Rendement (%)	Références
936	-	-	<i>Ostreopsis siamensis</i>	SOA1	OST-D	3,8	-	Usami et al., 1995
1973	-	-	<i>Ostreopsis siamensis</i>	SOA1	OST-D	9,5	-	Ukena et al., 2001
-	-	-	<i>Ostreopsis siamensis</i>	SOA1	OST-D	0,38	-	Terajima et al., 2018a
-	-	-	<i>Ostreopsis siamensis</i>	SOA1	OST-B	0,0017	-	Terajima et al., 2018a
-	-	-	<i>Ostreopsis siamensis</i>	SOA1	OST-A	0,85	-	Terajima et al., 2018b
-	-	-	<i>Ostreopsis siamensis</i>	SOA1	OST-E1	0,95	-	Terajima et al., 2018b
1000	-	-	<i>Ostreopsis ovata</i> IK2	<i>Ostreopsis ovata</i> IK2	OVTX-a/-d/-e IK2	-	-	Uchida et al., 2013
80	3 x 10 ⁸	19	<i>Ostreopsis cf. ovata</i>	OOAN0816	OVTX-a	0,7	12	Ciminiello et al., 2012c; Pelin et al., 2016b
10	-	-	<i>Ostreopsis cf. ovata</i>	NIES-3351	OVTX-a/-d/-e AC	-	-	Poli et al., 2018
35	-	55	<i>Ostreopsis cf. ovata</i>	MCCV55	OVTX-a	0,223	2,2	Notre étude

Concernant la purification des OVTX, à ce jour, seule l'OVTX-a a été purifiée (Ciminiello et al., 2012c) et a permis de réaliser des tests de toxicité (Ciminiello et al., 2012c; Pelin et al., 2016b) et d'élucider sa structure par RMN (Ciminiello et al., 2012a; Ciminiello et al., 2012c). Ceci a été rendu possible par l'utilisation d'une souche produisant majoritairement de l'OVTX-a (77 %). On peut noter que Poli et al. (2018) ont purifié un mélange d'OVTX contenant majoritairement de l'OVTX-a (ca. 85 %). Dans le chapitre 4, nous avons mis en place un protocole qui nous a permis de purifier 4,1 mg contenant un mélange de 5 OVTX (-a à -e) ainsi que 223 µg d'OVTX-a et 10,5 µg d'OVTX-d.

Les rendements de purification finaux obtenus pour les OVTX-a et -d (ca. 2 %), sont inférieurs à ceux rapportés par Ciminiello et al. (2012c) et Pelin et al. (2016b) (ca. 12 % pour l'OVTX-a). Ces derniers ont réalisé une procédure légèrement différente de la nôtre avec une extraction solide/liquide, un partage liquide/liquide permettant d'éliminer les molécules apolaires avec du chloroforme, une étape de concentration via la chromatographie flash suivie d'une purification par chromatographie semi-préparative puis analytique. Cette procédure est donc plus efficace que la nôtre. Ciminiello et al. (2012c) et Pelin et al. (2016b) ne rapportent qu'un rendement final de purification de l'OVTX-a, nous ne pouvons donc pas cerner l'étape ou les étapes ayant conduit aux pertes majoritaires. De plus, nous n'avons aucune information sur les volumes et les durées d'évaporation que les auteurs ont utilisés. Par conséquent, nous ne pouvons pas procéder à une comparaison des deux processus de purification et identifier les étapes critiques qui traduisent l'efficacité de nos procédures.

Les résultats de l'étude de stabilité ont permis de calculer les rendements et masses théoriques obtenus lors de chaque étape de purification. Dans l'ensemble, les valeurs expérimentales et

théoriques sont relativement en accord. Par exemple, nous avons obtenu 5,8 mg d'OVTX après fractionnement par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) et chromatographie semi-préparative à partir de la souche MCCV55 contre 5,5 mg théoriques. Seule l'étape finale de purification a donné des rendements très différents de ceux attendus (i.e. 96 % vs. 16 % théoriques), probablement dus à une mauvaise évaluation des pertes. Il semblerait que la durée de l'évaporation ait un impact très fort sur la perte de toxines. En effet, la concentration des toxines avant et après la dernière étape de chromatographie a nécessité de longues périodes d'évaporation (i.e. 2 x 3 semaines), ce qui s'est traduit par au moins 96 % de perte d'OVTX alors que la perte était seulement d'environ 16 % lors d'un test réalisé sur un petit volume ACN/eau, avec une durée d'évaporation très courte (ca. 1 journée). Dans notre étude, nous avons déjà remarqué que le temps d'évaporation pouvait avoir un impact négatif sur les toxines. En effet, lors de la comparaison de méthode de fractionnement (SEC vs. chromatographie flash), nous avons obtenu un rendement supérieur à ceux obtenus après fractionnement de la biomasse pour la purification (ca. 80 % vs. 50 %). Lors de la purification, nous avons travaillé sur des volumes plus importants d'extraits qui ont engendré de plus longues durées d'évaporation (6 à 10 jours) que pour la comparaison (1 à 3 jours). Cette observation nous avait permis de suspecter qu'il pourrait exister un effet négatif lié à la durée d'évaporation qui a été confirmé par l'étape de purification finale où nous avons obtenu environ 96 % de perte. Les pertes liées à la durée d'évaporation et à la stabilité des toxines dans le temps dans le solvant de purification finale (ACN/eau) n'ont pas pu être étudiées par manque de temps mais restent à déterminer afin de mieux apprécier les pertes observées lors de la purification. Aussi, ces résultats permettront d'optimiser cette dernière étape afin de minimiser les pertes pour les prochaines purifications.

Ce protocole nous a permis d'isoler les OVTX-a et -d mais dont le degré de pureté n'a pas été évalué. L'évaluation de la pureté nécessite d'évaporer à sec un aliquot et de peser la matière sèche obtenue et la comparer avec la quantité mesurée par LC-MS/MS. Etant donné que nous avons obtenu des quantités de l'ordre du microgramme, nous ne voulions pas perdre davantage d'OVTX pour cette mesure, puisqu'une nouvelle évaporation entraînerait de nouvelles pertes. De plus, afin de mesurer précisément la masse d'OVTX obtenue avec une balance de précision (précise jusqu'à 0,01 mg), il aurait fallu évaporer la moitié de l'extrait pour peser 0,1 mg. Dans le cas de l'OVTX-d, les quantités de 10,5 µg étaient trop faibles pour envisager une telle mesure.

Les rendements de purifications peuvent être améliorés et la procédure doit faire l'objet de changements afin de limiter les pertes.

5.3 Perspective pour la purification

D'après les résultats de l'étude de stabilité, le temps de conservation semble être l'une des principales sources de pertes. Or, notre protocole a impliqué de longues périodes d'évaporation liées à des volumes importants de solvant à évaporer. Ainsi, il faut chercher à raccourcir les durées d'évaporation et le nombre d'étapes de purification de manière générale. Pour cela, il est possible de diminuer les volumes à évaporer : i) en réduisant les volumes de solvant d'extraction (i.e. diminution du ratio volume de solvant / masse de culot cellulaire), ii) en utilisant un solvant d'extraction plus volatil (e.g. MeOH 100 %), iii) en utilisant d'autres méthodes d'évaporation plus rapide (e.g. lyophilisation ou évaporateur rotatif) ou iv) en ne sélectionnant que l'apex des pics chromatographiques lors de la séparation des différents analogues par chromatographie (i.e. volume plus faible de solvant, plus concentré en toxines).

D'autres OVTX (i.e. OVTX-b à -l) sont présentes dans les souches d'*O. cf. ovata* décrites dans la littérature et restent à purifier pour déterminer leur potentiel toxique et leur structure. L'OVTX-b est le second analogue le plus abondant et représente 26 % du profil toxinique majoritairement retrouvé parmi les souches en mer Méditerranée (**Brissard et al., 2014; Carnicer et al., 2016b; Accoroni et al., 2017a; Tartaglione et al., 2017; Gémin et al., 2020**). Cette proportion non négligeable nécessite de mieux connaître la toxicité de cet analogue.

Dans le **chapitre 4**, nous avons purifié un mélange de 5 OVTX (OVTX-a à -e) à partir d'une souche (MCCV54) produisant majoritairement de l'OVTX-a et -b. Cependant, les structures similaires des différents analogues leur confèrent un comportement physico-chimique comparable, qui réduit considérablement, pour les profils complexes comme celui-ci, la résolution chromatographique des différents analogues (i.e. mauvaise séparation des pics correspondant aux analogues d'OVTX). Afin de faciliter la purification de l'OVTX-b (et éviter les co-élutions), il serait intéressant de disposer de cultures en masse d'une souche, comme celle décrite dans le profil 3 par **Tartaglione et al. (2017)** composé d'OVTX-b (88 %) et d'OVTX-c (12 %). Cependant, cette souche produit une quantité faible de toxines (i.e. 4 pg/cellule), 6 fois moins que celle produite par nos deux souches MCCV54 et 55, ce qui nécessiterait d'accumuler davantage de biomasse et rallongerait la durée d'obtention de cette dernière. A titre d'information, avec les moyens du laboratoire (i.e. culture en Fernach) l'obtention de la totalité de la biomasse d'*O. cf. ovata* MCCV55 (35 g) a pris environ 6 mois et 1 an pour la souche MCCV54 (75 g). Il est donc nécessaire de trouver un compromis entre la quantité de toxines produites par cellule et le nombre d'analogues produits.

En optimisant les conditions de culture, il serait possible d'augmenter les quantités d'OVTX produites pas les cellules comme cela a été montré dans la littérature (**Pezzolesi et al., 2012; Carnicer et al.,**

2016b) et dans notre étude écophysiological (**Chapitre 3**). Par exemple, dans notre étude, nous avons obtenu 2 à 3 fois plus d'OVTX à 23 °C qu'à 27 ou 30 °C. Cependant, les températures optimales pour la production d'OVTX et la croissance ne sont pas nécessairement les mêmes. Il est donc nécessaire de trouver une condition de culture permettant d'obtenir à la fois un nombre de cellules intéressant et dont les concentrations en toxines ne sont pas trop faibles. Lors de la purification et dans l'optique de diminuer les volumes d'extraction et donc les durées d'évaporation, il est important d'utiliser la plus petite quantité de cellules mais avec des concentrations en toxines importantes. Toutefois, il faut noter qu'un rendement en cellules trop faible peut entraîner des phases d'accumulation de culot plus longues. Pour le choix de la souche, il existe alors un second compromis entre le nombre de cellule et la quantité de toxines produites par cellule afin de limiter le temps d'accumulation de la biomasse.

Dans l'objectif de purifier de nouvelles OVTX comme l'OVTX-b, il conviendrait alors d'isoler une souche produisant majoritairement de l'OVTX-b et qui contiendrait un nombre d'analogues limité. Les conditions de culture d'une telle souche pourraient être optimisées afin d'accroître la quantité de toxines qu'elle pourrait produire. Le choix de la souche d'*O. cf. ovata* et de ses conditions de culture sont des étapes préliminaires indispensables afin d'extraire une quantité maximale de toxines à partir d'une quantité minimale de cellules. Un criblage des souches d'*O. cf. ovata* pourrait alors être une première étape, pour sélectionner une souche au profil toxinique adapté à ce que l'on souhaite purifier.

La variabilité intraspécifique d'*O. cf. ovata* en mer Méditerranée peut être un atout pour la purification de toxines puisque les différentes souches connues possèdent des profils toxiques variés. **Tartaglione et al. (2017)** ont étudié le profil toxinique de 55 souches isolées majoritairement sur les côtes italiennes. Après culture en laboratoire, les auteurs ont mesuré des quantités d'OVTX variables allant de non détectable à 238 pg /cell. Les souches isolées ont pu être regroupées sous 4 profils toxiques, dont deux très majoritaires (i.e. profil 1 contenant majoritairement les OVTX-a à -e et profil 2 contenant les OVTX-a, -d et -e). Cette étude ne prend en compte qu'une partie de la mer Méditerranée et un travail similaire devrait être conduit dans d'autres régions où des blooms d'*O. cf. ovata* sont régulièrement rapportés (e.g., Espagne, France, Grèce, Tunisie). D'une part, une telle étude pourrait permettre de mettre en évidence les variabilités intraspécifiques en lien avec les différentes zones géographiques et d'autre part, elle permettrait de trouver de nouvelles souches au profil toxinique original (comme les profils 3 et 4 dans **Tartaglione et al. (2017)**, contenant majoritairement les OVTX-b et -f respectivement). Cette stratégie pourrait s'avérer efficace pour purifier des OVTX présentes en trop faibles quantités (i.e. < 10 %) dans les autres souches d'*O. cf. ovata* avec des profils « classiques » (i.e. avec une majorité d'OVTX-a et -b). La purification des OVTX-g à -l présentes très

minoritairement (quantitativement et relativement) dans les profils toxiques d'*Ostreopsis*, représente alors un véritable challenge.

Pour résumer, la purification des OVTX est un processus complexe au cours duquel des pertes importantes ont été mesurées, à la fois dans notre étude (i.e. rendements finaux de 2,1 et 1,5 % pour les OVTX-a et -d) et dans la littérature (i.e. 12 % de rendement pour l'OVTX-a dans **Ciminiello et al. (2012c)**). Depuis la première purification d'OVTX-a en 2012 par **Ciminiello et al. (2012c)**, aucune autre étude utilisant des OVTX purifiées n'a été publiée. Toutefois, on peut noter que plusieurs auteurs (**Brissard et al., 2015; Poli et al., 2018**) ont réussi à purifier des mélanges d'OVTX sans isoler un analogue précis. De plus, aucun étalon d'OVTX n'est disponible dans le commerce. La purification exige des quantités importantes de cellules (entre 35 et 80 L de culture, cf. Tableau 25) et des moyens techniques adaptés afin de procéder aux différentes étapes de purification (e.g. chromatographie d'exclusion stérique et semi-préparative). Ce constat permet de mettre en évidence que l'obtention d'OVTX purifiées reste un verrou technique pour la communauté scientifique internationale. La purification et l'isolement d'OVTX restent néanmoins indispensables pour disposer des étalons et de matériaux de références de différents analogues d'OVTX, utiles pour valider les méthodes de détection et d'identification, ainsi que pour les études toxicologiques nécessaires pour mieux apprécier le risque sanitaire à l'égard des OVTX.

Conclusion et synthèse

Ce sujet de thèse est un travail pluridisciplinaire au cours duquel plusieurs domaines ont été abordés : i) l'écologie avec l'étude d'efflorescence d'*Ostreopsis in situ* et ses interactions avec son substrat macroalgal, ii) l'écophysiologie avec l'évaluation des effets de la température et de l'intensité lumineuse sur la croissance, le contenu en OVTX et le métabolome d'*O. cf. ovata* et iii) la chimie analytique avec l'analyse et la purification des OVTX.

Les résultats de l'étude terrain ont permis d'apporter des connaissances sur les profils toxiques d'*O. cf. ovata* en fonction de la dynamique d'un bloom à Villefranche-sur-Mer, de son substrat et de la profondeur. Nous avons pu mettre en évidence une augmentation du quota d'OVTX au cours de la croissance du bloom et une diminution avec la profondeur. Ce travail a permis de mettre en évidence l'effet que peut avoir la macroalgue sur laquelle *O. cf. ovata* se fixe sur leur abondance et leur contenu en OVTX suggérant l'importance d'utiliser des substrats artificiels pour s'abstenir de leurs effets lors des suivis.

L'étude écophysiologique menée au laboratoire sur des cultures acclimatées d'une souche d'*O. cf. ovata* isolée en Méditerranée a montré que l'effet de la température était prédominant sur celui de la lumière pour la croissance, le contenu en OVTX et le métabolome. Néanmoins, la plus faible luminosité induit une réponse du métabolisme différente ainsi que des taux de croissance significativement plus faibles. Compte tenu des nombreux résultats contradictoires retrouvés dans la littérature, les études d'écophysiologie doivent être menées sur plus de souches afin de tirer des tendances plus claires sur l'influence de la température et de la lumière sur *O. cf. ovata*. L'approche métabolomique nous a permis d'annoter une douzaine de molécules comprenant des caroténoïdes et des glycolipides. Cette faible proportion de molécules annotées reflète le manque de données disponibles sur le métabolome des dinoflagellés et suggère que d'autres efforts doivent être réalisés pour identifier les molécules du métabolome des dinoflagellés afin d'accroître les connaissances sur ces organismes et de mieux comprendre les mécanismes mis en œuvre par les cellules pour s'acclimater aux différentes conditions environnementales.

L'étude de stabilité de la PLTX, a montré que des pertes pouvaient être occasionnées dans le temps et qu'elles pouvaient varier en fonction du solvant, du type de contenant ou du mode et de la durée d'évaporation. Ces données sont d'une importance cruciale et permettraient d'expliquer les faibles rendements de purification. Aussi, ces données sont utiles pour la communauté scientifique

internationale concernée par cette problématique et qui rencontre les mêmes difficultés techniques liées à la complexité des profils toxiques d'*Ostreopsis*, pour lesquels aucun étalon n'est disponible dans le commerce. Le bilan des purifications de toxines menées a permis de fournir un mélange de 5 OVTX (OVTX-a à -e) et deux solutions d'OVTX-a et -d pour des études d'écotoxicologie et de cytotoxicologie par les partenaires du projet ANR-OCEAN-15, le LOV et l'ANSES-Fougères respectivement.

Ces travaux de thèse ont permis d'acquérir de nouvelles connaissances sur la problématique d'*O. cf. ovata* en Méditerranée en fonction des paramètres environnementaux (abiotiques et biotiques). Les données terrain vont contribuer à mieux appréhender la dynamique des efflorescences estivales d'*O. cf. ovata* et leur dangerosité en fonction de la période du bloom, mais aussi l'effet du choix du substrat (i.e. espèce de macroalgue) lors des suivis. Les études toxicologiques à partir des molécules d'OVTX purifiées contribueront à mieux apprécier le risque sanitaire à l'égard des OVTX. En effet, contrairement aux toxines réglementées, rappelons qu'actuellement, il n'existe aucun seuil de sécurité sanitaire concernant les OVTX par manque de données toxicologiques et épidémiologiques. Aussi, l'ensemble des données, acquises dans le cadre de ces travaux de thèse, constitueront des éléments d'aide à la décision auprès des gestionnaires des risques sanitaires et environnementaux, ainsi qu'auprès des acteurs socio-économiques, notamment sur les côtes méditerranéennes.

Valorisations scientifiques

Posters :

Marin-Pierre Gémin, Fabienne Hervé, Véronique Séchet, Rodolphe Lemée, Zouher Amzil. **Impact of the global warming on the production of toxins and other metabolites from *Ostreopsis ovata***. Conférence GdR Phycotox – GIS Cyanobactéries, Gif-sur-Yvette (France), 14 - 16 mars 2017.

Marin-Pierre Gémin, Fabienne Hervé, Véronique Séchet, Samuel Bertrand, Korian Lhaute, Rodolphe Lemée, Zouher Amzil. **Bioguided purification of bioactive metabolites of *Ostreopsis cf. ovata*, a toxic benthic dinoflagellate**. DINO 11th, Bordeaux (France), 17 - 21 juillet 2017.

Marin-Pierre Gémin, Damien Réveillon, Fabienne Hervé, Yoann Le Merrer, Véronique Séchet, Samuel Bertrand, Rodolphe Lemée, Zouher Amzil. **Impact of the temperature and light intensity on growth and toxin content of *Ostreopsis cf. ovata***. ICHA 2018, Nantes (France), 21 – 26 octobre 2018.

Marin-Pierre Gémin, Réveillon Damien, Fabienne Hervé, Véronique Séchet, Samuel Bertrand, Zouher Amzil. **Combined effects of temperature and light intensity on growth, toxins and metabolome of *Ostreopsis cf. ovata*, a toxic benthic dinoflagellate**. EPC 7th, Zagreb (Croatie), 25 – 30 août 2019.

Prix : 3^{ème} place au concours du meilleur poster étudiant

Communications orales :

Marin-Pierre Gémin, Réveillon Damien, Fabienne Hervé, Véronique Séchet, Samuel Bertrand, Zouher Amzil. **Impact du changement global sur la production de toxines et autres métabolites chez *Ostreopsis cf. ovata*, dinoflagellé benthique toxique**. Journée des doctorants Ifremer, Nantes, 17 janvier 2017.

Marin-Pierre Gémin, Damien Réveillon, Fabienne Hervé, Véronique Séchet, Samuel Bertrand, Rodolphe Lemée, Zouher Amzil. **Combined effects of temperature and light intensity on growth and toxin production of *Ostreopsis cf. ovata***. Conférence GdR Phycotox, Brest, 15 – 16 mai 2019.

Articles acceptés

Gémin Marin-Pierre, Réveillon Damien, Hervé Fabienne, Pavaux Anne-Sophie, Tharaud Maxime, Séchet Véronique, Bertrand Samuel, Lemée Rodolphe, Amzil Zouher, 2020. **Toxin content of *Ostreopsis cf. ovata* depends on bloom phases, depth and macroalgae in the NW Mediterranean Sea.** Harmful Algae 92, p-101727.

doi : <https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.101727>

Pavaux Anne-Sophie, Ternon Eva, Dufour Louison, Marro Sophie, Gémin Marin-Pierre, Thomas Olivier P., Lemée Rodolphe, 2020. **Efficient, fast and inexpensive bioassay to monitor benthic microalgae toxicity: Application to *Ostreopsis* species.** Aquat. Toxicol., 105485.

doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105485>

Articles en préparation

Gémin Marin-Pierre, Bertrand Samuel, Séchet Véronique, Amzil Zouher, Réveillon Damien, 2020. **Combined effects of temperature and light intensity on growth, metabolome and ovatoxins content of *Ostreopsis cf. ovata* strain from the Mediterranean Sea.** A soumettre dans Harmful Algae.

Ternon Eva, Pavaux Anne-Sophie, Peltekis Alexandra, Gémin Marin-Pierre, Jauzein Cécile, Bailleul Benjamin, Lemée Rodolphe, Thomas Olivier. **Allelochemistry in the dynamics of microalgal species: case study of the toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata*.**

Laury Açaf, Cécile Jauzein, Marin-Pierre Gémin, Thierry Blasco, Sophie Marro, Marie Abboud-Abi Saab, Zouher Amzil, Rodolphe Lemée. **Nitrogen uptake of the benthic toxic dinoflagellates *Ostreopsis cf. ovata* and *Ostreopsis fattorussoi* of the Mediterranean Sea.**

Bibliographie

- Abboud-Abi Saab, M., 1989. Les dinoflagellés des eaux côtières libanaises- Espèces rares ou nouvelles du phytoplancton marin. *Lebanese Science Bulletin* 5, 5-16.
- Abdennadher, M., Zouari, A.B., Sahnoun, W.F., Alverca, E., Penna, A., Hamza, A., 2017. *Ostreopsis* cf. *ovata* in the Gulf of Gabes (south-eastern Mediterranean Sea): morphological, molecular and ecological characterization. *Harmful Algae* 63, 56-67.
- Accoroni, S., Glibert, P., Pichierri, S., Romagnoli, T., Marini, M., Totti, C., 2015a. A conceptual model of annual *Ostreopsis* cf. *ovata* blooms in the northern Adriatic Sea based on the synergic effects of hydrodynamics, temperature, and the N:P ratio of water column nutrients. *Harmful Algae* 45, 14-25.
- Accoroni, S., Percopo, I., Cerino, F., Romagnoli, T., Pichierri, S., Perrone, C., Totti, C., 2015b. Allelopathic interactions between the HAB dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* and macroalgae. *Harmful Algae* 49, 147-155.
- Accoroni, S., Romagnoli, T., Colombo, F., Pennesi, C., Di Camillo, C.G., Marini, M., Battocchi, C., Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Dello Iacovo, E., Fattorusso, E., Tartaglione, L., Penna, A., Totti, C., 2011. *Ostreopsis* cf. *ovata* bloom in the northern Adriatic Sea during summer 2009: ecology, molecular characterization and toxin profile. *Marine Pollution Bulletin* 62(11), 2512-2519.
- Accoroni, S., Romagnoli, T., Penna, A., Capellacci, S., Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Tartaglione, L., Abboud-Abi Saab, M., Giussani, V., Asnaghi, V., Chiantore, M., Totti, C., 2016. *Ostreopsis fattorussoi* sp. nov. (Dinophyceae), a new benthic toxic *Ostreopsis* species from the eastern Mediterranean Sea. *Journal of Phycology* 52(6), 1064-1084.
- Accoroni, S., Romagnoli, T., Pichierri, S., Colombo, F., Totti, C., 2012. Morphometric analysis of *Ostreopsis* cf. *ovata* cells in relation to environmental conditions and bloom phases. *Harmful Algae* 19, 15-22.
- Accoroni, S., Romagnoli, T., Pichierri, S., Totti, C., 2014. New insights on the life cycle stages of the toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata*. *Harmful Algae* 34, 7-16.
- Accoroni, S., Tartaglione, L., Dello Iacovo, E., Pichierri, S., Marini, M., Campanelli, A., Dell'Aversano, C., Totti, C., 2017a. Influence of environmental factors on the toxin production of *Ostreopsis* cf. *ovata* during bloom events. *Marine Pollution Bulletin* 123(1-2), 261-268.
- Accoroni, S., Totti, C., 2016. The toxic benthic dinoflagellates of the genus *Ostreopsis* in temperate areas: a review. *Advances in Oceanography and Limnology* 7, 1-15.
- Accoroni, S., Totti, C., Razza, E., Congestri, R., Campanelli, A., Marini, M., Ellwood, N.T.W., 2017b. Phosphatase activities of a microepiphytic community during a bloom of *Ostreopsis* cf. *ovata* in the northern Adriatic Sea. *Water Research* 120, 272-279.
- Adachi, M., Ikegami, T., Yamaguchi, H., 2008. The genus *Ostreopsis* in the coastal regions in Tosa Bay, southern part of Japan, Proc. 13th Int. Conf. on Harmful Algae, Hong Kong, p. 1.
- Adams, C., Larkin, S., Hoagland, P., Sancewich, B., 2018. Assessing the Economic Consequences of Harmful Algal Blooms, pp. 337-354.
- Aguilera-Sáez, L.M., Abreu, A.C., Camacho-Rodríguez, J., González-López, C.V., del Carmen Cerón-García, M., Fernández, I., 2019. NMR Metabolomics as an Effective Tool To Unravel the Effect of Light Intensity and Temperature on the Composition of the Marine Microalgae *Isochrysis galbana*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 67(14), 3879-3889.

- Aissaoui, A., Turki, S., Ben Hassine, O.K., 2012. Occurrence of harmful dinoflagellates in the punic harbors of Carthage (Gulf of Tunis) and their correlations with the physicochemical parameters. *Bulletin de l'Institut National des Sciences et Technologies de la Mer* 39, 127-140.
- Alcala, A.C., Alcalá, L.C., Garth, J.S., Yasumura, D., Yasumoto, T., 1988. Human fatality due to ingestion of the crab *Demania reynaudii* that contained a palytoxin-like toxin. *Toxicon* 26(1), 105-107.
- Alexander, M., Scott, J., Friedland, K., Mills, K., Pershing, A., Thomas, A., 2018. Projected sea surface temperatures over the 21st century: Changes in the mean, variability and extremes for large marine ecosystem regions of Northern Oceans. *Elem Sci Anth* 6, 9.
- Aligizaki, K., 2009. Spread of potentially toxic benthic dinoflagellates in the Mediterranean Sea: a response to climate change, Abstract book of the CIESM Workshop n°40: "Phytoplankton response to Mediterranean environmental change.
- Aligizaki, K., Katikou, P., Milandri, A., Diogène, J., 2011. Occurrence of palytoxin-group toxins in seafood and future strategies to complement the present state of the art. *Toxicon* 57(3), 390-399.
- Aligizaki, K., Katikou, P., Nikolaidis, G., Panou, A., 2008. First episode of shellfish contamination by palytoxin-like compounds from *Ostreopsis* species (Aegean Sea, Greece). *Toxicon* 51(3), 418-427.
- Aligizaki, K., Nikolaidis, G., 2006. The presence of the potentially toxic genera *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophyceae) in the north Aegean sea, Greece. *Harmful Algae* 5(6), 717-730.
- Aminot, A., Kérouel, R., Coverly, S., 2009. Nutrients in Seawater Using Segmented Flow Analysis, pp. 143-178.
- Amzil, Z., Sibat, M., Chomérat, N., Grossel, H., Marco-Miralles, F., Lemée, R., Nézan, E., Séchet, V., 2012. Ovatoxin-a and palytoxin accumulation in seafood in relation to *Ostreopsis* cf. *ovata* blooms on the French Mediterranean coast. *Marine Drugs* 10(2), 477-496.
- Amzil, Z., Vernoux, J.P., Pottier, I., 2001. Les principales classes de phycotoxines, In: Ifremer (Ed.), *Toxines d'algues dans l'alimentation*. Frémy, J. M., Lassus, P., pp. 160-180.
- Anderson, D., 2014. HABs in a changing world: a perspective on harmful algal blooms, their impacts, and research and management in a dynamic era of climactic and environmental change. *Harmful Algae* 2012 (2012) 2012, 3-17.
- Anderson, D., 2017. Chapter 1. Harmful algal blooms, In: Donald M. Anderson, Siobhan F.E. Boerlage, Dixon, M.B. (Eds.), *Harmful Algal Blooms (HABs) and Desalination: A Guide to Impacts, Monitoring, and Management*, pp. 17-52.
- Anderson, D.M., Cembella, A.D., Hallegraeff, G.M., 2012. Progress in Understanding Harmful Algal Blooms: Paradigm Shifts and New Technologies for Research, Monitoring, and Management, In: Carlson, C.A., Giovannoni, S.J. (Eds.), *Annual Review of Marine Science*, Vol 4. Annual Reviews, Palo Alto, pp. 143-176.
- Arbelaez M., N., Mancera Pineda, J.E., Reguera, B., 2017. Dinoflagelados epífitos de *Thalassia testudinum* en dos sistemas costeros del Caribe colombiano. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras - INVEMAR* 46, 9-40.
- Ares, I.R., Louzao, M.C., Vieytes, M.R., Yasumoto, T., Botana, L.M., 2005. Actin cytoskeleton of rabbit intestinal cells is a target for potent marine phycotoxins. *The Journal of experimental biology* 208(Pt 22), 4345-4354.
- Argyle, P.A., Harwood, D.T., Rhodes, L.L., Champeau, O., Tremblay, L.A., 2016. Toxicity assessment of New Zealand and Pacific dinoflagellates *Ostreopsis* and *Gambierdiscus* (Dinophyceae) extracts using bioassays. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 50(3), 444-456.
- Aron, A.T., Gentry, E., McPhail, K.L., Nothias, L.F., Nothias-Esposito, M.I., Bouslimani, A., Petras, D., Gauglitz, J.M., Sikora, N., Vargas, F., van der Hooft, J.J.J., Ernst, M., Kang, K.B., Aceves, C.M., Caraballo-Rodríguez, A.M., Koester, I., Weldon, K.C., Bertrand, S., Roullier, C., Sun, K., Tehan, R.M., Boya, C.A., Martin H., C., Gutiérrez, M., Ulloa, A.M., Mora, J.A.T., Mojica-Flores, R., Lakey-Beitia,

- J., Vásquez-Chaves, V., Calderón, A.I., Tayler, N., Keyzers, R.A., Tugizimana, F., Ndlovu, N., Aksenov, A.A., Jarmusch, A.K., Schmid, R., Truman, A.W., Bandeira, N., Wang, M., Dorrestein, P., 2019. Reproducible Molecular Networking Of Untargeted Mass Spectrometry Data Using GNPS. ChemRxiv, doi: 10.26434/chemrxiv.9333212.v9333211.
- Artigas, P., Gadsby, D.C., 2004. Large diameter of palytoxin-induced Na/K pump channels and modulation of palytoxin interaction by Na/K pump ligands. *J. Gen. Physiol.* 123(4), 357-376.
- Asnaghi, V., Bertolotto, R., Giussani, V., Mangialajo, L., Hewitt, J., Thrush, S., Moretto, P., Castellano, M., Rossi, A., Povero, P., Cattaneo-Vietti, R., Chiantore, M., 2012. Interannual variability in *Ostreopsis ovata* bloom dynamic along Genoa coast (North-western Mediterranean): a preliminary modeling approach. *Cryptogamie Algol* 33(2), 181-189.
- Ballantine, D.L., Tosteson, T.R., Bardales, A.T., 1988. Population-Dynamics and Toxicity of Natural-Populations of Benthic Dinoflagellates in Southwestern Puerto-Rico. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 119(3), 201-212.
- Basti, L., Hégaret, H., Shumway, S., 2018. Harmful Algal Blooms and Shellfish, *Harmful Algal Blooms*, pp. 135-190.
- Battocchi, C., Totti, C., Vila, M., Masó, M., Capellacci, S., Accoroni, S., Reñé, A., Scardi, M., Penna, A., 2010. Monitoring toxic microalgae *Ostreopsis* (dinoflagellate) species in coastal waters of the Mediterranean Sea using molecular PCR-based assay combined with light microscopy. *Marine Pollution Bulletin* 60(7), 1074-1084.
- Beardall, J., Stojkovic, S., Larsen, S., 2009. Living in a high CO₂ world: impacts of global climate change on marine phytoplankton. *Plant Ecology & Diversity* 2(2), 191-205.
- Beau, N., Allemand, D., Molinatti, E., Claessens, Y.E., 2017. Palytoxin Poisoning, Limu-make-o'hana's Devilry. *Ann. Fr. Med. Urgence* 7(1), 52-54.
- Bechard, A., 2019. Red tide at morning, tourists take warning? County-level economic effects of HABS on tourism dependent sectors. *Harmful Algae*, 101689.
- Belin, C., Soudant, D., 2018. Trente années d'observation des micro-algues et des toxines d'algues sur le littoral.
- Ben-Gharbia, H., Yahia, O.K., Amzil, Z., Chomérat, N., Abadie, E., Masseret, E., Sibat, M., Zmerli Triki, H., Nouri, H., Laabir, M., 2016. Toxicity and Growth Assessments of Three Thermophilic Benthic Dinoflagellates (*Ostreopsis* cf. *ovata*, *Prorocentrum lima* and *Coolia monotis*) Developing in the Southern Mediterranean Basin. *Toxins* 8(10), 38.
- Ben Gharbia, H., Kefi-Daly Yahia, O., Cecchi, P., Masseret, E., Amzil, Z., Hervé, F., Rovillon, G., Nouri, H., M'Rabet, C., Couet, D., Zmerli Triki, H., Laabir, M., 2017. New insights on the species-specific allelopathic interactions between macrophytes and marine HAB dinoflagellates. *PLoS ONE* 12(11), e0187963.
- Ben Gharbia, H., Laabir, M., Ben Mhamed, A., Gueroun, S., Daly Yahia, M., Nouri, H., Mrabet, C., Shili, A., Kefi - Daly Yahia, O., 2019. Occurrence of epibenthic dinoflagellates in relation to biotic substrates and to environmental factors in Southern Mediterranean (Bizerte Bay and Lagoon, Tunisia): An emphasis on the harmful *Ostreopsis* spp., *Prorocentrum lima* and *Coolia monotis*. *Harmful Algae* 90.
- Berdalet, E., Fleming, L.E., Gowen, R., Davidson, K., Hess, P., Backer, L.C., Moore, S.K., Hoagland, P., Enevoldsen, H., 2016. Marine harmful algal blooms, human health and wellbeing: challenges and opportunities in the 21st century. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 2015(1), 61-91.
- Berdalet, E., Tester, P., Zingone, A., 2013. Global ecology and oceanography of harmful algal blooms, GEOHAB Core Research Project: HABs in benthic systems. IOC, UNESCO, SCOR.

- Besada, E.G., Loeblich, L.A., Loeblich, A.R., 1982. Observations on Tropical, Benthic Dinoflagellates from Ciguatera-Endemic Areas - *Coolia*, *Gambierdiscus*, and *Ostreopsis*. *Bulletin of Marine Science* 32(3), 723-735.
- Bi, Y., Wang, F., Zhang, W., 2019. Omics Analysis for Dinoflagellates Biology Research. *Microorganisms* 7, 288.
- Bidigare, R., Heukelem, L., Trees, C., 2005. Analysis of Algal Pigments by High-Performance Liquid Chromatography. *Algal Culturing Techniques*, 327-345.
- Bindoff, N., Willebrand, J., Artale, V., Cazenave, A., Gregory, J., Gulev, S., Hanawa, K., Le Quéré, C., Levitus, S., Nojiri, Y., Shum, C.K., Talley, L., Alakkat, U., 2007. Observations: Oceanic Climate Change and Sea Level. The Physical Science Basis. Working Group I Contribution to the Intergovernmental Panel on Climate Change Fourth Assessment Report.
- Biré, R., Trotereau, S., Lemée, R., Delpont, C., Chabot, B., Aumond, Y., Krys, S., 2013. Occurrence of palytoxins in marine organisms from different trophic levels of the French Mediterranean coast harvested in 2009. *Harmful Algae* 28, 10-22.
- Biré, R., Trotereau, S., Lemée, R., Oregioni, D., Delpont, C., Krys, S., Guérin, T., 2015. Hunt for Palytoxins in a Wide Variety of Marine Organisms Harvested in 2010 on the French Mediterranean Coast. *Marine Drugs* 13(8), 5425-5446.
- Bjørnland, T., Haxo, F.T., Liaaen-Jensen, S., 2003. Carotenoids of the Florida red tide dinoflagellate *Karenia brevis*. *Biochemical Systematics and Ecology* 31(10), 1147-1162.
- Blanfuné, A., Boudouresque, C.F., Grosse, H., Thibaut, T., 2015. Distribution and abundance of *Ostreopsis* spp. and associated species (Dinophyceae) in the northwestern Mediterranean: the region and the macroalgal substrate matter. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22(16), 12332-12346.
- Boccard, J., Rudaz, S., 2014. Harnessing the complexity of metabolomic data with chemometrics. *Journal of Chemometrics* 28(1), 1-9.
- Boccard, J., Rudaz, S., 2016. Exploring Omics data from designed experiments using analysis of variance multiblock Orthogonal Partial Least Squares. *Analytica Chimica Acta* 920, 18-28.
- Boisnoir, A., Pascal, P.-Y., Cordonnier, S., Lemée, R., 2018. Depth distribution of benthic dinoflagellates in the Caribbean Sea. *Journal of Sea Research* 135, 74-83.
- Bomber, J.W., Rubio, M.G., Norris, D.R., 1989. Epiphytism of dinoflagellates associated with the disease ciguatera substrate specificity and nutrition. *Phycologia* 28(3), 360-368.
- Borowitzka, M., 2018. The 'stress' concept in microalgal biology—homeostasis, acclimation and adaptation. *J. Appl. Phycol.* 30.
- Botana, L.M., 2016. Toxicological Perspective on Climate Change: Aquatic Toxins. *Chem. Res. Toxicol.* 29(4), 619-625.
- Brahim, M.B., Feki, M., Bouain, A., 2015. Occurrences of the toxic dinoflagellate *Ostreopsis ovata* in relation with environmental factors in Kerkennah Island (Southern coast of Tunisia). *Journal of Coastal Life Medicine* 3(8), 930-933.
- Brandenburg, K., Wohlrab, S., John, U., Kremp, A., Jerney, J., Krock, B., Van de Waal, D., 2018. Intraspecific trait variation and trade-offs within and across populations of a toxic dinoflagellate. *Ecology Letters* 21.
- Brandenburg, K.M., Velthuis, M., Van de Waal, D.B., 2019. Meta-analysis reveals enhanced growth of marine harmful algae from temperate regions with warming and elevated CO₂ levels. *Global Change Biology* 25(8), 2607-2618.
- Bravo, I., Vila, M., Magadan, S., Rial, P., Rodríguez, F., Fraga, S., Franco, J.M., Riobó, P., Sala, M.M., 2010. Studies on cultures of *Ostreopsis cf ovata*; life cycle observations, 14th International Conference on Harmful Algae, Crete.

- Brescianini, C., Grillo, C., Melchiorre, N., Bertolotto, R., Ferrari, A., Vivaldi, B., Icardi, G., Gramaccioni, L., Funari, E., Scardala, S., 2006. *Ostreopsis ovata* algal blooms affecting human health in Genova, Italy, 2005 and 2006. Euro surveillance : bulletin européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin 11, E060907.060903.
- Brissard, C., 2014. Ovatoxines : purification à partir d'*Ostreopsis cf. ovata* en culture et niveaux d'accumulation dans les produits de la mer, p. 1 vol. (254 p.).
- Brissard, C., Herrenknecht, C., Séchet, V., Hervé, F., Pisapia, F., Harcouet, J., Lemée, R., Chomérat, N., Hess, P., Amzil, Z., 2014. Complex toxin profile of French Mediterranean *Ostreopsis cf. ovata* strains, seafood accumulation and ovatoxins repurification. Marine Drugs 12(5), 2851-2876.
- Brissard, C., Hervé, F., Sibat, M., Séchet, V., Hess, P., Amzil, Z., Herrenknecht, C., 2015. Characterization of ovatoxin-h, a new ovatoxin analog, and evaluation of chromatographic columns for ovatoxin analysis and purification. Journal of Chromatography A 1388, 87-101.
- Bundy, J., Davey, M., Viant, M., 2008. Environmental metabolomics: A critical review and future perspectives. Metabolomics 5, 3-21.
- Burkholder, J., Glibert, P., Skelton, H., 2008. Mixotrophy, a Major Mode of Nutrition for Harmful Algal Species in Eutrophic Waters. Harmful Algae 8, 77-93.
- Burkholder, J.M., Shumway, S.E., Glibert, P.M., 2018. Food Web and Ecosystem Impacts of Harmful Algae, Harmful Algal Blooms, pp. 243-336.
- Calbet, A., Bertos, M., Fuentes-Grünewald, C., Alacid, E., Figueroa, R., Renom, B., Garcés, E., 2011. Intraspecific variability in *Karlodinium veneficum*: Growth rates, mixotrophy, and lipid composition. Harmful Algae 10(6), 654-667.
- Calon, T., Sinno-Tellier, S., de Haro, L., Bloch, J., 2019. Palytoxin exposure induced by soft corals in aquariums: Cases report of French poison centers network from 2000 to 2017. Toxicologie Analytique & Clinique 31(1), 64-76.
- Carella, F., Sardo, A., Mangoni, O., Di Cioccio, D., Urciuolo, G., De Vico, G., Zingone, A., 2015. Quantitative histopathology of the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis* L.) exposed to the harmful dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata*. Journal of invertebrate pathology 127.
- Carnicer, O., De La Fuente, P., Canepa, A., Keith, I., Rebolledo Monsalve, E.R., Diogène, J., Fernández, M., 2019. Marine Dinoflagellate Assemblage in the Galápagos Marine Reserve. Front. Mar. Sci. 6, 235.
- Carnicer, O., García-Altare, M., Andree Karl, B., Diogène, J., Fernández-Tejedor, M., 2016a. First evidence of *Ostreopsis cf. ovata* in the eastern tropical Pacific Ocean, Ecuadorian coast, Botanica Marina, p. 267.
- Carnicer, O., García-Altare, M., Andree, K.B., Tartaglione, L., Dell'Aversano, C., Ciminiello, P., de la Iglesia, P., Diogène, J., Fernández-Tejedor, M., 2016b. *Ostreopsis cf. ovata* from western Mediterranean Sea: Physiological responses under different temperature and salinity conditions. Harmful Algae 57, 98-108.
- Carnicer, O., Guallar, C., Andree, K.B., Diogène, J., Fernández-Tejedor, M., 2015a. *Ostreopsis cf. ovata* dynamics in the NW Mediterranean Sea in relation to biotic and abiotic factors. Environmental Research 143(Pt B), 89-99.
- Carnicer, O., Tunin-Ley, A., Andree, K., Turquet, J., Diogène, J., Fernández, M., 2015b. Contribution to the Genus *Ostreopsis* in Reunion Island (Indian Ocean): Molecular, Morphologic and Toxicity Characterization. Cryptogamie Algol 36, 101-119.
- Carreto, J., Carignan, M., Montoya, N., 2001. Comparative studies on mycosporine-like amino acids, paralytic shellfish toxins and, pigment profiles of the toxic dinoflagellates *Alexandrium tamarense*, *Acatenella* and *A-minutum*. Marine Ecology Progress Series Mar. Ecol. Prog. Ser., 49-60.
- Carroll, A.R., Copp, B.R., Davis, R.A., Keyzers, R.A., Prinsep, M.R., 2019. Marine natural products. Natural Product Reports 36(1), 122-173.

- Castanedo, F., 2013. A review of data fusion techniques. *Scientific World Journal* 2013, 704504.
- Chambers, M.C., Maclean, B., Burke, R., Amodei, D., Ruderman, D.L., Neumann, S., Gatto, L., Fischer, B., Pratt, B., Egertson, J., Hoff, K., Kessner, D., Tasman, N., Shulman, N., Frewen, B., Baker, T.A., Brusniak, M.-Y., Paulse, C., Creasy, D., Flashner, L., Kani, K., Moulding, C., Seymour, S.L., Nuwaysir, L.M., Lefebvre, B., Kuhlmann, F., Roark, J., Rainer, P., Detlev, S., Hemenway, T., Huhmer, A., Langridge, J., Connolly, B., Chadick, T., Holly, K., Eckels, J., Deutsch, E.W., Moritz, R.L., Katz, J.E., Agus, D.B., MacCoss, M., Tabb, D.L., Mallick, P., 2012. A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. *Nature Biotechnology* 30(10), 918-920.
- Chang, F.H., Shimizu, Y., Hay, B., Stewart, R., Mackay, G., Tasker, R., 2000. Three recently recorded *Ostreopsis* spp. (Dinophyceae) in New Zealand: temporal and regional distribution in the upper North Island from 1995 to 1997. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 34(1), 29-39.
- Chaudhry, N.L., Przybek, J., Hamilton, A., Carley, F., 2016. Unique case of palytoxin-related keratitis. *Clin. Exp. Ophthalmol.* 44(9), 853-854.
- Chomerat, N., Bilien, G., Couté, A., Quod, J.-P., 2020. Reinvestigation of *Ostreopsis mascarenensis* Quod (Dinophyceae, Gonyaulacales) from Réunion Island (SW Indian Ocean): molecular phylogeny and emended description. *Phycologia*, 1-14.
- Chomérat, N., Bilien, G., Derrien, A., Henry, K., Ung, A., Viallon, J., Darius, H.T., Mahana Iti Gatti, C., Roue, M., Hervé, F., Réveillon, D., Amzil, Z., Chinain, M., 2019. *Ostreopsis lenticularis* Y. Fukuyo (Dinophyceae, Gonyaulacales) from French Polynesia (South Pacific Ocean): A revisit of its morphology, molecular phylogeny and toxicity. *Harmful Algae* 84, 95-111.
- Chu Van, T., 2002a. Data on the species composition and the distribution of harmful marine epiphytic macroalgae living on coral reefs in the north. *J. Biol* 24, 22-30.
- Chu Van, T., 2002b. Data on the species composition and the distribution of potentially marine epiphytic macroalgae living on coral reefs in Hai Van–Son Cha (Thua Thien–Hue). *Mar. Resour. Env* 8, 220-227.
- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Dello Iacovo, E., Fattorusso, E., Forino, M., Grauso, L., Tartaglione, L., 2012a. High resolution LC-MS(n) fragmentation pattern of palytoxin as template to gain new insights into ovatoxin-a structure. The key role of calcium in MS behavior of palytoxins. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 23(5), 952-963.
- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Dello Iacovo, E., Fattorusso, E., Forino, M., Grauso, L., Tartaglione, L., 2012b. Stereochemical studies on ovatoxin-a. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* 18(52), 16836-16843.
- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Dello Iacovo, E., Fattorusso, E., Forino, M., Grauso, L., Tartaglione, L., Guerrini, F., Pezzolesi, L., Pistocchi, R., Vanucci, S., 2012c. Isolation and structure elucidation of ovatoxin-a, the major toxin produced by *Ostreopsis ovata*. *Journal of the American Chemical Society* 134(3), 1869-1875.
- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Dello Iacovo, E., Fattorusso, E., Forino, M., Grauso, L., Tartaglione, L., Guerrini, F., Pistocchi, R., 2010. Complex palytoxin-like profile of *Ostreopsis ovata*. Identification of four new ovatoxins by high-resolution liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24(18), 2735-2744.
- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Dello Iacovo, E., Fattorusso, E., Forino, M., Tartaglione, L., Benedettini, G., Onorari, M., Serena, F., Battocchi, C., Casabianca, S., Penna, A., 2014. First Finding of *Ostreopsis* cf. *ovata* Toxins in Marine Aerosols. *Environmental Science & Technology* 48(6), 3532-3540.
- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Tartaglione, L., Grillo, C., Melchiorre, N., 2008. Putative palytoxin and its new analogue, ovatoxin-a, in *Ostreopsis ovata* collected along the Ligurian coasts during the 2006 toxic outbreak. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 19(1), 111-120.

- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Iacovo, E.D., Fattorusso, E., Forino, M., Tartaglione, L., Battocchi, C., Crinelli, R., Carloni, E., Magnani, M., Penna, A., 2012d. Unique toxin profile of a Mediterranean *Ostreopsis* cf. *ovata* strain: HR LC-MS(n) characterization of ovatoxin-f, a new palytoxin congener. *Chem Res Toxicol* 25(6), 1243-1252.
- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Magno, G., S., Tartaglione, L., Grillo, C., Melchiorre, N., 2006. The Genoa 2005 Outbreak. Determination of Putative Palytoxin in Mediterranean *Ostreopsis ovata* by a New Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Method. *Anal. Chem.* 78, 6153-6189.
- Cohu, S., Lemée, R., 2012. Vertical distribution of the toxic epibenthic dinoflagellates *Ostreopsis* cf. *ovata*, *Prorocentrum lima* and *Coolia monotis* in the NW Mediterranean Sea. *Cah. Biol. Mar.* 53, 373-380.
- Cohu, S., Mangialajo, L., Thibaut, T., Blanfuné, A., Marro, S., Lemée, R., 2013. Proliferation of the toxic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* in relation to depth, biotic substrate and environmental factors in the North West Mediterranean Sea. *Harmful Algae* 24, 32-44.
- Cohu, S., Thibaut, T., Mangialajo, L., Labat, J.P., Passafiume, O., Blanfuné, A., Simon, N., Cottalorda, J.M., Lemée, R., 2011. Occurrence of the toxic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* in relation with environmental factors in Monaco (NW Mediterranean). *Marine Pollution Bulletin* 62(12), 2681-2691.
- Conceição, D., Lopes, R.G., Derner, R.B., Cella, H., do Carmo, A.P.B., Montes D'Oca, M.G., Petersen, R., Passos, M.F., Vargas, J.V.C., Galli-Terasawa, L.V., Kava, V., 2020. The effect of light intensity on the production and accumulation of pigments and fatty acids in *Phaeodactylum tricorutum*. *J. Appl. Phycol.*
- Cramer, W., Guiot, J., Marini, K., 2019. MedECC booklet: risks associated to climate and environmental changes in the Mediterranean region.
- Crinelli, R., Carloni, E., Giacomini, E., Penna, A., Dominici, S., Battocchi, C., Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Tartaglione, L., Magnani, M., 2012. Palytoxin and an *Ostreopsis* Toxin Extract Increase the Levels of mRNAs Encoding Inflammation-Related Proteins in Human Macrophages via p38 MAPK and NF- κ B. *PLoS ONE* 7(6), e38139.
- David, H., Laza-Martinez, A., Miguel, I., Orive, E., 2013. *Ostreopsis* cf. *siamensis* and *Ostreopsis* cf. *ovata* from the Atlantic Iberian Peninsula: Morphological and phylogenetic characterization. *Harmful Algae* 30.
- David, H., Nascimento, P., Caeiro, M.F., Melo, R., Amorim, A., 2018. First *Ostreopsis* bloom detected in the bay of Cascais, Portugal, XIII Reunión Ibérica de Algas Tóxicas y biotoxinas marinas 2018, Vigo, p. 50.
- Dayalan, S., Xia, J., Spicer, R.A., Salek, R., Roessner, U., 2019. Metabolome Analysis, In: Ranganathan, S., Gribskov, M., Nakai, K., Schönbach, C. (Eds.), *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*. Academic Press, Oxford, pp. 396-409.
- de Haan, J.R., Wehrens, R., Bauerschmidt, S., Piek, E., Schaik, R.C.v., Buydens, L.M.C., 2007. Interpretation of ANOVA models for microarray data using PCA. *Bioinformatics* 23(2), 184-190.
- Deeds, J.R., Schwartz, M.D., 2010. Human risk associated with palytoxin exposure. *Toxicol* 56(2), 150-162.
- Di Cioccio, D., Buia, M.C., Zingone, A., 2014. Ocean acidification will not deliver us from *Ostreopsis*, *Proceedings 15th ICHA*, Changwon, Korea.
- Dira, Z., Bel Hassen, M., Hamza, A., Rebai, A., Bouain, A., Ayadi, H., Aleya, L., 2009. Spatial and temporal variations of microphytoplankton composition related to hydrographic conditions in the Gulf of Gabès. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 89(08), 1559.
- Durando, P., Ansaldi, F., Oreste, P., Moscatelli, P., Marensi, L., Grillo, C., Gasparini, R., Icardi, G., 2007. *Ostreopsis ovata* and human health: Epidemiological and clinical features of respiratory syndrome

- outbreaks from a two year syndromic surveillance, 2005–2006, in northwest Italy. *Euro Surveillance* 12(23).
- Echigoya, R., Rhodes, L., Oshima, Y., Satake, M., 2005. The structures of five new antifungal and hemolytic amphidinol analogs from *Amphidinium carterae* collected in New Zealand. *Harmful Algae* 4(2), 383-389.
- EFSA, 2008a. Marine biotoxins in shellfish - okadaic acid and analogues - Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain. *EFSA Journal* 6(1), 589.
- EFSA, 2008b. Marine biotoxins in shellfish – Azaspiracid group - Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain. *EFSA Journal* 6(10), 723.
- EFSA, 2009a. Marine biotoxins in shellfish – Domoic acid. *EFSA Journal* 7(7), 1181.
- EFSA, 2009b. Marine biotoxins in shellfish – Pectenotoxin group. *EFSA Journal* 7(6), 1109.
- EFSA, 2009c. Marine biotoxins in shellfish – Saxitoxin group. *EFSA Journal* 7(4), 1019.
- EFSA, 2009d. Marine biotoxins in shellfish – Summary on regulated marine biotoxins. *EFSA Journal* 7(8).
- EFSA, 2009e. Marine biotoxins in shellfish – Yessotoxin group - Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain. *EFSA Journal* 7(2), 907.
- EFSA, 2009f. Scientific Opinion on marine biotoxins in shellfish – Palytoxin group. *EFSA Journal* 7(12), 1393.
- EFSA, 2010a. Scientific Opinion on marine biotoxins in shellfish – Cyclic imines (spirolides, gymnodimines, pinnatoxins and pteriatoxins). *EFSA Journal* 8(6).
- EFSA, 2010b. Scientific Opinion on marine biotoxins in shellfish – Emerging toxins: Brevetoxin group. *EFSA Journal* 8(7).
- EFSA, 2010c. Scientific Opinion on marine biotoxins in shellfish – Emerging toxins: Ciguatoxin group. *EFSA Journal* 8(6).
- Espina, B., Cagide, E., Louzao, M.C., Fernández, M.M., Vieytes, M.R., Katikou, P., Villar, A., Jaen, D., Maman, L., Botana, L.M., 2009. Specific and dynamic detection of palytoxins by in vitro microplate assay with human neuroblastoma cells. *Biosci Rep* 29(1), 13-23.
- Faimali, M., Giussani, V., Piazza, V., Garaventa, F., Corrà, C., Asnaghi, V., Privitera, D., Gallus, L., Cattaneo-Vietti, R., Mangialajo, L., Chiantore, M., 2012. Toxic effects of harmful benthic dinoflagellate *Ostreopsis ovata* on invertebrate and vertebrate marine organisms. *Mar. Environ. Res.* 76, 97-107.
- Farabegoli, F., Rodríguez, L.P., Vieites, J., Cabado, A., Blanco, L., 2018. Phycotoxins in Marine Shellfish: Origin, Occurrence and Effects on Humans. *Marine Drugs* 16.
- Faraloni, C., Torzillo, G., 2017. Synthesis of Antioxidant Carotenoids in Microalgae in Response to Physiological Stress.
- Faust, M., 1999. Three new *Ostreopsis* species (Dinophyceae): *O. marinus* sp. nov., *O. belizeanus* sp. nov., and *O. caribbeanus* sp. nov. *Phycologia* 38, 92-99.
- Faust, M.A., Morton, S.L., 1995. Morphology and Ecology of the Marine Dinoflagellate *Ostreopsis Labens* Sp. Nov. (Dinophyceae)¹. *Journal of Phycology* 31(3), 456-463.
- Faust, M.A., Morton, S.L., Quod, J.P., 1996. Further Sem Study of Marine Dinoflagellates: The Genus *Ostreopsis* (Dinophyceae)¹. *Journal of Phycology* 32(6), 1053-1065.
- Fernández-Zabala, J., Tuya, F., Amorim, A., Soler Onís, E., 2019. Benthic dinoflagellates: Testing the reliability of the artificial substrate method in the Macaronesian region. *Harmful Algae* 87.
- Fiehn, O., 2002. Metabolomics — The Link Between Genotypes and Phenotypes. *Plant Molecular Biology*, v.48, 155-177 (2002) 48.

- Fraga, S., Rodríguez, F., Bravo, I., Zapata, M., Marañón, E., 2012. Review of the Main Ecological Features Affecting Benthic Dinoflagellate Blooms. *Cryptogamie Algal* 33(2), 171-179.
- Frelin, C., Vigne, P., Breittmayer, J.P., 1990. Palytoxin acidifies chick cardiac cells and activates the Na⁺/H⁺ antiporter. *FEBS Lett* 264(1), 63-66.
- Fresno, C., Balzarini, M., Fernandez, E., 2014. lmdme: Linear Models on Designed Multivariate Experiments in R. *Journal of statistical software* 56.
- Fukuyo, Y., 1981. Taxonomical Study on Benthic Dinoflagellates Collected in Coral Reefs. *B Jpn Soc Sci Fish* 47(8), 967-978.
- Funari, E., Manganelli, M., Testai, E., 2015. *Ostreopsis* cf. *ovata* blooms in coastal water: Italian guidelines to assess and manage the risk associated to bathing waters and recreational activities. *Harmful Algae* 50, 45-56.
- Gallitelli, M., Ungaro, N., Addante, L.M., Procacci, V., Silveri, N.G., Sabba, C., 2005. Respiratory illness as a reaction to tropical algal blooms occurring in a temperate climate. *Journal of the American Chemical Society* 293(21), 2599-2600.
- Gallo, C., d'Ippolito, G., Nuzzo, G., Sardo, A., Fontana, A., 2017. Autoinhibitory sterol sulfates mediate programmed cell death in a bloom-forming marine diatom. *Nature Communications* 8.
- Gamboa Marquez, J.F., Sanchez Suarez, I.G., L.B.rbera Sanchez, A., 1994. Dinoflagellates from the Los Roques Archipelago Families Prorocentraceae and Ostreopsidaceae. *Acta Cientifica Venezolana* 45(2), 140-152.
- García-Altres, M., Tartaglione, L., Dell'Aversano, C., Carnicer, O., de la Iglesia, P., Forino, M., Diogène, J., Ciminiello, P., 2015. The novel ovatoxin-g and isobaric palytoxin (so far referred to as putative palytoxin) from *Ostreopsis* cf. *ovata* (NW Mediterranean Sea): structural insights by LC-high resolution MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 407(4), 1191-1204.
- García-Portela, M., Riobó, P., Franco, J.M., Bañuelos, R.M., Rodríguez, F., 2016. Genetic and toxinological characterization of North Atlantic strains of the dinoflagellate *Ostreopsis* and allelopathic interactions with toxic and non-toxic species from the genera *Prorocentrum*, *Coolia* and *Gambierdiscus*. *Harmful Algae* 60, 57-69.
- Gémin, M.P., Réveillon, D., Hervé, F., Pavaux, A.S., Tharaud, M., Séchet, V., Bertrand, S., Lemée, R., Amzil, Z., 2020. Toxin content of *Ostreopsis* cf. *ovata* depends on bloom phases, depth and macroalgal substrate in the NW Mediterranean Sea. *Harmful Algae* 92, 101727.
- Georges des Aulnois, M., Réveillon, D., Robert, E., Amandine, C., Briand, E., Guljamow, A., Dittmann, E., Amzil, Z., Bormans, M., 2020. Salt Shock Responses of *Microcystis* Revealed through Physiological, Transcript, and Metabolomic Analyses. *Toxins* 12.
- Georges des Aulnois, M., Roux, P., Amandine, C., Réveillon, D., Briand, E., Hervé, F., Savar, V., Bormans, M., Amzil, Z., 2019. Physiological and metabolic responses of freshwater and brackish strains of *Microcystis aeruginosa* acclimated to a salinity gradient: insight into salt tolerance. *Applied and Environmental Microbiology* 85.
- Gerssen, A., Gago-Martinez, A., 2019. Emerging Marine Biotoxins. *Toxins* 11, 314.
- Gigova, L., Ivanova, N., Gacheva, G., Andreeva, R., Sevdalina, F., 2012. Response of *Trachydiscus minutus* (Xanthophyceae) to temperature and light. *Journal of Phycology* 48, 85-93.
- Giussani, V., Asnaghi, V., Pedroncini, A., Chiantore, M., 2017. Management of harmful benthic dinoflagellates requires targeted sampling methods and alarm thresholds. *Harmful Algae* 68(Supplement C), 97-104.
- Giussani, V., Sbrana, F., Asnaghi, V., Vassalli, M., Faimali, M., Casabianca, S., Penna, A., Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Tartaglione, L., Mazzeo, A., Chiantore, M., 2015. Active role of the mucilage in the toxicity mechanism of the harmful benthic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata*. *Harmful Algae* 44, 46-53.

- Gleibs, S., Mebs, D., 1999. Distribution and sequestration of palytoxin in coral reef animals. *Toxicon* : official journal of the International Society on Toxinology 37, 1521-1527.
- Glibert, P., Burkholder, J., 2018. Causes of Harmful Algal Blooms, pp. 1-38.
- Glibert, P.M., Icarus Allen, J., Artioli, Y., Beusen, A., Bouwman, L., Harle, J., Holmes, R., Holt, J., 2014. Vulnerability of coastal ecosystems to changes in harmful algal bloom distribution in response to climate change: projections based on model analysis. *Global Change Biology* 20(12), 3845-3858.
- Godhe, A., Rynearson, T., 2017. The role of intraspecific variation in the ecological and evolutionary success of diatoms in changing environments. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 372, 20160399.
- Gómez, F., Qiu, D., Lopes, R., Lin, S., 2017. Morphological and molecular characterization of the toxic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* (Dinophyta) from Brazil (South Atlantic Ocean). *Revista de Biología Tropical* 65, 1022.
- Gorbi, S., Avio, G.C., Benedetti, M., Totti, C., Accoroni, S., Pichierri, S., Bacchiocchi, S., Orletti, R., Graziosi, T., Regoli, F., 2013. Effects of harmful dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* exposure on immunological, histological and oxidative responses of mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Fish & Shellfish Immunology* 35(3), 941-950.
- Granéli, E., Turner, J., 2006. Ecology of Harmful Algae.
- Granéli, E., Vidyarthna, N.K., Funari, E., Cumaratunga, P.R.T., Scenati, R., 2011. Can increases in temperature stimulate blooms of the toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis ovata*? *Harmful Algae* 10(2), 165-172.
- Gray, Lasiter, A., Leblond, J., 2009a. Mono- and digalactosyldiacylglycerol composition of dinoflagellates. III. Four cold-adapted, peridinin-containing taxa and the presence of trigalactosyldiacylglycerol as an additional glycolipid. *European Journal of Phycology* 44, 439.
- Gray, C., Lasiter, A., Li, C., Leblond, J., 2009b. Mono- and digalactosyldiacylglycerol composition of dinoflagellates. I. Peridinin-containing taxa. *European Journal of Phycology* 44.
- Griffith, A.W., Gobler, C.J., 2019. Harmful algal blooms: A climate change co-stressor in marine and freshwater ecosystems. *Harmful Algae*, 101590.
- Guerrini, F., Pezzolesi, L., Feller, A., Riccardi, M., Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Tartaglione, L., Dello Iacovo, E., Fattorusso, E., Forino, M., Pistocchi, R., 2010. Comparative growth and toxin profile of cultured *Ostreopsis ovata* from the Tyrrhenian and Adriatic Seas. *Toxicon* 55(2-3), 211-220.
- Guidi-Guilvard, L., Gasparini, S., Lemée, R., 2012. The negative impact of *Ostreopsis* cf. *ovata* on phytal meiofauna from the coastal NW Mediterranean. *Cryptogamie Algol* 33(2), 121-128.
- Guidi, F., Pezzolesi, L., Vanucci, S., 2018. Microbial dynamics during harmful dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* growth: Bacterial succession and viral abundance pattern. *Microbiologyopen* 0(0), e00584.
- Guil-Guerrero, J., 2007. Stearidonic acid (18:4n-3): Metabolism, nutritional importance, medical uses and natural sources. *European Journal of Lipid Science and Technology* 109, 1226-1236.
- Guillard, R.R.L., 1975. The culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. *The Culture of Marine Invertebrates Animals*, 29-60.
- Guillard, R.R.L., Hargraves, P.E., 1993. *Stichochrysis-Immobilis* Is a Diatom, Not a Chrysophyte. *Phycologia* 32(3), 234-236.
- Habermann, E., 1989. Palytoxin acts through Na⁺, K⁺-ATPase. *Toxicon* 27(11), 1171-1187.
- Hachani, M.A., Dhib, A., Fathalli, A., Ziadi, B., Turki, S., Aleya, L., 2018. Harmful epiphytic dinoflagellate assemblages on macrophytes in the Gulf of Tunis. *Harmful Algae* 77, 29-42.
- Hahne, H., Pachl, F., Ruprecht, B., Maier, S., Klaeger, S., Helm, D., Médard, G., Wilm, M., Lemeer, S., Kuster, B., 2013. DMSO enhances electrospray response, boosting sensitivity of proteomic experiments. *Nature methods* 10.

- Hallegraeff, G.M., 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia* 32(2), 79-99.
- Hallegraeff, G.M., 2010. Ocean Climate Change, Phytoplankton Community Responses, and Harmful Algal Blooms: A Formidable Predictive Challenge. *Journal of Phycology* 46(2), 220-235.
- Hansen, G., Turquet, J., Quod, J.P., Ten-Hage, L., Lugomela, C., Kyewalyanga, M., Hirbungs, M., Wawiye, P., Ogongo, B., Tunje, S., 2001. Potentially harmful microalgae of the western Indian Ocean: a guide based on a preliminary survey.
- Harrington, P.d.B., Vieira, N.E., Espinoza, J., Nien, J.K., Romero, R., Yergey, A.L., 2005. Analysis of variance–principal component analysis: A soft tool for proteomic discovery. *Analytica Chimica Acta* 544(1–2), 118-127.
- Hickman, M., Schweger, C.E., 1991. Oscillaxanthin and myxoxanthophyll in two cores from Lake Wabamun, Alberta, Canada. *Journal of Paleolimnology* 5(2), 127-137.
- Hirao, S., Tara, K., Kuwano, K., Tanaka, J., Ishibashi, F., 2012. Algicidal activity of glycerolipids from brown alga *Ishige sinicola* toward red tide microalgae. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76(2), 372-374.
- Hoffmann, K., Hermanns-Clausen, M., Buhl, C., Buchler, M.W., Schemmer, P., Mebs, D., Kaufenstein, S., 2008. A case of palytoxin poisoning due to contact with zoanthid corals through a skin injury. *Toxicon* 51(8), 1535-1537.
- Holmes, M., 1998. A survey of benthic dinoflagellates on Singapore reefs. *Harmful Algae*, 50-51.
- Honsell, G., Bonifacio, A., De Bortoli, M., Penna, A., Battocchi, C., Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Sosa, S., Yasumoto, T., Tubaro, A., 2013. New Insights on Cytological and Metabolic Features of *Ostreopsis cf. ovata* Fukuyo (Dinophyceae): A Multidisciplinary Approach. *PLoS ONE* 8(2).
- Hoppenrath, M., Murray, S., Chomérat, N., Horiguchi, T., 2014. Marine benthic dinoflagellates - unveiling their worldwide biodiversity.
- Hosny, S., Labib, W., 2019. Ecology of the Epiphytic Potentially Harmful Dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata* (Fukuyo) from Coastal Waters off Alexandria Egypt. *Journal of Oceanography and Marine Research* 07.
- Houdai, T., Matsuoka, S., Matsumori, N., Murata, M., 2004. Membrane-permeabilizing activities of amphidinol 3, polyene-polyhydroxy antifungal from a marine dinoflagellate. *Biochim Biophys Acta* 1667(1), 91-100.
- Hu, Q., 2003. Environmental Effects on Cell Composition, In: Amos, R. (Ed.), *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, pp. 83-94.
- Hwang, B.S., Yoon, E.Y., Jeong, E.J., Park, J., Kim, E.-H., Rho, J.-R., 2017. Determination of the Absolute Configuration of Polyhydroxy Compound Ostreol B Isolated from the Dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata*. *The Journal of Organic Chemistry* 83(1), 194-202.
- Hwang, B.S., Yoon, E.Y., Kim, H.S., Yih, W., Park, J.Y., Jeong, H.J., Rho, J.R., 2013. Ostreol A: a new cytotoxic compound isolated from the epiphytic dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata* from the coastal waters of Jeju Island, Korea. *Bioorg Med Chem Lett* 23(10), 3023-3027.
- Illoul, H., Hernandez, F.R., Vila, M., Adjias, N., Younes, A.A., Bourmisa, M., Koroghli, A., Marouf, N., Rabia, S., Ameer, F.L.K., 2012. The genus *Ostreopsis* along the Algerian coastal waters (SW Mediterranean Sea) associated with a human respiratory intoxication episode. *Cryptogamie Algol* 33(2), 209-216.
- Inuzuka, T., Fujisawa, T., Arimoto, H., Uemura, D., 2007. Molecular shape of palytoxin in aqueous solution. *Org Biomol Chem* 5(6), 897-899.
- Iona, A., Theodorou, A., Sofianos, S., Watelet, S., Troupin, C., Beckers, J.-M., 2018. Mediterranean Sea climatic indices: Monitoring long-term variability and climate changes. *Earth System Science Data* 10, 1829-1842.

- IPCC, 2008. Climate Change 2007 – Impacts, Adaptation and Vulnerability. Working Group II contribution to the Fourth Assessment Report of the IPCC Intergovernmental Panel on Climate Change, <http://www.ipcc.ch/>.
- IPCC, 2018. 2018: Annex I: Glossary In: Matthews, J.B.R. (Ed.), Global Warming of 1.5°C. An IPCC Special Report on the impacts of global warming of 1.5°C above pre-industrial levels and related global greenhouse gas emission pathways, in the context of strengthening the global response to the threat of climate change, sustainable development, and efforts to eradicate poverty.
- Ismael, A., Halim, Y., 2012. Potentially harmful *Ostreopsis* spp. in the coastal waters of Alexandria-Egypt. Mediterranean Marine Science 13(2), 208-212.
- Ito, E., Ohkusu, M., Yasumoto, T., 1996. Intestinal injuries caused by experimental palytoxicosis in mice. Toxicon 34(6), 643-652.
- Ito, E., Yasumoto, T., 2009. Toxicological studies on palytoxin and ostreocin-D administered to mice by three different routes. Toxicon 54(3), 244-251.
- Jauzein, C., Açaf, L., Accoroni, S., Asnaghi, V., Fricke, A., Hachani, M.A., Saab, M.A.A., Chiantore, M., Mangialajo, L., Totti, C., Zaghmouri, I., Lemée, R., 2018. Optimization of sampling, cell collection and counting for the monitoring of benthic harmful algal blooms: Application to *Ostreopsis* spp. blooms in the Mediterranean Sea. Ecological Indicators 91, 116-127.
- Jauzein, C., Couet, D., Blasco, T., Lemée, R., 2017. Uptake of dissolved inorganic and organic nitrogen by the benthic toxic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata*. Harmful Algae 65.
- Jauzein, C., Fricke, A., Mangialajo, L., Lemée, R., 2016. Sampling of *Ostreopsis* cf. *ovata* using artificial substrates: Optimization of methods for the monitoring of benthic harmful algal blooms. Marine Pollution Bulletin 107(1), 300-304.
- Jeffrey, S., Mactavish, H., Dunlap, W., Vesik, M., Groenewoud, K., 1999. Occurrence of UVA- and UVB-absorbing compounds in 152 species (206 strains) of marine microalgae. Marine Ecology Progress Series 189, 35-51.
- Jeong, J.-H., Jin, H.-J., Sohn, C., Suh, K.-H., Hong, Y.-K., 2000. Algicidal activity of the seaweed *Corallina pilulifera* against red tide microalgae. J. Appl. Phycol. 12, 37-43.
- Jiang, J., Lu, Y., 2019. Metabolite profiling of *Breviolum minutum* in response to acidification. Aquat. Toxicol. 213, 105215.
- Jin, Q., Dong, S., Wang, C., 2005. Allelopathic growth inhibition of *Prorocentrum micans* (Dinophyta) by *Ulva pertusa* and *Ulva linza* (Chlorophyta) in laboratory cultures. European Journal of Phycology 40(1), 31-37.
- Jin, Q., Dong, S.L., 2003. Comparative studies on the allelopathic effects of two different strains of *Ulva pertusa* on *Heterosigma akashiwo* and *Alexandrium tamarense*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 293(1), 41-55.
- Judak, P., Grainger, J., Goebel, C., Eeno, P., deventer, K., 2017. DMSO Assisted Electrospray Ionization for the Detection of Small Peptide Hormones in Urine by Dilute-and-Shoot-Liquid-Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry. Journal of The American Society for Mass Spectrometry 28.
- Keating, K.I., 1977. Allelopathic influence on blue-green bloom sequence in a eutrophic lake. Science 196(4292), 885-887.
- Kermarec, F., Dor, F., Armengaud, A., Charlet, F., Kantin, R., Sauzade, D., De Haro, L., 2008. Les risques sanitaires liés à la présence d'*Ostreopsis ovata* dans les eaux de baignade ou d'activités nautiques. Environnement, Risque et Santé 7(5), 357-363.
- Kim, H.S., Rho, J.-R., Lee, Y.K., Yoo, Y.D., Yih, W., 2017. New Cytotoxic Ostreols from the epiphytic Dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* isolated from Jeju coastal waters in Korea, DINO11th, Bordeaux.

- Kim, J.Y., Alamsjah, M.A., Hamada, A., Fujita, Y., Ishibashi, F., 2014. Algicidal Diterpenes from the Brown Alga *Dictyota dichotoma*. *Biosci Biotechnol Biochem* 70(10), 2571-2574.
- Kremp, A., Godhe, A., Egardt, J., Dupont, S., Suikkanen, S., Casabianca, S., Penna, A., 2012. Intraspecific variability in the response of bloom-forming marine microalgae to changed climate conditions. *Ecol Evol* 2(6), 1195-1207.
- Landsberg, J., 2002. The Effects of Harmful Algal Blooms on Aquatic Organisms. *Reviews in Fisheries Science - REV FISH SCI* 10, 113-390.
- Leaw, C.P., Lim, P.T., Cheng, K.W., Ng, B.K., Usup, G., 2010. Morphology and Molecular Characterization of a New Species of Thecate Benthic Dinoflagellate, *Coolia malayensis* sp. nov. (Dinophyceae)¹. *Journal of phycology* 46(1), 162-171.
- Leblond, J.D., Chapman, P.J., 2000. Lipid Class Distribution of Highly Unsaturated Long Chain Fatty Acids in Marine Dinoflagellates. *Journal of Phycology* 36(6), 1103-1108.
- Leblond, J.D., Dahmen, J.L., Evens, T.J., 2010. Mono- and digalactosyldiacylglycerol composition of dinoflagellates. IV. Temperature-induced modulation of fatty acid regiochemistry as observed by electrospray ionization/mass spectrometry. *European Journal of Phycology* 45(1), 13-18.
- Lelieveld, J., Berresheim, H., Borrmann, S., Crutzen, P.J., Dentener, F.J., Fischer, H., Feichter, J., Flatau, P.J., Heland, J., Holzinger, R., Korrmann, R., Lawrence, M.G., Levin, Z., Markowicz, K.M., Mihalopoulos, N., Minikin, A., Ramanathan, V., de Reus, M., Roelofs, G.J., Scheeren, H.A., Sciare, J., Schlager, H., Schultz, M., Siegmund, P., Steil, B., Stephanou, E.G., Stier, P., Traub, M., Warneke, C., Williams, J., Ziereis, H., 2002. Global Air Pollution Crossroads over the Mediterranean. *Science* 298(5594), 794-799.
- Lemée, R., Mangialajo, L., Cohu, S., Amzil, Z., Blanfuné, A., Chomérat, N., Ganzin, N., Gasparini, S., Grosseil, H., Guidi-Guilvard, L., Hoareau, L., Le Duff, F., Sophie, M., Simon, N., Nezan, E., Pedrotti, M.L., Séchet, V., Soliveres, O., Thibaut, T., 2012. Interactions between Scientists, Managers and Policy Makers in the Framework of the French MediOs Project on *Ostreopsis* (2008–2010). *Cryptogamie Algol* 33, 137-142.
- Lenoir, S., Ten-Hage, L., Turquet, J., Quod, J.-P., Bernard, C., Hennion, M.-C., 2004. First Evidence of Palytoxin Analogues from An *Ostreopsis Mascarenensis* (Dinophyceae) Benthic Bloom in Southwestern Indian Ocean. *Journal of Phycology* 40(6), 1042-1051.
- Lenoir, S., Ten-Hage, L., Turquet, J., Quod, J.-P., Hennion, M.C., 2006. Characterization of new analogues of palytoxin isolated from an *Ostreopsis mascarenensis* bloom in the south-west Indian Ocean. *African Journal of Marine Science* 28, 389-391.
- Lionello, P., Gacic, M., Gomis, D., Garcia-Herrera, R., Giorgi, F., Planton, S., Trigo, R., Theocharis, A., Tsimplis, M.N., Ulbrich, U., Xoplaki, E., 2012. Program focuses on climate of the Mediterranean region. *Eos, Transactions American Geophysical Union* 93(10), 105-106.
- Llewellyn, C.A., Airs, R.L., 2010. Distribution and abundance of MAAs in 33 species of microalgae across 13 classes. *Marine drugs* 8(4), 1273-1291.
- Lobel, P., Anderson, D., Durand-Clement, M., 1988. Assessment of Ciguatera Dinoflagellate Populations: Sample Variability and Algal Substrate Selection. *Bio. Bull.* 175, 94.
- Louzao, M.C., Ares, I.R., Vieytes, M.R., Valverde, I., Vieites, J.M., Yasumoto, T., Botana, L.M., 2007. The cytoskeleton, a structure that is susceptible to the toxic mechanism activated by palytoxins in human excitable cells. *The FEBS journal* 274(8), 1991-2004.
- Luan, H., Ji, F., Chen, Y., Cai, Z., 2018. statTarget: A streamlined tool for signal drift correction and interpretations of quantitative mass spectrometry-based omics data. *Analytica Chimica Acta* 1036, 66-72.
- Luckas, B., Krüger, T., Röder, K., 2017. Phycotoxins and Food Safety, In: Dieter, S., Alexander, C. (Eds.), *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition*,

Chemical Contaminants and Residues in Food (Second Edition), pp. 337-378.

Mangialajo, L., Bertolotto, R., Cattaneo-Vietti, R., Chiantore, M., Grillo, C., Lemée, R., Melchiorre, N., Moretto, P., Povero, P., Ruggieri, N., 2008. The toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis ovata*: Quantification of proliferation along the coastline of Genoa, Italy. *Marine Pollution Bulletin* 56(6), 1209-1214.

Mangialajo, L., Fricke, A., Perez-Gutierrez, G., Catania, D., Jauzein, C., Lemee, R., 2017. Benthic Dinoflagellate Integrator (BEDI): A new method for the quantification of Benthic Harmful Algal Blooms. *Harmful Algae* 64, 1-10.

Mangialajo, L., Ganzin, N., Accoroni, S., Asnaghi, V., Blanfuné, A., Cabrini, M., Cattaneo-Vietti, R., Chavanon, F., Chiantore, M., Cohu, S., Costa, E., Fornasaro, D., Grossel, H., Marco-Miralles, F., Masó, M., Reñé, A., Rossi, A.M., Sala, M.M., Thibaut, T., Totti, C., Vila, M., Lemée, R., 2011. Trends in *Ostreopsis* proliferation along the Northern Mediterranean coasts. *Toxicon* 57(3), 408-420.

Marchan, J., Valerio, L., Troccoli, L., López, F., 2017. Dinoflagelados bentónicos nocivos, asociados con el sedimento arenoso en dos playas de la isla de Margarita, Venezuela. *Revista Biodiversidad Neotropical* 7.

Martens, H., Tillmann, U., Harju, K., Dell'Aversano, C., Tartaglione, L., Krock, B., 2017. Toxin Variability Estimations of 68 *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) Strains from The Netherlands Reveal a Novel Abundant Gymnodimine. *Microorganisms* 5, 29.

Masó, M., Garcés, E., 2006. Harmful microalgae blooms (HAB); problematic and conditions that induce them. *Marine pollution bulletin* 53, 620-630.

McGowan, S., 2016. Algal Blooms, In: SIVANPILLAI, R. (Ed.), *Biological and environmental hazards, risks and disasters*. Elsevier, Amsterdam, Netherlands, pp. 5-45.

Mebs, D., 1998. Occurrence and sequestration of toxins in food chains. *Toxicon* 36(11), 1519-1522.

Meehl, G.A., Stocker, T.F., Collins, W.D., Friedlingstein, P., Gaye, A.T., Gregory, J.M., Kitoh, A., Knutti, R., Murphy, J.M., Noda, A., Raper, S.C.B., Watterson, I.G., Weaver, A.J., Zhao, Z.C., 2007. Global climate projections, In: Solomon, S., Qin, D., Manning, M., Chen, Z., Marquis, M., Averyt, K.B., Tignor, M., Miller, H.L. (Eds.), *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, pp. 749-884.

Mendes, M.C.Q., Nunes, J.M.C., Menezes, M., Fraga, S., Rodríguez, F., Vázquez, J.A., Blanco, J., Franco, J.M., Riobó, P., 2017. Toxin production, growth kinetics and molecular characterization of *Ostreopsis* cf. *ovata* isolated from Todos os Santos Bay, tropical southwestern Atlantic. *Toxicon* 138, 18-30.

Meng, Y., Van Wagoner, R.M., Misner, I., Tomas, C., Wright, J.L., 2010. Structure and biosynthesis of amphidinol 17, a hemolytic compound from *Amphidinium carterae*. *Journal of natural products* 73(3), 409-415.

Mercado, J.A., Rivera-Rentas, A.L., Gonzalez, I., Tosteson, T.R., Molgó, J., Motta, G., 1994. Neuro- and myo-toxicity of extracts from the benthic dinoflagellate *Ostreopsis lenticularis* is sensitive to μ -conotoxin. *Society for Neuroscience. Abstract* 20.

Meroni, L., Chiantore, M., Petrillo, M., Asnaghi, V., 2018. Habitat effects on *Ostreopsis* cf. *ovata* bloom dynamics. *Harmful Algae* 80, 64-71.

Meunier, F.A., Mercado, J.A., Molgo, J., Tosteson, T.R., Escalona de Motta, G., 1997. Selective depolarization of the muscle membrane in frog nerve-muscle preparations by a chromatographically purified extract of the dinoflagellate *Ostreopsis lenticularis*. *British journal of pharmacology* 121(6), 1224-1230.

Miraglia, M., Marvin, H.J.P., Kleter, G.A., Battilani, P., Brera, C., Coni, E., Cubadda, F., Croci, L., De Santis, B., Dekkers, S., Filippi, L., Hutjes, R., Noordam, M.Y., Pisante, M., Piva, G., Prandini, A., Toti,

- L., Born, G.J., Vespermann, A., 2009. Climate change and food safety: An emerging issue with special focus on Europe. *Food and Chemical Toxicology* 47, 1009-1021.
- Moestrup, Ø., Akselmann-Cardella, R., Fraga, S., Hoppenrath, M., Iwataki, M., Komárek, J., Larsen, J., Lundholm, N., Zingone, A., 2009. IOC-UNESCO Taxonomic Reference List of Harmful Micro Algae.
- Monti, M., Cecchin, E., 2012. Comparative growth of three strains of *Ostreopsis ovata* at different light intensities with focus on inter-specific allelopathic interactions. *Cryptogamie Algol* 33(2), 113-119.
- Monti, M., Minocci, M., Beran, A., Iveša, L., 2007. First record of *Ostreopsis* cf. *ovata* on macroalgae in the Northern Adriatic Sea. *Marine Pollution Bulletin* 54(5), 598-601.
- Moore, R.E., Bartolini, G., 1981. Structure of Palytoxin. *Journal of the American Chemical Society* 103(9), 2491-2494.
- Moore, R.E., Scheuer, P.J., 1971. Palytoxin: a new marine toxin from a coelenterate. *Science* 172(3982), 495-498.
- Morsy, N., Matsuoka, S., Houdai, T., Matsumori, N., Adachi, S., Murata, M., Iwashita, T., Fujita, T., 2005. Isolation and structure elucidation of a new amphidinol with a truncated polyhydroxyl chain from *Amphidinium klebsii*. *Tetrahedron* 61(36), 8606-8610.
- Morton, B., 2016. Palytoxin: History and Prehistory.
- Morton, S.L., Norris, D.R., Bomber, J.W., 1992. Effect of Temperature, Salinity and Light-Intensity on the Growth and Seasonality of Toxic Dinoflagellates Associated with Ciguatera. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 157(1), 79-90.
- Munday, R., 2011. Palytoxin toxicology: animal studies. *Toxicon* 57(3), 470-477.
- Murphy, L.T., Vakkalanka, J.P., Cote, J.L.P., Charlton, N.P., 2016. Palytoxin exposures reported to the US National Poison Data System (NPDS). *Clinical Toxicology* 54(4), 453-453.
- Myers, O., Sumner, S., Li, S., Barnes, S., Du, X., 2017. One Step Forward for Reducing False Positive and False Negative Compound Identifications from Mass Spectrometry Metabolomics Data: New Algorithms for Constructing Extracted Ion Chromatograms and Detecting Chromatographic Peaks. *Analytical Chemistry* 89.
- Nagayama, K., Shibata, T., Fujimoto, K., Honjo, T., Nakamura, T., 2003. Algicidal effect of phlorotannins from the brown alga *Ecklonia kurome* on red tide microalgae. *Aquaculture* 218(1-4), 601-611.
- Nan, C., Zhang, H., Lin, S., Zhao, G., Liu, X., 2008. Allelopathic effects of *Ulva lactuca* on selected species of harmful bloom-forming microalgae in laboratory cultures. *Aquatic Botany* 89, 9-15.
- Nan, C., Zhang, H., Zhao, G., 2004. Allelopathic interactions between the macroalga *Ulva pertusa* and eight microalgal species. *Journal of Sea Research* 52(4), 259-268.
- Nascimento, S., A. F. Neves, R., De'carli, G., Borsato, G., Silva, R., Melo, G., Morais, A., Cockell, T., Fraga, S., Menezes-Salgueiro, A., Mafra, L., Hess, P., Salgueiro, F., 2020. *Ostreopsis* cf. *ovata* (Dinophyceae) Molecular Phylogeny, Morphology, and Detection of Ovatoxins in Strains and Field Samples from Brazil. *Toxins* 12, 70.
- Nascimento, S., Monteiro, P.O., Ferreira, C., Gonzalez-Rodriguez, E., 2008. *Ostreopsis ovata* blooms on Rio de Janeiro coastline, Brazilian southeast. *Harmful Algae News* 37, 1-4.
- Nascimento, S.M., Corrêa, E.V., Menezes, M., Varela, D., Paredes, J., Morris, S., 2012a. Growth and toxin profile of *Ostreopsis* cf. *ovata* (Dinophyta) from Rio de Janeiro, Brazil. *Harmful Algae* 13, 1-9.
- Nascimento, S.M., Franca, J.V., Goncalves, J.E., Ferreira, C.E., 2012b. *Ostreopsis* cf. *ovata* (Dinophyta) bloom in an equatorial island of the Atlantic Ocean. *Marine Pollution Bulletin* 64(5), 1074-1078.
- Neves, R.A.F., Contins, M., Nascimento, S.M., 2018. Effects of the toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* on fertilization and early development of the sea urchin *Lytechinus variegatus*. *Mar. Environ. Res.* 135, 11-17.

- Neves, R.A.F., Fernandes, T., Neves dos Santos, L., Nascimento, S., 2017. Toxicity of benthic dinoflagellates on grazing, behavior and survival of the brine shrimp *Artemia salina*. PLoS ONE 12, e0175168.
- Ninčević Gladan, Ž., Arapov, J., Casabianca, S., Penna, A., Honsell, G., Brovedani, V., Pelin, M., Tartaglione, L., Sosa, S., Dell'Aversano, C., Tubaro, A., Žuljević, A., Grbec, B., Čavar, M., Bužančić, M., Bakrač, A., Skejić, S., 2019. Massive Occurrence of the Harmful Benthic Dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* in the Eastern Adriatic Sea. Toxins 11(5), 300.
- Norris, D.R., Bomber, J.W., Balech, E., 1985. Benthic dinoflagellates associated with ciguatera from the Florida Keys 1 *Ostreopsis heptagona* sp. nov., In: Anderson, D.M., White, A.W., Baden, D.G. (Eds.), Toxic Dinoflagellate, pp. 39-44.
- O'Donnell, V.B., Dennis, E.A., Wakelam, M.J.O., Subramaniam, S., 2019. LIPID MAPS: Serving the next generation of lipid researchers with tools, resources, data, and training. Science Signaling 12(563), eaaw2964.
- Onuma, Y., Satake, M., Ukena, T., Roux, J., Chanteau, S., Rasolofonirina, N., Ratsimaloto, M., Naoki, H., Yasumoto, T., 1999. Identification of putative palytoxin as the cause of clupeotoxism. Toxicon 37(1), 55-65.
- Parsons, M., J Settlemier, C., M Ballauer, J., 2011. An examination of the epiphytic nature of *Gambierdiscus toxicus*, a dinoflagellate involved in ciguatera fish poisoning. Harmful Algae 10, 598-605.
- Parsons, M.L., Aligizaki, K., Bottein, M.Y.D., Fraga, S., Morton, S.L., Penna, A., Rhodes, L., 2012. *Gambierdiscus* and *Ostreopsis*: Reassessment of the state of knowledge of their taxonomy, geography, ecophysiology, and toxicology. Harmful Algae 14, 107-129.
- Parsons, M.L., Preskitt, L.B., 2007. A survey of epiphytic dinoflagellates from the coastal waters of the island of Hawai'i. Harmful Algae 6(5), 658-669.
- Patocka, J., Gupta, R.C., Wu, Q.H., Kuca, K., 2015. Toxic potential of palytoxin. J. Huazhong Univ. Sci. Tech.-Med. 35(5), 773-780.
- Paul, G.K., Matsumori, N., Murata, M., Tachibana, K., 1995. Isolation and Chemical-Structure of Amphidinol-2, a Potent Hemolytic Compound from Marine Dinoflagellate *Amphidinium-Klebsii*. Tetrahedron Letters 36(35), 6279-6282.
- Pavaux, A.-S., Rostan, J., Guidi-Guilvard, L., Marro, S., Ternon, E., Olivier P., T., Lemée, R., Gasparini, S., 2019. Effects of the toxic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* on survival, feeding and reproduction of a phytal harpacticoid copepod. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 516, 103-113.
- Pelin, M., Brovedani, V., Sosa, S., Tubaro, A., 2016a. Palytoxin-Containing Aquarium Soft Corals as an Emerging Sanitary Problem. Marine Drugs 14(2), 22.
- Pelin, M., Forino, M., Brovedani, V., Tartaglione, L., Dell'Aversano, C., Pistocchi, R., Poli, M., Sosa, S., Florio, C., Ciminiello, P., Tubaro, A., 2016b. Ovatoxin-a, A Palytoxin Analogue Isolated from *Ostreopsis* cf. *ovata* Fukuyo: Cytotoxic Activity and ELISA Detection. Environmental Science & Technology 50(3), 1544-1551.
- Pelin, M., Sosa, S., Ponti, C., Gibellini, D., Florio, C., Tubaro, A., 2018. Pro-inflammatory effects of palytoxin on skin keratinocytes and indirect modulation of inflammatory cells. Toxicon 149, 97.
- Penna, A., Fraga, S., Battocchi, C., Casabianca, S., Giacobbe, M.G., Riobó, P., Vernesi, C., 2010. A phylogeographical study of the toxic benthic dinoflagellate genus *Ostreopsis* Schmidt. Journal of Biogeography 37(5), 830-841.
- Penna, A., Vila, M., Fraga, S., Giacobbe, M.G., Andreoni, F., Riobó, P., Vernesi, C., 2005. Characterization Of *Ostreopsis* And *Coolia* (Dinophyceae) Isolates In The Western Mediterranean Sea Based On Morphology, Toxicity And Internal Transcribed Spacer 5.8S rDNA Sequences. Journal of Phycology 41(1), 212-225.

- Pereira Braga, C., Adamec, J., 2019. Metabolome Analysis, In: Ranganathan, S., Gribskov, M., Nakai, K., Schönbach, C. (Eds.), Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology. Academic Press, Oxford, pp. 463-475.
- Petrier, C., Jeunet, A., Luche, J.L., Reverdy, G., 1992. Unexpected frequency effects on the rate of oxidative processes induced by ultrasound. *Journal of the American Chemical Society* 114(8), 3148-3150.
- Pezzolesi, L., Guerrini, F., Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Dello Iacovo, E., Fattorusso, E., Forino, M., Tartaglione, L., Pistocchi, R., 2012. Influence of temperature and salinity on *Ostreopsis cf. ovata* growth and evaluation of toxin content through HR LC-MS and biological assays. *Water Research* 46(1), 82-92.
- Pezzolesi, L., Pistocchi, R., Fratangeli, F., Dell'Aversano, C., Dello Iacovo, E., Tartaglione, L., 2014. Growth dynamics in relation to the production of the main cellular components in the toxic dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata*. *Harmful Algae* 36, 1-10.
- Pezzolesi, L., Vanucci, S., Dell'Aversano, C., Dello Iacovo, E., Tartaglione, L., Pistocchi, R., 2016. Effects of N and P availability on carbon allocation in the toxic dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata*. *Harmful Algae* 55, 202-212.
- Pfannkuchen, M., Godrijan, J., Pfannkuchen, D.M., Iveša, L., Kružić, P., Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Dello Iacovo, E., Fattorusso, E., Forino, M., Tartaglione, L., Godrijan, M., 2012. Toxin-producing *Ostreopsis cf. ovata* are likely to bloom undetected along coastal areas. *Environmental Science & Technology* 46(10), 5574-5582.
- Pin, L.C., Teen, L.P., Ahmad, A., Usup, G., 2001. Genetic diversity of *Ostreopsis ovata* (Dinophyceae) from Malaysia. *Marine biotechnology* 3(3), 246-255.
- Pinna, A., Pezzolesi, L., Pistocchi, R., Vanucci, S., Ciavatta, S., Polimene, L., 2015. Modelling the Stoichiometric Regulation of C- Rich Toxins in Marine Dinoflagellates. *PLoS ONE* 10.
- Pistocchi, R., Pezzolesi, L., Guerrini, F., Vanucci, S., Dell'aversano, C., Fattorusso, E., 2011. A review on the effects of environmental conditions on growth and toxin production of *Ostreopsis ovata*. *Toxicon* 57(3), 421-428.
- Pluskal, T., Castillo, S., Villar-Briones, A., Orešič, M., 2010. MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics* 11(1), 395.
- Poli, M., Ruiz-Olvera, P., Nalca, A., Ruiz, S., Livingston, V., Frick, O., Dyer, D., Schellhase, C., Raymond, J., Kulis, D., Anderson, D., McGrath, S., Deeds, J., 2018. Toxicity and pathophysiology of palytoxin congeners after intraperitoneal and aerosol administration in rats. *Toxicon* 150, 235-250.
- Privitera, D., Giussani, V., Isola, G., Faimali, M., Piazza, V., Garaventa, F., Asnaghi, V., Cantamessa, E., Cattaneo-Vietti, R., Chiantore, M., 2012. Toxic effects of *Ostreopsis ovata* on larvae and juveniles of *Paracentrotus lividus*. *Harmful Algae* 18, 16-23.
- Quintana-M, H., Mercado Gomez, J., 2017. Composición de dinoflagelados epífitos y forófitos en la Costa norte del golfo de Morrosquillo, Sucre, Colombia. *Revista Colombiana de Ciencia Animal - RECIA* 9, 129.
- Quod, J., 1994. *Ostreopsis mascarenensis* sp. nov.(Dinophyceae), dinoflagellé toxique associé à la ciguatera dans l'océan Indien. *Cryptogamie Algol* 15(4), 243-251.
- Quod, J., Turquet, J., Diogene, G., Fessard, V., 1995. Screening of extracts of dinoflagellates from coral reefs (Reunion Island, SW Indian Ocean), and their biological activities. *Harmful marine algal blooms*, 815-820.
- R Core Team, 2019. R: A Language and Environment for Statistical Computing, Vienna, Austria.

- Rådjursöga, M., Lindqvist, H.M., Pedersen, A., Karlsson, G.B., Malmödin, D., Brunius, C., Ellegård, L., Winkvist, A., 2019. The ¹H NMR serum metabolomics response to a two meal challenge: a cross-over dietary intervention study in healthy human volunteers. *Nutrition Journal* 18(1), 25.
- Ramos, V., Salvi, D., Machado, J., Vale, M., Azevedo, J., Vasconcelos, V., 2015. Culture-Independent Study of the Late-Stage of a Bloom of the Toxic Dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata*: Preliminary Findings Suggest Genetic Differences at the Sub-Species Level and Allow ITS2 Structure Characterization. *Toxins* 7, 2514-2533.
- Ras, M., Steyer, J.-P., Bernard, O., 2013. Temperature effect on microalgae: a crucial factor for outdoor production. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 12(2), 153-164.
- Rasmussen, S.A., Andersen, A.J.C., Andersen, N.G., Nielsen, K.F., Hansen, P.J., Larsen, T.O., 2016. Chemical Diversity, Origin, and Analysis of Phycotoxins. *Journal of natural products* 79(3), 662-673.
- Raven, J.A., Geider, R.J., 1988. Temperature and Algal Growth. *The New Phytologist* 110(4), 441-461.
- Rhodes, L., 2011. World-wide occurrence of the toxic dinoflagellate genus *Ostreopsis* Schmidt. *Toxicon* 57(3), 400-407.
- Rhodes, L., Adamson, J., Suzuki, T., Briggs, L., Garthwaite, I., 2000. Toxic marine epiphytic dinoflagellates, *Ostreopsis siamensis* and *Coolia monotis* (Dinophyceae), in New Zealand. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 34(2), 371-383.
- Rhodes, L.L., Smith, K.F., Munday, R., Selwood, A.I., McNabb, P.S., Holland, P.T., Bottein, M.-Y., 2010. Toxic dinoflagellates (Dinophyceae) from Rarotonga, Cook Islands. *Toxicon* 56(5), 751-758.
- Richlen, M., Lobel, P., 2011. Effects of depth, habitat, and water motion on the abundance and distribution of ciguatera dinoflagellates at Johnston Atoll, Pacific Ocean. *Marine Ecology Progress Series* 421, 51-66.
- Riobó, P., Paz, B., Fernández, M., Fraga, S., Franco, J., 2003. Lipophylic toxins of different strains of *Ostreosidaceae* and *Gonyaulacaceae*.
- Riobó, P., Paz, B., Franco, J.M., 2006. Analysis of palytoxin-like in *Ostreopsis* cultures by liquid chromatography with precolumn derivatization and fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta* 566(2), 217-223.
- Rochfort, S., 2005. Metabolomics Reviewed: A New “Omics” Platform Technology for Systems Biology and Implications for Natural Products Research. *Journal of natural products* 68(12), 1813-1820.
- Rønneberg, H., Foss, P., Ramdahl, T., Borch, G., M. Skulberg, O., Liaaen-Jensen, S., 1980. Occurrence and chirality of oscillaxanthin. *Phytochemistry* 19(10), 2167-2170.
- Rossi, R., Castellano, V., Scalco, E., Serpe, L., Zingone, A., Soprano, V., 2010. New palytoxin-like molecules in Mediterranean *Ostreopsis* cf. *ovata* (dinoflagellates) and in *Palythoa tuberculosa* detected by liquid chromatography-electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *Toxicon* 56(8), 1381-1387.
- Roullier, C., Bertrand, S., Blanchet, E., Peigné, M., Robiou du Pont, T., Guitton, Y., Pouchus, Y.F., Grovel, O., 2016. Time dependency of biosynthetic pathways and chemodiversity: an LC-MS metabolomic study of marine-sourced *Penicillium* Marine Drugs 14(5), 103.
- Santos, M., Oliveira, P., Moita, M.T., David, H., Caeiro, M., Zingone, A., Amorim, A., D. Silva, A., 2019. Occurrence of *Ostreopsis* in two temperate coastal Bays (SW Iberia): Insights from the plankton. *Harmful Algae* 86, 20-36.
- Sarkar, S., 2018. Harmful Algal Blooms (HABs), pp. 111-170.
- Satake, M., Murata, M., Yasumoto, T., Fujita, T., Naoki, H., 1991. Amphidinol, a Polyhydroxypolyene Antifungal Agent with an Unprecedented Structure, from a Marine Dinoflagellate, *Amphidinium-Klebsii*. *Journal of the American Chemical Society* 113(26), 9859-9861.

- Sato, S., Nishimura, T., Uehara, K., Sakanari, H., Tawong, W., Hariganeya, N., Smith, K., Rhodes, L., Yasumoto, T., Taira, Y., Suda, S., Yamaguchi, H., Adachi, M., 2011. Phylogeography of *Ostreopsis* along west Pacific coast, with special reference to a novel clade from Japan. PLoS ONE 6(12), e27983.
- Scalco, E., Brunet, C., Marino, F., Rossi, R., Soprano, V., Zingone, A., Montresor, M., 2012. Growth and toxicity responses of Mediterranean *Ostreopsis* cf. *ovata* to seasonal irradiance and temperature conditions. Harmful Algae 17, 25-34.
- Schmidt, J., 1901. Preliminary report of the botanical results of the Danish expedition to Siam (1899-1900). Botanisk Tidsskrift 24, 212-221.
- Schulz, M., Los, A., Szabelak, A., Strachecka, A., 2019. Inhalation poisoning with palytoxin from aquarium coral: case description and safety advice. Arh Hig Rada Toksikol 70(1), 14-17.
- Séchet, V., Sibat, M., Chomérat, N., Nézan, E., Grosseil, H., Lehebel-Peron, J.-B., Jauffrais, T., Ganzin, N., Marco-Miralles, F., Lemée, R., Amzil, Z., 2012. *Ostreopsis* cf. *ovata* in the French Mediterranean Coast: Molecular Characterisation and Toxin Profile. Cryptogamie, Algologie 33(2), 89-98.
- Selina, M., Morozova, T., I. Vyshkvartsev, D., Orlova, T., 2014. Seasonal dynamics and spatial distribution of epiphytic dinoflagellates in Peter the Great Bay (Sea of Japan) with special emphasis on *Ostreopsis* species. Harmful Algae 32, 1-10.
- Selina, M.S., Orlova, T.Y., 2010. First occurrence of the genus *Ostreopsis* (Dinophyceae) in the Sea of Japan. Botanica Marina 53(3), 243-249.
- Selwood, A.I., van Ginkel, R., Harwood, D.T., McNabb, P.S., Rhodes, L.R., Holland, P.T., 2012. A sensitive assay for palytoxins, ovatoxins and ostreocins using LC-MS/MS analysis of cleavage fragments from micro-scale oxidation. Toxicon 60(5), 810-820.
- Shah, M., An, S.-J., Lee, J.-B., 2013. Seasonal abundance of epiphytic dinoflagellates around coastal waters of Jeju Island, Korea. Journal of Marine Science and Technology 21, 156-165.
- Shaltout, M., Omstedt, A., 2014. Recent sea surface temperature trends and future scenarios for the Mediterranean Sea. Oceanologia 56(3), 411-443.
- Shears, N.T., Ross, P.M., 2009. Blooms of benthic dinoflagellates of the genus *Ostreopsis*; an increasing and ecologically important phenomenon on temperate reefs in New Zealand and worldwide. Harmful Algae 8(6), 916-925.
- Simoni, F., Gaddi, A., Di Paolo, C., Lepri, L., 2003. Harmful epiphytic dinoflagellate on Tyrrhenian Sea reefs. Harmful Algae News 24, 13-14.
- Simonini, R., Orlandi, M., Abbate, M., 2011. Is the toxic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* harmful to Mediterranean benthic invertebrates? Evidences from ecotoxicological tests with the polychaete *Dinophilus gyrociliatus*. Mar. Environ. Res. 72(4), 230-233.
- Smayda, T.J., 1997. What is a bloom? A commentary. Limnology and Oceanography 42(5part2), 1132-1136.
- Soler Onís, E., Fernández Zabala, J., A., A., 2018. Somelike it hot: diversidad del género *Ostreopsis* en la region macaronésica, Abstract Volume XIII Iberian Toxic Algae and Marine Biotoxins Meeting., p. 47.
- Sumner, L.W., Amberg, A., Barrett, D., Beale, M., Beger, R., Daykin, C., Fan, T.M., Fiehn, O., Goodacre, R., Griffin, J., Hankemeier, T., Hardy, N., Harnly, J., Higashi, R., Kopka, J., Lane, A., Lindon, J., Marriott, P., Nicholls, A., Reily, M., Thaden, J., Viant, M., 2007a. Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. Metabolomics 3(3), 211-221.
- Sumner, L.W., Amberg, A., Barrett, D., Beale, M.H., Beger, R., Daykin, C.A., Fan, T.W.M., Fiehn, O., Goodacre, R., Griffin, J.L., Hankemeier, T., Hardy, N., Harnly, J., Higashi, R., Kopka, J., Lane, A.N., Lindon, J.C., Marriott, P., Nicholls, A.W., Reily, M.D., Thaden, J.J., Viant, M.R., 2007b. Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. Metabolomics 3(3), 211-221.
- Suslick, K.S., 1994. The chemistry of ultrasound. Encyclopedia Britannica, Chicago 138.

- Suzuki, T., Watanabe, R., Uchida, H., Matsushima, R., Nagai, H., Yasumoto, T., Yoshimatsu, T., Sato, S., Adachi, M., 2012. LC-MS/MS analysis of novel ovatoxin isomers in several *Ostreopsis* strains collected in Japan. *Harmful Algae* 20, 81-91.
- Takaichi, S., 2011. Carotenoids in algae: distributions, biosyntheses and functions. *Marine drugs* 9(6), 1101-1118.
- Takaichi, S., Mochimaru, M., 2007. Carotenoids and carotenogenesis in cyanobacteria: Unique ketocarotenoids and carotenoid glycosides. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 64, 2607-2619.
- Tang, Y.Z., Gobler, C.J., 2011. The green macroalga, *Ulva lactuca*, inhibits the growth of seven common harmful algal bloom species via allelopathy. *Harmful Algae* 10(5), 480-488.
- Taniyama, S., Arakawa, O., Terada, M., Nishio, S., Takatani, T., Mahmud, Y., Noguchi, T., 2003. *Ostreopsis* sp., a possible origin of palytoxin (PTX) in parrotfish *Scarus ovifrons*. *Toxicon* 42(1), 29-33.
- Tartaglione, L., Dell'Aversano, C., Mazzeo, A., Forino, M., Wieringa, A., Ciminiello, P., 2016a. Determination of Palytoxins in Soft Coral and Seawater from a Home Aquarium. Comparison between *Palythoa*- and *Ostreopsis*-Related Inhalatory Poisonings. *Environmental Science & Technology* 50(2), 1023-1030.
- Tartaglione, L., Dello Iacovo, E., Mazzeo, A., Casabianca, S., Ciminiello, P., Penna, A., Dell'Aversano, C., 2017. Variability in Toxin Profiles of the Mediterranean *Ostreopsis* cf. *ovata* and in Structural Features of the Produced Ovatoxins. *Environmental Science & Technology* 51(23), 13920-13928.
- Tartaglione, L., Mazzeo, A., Dell'Aversano, C., Forino, M., Giussani, V., Capellacci, S., Penna, A., Asnagli, V., Faimali, M., Chiantore, M., Yasumoto, T., Ciminiello, P., 2016b. Chemical, molecular, and eco-toxicological investigation of *Ostreopsis* sp. from Cyprus Island: structural insights into four new ovatoxins by LC-HRMS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 408(3), 915-932.
- Tartaglione, L., Pelin, M., Morpurgo, M., Dell'Aversano, C., Montenegro, J., Sacco, G., Sosa, S., Reimer, J.D., Ciminiello, P., Tubaro, A., 2016c. An aquarium hobbyist poisoning: Identification of new palytoxins in *Palythoa* cf. *toxica* and complete detoxification of the aquarium water by activated carbon. *Toxicon* 121, 41-50.
- Tawong, W., Nishimura, T., Sakanari, H., Sato, S., Yamaguchi, H., Adachi, M., 2014. Distribution and molecular phylogeny of the dinoflagellate genus *Ostreopsis* in Thailand. *Harmful Algae* 37, 160-171.
- Tawong, W., Yoshimatsu, T., Yamaguchi, H., Adachi, M., 2015. Effects of temperature, salinity and their interaction on growth of benthic dinoflagellates *Ostreopsis* spp. from Thailand. *Harmful Algae* 44, 37-45.
- Taylor, F., 1979. The description of the benthic dinoflagellate associated with maitotoxin and ciguatoxin, including observations on Hawaiian material. *Developments in marine biology*, 71-77.
- Terajima, T., Uchida, H., Abe, N., Yasumoto, T., 2018a. Simple structural elucidation of ostreocin-B, a new palytoxin congener isolated from the marine dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*, using complementary positive and negative ion liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 32(12), 1001-1007.
- Terajima, T., Uchida, H., Abe, N., Yasumoto, T., 2018b. Structure elucidation of ostreocin-A and ostreocin-E1, novel palytoxin analogs produced by the dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*, using LC/Q-TOF MS. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1-10.
- Ternon, E., Pavaux, A.-S., Marro, S., Thomas, O.P., Lemée, R., 2018. Allelopathic interactions between the benthic toxic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* and a co-occurring diatom. *Harmful Algae* 75, 35-44.
- Tester, P., Litaker, R., Berdalet, E., 2020. Climate change and harmful benthic microalgae. *Harmful Algae*, 101655.

- Tester, P.A., Kibler, S.R., Holland, W.C., Usup, G., Vandersea, M.W., Leaw, C.P., Teen, L.P., Larsen, J., Mohammad-Noor, N., Faust, M.A., Litaker, R.W., 2014. Sampling harmful benthic dinoflagellates: Comparison of artificial and natural substrate methods. *Harmful Algae* 39, 8-25.
- Thakur, L.K., Jha, K.K., 2017. Palytoxin-induced acute respiratory failure. *Respir. Med. Case Rep.* 20, 4-6.
- Theodoridis, G., Gika, H., Want, E., Wilson, I., 2012. Liquid chromatography–mass spectrometry based global metabolite profiling: A review. *Analytica chimica acta* 711, 7-16.
- Thévenot, E., Roux, A., Xu, Y., Ezan, E., Junot, C., 2015. Analysis of the Human Adult Urinary Metabolome Variations with Age, Body Mass Index, and Gender by Implementing a Comprehensive Workflow for Univariate and OPLS Statistical Analyses. *Journal of proteome research* 14.
- Tibiriçá, C.E.J.A., Leite, I.P., Batista, T.V.V., Fernandes, L.F., Chomérat, N., Hervé, F., Hess, P., Mafra, L.L., 2019. *Ostreopsis cf. ovata* Bloom in Currais, Brazil: Phylogeny, Toxin Profile and Contamination of Mussels and Marine Plastic Litter. *Toxins* 11(8), 446.
- Tichadou, L., Glaizal, M., Armengaud, A., Grosseil, H., Lemee, R., Kantin, R., Lasalle, J.L., Drouet, G., Rambaud, L., Malfait, P., de Haro, L., 2010. Health impact of unicellular algae of the *Ostreopsis* genus blooms in the Mediterranean Sea: experience of the French Mediterranean coast surveillance network from 2006 to 2009. *Clin. Toxicol.* 48(8), 839-844.
- Tindall, D., Miller, D., Tindall, P., 1990. Toxicity of *Ostreopsis lenticularis* from the British and United States Virgin Islands.
- Tognetto, L., Bellato, S., Moro, I., Andreoli, C., 1995. Occurrence of *Ostreopsis ovata* (Dinophyceae) in the Tyrrhenian Sea during Summer 1994. *Botanica Marina* 38, 291-295.
- Toldra, A., Alcaraz, C., Andree, K.B., Fernández-Tejedor, M., Diogène, J., Katakis, I., O'Sullivan, C.K., Campas, M., 2019. Colorimetric DNA-based assay for the specific detection and quantification of *Ostreopsis cf. ovata* and *Ostreopsis cf. siamensis* in the marine environment. *Harmful Algae* 84, 27-35.
- Totti, C., Accoroni, S., Cerino, F., Cucchiari, E., Romagnoli, T., 2010. *Ostreopsis ovata* bloom along the Conero Riviera (northern Adriatic Sea): Relationships with environmental conditions and substrata. *Harmful Algae* 9(2), 233-239.
- Totti, C., Maria Cucchiari, E., Romagnoli, T., Penna, A., 2007. Bloom of *Ostreopsis ovata* on the Conero riviera (NW Adriatic Sea).
- Trenberth, K.E., Jones, P.D., Ambenie, P., Bojariu, R., Easterling, D., Klein Tank, A., Parker, D., Rahimzadeh, F., Renwick, J.A., Rusticucci, M., al., e., 2007. Observations: Surface and Atmospheric Climate Change, In: Solomon, S., Qin, D., Manning, M., Chen, Z., Marquis, M., Averyt, K.B., Tignor, M., Miller, H.L. (Eds.), *Global climate projections, in Climate Change 2007: The Physical Science Basis*. Cambridge University Press, Cambridge (United Kingdom), pp. 235–336.
- Tronholm, A., Steen, F., Tyberghein, L., Leliaert, F., Verbruggen, H., Antonia Ribera Siguan, M., De Clerck, O., 2010. Species Delimitation, Taxonomy, and Biogeography of *Dictyota* in Europe (Dictyotales, Phaeophyceae). *Journal of Phycology* 46(6), 1301-1321.
- Tubaro, A., Durando, P., Del Favero, G., Ansaldi, F., Icardi, G., Deeds, J.R., Sosa, S., 2011. Case definitions for human poisonings postulated to palytoxins exposure. *Toxicon* 57(3), 478-495.
- Turki, S., 2005. Distribution of toxic dinoflagellates along the leaves of seagrass *Posidonia oceanica* and *Cymodocea nodosa* from the Gulf of Tunis. *Cahiers de biologie marine* 46(1), 29-34.
- Turki, S., Harzallah, A., Sammari, C., 2006. Occurrence of harmful dinoflagellates in two different Tunisian ecosystems : the lake of Bizerte and the gulf of Gabès. *Cah. Biol. Mar.* 47(3), 7.
- Uchida, H., Taira, Y., Yasumoto, T., 2013. Structural elucidation of palytoxin analogs produced by the dinoflagellate *Ostreopsis ovata* IK2 strain by complementary use of positive and negative ion liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 27(17), 1999-2008.

- Uemura, D., Ueda, K., Hirata, Y., Naoki, H., Iwashita, T., 1981a. Further studies on palytoxin. I. Tetrahedron Letters 22(20), 1909-1912.
- Uemura, D., Ueda, K., Hirata, Y., Naoki, H., Iwashita, T., 1981b. Further studies on palytoxin. II. structure of palytoxin. Tetrahedron Letters 22(29), 2781-2784.
- Ukena, T., Satake, M., Usami, M., Oshima, Y., Fujita, T., Naoki, H., Yasumoto, T., 2002. Structural confirmation of ostreocin-D by application of negative-ion fast-atom bombardment collision-induced dissociation tandem mass spectrometric methods. Rapid Commun. Mass Spectrom. 16, 2387-2393.
- Ukena, T., Satake, M., Usami, M., Oshima, Y., Naoki, H., Fujita, T., Kan, Y., Yasumoto, T., 2001. Structure elucidation of ostreocin D, a palytoxin analog isolated from the dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*. Biosci Biotechnol Biochem 65(11), 2585-2588.
- Usami, M., Satake, M., Ishida, S., Inoue, A., Kan, Y., Yasumoto, T., 1995. Palytoxin Analogs from the Dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*. Journal of the American Chemical Society 117(19), 5389-5390.
- Utermöhl, H., 1958. Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. Mit. Int. Ver. Theor. Angew. Limnol. 9, 1-38.
- van den Berg, R.A., Hoefsloot, H.C., Westerhuis, J.A., Smilde, A.K., van der Werf, M.J., 2006. Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. BMC genomics 7, 142.
- Van Dolah, F.M., 2000. Marine algal toxins: origins, health effects, and their increased occurrence. Environ Health Perspect 108 Suppl 1, 133-141.
- Vanucci, S., Pezzolesi, L., Pistocchi, R., Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Dello Iacovo, E., Fattorusso, E., Tartaglione, L., Guerrini, F., 2012. Nitrogen and phosphorus limitation effects on cell growth, biovolume, and toxin production in *Ostreopsis cf. ovata*. Harmful Algae 15, 78-90.
- Vassalli, M., Penna, A., Sbrana, F., Casabianca, S., Gjerci, N., Capellacci, S., Asnaghi, V., Ottaviani, E., Giussani, V., Pugliese, L., Jauzein, C., Lemée, R., Hachani, M.A., Turki, S., Açaf, L., Saab, M.A.-A., Fricke, A., Mangialajo, L., Bertolotto, R., Totti, C., Accoroni, S., Berdalet, E., Vila, M., Chiantore, M., 2018. Intercalibration of counting methods for *Ostreopsis* spp. blooms in the Mediterranean Sea. Ecological Indicators 85, 1092-1100.
- Vello, V., Chu, W.-L., Lim, P.E., Abdul Majid, N., Phang, S.-M., 2018. Metabolomic profiles of tropical *Chlorella* species in response to physiological changes during nitrogen deprivation. J. Appl. Phycol.
- Verma, A., Hoppenrath, M., Dorantes-Aranda, J.J., Harwood, D.T., Murray, S.A., 2016. Molecular and phylogenetic characterization of *Ostreopsis* (Dinophyceae) and the description of a new species, *Ostreopsis rhodesae* sp. nov., from a subtropical Australian lagoon. Harmful Algae 60, 116-130.
- Verma, A., Kohli, G.S., Harwood, D.T., Ralph, P.J., Murray, S.A., 2019. Transcriptomic investigation into polyketide toxin synthesis in *Ostreopsis* (Dinophyceae) species. Environ Microbiol, 16.
- Viant, M., Sommer, U., 2012. Mass spectrometry based environmental metabolomics: A primer and review. Metabolomics 9, 1-15.
- Viant, M.R., 2008. Recent developments in environmental metabolomics. Molecular BioSystems 4(10), 980-986.
- Vidyarathna, N.K., Granéli, E., 2012. Influence of temperature on growth, toxicity and carbohydrate production of a Japanese *Ostreopsis ovata* strain, a toxic-bloom-forming dinoflagellate. Aquatic Microbial Ecology 65(3), 261-270.
- Vidyarathna, N.K., Granéli, E., 2013. Physiological responses of *Ostreopsis ovata* to changes in N and P availability and temperature increase. Harmful Algae 21-22, 54-63.
- Vila, M., Abós-Herrándiz, R., Giussani, V., Viure, L., Moyano, E., Berdalet, E., 2018. Role of environmental conditions and physiology on the harmful impacts of *Ostreopsis cf. ovata* blooms, XIII Reunión Ibérica de Algas Tóxicas y biotoxinas marinas 2018, Vigo, p. 48.

- Vila, M., Abòs-Herràndiz, R., Isern-Fontanet, J., Àlvarez, J., Berdalet, E., 2016. Establishing the link between *Ostreopsis* cf. *ovata* blooms and human health impacts using ecology and epidemiology. *Sci. Mar.* 80, 107-115.
- Vila, M., Arin, L., Battocchi, C., Bravo, I., Fraga, S., Penna, A., Reñé, A., Riobó, P., Rodríguez, F., Montserrat Sala, M., Camp, J., Torres, M., Franco, J., 2012. Management of *Ostreopsis* Blooms in Recreational waters along the Catalan Coast (NW Mediterranean Sea): Cooperation between a Research Project and a Monitoring Program. *Cryptogamie Algol* 33.
- Vila, M., Camp, J., Garcés, E., Masó, M., Delgado, M., 2001a. High resolution spatio-temporal detection of potentially harmful dinoflagellates in confined waters of the NW Mediterranean. *Journal of Plankton Research* 23(5), 497-514.
- Vila, M., Garcés, E., Masó, M., 2001b. Potentially toxic epiphytic dinoflagellate assemblages on macroalgae in the NW Mediterranean. *Aquat. Microb. Ecol.* 26(1), 51-60.
- Vila, M., Masó, M., Sampedro, N., Illoul, H., Arin, L., Garcés, E., Giacobbe, M.G., Àlvarez, J., Camp, J., 2008. The genus *Ostreopsis* in the recreational waters along the Catalan Coast and Balearic Islands (NW Mediterranean Sea): are they the origin of human respiratory difficulties?
- Wachi, K., Hokama, Y., 2001. Diversity of marine biotoxins in the near-shore ocean area: Presence of a palytoxin-like entity at Barber's Point Harbor, Oahu. *Journal of natural toxins* 10, 317-333.
- Wang, M., Carver, J., Phelan, V., Sanchez, L., Garg, N., Peng, Y., Nguyen, D., Watrous, J., Kapon, C., Luzzatto Knaan, T., Porto, C., Bouslimani, A., Melnik, A., Meehan, M., Liu, W.-T., Crüsemann, M., Boudreau, P., Esquenazi, E., Sandoval-Calderón, M., Bandeira, N., 2016. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nature Biotechnology* 34, 828-837.
- Wang, R., Xiao, H., Wang, Y., Zhou, W., Tang, X., 2007a. Effects of three macroalgae, *Ulva linza* (Chlorophyta), *Corallina pilulifera* (Rhodophyta) and *Sargassum thunbergii* (Phaeophyta) on the growth of the red tide microalga *Prorocentrum donghaiense* under laboratory conditions. *Journal of Sea Research* 58(3), 189-197.
- Wang, Y., Yu, Z., Song, X., Tang, X., Zhang, S., 2007b. Effects of macroalgae *Ulva pertusa* (Chlorophyta) and *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta) on growth of four species of bloom-forming dinoflagellates. *Aquatic Botany* 86(2), 139-147.
- Wells, M.L., Karlson, B., Wulff, A., Kudela, R., Trick, C., Asnaghi, V., Berdalet, E., Cochlan, W., Davidson, K., De Rijcke, M., Dutkiewicz, S., Hallegraeff, G., Flynn, K.J., Legrand, C., Paerl, H., Silke, J., Suikkanen, S., Thompson, P., Trainer, V.L., 2019. Future HAB science: Directions and challenges in a changing climate. *Harmful Algae*, 101632.
- Wells, M.L., Trainer, V.L., Smayda, T.J., Karlson, B.S., 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.
- Wiklund, S., Johansson, E., Sjöström, L., Mellerowicz, E.J., Edlund, U., Shockcor, J.P., Gottfries, J., Moritz, T., Trygg, J., 2008. Visualization of GC/TOF-MS-Based Metabolomics Data for Identification of Biochemically Interesting Compounds Using OPLS Class Models. *Analytical Chemistry* 80(1), 115-122.
- Wolfender, J.-L., Nuzillard, J.-M., van der Hoof, J.J.J., Renault, J.-H., Bertrand, S., 2019. Accelerating metabolite identification in natural product research: toward an ideal combination of LC-HRMS/MS and NMR profiling, in silico databases and chemometrics. *Analytical Chemistry* 91, 704-742.
- Wood, A.M., Everroad, R.C., Wingard, L., 2005. Measuring growth rates in microalgal cultures, In: Ra, A. (Ed.), *Algal Culturing Techniques*, pp. 269-285.
- Yamaguchi, H., Tanimoto, Y., Yoshimatsu, T., Sato, S., Nishimura, T., Uehara, K., Adachi, M., 2012a. Culture method and growth characteristics of marine benthic dinoflagellate *Ostreopsis* spp. isolated from Japanese coastal waters. *Fisheries Science* 78(5), 993-1000.

- Yamaguchi, H., Yoshimatsu, T., Tanimoto, Y., Sato, S., Nishimura, T., Uehara, K., Adachi, M., 2012b. Effects of temperature, salinity and their interaction on growth of the benthic dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* (Dinophyceae) from Japanese coastal waters. *Phycological Research* 60(4), 297-304.
- Yamamoto, Y., 2016. Quality Control of Photosystem II: The Mechanisms for Avoidance and Tolerance of Light and Heat Stresses are Closely Linked to Membrane Fluidity of the Thylakoids. *Frontiers in Plant Science* 7(1136).
- Yasumoto, T., Yasumura, D., Ohizumi, Y., Takahashi, M., Alcalá, A.C., Alcalá, L.C., 1986. Palytoxin in Two Species of Xanthid Crab from the Philippines. *Agricultural and Biological Chemistry* 50(1), 163-167.
- Ye, C., Zhang, M., 2013. Allelopathic Effect of Macroalga *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta) on the Photosynthetic Apparatus of Red-tide Causing Microalga *Prorocentrum micans*. *IERI Procedia* 5, 209-215.
- Yong, H.L., Mustapa, N.I., Lee, L.K., Lim, Z.F., Tan, T.H., Usup, G., Gu, H., Litaker, R.W., Tester, P.A., Lim, P.T., Leaw, C.P., 2018. Habitat complexity affects benthic harmful dinoflagellate assemblages in the fringing reef of Rawa Island, Malaysia. *Harmful Algae* 78, 56-68.
- Zapata, M., Fraga, S., Rodríguez, F., Garrido, J.L., 2012. Pigment-based chloroplast types in dinoflagellates. *Marine Ecology Progress Series* 465, 33-52.
- Zendong, Z., Bertrand, S., Herrenknecht, C., Abadie, E., Jauzein, C., Lemée, R., Gouriou, J., Amzil, Z., Hess, P., 2016. Passive sampling and high resolution mass spectrometry for chemical profiling of French coastal areas with a focus on marine biotoxins. *Environmental Science & Technology* 50(16), 8522-8529.
- Zhang, H., Lu, S.H., Li, Y., Cen, J.Y., Wang, H.L., Li, Q., Nie, X.P., 2018. Morphology and molecular phylogeny of *Ostreopsis* cf. *ovata* and *O. lenticularis* (Dinophyceae) from Hainan Island, South China Sea. *Phycological Research* 66(1), 3-14.
- Zingone, A., Siano, R., D'Alelio, D., Sarno, D., 2006. Potentially toxic and harmful microalgae from coastal waters of the Campania region (Tyrrhenian Sea, Mediterranean Sea). *Harmful Algae* 5(3), 321-337.

Titre : Effets *in situ* et *in vitro* des paramètres environnementaux sur l'abondance, le métabolome et le contenu toxinique d'*Ostreopsis cf. ovata* et purifications des ovatoxines

Mots clés : *Ostreopsis cf. ovata*, ovatoxines, métabolomique, purification, étude *in situ*, écophysiologie

Résumé : *Ostreopsis cf. ovata* est un dinoflagellé benthique toxique dont les proliférations s'accroissent en zone tempérée, comme en mer Méditerranée depuis 2005, probablement en lien avec le changement global. Ce dinoflagellé fait l'objet d'une surveillance puisque ses proliférations peuvent entraîner une mortalité des organismes marins et un impact sanitaire par inhalation et au contact de la peau. La relation avec la production d'ovatoxines (OVTX), analogues de la palytoxine (PLTX) a été suggérée mais non confirmée par manque d'OVTX purifiées pour mener des études toxicologiques.

Lors d'une étude terrain à Villefranche-sur-Mer, nous avons confirmé l'intérêt d'utiliser des substrats artificiels pour l'échantillonnage d'*O. cf. ovata* et que le quota d'OVTX suivait la dynamique de l'efflorescence. Un effet significatif du substrat macroalgal a été observé, suggérant des effets allélopathiques.

L'étude combinée des facteurs environnementaux que sont la température et l'irradiance ont montré, après acclimation, l'effet prédominant de la température sur le métabolome d'une souche d'*O. cf. ovata*. Alors qu'une plus forte température augmenterait la croissance, elle réduirait leur quota d'OVTX, ce qui supposerait une toxicité moindre avec le réchauffement climatique, mais cela doit être confirmé à plus large échelle. L'étude de stabilité de la PLTX a permis de mieux apprécier les pertes observées lors du processus de purification des OVTX à partir de cultures en masse d'*O. cf. ovata*. Les OVTX ainsi purifiées (un ménage de 5 analogues et les OVTX-a et -d) ont servi à mener des études toxicologiques, en collaboration avec des équipes spécialisées.

L'ensemble des données de cette thèse contribueront à mieux apprécier le risque sanitaire lié à la problématique *Ostreopsis*.

Title : *In situ* and *in vitro* effects of environmental parameters on the abundance, the metabolome and the toxin content of *Ostreopsis cf. ovata* and purification of ovatoxins

Keywords : *Ostreopsis cf. ovata*, ovatoxins, metabolomics, purification, *in situ* study, ecophysiology

Abstract : *Ostreopsis cf. ovata* is a benthic and toxic dinoflagellate spreading into temperate areas, as in the Mediterranean Sea since 2005, probably in relation to the global changes. This dinoflagellate undergoes surveillance programs as its proliferation can induce death of marine organisms and cause sanitary illness by inhalation or skin contact. The link with ovatoxins (OVTX) production, analogues of the palytoxin (PLTX), has been suggested but not confirmed yet because of the lack of pure OVTX for toxicological studies.

A field study at Villefranche-sur-Mer allowed us to confirm the advantage of using artificial substrates to sample of *O. cf. ovata* and to show that OVTX quota followed the bloom dynamic. A significant effect of the macroalgal substrate was observed, suggesting allelopathic interactions.

The combined study of the environmental factors temperature and light intensity showed, after acclimation, the predominant effect of temperature on the metabolome of *O. cf. ovata*. Despite higher temperatures increased the growth, they reduced their OVTX content, suggesting a decrease of toxicity in a context of global warming, but this must be confirmed at a larger scale. The stability study of PLTX allowed to appreciate the losses observed during the purification process of OVTX from high biomass of two *O. cf. ovata* strains. Such purified OVTX (a mix of 5 analogues and OVTX-a and -d) were used to perform toxicological studies, in collaboration with specialised teams.

All these data will contribute to a better understanding of the sanitary risks associated to *Ostreopsis*.