

## Rapport final du Projet SECTOX

Etude de la contamination par les phycotoxines (PST et lipophiles dont DST) des huîtres creuses et des moules de la lagune de Thau – Dynamique temporelle et spatiale de cette contamination dans l’optique d’une gestion sectorisée de la lagune (SECTOX).



Campagne terrain du projet SECTOX en octobre 2020 à bord du Gryphéa (Source : E. Abadie, Ifremer)

## Fiche documentaire

<p><b>Titre du rapport :</b> Etude de la contamination par les phycotoxines (PST et lipophiles dont DST) des huîtres creuses et des moules de la lagune de Thau – Dynamique temporelle et spatiale de cette contamination dans l’optique d’une gestion sectorisée de la lagune (SECTOX).</p>	
<p><b>Référence interne :</b> ODE/UL/LERLR 21-24</p> <p><b>Diffusion :</b></p> <p><input checked="" type="checkbox"/> libre (internet)</p> <p><input type="checkbox"/> restreinte (accès sur demande)</p> <p><input type="checkbox"/> interdite (confidentielle)</p>	<p><b>Date de publication :</b> 10/03/2023</p> <p><b>Version :</b> 1.0.0</p> <p><b>Référence de l’illustration de couverture :</b> Campagne terrain du projet SECTOX en octobre 2020 à bord du Gryphéa. Source : E. Abadie, Ifremer</p> <p><b>Langue(s) :</b> Français</p>
<p><b>Résumé :</b></p> <p>Le projet SECTOX porte sur l’étude de la contamination par les phycotoxines (PST et lipophiles dont DST) des huîtres creuses et des moules de la lagune de Thau ainsi que la dynamique temporelle et spatiale de cette contamination dans l’optique d’une gestion sectorisée de la lagune. Les campagnes de terrain ont été réalisées entre septembre 2019 et décembre 2020. La contamination des toxines lipophiles et des toxines hydrophiles (PST) a été suivie dans plusieurs matrices : coquillages et échantillonneurs passifs. Le suivi des espèces toxiques dans la colonne d’eau a été opéré selon plusieurs méthodes d’analyses et techniques d’échantillonnage. L’étude a mis en évidence que la contamination par les toxines lipophiles produites par une microalgue appartenant au genre toxique <i>Dinophysis</i>, impacte l’ensemble de la lagune de Thau sans qu’il soit possible de déterminer des dynamiques différentes entre les différents secteurs de la lagune. L’absence de prolifération du dinoflagellé <i>Alexandrium pacificum</i> (producteur de PST) sur la période suivie n’a pas permis de conclure sur l’existence d’une dynamique spatio-temporelle différente entre les secteurs de l’étang de Thau pour le risque de contamination par les PST.</p> <p>L’étude a aussi permis de tester de nouveaux outils (SPATT, échantillonneur passif pour les toxines) ainsi que la méthode de qPCR utilisant les outils de la biologie moléculaire pour l’identification et le dénombrement des espèces toxiques. Les résultats obtenus montrent que ces techniques sont prometteuses mais nécessitent une optimisation avant une utilisation en « routine » dans le volet sanitaire du réseau de surveillance REPHY.</p>	
<p><b>Mots-clés :</b></p> <p>SECTOX, <i>Alexandrium pacificum/tamarense</i>, <i>Dinophysis</i>, toxines paralysantes, toxines diarrhéiques, lipophiles, coquillages, SPATT, qPCR, prélèvement d’eau, REPHY, lagune de Thau</p>	
<p><b>Comment citer ce document :</b></p> <p>Eric Abadie, Ophélie Serais, Jean Luc Rolland, Zouher Amzil, Clarisse Hubert, Fabienne Hervé, Georges-Augustin Rovillon, Amélie Derrien, Aouregan Terre Terrillon, Kenneth Mertens, Gwenaél Bilien, Nicolas Chomérat, Christine Félix, Mohamed Laabir, Estelle Masseret. Rapport final du projet SECTOX « Etude de la contamination par les phycotoxines (PST et lipophiles dont DST) des huîtres creuses et des moules de la lagune de Thau – Dynamique temporelle et spatiale de cette contamination dans l’optique d’une gestion sectorisée de la lagune ». Ifremer/ODE/UL/LERLR 21.24- MARBEC. Mars, 2023.</p>	

<b>Commanditaire du rapport</b> : Direction Générale de l'Alimentation (DGAL)	
<b>Nom / référence du contrat</b> : 2019-155 (2102848362)	
<input type="checkbox"/> Rapport intermédiaire (réf. bibliographique : XXX) <input checked="" type="checkbox"/> Rapport définitif	
<b>Projets dans lesquels ce rapport s'inscrit</b> (programme européen, campagne, etc.) : Projet SECTOX - Financements Ifremer (50%), DGAL (18%), Région Occitanie (14%), Département de l'Hérault (14%), Sète Agglopôle Méditerranée (4%)	
<b>Auteur(s) :</b>	<b>Affiliation / Direction / Service, laboratoire</b>
Abadie Eric	Ifremer/RBE/BIODIVENV
Serais Ophélie	Marbec – Ifremer/ODE/UL/LERLR
Rolland Jean-Luc	Marbec – Ifremer/RBE
Amzil Zouher	Ifremer/ODE/DYNECO/PHYC
Hubert Clarisse	Ifremer/RBE/BRM/LPBA
Hervé Fabienne	Ifremer/ODE/DYNECO/PHYC
Rovillon Georges Augustin	Ifremer/RBE/BIODIVENV
Derrien Amélie	Ifremer/ODE/UL/LERBO
Terre-Terrillon Aourégan	Ifremer/ODE/UL/LERBO
Mertens Kenneth Neil	Ifremer/ODE/UL/LERBO
Bilien Gwenaël	Ifremer/ODE/UL/LERBO
Chomérat Nicolas	Ifremer/ODE/UL/LERBO
Félix Christine	Marbec - Université Montpellier
Laabir Mohamed	Marbec - Université Montpellier
Masseret Estelle	Marbec - Université Montpellier
<b>Encadrement(s) :</b>	
<b>Destinataires :</b> DGAL, DDPP34, Région Occitanie, Département de l'Hérault, Sète Agglopole Méditerranée	
<b>Validé par :</b> Yannick GUEGUEN, Responsable du LER-LR	

## Sommaire

### Table des matières

1.	Etat de l'art et contexte du projet de recherche	6
1.1.	Syndrome PSP (Paralytic Shellfish Poisoning) et <i>Alexandrium</i>	7
1.2.	Syndrome DSP (Diarrethic Shellfish Poisoning) et <i>Dinophysis</i>	9
1.3.	Syndrome ASP (Amnesic Shellfish Poisoning) et <i>Pseudo-nitzschia</i>	10
2.	Objectif général de l'étude	12
3.	Méthodologies mises en œuvre	14
3.1.	Stratégie d'échantillonnage	14
3.1.1	Localisation des points d'échantillonnage	14
3.1.2	Fréquence d'échantillonnage	14
3.2.	Suivi du plancton toxique dans l'eau	16
3.2.1.	Protocole REPHY : prélèvement <i>via</i> la bouteille Hydrobios® en surface et dénombrement et identification microscopique selon la méthode Utermöhl	16
3.2.2.	Prélèvement de l'ensemble de la colonne d'eau au filet à plancton, dénombrement et identification microscopique selon la méthode Utermöhl	16
3.2.3.	Prélèvement de l'ensemble de la colonne d'eau au filet à plancton et dénombrement par PCR quantitative (qPCR)	17
3.2.3.1.	Extraction et purification des acides nucléiques	17
3.2.3.2.	Amplification PCR	17
3.3.	Suivi des toxines dans l'eau et dans les coquillages	18
3.3.1.	Profil toxinique du phytoplancton	18
3.3.2.	Profil toxinique des coquillages	18
3.3.3.	Toxines dissoutes dans l'eau	18
4.	Résultats	19
4.1.	Déroulé des campagnes d'échantillonnage dans la lagune de Thau	19
4.2.	Paramètres physicochimiques	19
4.3.	Genres <i>Dinophysis</i> et <i>Alexandrium</i> dans la colonne d'eau	20
4.3.1	Méthode REPHY	20
4.3.2	Comparaison des méthodes de prélèvement et d'analyse du phytoplancton toxique	22
4.3.2.1.	Prélèvement : bouteille Hydrobios versus filet à plancton	22
4.3.2.2.	Analyse des échantillons : méthode d'analyse microscopique (Utermöhl) versus méthode d'analyse moléculaire (qPCR)	22
4.4.	Toxines dissoutes dans la colonne d'eau	25
4.4.1.	Toxines lipophiles réglementées : acide okadaïque (AO), dinophysistoxines et pectenotoxine-2 (PTX-2)	25

4.4.2.	Autres toxines réglementées (yessotoxines et azaspiracides)	25
4.4.3.	Toxines lipophiles non réglementées	25
4.5.	Toxines dans les coquillages	28
4.5.1.	Toxines lipophiles (DST)	28
4.5.1.2.	Toxines du groupe acide okadaïque et pectenotoxine-2	28
4.5.1.3.	Azaspiracides et yessotoxines	28
4.5.2.	Toxines lipophiles non réglementées	29
4.5.3.	Toxines hydrophiles (PST)	29
5.	Conclusion générale de l'étude	33
	Remerciements	35
	Bibliographie	36

## 1. Etat de l'art et contexte du projet de recherche

Le phytoplancton est un compartiment fondamental du réseau trophique dans l'écosystème marin. Certaines espèces phytoplanctoniques, appartenant majoritairement aux groupes des dinoflagellés et des diatomées, sont capables de produire des toxines qui sont soit directement nocives pour les animaux aquatiques soit accumulées, sans dommage apparent, par les mollusques filtreurs (Smayda, 1997, Belin et al, 2021). Ces derniers deviennent eux-mêmes toxiques pour l'Homme provoquant, selon les toxines en cause, des amnésies, des diarrhées ou des paralysies (troubles nerveux pouvant conduire au décès dans des cas aigus d'intoxications). Les microalgues productrices de toxines couvrent une grande variété de genre ou espèces d'organismes (Tableau 1).

Tableau 1. Familles de phycotoxines et microalgues toxiques associées pour les espèces où la production toxinique a été prouvée. Les groupes de toxines dont les effets chez l'homme se sont avérés sont en caractères gras ; le syndrome dont souffrent les êtres humains est désigné dans la deuxième colonne (ALS: sklerose latérale amyotrophique, ASP: intoxication amnésique par les mollusques, AST: toxicité d'aérosol, AZP: intoxication par azaspiracide, CFP: empoisonnement ciguaterique par les coquillages, CPT: clupeotoxisme, DTT: dermatotoxicité, HPT: hépatotoxicité, NSP: empoisonnement neurotoxique par les coquillages, PSP: intoxication par phycotoxine paralysante), les autres toxines sont désignées par pep = pas d'effet prouvé (Lassus et al., 2016)

Toxin group	Syndrome	Causative organism (genus or species level)
<b>Azaspiracids</b>	<b>AZP</b>	<i>Amphidoma languida</i> , <i>Azadinium poporum</i> , <i>A. spinosum</i> , <i>A. dexteroporum</i>
<b>β-methyl-amino alanine</b>	<b>ALS</b>	<i>Heterocapsa triquetra</i> , <i>Nostoc</i> spp.
Brevesulcenals		<i>Karenia brevisulcata</i>
<b>Brevetoxin</b>	<b>NSP</b>	<i>Karenia brevis</i> , <i>K. papilionacea</i>
Cooliatoxin		<i>Coolia malayensis</i> , <i>Coolia monotis</i> , <i>Coolia tropicalis</i>
<b>Ciguatoxins</b> (* also maitotoxin)	<b>CFP</b>	<i>Gambierdiscus australes*</i> , <i>G. belizeanus</i> , <i>G. caribaeus</i> , <i>G. carolinianus</i> , <i>G. carpenteri</i> , <i>G. excentricus</i> , <i>G. pacificus*</i> , <i>G. polynesiensis*</i> , <i>F. ruetzleri</i> , <i>G. silvae</i> , <i>G. toxicus*</i> , <i>G. yasumotoi</i>
<b>Domoic acid</b>	<b>ASP</b>	<i>Halamphora coffeaeformis</i> , <i>Nitzschia bizertensis</i> , <i>Nitzschia navis-varingica</i> <i>Pseudo-nitzschia australis</i> , <i>P. brasiliiana</i> , <i>P. calliantha</i> , <i>P. cuspidata</i> , <i>P. delicatissima</i> , <i>P. fraudulenta</i> , <i>P. galaxiae</i> , <i>P. granii</i> , <i>P. multiseriata</i> , <i>P. multistriata</i> , <i>P. pseudodelicatissima</i> , <i>P. pungens</i> , <i>P. seriata</i> , <i>P. turgidula</i>
Goniodomine A	n.e.p.	<i>Alexandrium hiranoi</i> , <i>A. pseudogonyaulax</i>
Gymnocins	n.e.p.	<i>Karenia mikimotoi</i>
Gymnodimines	n.e.p.	<i>Karenia selliformis</i> , <i>Alexandrium peruvianum</i>
<b>Karenia brevisulcata toxins</b>	<b>AST</b>	<i>Karenia brevisulcata</i>
Karlotoxins	n.e.p.	<i>Karlodinium veneficum</i> , <i>K. conicum</i>
<b>Lyngbiatoxins (&amp; antillatoxin)</b>	<b>DTT</b>	<i>Lyngbya majuscula</i>
<b>Nodularins</b>	<b>HPT</b>	<i>Nodularia spumigena</i>
<b>Okadaic acid &amp; Dinophysis toxins</b> (* also pectenotoxins, †also prorocentrolide, no effects proven in man for these two groups)	<b>DSP</b>	<i>Dinophysis acuminata*</i> , <i>D. acuta*</i> , <i>D. caudata*</i> , <i>D. fortii*</i> , <i>D. norvegica*</i> , <i>D. ovum*</i> , <i>D. sacculus*</i> , <i>D. miles*</i> <i>Phalacroma rotundatum</i> , <i>P. rapa</i> , <i>P. mitra</i> , <i>Prorocentrum belizeanum</i> , <i>P. concavum</i> , <i>P. faustiae</i> , <i>P. hoffmanianum</i> , <i>Prorocentrum leve</i> , <i>P. texanum</i> , <i>P. maculosum</i> ‡, <i>P. rhathymum</i> , <i>P. lima</i>
<b>Mascarenotoxins, ovatoxins &amp; ostreocins (palytoxins)</b>	<b>AST / CPT</b>	<i>Ostreopsis lenticularis</i> , <i>O. mascarenensis</i> , <i>Ostreopsis ovata</i> , <i>O. cf. ovata</i> , <i>O. siamensis</i> , <i>Trichodesmium erythraeum</i>
Pinnatoxins	n.e.p.	<i>Vulcanodinium rugosum</i>
Prymnesins	n.e.p.	<i>Prymnesium parvum</i>
<b>Saxitoxins</b>	<b>PSP</b>	<i>Alexandrium affine</i> , <i>A. ostenfeldii</i> , <i>A. acatenella</i> , <i>A. catenella</i> , <i>A. cohorticula</i> , <i>A. peruvianum</i> , <i>A. tamiyavanichii</i> , <i>A. andersonii</i> , <i>A. fundyense</i> , <i>A. tamarensis</i> , <i>A. leei</i> , <i>A. minutum</i> , <i>Gymnodinium catenatum</i> , <i>Pyrodinium bahamense</i> , <i>Trichodesmium erythraeum</i>
Spirolides	n.e.p.	<i>A. ostenfeldii</i> , <i>A. peruvianum</i>
Viequeamides (=Kulolides)	n.e.p.	<i>Rivularia</i> sp.
Yessotoxins (* also adriatoxin)	n.e.p.	<i>Protoceratium reticulatum*</i> , <i>Lingulodinium polyedra</i> , <i>Gonyaulax spinifera</i>

Au niveau international, les efflorescences des microalgues toxiques sont de plus en plus fréquentes et connaissent une expansion inquiétante (Sournia et al., 1991 ; Hallegraef, 1993 ; Glibert et al., 2014 ; T. J. Smayda, 2002 ; Wells et al., 2015 ; Lassus et al., 2016 ; Berdalet et al., 2016 ;). Sur le littoral français métropolitain, la présence des espèces toxiques est connue depuis les années 1980 (Masselin et al., 2000 ; Laabir et al., 2007 ; Laabir et al., 2011 ; Genovesi et al., 2013 ; Belin, Soudant, & Amzil, 2021). Afin de protéger le consommateur, l'IFREMER a mis en place en 1984, un réseau de surveillance du phytoplancton et des phycotoxines (REPHY) pour dénombrer les espèces toxiques et suivre la contamination des coquillages afin de fournir à l'administration les données permettant de prendre les mesures de gestion adaptées pour protéger la santé des consommateurs de coquillages. Dans la lagune de Thau, sont présentes essentiellement des espèces appartenant aux genres *Alexandrium*, *Dinophysis* (dinoflagellés) et *Pseudo-nitzschia* (diatomée) pouvant entraîner respectivement des intoxications de type PSP, DSP et ASP (Belin et al., 2021).

### 1.1. Syndrome PSP (Paralytic Shellfish Poisoning) et *Alexandrium*

Les toxines, associées au syndrome PSP (Paralytic Shellfish Poisoning) ont été décrites au XVII<sup>ème</sup> siècle (Halstead, 1967). Ces toxines, dont on dénombre aujourd'hui plus de trente analogues, ont comme base commune la saxitoxine. Cette neurotoxine qui représente le groupe le plus dangereux en matière de toxicité est classée « arme biologique » en France. Ces toxines sont produites notamment par des microalgues appartenant aux genres *Alexandrium* et *Gymnodinium* (Tableau 1) mais aussi par des cyanobactéries, notamment en eau douce. En France, les toxines paralysantes (Paralytic Shellfish Toxin, PST) ont été observées pour la première fois en 1988 sur les côtes atlantiques, en Bretagne dans les Abers (Erard-Le Denn, 1991). Puis elles ont été détectées en 1998 sur les côtes méditerranéennes dans l'étang de Thau (Masselin et al., 2000 ; Genovesi et al., 2011 ; Laabir et al., 2013).

Dans la lagune de Thau, bien qu'*Alexandrium pacificum* (dénommé *Alexandrium catenella* jusqu'en 2014 (John et al., 2014)) ait été formellement identifié suite au bloom de 1998 grâce à la morphologie de sa thèque et son ribotype (Lilly et al., 2002), la reconnaissance des espèces impliquées dans ces efflorescences récurrentes depuis 1998 n'était pas résolue de façon définitive sur la simple base de la systématique classique car à l'évidence plusieurs types morphologiques d'*Alexandrium* semblaient exister, voire coexister lors des différents blooms. Enfin, les modes de colonisation potentiellement envisagés laissaient entrevoir la possibilité de souches d'origine diverse. C'est dans ce contexte que l'isolement de cellules végétatives et de kystes pour réaliser des cultures monoclonales afin de ribotyper les individus a permis de décrire les deux espèces *A. pacificum* et *A. tamarense* dans les échantillons environnementaux (Masseret et al., 2010 ; Genovesi et al., 2011).

Parmi l'ensemble des résultats acquis dans le cadre du REPHY sur la période 1998-2021<sup>1</sup> dans la lagune de Thau, des efflorescences du genre *Alexandrium* caractérisées par des dépassements du seuil d'alerte REPHY (1000 Cell/L) ont été détectées dans les zones d'élevage aux points « Bouzigues (a) » et « Marseillan (a) » (Figure 1 en haut) pour 17 des 24 années suivies. Elles sont observées principalement au cours des mois de mai à décembre (Figure 1). Un gradient décroissant de la durée et de la fréquence des épisodes d'efflorescences à *Alexandrium* est observé d'Est en Ouest entre les points « Crique de l'Angle », « Bouzigues (a) » et « Marseillan (a) » (cf. pg.4 pour la localisation des points).

Des teneurs en toxines paralysantes (supérieures à la limite de détection) ont été mesurées dans les coquillages des points « Bouzigues (a) » et « Marseillan (a) » de 1998 à 2021 dans le cadre du Réseau

<sup>1</sup> REPHY - French Observation and Monitoring program for Phytoplankton and Hydrology in coastal waters (2022). REPHY dataset - French Observation and Monitoring program for Phytoplankton and Hydrology in coastal waters. Metropolitan data. SEANOE. <https://doi.org/10.17882/47248>

de Surveillance des Phycotoxines dans les organismes marins REPHYTOX<sup>2</sup> (Figure 1 en bas). Sur les onze épisodes d'efflorescences à *Alexandrium* survenus en fin d'année, entre septembre et décembre, neuf ont provoqué un dépassement du seuil réglementaire (800 µg éq STX/kg de chair totale) en PST dans les coquillages. Les épisodes d'efflorescences d'*Alexandrium* qui ont eu lieu au printemps/été n'ont jamais engendré de dépassement du seuil réglementaire en toxines dans les coquillages. Cette saisonnalité de la toxicité des coquillages est fonction de la proportion des espèces d'*Alexandrium* au sein des efflorescences. Les deux espèces d'*Alexandrium* décrites dans la lagune de Thau sont *A. pacificum* (toxique) majoritairement observée à l'automne et d'*A. tamarense* (souches décrites à Thau non toxiques) potentiellement présent le reste de l'année (Genovesi et al., 2011). Elles ne peuvent pas être formellement distinguées dans le cadre des observations réalisées au microscope optique dans le cadre du REPHY.

Sur les 9 épisodes de dépassement du seuil réglementaire en PST dans les coquillages, un seul, en fin d'année 1998, concerne les deux points de surveillance et 8 concernent uniquement le point « Bouzigues (a) » (années 2017, 2016, 2015, 2007, 2004, 2003, 2001 et 1999, Figure 1 en bas).

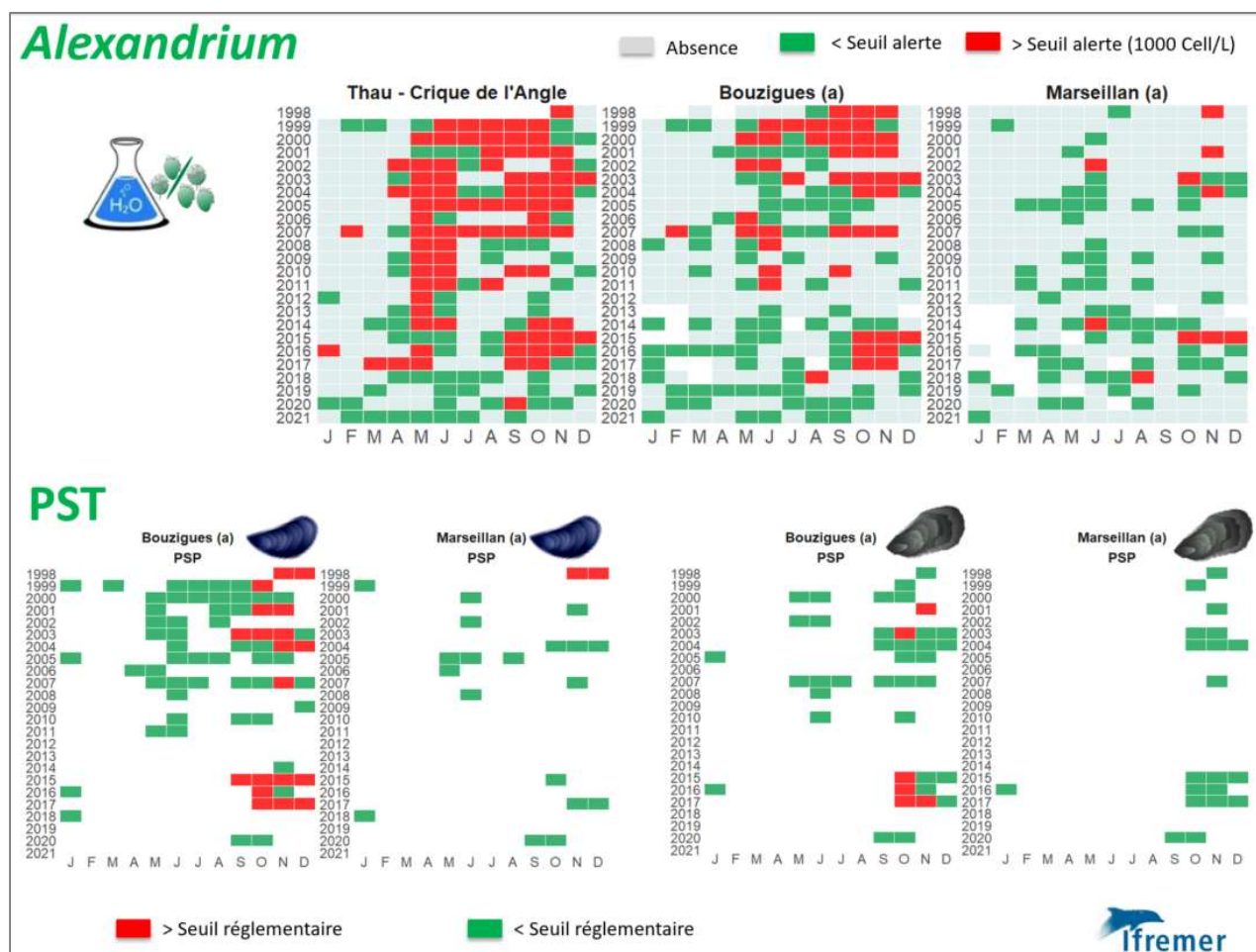


Figure 1. Résultats REPHY des observations des espèces du genre *Alexandrium* dans l'eau (en haut) et résultats REPHYTOX des concentrations PST dans les coquillages (en bas) de 1998 à 2021 aux points de suivi des zones d'élevage de la lagune de Thau. En rouge, au moins une observation, dans le mois, supérieure au seuil; en vert, au moins une observation inférieure au seuil; en gris pour le REPHY: absence de cellule détectée dans le mois.

<sup>2</sup> REPHYTOX - French Monitoring program for Phycotoxins in marine organisms (2022). REPHYTOX dataset. French Monitoring program for Phycotoxins in marine organisms. Data since 1987. SEANOE. <https://doi.org/10.17882/47251>



## 1.2. Syndrome DSP (Diarrehic Shellfish Poisoning) et *Dinophysis*

Ce syndrome diarrhéique connu sous le nom anglo-saxon de DSP (Diarrehic Shellfish Poisoning) a été décrit pour la première fois en 1961 au Pays Bas. Les toxines le plus souvent impliquées sont l'acide okadaïque (AO) et ses dérivés (dinophysistoxines). En France, le risque principal est essentiellement constitué des contaminations dues au groupe de l'acide okadaïque et des dinophysistoxines : DTX-1 à 3 (Amzil et al, 2006; Amzil et al., 2007; Caruana et Amzil, 2018).

Dans la lagune de Thau, la microalgue responsable du syndrome DSP a été identifiée comme étant *Dinophysis* spp. Ce dinoflagellé est très régulièrement observé dans la lagune de Thau, ce qui conduit à un nombre élevé d'alertes REPHY dont le seuil est atteint dès la présence de *Dinophysis* (Figure 2, en haut). A l'Ouest de la zone d'élevage, le point « Marseillan (a) » est moins fréquemment exposé à sa présence que les deux autres points situés à l'Est (Figure 2 en haut) sur la période 1998-2021. Le risque lié à la présence de *Dinophysis* tend à s'accroître : i) depuis 2008, les efflorescences ont augmenté en fréquence au point « Marseillan (a) », ii) depuis les années 2013-2014, la période de présence de *Dinophysis* aux points « Bouzigues (a) » et « Crique de l'Angle », semble s'étendre et couvrir toute l'année alors qu'elle était précédemment d'avril à décembre.

Dans les moules, trois épisodes toxiques caractérisés par des dépassements du seuil réglementaire (160 µg éq AO/kg de chair totale) dans le mois ont été mesurés au point « Bouzigues (a) » en juin 2014 (maximum de 239 µg éq AO/kg de chair totale) et mai 2021, ainsi qu'au point « Marseillan (a) » en novembre 2018 (195 µg éq AO/kg de chair total). De 2010 à 2021, le seuil réglementaire (Figure 2, en bas) et le ½ seuil réglementaire n'ont jamais été atteint dans les huîtres de la lagune de Thau.

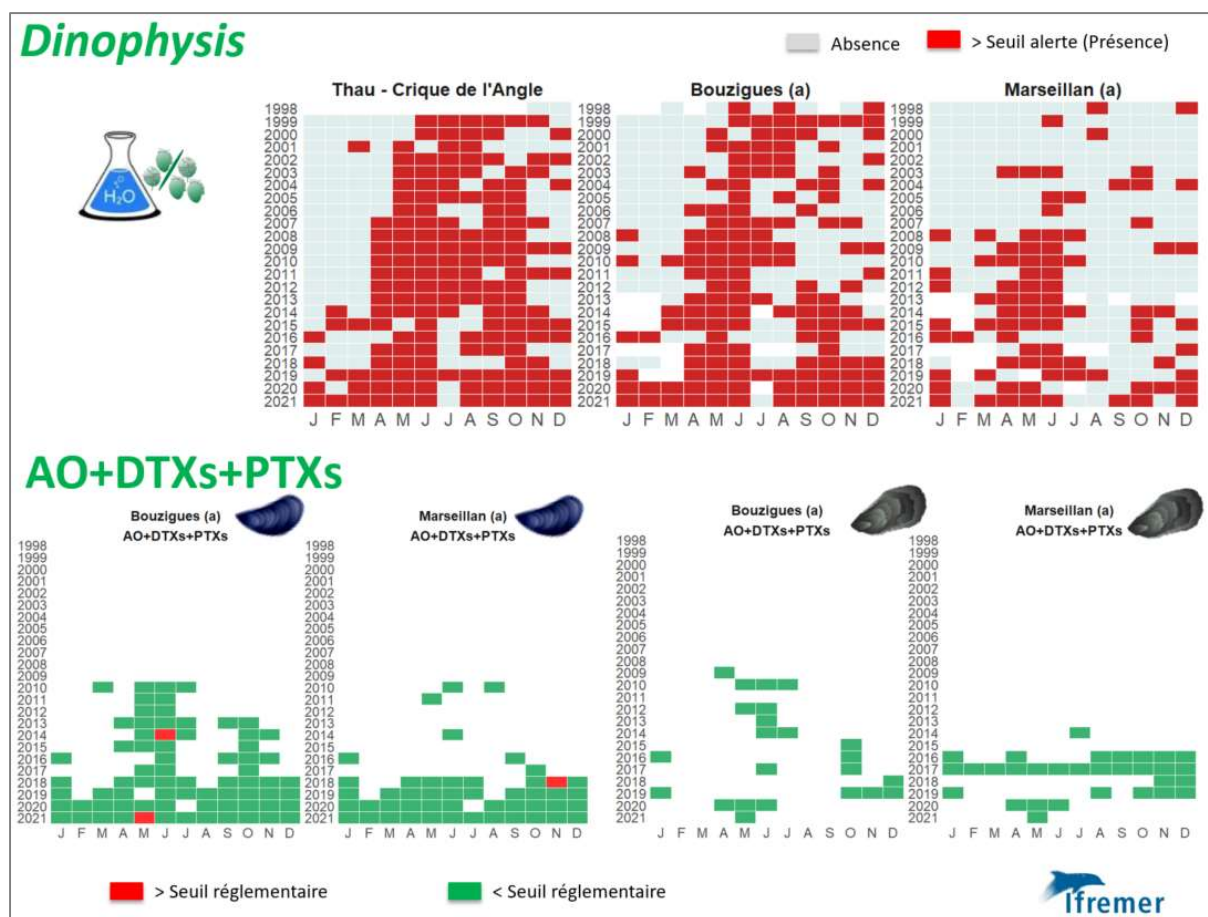


Figure 2. Résultats REPHY des observations des espèces du genre *Dinophysis* dans l'eau (en haut) de 1998 à 2021 et résultats REPHYTOX des concentrations en lipophiles (DST) dans les coquillages (en bas) de 2010 à 2021 aux points de suivi des zones d'élevage de la lagune de Thau. En rouge, au moins une observation, dans le mois, supérieure au seuil; en vert, au moins une observation inférieure au seuil; en gris pour le REPHY: absence de cellule détectée dans le mois. Les résultats du bio-essai sur la fraction hépatopancréas avant 2010 ne sont pas représentés sur le graphe.

### 1.3. Syndrome ASP (Amnesic Shellfish Poisoning) et *Pseudo-nitzschia*

Le syndrome ASP (Amnesic Shellfish Poisoning) a été mis en évidence pour la première fois au Canada en 1987 dans l'île du Prince Edouard (Bates et al., 1989). Cette quasi unique intoxication répertoriée au monde a concerné 107 personnes dont 22 ont dû être hospitalisées pour des symptômes graves. Quatre d'entre elles sont décédées (personnes âgées de 71 à 84 ans). La toxine incriminée est l'acide domoïque produit par des diatomées du genre *Pseudo-nitzschia*.

En France métropolitaine, les toxines amnésiantes, en relation avec les espèces *Pseudo-nitzschia* toxiques, ont été mises en évidence en 1999 (Amzil et al, 2001). La diatomée *Pseudo-nitzschia* est observée régulièrement dans la lagune de Thau tout au long de l'année et dans toutes les zones conchylicoles (Figure 3, en haut). Les dépassements du seuil d'alerte sanitaire REPHY (100 000 Cell/L) dans la zone d'élevage sont plus fréquemment observés entre avril et septembre, et sont plus rares sur « Marseillan (a) » que sur « Bouzigues (a) » ou « Crique de l'Angle ». Bien que des espèces du genre *Pseudo-nitzschia* soient présentes une grande partie de l'année au-dessus du seuil de déclenchement d'alerte REPHY, aucun dépassement du seuil réglementaire en toxine ASP (20 mg/kg de chair totale) n'a été mesuré dans les coquillages des points « Marseillan (a) » et « Bouzigues (a) » depuis 1998 (Figure 3, en bas). Dans la lagune de Thau, c'est actuellement le risque toxinique le moins problématique des trois familles de toxines réglementées suivies.

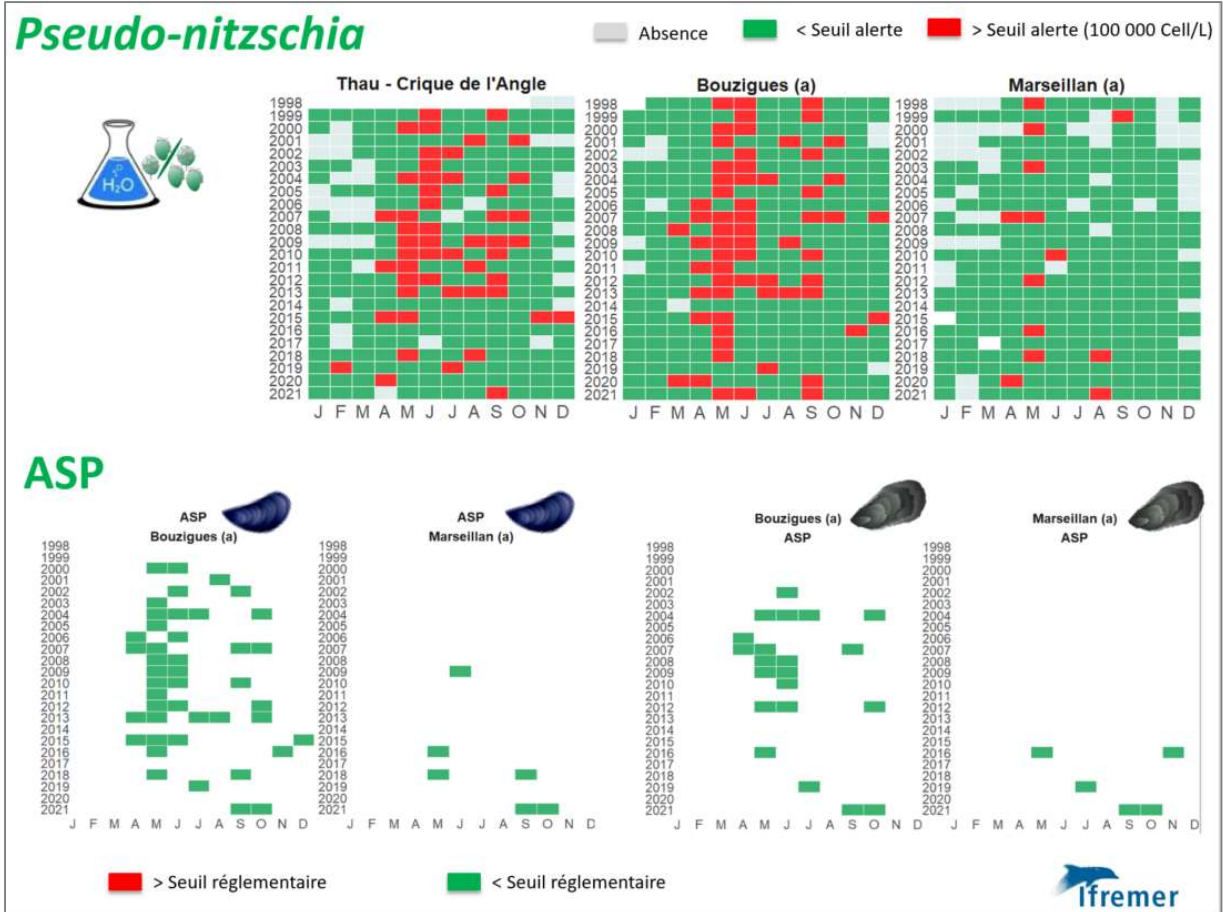


Figure 3. Résultats REPHY des observations des espèces du genre *Pseudo-nitzschia* dans l'eau (en haut) et résultats REPHYTOX des concentrations ASP dans les coquillages (en bas) de 1998 à 2021 aux points de suivi des zones d'élevage de la lagune de Thau. En rouge, au moins un résultat, dans le mois, supérieur au seuil; en vert, au moins un résultat inférieur au seuil ; en gris pour le REPHY: absence de cellule détectée dans le mois.

## 2. Objectif général de l'étude

Depuis le 01/01/2019, la zone de production conchylicole n°34.39 « Lotissements conchylicoles de la lagune de Thau » est découpée par arrêté Préfectoral (DDTM34 n°2018/01/1448) en deux zones distinctes, les zones 34.39.01 et 34.39.02, correspondant aux secteurs conchylicoles de « Bouzigues » et « Mèze-Marseillan », afin de permettre une gestion sectorisée de l'activité conchylicole en cas d'épisode de contamination microbiologique de la lagune de Thau. En raison de l'impact croissant des épisodes de contamination par les phycotoxines sur l'activité conchylicole, les services gestionnaires des risques sanitaires souhaitent évaluer la possibilité de généraliser la stratégie de sectorisation de la lagune aux crises toxiques.

Cependant, si la stratégie REPHY de surveillance du risque phycotoxinique - basée sur le suivi des 3 lieux de surveillance « Crique de l'Angle », « Bouzigues (a) » et « Marseillan (a) » (Figure 4) - est adaptée à l'évaluation d'un tel risque à l'échelle de la lagune, elle ne permet pas une évaluation de ce risque de manière différenciée dans les deux zones de production de la lagune. Afin d'émettre un avis sur une éventuelle gestion sectorisée du risque phycotoxinique, et proposer un protocole d'alerte REPHY-REPHYTOX adapté, il était indispensable d'acquérir des connaissances approfondies de la dynamique de contamination des coquillages exploités dans la lagune par les toxines lipophiles et PST. Devant la très faible incidence de la contamination à l'acide domoïque (AD/ASP) dans la lagune de Thau, cette toxine n'a pas été incluse dans le champ de cette étude.

En effet, les résultats des suivis REPHY et REPHYTOX montrent que le développement des espèces toxiques des genres *Dinophysis* et *Alexandrium* (*A. pacificum* et *A. tamarense*) est hétérogène dans le temps et dans l'espace dans la lagune de Thau. Bien que des proliférations de *Dinophysis* et *Alexandrium* soient régulièrement observées dans la lagune, les dépassements des seuils réglementaires dans les coquillages pour les toxines sont rares sur la période 1998-2021. Ils ne concernent quasi exclusivement que les toxines paralysantes (PST) liées à la présence de l'espèce toxique *Alexandrium pacificum*. La forte variabilité des vents et de la modification rapide des cellules de circulation engendrées par ces vents, rendent difficile l'anticipation de la dissémination dans la lagune des blooms d'*Alexandrium*. L'évaluation du risque sanitaire lié aux phycotoxines dans la lagune de Thau implique de pouvoir anticiper le dépassement des seuils sanitaires en toxines dans les animaux d'élevage.

Pour comprendre ces cinétiques de contaminations dans la lagune de Thau, au-delà de l'observation du phytoplancton toxique (selon le protocole REPHY) il est nécessaire d'accroître nos connaissances sur la dynamique de dissémination de ces algues toxiques (*Dinophysis* et *Alexandrium pacificum*). Dans cette optique, l'étude SECTOX propose :

- D'évaluer la prévalence de ces espèces toxiques dans la colonne d'eau toute l'année et pas seulement au moment des blooms. En effet, de nombreux travaux ont montré que ces espèces peuvent migrer dans la colonne d'eau en fonction des conditions hydrologiques mais aussi en fonction des conditions écologiques notamment : l'accès aux nutriments, l'évitement en tant que proies, à la compétition avec d'autres espèces, aux effets allélopathiques (Genovesi et al., 2013 ; Laabir et al., 2013; Laanaia et al., 2013 ; Smida et al., 2012; Brandenburg et al., 2017). L'utilisation de technique de biologie moléculaire telle que l'amplification par PCR quantitative (Quantitative Polymerase Chain Reaction : qPCR) est un outil de diagnostic permettant de détecter et de quantifier des espèces phytoplanctoniques cibles grâce à des amorces spécifiques. De plus, elle permet d'analyser d'un nombre important d'échantillons en peu de

temps. Cet outil se révèle particulièrement performant pour les espèces toxiques rencontrées régulièrement dans nos milieux.

- D'identifier, dans le cas d'*Alexandrium*, les sites préférentiels d'accumulation des kystes de résistance qui jouent un rôle important dans l'initiation mais aussi dans le maintien des blooms (Genovesi et al., 2009 ; Ishikawa et al., 2014 ; Shin et al., 2014 ; Triki et al., 2014 ; Mardones et al., 2016 ; Lau et al., 2017). Comme pour le phytoplancton, la technique de qPCR pour la détection des kystes d'*Alexandrium* sera mise en œuvre.
- De réaliser un suivi de la contamination par les phycotoxines des mollusques bivalves (*Crassostrea gigas* et *Mytilus galloprovincialis*).

Concernant les toxines paralysantes (PST), le protocole utilisé pour cette étude repose sur un suivi de contamination selon le test qui était officiellement pratiqué en France et en Europe au moment de l'étude ; c'est-à-dire le bioessai sur souris, validé au niveau international. Il est décrit dans la méthode du LNR « biotoxines marines » de l'Anses. Cependant, sa limite de détection est relativement élevée : 350 µg éq STX/kg de chair totale, soit presque la moitié du seuil de sécurité réglementaire qui est de 800 µg éq STX/kg. Il ne permet pas un suivi de la cinétique de contamination et de décontamination pour de faibles teneurs en toxines. En outre, cette méthode ne permet pas de déterminer le profil toxinique. Ainsi des analyses physico-chimiques par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) ont été menées pour identifier et quantifier formellement les toxines paralysantes dans les matrices biologiques (phytoplancton, coquillages).

Concernant les analyses des toxines lipophiles, le protocole repose sur la méthode chimique officielle au niveau européen et relayée au plan national par le LNR « biotoxines marines » de l'Anses. Il s'agit également d'une analyse physico-chimique réalisée par LC-MS/MS.

- En complément, le projet s'appuie sur un suivi des toxines dissoutes dans l'eau en utilisant des échantillonneurs passifs SPATTs (Solid Phase Adsorption Toxins Tracking). Ces SPATTs contiennent une résine qui permet de concentrer les toxines dissoutes afin de les doser ensuite par analyse chimique (MacKenzie et al., 2004 ; Fux et al., 2008 ; Fux et al., 2009 ; Li et al., 2011 ; MacKenzie, 2010 ; Zendong et al., 2014 ; Li et al., 2016). L'objectif est de mieux appréhender la dispersion géographique de ces toxines mais aussi de mieux évaluer les contaminations croisées des bivalves à la fois par le phytoplancton toxique et les toxines dissoutes.

Les résultats de cette étude avaient pour objectif 1) d'apporter des éléments de réponse aux questionnaires quant à la possibilité de la mise en place d'une gestion sectorisée du risque de contamination par des phycotoxines dans l'étang de Thau, et 2) le cas échéant d'envisager une évolution du protocole de suivi REPHY/REPHYTOX actuel.

En complément de cette étude, une campagne de prélèvements de sédiments a été réalisée en février 2021 dans le cadre du projet SECTOX 2 afin d'identifier la présence de kystes d'*Alexandrium* dans la lagune de Thau et mettre en évidence la présence de zones à risque d'émergence. Les résultats de cette campagne seront restitués ultérieurement.

### 3. Méthodologies mises en œuvre

#### 3.1. Stratégie d'échantillonnage

##### 3.1.1 Localisation des points d'échantillonnage

En complément des trois stations de suivi REPHY actuelles (Crique de l'Angle, Bouzigues (a) et Marseillan (a)), dix points d'échantillonnage supplémentaires de prélèvement d'eau et de coquillages et de d'immersion de capteurs passifs de toxines (SPATTs) ont été choisis sur les trois zones conchylicoles exploitées (Figure 4).

Ces points de prélèvement sont :

- Les points BZ01 et BZ02, complémentaires de la station « Bouzigues (a) » du suivi REPHY-REPHYTOX. Ils doivent permettre de suivre la propagation des proliférations toxiques au départ de la Crique de l'Angle. Ces points supplémentaires ont été choisis pour vérifier si « Bouzigues (a) » se révèle bien être une station « sentinelle » REPHY/REPHYTOX de la zone conchylicole n°34.39.01 de Bouzigues.
- Les points BZ03, BZ04, BZ05, MM06, MM07 et la « table Ifremer » ont été positionnés pour détecter la présence de microalgues toxiques dans le secteur central de l'étang. La comparaison des résultats acquis sur les points MM06, MM07 doit également permettre d'identifier le point le plus sensible à suivre dans le cadre du REPHY dans ce secteur de la zone n°34.39.02 de Mèze-Marseillan.
- Les points MM10, MM11 et MM12 ont été choisis afin de surveiller et d'étudier la circulation et les proliférations des microalgues toxiques dans le secteur Sud-Ouest de l'étang. Ces points doivent également permettre de vérifier que la station « Marseillan (a) » est bien une station « sentinelle » REPHY/REPHYTOX de la zones conchylicoles n°34.39.02 de Mèze-Marseillan.

##### 3.1.2 Fréquence d'échantillonnage

Pour cette étude, la fréquence d'échantillonnage de l'eau et des coquillages a été calquée sur le protocole de suivi REPHY, c'est-à-dire un échantillonnage tous les quinze jours en période d'absence attendue d'espèces toxiques et un échantillonnage hebdomadaire en période à risque de prolifération de microalgues toxiques. La température et la salinité de l'eau ont également été suivies *in situ* à l'aide de sondes multi-paramètres.

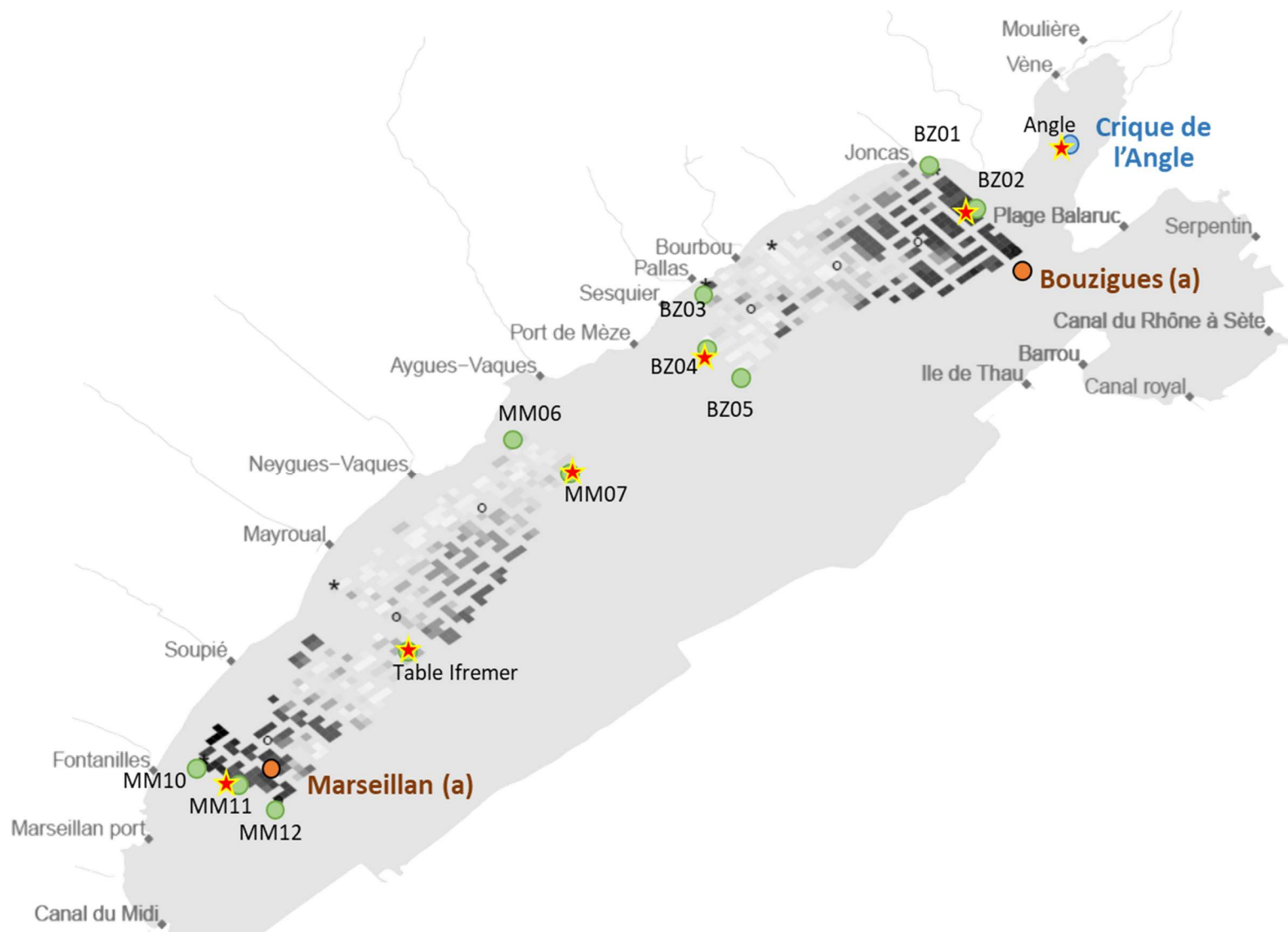


Figure 4. Localisation des stations d'échantillonnage REPHY Crique de l'Angle (rond bleu), REPHYTOX (ronds orangers), onze stations supplémentaires pour analyses eau et coquillages (ronds verts) ; 6 stations supplémentaires pour analyses des toxines dissoutes dans l'eau – SPATTS (étoiles rouges).

### 3.2. Suivi du plancton toxique dans l'eau

Le plancton toxique dans l'eau a été suivi selon 3 protocoles différents couplant deux méthodes de prélèvements de l'eau et deux méthodes de dénombrement du plancton.

#### 3.2.1. Protocole REPHY : prélèvement *via* la bouteille Hydrobios® en surface et dénombrement et identification microscopique selon la méthode Utermöhl

L'eau de Thau a été prélevée à l'aide d'une bouteille de prélèvement verticale Hydrobios® en sub-surface, puis les dénombrements des espèces toxiques dans l'eau ont été réalisés d'après le protocole REPHY en vigueur. Brièvement, le flacon d'un litre d'eau « brute » a été transféré dans une glacière pour le transport. Au laboratoire, un aliquot de 10 mL a été placé dans une chambre de lecture à plancton (Hydrobios) puis fixé par une goutte de lugol. Le dénombrement complet de la chambre et l'identification microscopique des microalgues ont été réalisés selon la méthode Utermöhl (Utermöhl, 1931) avec un microscope inversé "Zeiss Axio Observer".

#### 3.2.2. Prélèvement de l'ensemble de la colonne d'eau au filet à plancton, dénombrement et identification microscopique selon la méthode Utermöhl

Des prélèvements ont été effectués à l'aide d'un filet à plancton de maille 20 µm par relevage vertical du filet, du fond vers la surface (Figure 5).



Figure 5. Prélèvement de plancton au filet.

La quantité d'eau filtrée a été estimée en fonction du diamètre du filet et à la hauteur d'eau mesurée par un sondeur à main PLASTIMO. Selon la hauteur de la colonne d'eau, entre 300 et 800 litres ont été échantillonnés et concentrés dans 50 mL. Pour chaque prélèvement, le concentrat a été transféré dans un tube Falcon puis conservé sur le bateau en enceinte isotherme à 4°C. Au laboratoire, un aliquot de 1 mL de concentrat a été placé dans une chambre de lecture à plancton (Hydrobios). La chambre a été complétée par de l'eau de mer filtrée jusqu'au volume de 10 mL puis l'échantillon a été fixé par une goutte de lugol. Les dénombrements et identifications des espèces toxiques dans l'eau ont ensuite été réalisés selon la méthode Utermöhl (Utermöhl, 1931) avec un microscope inversé "Zeiss Axio Observer".



### 3.2.3. Prélèvement de l'ensemble de la colonne d'eau au filet à plancton et dénombrement par PCR quantitative (qPCR)

Des prélèvements en triplicats ont été effectués à l'aide du filet selon la méthode décrite au paragraphe précédent. L'estimation quantitative du nombre de cellules des espèces toxiques cibles présentes dans l'eau a ensuite été réalisée par qPCR). Cette technique a été développée au laboratoire.

#### 3.2.3.1. Extraction et purification des acides nucléiques

Au laboratoire (pas plus de 4h après le prélèvement), 10 mL de concentrat ont été filtrés sur une membrane en polycarbonate de porosité 10 µm. Après la filtration, les filtres ont été déposés dans une solution contenant 500µL de tampon d'extraction (10mM Tris-Base, pH8, 100mM NaCl, 25mM EDTA dihydrate, 0.5% SDS, 0.1mg/mL protéinase K). Après 30 secondes d'agitation (vortex), les échantillons ont été incubés pendant 18h à 60°C. Les acides nucléiques ont ensuite été purifiés par la méthode au phénol/chloroforme selon la méthode décrite dans le Current protocols<sup>3</sup>. Les culots d'ADN, repris dans 100 µL d'eau ultrapure, ont été quantifiés puis conservés à 4°C avant les amplifications par qPCR. La concentration et la pureté des ADN ont été mesurées au spectrophotomètre NanoDrop®.

#### 3.2.3.2. Amplification PCR

La recherche de la présence d'ADN des espèces de phytoplancton toxique dans l'ADN environnemental a été réalisée par PCR quantitative sur un LightCycler® 480 (Roche) en utilisant des amorces spécifiques permettant d'amplifier des fragments cibles des gènes codant pour les ARN ribosomiques et l'ITS (Internal transcribed spacer) :

- En ce qui concerne *Dinophysis* spp., le fragment cible est un fragment partiel situé au niveau du gène codant pour l'ARNr de la grande sous-unité ribosomale LSU dans la région D1-D2. Cette portion du gène codant pour rDNA LSU a été amplifiée en utilisant l'amorce sens LSU 1F modifiée dans le cadre de ce projet (5'-GGATTGGTTGCTGCCACAAC-3') et l'amorce anti-sens DIN\_R (5'-CTTACGCACAAGCATAAC-3') (Kavanagh et al., 2010). En effet, l'amorce sens DIN\_F décrite par Kavanagh et al. (2010) n'a pas permis d'obtenir des amplifications spécifiques.
- En ce qui concerne les deux espèces d'*Alexandrium pacificum* et *Alexandrium tamarense*, le fragment cible est un fragment partiel situé au niveau du gène codant pour l'ARNr de la grande sous-unité ribosomale 18S – 28S rRNA ITS. Il a été amplifié, pour l'espèce toxique *A. pacificum* grâce aux amorces sens Acat (5'-TGATATTGTGGGCAACTGTAA-3') et anti-sens Acatam (5'-AACATCTGTTAGCTCACGGAA-3') (Genovesi et al., 2011) et pour l'espèce nontoxique *A. tamarense* grâce aux amorces sens Atam (5'-TGGTAATTCTTCATTGATTACAATG-3') et anti-sens Acatam (5'-AACATCTGTTAGCTCACGGAA-3') (Genovesi et al., 2011).

Chaque réaction d'amplification par PCR contenait 1 µL de matrice ADN, 1,2 µL de chaque amorce (3,33 µM) et 5 µL de mélange réactionnel (SYBR Green Master Mix 2x contenant les DNTPs et l'ADN polymérase) dans un volume total de 10 µL. Chaque cycle de qPCR était constitué de : 5 min à 95°C (dénaturation initiale) et 45 cycles de 10 s à 95°C (dénaturation) ; 10 s à 58°C pour *A. pacificum* et *A. tamarense* et 55°C pour *Dinophysis* (hybridation) ; et 10 s à 72 °C (élongation). Les courbes de fusion sont générées entre 95°C et 65°C. La quantification des microorganismes a été réalisée avec des courbes d'étalonnage en utilisant des ADN des souches de références *Dinophysis sacculus*, *Dinophysis acuminata*, *Alexandrium pacificum* ACT03 et *Alexandrium tamarense* ATT07 Pour produire des courbes standards, la valeur logarithmique de la concentration en ADN a été comparée à la valeur du point de croisement (Cp) donnée par l'appareil LightCycler 480. Le nombre théorique de cellules présentes par

<sup>3</sup> <https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471142905.hga03cs00>

litre d'eau de mer a été calculé à partir de la relation qui existe entre la quantité d'ADN amplifié (Ct) et le nombre de cellules de références extraites correspondantes (équivalent Cellules).

### 3.3. Suivi des toxines dans l'eau et dans les coquillages

#### 3.3.1. Profil toxinique du phytoplancton

Les analyses toxiques des prélèvements phytoplanctoniques ont été effectuées uniquement sur les échantillons contenant des cellules d'espèces phytoplanctoniques toxiques connues. Les analyses ont été effectuées sur des culots cellulaires issus d'échantillons d'eau prélevés au filet à plancton (protocole filet à plancton, §.3.2.2). Les toxines ont été extraites à partir de ces culots cellulaires avec les solvants appropriés selon le type de toxines recherchées (lipophiles/diarrhéiques ou hydrophiles/paralysantes).

#### 3.3.2. Profil toxinique des coquillages

La contamination potentielle des huîtres creuses et des moules par les phycotoxines a été recherchée sur l'ensemble des points de suivi pour les toxines lipophiles réglementées (dont les toxines diarrhéiques) et non réglementées (dont les pinnatoxines). A la demande des services de l'Etat, dans le cas où une efflorescence du genre *Alexandrium* caractérisée par des abondances supérieures à 1000 Cellules/L dans l'eau dans les parcs était observée, une mesure de la teneur en PST était également prévue par la méthode du bioessai sur souris sur 5 points en plus des points REPHYTOX (méthode LNRBM-PSP 01 version en vigueur au moment de l'étude).

#### 3.3.3. Toxines dissoutes dans l'eau

Pour évaluer la présence de toxines dissoutes dans l'eau, des cages (ExposMeter, Figure 6) contenant trois SPATTs (dispositifs expérimentaux) ont été déployées sur une radiale de six points (Figure 4). Ces dispositifs permettent la détection des toxines lipophiles réglementées (acide okadaïque (AO), dinophysistoxines (DTXs), pectenotoxines (PTXs réglementées lors de l'étude), azaspiracides (AZAs) et yessotoxines (YTXs) et des toxines non réglementées gymnodimines (GYMs), spirolides (SPXs) et pinnatoxines (PnTXs). Pendant une année de suivi, ces dispositifs étaient immergés pendant une durée de 15 jours et remplacés par des dispositifs neufs pour une nouvelle période de 15 jours d'immersion.



Figure 6. Dispositif SPATT. A gauche : cage ExposMeter ; à droite : triplicat de SPATTs dans un ExpoMeter

## 4. Résultats

### 4.1. Déroulé des campagnes d'échantillonnage dans la lagune de Thau

Le projet a débuté en octobre 2019. Au total, 27 campagnes d'échantillonnage des 14 points de suivi ont été réalisées du 3 octobre 2019 au 10 décembre 2020, au cours desquelles plus de 400 échantillons ont été prélevés. Des prélèvements d'eau à la bouteille Hydrobios et au filet ainsi que la collecte de coquillages et de capteurs de toxines passif (SPATTs) ont été réalisés. Les premiers prélèvements ont été réalisés du 3 octobre 2019 au 13 novembre 2019 (pendant 5 semaines consécutives). Puis en raison de l'absence de prolifération significative d'espèces toxiques, les échantillonnages ont été réalisés à une fréquence bimensuelle jusqu'au 15 mars 2020, conformément au protocole REPHY défini en l'absence de bloom d'espèces toxiques. Ce suivi a été interrompu du 16 mars au 25 juin 2020 en raison des conditions sanitaires liées à la pandémie de Covid-19 qui ne permettaient ni l'organisation de campagnes « terrain », ni un accès au Laboratoire (excepté pour la surveillance réglementaire). Le suivi bimensuel a repris le 26 juin jusqu'au 10 septembre 2020. A partir du 17 septembre 2020, début des périodes de prolifération de la microalgue du genre *Alexandrium*, un suivi hebdomadaire a été réalisé jusqu'au 10 décembre 2020 (Figure 7).

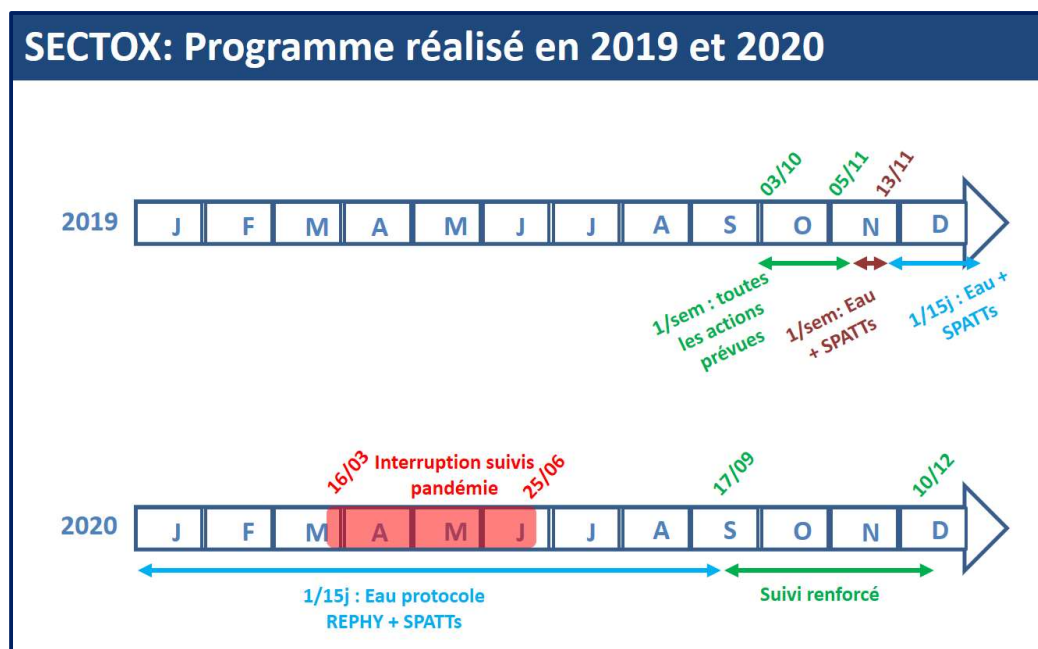


Figure 7. Programme de prélèvements du projet SECTOX en 2019 et 2020.

### 4.2. Paramètres physicochimiques

La température, la salinité et la profondeur de la colonne d'eau ont été mesurées sur les 14 sites d'échantillonnage lors des campagnes d'échantillonnage 2019 et 2020. Les résultats obtenus montrent une variation saisonnière de la température et de la salinité homogène sur l'ensemble de l'étang de Thau (Figure 8). Les températures de l'eau ont fluctué entre 8°C et 28 °C et les salinités entre 36 et 42 PSU. La profondeur de la colonne d'eau est variable en fonction des sites conchylicoles (Figure 8) : le secteur de Bouzigues (environ 8 m) est deux fois plus profond que le secteur de Marseillan (environ 4 m). La zone échantillonnée la moins profonde est située dans la Crique de l'Angle.

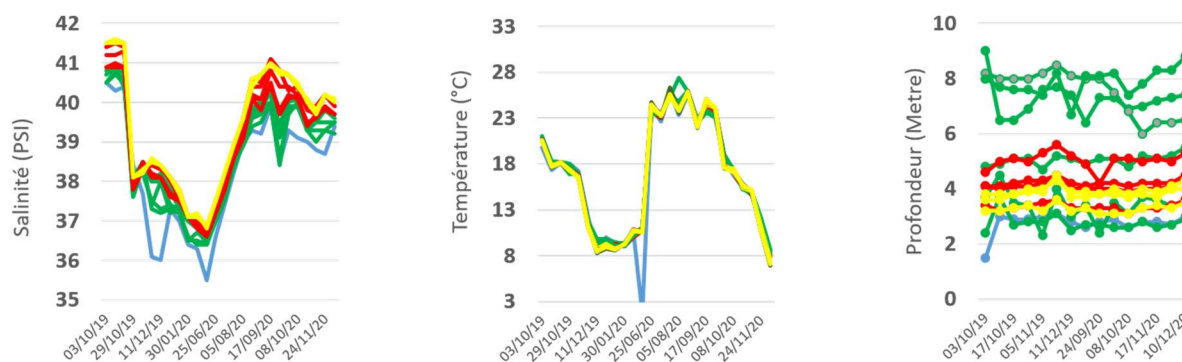


Figure 8. Variations spatiales et temporelles des valeurs de température, de salinité et de profondeur de la colonne d'eau. Crique de l'angle (bleu) ; Zone conchylicole de Bouzigues (vert) ; Zone conchylicole de Mèze (rouge), Zone conchylicole de Marseillan (jaune).

### 4.3. Genres *Dinophysis* et *Alexandrium* dans la colonne d'eau

#### 4.3.1 Méthode REPHY

En 2019, peu de cellules de *Dinophysis* ont été détecté dans la lagune de Thau, y compris dans la Crique de l'Angle avec un maximum observé de 400 Cell/L le 05/11/2019 (Figure 9A). A contrario, à partir du mois d'août 2020, une prolifération de *Dinophysis* a été observée dans la lagune. Cette prolifération a été continue jusqu'à la fin de l'année 2020 (Figure 9A). Si les résultats montrent que la Crique de l'Angle semble jouer un rôle important dans l'initiation des proliférations de *Dinophysis*, la présence de ce genre est rapidement enregistrée sur l'ensemble des secteurs conchylicoles. Ainsi, les résultats des campagnes du mois de novembre 2020 montrent que tous les secteurs conchylicoles sont impactés avec des concentrations importantes en cellules y compris dans le secteur de Marseillan. **L'absence de gradient de concentration d'est en ouest laisse penser que la prolifération de *Dinophysis* est généralisée à l'ensemble de la lagune.** De plus, nos résultats montrent qu'aucun secteur de l'étang n'est à l'abri de ces proliférations.

Comme pour le genre *Dinophysis*, peu de cellules du genre *Alexandrium* ont été détectées dans la lagune de Thau en 2019, y compris dans la Crique de l'Angle (Figure 9B). En 2020, un départ de bloom d'*Alexandrium* a été observé le 17 septembre dans la Crique de l'Angle (maximum 63 000 Cell/L). Au même moment, ce dinoflagellé est observé aussi dans les trois secteurs conchylicoles à des concentrations beaucoup plus faibles (Figure 9B). Cette prolifération a très vite décliné dès la semaine suivante (4 100 Cell/L) sans se propager de façon notable, à l'ensemble des parcs conchylicoles. Bien que les conditions de terminaison de l'efflorescence soient multifactorielles, la forte agitation du milieu (vent) et la baisse sensible des températures (Figure 8) ont probablement participé à son déclin.

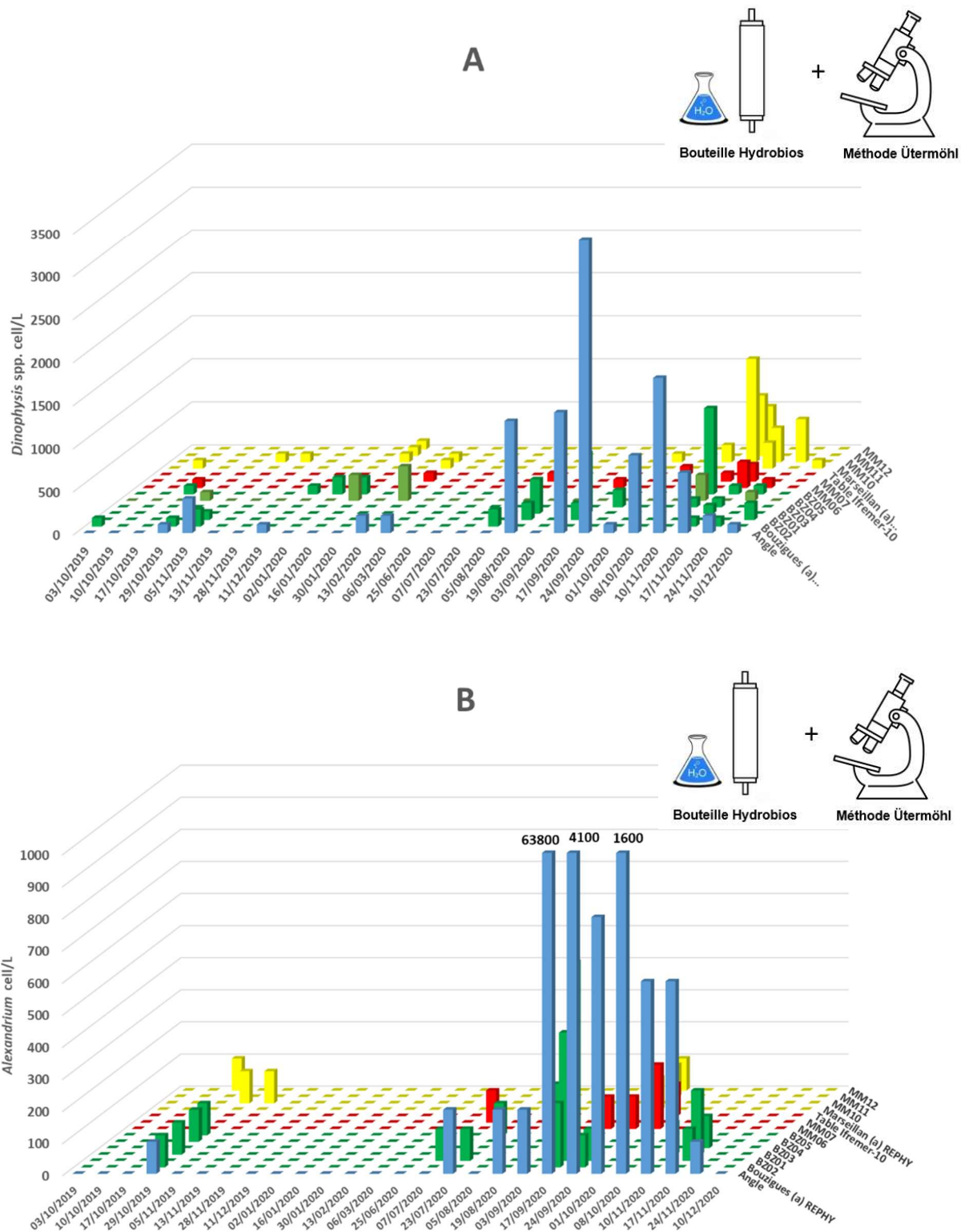


Figure 9. Variations spatiales et temporelles des concentrations en cellules de *Dinophysis* (A) et d'*Alexandrium* (B) dans la colonne d'eau mesurées selon le protocole REPHY (bouteille Hydrobios + méthode Utermöhl). Crique de l'angle (bleu) ; Secteur conchylicole de Bouzigues (vert); Secteur conchylicole de Mèze (rouge), Secteur conchylicole de Marseillan (jaune). L'absence de cellules sur les graphiques correspond à une concentration inférieure à la limite de détection qui est de 100 cell/L.

## 4.3.2 Comparaison des méthodes de prélèvement et d'analyse du phytoplancton toxique

### 4.3.2.1. Prélèvement : bouteille Hydrobios *versus* filet à plancton

Nous avons comparé deux méthodes de prélèvement d'eau pour l'analyse du phytoplancton toxique par la méthode microscopique Utermöhl. La première est la méthode de référence utilisée par le REPHY. Elle consiste à prélever directement de l'eau en surface (-1 m) avec une bouteille Hydrobios puis à dénombrer les espèces d'intérêt présentes dans un aliquot de 10 mL d'eau. La seconde méthode consiste à dénombrer les cellules d'intérêt présentes dans le concentrat de 50 mL correspondant à 300 à 800 litres d'eau de mer filtrées lors de l'échantillonnage réalisé avec le filet à plancton (porosité 20 µm) (cf. §.3.2.2).

Les résultats obtenus en 2020 montrent que **la méthode de prélèvement d'eau de référence, en surface et utilisant la bouteille Hydrobios, pour *Dinophysis* comme pour *Alexandrium* affiche des concentrations plus importantes comparativement à la méthode de prélèvement au filet à plancton** (Figure 10A vs B).

Deux principales raisons pourraient expliquer ces résultats :

- Un important effet de dilution du prélèvement au filet à plancton dû à la répartition non homogène des microalgues d'intérêt dans la colonne d'eau,
- L'ensemble des organismes présents dans la colonne d'eau sont concentrés dans « une pâte » difficile à homogénéiser, à échantillonner et donc à dénombrer. Il est probable que l'échantillon analysé soit peu représentatif du prélèvement.

### 4.3.2.2. Analyse des échantillons : méthode d'analyse microscopique (Utermöhl) *versus* méthode d'analyse moléculaire (qPCR)

Avant de réaliser les amplifications par qPCR sur les échantillons environnementaux, la spécificité des amorces pour la détection des espèces d'*Alexandrium pacificum*, *Alexandrium tamarense*, et de *Dinophysis* spp. décrites dans la littérature (cf 3.2.3.2) ont été testées sur de l'ADN des espèces cibles. Seules les amorces pour *A. pacificum* et *A. tamarense* ont montré une amplification spécifique comme attendu. L'association des amorces (DIN\_F et DIN\_R) n'a pas permis d'amplifier le fragment du gène de la grande sous unité LSU (ADNr) de *Dinophysis* spécifiquement, ni chez *Dinophysis acuminata*, ni *Dinophysis sacculus*. Nous avons donc dessiné une nouvelle amorce sens spécifique LSU 1F qui a été utilisée sur les échantillons environnementaux.

### Prélèvement au filet à plancton

**Les résultats obtenus par analyse moléculaire (qPCR) (Figure 10C) sont plus sensibles que ceux obtenus par la méthode microscopique (Utermöhl) (Figure 10B) pour les espèces *Dinophysis* spp. et *Alexandrium pacificum* sur le concentrat obtenu avec le prélèvement au filet à plancton.**

Dans le cas des *Dinophysis*, pour tous les échantillons **prélevés au filet** à plancton entre septembre et décembre 2020 et analysés par les méthodes Utermöhl et qPCR, les concentrations de *Dinophysis* les plus élevées sont obtenues par qPCR (Figure 10B vs 10C en haut). En outre, si les deux méthodes sont capables de détecter la prolifération du 10 novembre 2020, seule la méthode qPCR permet d'observer la persistance de la prolifération de *Dinophysis* entre le 10 novembre et le 10 décembre 2020 au point « Crique de l'Angle » et l'expansion de la prolifération au secteur de Bouzigues le 10 décembre (Figure 10B vs 10C en haut).

Il en est de même dans le cas du genre *Alexandrium*. Parmi les deux espèces de ce genre recherchées par qPCR, *Alexandrium tamarense* a été détecté dans certains échantillons à des concentrations non quantifiables (résultats non présentés). Seule la présence d'*Alexandrium pacificum* a été quantifiée. Pour tous les échantillons prélevés au filet à plancton entre septembre et décembre 2020 et analysés par les méthodes microscopique Utermöhl et moléculaire qPCR, les concentrations des cellules *A. pacificum* les plus élevées sont obtenues par qPCR (Figure 10B vs 10C en bas). Seule la méthode qPCR permet de détecter les proliférations du 17 novembre dans la Crique de l'Angle puis sa propagation vers l'ensemble des secteurs conchylicoles le 10 décembre 2020 (Figure 10B vs 10C en bas).

**La méthode de détection moléculaire par qPCR a permis de mettre en évidence dans la lagune de Thau la présence de *Dinophysis spp.* et spécifiquement *Alexandrium pacificum* espèce productrice de toxines paralysantes (PST).**

#### Prélèvement à la bouteille Hydrobios

**La stratégie déployée dans ce projet ne permet pas de comparer les résultats obtenus par les méthodes d'analyse microscopique (Utermöhl) et d'analyse moléculaire (qPCR) sur les échantillons d'eau prélevés à la bouteille Hydrobios.**

Toutefois, il est intéressant de noter que seul le protocole REPHY, qui couple un prélèvement à la bouteille Hydrobios et une analyse avec la méthode Utermöhl détecte une présence de *Dinophysis* en septembre principalement dans la Crique de l'Angle (17 et 24 septembre 2020). Les résultats obtenus par la méthode qPCR sur le prélèvement filet ne détectent pas cette prolifération. Il est probable que ces différences soient liées aux limites du prélèvement au filet décrites au §.4.3.2.1. En ce qui concerne le genre *Alexandrium*, les résultats des analyses qPCR réalisées à partir des prélèvements au filet à plancton sont également comparables aux résultats obtenus avec le protocole REPHY sauf pour la période du 17 septembre au 1<sup>er</sup> octobre 2020 (Figure 10A vs 10C en bas) où une efflorescence d'*Alexandrium pacificum* a été détectée plus précocement par le protocole REPHY. En outre, les proliférations d'*Alexandrium pacificum* observées par qPCR dans les échantillons prélevés au filet le 10 décembre dans 8 points de suivi répartis dans l'ensemble de secteurs conchylicoles ne sont pas détectées par la méthode REPHY. Ces différences pourraient être liées à l'intégration de la colonne par le prélèvement au filet.

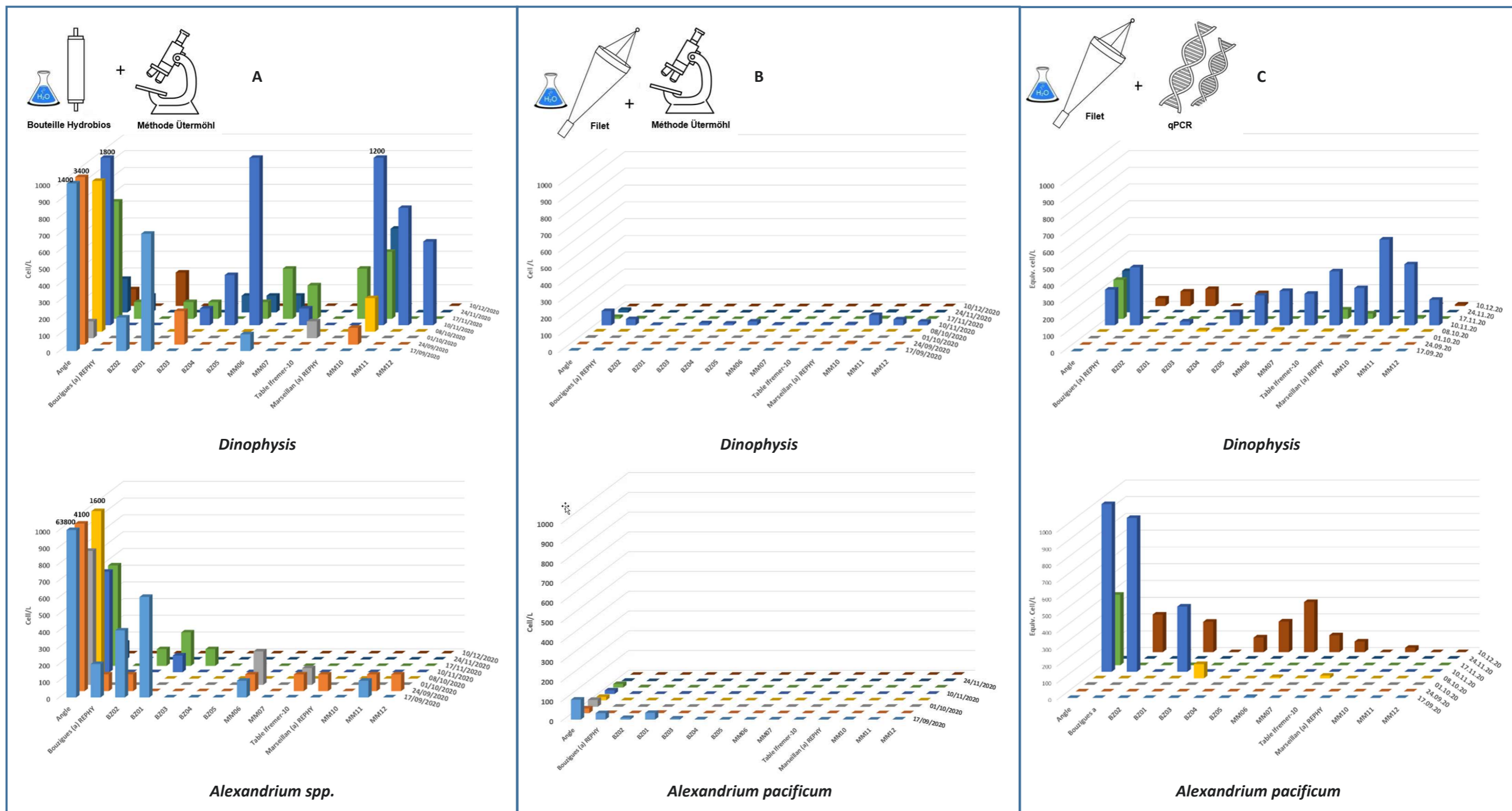


Figure 10. Variations spatiales et temporelles des concentrations en cellules de *Dinophysis* et d'*Alexandrium* dans l'eau en 2020. (A) protocole REPHY : bouteille hydrobios + méthode Utermöhl ; (B) protocole filet + méthode Utermöhl ; (C) protocole filet + qPCR



#### 4.4. Toxines dissoutes dans la colonne d'eau

L'utilisation d'échantillonneurs passifs (SPATTs : Solid Phase Adsorption Toxin Tracking) a permis de mesurer les teneurs en toxines dissoutes dans la colonne d'eau adsorbées sur la résine des SPATTs.

##### 4.4.1. Toxines lipophiles réglementées : acide okadaïque (AO), dinophysistoxines et pectenotoxine-2 (PTX-2)

Sur toute la durée de l'étude, les phycotoxines suivantes ont été détectées, sur l'ensemble des points échantillonnés de la lagune : acide okadaïque (AO), dinophysistoxines (DTXs) et pectenotoxine-2 (PTX-2). L'interruption du suivi au printemps 2020 lié au confinement n'a cependant pas permis de confirmer la présence de ces toxines dans l'eau sur l'ensemble de l'année. L'année 2020 a été marquée par de plus fortes concentrations en toxines sur les mois de février, mars et juin et en fin d'année en novembre et décembre (Figures 11 et 12). Les valeurs des concentrations en AO/DTXs ont été, en général, plus élevées que celles en PTX-2. L'existence d'une corrélation positive significative entre les teneurs en AO/DTXs et celles de PTX-2 dans l'eau ( $r^2=0,801$ ,  $p<0,001$ ) serait en accord avec la présence de cellules du genre *Dinophysis* produisant ces deux toxines.

##### 4.4.2. Autres toxines réglementées (yessotoxines et azaspiracides)

Des concentrations très faibles (traces) de yessotoxines et d'azaspiracides ont été détectées de façon épisodique dans l'eau de Thau, ce qui confirme que le risque lié à ces toxines demeure très faible.

##### 4.4.3. Toxines lipophiles non réglementées

Les toxines non réglementées gymnodimines (GYMs), spirolides (SPXs) et pinnatoxines (PnTXs) ont été recherchées dans les SPATTs. Parmi ces toxines, seule la pinnatoxine-G a présenté des concentrations substantielles.

La pinnatoxine-G (PnTX-G) est une neurotoxine actuellement non réglementée mais qui fait l'objet d'une recommandation de l'ANSES qui fixe un seuil sanitaire de 23  $\mu\text{g}/\text{kg}$  dans la chair de coquillages (avis de l'ANSES « Risques liés aux pinnatoxines dans les coquillages », mars 2019).

La PnTX-G a été détectée sur l'ensemble de la lagune de Thau, pendant toute la durée de l'étude, y compris en période hivernale (maximum de 5,4  $\mu\text{g}$  PnTX-G/g résine de SPATT le 29/10/2019) (Figure 13). Les valeurs mesurées en automne-hiver 2019 sont plus élevées que celles mesurées durant la même période en 2020. Les concentrations en PnTx-G sont généralement plus faibles que celles enregistrées pour les toxines AO/DTXs et PTX-2.

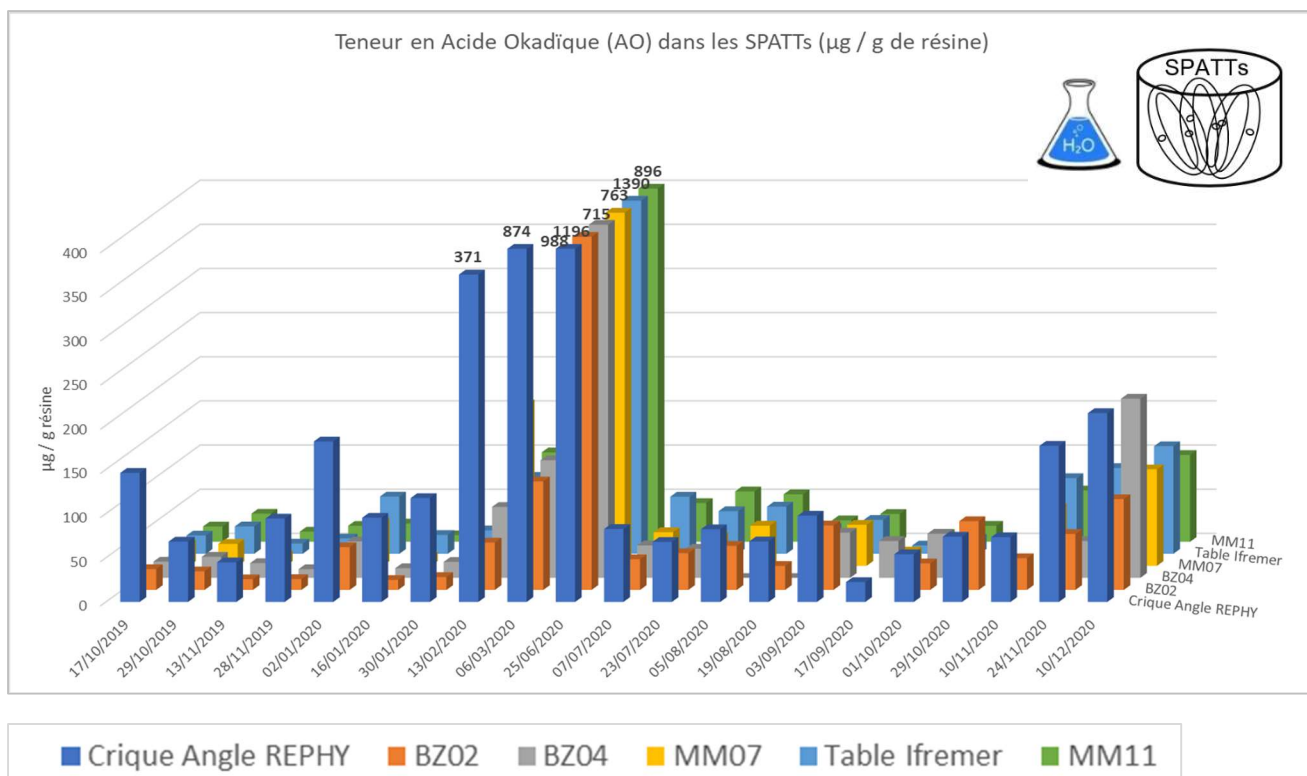


Figure 11. Variations spatiales et temporelles des teneurs en acide okadaïque (AO) dans l'eau. Crique de l'angle ; Zone conchylicole de Bouzigues (BZ02 et BZ04); Zone conchylicole de Mèze (MM07 et Table Ifremer), Zone conchylicole de Marseillan (MM11).

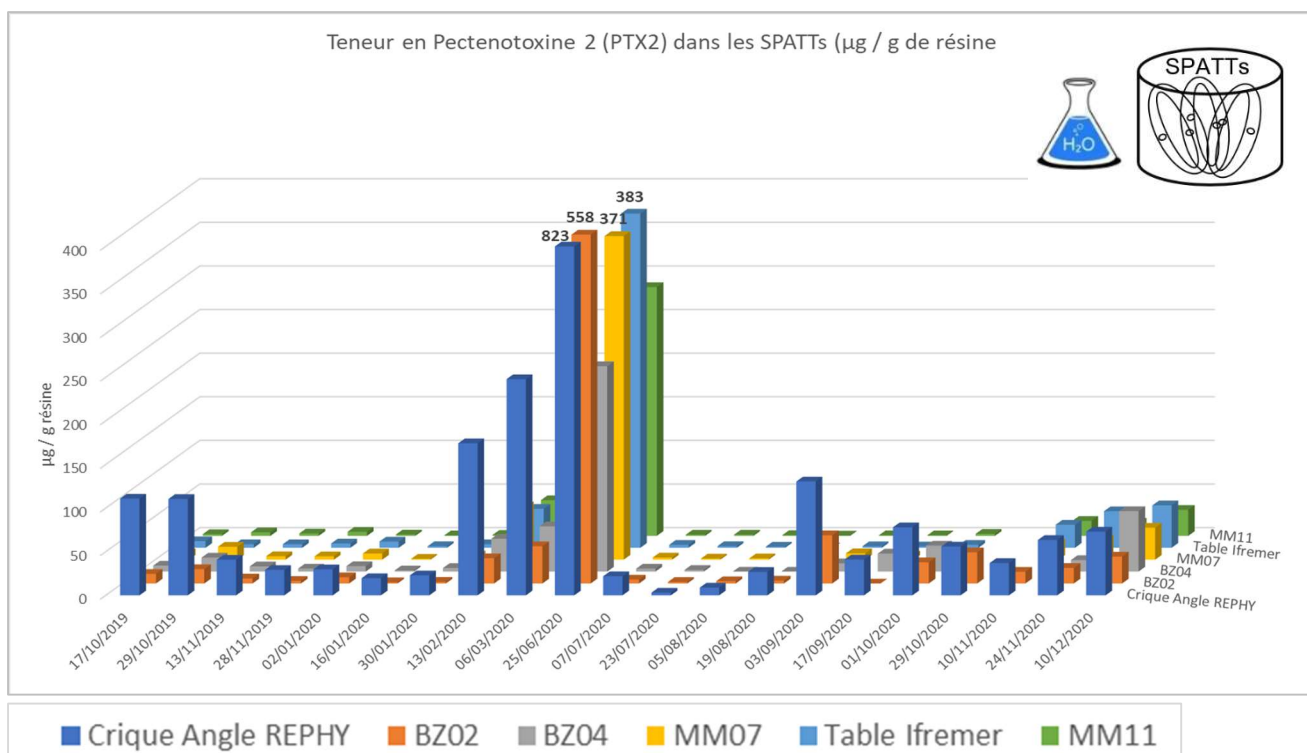


Figure 12. Variations spatiales et temporelles des teneurs en pectenotoxine-2 (PTX-2) dans l'eau. Crique de l'angle ; Zone conchylicole de Bouzigues (BZ02 et BZ04); Zone conchylicole de Mèze (MM07 et Table Ifremer), Zone conchylicole de Marseillan (MM11).

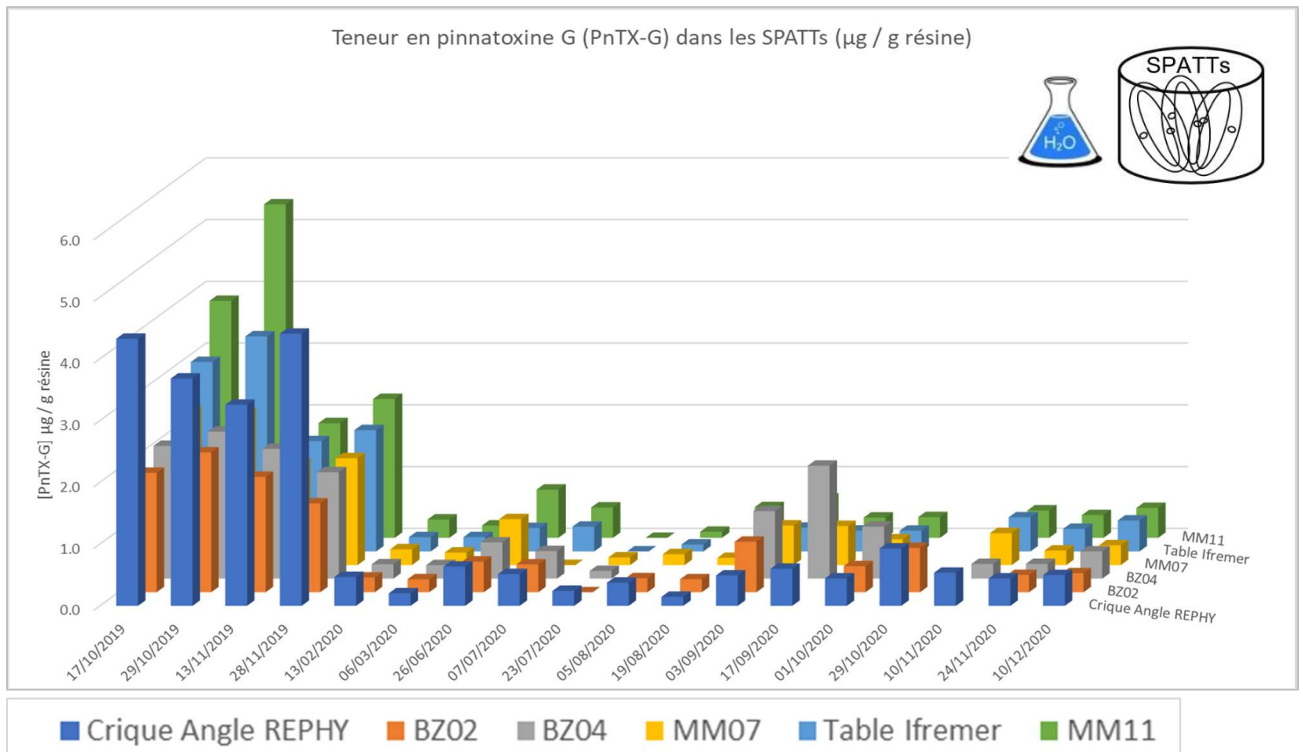


Figure 13. Variations spatiales et temporelles des concentrations en pinnatoxine-G (PnTX-G) dans l'eau de Thau. Crique de l'angle (bleu) ; zone conchylicole de Bouzigues (BZ02 et BZ04); zone conchylicole de Mèze (MM07 et Table Ifremer), zone conchylicole de Marseillan (MM11).

## 4.5. Toxines dans les coquillages

Une analyse systématique de la contamination des coquillages par des phycotoxines a été réalisée du 3 octobre 2019 au 13 novembre 2019. A partir du 17 septembre 2020 (début des périodes de bloom d'*Alexandrium*), un suivi hebdomadaire a été réalisé jusqu'au 10 décembre 2020.

### 4.5.1. Toxines lipophiles (DST)

#### 4.5.1.2. Toxines du groupe acide okadaïque et pectenotoxine-2

Quelle que soit l'espèce de coquillages (huître ou moule), les résultats obtenus montrent une forte variabilité interannuelle de la concentration des bivalves en toxines du groupe acide okadaïque et en pectenotoxine-2 (Figure 14). Les niveaux de contamination en automne – hiver 2020 sont plus élevés chez les bivalves que ceux détectés pour la même période en 2019.

Pour les moules, 10 prélèvements ont dépassé le seuil réglementaire (de 160 µg/kg de chair d'AO + DTXs + PTXs au moment de l'étude<sup>4</sup>) entre le 10 et le 24 novembre 2020 (3 dates de prélèvement : 10, 17 et 24/11/2020 et 7 points de prélèvements : BZ04, BZ05, MM06, Marseillan (a), MM10, MM11 et MM12). Les contaminations les plus fortes ont été observées le 10 novembre 2020 avec six dépassements sur les 7 points et une valeur maximale de 301 µg/kg de chair dans la zone conchylicole de Marseillan (point MM11). Pour les huîtres creuses, le seuil réglementaire n'a jamais été atteint. Comme régulièrement observée depuis des années, la contamination des huîtres creuses est sensiblement plus faible que celle des moules (Figure 14). Ces observations confirment le rôle sentinelle de la moule pour ces toxines. La concentration maximale détectée dans les huîtres était de 134 µg/kg de chair le 10/11/2020 dans la zone conchylicole de Bouzigues (point BZ05). Ces résultats ont montré que la totalité des élevages dans la lagune de Thau est impactée par ces contaminations et que les deux secteurs (selon le classement sanitaire actuel) ont été concernés concomitamment par des dépassements de seuil réglementaire dans les moules.

Ces résultats SECTOX complètent avec ceux acquis dans le cadre du REPHYTOX. Aucun épisode toxique, caractérisé par des dépassements du seuil réglementaire, n'a été observé en 2020 dans les coquillages de la lagune de Thau par le REPHYTOX (Ifremer, 2020). L'année 2020 est cependant marquée par un nombre important et inédit, au moment de l'étude, de 10 dépassements du ½ seuil réglementaire dans les moules, prélevées entre le 20 avril et le 2 juin 2020, pendant les proliférations printanières de *Dinophysis*, aux points « Bouzigues (a) » (n=5, maximum de 132,9 µg éq. AO / kg de chair le 20 avril) et « Marseillan (a) » (n=5, maximum de 143,9 µg éq. AO / kg de chair le 2 juin). Simultanément, les concentrations en toxines lipophiles AO+DTXs+PTXs dans les huîtres ont été faibles. Aucun dépassement du ½ seuil réglementaire n'a donc été observé dans les huîtres dans le cadre du REPHYTOX pendant l'épisode de contamination automnal suivi par SECTOX.

#### 4.5.1.3. Azaspiracides et yessotoxines

Les résultats des analyses en azaspiracides et en yessotoxines ont montré que le risque lié à ces toxines est très faible. Les azaspiracides n'ont été détectées que dans deux échantillons de moules prélevés le 10 octobre 2019 pour des valeurs de 5,6 µg / kg au point BZ02 et de 4,6 µg / kg au point MM06. Les yessotoxines ont été détectées plus régulièrement tout au long de l'étude dans la totalité des points échantillonnés de la lagune. Les valeurs ont varié entre <LD et 10.6 µg/kg dans les moules au point « table Ifremer » le 05/11/2019.

<sup>4</sup> Depuis, les pectenotoxines ne sont plus des toxines réglementées. Cf RÈGLEMENT DÉLÉGUÉ (UE) 2021/1374 DE LA COMMISSION du 12 avril 2021.

#### 4.5.2. Toxines lipophiles non réglementées

Dans les coquillages, la présence de portimine-A a pu être mise en évidence à de faibles concentrations. Comme pour les SPATTs, la pinnatoxine-G est la seule toxine lipophile non réglementée qui est présente dans les coquillages en concentrations importantes. Les résultats obtenus montrent, comme pour les toxines lipophiles réglementées, une forte variabilité interannuelle de la contamination des bivalves par la pinnatoxine-G (PnTX-G). Les concentrations sont plus élevées dans les moules en 2019 par rapport à 2020 (Figure 15).

Entre le 03/10/2019 et le 05/11/2019, 100% des concentrations mesurées dans les moules ont dépassé la valeur guide recommandée par l'ANSES (23  $\mu\text{g}$  / kg de chair totale) pour une teneur maximale de 84  $\mu\text{g}$  / kg le 03/10. Pour la même période, les concentrations en PnTXG dans les huîtres sont restées très faibles et aucune n'a atteint la valeur guide. En 2020, environ 24% des concentration mesurées dans les moules ont dépassé la valeur guide avec un maximum de 48  $\mu\text{g}/\text{kg}$  le 17/09. Pour les huîtres creuses, les valeurs enregistrés ont été faibles et la PnTX-G n'a plus été détectée en novembre et décembre 2020.

#### 4.5.3. Toxines hydrophiles (PST)

En raison de l'absence de prolifération significative du genre *Alexandrium* au cours du projet SECTOX (Figure 9B), les mesures de la teneur en toxines paralysantes (PST) par bio-essai sur souris n'ont pas été déclenchées par la DDPP34. Cependant, nous avons tout de même procédé à l'analyse de ces toxines PST par l'analyse chimique en LC-MS/MS sur les coquillages collectés sur les points situés à proximité de la Crique de l'Angle où les concentrations cellulaires du genre *Alexandrium* observées étaient relativement importantes entre le 17/09/2020 et le 01/10/2020 (Figure 9B).

Les résultats obtenus ont montré une faible contamination des coquillages par les PST (Tableau 2). Seules des traces de toxines ont été détectées par LC-MS/MS pendant cette période dans les moules comme dans les huîtres creuses avec une valeur maximale de 3,7  $\mu\text{g}$  de GTX6 / kg de chair de moule mesurée le 24/09/2020 dans la zone conchylicole de Bouzigues (point BZ01).

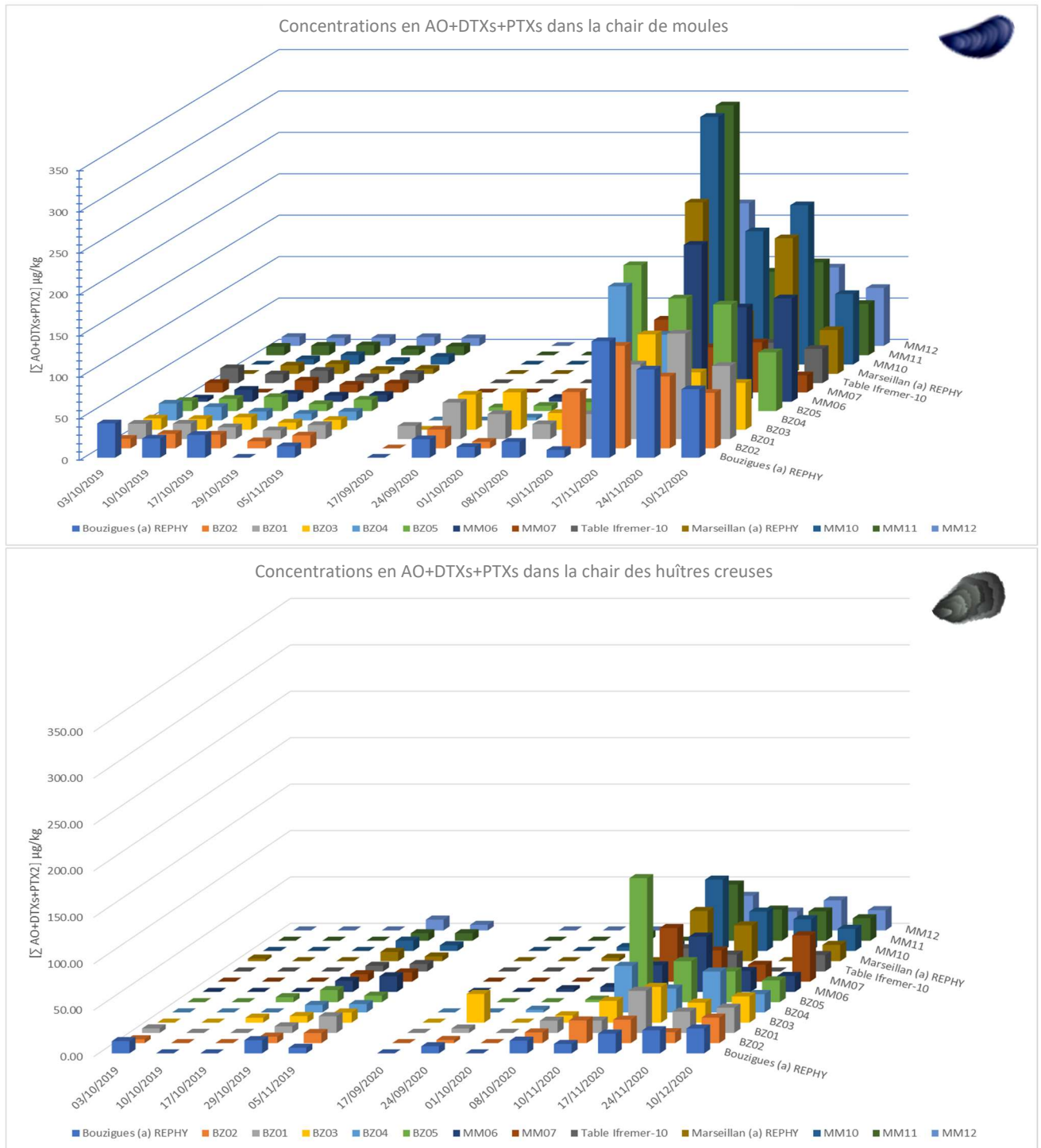


Figure 14. Variations spatiales et temporelles des concentrations en toxines AO+DTXs+PTXs dans les chairs de bivalves exploités, moules (en haut) et huîtres (en bas).

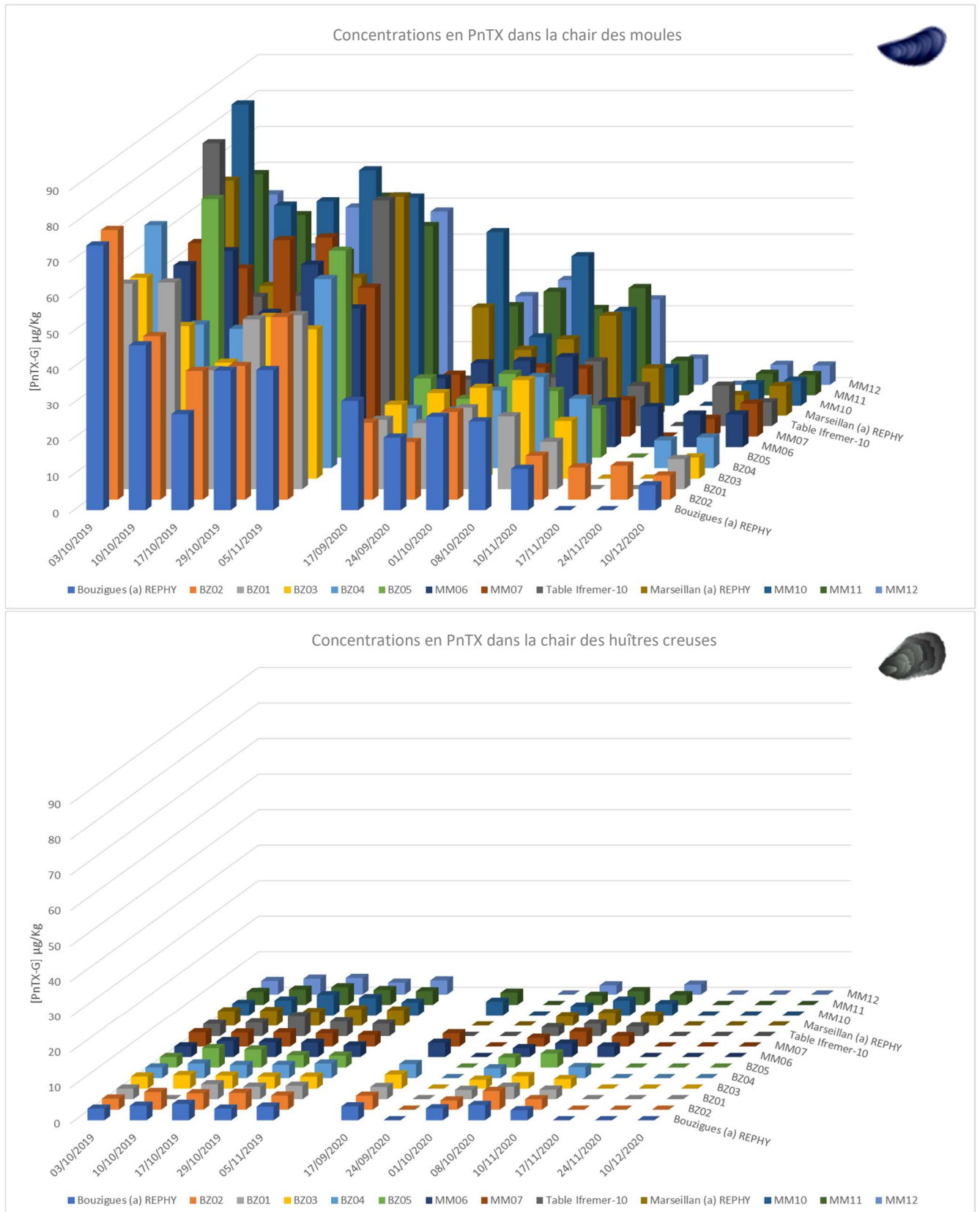


Figure 15. Variations spatiales et temporelles des concentrations en pinnatoxine-G (PnTX-G) dans les chairs de bivalves exploités, moules (en haut) et huîtres (en bas).

Tableau 2. Concentration en toxines hydrophiles paralysantes (PST) en µg/kg dans la chair de coquillages (moules et huîtres creuses) prélevés du 17/09/2020 au 01/10/2020 (LD : Limite de Détection, LQ : Limite de Quantification)

Matrice	Date	Points prelevement	C1	C2	C3	C4	GTX1	GTX4	GTX2	GTX3	dc-GTX2	dc-GTX3	GTX5	GTX6	Néo STX	dc-STX	STX	dc-Neo
Moules	17/09/2020	Bouzigues a	<LQ	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LQ	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Moules	17/09/2020	BZ02	<LQ	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LQ	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Moules	17/09/2020	BZ01	<LQ	<LD	<LD	<LD	<LQ	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LQ	<LQ	<LD	<LD	<LD	<LD
Moules	24/09/2020	Bouzigues a	<LQ	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Moules	24/09/2020	BZ02	<LQ	<LD	<LD	<LD	<LQ	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LQ	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Moules	24/09/2020	BZ01	<LQ	<LQ	<LD	<LD	<LQ	<LQ	<LQ	<LD	<LD	<LD	<LQ	3.72	<LD	<LQ	<LD	<LD
Moules	01/10/2020	Bouzigues a	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Moules	01/10/2020	BZ02	<LQ	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Moules	01/10/2020	BZ01	<LQ	<LD	<LD	<LD	<LQ	<LD	<LQ	<LD	<LD	<LD	<LQ	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Huitres creuses	17/09/2020	Bouzigues a	<LQ	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LQ	<LD	<LD	<LD	<LQ	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Huitres creuses	17/09/2020	BZ02	<LQ	<LQ	<LD	<LD	<LD	<LD	<LQ	<LD	<LD	<LD	<LQ	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Huitres creuses	17/09/2020	BZ01	<LQ	<LQ	<LD	<LD	<LD	<LD	<LQ	<LD	<LD	<LD	<LQ	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Huitres creuses	24/09/2020	Bouzigues a	<LQ	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LQ	<LD	<LD	<LD	<LQ	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Huitres creuses	24/09/2020	BZ02	<LQ	<LQ	<LD	<LD	<LD	<LD	<LQ	<LD	<LD	<LD	<LQ	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Huitres creuses	24/09/2020	BZ01	<LQ	<LQ	<LD	<LD	<LQ	<LD	<LQ	<LQ	<LD	<LD	<LQ	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Huitres creuses	01/10/2020	Bouzigues a	<LQ	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Huitres creuses	01/10/2020	BZ02	<LQ	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Huitres creuses	01/10/2020	BZ01	<LQ	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LQ	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD



## 5. Conclusion générale de l'étude

**L'objectif principal de cette étude était de mesurer la dynamique spatiale et temporelle des contaminations par les toxines lipophiles (diarrhéiques) et hydrophiles (paralysantes) dans toutes les zones d'exploitation conchylicole de l'étang de Thau.**

### Cas des toxines lipophiles réglementées

Nous avons mis en évidence des contaminations de tous les coquillages des zones conchylicoles de la lagune lors des proliférations de *Dinophysis*. Une augmentation croissante des toxines dissoutes dans l'eau a été observée pendant la période du 17 septembre 2020 au 10 décembre 2020, au cours de laquelle le seuil réglementaire a été dépassé à 10 reprises dans les moules. Pendant cet épisode, tous les secteurs conchylicoles ont été impactés avec des concentrations cellulaires importantes de *Dinophysis*. L'absence de gradient de concentration d'est en ouest semblerait indiquer que la prolifération de *Dinophysis* était généralisée à l'ensemble de la lagune. Par ailleurs, l'utilisation des échantillonneurs passifs (SPATTs) a montré également que l'ensemble des secteurs conchylicoles de la lagune de Thau a été impacté par des contaminations en toxines AO, DTXs et PTX2 (toxine encore réglementée lors de cette étude). La présence des toxines lipophiles dissoutes dans l'eau et dans les coquillages n'a pas toujours été reliée à la détection de cellules de *Dinophysis* dans l'eau. La contamination des coquillages en toxines lipophiles est significativement moins importante pour les huîtres creuses que pour les moules (test de Fisher,  $p < 0.0001$ ).

### Cas des toxines paralysantes (PST)

L'absence de prolifération massive d'*Alexandrium pacificum* pendant les deux années du projet s'est quant à elle traduite directement par l'absence de contamination des coquillages par les toxines paralysantes. Cette absence de prolifération rend donc impossible toute conclusion concernant la dynamique spatio-temporelle du développement et de la dissémination d'*Alexandrium pacificum* dans la lagune et donc de la contamination par les PST.

### Cas des toxines lipophiles non réglementées

Parmi les toxines lipophiles suivies non réglementées, seule la pinnatoxine-G a été détectée à des concentrations substantielles mais faibles comparativement à celles des toxines réglementées. Les teneurs mesurées dans les moules ont dépassé la valeur guide recommandée par l'ANSES à plusieurs reprises. Contrairement aux moules, les huîtres creuses ont été très faiblement impactées par cette contamination ce qui confirme le choix de la moule en tant qu'espèce sentinelle. Comme pour les toxines réglementées, la contamination est significativement moins importante pour les huîtres creuses que pour les moules (test de Fisher,  $p < 0.0001$ ).

**Le deuxième objectif de cette étude était de tester de nouveaux outils d'observation pour permettre une amélioration de la surveillance et de l'appréciation du risque toxinique par les gestionnaires.**

### Identification spécifique d'espèces toxiques dans la colonne d'eau

Si les avantages et les inconvénients de la méthode de référence REPHY sont bien connus, la mise en œuvre de nouveaux protocoles de prélèvements et d'analyses a permis de mieux appréhender ses avantages et ses limites. Nous avons testé le prélèvement au filet à plancton vertical afin de réaliser un prélèvement intégré de la colonne d'eau et d'estimer la concentration totale des espèces toxiques dans toute la colonne d'eau. Cette méthode a été comparée à la méthode de prélèvement en sous-surface à la bouteille Hydrobios (protocole REPHY). L'échantillonnage avec le filet à plancton vertical suivi de l'observation microscopique des échantillons par la méthode Utermöhl ne s'est pas avéré concluant. Les abondances de cellules des genres *Dinophysis* et *Alexandrium* estimées par la méthode microscopique Utermöhl sont plus faibles dans les échantillons prélevés au filet comparativement à ceux prélevés en surface. La présence de ces microalgues toxiques observées dans les échantillons

prélevés en surface n'a pas été détectée dans la majorité des échantillons prélevés au filet à plancton. Les difficultés d'homogénéisation du concentrat de microorganismes planctoniques et l'important effet de dilution dû à la répartition non homogène des dinoflagellés dans la colonne d'eau peuvent expliquer ces différences.

Nous avons développé et testé la méthode d'analyse moléculaire par qPCR pour le suivi des proliférations des deux microalgues toxiques de référence (*Dinophysis spp.* et *Alexandrium pacificum*) sur les prélèvements réalisés au filet. Cette approche moléculaire a permis de détecter des proliférations de ces algues toxiques non détectées par la méthode Utermöhl dans le concentrat d'algues. Le protocole déployé dans le cadre de ce projet ne nous a pas permis de comparer les résultats des analyses des méthodes microscopique Utermöhl et moléculaire par qPCR dans les échantillons prélevés à la bouteille Hydrobios. Les résultats des analyses moléculaires par qPCR étant prometteurs, ces analyses comparées ainsi que l'optimisation des protocoles seront réalisés dans le projet TOXIDIAG, continuité du projet SECTOX. Le développement de ces analyses moléculaires devrait à terme permettre de cibler plus spécifiquement les espèces toxiques, et ainsi éviter la multiplication des analyses de toxines dans les coquillages. Ces méthodes moléculaires étant plus sensibles que la méthode par analyse microscopique de référence Utermöhl, ces développements devront s'accompagner d'une réflexion sur les seuils de déclenchement des alertes du phytoplancton toxique.

#### Utilisation des échantillonneurs passifs pour l'analyse des toxines dissoutes dans l'eau

Les échantillonneurs passifs (SPATTs) ont mis en évidence la présence d'une contamination de l'eau par les toxines lipophiles réglementées et non réglementées. Ils pourraient également être une piste prometteuse pour améliorer l'appréciation du risque par les gestionnaires. Bien que qualitatif, cet outil est complémentaire au suivi ponctuel des cellules de microalgues toxiques dans l'eau. En effet, l'utilisation des SPATTs est basée sur l'intégration pendant une période de quinze jours des toxines présentes (comparée à la mesure ponctuelle de la concentration en cellules de *Dinophysis* par la méthode REPHY).

#### Points de prélèvement REPHY et REPHYTOX dans la lagune de Thau

Le suivi des concentrations cellulaires des espèces toxiques cibles et des phycotoxines au cours de ce projet, a montré que les valeurs maximales observées étaient détectées sur des points différents des points de références REPHYTOX ou REPHY. Nos résultats ont montré également que les concentrations en AO/DTXs et PTX2 dans les coquillages aux points REPHYTOX n'ont pas toujours correspondu aux valeurs maximales observées dans la lagune de Thau. Le 10/11/2020, la valeur maximale de 301 µg/kg a été mesurée au point MM11 alors qu'elle était de 207 µg/kg au point REPHYTOX Marseillan (a). Dans la zone de Bouzigues, la valeur maximale (162 µg/kg) a été mesurée au point BZ04 alors qu'elle n'était que d'environ 10 µg/kg au point REPHYTOX Bouzigues (a). Par ailleurs, dans le cadre du REPHYTOX, aucun épisode toxique caractérisé par des dépassements du seuil réglementaire n'a été observé en 2020 dans les coquillages de la lagune de Thau tandis que 10 dépassements de ce seuil réglementaire dans les moules ont été mis en évidence en novembre 2020 dans cette étude. Les résultats de ce projet vont permettre une réflexion sur le positionnement de ces points et éventuellement leur nombre dans le cadre d'une expertise future afin de renforcer l'efficacité de la surveillance.

**En conclusion, quel que soit le protocole ou la méthode d'analyse utilisés, nous avons détecté la présence d'algues toxiques des genres *Alexandrium* et *Dinophysis* dans toute la lagune au cours des automnes/hivers 2019 et 2020.**

**Cette étude montre qu'aucun secteur de la lagune n'est « épargné » par les contaminations par *Dinophysis* et les toxines lipophiles réglementées et non réglementées. Concernant *Alexandrium pacificum* et les toxines PSTs, l'absence de prolifération conséquents sur la période étudiée rend impossible toute conclusion concernant la dynamique spatio-temporelle de cette contamination.**

## Remerciements

Cette étude a pu être menée grâce au financement de la Direction Générale de l'Alimentation (DGAL), la région Occitanie, le Conseil Départemental de l'Hérault, Sète Agglopôle et l'Ifremer.

Il est important de signaler que la réussite d'un projet de cette envergure n'est possible qu'avec le soutien et l'implication des professionnels. Ces derniers, sous l'impulsion du Comité Régional des Cultures Marines (CRCM) ont participé au bon déroulement des campagnes d'échantillonnage.

Ce projet a été marqué par le nombre très important d'échantillons différents analysés (eau, échantillonneurs passifs, coquillages) pour des paramètres variés (toxines, dénombrement) et par des techniques multiples (microscope optique, qPCR, LC-MS/MS ...). Sans l'implication et la motivation des personnels du laboratoire PHYC, du LERBO de Concarneau et de l'UMR MARBEC de Sète, ce projet n'aurait pas pu être mené à son terme. Nous remercions particulièrement Juliette Croenne et Elisa Sandras pour leur travail de terrain et laboratoire dédié à ce projet.

## Bibliographie

Abadie, E. B., C. ; Comps, MA. ; Elziere-Papayanni, P.; Lassus, P.; Le Bec, C.; Marcaillou-Le Baut, C.; Nezan, E.; Poggi, R. (1999). Contamination de l'étang de Thau par *Alexandrium tamarense*. Episode de novembre à décembre 1998.

Accoroni, S., Percopo, I., Cerino, F., Romagnoli, T., Pichierri, S., Perrone, C., & Totti, C. (2015). Allelopathic interactions between the HAB dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata* and macroalgae. *Harmful Algae*, 49, 147-155. doi:10.1016/j.hal.2015.08.007

Amzil Z., Fresnel J, Le Gal, D., Billard, C. (2001). Domoic acid accumulation in French shellfish in relation to toxic species of *Pseudo-nitzschia multiseriata* and *P. pseudodelicatissima*. *Toxicon*, 39(8), 1245-1251. doi:10.1016/S0041-0101(01)00096-4

Amzil, Z., Sibat, M., Royer, F., Masson, N., & Abadie, E. (2007). Report on the first detection of pectenotoxin-2, spirolide-A and their derivatives in French shellfish. *Marine Drugs*, 5(4), 168-179. doi:10.3390/md504168

Amzil Z., M. A. (2006). First report on detection of okadaic acid 7-O-acyl-ester derivatives (DTX-3) in French shellfish. In *Molluscan Shellfish Safety*. Henshilwood K., Deegan B., McMahon T., Cusak C., Keaveney S., Silke J., O' Cinneide M., Lyons D. and Hess P. (eds), 150-161.

Barreiro, A., & Vasconcelos, V. M. (2014). Interactions between allelopathic properties and growth kinetics in four freshwater phytoplankton species studied by model simulations. *Aquatic Ecology*, 48(2), 191-205. doi:10.1007/s10452-014-9475-2

Bates, S. S., Bird, C. J., Defreitas, A. S. W., Foxall, R., Gilgan, M., Hanic, L. A., Wright, J. L. C. (1989). Pennate diatom *Nitzschia pungens* as the primary source of domoic acid, a toxin in shellfish from Eastern Prince Edward Island, Canada. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 46(7), 1203-1215. doi:10.1139/f89-156

Belin, C. (1993). Distribution of *Dinophysis* spp. and *Alexandrium minutum* along French coasts since 1984 and their DSP and PSP toxicity levels. In Smayda, T.J.; Shimizu, Y. (Ed.) (1993). *Toxic phytoplankton blooms in the sea: Proceedings of the Fifth International Conference on Toxic Marine Phytoplankton*, Newport, Rhode Island, U.S.A., 28 October-1 November 1991. *Developments in Marine Biology*, 3. Elsevier Science Publishers: Amsterdam. ISBN 0-444-89719-4., 469-474.

Belin, C., & Raffin, B. (1998). Les espèces phytoplanctoniques toxiques et nuisibles sur le littoral français de 1984 à 1995, résultats du REPHY (réseau de surveillance du phytoplancton et des phycotoxines).

Belin, C., Soudant, D., & Amzil, Z. (2021). Three decades of data on phytoplankton and phycotoxins on the French coast: Lessons from REPHY and REPHYTOX. *Harmful Algae*, 102. doi:10.1016/j.hal.2019.101733

Ben Gharbia, H., Yahia, O. K. D., Cecchi, P., Masseret, E., Amzil, Z., Herve, F., Laabir, M. (2017). New insights on the species-specific allelopathic interactions between macrophytes and marine HAB dinoflagellates. *Plos One*, 12(11), 28. doi:10.1371/journal.pone.0187963

Berdalet, E., Fleming, L. E., Gowen, R., Davidson, K., Hess, P., Backer, L. C., 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*, 96(1), 61-91. doi:10.1017/s0025315415001733

Brandenburg, K. M., Domis, L. N. d. S., Wohlrab, S., Krock, B., John, U., van Scheppingen, Y., Van de Waal, D. B. (2017). Combined physical, chemical and biological factors shape *Alexandrium ostenfeldii* blooms in The Netherlands. *Harmful Algae*, 63, 146-153. doi:<https://doi.org/10.1016/j.hal.2017.02.004>

Caruana A, A. Z. (2018). Chapter 13 – Microalgues and Toxins. In *Microalgues in Health and Disease Prevention* (Eds Levine, Ira A. and Fleurence, Joël), Academic Press Publisher, 263-305.

Chen, J., Ye, Q., Gu, H. F., Li, H. Y., Lv, S. H., Liu, J. S., & Yang, W. D. (2015). Variability in the allelopathic action of the *Alexandrium tamarense* species complex along the coast of China. *Harmful Algae*, 47, 17-26. doi:10.1016/j.hal.2015.05.008

Collos, Y., Bec, B., Jauzein, C., Abadie, E., Laugier, T., Lautier, J., Vaquer, A. (2009). Oligotrophication and emergence of picocyanobacteria and a toxic dinoflagellate in Thau lagoon, southern France. *Journal of Sea Research*, 61(1–2), 68-75. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.seares.2008.05.008>

Collos, Y., Gagne, C., Laabir, M., Vaquer, A., Cecchi, P., & Souchu, P. (2004). Nitrogenous nutrition of *Alexandrium catenella* (Dinophyceae) in cultures and in Thau lagoon, southern France. *Journal of Phycology*, 40(1), 96-103. doi:10.1046/j.1529-8817.2004.03034.

Collos, Y., Vaquer, A., Laabir, M., Abadie, E., Laugier, T., Pastoureaud, A., & Souchu, P. (2007). Contribution of several nitrogen sources to growth of *Alexandrium catenella* during blooms in Thau lagoon, southern France. *Harmful Algae*, 6(6), 781-789. doi:10.1016/j.hal.2007.04.003

Erard-Le Denn, E. (1991). Recent Occurrence of red tide dinoflagellate *Alexandrium minutum* Halim from the Northwestern coasts of France. in Park JS, Kim HG (eds): "Recent Approaches on Red Tides.(Proceed 1990 Korean-French Seminar on Red tides, NFRDA), 85-98.

Fiandrino Annie, Serais Ophelie, Caillard Elise, Munaron Dominique, Cimiterra Nicolas (2021). Qualité du Milieu Marin Littoral. Bulletin de la surveillance 2020. Région Occitanie - Départements des Pyrénées Orientales, de l'Aude, de l'Hérault, du Gard . ODE/LITTORAL/LERLR/21.007. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00718/82982/>

Fux, E., Bire, R., & Hess, P. (2009). Comparative accumulation and composition of lipophilic marine biotoxins in passive samplers and in mussels (*M. edulis*) on the West Coast of Ireland. *Harmful Algae*, 8(3), 523-537. doi:10.1016/j.hal.2008.10.007

Fux, E., Marcaillou, C., Mondeguer, F., Bire, R., & Hess, P. (2008). Field and mesocosm trials on passive sampling for the study of adsorption and desorption behaviour of lipophilic toxins with a focus on OA and DTX1. *Harmful Algae*, 7(5), 574-583. doi:10.1016/j.hal.2007.12.008

Genovesi, B., Laabir, M., Masseret, E., Collos, Y., Vaquer, A., & Grzebyk, D. (2009). Dormancy and germination features in resting cysts of *Alexandrium tamarense* species complex (Dinophyceae) can facilitate bloom formation in a shallow lagoon (Thau, southern France). *Journal of Plankton Research*, 31(10), 1209-1224. doi:10.1093/plankt/fbp066

Genovesi B, Shin-Grzebyk M-S, Grzebyk D, Laabir M, Gagnaire P-A, Vaquer A, Pastoureaud A, Lasserre B, Collos Y, Berrebi P, Masseret E. (2011) Assessment of cryptic species diversity within blooms and cyst bank of the *Alexandrium tamarense* complex (Dinophyceae) in a Mediterranean lagoon facilitated by semi-multiplex PCR. *J. Plankton Research*. 33 (3) 405-414 doi:10.1093/plankt/fbq127  
Genovesi, B., Mouillot, D., Laugier, T., Fiandrino, A., Laabir, M., Vaquer, A., & Grzebyk, D. (2013). Influences of sedimentation and hydrodynamics on the spatial distribution of *Alexandrium catenella*/tamarense resting cysts in a shellfish farming lagoon impacted by toxic blooms. *Harmful Algae*, 25(0), 15-25.

- Glibert, P. M., Allen, J. I., Artioli, Y., Beusen, A., Bouwman, L., Harle, J., 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. doi:10.1111/gcb.12662
- Hallegraeff, G. M. (1993). A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia*, 32(2), 79-99. doi:10.2216/i0031-8884-32-2-79.1
- Halstead, B. W. (1967). Poisonous and venomous marine animals of the world. U.S. Government Printing Office, Washington, DC., 2-Invertebrates.
- Ishikawa, A., Hattori, M., Ishii, K.-I., Kulis, D. M., Anderson, D. M., & Imai, I. (2014). In situ dynamics of cyst and vegetative cell populations of the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* in Ago Bay, central Japan. *Journal of Plankton Research*, 36(5), 1333-1343. doi:10.1093/plankt/fbu048
- John U, Litaker RW, Montresor M, Murray S, Brosnahan ML & Anderson DM (2014) Formal revision of the *Alexandrium tamarense* species complex (Dinophyceae) taxonomy: The introduction of five species with emphasis on molecular-based (rDNA) classification. *Protist* 165, 779-804.
- Laabir, M., Amzil, Z., Lassus, P., Masseret, E., Tapilatu, Y., De Vargas, R., & Grzebyk, D. (2007). Viability, growth and toxicity of *Alexandrium catenella* and *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) following ingestion and gut passage in the oyster *Crassostrea gigas*. *Aquatic Living Resources*, 20(1), 51-57. doi:10.1051/alr:2007015
- Laabir, M., Collos, Y., Masseret, E., Grzebyk, D., Abadie, E., Savar, V. r., Amzil, Z. (2013). Influence of Environmental Factors on the Paralytic Shellfish Toxin Content and Profile of *Alexandrium catenella* (Dinophyceae) Isolated from the Mediterranean Sea. *Marine Drugs*, 11(5), 1583-1601.
- Laabir, M., Grignon-Dubois, M., Masseret, E., Rezzonico, B., Soteras, G., Rouquette, M., Cecchi, P. (2013). Algicidal effects of *Zostera marina* L. and *Zostera noltii* Hornem. extracts on the neuro-toxic bloom-forming dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Aquatic Botany*, 111, 16-25. doi:10.1016/j.aquabot.2013.07.010
- Laabir, M., Jauzein, C., Genovesi, B., Masseret, E., Grzebyk, D., Cecchi, P., Collos, Y. (2011). Influence of temperature, salinity and irradiance on the growth and cell yield of the harmful red tide dinoflagellate *Alexandrium catenella* colonizing Mediterranean waters. *Journal of Plankton Research*, 33(10), 1550-1563. doi:10.1093/plankt/fbr050
- Laanaia, N., Vaquer, A., Fiandrino, A., Genovesi, B., Pastoureaud, A., Cecchi, P., & Collos, Y. (2013). Wind and temperature controls on *Alexandrium* blooms (2000-2007) in Thau lagoon (Western Mediterranean). *Harmful Algae*, 28, 31-36. doi:10.1016/j.hal.2013.05.016
- Lassus, P., Chomerat, N., Hess, P., Nezan, E. (2016). Micro-algues toxiques et nuisibles de l'océan mondial. COI Manuels et Guides, 68 / Toxic and Harmful Microalgae of the World Ocean. IOC Manuals and Guides, 68. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00379/49054/>
- Lau, W. L. S., Law, I. K., Liow, G. R., Hii, K. S., Usup, G., Lim, P. T., & Leaw, C. P. (2017). Life-history stages of natural bloom populations and the bloom dynamics of a tropical Asian ribotype of *Alexandrium minutum*. *Harmful Algae*, 70, 52-63. doi:10.1016/j.hal.2017.10.006
- Lawrence, J. L., H.; Toyofuku, H.; Hess, P.; Karunasagar, I.; Ababouch, L. (2011). Assessment and management of biotoxin risks in bivalve molluscs. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper, 551. Rome, 337pp.

Li, A., Ma, F., Song, X., & Yu, R. (2011). Dynamic adsorption of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins in passive sampling relates to pore size distribution of aromatic adsorbent. *Journal of Chromatography A*, 1218(11), 1437-1442.

Li, F. L., Li, Z. X., Guo, M. M., Wu, H. Y., Zhang, T. T., & Song, C. H. (2016). Investigation of diarrhetic shellfish toxins in Lingshan Bay, Yellow Sea, China, using solid-phase adsorption toxin tracking (SPATT). *Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment*, 33(8), 1367-1373. doi:10.1080/19440049.2016.1200752

Lilly EL, Kulis DM, Gentien P & Anderson DM (2002) Paralytic shellfish poisoning toxins in France linked to a human-introduced strain of *Alexandrium catenella* from the western Pacific: evidence from DNA and toxin analysis. *Journal of Plankton Research* 24, 443-452.

Lyczkowski, E. R., & Karp-Boss, L. (2014). Allelopathic effects of *Alexandrium fundyense* (Dinophyceae) on *Thalassiosira cf. gravida* (Bacillariophyceae): a matter of size. *Journal of Phycology*, 50(2), 376-387. doi:10.1111/jpy.12172

MacKenzie, L., Beuzenberg, V., Holland, P., McNabb, P., & Selwood, A. (2004). Solid phase adsorption toxin tracking (SPATT): a new monitoring tool that simulates the biotoxin contamination of filter feeding bivalves. *Toxicon*, 44(8), 901-918. doi:10.1016/j.toxicon.2004.08.020

MacKenzie, L. A. (2010). In situ passive solid-phase adsorption of micro-algal biotoxins as a monitoring tool. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(3), 326-331. doi:10.1016/j.copbio.2010.01.013

Mardones, J. I., Bolch, C., Guzman, L., Paredes, J., Varela, D., & Hallegraeff, G. M. (2016). Role of resting cysts in Chilean *Alexandrium catenella* dinoflagellate blooms revisited. *Harmful Algae*, 55, 238-249. doi:10.1016/j.hal.2016.03.020

Masselin, P., Amzil, Z., Carreras, A., Chiantella, C., Le Bec, C., Nezan, E., & Truquet, P. (2000). Paralytic Shellfish Poisoning on French Mediterranean coast in the autumn of 1998: *Alexandrium tamarensis* as a causative agent. Ninth International Conference on Harmful Algae Blooms, Tasmania 2000. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00017/12871/>

Masseret E, Enquebecq M, Laabir M, Genovesi B, A Vaquer & Avarre J-C. (2010) A Simple and Innovative Method for Species Identification of Phytoplankton Cells on Minute Quantities of DNA. *Environmental Microbiology Reports*. 2(6) 715-719.

REPHY - French Observation and Monitoring program for Phytoplankton and Hydrology in coastal waters (2022). REPHY dataset - French Observation and Monitoring program for Phytoplankton and Hydrology in coastal waters. Metropolitan data. SEANOE. <https://doi.org/10.17882/47248>

REPHYTOX - French Monitoring program for Phycotoxins in marine organisms (2022). REPHYTOX dataset. French Monitoring program for Phycotoxins in marine organisms. Data since 1987. SEANOE. <https://doi.org/10.17882/47251>

Shin, H. H., Baek, S. H., Li, Z., Han, M.-S., Oh, S. J., Youn, S.-H., Lim, W.-A. (2014). Resting cysts, and effects of temperature and salinity on the growth of vegetative cells of the potentially harmful species *Alexandrium insuetum* Balech (Dinophyceae). *Harmful Algae*, 39(0), 175-184.

Smayda, T. J. (1997). Harmful Algal Blooms: Their Ecophysiology and General Relevance to Phytoplankton Blooms in the Sea. *Limnology and Oceanography*, 42(5), 1137-1153. doi:10.2307/2839007

- Smayda, T. J. (2002). Adaptive ecology, growth strategies and the global bloom expansion of dinoflagellates. *Journal of Oceanography*, 58(2), 281-294. doi:10.1023/a:1015861725470
- Smida, D. B., Sahraoui, I., Mabrouk, H. H., & Hlaili, A. S. (2012). Seasonal dynamics of genus *Alexandrium* (potentially toxic dinoflagellate) in the lagoon of Bizerte (North of Tunisia) and controls by the abiotic factors. *Comptes Rendus Biologies*, 335(6), 406-416. doi:10.1016/j.crv.2012.04.007
- Sournia, A., Chretiennotdinet, M. J., & Ricard, M. (1991). Marine-phytoplankton - how many species in the world ocean. *Journal of Plankton Research*, 13(5), 1093-1099. doi:10.1093/plankt/13.5.1093
- Triki, H. Z., Daly-Yahia, O. K., Malouche, D., Komiha, Y., Deidun, A., Brahim, M., & laabir, M. (Writers). (2014). Distribution of resting cysts of the potentially toxic dinoflagellate *Alexandrium pseudogonyaulax* in recently-deposited sediment within Bizerte Lagoon (Mediterranean coast, Tunisia).
- Utermöhl, H. (1931). Neue Wege in der quantitativen Erfassung des Planktons: (Mit besondere Berücksichtigung des Ultraplanktons). *Verh. Int. Ver. Theor. Angew. Limnol*, 5, 567-595.
- Wells, M. L., Trainer, V. L., Smayda, T. J., Karlson, B. S. O., Trick, C. G., Kudela, R. 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. doi:10.1016/j.hal.2015.07.009
- Zendong, Z., Herrenknecht, C., Abadie, E., Brissard, C., Tixier, C., Mondeguer, F., Hess, P. (2014). Extended evaluation of polymeric and lipophilic sorbents for passive sampling of marine toxins. *Toxicon*, 91, 57-68. doi:10.1016/j.toxicon.2014.03.010