

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES

ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTE

Année 2011



Contribution à l'étude de la toxicité de *Pseudo-nitzschia* :
régulation de la production d'acide domoïque et synthèse
d'analogues chimiques

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Biologie Santé

Spécialité : Biologie marine

*Présentée
et soutenue publiquement par*

Guillaume CALU

Le 5 juillet 2011, devant le jury ci-dessous

Président	Mr. Yves-François POUCHUS, Professeur, Université de Nantes.
Rapporteurs	Mr. Yves COLLOS, Directeur de Recherches, CNRS-Université Montpellier 2-IRD. Mr. Jean-Marc FREMY, Professeur, Centre National d'Etudes Vétérinaires et
Examineurs	Alimentaires, Maisons-Alfort. Mr. Pierre WEIGEL, Enseignant-chercheur, Université de Nantes. Mme Véronique MARTIN-JEZEQUEL, Chargée de recherche CNRS, Université de Nantes. Mme Véronique CREACH, Chargée de recherche CEFAS, Lowestoft, U.K.

Directeur de thèse : M. Pierre Weigel

Mme Véronique Martin-Jézéquel

Remerciements

Ce travail de thèse a fait l'objet d'un financement mixte Ifremer / Région Pays de la Loire (2007-2010). Il a été réalisé au sein des laboratoires Mer Molécule Santé (MMS) et U3B (Biocatalyse, Biotechnologie et Biorégulation) de l'Université de Nantes, et du laboratoire Phycotoxines du centre Ifremer Nantes.

Merci à mon directeur de thèse, Pierre Weigel, à ma co-directrice de thèse, Véronique Martin-Jézéquel, et à mon encadrante de thèse Corinne Miral pour leur confiance, leur soutien et leurs encouragements.

Je tiens à remercier Yves-François Pouchus, Jean-Marc Frémy, Yves Collos, Véronique Martin-Jézéquel, Pierre Weigel et Véronique Créach pour avoir accepté d'être membres de ce jury de thèse.

Merci à toutes les personnes avec qui j'ai pu collaborer au cours de ces quatre années : Zouher Amzil, Michèle Bardouil, Madeleine Bohec, Gaël Bougaran, Pierre Gaudin, Raymond Kaas, Patrick Lassus, Damien Marquis, Philippe Rosa, Véronique Séchet ainsi qu'aux stagiaires ayant participé à ces travaux de thèse : Estelle Lefaux, Paule Gaudin, Jeff Durant et Léo Candela.

Je remercie également Julien Conseil, David Tézé et Guillaume Peron pour leur amitié. Mais mes plus chaleureux remerciements iront à Astrid, qui a dû assumer la douloureuse tâche de compagne de thésard pendant ces quatre années, à tel point qu'il ne serait que justice de lui attribuer le titre de co-auteur d'honneur de ce présent manuscrit !

Ce manuscrit de thèse est dédié à mes deux grands-pères.

Sommaire

Remerciements	2
Sommaire	3
Introduction Générale.....	6
Partie 1 : <i>Pseudo-nitzschia</i> et l'acide domoïque : chimie, biologie, écotoxicologie et neurotoxicologie.....	9
1. Historique	10
2. Chimie de l'acide domoïque	12
3. Les algues productrices d'AD et dérivés.....	14
4. Ecophysiologie de la croissance de <i>Pseudo-nitzschia sp.</i> et de la production d'acide domoïque.....	18
4.1. Blooms et production toxinique <i>in situ</i>	18
4.2. Culture en laboratoire et cycle biologique	19
4.3. Silicium et phosphates.....	20
4.4. Sources azotées	21
4.5. Température, irradiance, salinité.....	22
4.6. Bactéries	23
5. Biosynthèse de l'acide domoïque.....	26
6. Accumulation de l'acide domoïque et de ses dérivés chez la faune marine et effets physiologiques.....	27
7. Neurotoxicité de l'acide domoïque et de ses dérivés	30
Partie 2 : Matériel et Méthodes	34
1. Culture de diatomées et souchothèque	35
1.1. Salles de culture	35
1.2. Choix et formulation des milieux de culture.....	35
1.2.1. Eau de mer naturelle.....	35
1.2.2. Eau de mer artificielle	36
1.2.3. Méthodes de stérilisation de l'eau de mer	37
1.2.4. Choix de la formulation d'enrichissement des eaux de mer stériles	38
1.3. Entretien de la souchothèque.....	42
1.3.1. Inventaire des souches.....	42
1.3.2. Méthodes de repiquage et entretien.....	42
1.4. Méthodes de cultures expérimentales	43
1.4.1. Cultures en système fermé	43
1.4.2. Cultures en système ouvert	44
2. Analyses physico-chimiques des milieux de culture.....	50
2.1. Contrôle de l'irradiance, du pH et de la salinité.....	50
2.2. Mesure du silicium	50
2.3. Mesure de l'ammonium	51
2.4. Mesure de l'urée.....	51
3. Analyse chimique de la toxicité	52
3.1. Préparation des échantillons et extraction de l'acide domoïque	52
3.2. Analyse de l'acide domoïque par méthode HPLC/UV	52
3.3. Contrôle de la qualité des analyses par un test de dopage	53
Partie 3 : Croissance et production toxinique chez <i>Pseudo-nitzschia multiseriis</i> en présence de silicium et de germanium	55

1.	Introduction	56
1.1.	Rôle inhibiteur du germanium	59
1.2.	Influence du silicium dans la production toxinique chez <i>Pseudo-nitzschia</i>	59
2.	Rôle du silicium et influence du germanium dans la croissance et la toxicité de <i>Pseudo-nitzschia multiseriis</i>	61
2.1.	Mise au point des conditions expérimentales.....	62
2.1.1.	Influence des teneurs initiales en silicium dans le milieu de culture	62
2.1.2.	Inhibition de la croissance par ajout de germanium dans le milieu de culture ..	62
2.1.3.	Recherche d'effet du germanium sur les dosages extra-cellulaires de silicium.	63
2.2.	Résultats	64
2.2.1.	Influence des teneurs initiales en silicium dans le milieu de culture	64
2.2.2.	Cinétiques de croissance de <i>Pseudo-nitzschia multiseriis</i> en présence de germanium.....	67
2.2.3.	Concentration en silicium dans les milieux de culture au cours du suivi	67
2.2.4.	Toxicité des cultures de <i>Pseudo-nitzschia multiseriis</i> en présence de germanium	68
2.3.	Discussion	69
Partie 4 : Influence des sources azotées sur la croissance et la toxicité de <i>Pseudo-nitzschia sp.</i>		72
1.	Introduction	73
1.1.	Incorporation des sources azotées chez les diatomées	74
1.1.1.	Généralités.....	74
1.1.2.	Assimilation des sources azotées minérales.....	76
1.1.3.	Assimilation de l'urée	79
1.1.4.	Assimilation des acides aminés.....	82
1.1.5.	Assimilation et métabolisme azoté cellulaire.....	83
1.2.	Sources azotées et <i>Pseudo-nitzschia</i>	86
2.	Rôle de différentes sources azotées et influence de l'hydroxyurée sur la croissance et la production toxinique de <i>Pseudo-nitzschia spp.</i>	89
2.1.	Mise au point des conditions expérimentales.....	90
2.1.1.	Suivi des cinétiques de croissance et de la production toxinique de <i>P. multiseriis</i> CCL70 et <i>P. australis</i> PN C1 en présence de différentes sources azotées.....	90
2.1.2.	Comparaison des sources nitrates et urée lors de cultures continues en photobioréacteur chez <i>P. multiseriis</i> CCL 70.....	91
2.1.3.	Inhibition de l'assimilation de l'urée et effets sur la croissance et la production toxinique de <i>P. multiseriis</i> CCL 70	92
2.2.	Résultats	94
2.2.1.	Suivi des cinétiques de croissance et de la production toxinique de <i>P. multiseriis</i> CCL70 et <i>P. australis</i> PN C1 en présence de différentes sources azotées.....	94
2.2.2.	Comparaison des sources azotées nitrates et urée lors de cultures continues en photobioréacteur chez <i>P. multiseriis</i> CCL 70 et chez <i>P. pungens</i> PN D10.....	112
2.2.3.	Inhibition de l'incorporation de l'urée et effets de l'hydroxyurée sur la croissance et la production toxinique de <i>P. multiseriis</i> CCL 70	115
2.3.	Discussion	117
2.3.1.	Croissance de <i>Pseudo-nitzschia sp.</i> en fonction des sources azotées disponibles dans le milieu de culture.....	117
2.3.2.	Teneurs intracellulaires en acide domoïque chez <i>Pseudo-nitzschia sp.</i> selon les sources azotées en présence	121
2.3.3.	Dynamique de production de l'acide domoïque chez <i>P. multiseriis</i> CCL 70 et <i>P. australis</i> PN C1	125
2.3.4.	Origine et devenir de l'acide domoïque extracellulaire détecté dans les milieux de culture au cours de ces expériences.....	127

2.3.5. Conclusion.....	131
Partie 5 : Etude de la synthèse de kanoïdes à partir d'hydroxyproline.	133
1. Introduction	134
2. Synthèse chimique des kanoïdes	138
2.1. Protection de la fonction amine.....	139
2.1.1. Protocole de synthèse et caractérisation physico-chimique	140
2.2. Protection de la fonction acide carboxylique	140
2.2.1. - Protocole de synthèse et caractérisation physico-chimique.....	141
2.3. Oxydation de la fonction hydroxyle.....	141
2.3.1. - Protocole de synthèse et caractérisation physico-chimique.....	142
2.4. Discussion	142
Conclusion Générale	144
Bibliographie.....	148
Annexe 1 : formulation des eaux de mer artificielles et milieux de culture.....	185
Annexe 2 : réactifs et protocoles de dosages chimiques des sels nutritifs	191
Annexe 3 : spectres RMN des étapes réalisées lors de la synthèse chimique des toxines kainiques.....	198
Annexe 4 : exemple de chromatogramme obtenu lors de l'analyse de la toxicité d'un culot cellulaire par méthode spectrométrique HPLC/UV	201
Annexe 5 : publication parue dans <i>Proceedings of the seventh International Conference on Molluscan Shellfish Safety</i> (Nantes, 2009), Editions Quae.....	203

Introduction Générale

Les diatomées nuisibles du genre *Pseudo-nitzschia* furent considérées comme inoffensives pendant près d'un siècle. Le genre fit son apparition dans la première édition de *l'Atlas des Diatomées marines de France* de H. et M. Peragallo, en 1897, puis fut confirmé en 1908 dans l'édition complète. Les auteurs rapportèrent alors plusieurs gravures des espèces dénommées *P. migrans* (Cleve), *P. seriata*, *P. sicula*. En 1930, la présence de *Nitzschia seriata* et *N. delicatissima* (ultérieurement rebaptisées *P. seriata* et *P. delicatissima*) fut signalée en mer d'Ecosse (Lebour, 1930). Leur toxicité resta cependant inconnue. Il fallut donc attendre la crise d'intoxication des moules bleues aux toxines amnésiantes de 1987, au Canada, pour que le risque sanitaire lié aux efflorescences de *Pseudo-nitzschia sp.* soit identifié pour la première fois. C'est ainsi que le genre, pourtant décrit depuis le XIX^{ème} siècle, n'en reste pas moins étudié de manière approfondie que depuis 24 ans.

La crise d'intoxication à l'acide domoïque de 1987 permit de relier la présence de cette toxine dans les coquillages à d'importantes efflorescences de la diatomée *Nitzschia pungens* forma *multiseries*, rebaptisée par la suite *Pseudo-nitzschia multiseries*. L'étude de cette problématique connut ensuite un très vif intérêt, alors que les réseaux de surveillance intégraient l'acide domoïque dans leurs programmes. Les premières investigations menées lors de cultures en laboratoire permirent de mieux comprendre les dynamiques de production toxinique au cours de la croissance de *P. multiseries* et de caractériser l'influence des macro-nutriments comme les nitrates, le silicium et les phosphates (Bates, 1998). Cependant, ces travaux restèrent très insuffisants, alors que les principaux efforts de recherche se concentrèrent sur le risque sanitaire et la surveillance des fruits de mer en milieu côtier.

Les recherches menées sur la physiologie et le métabolisme *Pseudo-nitzschia* restent donc très en retard par rapport aux connaissances accumulées pour d'autres modèles de diatomées. Les voies de biosynthèse et le rôle biologique de l'acide domoïque n'étant toujours pas connus, de nombreuses interrogations subsistent quant au comportement des souches toxiques en présence de différentes sources nutritives azotées.

Afin de contribuer au développement des connaissances dans ce domaine, nous nous sommes donc proposés, au cours de ce sujet de thèse, d'explorer plus en détails l'influence de la nutrition sur la croissance et la production toxinique de ces diatomées et de proposer une nouvelle approche de détection *in situ* des toxines amnésiantes.

Après avoir rapporté les connaissances actuelles sur *Pseudo-nitzschia* et les épisodes de contamination aux toxines amnésiantes, nous détaillerons les méthodes techniques retenues dans le cadre de ces travaux de thèse. Nous présenterons ensuite les résultats obtenus dans le cadre de l'étude de l'influence du silicium lors de cultures en laboratoire, et l'impact d'un inhibiteur compétitif de l'assimilation du silicium, le germanium, sur ces résultats. Enfin, nous aborderons la nutrition azotée chez trois espèces toxiques de *Pseudo-nitzschia* et les résultats obtenus en culture lors de l'étude de l'influence de nouvelles sources azotées. Ces données apportent de nouveaux éclairages quant à l'action *in situ* de ces sources azotées, mais également sur la régulation des voies d'assimilation de l'azote chez *Pseudo-nitzschia spp.* grâce à l'influence de l'hydroxyurée, un inhibiteur compétitif de l'assimilation de l'urée.

Le développement d'outils d'analyse innovants afin de détecter *in situ* les espèces de *Pseudo-nitzschia* productrices d'acide domoïque représente également un enjeu important pour les réseaux de surveillance sanitaire du milieu marin. Les avancées récentes menées sur la reconnaissance de molécules-cibles par les aptamères (Tombelli *et al.*, 2005) représentent une solution intéressante de détection de l'acide domoïque. La première étape en vue d'initier cette approche consiste à synthétiser des molécules-cibles pour la procédure SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) (Gold *et al.*, 1997). Nous rapporterons donc les travaux de synthèse organique menés en laboratoire durant cette thèse de doctorat, afin de produire des analogues de toxines amnésiantes. Ces travaux préliminaires permettent d'obtenir des ligands en vue de leur utilisation dans des procédures de sélection de récepteurs biologiques et de réalisation de biocapteurs innovants.

Partie 1 : *Pseudo-nitzschia* et l'acide domoïque : chimie,
biologie, écotoxicologie et neurotoxicologie

1. Historique

L'acide domoïque et ses dérivés issus d'extraits d'algues rouges sont utilisés comme vermifuges et insecticides naturels dans la pharmacopée japonaise traditionnelle. Ces composés furent d'abord isolés à partir d'algues rouges (Takemoto & Daigo, 1958) et restèrent longtemps considérés comme des métabolites secondaires des Rhodophycées. Ce n'est que fin 1987, lors d'une crise alimentaire sans précédent au Canada, que l'acide domoïque fut mis en avant comme toxine alimentaire produite par une diatomée.

Durant cette crise, près de 250 individus furent admis dans les hôpitaux des villes de Québec et de la province du New Brunswick suite à la consommation de moules. Ils présentaient divers degrés de malaises gastro-intestinaux et de symptômes neurologiques (Perl *et al.*, 1990). Les moules bleues (*Mytilus eludis*) responsables de cette crise provenaient de sites aquacoles de la baie de Cardigan (Prince Edward Island, Canada) (Bates *et al.*, 1989). À défaut d'identifier une toxine alimentaire classique, une véritable course contre la montre fut engagée afin d'isoler la molécule incriminée. Cette dernière s'avéra être l'acide domoïque.

Les populations *in situ* de macro-algues rouges susceptibles de produire la quantité d'acide domoïque à l'origine de cette crise sanitaire étant trop faibles, les recherches s'orientèrent sur la présence d'importants blooms monospécifiques de la diatomée *Nitzschia pungens* forma *multiseries* dans les eaux de la baie durant cette période (atteignant jusqu'à 15.10^6 cellules/l). Le tractus digestif des moules contaminées contenait des débris de ces diatomées. Les cellules de *Nitzschia pungens* forma *multiseries*, isolées puis cultivées en laboratoire, produisirent de l'acide domoïque (Wright *et al.*, 1989). Il s'agissait du premier cas identifié de phycotoxine produite par une diatomée.

Durant l'épisode toxique de 1987, 107 personnes sur les 250 patients recensés présentaient des symptômes directement reliés à la consommation des moules contaminées. Les symptômes gastro-intestinaux se manifestaient rapidement dans les 24 heures après ingestion, et les premiers symptômes neurologiques 48 heures après ingestion. Pour les cas les moins graves, ils se limitaient à des crampes abdominales et à des vomissements. Dans les cas de contaminations plus importantes, les symptômes neurologiques comprenaient une désorientation, une amnésie (temporaire ou permanente), voire le coma et pouvant aboutir au décès du patient (Todd, 1993). Trois personnes âgées succombèrent après avoir été admises à l'hôpital suite à cet empoisonnement, et quatre autres décédèrent dans les trois mois suivant l'ingestion de moules

contaminées (Teitelbaum *et al.*, 1990). Les tests cliniques réalisés dans le cadre de l'utilisation de l'acide domoïque extrait de Rhodophycées comme vermifuge ne notaient aucun effet secondaire indésirable pour des doses de 20 mg chez un enfant. Lors de la crise de 1987, les personnes ayant ingéré l'équivalent de 15 à 20 mg de toxines ne présentaient pas de symptômes particuliers, en revanche les deux patients victimes des crises les plus sévères avaient ingéré l'équivalent de 290 mg de toxines (Perl *et al.*, 1990). A partir de ces données cliniques, les doses d'acide domoïque requises pour entraîner l'apparition des premiers symptômes ont été estimées à 0,2-0,3 mg (AD)/kg pour un individu de corpulence moyenne comprise entre 50 et 70 kg (Tasker, 2002).

A la suite de la crise sanitaire de 1987, la surveillance systématique des diatomées du genre *Pseudo-nitzschia* et des toxines ASP (amnesic shellfish poisoning) fut initiée au Canada. Les programmes de surveillance mis en place envisagèrent alors des mesures d'interdictions de commercialisation des coquillages au-delà du seuil sanitaire de 20 µg(AD) / g de chair de coquillage. Ce seuil sanitaire fut ensuite repris par de nombreux pays. Dans les années qui suivirent, d'autres épisodes de toxicité furent rapportés dans les coquillages en baie de Cardigan suite à des blooms de *P. multiseries*, avec des teneurs toxiques rapportées dans les moules supérieures au seuil sanitaire en 1988 (jusqu'à 280 µg(AD)/g de chair) mais inférieures au seuil sanitaire en 1989 et 1990 (Bates *et al.*, 1998). En 1988, les clams de la baie de Fundy (Canada) présentèrent une toxicité équivalente à 74 µg(AD)/g de chair (Bates *et al.*, 1998). La source productrice de ces toxines fut attribuée à la diatomée *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* (Martin *et al.*, 1990). Jusqu'en 1991, la côte est du Canada semblait être la seule région au monde soumise aux crises ASP. Or, en septembre 1991, une centaine de Pélicans bruns et de Cormorans de Brandt furent retrouvés morts dans la Baie de Monterey (Californie, USA) suite à d'inhabituels symptômes neurologiques (Work *et al.*, 1993). Les oiseaux avaient ingéré des anchois contaminés par l'acide domoïque, la toxine étant cette fois-ci produite par la diatomée *Pseudo-nitzschia australis* (Buck *et al.*, 1992 ; Fritz *et al.*, 1992). Depuis ces premières crises de contamination des coquillages aux toxines ASP, beaucoup d'autres épisodes ont été rapportés de part le monde (voir exemples en tableau 1) et ce problème sanitaire reste toujours d'actualité.

En France, le REPHY intègre depuis 1999 la surveillance des toxines amnésiantes dans les coquillages (valeur-seuil de 20 µg d'AD/g de chair de coquillage) et des *Pseudo-nitzschia spp.* dans l'eau de mer (valeur-seuil de 10⁵ cellules/l). Le premier cas d'interdiction de consommation fut mis en place au printemps 2000 en mer d'Iroise suite à la détection dans les

coquillages de teneurs allant jusqu'à 53 µg d'AD/g de chair (Amzil *et al.*, 2001a). Des crises ont été depuis régulièrement signalées le long des côtes de la Manche, Atlantique et Méditerranée.

Il faut noter qu'outre les problèmes sanitaires, les proliférations d'algues toxiques ont aussi de sérieuses répercussions économiques. Le coût de la crise de Prince Edward Island en 1987-1988 a été estimé à 8,4 millions de dollars canadiens. Ce montant prend en compte les hospitalisations, décès de patients, coûts des analyses effectuées sur le terrain, des relations publiques et des pertes subies par les mytiliculteurs et autres professionnels du secteur (Cembella & Todd, 1993). A partir de données collectées depuis 1991 sur les quatre sites les plus souvent fermés en raison de blooms de *Pseudo-nitzschia sp.* (ASP) ou de dinoflagellés toxiques du genre *Alexandrium sp.* (PSP), des modèles économiques ont pu montrer que pour ces quatre sites, une année entière de fermeture représenterait 10,6 millions de dollars de pertes et toucherait 339 emplois à plein temps (Dyson & Huppert, 2010).

2. Chimie de l'acide domoïque

L'acide domoïque est un acide aminé secondaire tricarboxylique non-protéique, membre de la famille des kanoïdes (figure 1). En raison de leurs effets neurotoxiques, les composés de cette famille sont plus communément désignés sous le nom de toxines ASP (Amnesic Shellfish Poisoning). Ces composés possèdent une base chimique commune : un α - acide aminé secondaire dicarboxylique, auquel vient se greffer une chaîne latérale mono- ou diéthylénique, comprenant une fonction lactone ou carboxylique (Clayden *et al.*, 2005).

L'acide domoïque de formule brute $C_{15}H_{21}NO_6$ a une masse moléculaire $MM = 311,3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. La toxine présente un point de fusion à 216°C. Son pouvoir rotatoire vaut $[\alpha]_D = -120,5^\circ$. Les valeurs de pKa de l'acide domoïque sont, pour les groupements carboxyles, respectivement de 1,85 (en position C₂), 4,75 (en position C₁) et 4,47 (chaîne latérale en C₄) (Walter *et al.*, 1991). L'amine secondaire a un pKa de 9,82 (Piñeiro *et al.*, 1999). L'acide domoïque est thermostable, soluble dans les solvants aqueux, mais instable en milieu acide (Amzil *et al.*, 2001b). A pH physiologique, l'acide domoïque a donc une charge globale de -2 (trois groupements COO⁻ et un groupement NH₃⁺).

L'acide domoïque dans l'eau de mer (milieu alcalin) a un temps de demi-vie de 12 à 34 heures (Burns *et al.*, 2007). Les rayons UV (entre 280 et 400 nm) sont responsables de cette photodégradation, qui peut être reproduite en laboratoire (Wright *et al.*, 1990b). Le fer Fe(III), chélaté avec la toxine, jouerait le rôle de photocatalyseur et favoriserait la dégradation (Bates *et*

al., 2003). L'impact du fer dans cette photodégradation varie selon les études : Fisher *et al.* (2006) notèrent une influence du fer en eau de mer synthétique, tandis que Bouillon *et al.* (2006) ne rapportèrent pas d'influence en eau de mer naturelle ; ce phénomène reste donc encore discutable dans l'environnement.

A des températures supérieures à 50°C ou sous UV, l'acide domoïque s'isomérise pour donner principalement de l'acide épidoïmoïque (Ifremer, 2003 ; Jeffery *et al.*, 2004) et des acides isodomoïques (Wright *et al.*, 1990b).

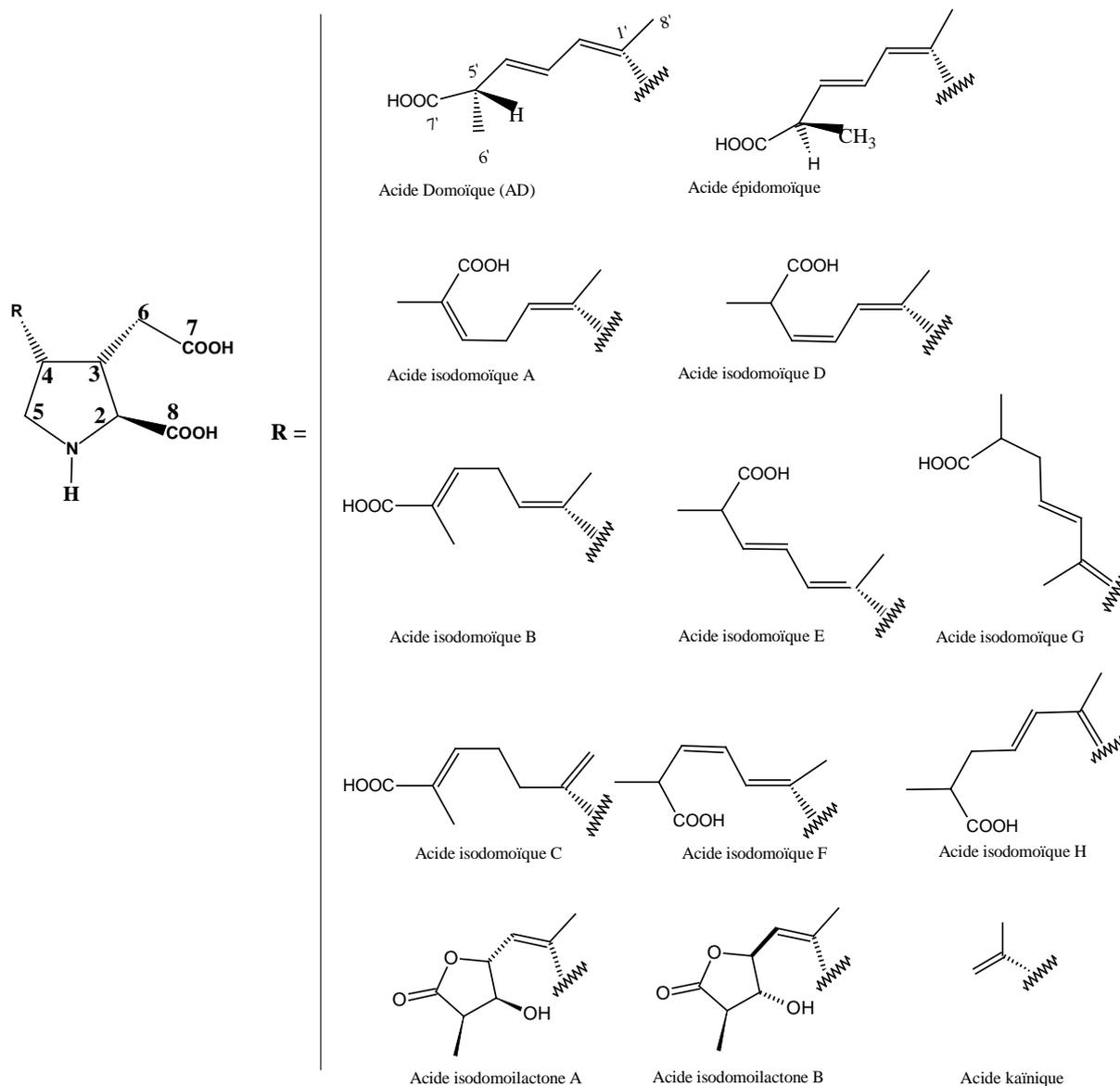


Figure 1 : la famille des kanoïdes : acide domoïque et dérivés (d'après Ifremer, 2003 ; Clayden *et al.*, 2005).

Lors de sa photodégradation, l'acide domoïque est isomérisé par *cis-trans* photoisomérisation pour former principalement les acides isodomoïques D, E et F. Il semblerait que ces isomères

soient eux-même des molécules intermédiaires au cours de la photodégradation de l'acide domoïque (Bouillon *et al.*, 2008). Dans une plus faible proportion, des dérivés décarboxylés apparaissent également (Campbell *et al.*, 2004). De plus, les formes d'acide isodomoïque A et B sont produites par certaines souches de *Nitzschia navis-varingica* (Kotaki *et al.*, 2005), et l'isomère C a été détecté dans les coquillages puis isolé à partir de cultures de *P. australis* (Holland *et al.*, 2005). Enfin, les acides isodomoïques G et H ont également été rapportés chez l'algue rouge *Chondria armata* (Zaman *et al.*, 1997).

La synthèse de kanoïdes et de l'acide kaïnique a été réalisée à plusieurs reprises (voir chapitre 5). L'acide domoïque fut synthétisé pour la première fois en 1982 afin de connaître sa configuration absolue (Ohfuné & Tomita, 1982). Des dérivés de l'acide domoïque sont également synthétisables chimiquement, tels les acides isodomoïques C (Clayden *et al.*, 2004) et G (Clayden *et al.*, 2005).

3. Les algues productrices d'AD et dérivés

Les Rhodophytes productrices de neurotoxines sont utilisées de manière empirique dans la pharmacopée traditionnelle japonaise pour traiter les vers intestinaux chez les jeunes enfants. Le premier principe actif identifié dans ces algues rouges fut l'acide kaïnique, isolé pour la première fois en 1953 à partir de la Rhodophyte *Digenea simplex* (Murakami *et al.*, 1953). En 1958, l'acide domoïque a été caractérisé au Japon à partir d'extraits de l'algue rouge *Chondria armata domoi* (Takemoto & Daigo, 1958). La toxine fut baptisée ainsi à partir du mot japonais « *domoi* » désignant les algues.

L'acide domoïque fut ensuite isolé chez les Rhodophytes *Alsium corallinum* de la côte ouest de la Sicile (Impellizeri *et al.*, 1975) et *Chondria baileyana* le long des côtes canadiennes (Laycock, 1989). La toxine a été depuis identifiée chez *Amansia glomerata*, *Digenea simplex* et *Vidalia obtusiloba*, des espèces algales membres de la famille des Rhodomelaceae (Rhodophytes) (Sato *et al.*, 1996). Les acides isodomoïques A, B, C, D, G et H et les domoïlactones A et B ont également été isolés chez *C. armata* (Clayden *et al.*, 2005 ; Maeda *et al.*, 1987 ; Zaman *et al.*, 1997), tandis que l'analyse d'échantillons de moules *Mytilus edulis* a permis d'identifier les acides isodomoïques E et F (Wright *et al.*, 1990a).

La première donnée recensée concernant la production d'acide domoïque par des diatomées remonte à l'épisode toxique de Prince Edward Island, au Canada, fin 1987, avec la mise en

évidence en laboratoire de la production toxinique chez *Pseudo-nitzschia multiseries* (détection par méthode fluorimétrique avec séparation des acides aminés marqués par HPLC) (Bates *et al.*, 1989). Cette espèce fut à l'origine rapportée sous le nom *Nitzschia pungens* forma *multiseries*, puis fut rebaptisée *Pseudo-nitzschia pungens* forma *multiseries* (Hasle, 1965 ;1994; Hasle *et al.*, 1996), avant que l'espèce *P. multiseries* (figure 2) soit clairement séparée de l'espèce *P. pungens* sur la base de critères morphologiques, physiologiques et génétiques (Hasle, 1995).

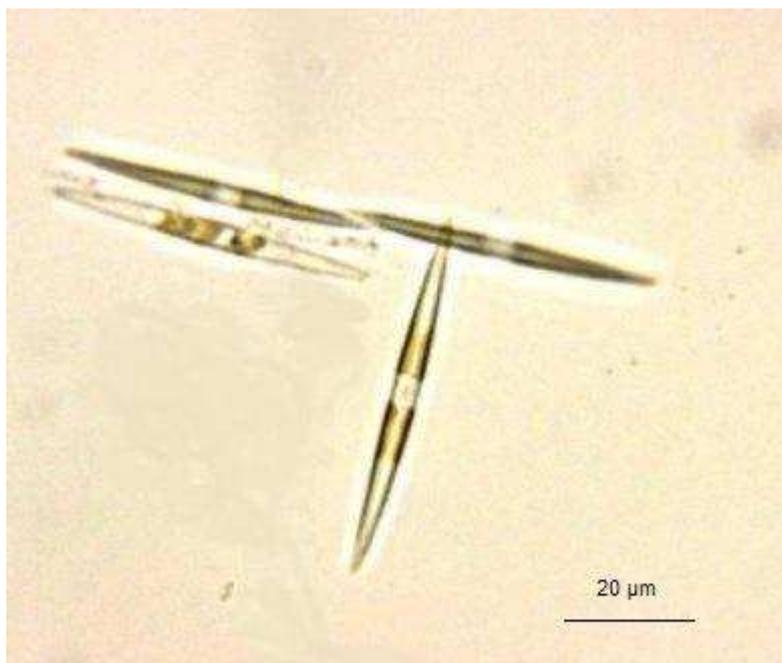


Figure 2 : *P. multiseries* CCMP2708 en microscopie photonique. Cliché G. Calu

Différentes espèces de *Pseudo-nitzschia* ont depuis été recensées comme productrices d'acide domoïque : *P.multiseries*, *P.delicatissima*, *P.pseudodelicatissima*, *P.australis*, *P.seriata*, *P.fraudulenta*, *P.calliantha*, *P.cuspidata*, *P.galaxiae*, *P.multistriata*, *P.turgidula* ainsi que quelques souches de *P.pungens* (espèce majoritairement non toxique) (Bates & Trainer, 2006). Parmi les autres genres de diatomées, *Nitzschia navis-varingica* produit de l'acide domoïque et les acides isodomoïques A et B (Kotaki *et al.*, 2004 ; Romero *et al.*, 2011). *Amphora coffeaeformis* (Shimizu *et al.*, 1989) est également suspectée de produire de l'acide domoïque.

La répartition des principales espèces productrices d'acide domoïque semble cosmopolite (Hasle, 2002) et les cas rapportés sur les cinq continents, de l'Afrique aux zones polaires couvrent l'ensemble des zones maritimes mondiales (tableau 1).

Lieu géographique	Espèces identifiées	Références
<u>Afrique</u>		
Delta du Nil, Egypte	<i>P. pungens</i>	Zingone <i>et al.</i> , 2004
Lagune de Bizerte, Tunisie	<i>P. calliantha</i>	Sahraoui <i>et al.</i> , 2006
Lagune de Moulay Bousselham , Maroc	<i>P. multiseriis</i>	Akallal <i>et al.</i> , 2000
Baie de Luanda, Angola	<i>Pseudo-nitzschia</i> spp.	Menezes Rangel & Silva, 2007; Blanco <i>et al.</i> , 2010
Baie de Lambert, Afrique du Sud	<i>P. australis</i>	Marangoni <i>et al.</i> , 2001
<u>Asie</u>		
Baie d'Ofunato, Japon	<i>P. multiseriis</i>	Kotaki <i>et al.</i> , 1996
Mer du Japon	<i>P. calliantha</i> , <i>P. multistriata</i> , <i>P. multiseriis</i>	Orlova <i>et al.</i> , 2008
Baie de Jinhae, Corée	<i>P. multiseriis</i>	Lee & Baik, 1997
Baies d'Ofunato et de Okkirai, Japon	<i>P. pungens</i>	Casteleyn <i>et al.</i> , 2008
Hai Phong, Vietnam	<i>P. pungens</i>	Casteleyn <i>et al.</i> , 2008
<u>Amérique du Nord</u>		
Île du Prince Edouard (Canada)	<i>P. multiseriis</i>	Bates <i>et al.</i> , 1989.
Île du Prince Edouard (Canada)	<i>P. delicatissima</i>	Smith <i>et al.</i> , 1990
Baie de Fundy, Canada	<i>P. pseudodelicatissima</i>	Martin <i>et al.</i> , 1990
Baie du Massachussetts, USA	<i>P. multiseriis</i>	Villareal <i>et al.</i> , 1994
Baie de Narragansett, USA	<i>P. multiseriis</i>	Hargraves <i>et al.</i> , 1993
Baie de Galveston, USA	<i>P. multiseriis</i>	Fryxell <i>et al.</i> , 1990 ; Buck <i>et al.</i> , 1992 ; Fritz <i>et al.</i> , 1992 ; Garrison <i>et al.</i> , 1992 ; Villac <i>et al.</i> , 1993
Baie de Monterey, USA	<i>P. australis</i>	Villac <i>et al.</i> , 1993
Baie de Monterey, USA	<i>P. multiseriis</i>	Sayce & Horner, 1996
Baie de Willapa, USA	<i>P. multiseriis</i>	Horner <i>et al.</i> , 1996
Hood Canal, USA	<i>P. multiseriis</i>	Villac <i>et al.</i> , 1993
Baie de Coos, USA ; Ilwaco, USA	<i>P. australis</i>	Trainer <i>et al.</i> , 2009
Détroit de Juan de Fuca, USA	<i>P. cuspidata</i>	
Near Tuxpam, Golfe du Mexique, Mexique	<i>P. pungens</i>	Casteleyn <i>et al.</i> , 2008

Tableau 1 : exemples de répartitions d'espèces de *Pseudo-nitzschia* spp. déterminées toxiques ou supposées toxiques (présence de toxines ASP dans les coquillages à proximité du bloom) par zones continentales.

Lieu géographique	Espèces identifiées	Références
<u>Amérique du Sud</u>		
Rio de Janeiro, Brésil	<i>Pseudo-nitzschia</i> spp.	Villac & Tenenbaum, 2001
Nord du Chili	<i>P. calliantha</i> , <i>P. australis</i>	Álvarez <i>et al.</i> , 2009
Terre de Feu, Argentine	<i>P. seriata</i> , <i>P. australis</i>	Almandoz <i>et al.</i> , 2008
<u>Europe</u>		
Danemark	<i>P. seriata</i>	Lundholm <i>et al.</i> , 1994
Irlande	<i>P. australis</i>	Cuzack <i>et al.</i> , 2002
France	<i>P. multiseriata</i>	Amzil <i>et al.</i> , 2001a
Normandie, France	<i>P. australis</i>	Klein <i>et al.</i> , 2010
Galice, Espagne	<i>P. australis</i>	Miguez <i>et al.</i> , 1996
Baies d'Alfacs et de Fangar, Espagne	<i>Pseudo-nitzschia</i> spp.	Quijano-Scheggia <i>et al.</i> , 2008
Mer de Wadden	<i>P. multiseriata</i>	Vrieling <i>et al.</i> , 1996
Mer Noire	<i>P. calliantha</i>	Besiktepe <i>et al.</i> , 2008
Mer d'Ecosse	<i>Pseudo-nitzschia</i> spp.	Turell <i>et al.</i> , 2008
Mer d'Ecosse	<i>P. seriata</i>	Fehling, <i>et al.</i> , 2004
Golfe de Naples	<i>P. galaxiae</i>	
Mer Tyrrhénienne, Italie	<i>Pseudo-nitzschia</i> spp.	Congestri <i>et al.</i> , 2008
Golfe de Thermaikos, Grèce	<i>P. pungens</i> , <i>P. pseudodelicatissima</i>	Kaniou-Grigoriadou <i>et al.</i> , 2005
<u>Océanie</u>		
Côtes australiennes	<i>Pseudo-nitzschia</i> spp.	Lapworth <i>et al.</i> , 2001
Marlborough, Nouvelle Zélande	<i>P. pungens</i>	Rhodes <i>et al.</i> , 1996
Baie de Plenty, Nouvelle Zélande	<i>P. fraudulenta</i>	Rhodes <i>et al.</i> , 1996
Taylor's Mistake, Steels Reef et Baie de Big Glory, Nouvelle Zélande	<i>P. pungens</i>	Casteleyn <i>et al.</i> , 2008
<u>Zones sub-polaires</u>		
Océan Nord-Pacifique sub-Arctique	<i>Pseudo-nitzschia</i> spp.	Marchetti <i>et al.</i> , 2008
Mer de Wedell (Antarctique)	<i>Pseudo-nitzschia</i> spp.	Almandoz <i>et al.</i> , 2008

Tableau 1 : exemples de répartitions d'espèces de *Pseudo-nitzschia* spp. déterminées toxiques ou supposées toxiques (présence de toxines ASP dans les coquillages à proximité du bloom) par zones continentales (suite).

4. Ecophysiologie de la croissance de *Pseudo-nitzschia sp.* et de la production d'acide domoïque

Les travaux d'écophysiologie menés sur le genre *Pseudo-nitzschia* sont effectués soit par prélèvements sur le terrain, soit par cultures en laboratoire (tableau 2). Dans le premier cas, les espèces étudiées sont assez nombreuses et dépendent des blooms en présence au moment de l'étude. Dans le second cas, les espèces retenues dépendent des souches isolées lors de campagnes de prélèvement. Depuis la crise de 1987, le modèle principal de *Pseudo-nitzschia* toxique reste ainsi *P. multiseriis*. Cependant, de nombreux travaux sont également menés sur *P. australis*, notamment suite à la première crise californienne de 1991.

4.1. Blooms et production toxinique *in situ*

Les crises ASP peuvent se produire dans toutes les zones côtières des cinq continents et impliquent différentes espèces de *Pseudo-nitzschia spp.* (tableau 1). Tous les blooms ne sont pas suivis de la même manière ; la plupart sont surveillés selon la concentration en diatomées dans l'eau de mer et les teneurs en acide domoïque dans les coquillages, et peu de données sur l'acide domoïque dissout ou particulaire sont alors rapportées. Par exemple, lors de la crise de Prince Edward Island en 1987, la population cellulaire de *P. multiseriis* atteignait les $15 \cdot 10^6$ cellules/l dans l'eau de mer pour une toxicité des moules allant jusqu'à 790 $\mu\text{g AD/g}$ de chair de coquillage. Lors d'un bloom de *Pseudo-nitzschia spp.* en baie de Cardigan (Prince Edward Island), à l'automne 1988, Smith *et al.* (1990) rapportent cependant des toxicités intracellulaires allant jusqu'à 7,5 pg/cellule et des populations cellulaires maximales dans le bloom de $1,2 \cdot 10^6$ cellules/l d'eau de mer.

Lors de la crise ASP de 1991 en baie de Monterey (Californie), les teneurs en *P. australis* atteignirent plus de 10^6 cellules/l avec des teneurs intracellulaires en acide domoïque pouvant dépasser les 10 pg/cellule et des concentrations d'acide domoïque dans l'eau de mer rapportées supérieures à 10 $\mu\text{g/l}$ (Walz *et al.*, 1994). Anderson *et al.* (2006) rapportent dans le passage de Santa Barbara (Californie) des blooms de *P. australis* ayant eu lieu en mai 2003 qui pouvaient atteindre jusqu'à $2,4 \cdot 10^6$ cellules/l dans l'eau de mer et qui présentaient une toxicité cellulaire de 0,14 à 2,1 pg/cellules. Les concentrations d'acide domoïque dans l'eau de mer s'échelonnaient entre 1 et 1,6 $\mu\text{g/l}$. Schnetzer *et al.* (2007) ont suivi au printemps 2004 (février-mars) sur les mêmes zones côtières et alentours un bloom de *Pseudo-nitzschia spp.*, de moindre

importance (jusqu'à 6.10^4 cellules/l) mais également dominé par la présence de *P. australis*. Les cellules présentaient jusqu'à 117 pg d'AD/cellule (avec une moyenne de 24 pg/cell) et les eaux de mer testées contenaient de l'acide domoïque dissous jusqu'à 12,7 µg/l. Trainer *et al.* (2009) ont par ailleurs rapporté un bloom de *P. cuspidata* en septembre 2004 dans la baie de Juan de Fuca (USA-Canada) jusqu'à $6,1.10^6$ cellules/l. Les cellules contenaient jusqu'à 63 pg d'AD/cell et les eaux de mer contenaient de l'AD dissous jusqu'à des teneurs de 4 nmoles/l.

4.2. Culture en laboratoire et cycle biologique

Lors de cultures en laboratoire, les teneurs toxiques intracellulaires rapportées restent inférieures aux teneurs maximales rapportées lors de prélèvements sur le terrain. La production d'acide domoïque (tableau 2) semble dépendre de la phase de croissance, et elle est plus importante en fin de culture. Les premières études menées sur *P. multiseriis* en batch ont ainsi démontré que l'acide domoïque est produit dès la phase post-exponentielle et en phase stationnaire (Bates *et al.*, 1989 ; Pan *et al.*, 1996a). L'acide domoïque serait probablement un métabolite secondaire produit en cas de croissance cellulaire ralentie (Pan *et al.*, 1996b).

Espèce	Type de culture	Température (°C)	AD particulière (pg.cell⁻¹)	Références
<i>P. multiseriis</i>	Batch	10	21	Bates <i>et al.</i> , 1989
	Batch	17	9,5	Bates <i>et al.</i> , 1991
	Chémostat	15	5,62	Pan <i>et al.</i> , 1996b
	Chémostat	15	2,21	Pan <i>et al.</i> , 1996c
	Batch	15	2	Douglas & Bates, 1992
	Batch	15	0,14-0,43	Pan <i>et al.</i> , 1996a
	Batch	15	0,1	Wang <i>et al.</i> , 1993
<i>P. australis</i>	Batch	15	12-37	Garrison <i>et al.</i> , 1992
	Batch	15	$10^{-4} - 1,77.10^{-3}$	Howard <i>et al.</i> , 2007
<i>P. turgidula</i>	Batch	18	0,03	Rhodes <i>et al.</i> , 1996
<i>P. pungens</i>	Batch	18	0,47	Rhodes <i>et al.</i> , 1996
<i>P. seriata</i>	Batch	15	14,7	Fehling <i>et al.</i> , 2004
	Batch	4	1,0-33,6	Lundholm <i>et al.</i> , 1994

Tableau 2 : exemples de cultures de *Pseudo-nitzschia spp.* en batch ou en continu rapportées dans la littérature et teneurs maximales d'acide domoïque intracellulaire (pg.cell⁻¹) obtenues (repris d'après Bates, 1998)

En culture continue, *P. multiseriis* produit de l'acide domoïque à l'état d'équilibre de la culture lors de chémostats Si-limitants (Pan *et al.*, 1996b) ou P-limitants (Pan *et al.*, 1996c). Il existe alors une corrélation négative entre le taux de division cellulaire et la teneur intracellulaire en acide domoïque (Bates *et al.*, 1996 ; Pan *et al.*, 1996b). De manière générale, en batch ou en continu, la production d'acide domoïque serait donc liée à un ralentissement du nombre de divisions cellulaires (Bates, 1998).

Le cycle biologique de *Pseudo-nitzschia* affecte également la production toxinique. Lors des divisions végétatives successives, la taille moyenne d'une population de *Pseudo-nitzschia* diminue selon une exponentielle inverse (Schwarz *et al.*, 2009) jusqu'à atteindre une taille minimale permettant la régénération par reproduction sexuée. A ce stade, la teneur cellulaire maximale en toxines chute drastiquement, avec des teneurs 50 à 100 fois moins importantes que pour des cellules isolées de populations naturelles (Bates *et al.*, 1999). La phase sexuée de *Pseudo-nitzschia* est une allogamie avec production d'isogamètes non-flagellées (Davidovich & Bates, 1998) aboutissant à la formation d'une auxospore à partir de deux gamètes non différenciables. Plusieurs clones régénérés en cellules initiales par cycle sexué présentèrent une production toxinique accrue, jusqu'à 67 pg (AD).cellule⁻¹ pour *P. multiseriis* (Bates, 1998).

4.3. Silicium et phosphates

Sholin *et al.* (2000) rapportèrent que les efflorescences de *Pseudo-nitzschia* pourraient être favorisées par des apports d'eau douce riches en silicium. Mais lors de la crise de Prince Edward Island en 1987, l'optimum de la production toxinique eut lieu pour des ratios mesurés dans l'eau de mer $[Si]/[N] < 1$ et $[P]/[N] < 1$ (Subba Rao *et al.*, 1988b). La production de toxines est plus forte dès que le milieu de culture se retrouve carencé en silicium (Pan *et al.*, 1996a). Lors de cultures en continu de *P. multiseriis*, le taux de divisions cellulaires dans un chémostat P-limité est inversement corrélé aux teneurs cellulaires en acide domoïque (Pan *et al.*, 1996c). Ces cultures en batch ou en chémostat P-limitant de *P. multiseriis* montrent également que la production d'acide domoïque débute dès que les teneurs en phosphates dans le milieu chutent en-dessous de 1 μ M (Pan *et al.*, 1996c). Ces carences en phosphates entraînent une augmentation de l'activité de l'alcaline phosphatase et de la production d'acide domoïque parallèlement à la chute du taux de phosphore dans le milieu, mais les mécanismes permettant d'expliquer ces observations restent inconnus (Bates, 1998).

Le silicium est un élément important pour la formation de la frustule des diatomées sous sa forme inorganique $\text{Si}(\text{OH})_4$, et est indispensable à la croissance cellulaire des diatomées (Martin-Jézéquel *et al.*, 2000). Le phosphore entre en jeu dans la composition des membranes plasmiques et des biomolécules, et joue un rôle majeur dans la physiologie et la biologie moléculaire des cellules.

Les phosphates, comme le silicium (voir chapitre 3), semblent avoir un rôle indirect sur la production d'acide domoïque en agissant plus spécifiquement sur la croissance initiale des cultures de *Pseudo-nitzschia*. Les relations inverses entre taux de croissance et production d'acide domoïque seraient donc sans relation directe, mais plutôt une conséquence logique d'un ralentissement de la croissance au profit des métabolismes secondaires.

4.4. Sources azotées

Depuis quelques années, l'augmentation des nutriments déchargés dans les milieux aquatiques par l'activité humaine est notée comme l'un des facteurs responsables des proliférations d'algues toxiques. Les activités aquacoles et le déversement d'eaux chargées en engrais et déchets d'origine humaine enrichissent les eaux côtières et des rivières en nutriments azotés et phosphatés, entraînant une eutrophisation des milieux côtiers (Glibert *et al.*, 2005). Alors que l'utilisation de fertilisants en agriculture est en augmentation à travers le monde, la fraction de fertilisants azotés organiques est également en forte hausse, en raison de l'utilisation massive d'urée comme engrais (la part de l'urée dans les fertilisants agricoles dépassant les 50% durant la dernière décade). Ce comportement entraîne en conséquence un changement dramatique dans la composition des apports azotés côtiers (Smil, 2001).

Dans le milieu naturel, une relation positive entre la teneur intracellulaire en acide domoïque chez *Pseudo-nitzschia spp.* et un déchargement en nitrates dans les eaux de rivière a été constatée lors d'un bloom en baie de Cardigan (Prince Edward Island) en 1988 (Smith *et al.*, 1990). De même, une relation entre l'augmentation des teneurs en nitrates déchargés dans la rivière Mississippi (Louisiane) et la prolifération de *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* a été rapporté (Parsons *et al.*, 2002). De manière générale, les enrichissements en azote total au détriment des teneurs en silicium semblent favoriser la production toxinique (Bates *et al.*, 1998).

En laboratoire, peu de sources azotées autres que le nitrate, l'ammonium ou l'urée ont été testées pour la croissance et la toxicité de souches de *Pseudo-nitzschia spp.* (voir chapitre 4). Les résultats obtenus laissent entrevoir une forte variation intra-et inter-spécifique des réponses physiologiques entre sources azotées, croissance et toxicité (Thessen *et al.*, 2009).

4.5. Température, irradiance, salinité

Les données concernant ces facteurs physico-chimiques sont peu nombreuses et diffèrent selon l'espèce étudiée.

Les relations entre la production d'acide domoïque et la température ont été très peu étudiées. Chaque espèce de *Pseudo-nitzschia* présenterait son propre optimum de température de croissance, en accord avec la distribution mondiale du genre. Les températures tolérées par *Pseudo-nitzschia sp.* s'échelonnent ainsi entre 2°C et 28°C (Hasle, 1965 ; Hasle *et al.*, 1996). Chez *P. multiseriis*, les taux de division et les teneurs en acide domoïque diminuent avec la température, avec un maximum de croissance cellulaire à 20°C et de production toxinique à 25°C (Lewis *et al.*, 1993). A l'inverse, les données collectées dans les eaux danoises indiquent que *P. seriata* présenterait de plus fortes teneurs cellulaires en acide domoïque à 4°C qu'à 15°C (Lundholm *et al.*, 2004). Le manque de données quant au comportement d'autres souches et d'autres espèces empêche de tirer des conclusions générales quant à l'influence de la température sur la croissance cellulaire et la production toxinique.

L'impact de l'intensité lumineuse sur la production d'acide domoïque a été étudié chez *Pseudo-nitzschia multiseriis*. Des études lors de cultures en batch et en semi-continu de souches de cette espèce ont montré de plus faibles taux de division à faible éclaircissement (35-45 $\mu\text{mol photons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) et de plus forts taux de division à fort éclaircissement (90-200 $\mu\text{mol photons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) (Bates *et al.*, 1991 ; Bates & Léger, 1992). Durant ces expériences, les teneurs cellulaires en acide domoïque furent plus faibles à 35 $\mu\text{mol photons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ qu'à 90-200 $\mu\text{mol photons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Le niveau d'irradiance nécessaire pour éviter des limitations de croissance et de production toxinique avoisina les 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Bates, 1998). D'après ces résultats, le stress lumineux n'induit donc pas les mêmes régulations physiologiques que les stress de carences en phosphates ou en silicium, ceci très probablement en raison de son action sur la photosynthèse et l'apport de carbone réduit nécessaire à la production d'acide domoïque.

Chez *P. multiseriis*, le taux de lipides décroît lors d'une carence en silicium durant la phase stationnaire (Parrish *et al.*, 1991), alors que la teneur cellulaire d'acide domoïque augmente

(Pan *et al.*, 1996a). Les taux cellulaires d'acide domoïque et d'acides gras sont positivement corrélés, avec une hausse des concentrations lorsque l'intensité lumineuse est augmentée (Whyte *et al.*, 1995). Ces données suggèrent que les voies de biosynthèse des acides gras et de l'acide domoïque seraient alors favorisées, et que l'activité lumineuse de la photosynthèse jouerait un rôle positif sur la biosynthèse de la toxine.

La gamme de tolérance à la salinité n'est pas encore connue pour toutes les espèces de *Pseudo-nitzschia spp.*, et son impact sur la production d'acide domoïque n'a pas été étudié. Les quelques éléments connus montrent une différence de comportement liée à l'espèce. Ainsi, une souche isolée de *P. multiseriis* de la Nouvelle Ecosse (Canada) cultivée à des salinités de 6 à 48 psu a montré un taux de croissance optimal pour des salinités comprises entre 30 et 45 psu (Jackson *et al.*, 1992). Stewart *et al.* (1997) ont rapporté chez *Pseudo-nitzschia multiseriis* un optimum de croissance pour une salinité de 33 psu et une croissance moindre mais identique pour 28 et 38 psu.

4.6. Bactéries

Les bactéries épiphytes ou intracellulaires (Silva, 1982) peuvent influencer la production toxinique des micro-algues. Par exemple, chez *Alexandrium lusitanicum*, la bactérie *Pseudomonas stutzeri* isolée à partir de ce dinoflagellé produit des toxines PSP ; le dinoflagellé axénique produit deux fois moins de toxines PSP qu'en co-culture avec cette bactérie (Doucette & Powell, 1997). Chez *Pseudo-nitzschia*, les premières études de ce phénomène ont été rendues possibles dès l'obtention des premières cultures axéniques de *P. multiseriis* par traitements antibiotiques (Douglas & Bates, 1992). Ces auteurs montrèrent que les cultures axéniques produisirent durant la phase stationnaire vingt fois moins d'acide domoïque que les cultures non-axéniques. Bates *et al.* (2004) rapportèrent pour une autre souche de *P. multiseriis* une chute de la production toxinique de 8 à 38 fois en conditions axéniques. Le taux de division des souches axéniques de *P. multiseriis* fut également plus faible que le taux de division des souches en présence de bactéries (Douglas & Bates, 1992).

Les bactéries présentes chez *Pseudo-nitzschia* semblent exclusivement épiphytes (Bates *et al.*, 2004) ; il n'existe aucune mise en évidence de bactérie intracellulaire (MacPhee *et al.*, 1992). Les bactéries isolées à partir de cultures de *Pseudo-nitzschia sp.* non-axéniques sont des bactéries gram négatives des genres *Alteromonas spp.* ou *Moraxella spp.* (Stewart *et al.*, 1997). Les bactéries épiphytes isolées à partir de cultures non-axéniques de *P. multiseriis* et cultivées

séparément ont pu croître favorablement en co-présence proline/glucose ou proline/acétate, mais furent inhibées en co-présence glycine/glucose ou glycine/acétate (Stewart *et al.*, 1997). Aucune de ces bactéries isolées et cultivées en laboratoire n'a produit directement de l'acide domoïque. La réintroduction de cultures de bactéries dans une culture axénique de *P. multiseriis* augmente de 2 à 115 fois la production toxinique (Bates *et al.*, 1995 ; Osada & Stewart, 1997). Toutefois, l'impact des bactéries sur la culture de *P. multiseriis* ne semble pas obligatoirement associé à une interaction spécifique algue-bactérie. En effet, l'ajout de bactéries issues d'une culture de *Chaetoceros sp.* (diatomée non toxique) a aussi permis d'augmenter la production de toxines d'une culture axénique de *P. multiseriis* (Bates, 1998).

Les interactions entre les bactéries et les diatomées sont en définitive très complexes, et il est difficile d'expliquer de manière précise comment les bactéries influencent la production d'acide domoïque. Il existe probablement une interaction dynamique entre les diatomées et les bactéries. En effet, lors de cultures en chémostat Si-limité de *P. multiseriis*, il a été souligné une corrélation positive entre le nombre de bactéries et le taux d'acide domoïque (Pan, 1994). Cette relation devint moins claire lorsque le flux de nutriments du chémostat fut interrompu et que la culture fut suivie en batch. En culture fermée, le nombre de bactéries était devenu moins important, suggérant soit la production d'une substance bactéricide par les diatomées, soit l'absence d'un facteur de croissance bactérien. L'ajout d'extraits bactériens dans des cultures de diatomées n'a cependant pas montré d'effet sur la production de toxines (Stewart *et al.*, 1997).

Lors de cultures en batch de *P. multiseriis* axéniques et non-axéniques (Kobayashi & Takata, 2009) en présence de nitrates, les teneurs en acide domoïque intracellulaire dans la culture non-axénique atteignirent jusqu'à 3,2 pg/cellule, alors qu'aucune teneur toxinique intracellulaire significative ne fut rapportée pour la culture axénique (Kobayashi & Takata, 2009). Les teneurs en acide domoïque extracellulaire pour la culture non-axénique atteignirent jusqu'à 250 ng/ml, alors que les teneurs en acide domoïque extracellulaire pour la culture axénique ne dépassèrent pas les 50 ng/ml. Ces résultats laissent entendre que bien qu'en absence de détection d'acide domoïque intracellulaire chez ces *P. multiseriis* axéniques, une production toxinique eut tout de même lieu, comme peuvent le suggérer les travaux précédents de Douglas et Bates (1992).

La nature exacte des interactions entre *Pseudo-nitzschia sp.* et ses bactéries épiphytes n'est donc pas clairement comprise, mais pourrait être liée à la production de composés carbonés. *P. multiseriis* produit du glucose et du sorbitol, et bien que cette production puisse être corrélée à

une hausse de la salinité du milieu de culture et correspondre à une réponse de stress osmotique (Stewart *et al.*, 1997), ces molécules pourraient également être utilisées par les bactéries. En effet, les bactéries associées à *P. multiseriis* présentent la capacité de produire de l'acide gluconique et du gluconolactone à partir de glucose (Stewart *et al.*, 1997). En retour, lors d'ajout d'acide gluconique/gluconolactone à des cultures axéniques de *P. multiseriis*, la croissance cellulaire fut très peu affectée (Osada & Stewart, 1997) et la production d'acide domoïque rapportée augmenta fortement par rapport à des cultures témoins axéniques ou non-axéniques uniquement mises en présence de nitrates (Osada & Stewart, 1997). La production d'acide domoïque pourrait être une réponse à la présence d'acide gluconique/gluconolactone dans le milieu extra-cellulaire (Osada & Stewart, 1997).

L'effet de certains acides aminés a aussi été étudié, à la fois sur la croissance des diatomées, mais aussi sur les bactéries associées. La croissance de la souche non-axénique *P. multiseriis* N a été fortement augmentée en présence de proline, tandis qu'en présence de glycine, elle resta similaire au milieu témoin enrichi en nitrates (Stewart *et al.*, 1997). De même, les croissances de *P. multiseriis* N furent plus fortes en co-présence de proline/glucose ou de proline/acétate qu'en co-présence de glycine/glucose ou de glycine/acétate (Stewart *et al.*, 1997). La croissance de cultures axéniques de *P. multiseriis* N ne fut pas augmentée en présence de proline, laissant les auteurs supposer que les bactéries joueraient un rôle dans l'utilisation de cet acide aminé comme source nutritive par *P. multiseriis* (Stewart *et al.*, 1997). Cependant, lors de cultures axéniques de la souche *P. multiseriis* KP-59, la croissance des diatomées fut affectée par l'ajout de glutamate seul ou en co-présence d'acide gluconique / gluconolactone, de proline seule ou en co-présence d'acide gluconique / gluconolactone, par rapport à une culture témoin axénique en présence de nitrates uniquement (Osada & Stewart, 1997). Ces ajouts affectèrent également la production d'acide domoïque, qui ne fut importante qu'en présence seule d'acide gluconique / gluconolactone (Osada & Stewart, 1997). Les effets physiologiques de l'acide glutamique, de l'acide gluconique et du gluconolactone sur *P. multiseriis* ne sont cependant pas encore clairement compris (Osada & Stewart, 1997).

D'autre part, Stewart (2008) a montré que les bactéries associées à *P. multiseriis* sont capables d'absorber l'acide domoïque, mais les voies de dégradation ne sont pas connues. La production et les interactions de composés organiques utilisables par les algues et les bactéries sont donc très complexes, et leur impact sur la croissance et la production d'acide domoïque est encore très méconnu. Plus particulièrement, l'interaction algue-bactérie serait une hypothèse à approfondir quant au rôle de l'acide domoïque chez *Pseudo-nitzschia*.

5. Biosynthèse de l'acide domoïque

Les voies de biosynthèse de l'acide domoïque ne sont pas encore clairement identifiées. Cependant, deux précurseurs semblent impliqués dans ce métabolisme (figure 3a) : l'alpha-cétoglutarate et le géranyl pyrophosphate (Bates, 1998).

Les premières études menées sur la recherche des voies métaboliques à l'origine de l'acide domoïque furent réalisées en incorporant de l'acétate marqué en ^{13}C et rajouté dans le milieu de cultures axéniques de *P. multiseriis* (Douglas *et al.*, 1992). Le suivi de ce marquage isotopique fut réalisé par spectrométrie RMN. L'incorporation progressive des différents acétates marqués en $^{13}\text{C}_1$ et en $^{13}\text{C}_2$ sur les précurseurs métaboliques permet de mettre en évidence le passage de ces précurseurs via le cycle de Krebs. Il semblerait donc qu'un composé dérivant de l' α -oxaloacétate, après passage dans le cycle de Krebs (figure 4), soit impliqué dans la biosynthèse de l'acide domoïque.

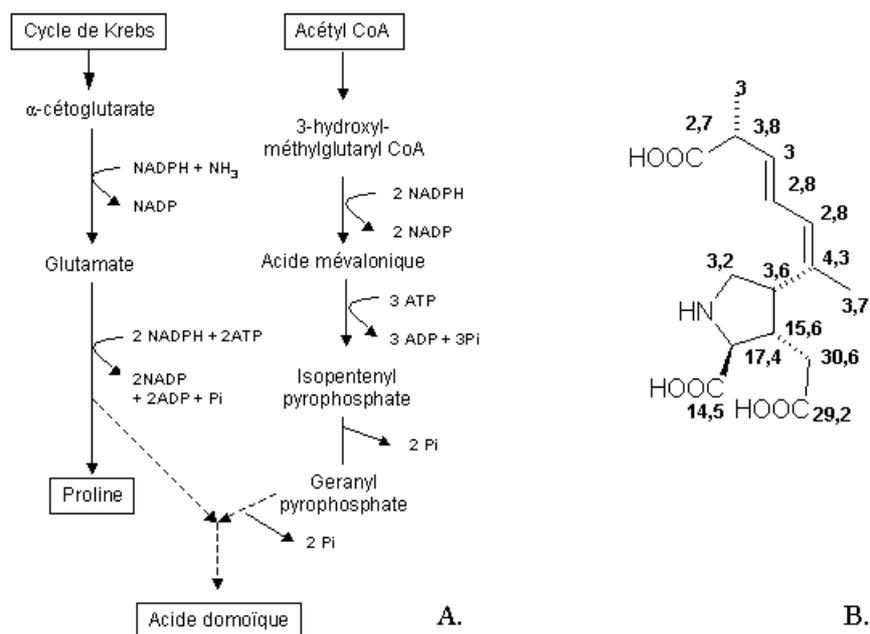


Figure 3 : biosynthèse de l'acide domoïque : A. voies supposées de cette biosynthèse (d'après Pan, 1994). B. pourcentage d'enrichissement en ^{13}C de chaque carbone après marquage isotopique de l'acide domoïque par l'acétate [1-2- ^{13}C] (d'après Ramsey *et al.*, 1998).

Ramsey *et al.* (1998) montrèrent que l'incorporation d'acétate [1- ^{13}C] ou [1-2- ^{13}C] dans l'acide domoïque aboutit à un marquage isotopique variable (figure 3b). Ces différences correspondraient à la portion d'acide domoïque provenant du précurseur α -cétoglutarate (pourcentage de ^{13}C incorporé compris entre 14,5 % et 30,6 %) et à la portion provenant d'un précurseur isoprénoïde (pourcentage de ^{13}C incorporé compris entre 2,7 et 4,3 %). Cette différence s'expliquerait par une probable compartimentation de la biosynthèse de ces deux

précurseurs (Ramsey *et al.*, 1998) : l'α-cétoglutarate proviendrait du cycle de Krebs se déroulant dans la mitochondrie (figure 4) tandis que la synthèse du géranyl pyrophosphate pourrait se dérouler dans le cytosol ou dans le chloroplaste.

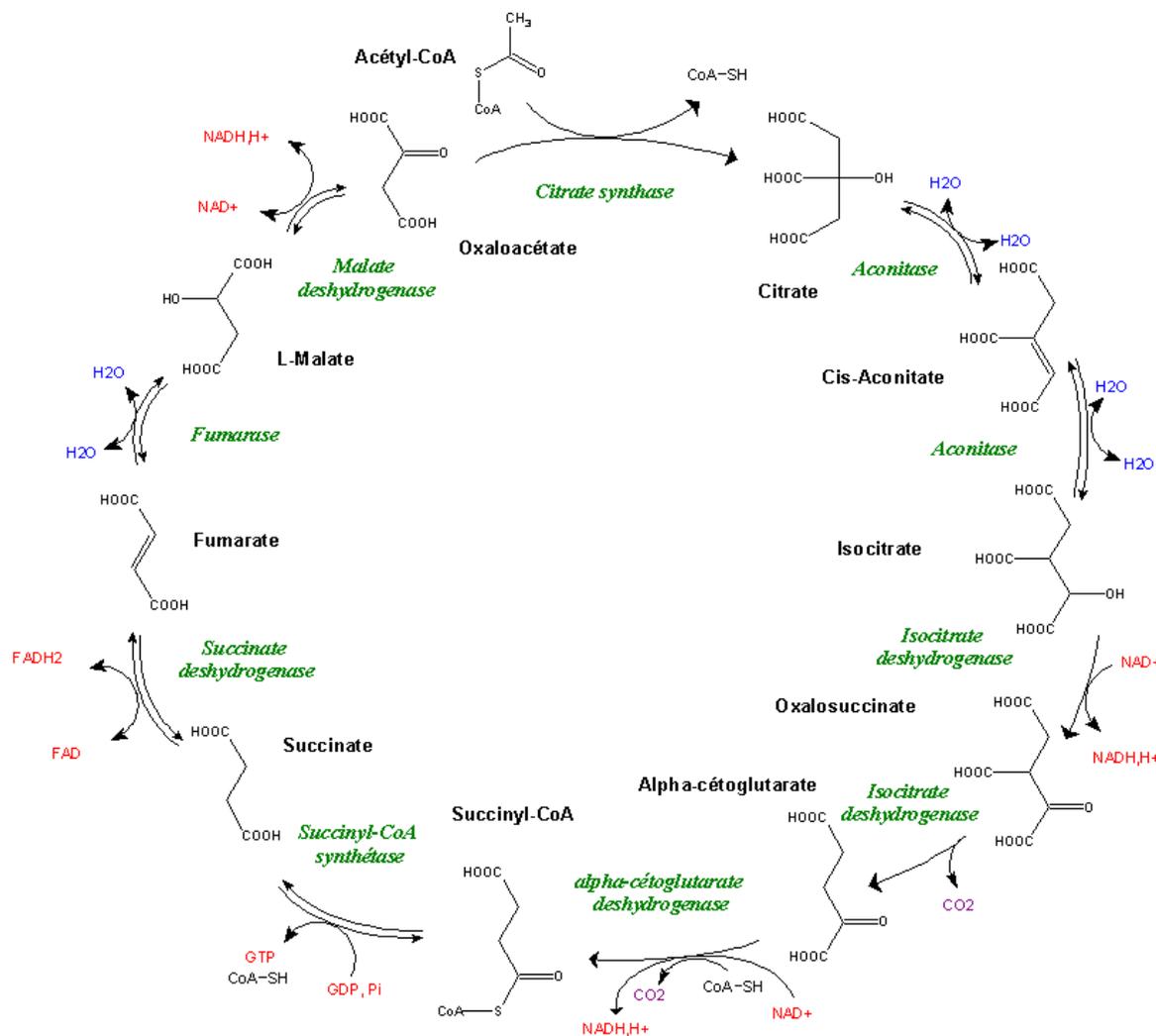


Figure 4 : le cycle de Krebs

6. Accumulation de l'acide domoïque et de ses dérivés chez la faune marine et effets physiologiques

Le phytoplancton étant le premier maillon de la chaîne trophique, des consommateurs primaires marins risquent donc de se contaminer en absorbant des cellules de *Pseudo-nitzschia* toxiques. L'accumulation et les effets des toxines kanoïdes sur la faune marine sont variables : elles dépendent de la sensibilité de chaque espèce (variabilité spécifique, voire intraspécifique) et de la région de l'épisode d'efflorescence (variabilité géographique). Lors de l'épisode de la baie de Cardigan (Prince Edward Island) fin 1987, le taux d'AD présent dans les moules bleues

(*Mytilus edulis*) atteint 900 µg/g de chair (Addison & Stewart, 1989). En 1988 en baie de Fundy, les teneurs allèrent de 1,2 à 38 µg/g de chair et jusqu'à 460 µg/g de chair chez le pétoncle géant (*Placopecten magellanicus*) sur le même site de prélèvements (Gilgan *et al.*, 1990). En 1999, lors de la découverte de près de 70 otaries en Californie mortes suite à l'ingestion d'anchois intoxiqués, les moules analysées sur la zone ne contenaient pas d'acide domoïque (Lefebvre *et al.*, 1999). Il n'est pas possible de se fier systématiquement et uniquement à la présence d'acide domoïque dans les moules (*Mytilus sp.*) pour détecter un événement d'efflorescence de *Pseudo-nitzschia* toxiques (Lassus & Marcaillou - Le Baut, 2001). Par exemple, les suivis toxiques de quatre sites grecs entre effectués en 2002 et 2003 soulignèrent que certains mollusques bivalves peuvent accumuler de l'acide domoïque dans leurs tissus, alors que sur le même site, les moules méditerranéennes (*Mytilus galloprovincialis*) n'en contiennent pas ou peu (Kaniou-Grigoriadou *et al.*, 2005). Désigner une espèce « sentinelle » comme bio-indicatrice dans le cadre d'une surveillance des taux d'acide domoïque dans l'environnement reste donc difficile.

Après contamination, les animaux marins vont accumuler les toxines amnésiantes dans différents tissus. Des études histologiques menées chez la moule bleue (*Mytilus edulis*) ont montré que les tissus et organes concernés sont principalement les glandes digestives, les reins et les branchies (Novaczek *et al.*, 1991). Dans le cas de l'huître *Crassostrea gigas*, Jones *et al.* (1995a) notèrent des différences par rapport aux moules avec une accumulation répartie dans tous les tissus des huitres et sans prévalence dans le tractus digestif comme chez les moules. A l'inverse, le couteau du Pacifique (*Siliqua patula*) accumule l'acide domoïque dans les parties comestibles (muscles adducteurs et du pied, siphon, manteau) (Lassus & Marcaillou-Le Baut, 2001). Chez *Placopecten magellanicus*, une expérience de décontamination suite à une exposition à des cultures toxiques de *P. multiseris* a montré que 50% de l'acide domoïque ingéré était incorporé d'abord dans les glandes digestives, puis en plus faible quantité dans les muscles adducteurs et autres tissus (Douglas *et al.*, 1997). Chez la coquille Saint-Jacques (*Pecten maximus*), 79% de la toxine est présente dans la glande digestive et 14% dans les tissus autres que les muscles ou les gonades (Arévalo *et al.*, 1998).

D'autre part, des travaux menés sur différentes espèces permettent de constater que les effets de l'acide domoïque sont variables. Chez l'huître (*Crassostrea gigas*), la présence de toxines amnésiantes entraîne un état de stress physiologique (Jones *et al.* 1995). Ces auteurs ont montré qu'après quatre heures d'exposition à *Pseudo-nitzschia multiseris*, les valves des huîtres vont se refermer. Le taux et l'activité des hémocytes, indicateurs de stress chez de

nombreux animaux (Cheng, 1975), augmentent significativement après 4 heures, puis déclinent et tendent vers des valeurs inférieures aux témoins, alors qu'en parallèle la concentration d'acide domoïque dans les huîtres augmente. Le couteau du Pacifique (*Siliqua patula*) possède deux récepteurs sensibles aux kanoïdes au niveau de ses siphons, l'un à faible affinité et l'autre à forte affinité vis à vis de l'acide kainique, ce qui le rend moins sensible à la présence d'acide domoïque et de ses dérivés dans l'environnement (Trainer & Bill, 2004). Le pétoncle (*Chlamys hastata*) meurt rapidement après avoir été exposé à des cultures toxiques de *P. multiseriis*, alors que le pétoncle géant *Placopecten magellanicus* ne présente pas de mortalité à court terme lorsqu'il est nourri avec la même espèce toxique (Douglas *et al.*, 1997). L'huître américaine *Crassostrea virginica* est capable en partie de sélectionner le phytoplancton consommé, et ne consomme pas de diatomées du genre *Pseudo-nitzschia*; ceci peut expliquer l'absence de crises ASP dans ces coquillages en Louisiane malgré les épisodes d'efflorescences de *Pseudo-nitzschia* toxiques observés dans ce territoire marin (Thessen *et al.*, 2010). Les moules ne semblent pas physiologiquement perturbées par la présence d'acide domoïque, mais peuvent en accumuler des quantités importantes dans leurs tissus tout en les éliminant très rapidement : en 24 heures, 17 à 50 % des toxines sont ainsi éliminées (Novaczek *et al.*, 1992). Pour la moule *Mytilus galloprovincialis*, la dépuración de coquillages contaminés à des teneurs de 153 µg(AD)/g de chair se réalise en deux jours, dans une eau à 22°C et de salinité de 31 psu, et permet d'observer une baisse de 86% des concentrations en acide domoïque (Blanco *et al.*, 2002). Des organes comme les branchies et les reins joueraient un rôle important dans l'accumulation et l'élimination de l'acide domoïque et autres toxines amnésiantes chez la moule (Madhyastha *et al.*, 1991). Tous les mollusques n'ont pas la même cinétique de décontamination, puisque *Siliqua patula*, quant à lui, élimine 50% des toxines en 86 jours (Jeffery *et al.*, 2004). Chez la coquille Saint-Jacques (*Pecten maximus*), l'essentiel de la cinétique de décontamination est liée à la glande digestive, qui contient la majorité des toxines. Le temps de décontamination varie selon l'environnement et prend près d'une centaine de jours pour faire chuter de moitié la concentration d'acide domoïque dans les tissus (Blanco *et al.*, 2006). Dans le cas d'autres espèces, comme le crabe *Cancer magister*, les cinétiques sont encore différentes. Selon les espèces, les individus contaminés après ingestion de coquillages toxiques montrent des performances variées d'élimination des toxines accumulées. A titre d'exemple, de 4% à 38% en 7 jours pour des crabes nourris avec des Bivalves non toxiques et de 57% à 89% en 21 jours pour des crabes à jeun (Lund *et al.*, 1997).

En remontant la chaîne alimentaire, l'acide domoïque peut également contaminer des poissons qui vont progressivement l'accumuler dans leurs tissus. Si ces derniers ne semblent

pas affectés par les toxines amnésiantes, ils peuvent cependant contaminer et entraîner la mort de prédateurs comme les oiseaux marins (Sierra Beltrán *et al.*, 1997) et les mammifères marins (Silvagni *et al.*, 2005). Les sardines (*Sardina pilchardus*) peuvent également accumuler de l'acide domoïque dans leurs viscères, mais pas dans leurs muscles, ce qui permet de limiter le risque de contamination humaine tant que seulement la chair est consommée (Costa & Garnido, 2004). Des travaux récents menés sur le tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*) montrent l'apparition d'un stress oxydatif (suivi de l'activité d'enzymes antioxydantes) en présence de teneurs croissantes d'acide domoïque (Mazmanci & Çavaş, 2010). De même, la génotoxicité de l'acide domoïque sur cette même espèce a été démontrée (Çavaş & Könen, 2008). Enfin, l'acide domoïque pourrait aussi être responsable d'intoxications de cétacés. Une étude sur les fécès de baleines bleues (*Balaenoptera musculus*) et à bosse (*Megaptera novaeangliae*) a pu montrer la présence de toxines en association avec celle de frustules de *P. australis* (Lefebvre *et al.*, 2002).

7. Neurotoxicité de l'acide domoïque et de ses dérivés

Les kanoïdes possèdent une similarité structurale avec l'acide glutamique (figure 5), neurotransmetteur du système nerveux central (SNC) chez les Mammifères. Ils vont par conséquent pouvoir se lier aux récepteurs neuronaux AMPA (désigné sous le terme de son activateur, le α -amino-3-hydroxy-5-méthylisozol-4-propionate) et kainates, et activer secondairement les récepteurs NMDA (N-Méthyl-D-Aspartate) (Berman & Murray, 1997). Ces récepteurs sont deux sous-types de la classe des récepteurs glutamates ionotropiques (Nanao *et al.*, 2005).

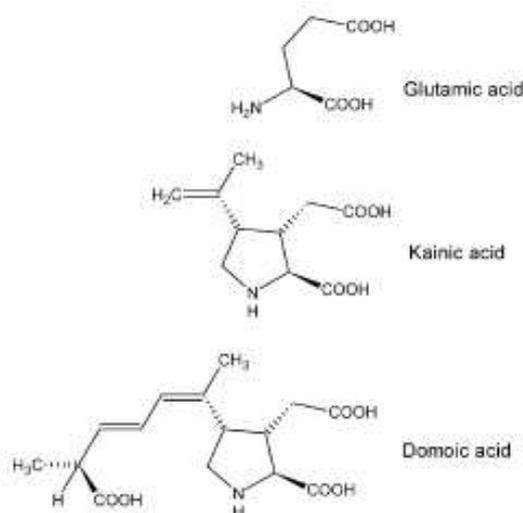


Figure 5 : analogie de structure entre le glutamate, l'acide kainique et l'acide domoïque (Jeffery *et al.*, 2004).

Les rapports de toxicité de l'acide domoïque et de ses dérivés ont été déterminés par différentes méthodes (Wright *et al.*, 1990b ; Sawant *et al.*, 2007 ; Hampson *et al.*, 1992) :

AD >> Iso D ; Iso F > Iso E (expériences de « voltage-clamp »)

AD = acide épidoïmoïque > Iso A >> Iso C (fixation compétitive sur récepteurs GluR6)

La fixation de la toxine sur le récepteur neuronal est influencée par la stéréochimie de la toxine en C₄ ainsi que par la nature et la conformation du substituant en C₄ (Clayden *et al.*, 2005). Il a été prouvé qu'une configuration *Z* en C'1 est plus active qu'une configuration *E*. De plus, la présence de carbones sp₂ (insaturations) dans la chaîne latérale augmente d'un facteur 1000 l'activité biologique de l'acide domoïque et de ses dérivés par rapport à un composé kanoïde à chaîne latérale saturée (Clayden *et al.*, 2005).

L'affinité de l'acide domoïque et de ses dérivés pour les récepteurs kaïnates varie sensiblement d'une molécule à l'autre : L'IC₅₀ pour l'acide domoïque et les acides isodomoïques D, E et F sont respectivement de 4,9 nM, 28 nM, 1400 nM et 940 nM (Jeffery *et al.*, 2004). Chez le récepteur kaïnate GluR-5, l'affinité (Kd) pour l'acide domoïque est de 2nM alors qu'elle est de 30 nM pour l'acide kanaïque (Sommer *et al.*, 1992). La réponse des récepteurs liés au ligand entraîne une libération de Ca²⁺ dans le cytosol des neurones via l'activation des récepteurs NMDA, provoquant une neurodégénérescence et l'apparition d'effets toxicologiques (Berman *et al.*, 2002). Des études menées sur des neurones granulaires du système nerveux central de souris montrent que de faibles doses d'acide domoïque (de l'ordre de 100 nM) induisent une apoptose cellulaire. Le mécanisme impliquerait un stress oxydatif (activation des kinases JNK et p38), un dysfonctionnement mitochondrial et l'activation de la caspase-3, enzyme-clé de l'apoptose cellulaire (Giordano *et al.*, 2008).

Chez les Mammifères, des données physiologiques sur les rongeurs et les primates suggèrent que la plus grande partie de l'acide domoïque absorbée par voie orale se retrouve éliminée dans les excréments (Jeffery *et al.*, 2004) et de manière bien moins importante dans l'urine. Ce qui laisse supposer que l'acide domoïque est très mal absorbé au niveau de la barrière intestinale. De plus, il semblerait que les reins possèdent au niveau des glomérules un transporteur actif pour l'élimination de l'acide domoïque.

Par contre, l'acide domoïque présent dans le sang va pouvoir traverser la barrière hémato-encéphalique, avec une constante de transport légèrement supérieure à celle du saccharose et

une constante K_i de l'ordre de $1,1 \cdot 10^6 \text{ ml} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour l'acide domoïque et de $1,7 \cdot 10^6 \text{ ml} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour le saccharose) (Jeffery *et al.*, 2004).

Les effets toxicologiques associés à l'acide domoïque ont été étudiés chez différents modèles animaux, dont les rongeurs *Mus musculus* et *Rattus norvegicus*. Le DL_{50} chez la souris est ainsi de 2,4 mg de toxine par kg d'animal (Jeffery *et al.*, 2004).

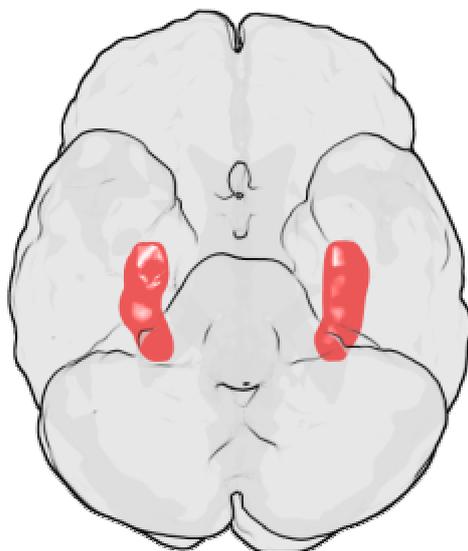


Figure 6 : Coupe horizontale du cerveau (front vers le haut). Les deux lobes de l'hippocampe sont représentés en rouge. (Wikipedia - licence libre)

Les symptômes observés après injection touchent le système nerveux central, et plus particulièrement la zone de l'hippocampe du cerveau (figure 6). Des examens neuropathologiques effectués chez des souris ou des rats ont montré la présence d'œdèmes et de dégénération neuronales au niveau principalement de la corne d'Ammon 3 (CA3). L'hippocampe étant la zone du cerveau impliquée dans la mémoire fonctionnelle, les effets de l'acide domoïque entraînent des troubles comportementaux et une perte de mémoire chez les rongeurs. Cependant, des injections répétées chez le modèle murin atténuent les effets neurologiques observables, ce qui laisse supposer que le cerveau peut s'accommoder de la perte de mémoire initiale en utilisant des processus alternatifs (Jeffery *et al.*, 2004).

Les examens menés chez les victimes lors de l'épisode toxique de 1987 à Prince Edward Island ont également permis d'obtenir des données médicales sur les intoxications par toxines ASP chez l'Homme. Les électroencéphalogrammes de patients réalisés une semaine après l'intoxication montrèrent un ralentissement de l'activité cérébrale. Lorsque des tests neurologiques et psychologiques furent effectués, 4 à 6 mois plus tard, certains patients présentaient toujours des perturbations de la mémoire et des troubles amnésiques. Des

autopsies réalisées sur quatre patients, décédés 4 à 6 mois après intoxication, montrèrent la présence de nécroses et la perte d'astrocytes au niveau des régions CA1 et CA3 de l'hippocampe. Des lésions étaient également visibles au niveau du thalamus et du cortex subfrontal. Des autopsies, réalisées sur des patients âgés décédés trois ans après l'intoxication ASP, montrèrent de sérieuses scléroses au niveau des deux structures bilatérales de l'hippocampe (Jeffery *et al.*, 2004).

A partir de ces données, une estimation du taux d'acide domoïque dans les moules ayant causé des symptômes ASP en 1987 a été estimé proche de 200 µg d'AD / g de moules, et un seuil sanitaire de 20 µg d'AD / g de chair de coquillage a été retenu. Cette valeur, d'abord mise en application comme seuil d'interdiction de consommation au Canada, a par la suite été reprise dans de nombreux pays, comme aux USA, dans l'Union Européenne, en Nouvelle Zélande ou encore en Australie (Jeffery *et al.*, 2004).

L'acide domoïque entraîne également des perturbations du développement animal, pré-natal comme post-natal. Des rats nouveaux-nés exposés à la toxine présentent des symptômes respiratoires, des hémorragies, des dégénérescences neuronales et des mouvements stéréotypés. Des examens histopathologiques ont suggéré que les changements comportementaux étaient liés à des dommages au niveau de la corde spinale plutôt qu'au niveau de liaisons cérébrales (Jeffery *et al.*, 2004). De plus, une administration d'acide domoïque à des femelles gestantes (7-16 jours de gestation) entraîne une baisse du nombre de fœtus vivants à 22 jours, avec une hausse des anomalies viscérales ou squelettiques (Jeffery *et al.*, 2004).

Enfin, la neurotoxicité de l'acide domoïque pourrait être potentiellement augmentée par l'action synergique d'autres toxines présentes dans l'environnement. Novelli *et al.* (1992) ont rapporté une augmentation de la toxicité de l'acide domoïque par la potentiation d'acides aminés excitateurs (glutamate et aspartate) sur des neurones mis en culture. Lors de bioessais sur larves de Diptères (*Calliphora vomitoria*), la co-présence de peptaibol (longibranchine-A-1) et d'acide domoïque entraîna une dose effective (ED₅₀) plus faible qu'en présence d'acide domoïque seul (Ruiz *et al.*, 2010). Ces résultats pourraient amener à explorer de nouvelles pistes de réflexion lors de toxicités anormalement élevées rapportées dans des coquillages.

Partie 2 : Matériel et Méthodes

1. Culture de diatomées et souchothèque

1.1. Salles de culture

Toutes les cultures ont été réalisées dans des salles de culture climatisées à 16°C dans des conditions d'éclairement d'alternance jour/nuit de 12h :12h. Les cultures en système ouvert comme fermé sont installés sur des rampes face à des néons. L'intensité lumineuse mesurée est de $110 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Les salles de culture ont été maintenues en conditions aseptisées par un nettoyage régulier à l'éthanol 70° et à l'eau de javel diluée.

1.2. Choix et formulation des milieux de culture

Les milieux de culture ont été faits à partir d'eau de mer enrichie en macro- et micro-nutriments. Plusieurs tests ont été réalisés pour définir l'eau de mer utilisée, les enrichissements et les conditions de préparations des milieux. L'ensemble de ces tests et les protocoles retenus sont détaillés dans les paragraphes suivants. Deux types d'eau de mer ont été utilisés durant ces travaux : de l'eau de mer naturelle et de l'eau de mer artificielle.

1.2.1. Eau de mer naturelle

L'eau de mer naturelle utilisée provient de pompages effectués au large de Saint-Malo (Ile-et-Vilaine, France). Sa qualité physico-chimique a été contrôlée par dosages physico-chimiques avant chaque utilisation par nos soins ou par les laboratoires du centre Ifremer Nantes (voir tableau 3).

Macro-nutriment	Nitrates (1)	Ammonium (2)	Urée (2)	Silicium (2)
Concentration molaire (μM)	0	0,49	0	6,8

Tableau 3 : dosages chimiques pratiqués sur l'eau de mer brute provenant du large de Saint-Malo. (1) dosage réalisé par Ifremer Nantes. (2) dosage réalisé lors de ces travaux de thèse.

1.2.2. Eau de mer artificielle

Trois formulations d'eau de mer artificielle ont été utilisées : Aquil (Morel *et al.*, 1979 ; Price *et al.*, 1989), Esaw (Harrison *et al.*, 1980 ; Berges *et al.*, 2001) et Yerkese modifié (Tesson, 2008). Les solutions salines entrant dans la composition de ces eaux de mer artificielles (tableau 4) n'ont pas été enrichies comme indiqué dans leur composition complète de milieu (voir annexe 1) mais selon l'enrichissement pour milieux de culture L1 + silicium (107 μM) (Guillard & Hargraves, 1993). Ces différentes formulations de milieu de culture à partir d'eau de mer naturelle ou artificielle ont été testées sur des cultures de *Pseudo-nitzschia multiseriis* CCL70 menées en duplicat.

D'après des tests préliminaires effectués sur la souche *P. multiseriis* CCL 70, les meilleurs taux de croissance furent obtenus avec de l'eau de mer artificielle Yerseke modifiée ou avec de l'eau de mer naturelle (figure 7). La formulation Aquil donna des croissances plus faibles, et la formulation Esaw inhiba presque totalement la croissance. L'eau mer artificielle Yerseke modifié enrichie selon la formulation L1 + silicium (107 μM) (Guillard & Hargraves, 1993) a été retenue pour les cultures de *Pseudo-nitzschia sp.* en fonction des besoins expérimentaux.

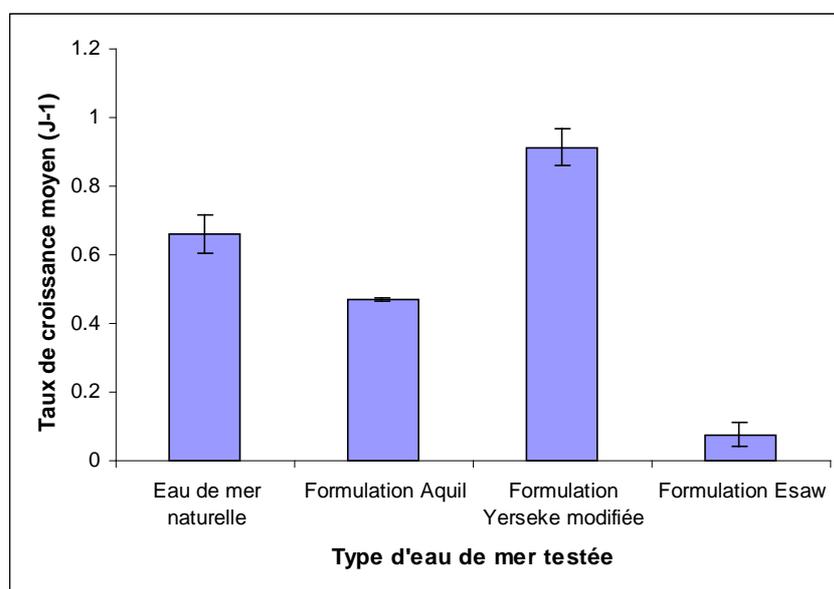


Figure 7 : comparaison des taux de croissance de *P. multiseriis* CCL70 suivant différents types d'eau de mer naturelle ou artificielle testés ($n=2$).

Sel ajouté	Aquil	Yerseke modifié	Esaw
NaCl	420 mM	344,8 mM	368 mM
Na ₂ SO ₄	28,8 mM	9,93 mM	25 mM
KCl	9,39 mM	7,24 mM	8,03 mM
NaHCO ₃	2,38 mM	7,24 mM	8,03 mM
KBr	0,84 mM	0,17 mM	0,725 mM
H ₃ BO ₃	48,5 μM	258 μM	372 μM
NaF	71,5 μM	0 μM	66,7 μM
MgCl ₂ , 6H ₂ O	54,6 mM	34,4 mM	47,1 mM
CaCl ₂ , 2H ₂ O	10,5 mM	8,16 mM	9,14 mM
SrCl ₂ , 6H ₂ O	63,8 μM	45 μM	81,9 μM

Tableau 4 : comparaison des solutions salines constitutives des formulations d’eaux de mer artificielle Aquil, Yerseke modifié et Esaw sans enrichissement. Ces solutions salines sont ensuite enrichies selon le milieu de culture L1 + silicium (107μM).

1.2.3. Méthodes de stérilisation de l’eau de mer

Comme il est connu que l’autoclavage de flacon pyrex peut entraîner un relargage du silicium dans le milieu, l’influence de l’autoclavage sur des ballons pyrex contenant de l’eau de mer a été suivie, et comparée à l’évolution des teneurs en silicium lors d’un autoclavage d’eau de mer dans un flacon polycarbonate (Nalgene). Les contenants pyrex ou Nalgene une fois autoclavés ont été stockés pendant 7 jours, et les teneurs en silicium ont été ensuite mesurées. Les teneurs ont été comparées aux concentrations en silicium d’une eau de mer témoin laissée 7 jours dans un ballon pyrex non autoclavé (figure 8). L’expérience est reproduite en triplicat.

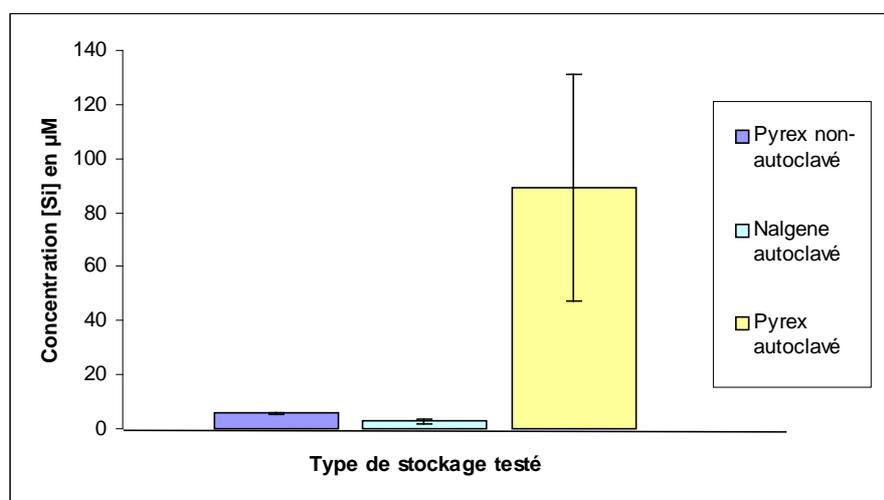


Figure 8 : Concentration finale en silicium de l’eau de mer en fonction de la méthode de stérilisation et de la nature du contenant ($n=3$)

Les résultats ont montré que l'autoclavage de l'eau de mer dans des ballons pyrex augmentait la concentration initiale en silicium dissous jusqu'à des concentrations proches de 90 μM en moyenne, pouvant perturber les conditions de culture expérimentale (ajout de 107 μM de silicium dans nos milieux de culture). Le flacon en polycarbonate autoclavé ne modifia pas la teneur initiale en silicium de l'eau de mer, tandis que le flacon témoin en pyrex non-autoclavé ne relargua que de très faibles quantités de silicium (figure 8).

Les tests préalables ont donc montré que, pour éviter un relargage de silicium dans le milieu, l'eau de mer ne doit pas être autoclavée dans de la verrerie pyrex, mais plutôt dans des contenants plastiques autoclavables. Le stockage d'eau de mer dans des contenants en pyrex est acceptable pour un usage à court terme, dans la mesure où le relargage de silicium reste faible au bout de 7 jours. La culture expérimentale devra se faire si possible dans des flacons en plastique vendus stériles, où bien les flacons pyrex devront être autoclavés à sec en parallèle du milieu de culture.

La méthode suivante a donc été retenue pour l'eau de mer naturelle. Avant enrichissement en milieu de culture, l'eau de mer naturelle subit une double filtration (Rodier, 1984). La première filtration est réalisée sur filtre de nitrocellulose 0,2 μm de diamètre. Le filtrat est ensuite stocké 7 jours à l'abri de la lumière. La seconde filtration est réalisée en condition stérile sur membrane millipore 0,22 μm en PES (polyethersulfone). L'eau de mer ainsi préparée est stockée en flacons plastique polycarbonate (Nalgène) ou pyrex autoclavés et conservée au réfrigérateur à 5°C avant utilisation.

L'eau de mer artificielle non-enrichie a été autoclavée dans des flacons Nalgène de 10 litres. Après autoclavage, la salinité et le pH sont contrôlés et réajustés si besoin. L'eau de mer naturelle et artificielle filtrées sont par la suite enrichies avec ces solutions-mères ainsi préparées en conditions stériles.

1.2.4. Choix de la formulation d'enrichissement des eaux de mer stériles

1.2.4.1. Sélection du milieu de référence

Le milieu de culture final nécessite l'enrichissement de l'eau de mer artificielle ou naturelle avec des micro- et macronutriments. Les enrichissements de référence L1 + Silicium (107 μM) (Guillard & Hargraves, 1993) et F/2 (Guillard et Ryther, 1962 ; Guillard, 1975) sont utilisés indifféremment au laboratoire Phycotoxines d'Ifremer Nantes pour l'entretien de souches de *Pseudo-nitzschia* spp. Les premières cultures en batch de *P. multiseriis* rapportées dans la

littérature utilisaient le milieu de culture de la formulation F/2 (Subba Rao *et al.*, 1988a). Nous avons donc procédé à un test comparatif de ces deux milieux afin de sélectionner l'enrichissement le plus pertinent pour nos travaux de thèse.

Les différences chimiques entre ces deux enrichissements apparaissent dans la nature et les concentrations molaires de métaux-traces rentrant dans leur composition (tableau 5). La comparaison entre ces deux milieux de référence lors de cultures en eau de mer naturelle a permis d'estimer si ces différences jouaient un rôle prépondérant dans la croissance et la production toxinique de *P. multiseriis* CCL 70.

Composant	Concentration molaire finale dans le milieu L1 (en moles/litres)	Concentration molaire finale dans le milieu F/2 (en moles/litres)
FeCl ₃ , 6H ₂ O	1,17.10 ⁻⁵	0,48.10 ⁻⁵
Na ₂ EDTA, 2H ₂ O	1,17.10 ⁻⁵	2,34.10 ⁻⁵
CuSO ₄ , 5H ₂ O	1,00.10 ⁻⁸	0,41.10 ⁻⁸
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	9,00.10 ⁻⁸	2,80.10 ⁻⁸
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	8,00.10 ⁻⁸	8,00.10 ⁻⁸
CoCl ₂ , 6H ₂ O	5,00.10 ⁻⁸	5,00.10 ⁻⁸
MnCl ₂ , 4H ₂ O	9,00.10 ⁻⁷	9,00.10 ⁻⁷
H ₂ SeO ₃	1,00.10 ⁻⁸	0
NiSO ₄ , 6H ₂ O	1,00.10 ⁻⁸	0
Na ₃ VO ₄	1,00.10 ⁻⁸	0
K ₂ CrO ₄	1,00.10 ⁻⁹	0

Tableau 5 : comparaison des teneurs finales en micro-nutriments des enrichissements de référence L1 + Silicium (107 µM) et F/2. (d'après Guillard & Hargraves, 1993 ; Guillard & Ryther, 1962, Guillard, 1975).

Les solutions-mères d'enrichissement en macro- et micro-nutriment ont été préparées puis filtrées en condition stérile sur des membranes millipore 0,22 µm en PES (polyethersulfone). Elles ont été ensuite diluées dans de l'eau de mer naturelle (voir annexes 1) précédemment stérilisée selon le protocole de Rodier (1984) et stockée dans des ballons pyrex. La souche *P. multiseriis* CCL 70 fut utilisée comme inoculat pour ces essais. Des cultures d'un volume de 300 ml ont été réalisées dans des flacons polystyrène transparent et ont été suivies pendant 15 jours en effectuant des prélèvements réguliers pour déterminer la population cellulaire et la teneur intracellulaire en acide domoïque.

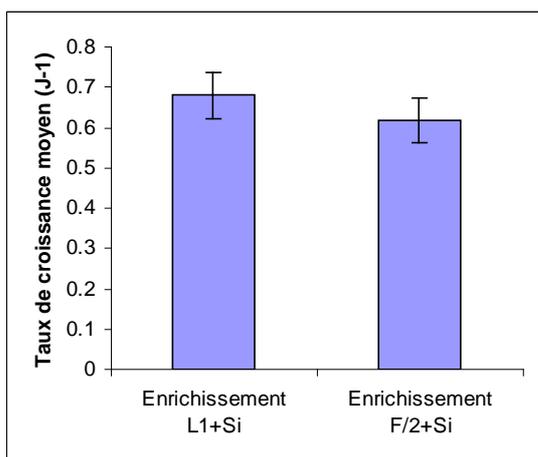


Figure 9 : taux de croissance en phase exponentielle de *P. multiseriis* CCL 70 selon le type d'enrichissement de l'eau de mer naturelle.

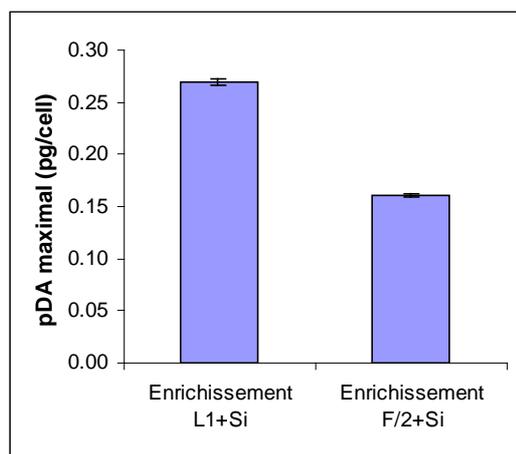


Figure 10 : teneur intracellulaire maximale en acide domoïque de *P. multiseriis* CCL 70 selon le type d'enrichissement de l'eau de mer naturelle.

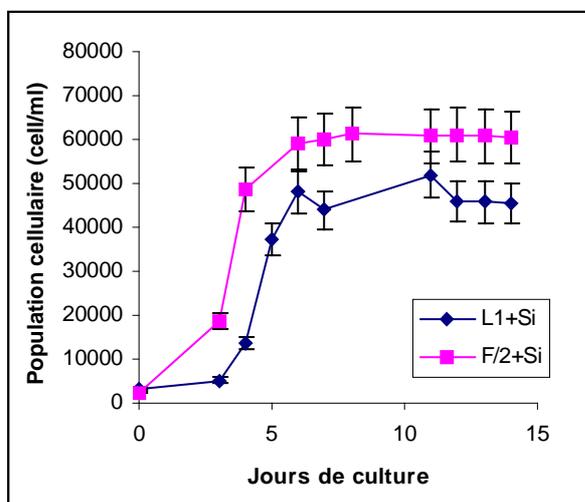


Figure 11 : cinétiques de croissance de *P. multiseriis* CCL 70 selon le type d'enrichissement de l'eau de mer naturelle.

Il est apparu que si les différences de taux de croissance de *P. multiseriis* CCL 70 dans les milieux L1 + silicium (107 μ M) et F/2 ne sont pas statistiquement significatives (figure 9), le milieu de culture F/2 permet d'obtenir une biomasse de 30% plus forte qu'avec le milieu L1 (figure 11). Les teneurs intracellulaires en toxines furent statistiquement plus importantes dans les cultures en milieu L1 + Silicium (figure 10).

Le milieu de culture final retenu correspond à l'enrichissement de type L1 + silicium (107 μ M) selon la formulation de Guillard & Hargraves (1993).

1.2.4.2. Modification des teneurs en azote de la formulation L1

Sholin *et al.* (2000) rapportèrent que les efflorescences de *Pseudo-nitzschia* sont favorisées par des apports en silicium. Nous avons donc envisagé l'hypothèse qu'une hausse du rapport [Si]/[N] favoriserait la croissance de cultures en batch de souches de *Pseudo-nitzschia spp.*

Nous avons comparés des cultures de *P. multiseriis* CCL70 en batch à deux teneurs différentes en nitrates et en urée (tableau 6). Durant les travaux d'écophysiole menés sur les sources azotées, les teneurs molaires ont donc été abaissées par rapport au milieu de culture de référence L1, qui est de [N] = 882 μM . L'équimolarité entre les différentes sources azotées a été fixée à [N] = 441 μM .

	Taux de croissance (J^{-1})	Pop. max. (cell/ml)	Plateau moyen (cell/ml)
[NO ₃] ⁻ = 441 μM	0,60	96120	95116
[NO ₃] ⁻ = 883 μM	0,68	49500	48250
[Urée] = 220 μM	0,60	125200	122620
[Urée] = 441 μM	0,52	53500	52250

Tableau 6 : comparaison des la croissance et de la toxicité cellulaire de *P. multiseriis* CCL70 à différentes teneurs en nitrates et en urée.

Les résultats obtenus nous ont permis d'obtenir une meilleure biomasse en phase stationnaire en abaissant les teneurs azotées de moitié, et les proliférations bactériennes furent moins importantes dans nos cultures non-axéniques pour des teneurs abaissées en urée à 220 μM (données non-présentées).

L'enrichissement de l'eau de mer retenu pour nos expérimentations se base donc sur la formulation L1 (Guillard et Hargraves, 1993), à laquelle nous avons apporté les modifications suivantes : les teneurs en silicium rajoutés sont fixées à 107 μM et les teneurs en source azotée doivent respecter une équimolarité [N] = 441 μM .

Les influences des sources azotées sur la croissance et la production toxinique de *Pseudo-nitzschia sp.* ont fait l'objet de travaux plus approfondis que ces tests préliminaires, présentés dans le chapitre 4.

1.3. Entretien de la souchothèque

1.3.1. Inventaire des souches

Au cours de ces travaux de thèse, nous avons collectionné et entretenu une souchothèque spécifique au genre *Pseudo-nitzschia*. La durée de vie moyenne d'un clone de *Pseudo-nitzschia spp.* en reproduction végétative étant de 3-4 ans en laboratoire, cette souchothèque a dû être régulièrement renouvelée (tableau 7).

Les espèces ont été isolées par différents laboratoires : Bigelow pour la souche canadienne, le CEFAS pour les souches anglaises et Ifremer Brest pour les souches françaises.

Souche	Espèce	Origine	Date d'isolement
CCMP 2708	<i>P. multiseriis</i>	Nord-Atlantique (Canada)	2007
CCL 26	<i>P. multiseriis</i>	Estuaire de la Tamise (U.K.)	2007
CCL 69	<i>P. multiseriis</i>	Estuaire de la Tamise (U.K.)	2007
CCL 70	<i>P. multiseriis</i>	Estuaire de la Tamise (U.K.)	2007
PN B5	<i>P. australis</i>	Mer d'Iroise (France)	2008
PN B9	<i>P. pungens</i>	Mer d'Iroise (France)	2008
PN C1	<i>P. australis</i>	Mer d'Iroise (France)	2009
PN D6	<i>P. australis</i>	Mer d'Iroise (France)	2009
PN D10	<i>P. pungens</i>	Mer d'Iroise (France)	2008

Tableau 7 : liste des souches entretenues au cours de la thèse

1.3.2. Méthodes de repiquage et entretien

Les souches sont entretenues en batch dans les mêmes conditions que les cultures expérimentales. Elles sont repiquées chaque semaine, dans un volume de 25 ml de milieu complet d'eau de mer enrichie L1 + silicium (107 μ M) avec un inoculat de 2 ml dans des flacons polystyrène transparents.

L'état des souches est régulièrement suivi par observation au microscope photonique. Les cultures n'étant pas axéniques, il est nécessaire d'effectuer un traitement aux antibiotiques tous les ans afin d'éviter une prolifération bactérienne trop importante et la perte de la souche.

Les antibiotiques ajoutés en cas de nécessité consistent en un mélange de trois molécules : pénicilline (5 g/l), streptomycine (5 g/l) et néomycine (10 g/l) de la marque PSN Antibiotic Mix. Ce mélange est dilué à raison d'un millilitre par litre de milieu de culture frais.

1.4. Méthodes de cultures expérimentales

1.4.1. Cultures en système fermé

L'eau de mer utilisée consiste en de l'eau naturelle ou artificielle de formulation Yerseke (voir annexes 1), avec un enrichissement de référence L1 + 107 µM de silicium modifié selon les précisions décrites dans le paragraphe 1.2. Suivant les besoins expérimentaux, la nature et les teneurs en macro-nutriments peuvent varier, comme il sera précisé dans les matériels et méthodes des chapitres correspondants.

Les cultures sont réalisées dans des flacons polystyrène transparent stérilisés par rayons gamma et UV par le fabricant. Le volume de culture peut varier selon les expériences, ce qui sera précisé le cas échéant. Les cultures sont placées en salle de culture et réalisées selon les conditions définies au paragraphe 1.1.

La formule utilisée afin de calculer le taux de croissance d'une culture en fonction du temps est la suivante (1) :

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X - (D \cdot X) \quad (1)$$

X = biomasse cellulaire (cellules.l⁻¹)

t = temps (jours)

D = taux de dilution (jours⁻¹)

µ = taux de croissance (jours⁻¹)

L'intégration de l'équation (1) en fonction du temps t dans l'intervalle t₁ à t₂ donne l'équation suivante (2) :

$$\frac{\ln(X_2) - \ln(X_1)}{t_2 - t_1} = \mu - D \quad (2)$$

Le système étant fermé, il n'y a pas d'apport de milieu frais au cours de la culture et le taux de dilution D est donc nul. Le taux de croissance μ correspond donc à l'équation simplifiée (3) pour les cultures en mode fermé (ou batch) :

$$\frac{\ln(X_2) - \ln(X_1)}{t_2 - t_1} = \mu \quad (3)$$

1.4.2. Cultures en système ouvert

Dans une culture en système ouvert (ou système en continu), le volume de culture reste constant mais est sans cesse renouvelé par un apport continu de milieu frais en entrée du système. Le milieu frais est déversé à débit constant. Le maintien d'une culture en système ouvert permet d'entretenir la population cellulaire à un seuil constant tout en imposant un taux de croissance spécifique.

Lors du paragraphe 1.4.1, nous avons vu que le taux de dilution s'exprime par l'équation suivante (2) :

$$\frac{\ln(X_2) - \ln(X_1)}{t_2 - t_1} = \mu - D \quad (2)$$

A l'état d'équilibre dans une culture en continu, la biomasse ne doit pas varier. Donc $X_1 = X_2$ et l'équation (2) se simplifie de la façon suivante :

$$\mu = D \quad (4)$$

Le taux de dilution est calculé par l'équation (5) comme le rapport entre le débit entrant de milieu frais F et le volume de culture V :

$$D = \frac{F}{V} \quad (5)$$

F = débit dans le système ouvert ($l.j^{-1}$)

V = volume total de culture (litres)

Comme le débit F est fixé par les conditions expérimentales, il est donc possible de calculer le taux de croissance à l'état d'équilibre en résolvant l'équation (6) :

$$\mu = \frac{F}{V} \quad (6)$$

Les cultures en mode continu sont réalisées dans des photobioréacteurs (figure 12). Le photobioréacteur est défini dans ce manuscrit de thèse comme un volume clos de paroi transparente, laissant ainsi passer l'énergie lumineuse nécessaire à la production photosynthétique des organismes phototrophiques. Ce système peut être utilisé pour réaliser des cultures en mode fermé comme en mode continu, en y rajoutant un jeu de pompes.

1.4.2.1. Protocole expérimental de mise en culture continue

Les photobioréacteurs sont en matière plastique altuglass transparente d'un volume maximal de 2,3 litres (figure 12) et ne sont pas autoclavables. Une fois assemblés, ils sont désinfectés par injection d'une solution d'acide peracétique diluée dans de l'eau ultrapure pour un rapport de 5 ml/l. Ils sont purgés au bout d'une heure maximum et rincés deux fois de suite avec de l'eau de mer filtrée.

Les milieux de culture sont préparés stérilement en grand volume et l'inoculation de la culture réalisée sous hotte dans des flacons polycarbonate stériles. La concentration initiale en cellules algales est donc fixée avant remplissage des bioréacteurs. La culture ainsi préparée est versée dans les photobioréacteurs à l'aide d'une pompe dont la tuyauterie a été préalablement désinfectée à l'acide peracétique 5 ml/l et rincée plusieurs fois à l'eau de mer filtrée. Le pH est régulé à 8,2 par injection d'un mélange air/CO₂ et le débit d'air est fixé à 0.5 l/min.

Cette mise en culture des cellules algales doit être suivie, après un temps d'accroissement de la biomasse en mode 'batch' (système fermé), par le démarrage du flux de milieu pour passer en mode 'continu' (système ouvert). Les détails sont donnés dans les paragraphes suivants.

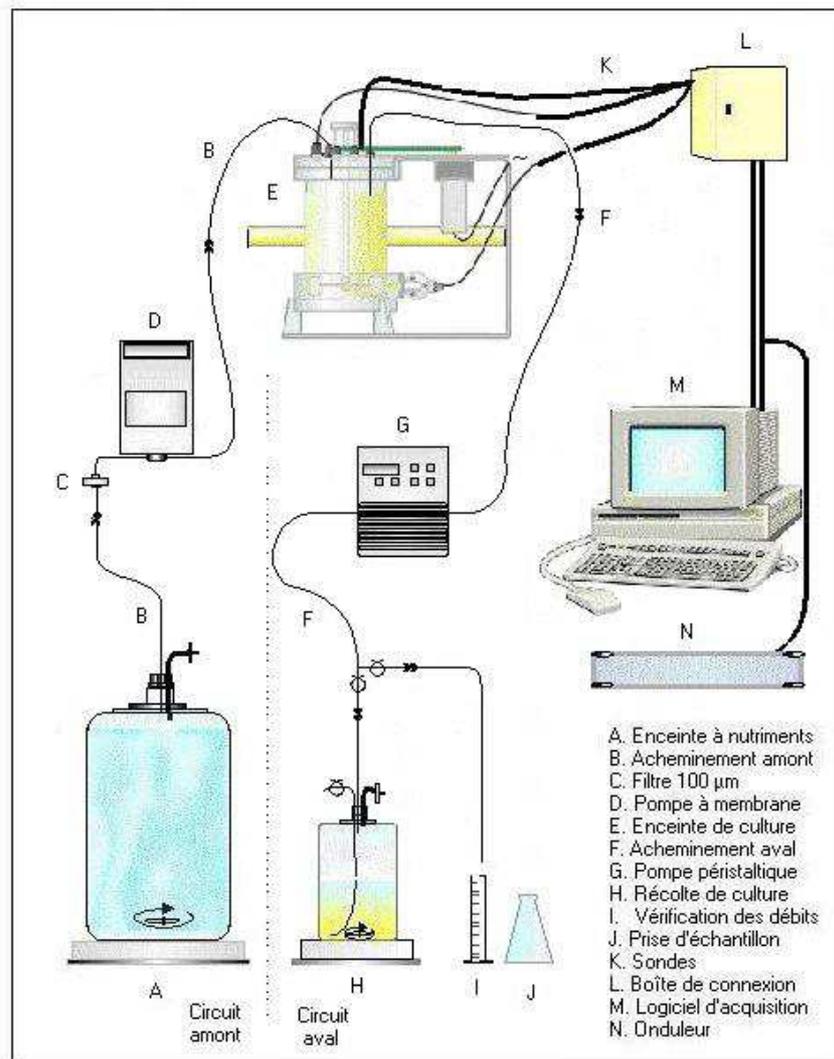


Figure 12 : schéma d'un photobioréacteur en culture en continu (illustration : G. Bougaran et J.-B. Bérard, Ifremer Nantes)

1.4.2.2. Mise en place du flux ouvert en mode continu

La mise en place de cultures en continu au cours de ces travaux de thèse a été réalisée par étapes successives, afin de lever les contraintes techniques rencontrées lors de la réalisation de cultures à l'équilibre en système ouvert.

La première difficulté concernant la mise en place de cultures en continu fut liée à la mise en place du système en mode ouvert après avoir débuté la culture en mode fermé. Les résultats de précédents travaux de culture en continu de *P. multiseriis* CCMP 2708 menés en stage de Master au sein du laboratoire Phycotoxines d'Ifremer Nantes (Calu, 2007) nous indiquaient qu'un basculement efficace du système fermé en système ouvert devait avoir lieu en début de phase de maturation. Lors des premiers essais sur des cultures des souches *P. multiseriis* CCL 70 et *P. pungens* PN D10, les pompes furent démarrées au cours du 7^{ème} jour de culture, en phase stationnaire de croissance de la population (figure 13). Ce délai ne s'avéra pas adapté pour les deux souches testées durant nos expériences, nos souches ne parvinrent pas à se maintenir à l'état d'équilibre et leur population chuta rapidement par lessivage.

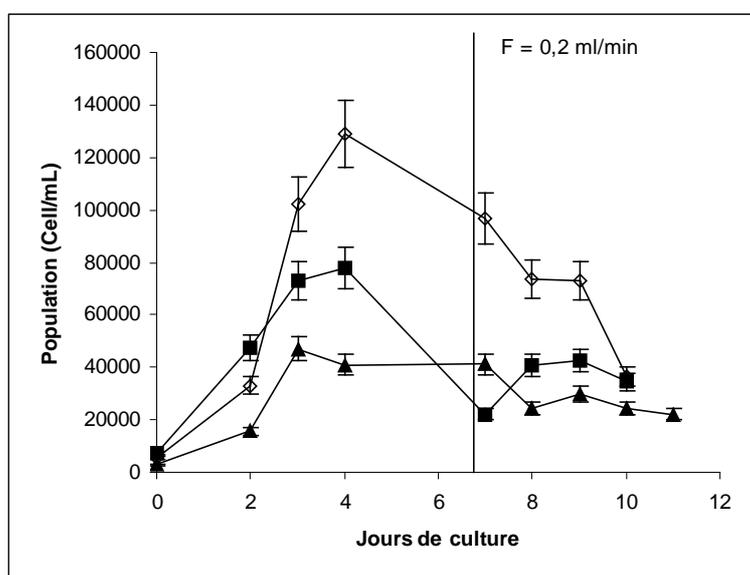


Figure 13 : tentatives de mise en système continu de cultures en batch de *P. multiseriis* CCL 70 en présence d'urée (ronds blancs), de nitrates (carrés noirs) ; et de *P. pungens* D10 en présence de nitrates (triangles noirs). Le trait vertical indique le démarrage de la culture en mode ouvert (7^{ème} jour).

Le suivi des teneurs en silicium au cours de cette expérience montra que les stocks extracellulaires ont été très rapidement absorbés (figure 14) et que leur épuisement dans le milieu au jour 3 correspondit à la fin de la phase exponentielle.

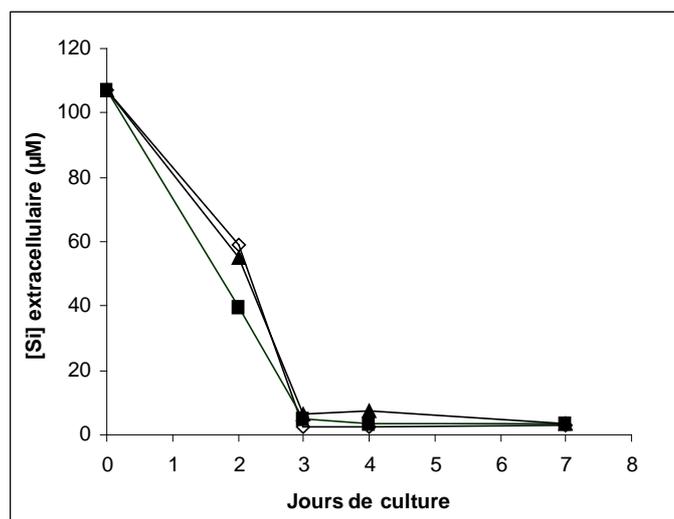


Figure 14 : évolution des teneurs extra-cellulaires en silicium durant ces essais de mise en culture continu de *P. multiseriis* CCL 70 en présence d'urée (losanges blancs), de nitrates (carrés noirs) ; et de *P. pungens* D10 en présence de nitrates (triangles noirs).

Nous avons alors décidé d'augmenter la teneur initiale en silicium à 214 μM et d'ouvrir le système plus précocement, au 3^{ème} jour lors de la phase exponentielle. L'expérience a été menée sur *P. multiseriis* CCL 70 uniquement (figure 15) et a permis de maintenir la culture en équilibre pendant 10 jours, période au-delà de laquelle une contamination bactérienne du milieu de culture a entraîné une chute brutale de la biomasse. Lors de l'état d'équilibre, le taux de croissance fut de $0,144 \text{ J}^{-1}$.

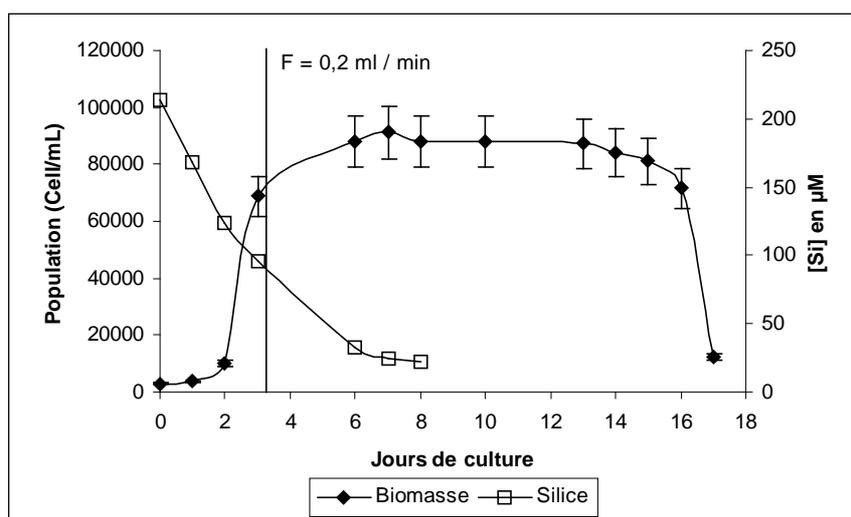


Figure 15 : Cinétique de croissance et concentration extra-cellulaire en silicium de *Pseudo-nitzschia multiseriis* CCL70 en photobioréacteur.

Le démarrage des pompes au 3^{ème} jour de culture étant favorable à la mise en continu du photobioréacteur, une nouvelle expérience a été menée sur *P. multiseriis* CCL70 en abaissant

la teneur en silicium dans le milieu de culture à 107 μM . Après la mise en milieu ouvert au 3^{ème} jour, la culture continue se stabilisa rapidement autour de 110000 cellules / ml (figure 16). L'état d'équilibre fut maintenu pendant 10 jours avec un taux de croissance cellulaire de 0,144 J^{-1} .

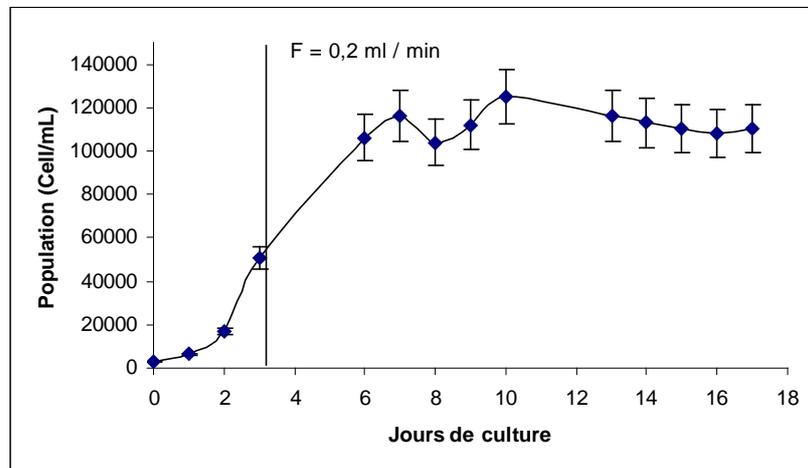


Figure 16 : Cinétique de croissance de *Pseudo-nitzschia multiseriis* CCL70 en photobioréacteur.

Suite à ces essais, nous avons donc retenu le basculement du système en mode ouvert dès le début de la phase exponentielle. Les teneurs en silicium proposées pour le milieu L1 + silicium (107 μM) (Guillard & Hargraves, 1993) ont été également conservées pour ces cultures en système ouvert.

2. Analyses physico-chimiques des milieux de culture

2.1. Contrôle de l'irradiance, du pH et de la salinité

L'intensité lumineuse a été mesurée à partir d'un luxmètre de la marque PCE. Le pH de l'eau de mer artificielle et des milieux de culture a été contrôlé par un pH-mètre électronique Eutech PC 510. La salinité des eaux de mer naturelle et artificielle a été mesurée par un réfractomètre à main de marque Reichert.

2.2. Mesure du silicium

Nous avons utilisé la méthode d'Aminot et Kerouel (2004), agréée par le Ministère de l'Environnement dans le cadre de programmes de surveillance de la qualité des eaux marines et côtières. Elle reprend en partie la méthode décrite par Hansel et Koroleff (1999). Elle se base sur la formation à pH très acide d'un complexe d'acide silicomolybdique et sa réduction par l'acide ascorbique.

La détermination des composés silicium dissous dans les eaux naturelles est basée sur la formation d'acide silicomolybdique de couleur jaune lorsque l'acide silicilique réagit au contact d'une solution de molybdate. Selon Chow et Robinson (1953), tout composé siliceux soluble dans l'eau peut être ainsi dosé, à l'exception des longues chaînes d'acide silicilique ayant polymérisé.

Le complexe silicomolybdique existe sous deux isomères : l'acide α - silicomolybdique formé à pH 3.5-4.5, et l'acide β - silicomolybdique formé à pH 0.8-2.5. L'isomère α - est stable mais son absorption molaire est plus faible que l'instable isomère β -. En conséquence, la coloration est stable seulement 5 minutes, avant que les isomères β - aient été transformés en isomères α -. Pour ces raisons, il a été proposé d'utiliser un agent réducteur afin d'obtenir un complexe de coloration intense et plus stable dans le temps. Plusieurs agents réducteurs peuvent être employés, les plus couramment cités sont le sulfate de p-méthylaminophénol (Mullin & Riley, 1955a), le chlorure d'étain (Mullin & Riley, 1955b) ou encore l'acide ascorbique (Koroleff, 1972).

Dans notre cas de figure, l'acide ascorbique a été retenu et doit être préparé en solution avec de l'acide oxalique. Ceci permet d'éviter les interférences dues aux phosphates dans l'échantillon à analyser.

Le protocole complet de ce dosage chimique est détaillé en annexes 2.

2.3. Mesure de l'ammonium

En 1859, Berthelot propose une méthode de dosage de l'ammoniac en présence de chlore en milieu basique pour former une monochloramine. Ce composé réagit ensuite avec deux molécules de phénol en milieu oxydant, et forme du bleu d'indophénol. L'absorption est alors mesurable à 630 nm. Koroleff (1969) et Solorzano (1969) appliquèrent la méthode à l'eau de mer. La précipitation du calcium et du magnésium en milieu basique est évitée par complexation avec du tricitrate de sodium. Aminot et Kerouel (2004) proposèrent une méthode issue de ces améliorations successives, que nous avons reprise pour nos expériences.

Le dosage de l'ammonium par cette méthode s'effectue pour des gammes de concentration entre 0,05 et 70 μM . Si la concentration est supérieure à ce seuil, il faut diluer l'échantillon une fois la coloration effectuée. L'écart relatif généralement constaté est de 3 à 5%. Il faut également noter que les interférences avec l'urée ou les acides aminés sont négligeables.

Le protocole complet de ce dosage chimique est détaillé en annexes 2.

2.4. Mesure de l'urée

La méthode que nous avons utilisée, dite de l'urée-diacetyl monoxime (Koroleff, 1983), a été améliorée par les récents apports de la littérature scientifique (Aminot et Kerouel, 2004). Elle repose sur le principe suivant : dans des solutions fortement acides et en présence d'un oxydant faible, l'urée forme un produit de condensation avec le diacetyl monoxime. Ce produit interagit avec le semicarbazide et les ions manganèses pour former un complexe de couleur magenta. Les ions chlorides sont ajoutés en excès afin d'augmenter la sensibilité de la réaction.

Bien que la réaction s'effectue avec tout composé de formule $\text{R-NH-CO-NH-R}'$, la méthode ne permet de quantifier que l'urée. Il n'y a pas d'interférence avec les ions de l'eau de mer, et il peut y avoir quelques problèmes d'interprétation avec de fortes concentrations de citrulline, comme dans le cas de suivi de déjections animales dans l'eau de mer.

Le protocole complet de ce dosage chimique est détaillé en annexes 2.

3. Analyse chimique de la toxicité

3.1. Préparation des échantillons et extraction de l'acide domoïque

Des prélèvements de 10 ml de milieu de culture sont effectués, puis centrifugés à 4°C pendant 15 minutes à 3000 G, pour séparer le culot cellulaire et le surnageant correspondant au milieu de culture, afin d'en extraire respectivement les toxines intracellulaires et extracellulaires.

Le surnageant est récupéré dans un tube polystyrène transparent puis congelé à -80°C. Une fois décongelé, 500µl de surnageant sont prélevés et filtrés (filtre Whatman GF/C) par ultracentrifugation (10 minutes à 8000G), puis les filtrats sont transvasés dans des vials pour injection en HPLC/UV. Tous les échantillons sont conservés au congélateur avant injection pour analyse chromatographique.

Le culot cellulaire est resuspendu dans 1 ml de solution MeOH/H₂O 1:1 (solvant d'extraction) puis stocké au congélateur à -80°C. Après décongélation à température ambiante, les cellules sont détruites par sonication pendant 30 minutes (puissance de 500W, fréquence des ultrasons de 20kHz, pulses de 15 secondes). Une vérification au microscope permet de confirmer l'éclatement des cellules avant de poursuivre l'extraction. Les échantillons sont ensuite centrifugés pendant 15 minutes à 4000G. A partir du surnageant obtenu, 500 µl sont filtrés (filtre Whatman GF/C) par ultracentrifugation (10 minutes à 8000G) et transvasés dans des vials pour analyse HPLC/UV. Tous les échantillons sont conservés au congélateur avant analyse chromatographique.

3.2. Analyse de l'acide domoïque par méthode HPLC/UV

L'analyse de l'acide domoïque est réalisée selon la méthode de Lawrence *et al.* (1989) en injectant 20 µl d'échantillon à travers une précolonne puis une colonne (dimension 4,6X250 mm) remplies d'une phase stationnaire échangeuse d'anions de silice greffée C₁₈ (particules de 5 µm de diamètre) de référence Jupiter (® Phenomenex). La précolonne et la colonne sont chauffées dans un four thermostaté à 40°C au cours de l'analyse. Le solvant d'élution est injecté à 1ml/min en régime isocratique. Il consiste en un mélange H₂O 0,1% TFA/CH₃CN 90:10. La détection en sortie de colonne est effectuée à la longueur d'onde $\lambda = 242$ nm assurée par détecteur UV. La durée de l'analyse de chromatographie est de 20 minutes. L'étalonnage est réalisé avec un étalon d'acide domoïque certifié et commercialisé par les laboratoires

canadiens du NRC-CNRC (National Research Council – Centre National de Recherche Canadien).

L'analyse est effectuée sur une chaîne semi-automatisée Agilent 1100 Series comprenant un système de pompes binaires, un rack de stockage de vials avec bras et injecteur automatisés, un four thermostaté pour colonnes chromatographiques et un détecteur à lampe UV. Le temps de rétention du pic d'acide domoïque est aux alentours de 15 minutes (voir des exemples de chromatogrammes en figure 17 et en annexe 4).

La chaîne est pilotée par ordinateur via le logiciel de contrôle *Agilent ChemStation for LC 3D* exécuté sous Windows 2000 Professionnal. L'analyse des spectres obtenus se fait directement sur ce même logiciel par résolution graphique des aires (figure 17). La gamme-étalon ainsi analysée permet d'obtenir une corrélation linéaire entre mesure surfacique des pics et concentration massique en acide domoïque.

3.3. Contrôle de la qualité des analyses par un test de dopage

Un test de dopage d'échantillon a été réalisé pour vérifier la qualité du dosage. Un échantillon non-toxique de 150 µl a été dopé avec 25 µl d'étalon toxinique à 5,59 µg/ml. L'échantillon ainsi dopé a été de nouveau analysé et la quantité de toxines détectée a été comparée à l'étalon toxinique dilué au même facteur de dilution que lors du dopage ($1/7^{\text{ème}}$).

	Echantillon seul	Echantillon dopé	Etalon toxinique	Etalon toxinique dilué au $1/7^{\text{ème}}$
Concentration massique (µg/ml)	0	0,79	5,59	0,78

Tableau 8 : test de dopage à l'acide domoïque certifié d'un échantillon analysé par la méthode HPLC/UV

La concentration massique d'acide domoïque retrouvée dans l'échantillon dopé étant quasiment équivalente à une dilution similaire de l'étalon toxinique (tableau 8), le test de dopage fut donc jugé concluant.

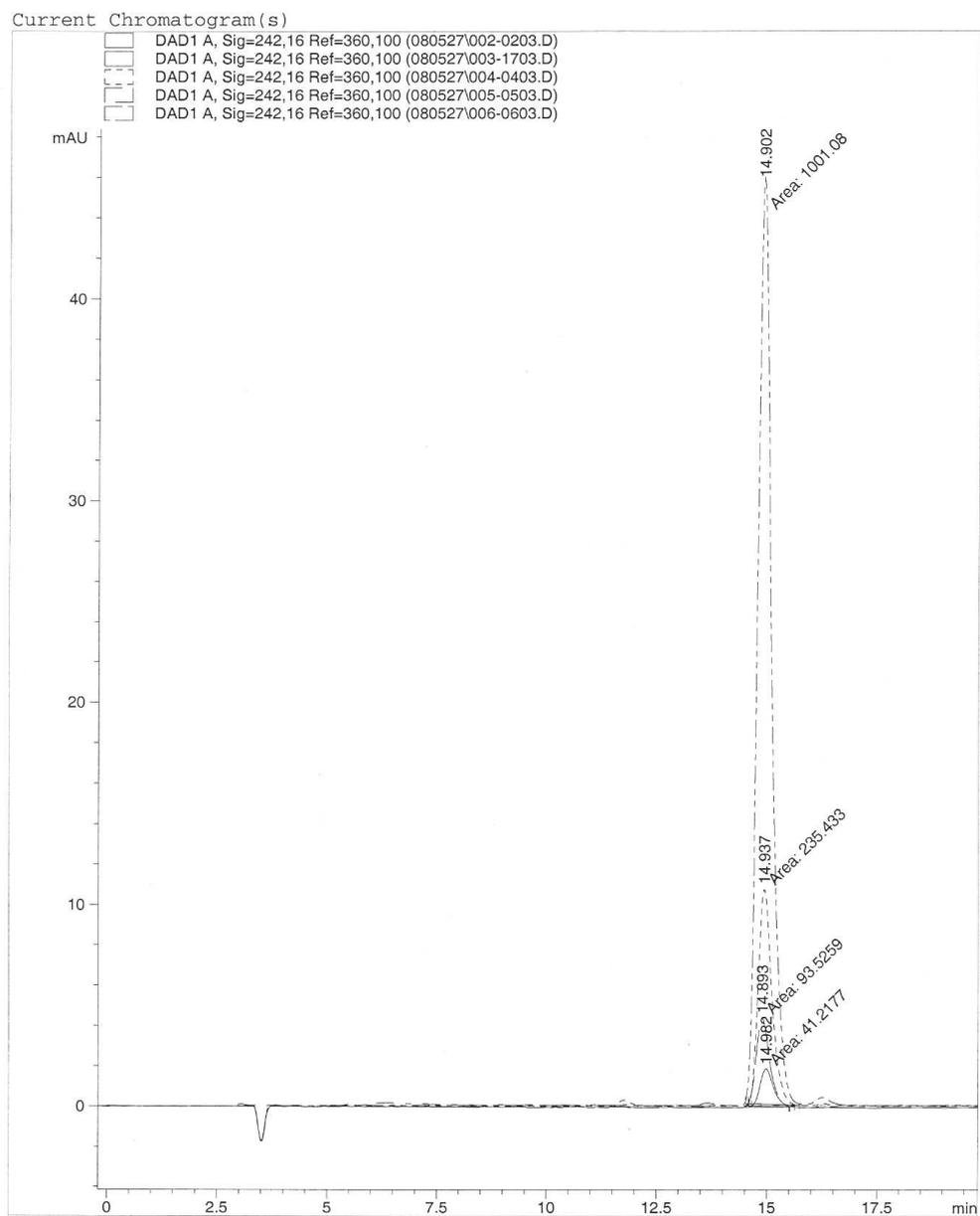


Figure 17 : chromatogramme de la gamme d'étalonnage de l'acide domoïque par la méthode d'analyse CLHP/UV.

Partie 3 : Croissance et production toxinique chez *Pseudo-nitzschia multiseriis* en présence de silicium et de germanium

1. Introduction

Le silicium représente l'élément atomique le plus abondant à la surface de la Terre après le carbone et l'oxygène. Outre son importance en tant que constituant minéral de la croûte terrestre, le silicium est également impliqué dans de nombreux métabolismes et processus de biosilification. Les principaux organismes fixateurs minéralisent de la silice colloïdale sous forme amorphe (ou opale $\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) (Lowenstam, 1981), bien que d'autres formes dérivées du silicium puissent être incorporées. Ces organismes sont essentiellement des Protistes : Diatomées, Chrysophytes, Dictyocophytes et Radiolaires ; mais certains appartiennent également au Règne Animal : Spongiaires, Annélides, Mollusques, Arthropodes et Echinodermes ; ou au Règne Végétal : Trachéophytes chez les Végétaux supérieurs (Simpson & Volcani, 1981 ; Lowenstam, 1981). Chez les Vertébrés, enfin, le silicium intervient dans la formation du cartilage et du système osseux (Carlisle, 1981).

Les Diatomées constituent autour de leur cellule une paroi siliceuse, ou frustule. Cette paroi est composée de deux éléments : l'épivalve et l'hypovalve, qui s'emboîtent l'une dans l'autre, et sont unies par l'intermédiaire de bandes intercalaires (figure 18). La forme du frustule ainsi que ses motifs varient d'une espèce à l'autre et ces critères morphologiques ont été utilisés précocement dans la taxonomie des diatomées. La phylogénie différencie ainsi les diatomées à symétrie radiale (diatomées centriques) et les diatomées à symétrie bilatérale (diatomées pennées) (Round *et al.*, 1990).

Dans le frustule, la silice amorphe constituant la structure siliceuse est essentiellement associée à des protéines et polypeptides récemment décrits, comme les silaffines et les silacidines, et des polyamines (voir figure 18) (Hatte *et al.*, 2008). Ces composés sont impliqués dans les étapes de biosilification et de polymérisation du silicium (Kröger, 2007). Certains polysaccharides et lipides ont aussi été trouvés associés au frustule (Tesson *et al.*, 2009). Des protéines particulières (frustulines et pleuralines) sont présentes chez certaines espèces, mais ne participent pas aux processus de biominéralisation (van de Poll *et al.*, 1999). Le frustule est aussi protégé sur sa face externe par un 'manteau' de matière organique, qui empêche la dissolution de la silice (Martin-Jézéquel *et al.*, 2000).

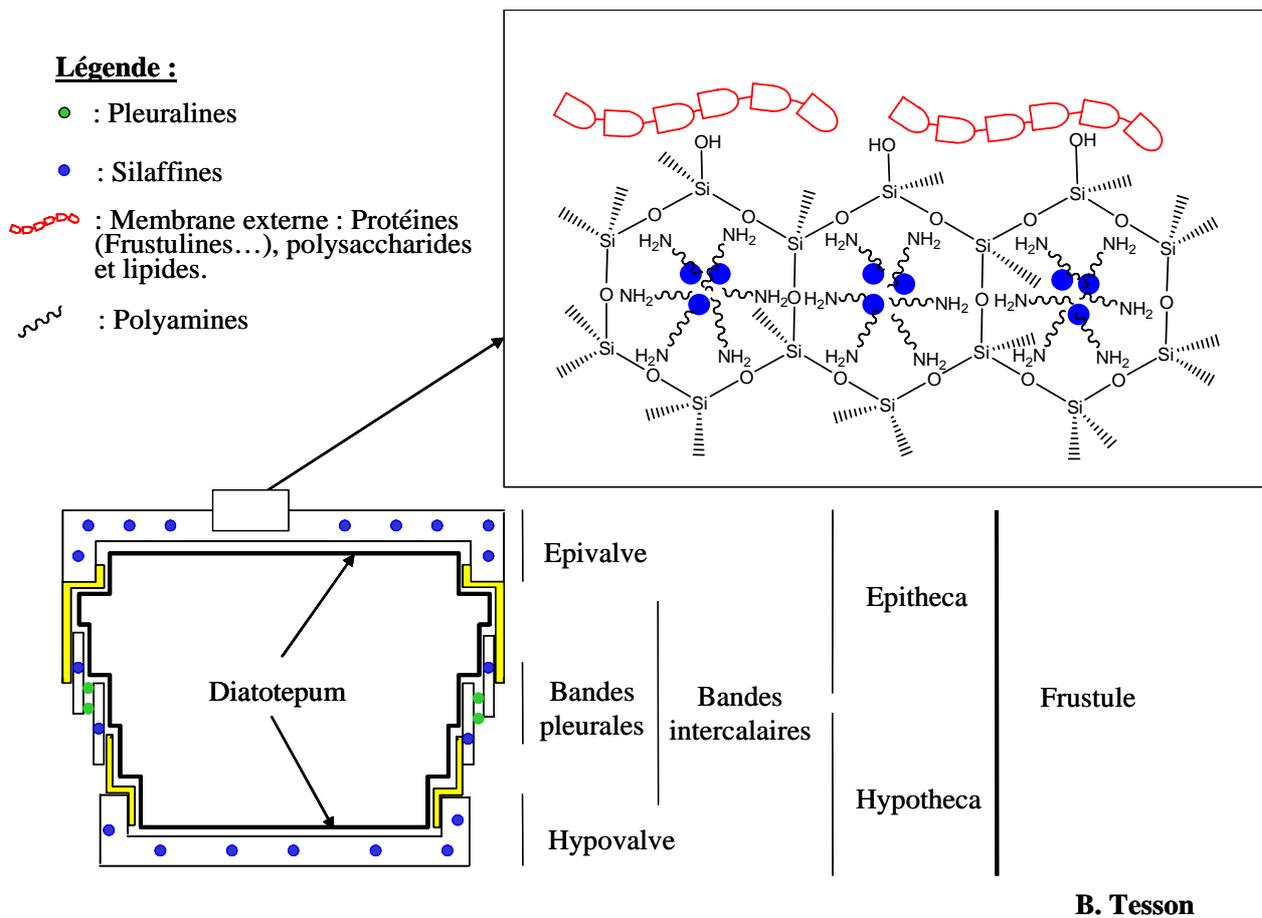
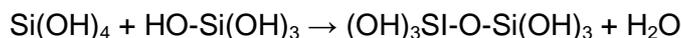


Figure 18 : schéma du frustule et de la matière organique associée (Hatte *et al.*, 2008. Repris dans Tesson, 2008)

Lors de la biosilicification, le silicium présent dans l'environnement est prélevé sous la forme d'acide monosilicique ($\text{Si}(\text{OH})_4$). Les transporteurs membranaires assurant l'incorporation intracellulaire du silicium sont appelés transporteurs SIT (Hildebrand *et al.*, 1998). Le nombre de ces transporteurs varie selon les espèces. Par exemple, cinq transporteurs ont été isolés chez *Cylindrotheca fusiformis* (Hildebrand *et al.*, 1998) et trois chez *Thalassiosira pseudonana* (Thamatrakoln *et al.*, 2006). Il s'agit de symporteurs électrogéniques Na- ou K-dépendants selon l'origine marine ou dulçaquicole des diatomées (Bhattacharyya & Volcani, 1980).

Il existe deux pools de silice chez les diatomées : le pool libre intracellulaire et le pool « biogénique » constituant le frustule (Martin-Jézéquel *et al.*, 2000). Le silicium intracellulaire 'libre' peut former des pools importants de 19 à 340 mM (Martin-Jézéquel & Lopez, 2003), bien supérieurs à la limite de saturation pour la solubilité de la silice. Il est donc probable que des molécules organiques évitent la précipitation spontanée du silicium dans le cytosol, même si aucune association chimique de ce type n'ait été encore identifiée (Martin-Jézéquel *et al.*, 2000 ; Tesson, 2008). Le silicium assimilé est accumulé dans une vésicule spécialisée dans la

déposition de la silice : la SDV (Silicon Deposition Vesicle), où il polymérise en formant des liaisons siloxanes selon la réaction chimique suivante :



Cette polymérisation entraîne finalement la formation de la silice amorphe, sous le contrôle des molécules organiques, qui jouent un rôle dans la condensation de l'acide monosilicique et la forme structurale obtenue à l'échelle nanométrique, en association avec la membrane de la SDV, le silicalemme. La biosynthèse du frustule se déroule donc dans la SDV, qui se forme au moment de la division cellulaire dans chaque cellule-fille, après la cytokinèse (figure 19). Lors de la mitose, chaque cellule-fille possède ainsi une valve de la cellule-mère, qui représentera leur épivalve, et une valve néo-formée, par déposition du silicium en association avec les molécules organiques et expansion de la SDV. Lorsque l'hypovalve est achevée, le retrait des macromolécules organiques crée des pores dans la matrice (Vrieling *et al.*, 2002).

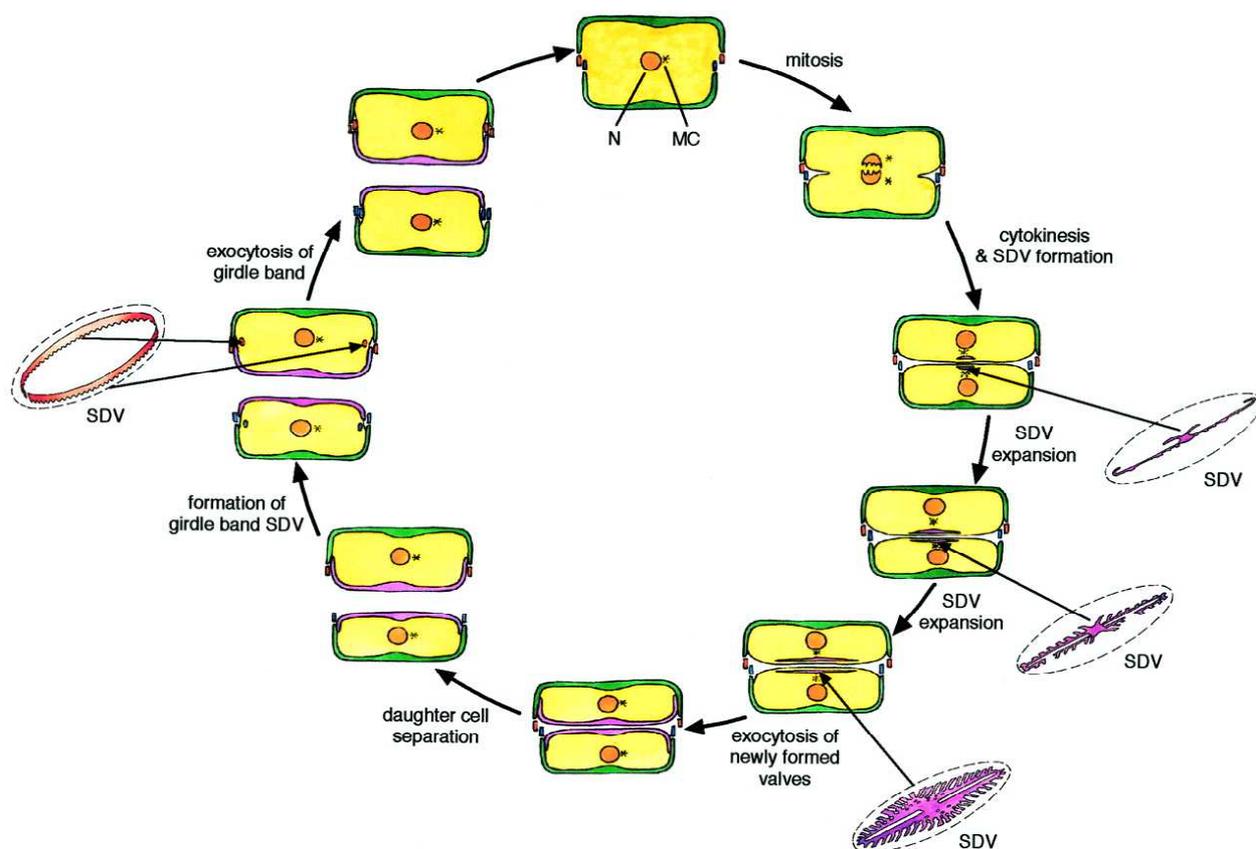


Figure 19 : cycle cellulaire et formation de la frustule (Zurzolo et Bowler, 2001).

1.1. Rôle inhibiteur du germanium

Le germanium est un élément chimique de la famille des cristallogènes (numéro atomique 32). Découvert en 1886 par le chimiste allemand Clemens Winkler, il possède des propriétés atomistiques similaires au silicium (Jolly, 1966) et peut se substituer au silicium dans de nombreux minéraux (Goldschmidt, 1958). Depuis les années 1970, le germanium est utilisé dans l'industrie des semi-conducteurs. Le génie électronique a fait naître un nouvel intérêt inattendu pour les frustules de diatomées, pouvant servir de nano-composants électroniques (Zhihao *et al.*, 2007). Cela a récemment donné lieu à des travaux de bio-ingénierie afin de faciliter la copolymérisation germanium/silicium en culture continue chez la diatomée *Pinnularia sp.* (Jeffryes *et al.*, 2008).

Quelques travaux ont été menés sur l'interférence germanium/silicium pour la synthèse du frustule chez les diatomées. Lewin s'est intéressée la première, en 1966, à son incorporation lors de la biosilicification chez les êtres vivants. Elle mit ainsi en évidence l'inhibition réversible de la croissance de 10 espèces de diatomées incubées en présence d'un mélange de $\text{Ge}(\text{OH})_4$ et de $\text{Si}(\text{OH})_4$ (Lewin, 1966). Le germanium agit comme un inhibiteur compétitif lors de l'incorporation du silicium (chez *Nitzschia alba*, son K_i est de $2.2 \cdot 10^{-6}$ M). A partir des observations expérimentales (Azam *et al.*, 1974), il semble être acheminé par des transporteurs actifs à ATPases. Il est ensuite incorporé dans le frustule par copolymérisation avec le silicium. La croissance des diatomées est cependant d'autant plus réduite que le ratio $[\text{Ge}]/[\text{Si}]$ augmente (Azam *et al.*, 1973).

1.2. Influence du silicium dans la production toxinique chez *Pseudo-nitzschia*

Le silicium est, sous sa forme inorganique $\text{Si}(\text{OH})_4$, un élément important pour la formation de la frustule des diatomées, et est indispensable à la croissance cellulaire des diatomées. Cependant, son métabolisme est indépendant de ceux du carbone et de l'azote (Martin-Jézéquel *et al.*, 2000). Les diatomées toxiques du genre *Pseudo-nitzschia spp.* ont également besoin d'incorporer du silicium dans leur métabolisme. Une carence environnementale en silicium semblerait jouer le rôle de stimulus au niveau cellulaire, orientant le métabolisme des acides aminés vers la production d'acide domoïque (Smith *et al.*, 2001). Cependant aucun lien entre le métabolisme du silicium et la synthèse d'acide domoïque n'a pu être décrit.

Lors des premiers essais de cultures en batch de *P. multiseriis* rapportées dans la littérature, le milieu de culture enrichi de référence utilisé était du F/2 (Subba Rao, 1988a). En raison du faible ratio [Si]/[N] dans ce milieu de culture, il a été envisagé que le silicium puisse être un élément déterminant dans l'arrêt de la croissance en batch et la production toxinique. Cette hypothèse fut vérifiée lors de cultures en batch de *P. multiseriis* : la production d'acide domoïque apparut dès la phase stationnaire (Bates *et al.*, 1989) et les cellules continrent plus d'acide domoïque pour de faibles teneurs de silicium initiales dans le milieu (Bates *et al.*, 1991). Cette hypothèse fut étudiée plus en détails par Pan *et al.* (1996a) qui démontrèrent l'existence d'une relation négative entre production toxinique et teneurs initiales en silicium dans le milieu de culture.

L'acide domoïque possède un squelette de carbones et d'azote, mais le silicium n'entre pas dans sa composition moléculaire. Par contre, le silicium, comme les autres sels nutritifs, pourrait agir sur le cycle cellulaire de *Pseudo-nitzschia*. En effet, une carence en silicium bloque les diatomées lors des transitions de phases G1/S et G2/M (Brzezinski *et al.*, 1990 ; Vaultot *et al.*, 1987). De plus, la limitation en silicium augmente la durée des phases du cycle cellulaire (Martin-Jézéquel *et al.*, 2000). Il est donc très probable que les régulations de production d'acide domoïque observées par Pan et Bates chez *P. multiseriis* soient liées à la régulation du cycle et de la division cellulaire, plutôt qu'au métabolisme du silicium. En effet, la teneur cellulaire en acide domoïque de *P. multiseriis* est corrélée négativement avec le taux de division de la population lors de cultures en continu (Bates *et al.*, 1996 ; Pan *et al.*, 1996b). De plus, dans une autre étude sur *P. multiseriis* en chémostat Si-limité, et sous une alternance jour/nuit 12 :12h régulant la division de la population pendant la phase lumineuse, Bates et Richard (1996) ont montré que les taux intracellulaires d'acide domoïque étaient en hausse durant la phase d'obscurité, au moment où les divisions cellulaires s'arrêtaient, et que les taux intracellulaires d'acide domoïque chutaient lorsque les divisions cellulaires reprenaient.

2. Rôle du silicium et influence du germanium dans la croissance et la toxicité de *Pseudo-nitzschia multiseriis*

Lors de nos travaux sur l'influence du silicium sur la croissance et la toxicité de *Pseudo-nitzschia*, nous avons étudié l'effet de carences physiologiques du silicium et l'ajout d'inhibiteur germanium sur des cultures suivies en batch. Nos travaux suivaient deux approches. D'une part, maîtriser l'effet des carences en silicium sur la croissance et la toxicité de *P. multiseriis*, et d'autre part, rechercher une relation directe entre teneur en silicium intracellulaire et production toxinique grâce à l'inhibition de l'assimilation du silicium par la co-présence de germanium. Deux souches ont été suivies au cours de ces expériences. La souche *P. multiseriis* CCMP 2708 a d'abord été utilisée lors d'expériences de teneurs initiales variables en silicium. Cette souche n'était plus disponible lors des expérimentations avec du germanium. Elle fut donc remplacée dans un second temps par la souche *P. multiseriis* CCL 70.

Les travaux portant sur l'influence de teneurs initiales en silicium s'inspirèrent de ceux réalisés par Pan *et al.* (1996a) lors de cultures en batch de *P. multiseriis* souche NPBIO. Leurs teneurs initiales s'échelonnèrent entre 60,9 μM , 95,3 μM (contrôle) et 190 μM de silicium. Contrairement à ces auteurs, nous avons choisi des teneurs comprises entre 0 et 107 μM (teneur de référence dans le milieu L1 + Silicium). Notre milieu de culture fut également formulé de manière différente, puisque Pan *et al.* (1996a) utilisèrent du milieu F pour leurs enrichissements. Tout comme lors de nos travaux, leurs micro-algues n'ont pas été carencées en silicium avant de servir d'inoculat pour les cultures expérimentales.

Les travaux d'inhibition de l'incorporation du silicium par du germanium s'inspirèrent quant à eux des travaux de Azam *et al.* (1973) sur l'incorporation de germanium dans les frustules de diatomées. Azam *et al.* (1973) proposèrent des ratios $[\text{Ge}]/[\text{Si}]$ respectivement de 0,01, 0,1 et 1. Pour notre part, nous avons retenu des ratios $[\text{Ge}]/[\text{Si}]$ de 0,01 et 0,1 car Azam *et al.* rapportèrent des réponses physiologiques pertinentes pour ces rapports : $[\text{Ge}]/[\text{Si}] = 0,01$ n'inhiba pas la croissance et l'incorporation de silicium chez *Nitzschia alba*, alors qu'un ratio $[\text{Ge}]/[\text{Si}] = 0,1$ entraîna un arrêt presque totalement la croissance et de l'incorporation de silicium (Azam *et al.*, 1973). Nous avons cependant rajouté arbitrairement un troisième rapport $[\text{Ge}]/[\text{Si}] = 0,32$ à nos travaux. Nous avons également effectué pour cette expérience un carencage préalable en silicium de notre souche *P. multiseriis* CCL 70.

2.1. Mise au point des conditions expérimentales

2.1.1. Influence des teneurs initiales en silicium dans le milieu de culture

Quatre flacons de culture polystyrène transparent ont été remplis jusqu'à 600 ml d'eau de mer naturelle enrichie en milieu L1 avec des teneurs variables en silicium respectivement de 0 μM , 35 μM , 71 μM et 107 μM . Une culture-mère de *Pseudo-nitzschia multiseries* CCMP 2708 a été réalisée en eau de mer naturelle enrichie en milieu L1 + silicium (107 μM) et fut utilisée comme inoculat. Les cultures ont été maintenues en chambre thermostatée selon les conditions décrites au chapitre 2. La croissance a été suivie pendant 40 jours par comptage cellulaire sur cellule de Nageotte jusqu'à la phase de sénescence des cultures et des prélèvements réguliers de 10 ml ont été effectués tous les quatre à six jours afin de détecter la présence de toxines dans les cellules (voir chapitre 2).

2.1.2. Inhibition de la croissance par ajout de germanium dans le milieu de culture

L'effet du germanium sur la croissance et la toxicité de *Pseudo-nitzschia multiseries* CCL 70 a été suivi pour différentes concentrations de germanium dioxyde rajoutées dans le milieu de culture.

De l'eau de mer naturelle a été enrichie en milieu de référence L1 sans ajout de silicium et inoculée avec la souche CCL70. La culture a été suivie pendant sept jours jusqu'à ce qu'elle atteigne la fin de la phase de croissance. Un prélèvement de toxicité a alors été réalisé et cette culture-mère fut utilisée comme inoculat pour ensemercer des cultures enrichies en germanium, réalisées à base d'eau de mer naturelle enrichie en milieu L1 modifié selon les conditions suivantes (tableau 9) :

Condition	Nombre de répliqués	Nitrates (μM)	Silicium (μM)	Germanium dioxyde (μM)	Rapport [Ge]/[Si]
A	2	440	107	0	0
B	2	440	107	1	0,01
C	2	440	107	10,7	0,1
D	2	440	107	35,1	0,3

Tableau 9 : modifications expérimentales apportées au milieu de référence L1

Les cultures ont été réalisées en duplicat et maintenues selon les protocoles expérimentaux décrits dans le chapitre 2. La croissance cellulaire a été suivie par comptage sur cellule de Nageotte à partir de prélèvements lugolés de 1 ml réalisés à intervalles. La toxicité cellulaire et les teneurs extracellulaires en silicium ont été également mesurées à partir de prélèvements de 10 ml de culture (cf chapitre 2).

2.1.3. Recherche d'effet du germanium sur les dosages extra-cellulaires de silicium

Nous avons d'abord dû procéder à un contrôle méthodologique. En effet, le germanium étant atomistiquement proche du silicium, nous avons cherché à caractériser son influence sur les dosages du silicium par la méthode spectrophotométrique retenue (voir chapitre 2). Deux gammes étalon de Si(OH)_4 et de GeO_2 ont été réalisées dans des gammes de concentrations expérimentales retenues pour le germanium dioxyde (figure 20).

Nos résultats ont montré que le germanium réagit dans des proportions très faibles avec le molybdate, puisque le complexe germanium-molybdate ainsi formé une fois réduit n'absorba que très peu dans les longueurs d'ondes testées. Cependant, le dosage de la gamme de germanium par cette méthode colorimétrique a permis d'obtenir une droite de corrélation régulière ($R^2 = 0.9992$).

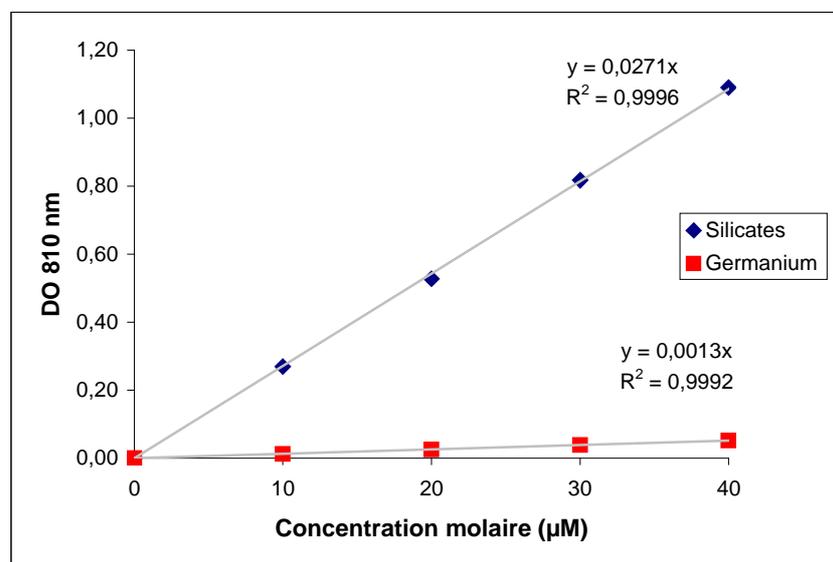


Figure 20 : absorption de gammes étalon de silicium et de germanium dosées par dosage colorimétrique (DO = 810 nm).

Les absorbances mesurées furent d'intensité plus forte à $\lambda = 810$ nm qu'à $\lambda = 660$ nm dans la gamme de concentration étudiée. Le germanium ne fut quasiment pas détecté à $\lambda = 810$ nm et

les absorbances rapportées pour le silicium furent plus importantes à $\lambda = 810$ nm, ce qui permit de mieux détecter les faibles concentrations de silicium dans le milieu. La longueur d'onde $\lambda = 810$ nm a donc été utilisée (figure 20) pour les dosages de silicium et la gamme d'étalonnage du germanium dioxyde a été retenue afin de calculer les valeurs d'incertitude du dosage au cours de l'expérience.

2.2. Résultats

2.2.1. Influence des teneurs initiales en silicium dans le milieu de culture

Les cultures présentèrent une biomasse maximale et un taux de croissance moyen proportionnels aux teneurs initiales en silicium (tableau 10). Chaque culture posséda des cinétiques de croissances bien distinctes pour chaque condition initiale en silicium (figure 21).

Teneur initiale en silicium (μM)	0	35	71	107
Taux de croissance moyen (J-1)	0,32	0,36	0,47	0,57
Biomasse moyenne au plateau (cell/ml)	21833	41833	63000	95555

Tableau 10 : taux de croissance et biomasse moyenne de cultures de *P. multiseriis* CCMP 2708 selon différentes concentrations initiales en silicium.

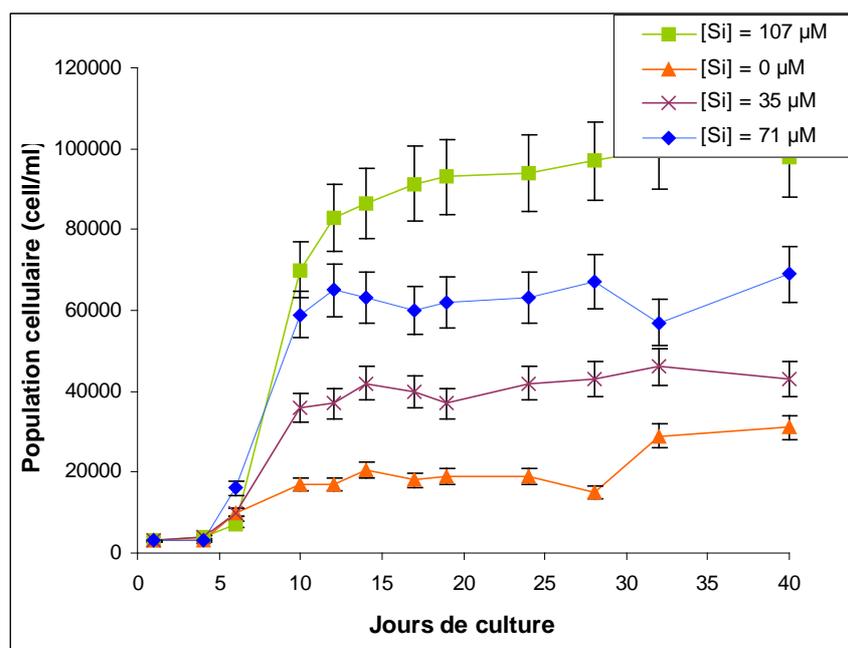


Figure 21 : cinétiques de croissance de *P. multiseriis* CCMP 2708 selon différentes concentrations initiales en silicium dans le milieu de culture L1.

Les teneurs intracellulaires en acide domoïque montrèrent une tendance inverse à celles des teneurs initiales en silicium, jusqu'au 32^{ème} jour du suivi. Seules les teneurs en acide domoïque du 38^{ème} jour furent comparables pour les quatre conditions en silicium testées (figure 22). La toxicité apparut en cours de phase stationnaire (19^{ème} jour) et montra un maximum de production au cours de cette phase, du 28^{ème} au 32^{ème} jour. Les teneurs moyennes en toxine s'échelonnèrent entre 1,2 pg/cellule à 2,5 pg/cellule ; les maximums toxiques atteignant 3,3 pg/cellule (tableau 11) :

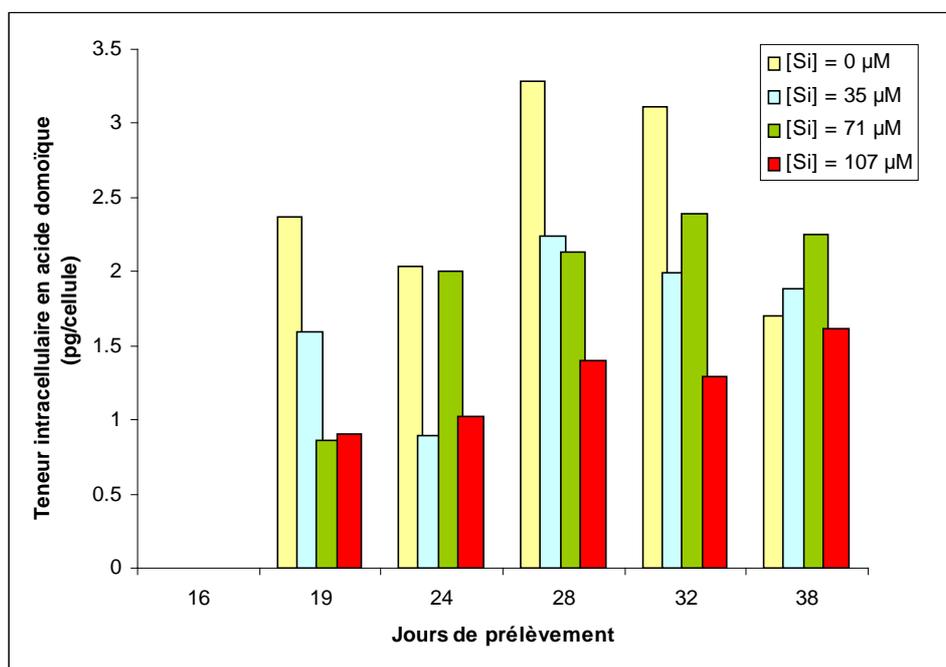


Figure 22 : teneurs intracellulaires en acide domoïque de *P. multiseriis* CCMP 2708 selon différentes concentrations initiales en silicium dans le milieu de culture L1.

Teneur initiale en silicium (μM)	0	35	71	107
Toxicité moyenne (pg/cell)	2,5	1,7	1,9	1,2
Toxicité maximale (pg/cell)	3,3	2,2	2,4	1,6

Tableau 11 : toxicités cellulaires moyennes en maximales de cultures de *P. multiseriis* CCMP 2708 selon différentes concentrations initiales en silicium.

Les données obtenues expérimentalement à partir des cultures de *P. multiseriis* CCMP 2708 vinrent confirmer les tendances rapportées par Pan *et al.* (1996a) : il apparaît une tendance

négative entre toxicité intracellulaire en phase stationnaire et la concentration initiale en silicium (figures 23 et 24), tandis que les taux de croissance moyens en phase exponentielle et la biomasse moyenne en phase stationnaire présentent une corrélation positive par rapport à la teneur initiale en silicium (figures 25 et 26).

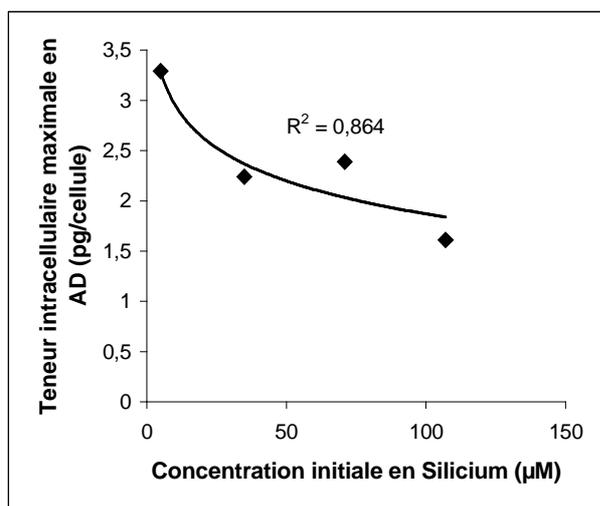


Figure 23 : toxicité cellulaire maximale de *P. multiseriis* CCMP 2708 en fonction de différentes concentrations initiales en silicium ($P=0,1$).

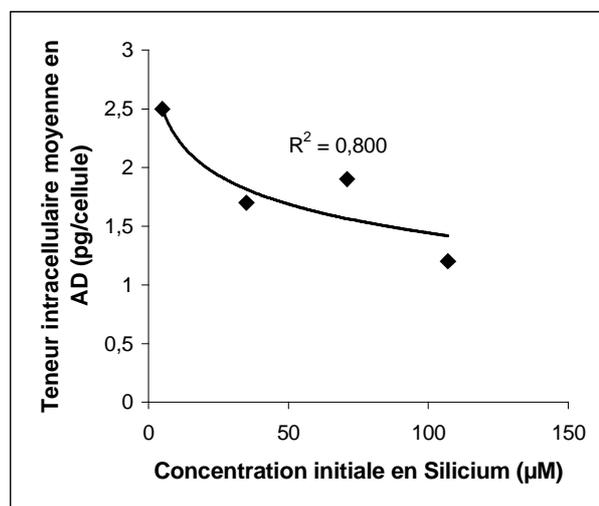


Figure 24 : toxicité cellulaire moyenne de *P. multiseriis* CCMP 2708 en fonction de différentes concentrations initiales en silicium ($P=0,12$).

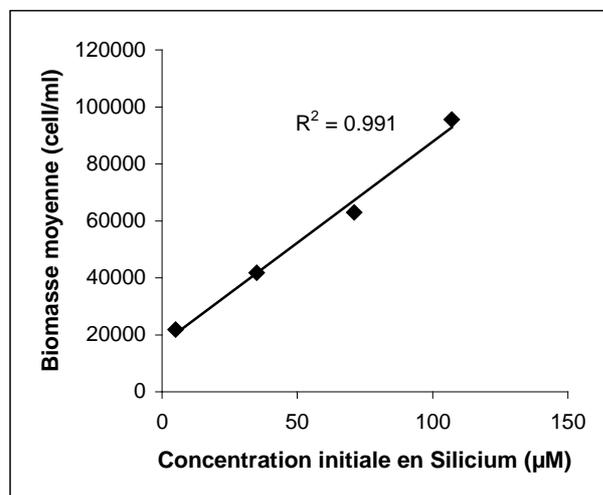


Figure 25 : biomasse moyenne en phase de maturation de *P. multiseriis* CCMP 2708 en fonction de différentes concentrations initiales en silicium ($P<0,01$).

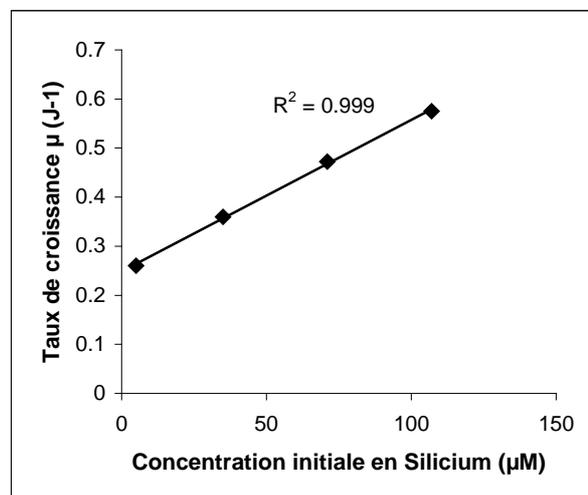


Figure 26 : taux de croissance moyen de *P. multiseriis* CCMP 2708 en fonction de différentes concentrations initiales en silicium ($P<0,001$).

Ces résultats nous ont amenés à nous interroger sur le rôle plus précis du silicium dans la production toxinique. La perturbation de l'acquisition du silicium au niveau cellulaire n'ayant jamais été réalisée pour des souches de *Pseudo-nitzschia sp.*, nous avons poursuivi ces travaux

pour une étude dans ce sens en utilisant le germanium comme inhibiteur compétitif de l'incorporation du silicium lors de nos cultures expérimentales.

2.2.2. Cinétiques de croissance de *Pseudo-nitzschia multiseriis* en présence de germanium

Les cinétiques de croissance des cultures réalisées en duplicat sont présentées dans la figure 27. Les résultats ont montré qu'à très faible dose de germanium ($[Ge]/[Si] = 0.01$), la croissance fut peu perturbée et les taux de croissance moyens en phase exponentielle ($0,42 J^{-1}$) furent comparables à ceux des cultures témoin sans germanium ($0,43 J^{-1}$). Cependant, pour des doses plus importantes, les croissances furent très fortement perturbées pour des teneurs initiales en germanium de $10,7 \mu M$ ($0,12 J^{-1}$), voire totalement inhibées pour une concentration initiale en germanium de $35,1 \mu M$ ($0,01 J^{-1}$).

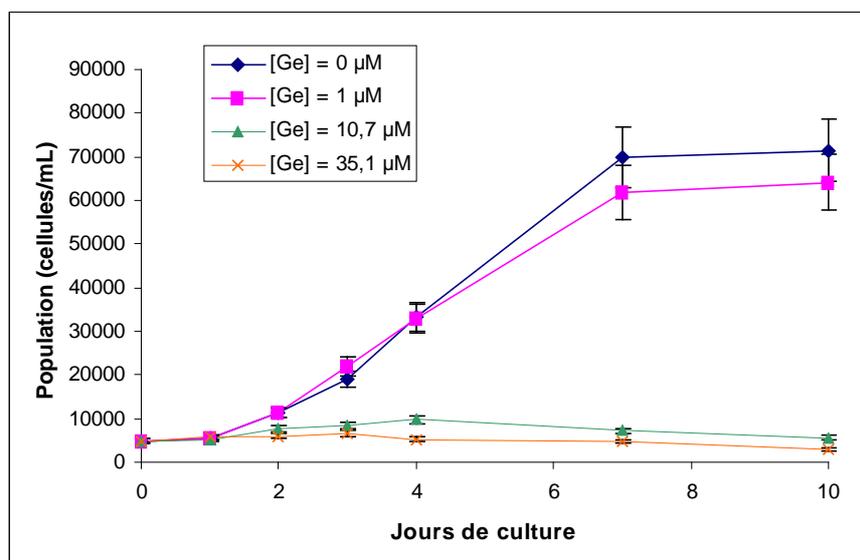


Figure 27 : cinétiques moyennes de croissance lors de cultures en batch de *P. multiseriis* CCL 70 en présence de différentes concentrations de germanium ($n=2$).

2.2.3. Concentration en silicium dans les milieux de culture au cours du suivi

Le germanium est un inhibiteur compétitif des transporteurs actifs du silicium, et cet élément chimique peut être incorporé dans les diatomées. Son influence a été observée de manière indirecte par le dosage du silicium du milieu (figure 28). En absence de germanium, la teneur extracellulaire en silicium chuta rapidement, l'élément ayant été incorporé par les cellules. Cette tendance s'inversa nettement pour des ajouts initiaux en germanium plus importants. Les teneurs en silicium extracellulaire se maintinrent à des valeurs proches des teneurs initiales pour une concentration initiale en germanium dioxyde de $35, \mu M$ (figure 28).

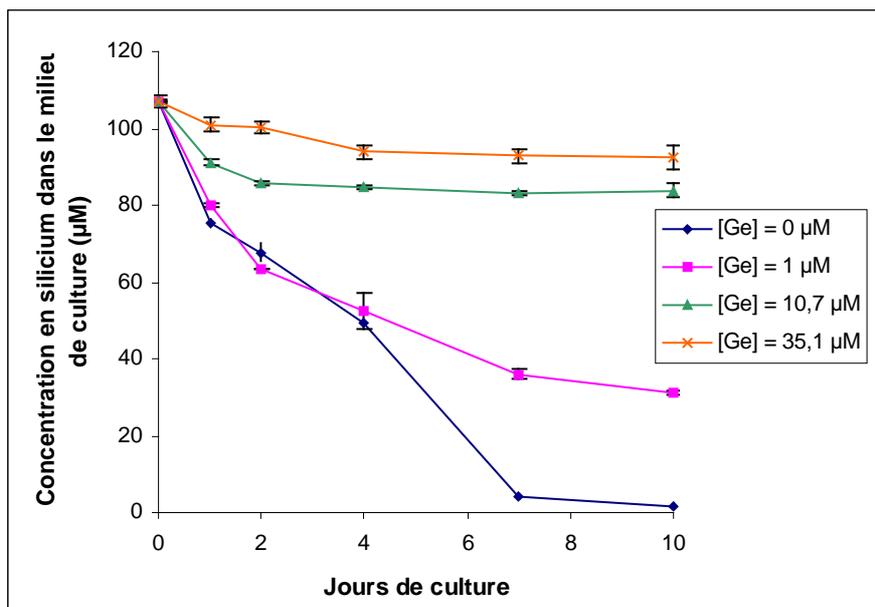


Figure 28 : cinétiques de décroissance moyenne de la concentration en silicium extra-cellulaire dans les cultures en batch de *P. multiseriis* CCL 70 en présence de teneurs initiales variables en germanium ($n=2$).

2.2.4. Toxicité des cultures de *Pseudo-nitzschia multiseriis* en présence de germanium

La toxicité apparut au cours de la phase exponentielle dès le 4^{ème} jour de suivi (figure 29) pour les cultures contenant les plus fortes doses de germanium dioxyde ($[Ge]/[Si] = 0,1$ et $[Ge]/[Si] = 0,3$). Ces mêmes cultures présentèrent une toxicité maximale au 7^{ème} jour de culture allant jusqu'à 0,93 pg/cellule ($[Ge]/[Si] = 0,1$) et 1,13 pg/cellule ($[Ge]/[Si] = 0,3$).

Pour les cultures en présence de germanium dioxyde à 1 µM ($[Ge]/[Si] = 0,01$) et les cultures témoin sans germanium, aucune toxicité intracellulaire ne fut détectée durant la phase exponentielle. Les teneurs intracellulaires en acide domoïque dans celles réalisées en présence de 1 µM de germanium dioxyde ($[Ge]/[Si] = 0,01$) furent détectées dès le 7^{ème} jour pour (figure 29) en début de la phase stationnaire. Les teneurs intracellulaires en acide domoïque atteignirent jusqu'à 0,035 pg/cellule. Les cultures témoin dépourvues de germanium présentèrent des teneurs intracellulaires en acide domoïque au cours du 10^{ème} jour de culture (0,09 pg/cellule), lors de la phase stationnaire (figure 29).

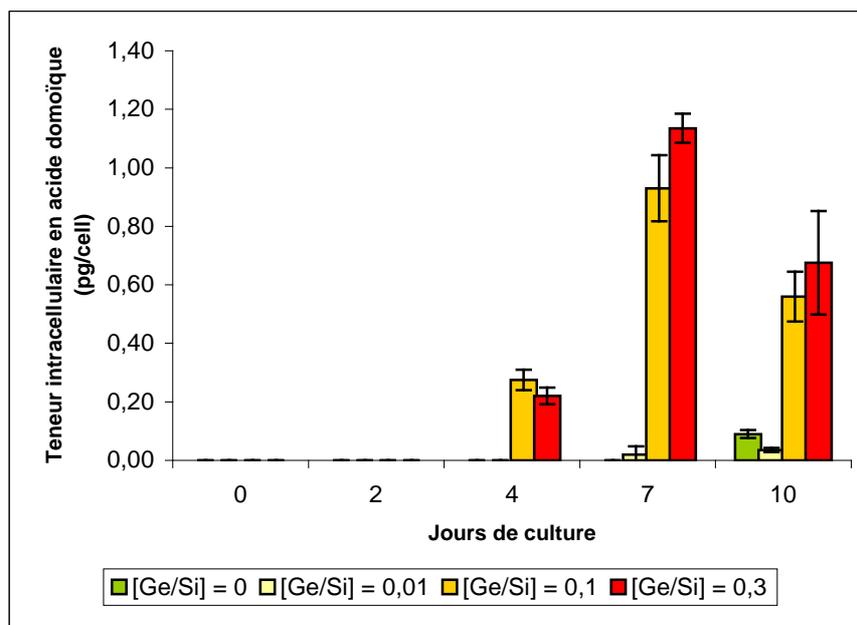


Figure 29 : toxicité intracellulaire en acide domoïque mesurée au cours du suivi expérimental des cultures de *P. multiseriis* CCL 70 en présence de différentes teneurs initiales en germanium ($n=2$).

2.3. Discussion

Les résultats obtenus lors des cultures de *P. multiseriis* CCMP 2708 en présence de différentes teneurs initiales en silicium confirmèrent les conclusions de Pan *et al.* (1996a) : nous avons également obtenu une tendance négative entre teneur initiale en silicium et toxicité intracellulaire (figures 23 et 24). Comme attendu, la teneur initiale en silicium fut corrélée positivement avec la biomasse moyenne en phase stationnaire (figure 25) et le taux de croissance en phase exponentielle (figure 26). Ces résultats sont en accord avec le rôle important du silicium comme nutriment majeur des diatomées et son impact sur la croissance cellulaire (Martin-Jézéquel *et al.*, 2000). Nos résultats ont également mis en avant une relation négative entre taux de croissance en phase exponentielle et teneurs intracellulaires en acide domoïque. L'acide domoïque serait probablement un métabolite secondaire (Bates, 1998) produit lorsque la croissance cellulaire est ralentie (Pan *et al.*, 1996b). Nos corrélations entre croissance cellulaire, toxicité intracellulaire et teneurs initiales en silicium lors de cultures en batch de *P. multiseriis* CCMP 2708 sont donc en accord avec la bibliographie consultée.

Les cinétiques de croissance rapportés pour *Pseudo-nitzschia multiseriis* CCL 70 en présence de différentes teneurs initiales en germanium dans le milieu de culture (figure 27) sont comparables aux résultats obtenus par Azam *et al.* (1973). La croissance de *P. multiseriis* CCL 70 fut très peu perturbée pour un rapport initial [Ge]/[Si] de 0,01 par rapport aux cultures

témoin sans germanium (figure 27), mais fut quasiment interrompue pour un rapport initial [Ge]/[Si] de 0,1. Les cultures réalisées en présence d'un ratio initial [Ge]/[Si] de 0,32 ne montrèrent pas de croissance (figure 27) et l'absorption du silicium extracellulaire lors de ces suivis furent quasi-nuls (figure 28). De par son analogie atomistique avec le silicium, le germanium est un inhibiteur de la croissance des diatomées. Il peut cependant être incorporé dans le frustule et représenter jusqu'à 80% de la portion minérale du frustule chez les modèles de diatomée précédemment étudiés dans la littérature (Azam *et al.*, 1973). Un rapport [Ge]/[Si] de 0,01 n'inhiba pas la croissance et l'incorporation de silicium chez *Nitzschia alba*, alors qu'un rapport [Ge]/[Si] de 0,1 interrompt presque totalement sa croissance et l'incorporation du silicium (Azam *et al.*, 1973). L'inhibition de l'acquisition du silicium par le germanium influencerait donc la croissance de *P. multiseriis* CCL 70 selon une relation négative entre teneur initiale en germanium et taux de croissance rapporté en phase exponentielle.

Lors des cultures de *P. multiseriis* CCL 70 réalisées en présence de germanium, nos résultats ont montré que la teneur toxinique maximale de *P. multiseriis* CCL 70 au cours de ces cultures fut corrélée négativement au taux de croissance en phase exponentielle (figure 30). La toxicité intracellulaire mesurée lors de ces expériences semble donc liée au taux de croissance cellulaire en phase stationnaire. Le rôle du germanium se limiterait donc à inhiber la croissance cellulaire et n'agirait pas directement sur la production toxinique.

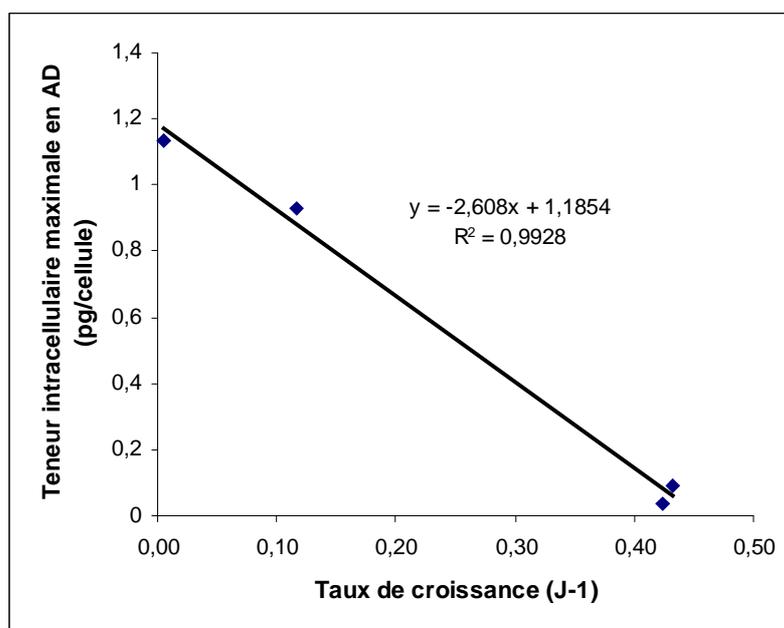


Figure 30 : teneur intracellulaire maximale en acide domoïque rapportée en fonction du taux de croissance moyen en phase exponentielle au cours du suivi des cultures de *P. multiseriis* CCL 70 selon différents ratios initiaux [Ge]/[Si] ($P < 0,001$; $n=2$).

Le silicium joue un rôle structural majeur chez les diatomées (Martin-Jézéquel *et al.* 2000). De plus, les diatomées sont capables de réguler la teneur en silicium de leur frustule en conditions Si-limitantes, jusqu'à un seuil minimum empêchant la constitution du frustule, et le blocage de la division cellulaire (Martin-Jézéquel *et al.*, 2000). Il est très probable que les rapports [Ge]/[Si] testés lors de notre étude ont permis la production du frustule jusqu'à ce seuil de blocage où la division cellulaire n'a pu avoir lieu, entraînant la diminution observée du taux de croissance de la population (figure 9). Nos résultats montrent d'ailleurs que la teneur intracellulaire en acide domoïque n'est pas directement liée aux teneurs intracellulaires en silicium (figure 31). En considérant la baisse de concentration en silicium au cours du suivi des cultures de *P. multiseriis* CCL 70 comme la fraction de silicium incorporée dans les cellules, il a été possible d'estimer la part de silicium absorbée par cellules. Ces valeurs rapportées en fonction de la toxicité cellulaire (figure 31) ne donnent pas de relations significatives.

Il semblerait donc, au vu des résultats de cette expérience, que la production d'acide domoïque par *P. multiseriis* est liée à un arrêt de la croissance, plutôt qu'à une régulation plus directe du silicium intracellulaire sur les voies métaboliques.

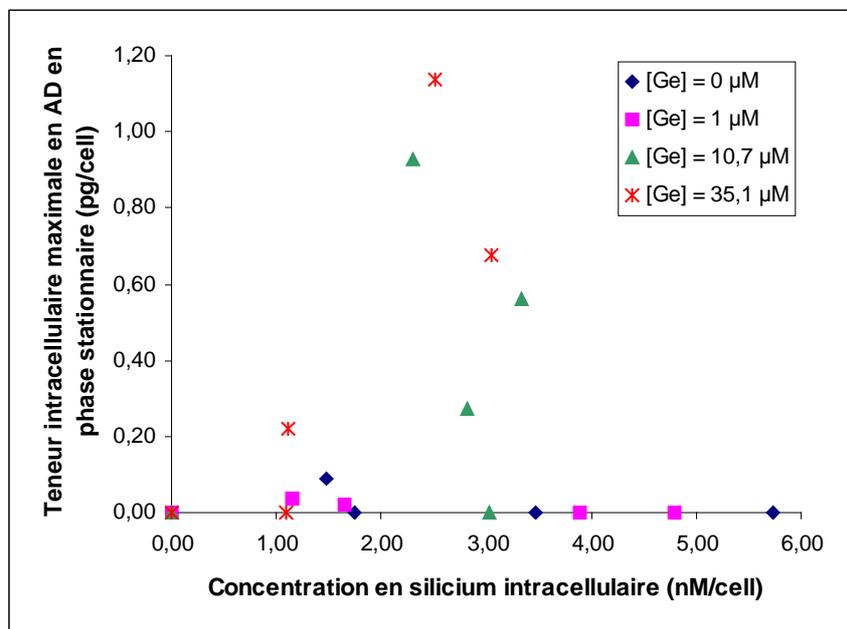


Figure 31 : teneur intracellulaire en acide domoïque rapportée en fonction de la fraction de silicium incorporée rapportée par cellule lors de cultures de *P. multiseriis* CCL 70 selon différents ratios initiaux [Ge]/[Si] ($n=2$).

Partie 4 : Influence des sources azotées sur la croissance et la toxicité de *Pseudo-nitzschia sp.*

1. Introduction

L'azote est un élément chimique indispensable à la constitution des molécules du vivant. Cet atome rentre donc en compte dans le métabolisme des diatomées. L'azote est biodisponible dans le milieu marin selon deux formes : minérales (nitrates, nitrites, ammonium) ou organiques (urée, acide urique, acides aminés, xanthine, guanine, adénine ...). Le diazote N_2 présent dans l'atmosphère peut également servir de source azotée à certains organismes : dans le milieu marin, la cyanobactérie *Trichodesmium sp.* est pour sa part la principale pourvoyeuse d'azote réduit par voie enzymatique, avec 10^8 tonnes de diazote fixés par an en moyenne (Fogg, 1978). Les sources azotées mesurées le long des zones côtières peuvent atteindre, par exemple, des concentrations variables comme celles rapportées par Parsons *et al.* (1977) à partir de mesures effectuées sur différents sites mondiaux : nitrates (0,01-50 μM), nitrites (0,01-5 μM), ammonique (0,1-5 μM), urée (0,1-5 μM) et acides aminés (0,2-2 μM).

L'étude du métabolisme azoté chez les micro-algues n'a cependant réellement débuté qu'en 1920, avec les travaux de Warburg et Negelein sur l'assimilation des nitrates par *Chlorella*. Durant les décennies suivantes, les océanographes ont eu tendance à négliger le rôle des composés azotés autres que les nitrates ou les nitrites (Antia *et al.*, 1976). Les travaux de Thomas (1966) insistèrent sur l'importance de l'ammoniaque comme source azotée minérale préférentielle pour le phytoplancton marin, notamment par rapport aux nitrates (Horrigan & McCarthy, 1982). Des précurseurs comme Harvey (1940) ou Droop (1955, 1961) soulevèrent pourtant la possible assimilation d'azote organique par le phytoplancton marin. L'urée fut ensuite rapidement mise en avant comme source d'azote organique d'intérêt par McCarthy (1970). Dugdale et Goering (1967) démontrèrent les premiers l'importance de la glycine comme forme d'azote organique, et furent rejoints par des études ultérieures sur l'incorporation d'autres acides aminés libres chez le phytoplancton marin (Schell, 1974 ; Wheeler *et al.*, 1974 ; Wheeler *et al.* ; 1977). Depuis lors, les études se sont succédées et ont élargi le champ des différents composés assimilables par les micro-algues. Malgré cela, des souches d'espèces phytoplanctoniques provenant de la même famille, voire du même genre peuvent présenter des différences d'assimilation très marquées, comme cela a été pu être démontré chez certaines diatomées (Wheeler *et al.*, 1974 ; Antia *et al.*, 1975). Toute généralité quant à l'assimilation de sources d'azotes par les micro-algues selon la nature chimique des nutriments ou pour deux espèces taxonomiquement très proches reste donc difficile à établir.

Les séquençages des génomes de *T. pseudonana* (Armbrust *et al.*, 2004) et de *P. tricornutum* (Bowler *et al.*, 2008) ont permis de mettre en évidence différents gènes impliqués dans le métabolisme azoté chez les diatomées. Le génome de *T. pseudonana*, par exemple, code ainsi pour différents transporteurs de nitrates et d'ammonium, pour des enzymes du catabolisme des acides aminés (transaminases, glutamate deshydrogénase) et des purines (uricases, allantocases) (Armbrust *et al.*, 2004). Mais l'outil génomique a également permis de mettre en évidence des voies métaboliques chez les diatomées, notamment le cycle de l'urée révélé grâce à l'annotation dans le génome des enzymes impliquées (Armbrust *et al.*, 2004 ; Allen *et al.*, 2006).

1.1. Incorporation des sources azotées chez les diatomées

1.1.1. Généralités

La fixation et l'assimilation de l'azote consistent biologiquement à la réduction des formes oxydées et du diazote en formes réduites (ammonium et azote organique). Les sources azotées peuvent être ainsi classées selon leur degré chimique d'oxydation (tableau 12) déterminant si ces molécules sont sous la forme oxydées (degré d'oxydation positif) ou réduites (degré d'oxydation négatif) :

Forme azotée	Formule	Degré d'oxydation
Nitrate	NO ₃ ⁻	+5
Nitrite	NO ₂ ⁻	+3
Diazote	N ₂	0
Ammonium	NH ₄ ⁺	-3
Urée	CO(NH ₂) ₂	-3
Glutamine		-4
Acides aminés et purines		-5

Tableau 12 : degrés d'oxydation des sources azotées biodisponibles dans le milieu marin (d'après Syrett, 1981).

Quasiment toutes les algues chlorophylliennes mises en culture croissent en présence de nitrates (NO₃⁻), nitrites (NO₂⁻) ou ammonium (NH₄⁺). Des sources azotées organiques comme l'urée, les acides aminés, la créatine, la pyrimidine, les purines ou encore les sucres aminés sont considérées comme assimilables par le phytoplancton (Antia *et al.*, 1991), les conditions de culture peuvent influencer ces incorporations. Par exemple, en cas de carence azotée chez *P.*

tricornutum, l'incorporation azotée de l'ammonium, des nitrates, de l'urée, des purines et des acides aminés est augmentée (Syrett *et al.*, 1986).

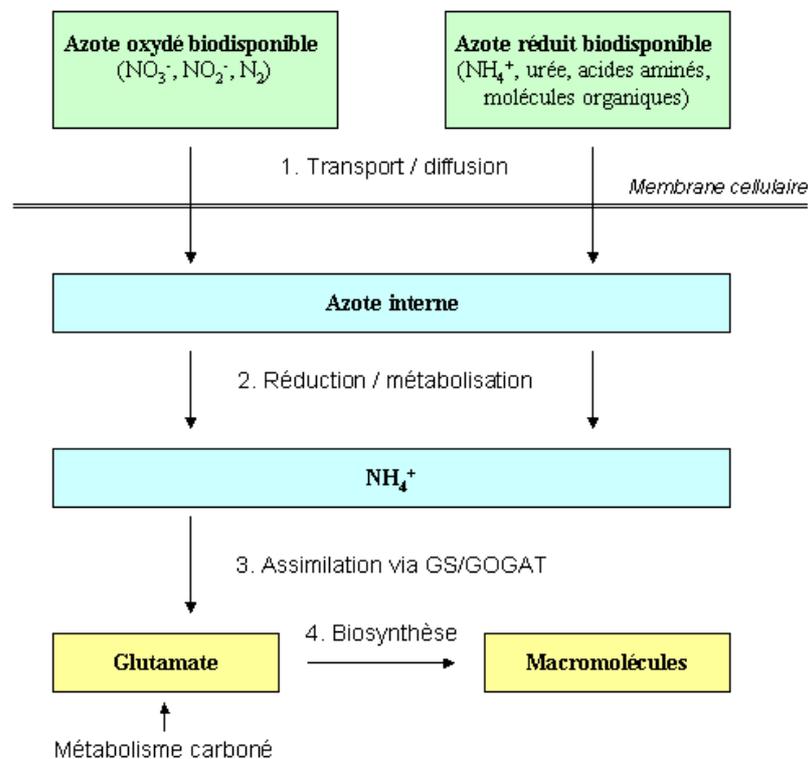


Figure 32 : principales étapes de l'assimilation des nutriments azotés chez les organismes phototrophes aquatiques (d'après Vincent, 1992).

L'assimilation des sources nutritives azotées par les micro-algues phototrophes suit quatre étapes-clé : 1. l'acquisition via des canaux et transporteurs membranaires, 2. la réduction des sources azotées oxydées, 3. l'assimilation du pool d'ammoniaque résultant de leur métabolisation et enfin 4. la biosynthèse de macromolécules (figure 32). Les sources azotées sont incorporées grâce à différents transporteurs (passifs ou actifs) régulés par la présence même des molécules azotées dans le milieu extracellulaire. Au niveau subcellulaire, cette assimilation intervient dans différents compartiments : cytoplasme, vacuole, mitochondrie et chloroplaste (figure 33).

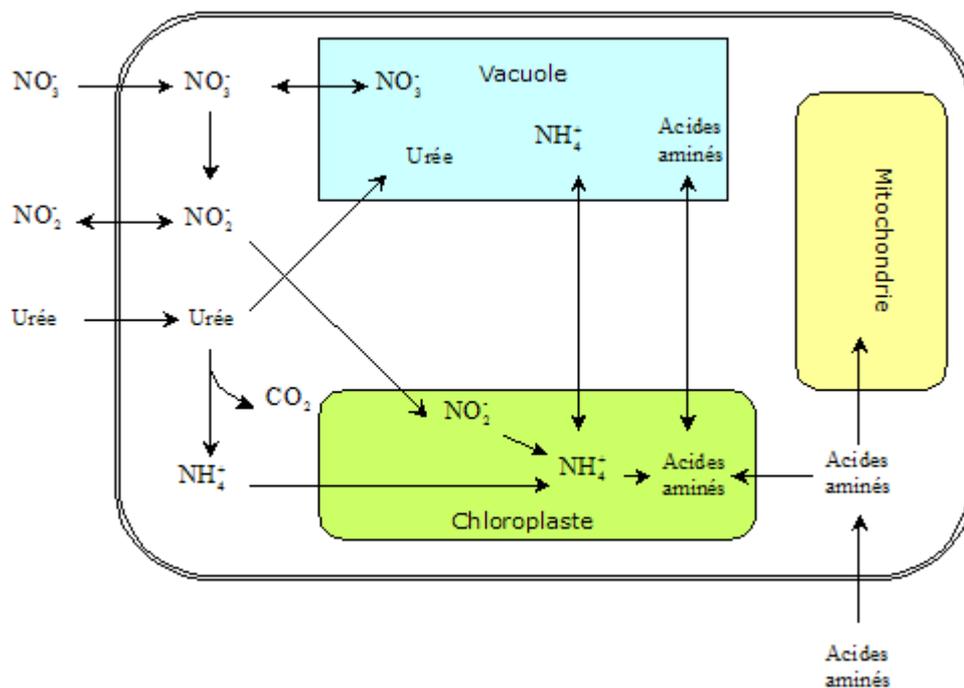


Figure 33 : assimilation d'azote minéral et organique chez les diatomées (d'après Syrett, 1981).

1.1.2. Assimilation des sources azotées minérales

L'acquisition des nitrates et nitrites est effectuée par des transporteurs localisés à la surface des membranes cellulaires. Serra *et al.* (1978a) ont démontré chez *Skeletonema costatum* que les cinétiques d'incorporation impliquaient la contribution simultanée de transporteurs passifs et actifs. Des cellules pré-incubées en présence de nitrates dans un milieu h/2-1 donnèrent de meilleurs taux d'acquisition azotée que des cellules N-déficientes incubées dans un milieu identique mais pauvre en nitrates (Serra *et al.*, 1978a). Pour des cultures de *Phaeodactylum tricornutum* carencées en azote, l'incorporation des nitrates fut également augmentée (Syrett & Peplinska, 1988).

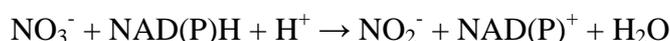
Les gènes de plusieurs transporteurs membranaires de nitrates (*NAT* ou *NRT*) de *Cylindrotheca fusiformis* ont été isolés et clonés dans des banques de gènes cDNA (Hildebrand & Dahlin, 2001). Les teneurs en ARNm transcrits à partir des gènes *NAT* furent importantes lors de cultures de cette diatomée en présence comme en absence de nitrates ou en présence d'urée, mais furent faibles en présence de nitrites, d'ammonium chloride ou d'ammonium-nitrate (Hildebrand & Dahlin, 2001).

Les transporteurs des nitrates peuvent être inhibés par la présence de cycloheximide et de *p*-hydroxymercuribenzoate, alors que ces molécules n'affectent pas les diffuseurs passifs des nitrates (Serra *et al.*, 1978a).

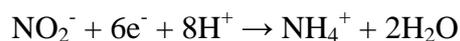
La réduction des nitrates en ammonium s'effectue en deux étapes lors de la dénitrification grâce à l'action de la nitrate réductase et de la nitrite réductase. Ce processus permet d'obtenir de l'azote biodisponible pour les réactions métaboliques. Ces étapes sont consommatrices de potentiel oxydo-réducteur, fourni par des transporteurs comme le NADH ou le NADPH.

La nitrate réductase a été purifiée et caractérisée chez les diatomées *T. pseudonana* (Amy & Garrett, 1974) et *S. costatum* (Gao *et al.*, 1993). Dans ces deux cas comme chez la plupart des Bacillariophycées, la nitrate réductase utilise préférentiellement du NADH comme source de potentiel rédox (Syrett, 1981). Bien que le NADPH soit très rarement utilisé, un cas a par exemple été rapporté chez *S. costatum* (Serra *et al.*, 1978c).

- Première étape de réduction des nitrates en nitrites grâce à la **nitrate réductase** (NR) :



- Seconde étape de réduction des nitrites en ammonium grâce à la **nitrite réductase** (NiR) :



Chez *Phaeodactylum tricornutum* et *Skeletonema costatum*, l'activité de la nitrate réductase est corrélée positivement par rapport à la concentration extracellulaire en nitrates dans le milieu de culture (Berges & Harrison, 1995) et au taux d'assimilation des nitrates (Collos, 1982). Chez des cultures de *P. tricornutum* initialement carencées en azote, les activités de la nitrate réductase en présence de nitrates sont plus importantes qu'en présence d'ammonium (Syrett & Peplinska, 1987). Lors de cultures de *Skeletonema costatum* en présence de nitrates, la transcription du gène *glnII*, codant pour la glutamine synthase isomérase, fut augmentée d'un facteur x2 à x3,5 par rapport à la transcription rapportée dans des cultures mises en présence d'ammonium (Takabayashi *et al.*, 2005). La transcription du gène *glnII* est induite pour assurer l'assimilation des nitrates en forme azotée réduite (figure 34).

La diatomée *Ditylum brightwalli* ne possède une forte activité de la nitrate réductase qu'en présence de nitrates, ceci ayant été vérifié par rapport à des cultures en présence de nitrites, d'urée, d'ammonium ou sans source azotée (Eppley *et al.*, 1969). Mais les nitrates peuvent également constituer une réserve nutritive, comme par exemple chez *Thalassiosira gravida*, *S. costatum* (Dortch, 1982) et *P. tricornutum* ; contrairement à *Chaetoceros affinis* qui accumule beaucoup moins de nitrate intracellulaire (Collos, 1982). Cette capacité de stockage permet

ainsi de maintenir un haut taux d'activité de réduction des nitrates même à faibles teneurs en nitrates dans le milieu de culture.

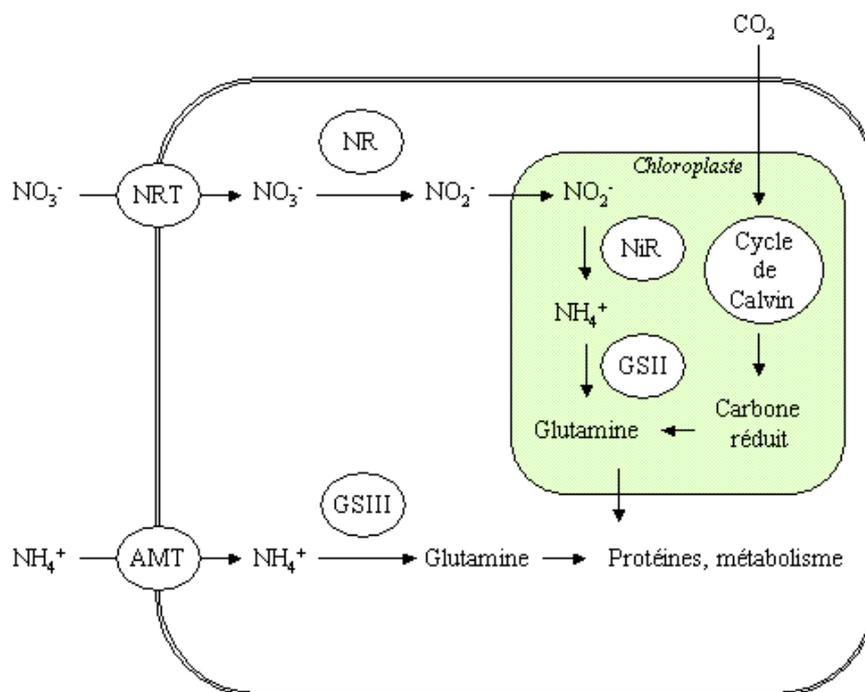


Figure 34 : voies d'assimilation majeures des nitrates et de l'ammonium chez les diatomées et interconnection avec le cycle de Calvin (d'après Takabayashi *et al.*, 2005). AMT : transporteurs ammonium; NRT : transporteurs nitrate; NR : nitrate réductase ; NiR : nitrite réductase ; GSII : glutamine synthétase II ; GSIII : glutamine synthétase III.

Les limitations en fer dans le milieu extracellulaire peuvent affecter l'utilisation de sources azotées par le phytoplancton marin (Raven *et al.*, 1992). En présence de nitrates, les besoins théoriques en fer sont jusqu'à 60 fois plus importants pour le phytoplancton marin qu'en présence d'ammonium (Raven *et al.*, 1992). Chez différentes espèces de diatomées étudiées, la croissance en présence de nitrates nécessite 1,8 fois plus de fer que lors de croissances en présence d'ammonium (Maldonado & Price, 1996). Ces observations peuvent s'expliquer par le fait que la nitrate réductase requiert 2 atomes de fer par enzyme fonctionnelle (Milligan & Harrison, 2000) et que la nitrite réductase requiert 5 atomes de fer par enzyme fonctionnelle (Guerrero *et al.* 1981). La nitrite réductase représente donc l'étape limitante en cas de carence en fer. Lors de cultures de *Thalassiosira weissflogii* en conditions limitantes en fer, les activités de la nitrate réductase baissèrent de 60% et celles de la nitrite réductase baissent d'un facteur x50 (Milligan & Harrison, 2000). Chez *P. tricornutum*, en cas de limitations en fer, les gènes de la nitrate réductase, d'un transporteur plastidique des nitrites, de la nitrite réductase de la GS II sont sous-exprimés (Allen *et al.*, 2008).

Les premières études de croissance de diatomées en cultures en présence d'ammonium ont été rapportées chez *Nitzschia closterium* par Harvey (1933) et Zobell (1935). L'incorporation de l'ammonium est effectuée grâce à des transporteurs membranaires, récemment clonés et caractérisés chez *Cylindrotheca fusiformis* (Hildebrand, 2005). Son assimilation s'effectue chez *S. costatum* directement via la GS II (glutamine synthétase II) dans le chloroplaste ou via la GS III (glutamine synthétase III) dans le cytosol (Takabayashi *et al.*, 2005).

En cas de co-présence d'ammonium et de nitrates dans le milieu de culture, l'ammonium est assimilé en général en premier, et les nitrates ne sont incorporés qu'après (Syrett, 1981 ; Vincent 1992). Ceci a été montré par exemple dans une culture de *Ditylum brightwelli* en co-présence de nitrates et d'ammonium (Eppley *et al.*, 1969). L'activité enzymatique de la nitrate réductase a connu un pic initial avant de chuter fortement et de se maintenir à faible niveau, jusqu'à ce que la teneur en ammonium dans le milieu de culture fut inférieure à 0,5 μM . L'activité de la nitrate réductase augmente alors, tandis que la teneur en nitrates dans le milieu de culture baisse (Eppley *et al.*, 1969). Cette activité initiale de la nitrate réductase a été considérée par les auteurs comme liée à la présence de stocks vacuolaires de nitrates. L'ammonium inhibe la mise en place des transporteurs actifs de nitrates et bloque la formation et l'activation de la nitrate réductase, mais ne bloque pas la diffusion passive des nitrates (Serra *et al.*, 1978b). Cependant, une co-assimilation est observée chez des algues très déficientes en azote, comme lors d'études de *Chlorella* et de *Scenedesmus* carencées en azote (Urhan, 1932).

L'urée inhibe aussi l'activité de la nitrate réductase, comme cela a été montré chez la diatomée *Cyclotella cryptica* (Liu & Hellebust, 1974b). En présence d'urée et d'ammonium chez *Skeletonema costatum*, le taux d'incorporation des nitrates diminue de manière hyperbolique (Lund, 1987).

1.1.3. Assimilation de l'urée

L'incorporation de l'urée peut se faire dans les cellules par diffusion passive ou par transporteur actif. McCarthy (1972) mit cependant en évidence chez la diatomée *Ditylum brightwelli* un mécanisme d'incorporation distinct du métabolisme de l'urée. L'incorporation de l'urée fut également étudiée par ce même auteur chez *Skeletonema costatum*, *Lauderia sp.* et *Thalassiosira weissflogii* (McCarthy, 1972). Chez *Phaeodactylum sp.*, l'incorporation de l'urée semble s'effectuer grâce à un transporteur Na-dépendant qui peut être inhibé par du lithium ou du potassium (Rees *et al.*, 1979). Ce transporteur actif est également inhibé de manière

compétitive par la thiourée, tandis que le CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone) inhibe presque totalement l'incorporation de l'urée à de faibles teneurs de substrat (Rees & Syrett, 1979).

Les cellules de *Phaeodactylum sp.* cultivées en présence d'urée incorporent par ce moyen cette source azotée, mais perdent leur capacité à incorporer de l'urée en présence d'ammoniaque (Rees & Syrett, 1979). Chez des cultures axéniques de *Phaeodactylum sp.*, des concentrations de $[NH_4^+] > 2,5$ mM suffisent à inhiber l'incorporation de l'urée (Molloy & Syrett, 1988). La présence d'ammonium inhibe également l'acquisition de l'urée chez *Thalassiosira pseudonana* et *Skeletonema costatum* (Horrigan & McCarthy, 1982).

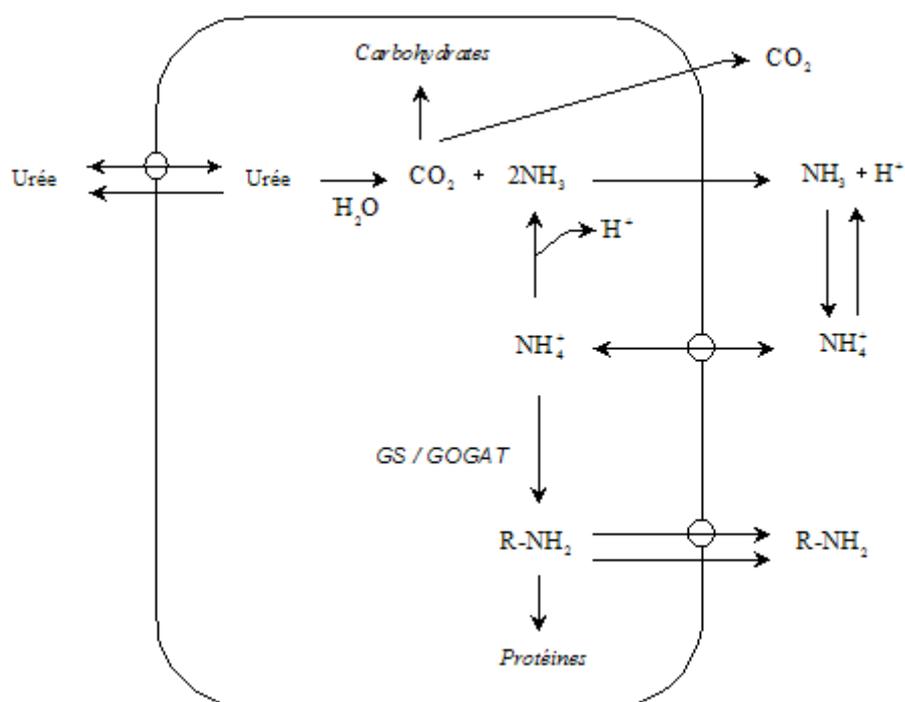


Figure 35 : modèle d'assimilation de l'urée chez *T. pseudonana* (Antia *et al.*, 1991 ; d'après Price & Harrison, 1988).

L'assimilation de l'urée interagit avec les autres voies d'assimilation de sources azotées. Williams et Hodson (1977) rapportèrent que l'incorporation de l'urée est ralentie par la présence d'ammonium. chez le phytoplancton, et notamment chez les diatomées *Thalassiosira pseudonana* et *Skeletonema costatum* (Horrigan & McCarthy, 1982).

Peers *et al.* (2000) ont cependant démontré que chez *T. pseudonana* et *T. weissflogii*, l'activité de l'uréase est détectée indépendamment de la source azotée en présence. Price et Harrison (1988) ont proposé un modèle d'assimilation de l'urée chez *T. pseudonana* à l'échelle de concentrations environnementales (figure 35), suggérant que l'influx d'urée est contrôlé par un

transport actif, et que l'efflux reste soumis aussi bien par transporteur actif que par diffusion passive. L'urée est ensuite dégradée dans la cellule en dioxyde de carbone et en ammonium. Mais en raison de sa nature lipophile, la fixation de l'ammonium NH₃ peut être rendue difficile (Raven, 1980). L'ammonium serait alors excrété dans le milieu extérieur (Castorph & Kleiner, 1984) et réincorporé par des transporteurs actifs sous la forme d'ammoniaque NH₄⁺ (figure 35).

La dégradation de l'urée en ammonium et en dioxyde de carbone peut être catalysée par deux enzymes : l'uréase et l'ATP-urée amidolyase :

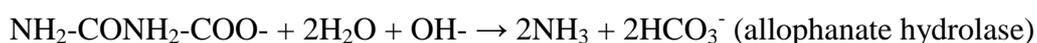
L'**uréase** est une métalloprotéine dépendant du nickel comme co-facteur au niveau de son site catalytique (Mobley & Hausinger, 1989). Chez les algues, elle est présente exclusivement chez les Bacillariophycées (diatomées), Bangiophycées, Chrysophycées, Cryptophycées, Cyanophycées, Euglenophycées, Eustigmatophycées, Phaeophycées, Prasinophycées et Prymnesiophycées (Antia *et al.*, 1991). Récemment, des gènes d'uréase ont été clonés chez trois espèces de diatomées (*P. tricorutum*, *T. pseudonana*, *T. oceanica*) (Baker *et al.*, 2009).

L'uréase catalyse la réaction suivante :



La perte de nickel provoque une perte irréversible de l'activité enzymatique (Hausinger, 1987), les algues cultivées dans des milieux carencés en nickel présentèrent des baisses de leur taux de croissance (Peers *et al.*, 2001). Chez *Thalassiosira weissflogii*, l'uréase est localisée dans la membrane plasmique (Price & Morel, 1988).

L'**ATP-urée amidolyase** (UALase) a été étudiée en premier (Antia *et al.*, 1991) chez la levure (Roon & Levenberg, 1968, 1972). Elle est présente exclusivement chez les Chlorophycées, à l'exception des Mesotaeniales, Ulvales et Zygnematales (Antia *et al.*, 1991). Certains membres des Ulotrichales possèdent cependant les deux enzymes (Bekheet & Syrett, 1977). L'ATP-urée amidolyase consiste en un complexe enzymatique utilisant de la biotine comme co-enzyme de transfert de groupe carboxylique. Deux ensembles enzymatiques distincts la composent: un composant urée carboxylase et un composant allophanate hydrolase.



Les deux composants du complexe enzymatique sont distribués dans deux sous-organelles, et la formation de l'allophanate est requise pour faciliter le transport d'une organelle à l'autre. Leur position exacte dans la cellule chez les micro-algues n'est pas clairement connue (Antia *et al.*, 1991).

1.1.4. Assimilation des acides aminés

Les diatomées marines sont capables d'assimiler différents acides aminés libres (Antia *et al.*, 1991) : arginine (Liu & Hellebust, 1974a,b), glutamate (Liu & Hellebust, 1974a,b), valine (Hellebust, 1970), aspartate (Jolley & Hellebust, 1974), alanine (Lewin & Hellebust, 1978), lysine (Flynn & Syrett, 1986), glycine (Lu & Stephens, 1984), ou encore proline (Liu & Hellebust, 1974a,b). Chez les diatomées benthiques, *Navicula salinarium* assimile l'aspartate, l'arginine, le glutamate, la glycine, l'histidine, la sérine, la valine et la leucine, tandis que *Amphiprora cf. paludosa* assimile l'aspartate et le glutamate en début de croissance, et la sérine, l'alanine l'histidine, la leucine au cours de la phase stationnaire (Admiraal *et al.*, 1987). *Thalassiosira rotula* a été caractérisée comme capable de croître en présence de glutamate (Sloan & Strickland, 1966). La diatomée centrée *Melosira nummuloides* a pu croître en présence d'arginine, asparagine, glutamine, proline et glutamate, mais ne put être cultivée en présence de dix-sept autres acides aminés testés (Hellebust & Guillard, 1967). Lors de cultures en présence d'acides aminés comme sources azotées, *Cyclotella cryptica* assimila rapidement l'aspartate, le glutamate et l'alanine, alors que *Coscinodiscus graani* assimila l'arginine, la valine, l'isoleucine et la leucine. *T. excentrica* incorpore tout acide aminé à l'exception de l'aspartate (Admiraal *et al.*, 1986).

En raison des faibles teneurs en acides aminés dans le milieu marin, leur incorporation s'effectue de manière active. Chez les diatomées pennées, le transport du glutamate (Hellebust & Lewin, 1977) est ainsi effectué par des transporteurs actifs ayant une régulation de type Michaelis-Menten. Les travaux menés par Hellebust (1978) chez la diatomée *Cyclotella cryptica* ont démontré que le transport d'acides aminés n'est pas lié à un flux de protons mais à la concentration en chlorure de sodium. Chez *Phaeodactylum tricorutum*, l'incorporation de la lysine est également Na-dépendante (Flynn & Syrett, 1986). L'augmentation de la concentration en ion potassium K⁺ dans le milieu de culture fait cependant chuter l'incorporation intracellulaire de lysine (Flynn & Syrett, 1986). Le potassium serait donc impliqué dans des mécanismes d'influx actif des acides aminés par antiport (Raven, 1980 ;

Flynn & Syrett, 1986). Si les transporteurs d'acides aminés des diatomées marines sont Na-dépendants, à l'inverse, les algues dulçaquicoles comme *Chlorella vulgaris* utilisent des co-transporteurs à protons H⁺ pour incorporer les acides aminés du milieu extérieur (Sauer, 1984). Les acides aminés semblent être incorporés par trois types de transporteurs distincts chez le phytoplancton afin de véhiculer les acides aminés négativement chargés comme le glutamate et l'aspartate, les acides aminés neutres comme la glycine ou la phénylalanine et enfin les acides aminés chargés positivement comme la lysine et l'arginine (Antia *et al.*, 1991).

L'incorporation de la lysine et de l'arginine chez *Phaeodactylum* n'est pas perturbée par la présence d'ammonium dans le milieu de culture (Flynn & Syrett, 1986). En revanche, Flynn & Wright (1986) ont montré que l'arginine inhibe l'incorporation de l'ammonium chez *Phaeodactylum*. Les acides aminés peuvent aussi inhiber l'incorporation des nitrates (Bilbao *et al.*, 1981) et de l'urée (Kirk & Kirk, 1978). Une privation en azote stimule également les systèmes de transport d'acides aminés chez le phytoplancton (Antia *et al.*, 1991).

1.1.5. Assimilation et métabolisme azoté cellulaire

L'azote biodisponible sous la forme ammoniacale est ensuite transféré sur des acides organiques afin de former des acides aminés. La glutamate deshydrogénase (GDH) et le complexe glutamine synthétase / glutamine α -cétoglutarate aminotransférase ou glutamate synthétase (GS/GOGAT) vont jouer un rôle important dans cette étape. Le complexe GS/GOGAT apparaît comme le système prioritaire pour l'assimilation de l'ammonium chez la plupart des organismes aquatiques phototrophes (Vincent, 1992). Ce complexe permet de greffer une molécule d'ammoniaque sur le glutamate pour former de la glutamine (GS) et d'assurer des opérations de transamination. La réaction catalysée par la glutamine synthétase est endergonique et nécessite un couplage avec l'hydrolyse de l'ATP (Syrett, 1981). La GDH, quant à elle, va permettre de fixer de l'ammoniaque sur de l' α -cétoglutarate.

- Réaction catalysée par la **glutamate deshydrogénase** (GDH) :



- Réaction catalysée par la **glutamine synthétase** (GS) :



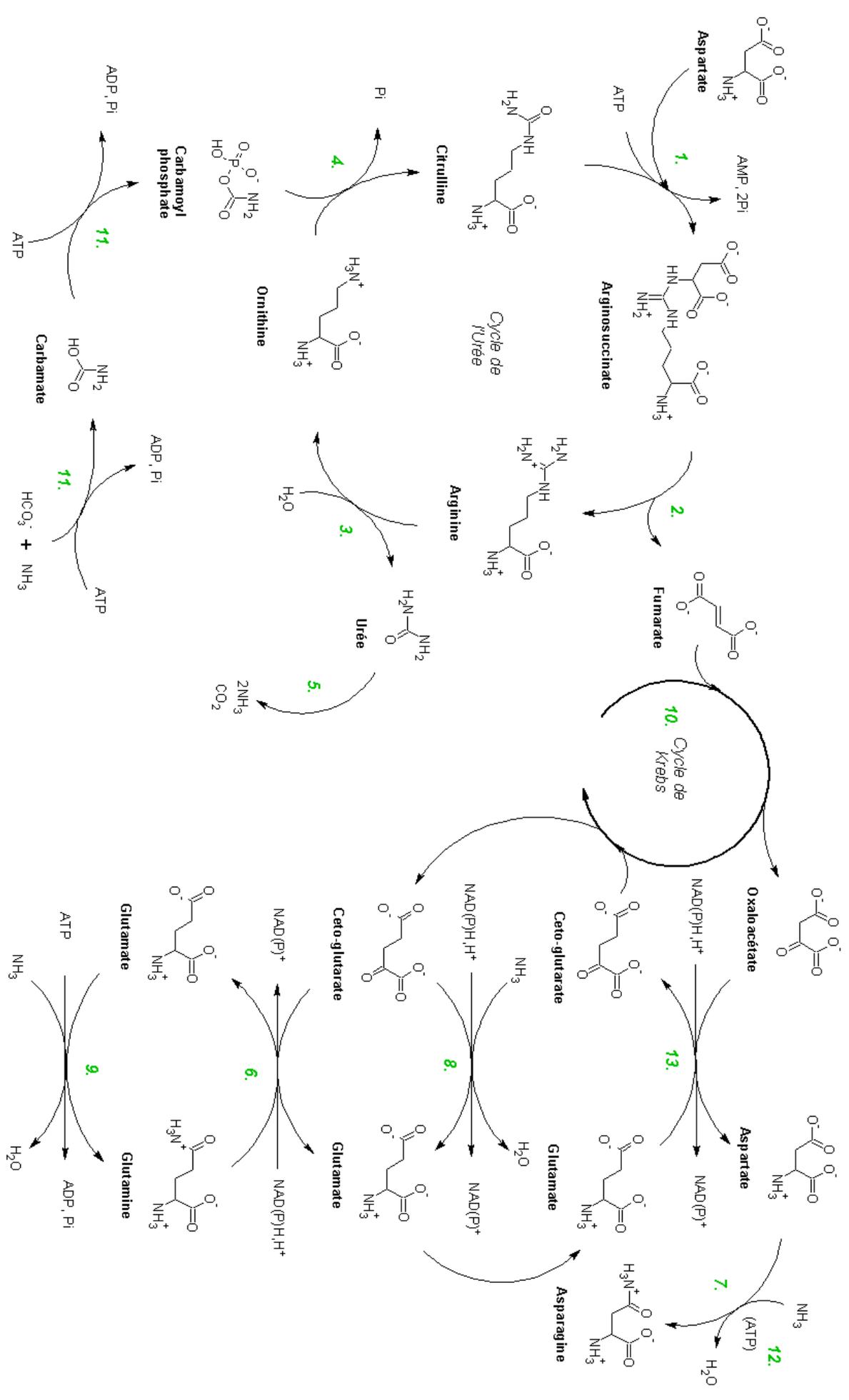
- Réaction catalysée par la **glutamine α -cétoglutarate aminotransférase** ou glutamate synthétase (GOGAT):



Tempest *et al.* (1970) ont montré l'importance de la GS et de la GOGAT comme voie métabolique d'assimilation de l'ammoniaque. Il s'agirait de la principale voie métabolique pour l'assimilation de l'ammonium chez le phytoplancton marin (Bressler & Saiyed, 1984). Chez *Chaetoceros affinis*, l'activité de la GS est associée à de faibles teneurs internes ou externes en azote, alors que l'activité de la GDH est associée à de fortes teneurs en azote (Slawyk & Rodier, 1986). L'aspartate peut aussi être produit par transamination sur un acide organique du cycle de Krebs, l'oxaloacétate, et être ensuite transformé en asparagine, forme de réserve et de transport de l'azote.

Chez la plupart des algues pour qui les désaminases extracellulaires sont absentes, les acides aminés absorbés représentent une source assimilable d'azote organique. Les acides aminés libres détectés en plus grande quantité dans le phytoplancton sont l'aspartate, le glutamate et la leucine (Martin-Jézéquel *et al.*, 1988). L'accumulation intra-cellulaire d'acides aminés libres est contrôlée par les pools intracellulaires en azote, notamment en ammoniaque et en protéines (Dortch, 1982 ; Dortch *et al.*, 1984). En absence de désamination, la glutamine incorporée peut être convertie en glutamate par la GOGAT (Miflin & Lea, 1976). L'arginine représente 30% des incorporations lors de cultures en co-présence d'ammonium et d'arginine chez *Phaeodactylum tricorutum* (Flynn & Wright, 1986). Cette source azotée est également catabolisée par la voie de l'ornithine-urée (Weathers *et al.*, 1978).

Figure 36 (ci-dessous) : vue d'ensemble du métabolisme de l'assimilation de l'azote et du cycle de l'urée. 1. arginosuccinate synthétase. 2. argininosuccinase 3. arginase 4. ornithine transcarbamylase 5. uréase 6. glutamine-oxoglutarate aminotransférase (GOGAT) 7. aspartate-ammonium ligase 8. glutamate deshydrogénase (GDH) 9. glutamine synthétase (GS) 10. cycle de Krebs 11. carbamoyl-phosphate synthase 12. asparagine synthase 13. aspartate transaminase



1.2. Sources azotées et *Pseudo-nitzschia*

Les observations *in situ* des populations de *Pseudo-nitzschia* laissent à supposer qu'un enrichissement en azote total au détriment des teneurs en silicium dans le milieu semble favoriser la production toxinique (Bates *et al.*, 1998). Des relations positives ont été mises en évidence entre déchargement estuarien en nitrates et teneur intracellulaire en acide domoïque (Smith *et al.*, 1990) ou déchargement estuarien en nitrates et proliférations de *Pseudo-nitzschia* spp. (Parsons *et al.*, 2002). Les substrats azotés font donc depuis lors l'objet d'un intérêt croissant dans l'étude de *Pseudo-nitzschia*, pour leur influence à la fois sur la production de biomasse, mais aussi sur la production d'acide domoïque. Cette neurotoxine étant un acide aminé secondaire, elle contient donc un atome d'azote dans sa structure chimique. Toutefois, l'azote ne représentant que 4,5% de la masse moléculaire de l'acide domoïque, il est très peu probable que cette toxine soit une forme de stockage organique de l'azote (Bates *et al.*, 1991). Bates *et al.* (1991) se sont interrogés les premiers sur l'impact d'une carence en azote sur la production d'acide domoïque chez *P. multiseriis*. Cultivée en absence de source azotée, cette diatomée ne produit plus d'acide domoïque.

Les travaux suivants se sont focalisés sur l'influence des sources nitrates et ammonium sur la croissance et la production toxinique de *P. multiseriis* (Bates, 1998b). *P. multiseriis* mise en culture en présence d'ammonium produit plus d'acide domoïque qu'en présence de nitrates, et dès la phase exponentielle lors de cultures en batch. Selon les auteurs, ces observations étaient probablement liées au stress ammoniacal imposé à la croissance des diatomées en présence d'ammonium dans le milieu de culture (Bates *et al.*, 1993). Les sources d'azote organique n'ont été abordées que plus tardivement, lors d'une étude en présence de glutamine, mais sans mesures de la toxicité des cellules de *P. multiseriis* ainsi cultivées (Hillebrand & Sommer, 1996). Lors de l'étude de l'impact des bactéries épiphytes sur la production toxinique, la glycine, la proline et le glutamate ont été ajoutées à des cultures déjà enrichies en nitrates, mais les différentes réponses physiologiques constatées entre conditions de culture des diatomées axéniques et non-axéniques n'ont pas été clairement comprises (Osada & Stewart, 1997 ; Stewart *et al.*, 1997).

L'impact de l'urée comme source azotée organique n'a été étudié qu'à partir des travaux de Howard *et al.* (2007). Ces auteurs effectuèrent un enrichissement d'échantillons d'eau de mer naturelle en baie de Monterey (Californie) contenant des cellules de *Pseudo-nitzschia* spp. et les enrichirent en azote (50 μ M de nitrates, 20 μ M d'ammonium et 20 μ M d'urée). Les taux de croissances des cultures, suivies par dosage de la chlorophylle, étaient statistiquement

équivalents mais les teneurs intracellulaires en acide domoïque étaient plus importantes en présence d'urée ($9,39 \mu\text{g.l}^{-1}$) qu'en présence de nitrates ($4,26 \mu\text{g.l}^{-1}$) ou d'ammonium ($2,64 \mu\text{g.l}^{-1}$). Ils réalisèrent aussi des cultures de *P. australis* et fixèrent les teneurs d'azote à $50 \mu\text{M}$ de nitrates ou d'ammonium et à $25 \mu\text{M}$ d'urée. Les taux de croissance rapportés étaient plus faibles en présence d'urée ($0,5 \text{ J}^{-1}$) qu'en présence de nitrates ou d'ammonium ($0,9 \text{ J}^{-1}$). Les teneurs intracellulaires d'acide domoïque étaient plus importantes en présence d'urée ($1,77 \text{ fg.cell}^{-1}$) qu'en présence de nitrates ($0,165 \text{ fg.cell}^{-1}$) ou d'ammonium ($0,112 \text{ fg.cell}^{-1}$). Il est donc ressorti de cette étude une tendance inverse entre la croissance et la toxicité chez *P. australis*, selon la source d'azote utilisée, tandis que les prélèvements terrain de *Pseudonitzschia spp.* montraient plus de toxicité intracellulaire en présence d'urée (Howard *et al.*, 2007).

Cochlan *et al.* (2008) s'intéressèrent aux cinétiques d'absorption de sources d'azote de *P. australis* pour un isolat provenant de la baie de Monterey, et montrèrent que ces valeurs variaient sensiblement suivant l'espèce chimique d'azote en présence. Ces auteurs ont noté une nette préférence pour les nitrates que pour l'ammonium ou la glutamine. La souche étudiée présenta cependant une très faible affinité avec l'urée lors de l'incorporation de ce nutriment azoté à partir du milieu extracellulaire.

Thessen *et al.* (2009) effectuèrent un travail de comparaison et de synthèse de l'influence des sources nitrates, urée et ammonium sur 19 souches différentes représentant trois espèces respectives (*P. multiseriis*, *P. calliantha* et *P. fraudulenta*). Les résultats obtenus en terme de croissance et de production toxinique ont été très variables d'une souche à l'autre. *P. calliantha* montra un taux de croissance plus important en présence de nitrates ($0,42$ à $0,9 \text{ J}^{-1}$) ou d'ammonium ($0,51$ à $0,87 \text{ J}^{-1}$) qu'en présence d'urée ($0,42 \text{ J}^{-1}$). La concentration totale en acide domoïque mesurée dans ces cultures fut plus forte en présence d'ammonium (60 fg.cell^{-1}) que de nitrates (40 fg.cell^{-1}) ou d'urée (20 fg.cell^{-1}) mais aucune relation significative ne se dégagait entre croissance et production toxinique pour les douze souches suivies. *P. fraudulenta* présenta de fortes variations de croissance suivant les cinq souches suivies, certaines ayant une meilleure croissance en présence des sources azotées urée ($1,02 \text{ J}^{-1}$) ou ammonium ($0,88 \text{ J}^{-1}$). De même, la production toxinique présenta des maximums en présence d'urée ($0,8 \text{ fg.cell}^{-1}$) ou d'ammonium, mais croissance et teneur intracellulaire en acide domoïque n'ont pu être corrélés négativement que chez une seule souche. *P. multiseriis* présenta un meilleur taux de croissance en présence de nitrates ($0,76 \text{ J}^{-1}$) ou d'urée ($0,68 \text{ J}^{-1}$) selon la souche étudiée. De même, le maximum de toxicité fut détecté en présence d'urée ($1,8 \text{ pg.cell}^{-1}$) ou en présence d'ammonium ($0,48 \text{ pg.cell}^{-1}$) selon la souche. Cependant, un seul isolat sur les deux suivis

présenta une corrélation statistiquement positive entre son taux de croissance et sa production toxinique.

Tous ces résultats soulignèrent l'existence d'une forte variation intra-spécifique mais également inter-spécifique dans le comportement des souches toxiques de *Pseudo-nitzschia* en présence des sources azotées nitrates, urée et ammonium. Les corrélations rapportées entre taux de croissance et production toxinique ne furent en conséquence pas toujours identiques. Contrairement aux résultats obtenus avec le silicium et les phosphates, la production toxinique ne semble donc pas directement influencée par le taux de croissance en présence de différentes sources azotées.

2. Rôle de différentes sources azotées et influence de l'hydroxyurée sur la croissance et la production toxinique de *Pseudo-nitzschia spp.*

Lors de ces travaux sur l'influence des sources azotées chez *Pseudo-nitzschia spp.*, nos expérimentations avaient pour objectif de mettre en évidence des conditions azotées préférentielles pour la croissance et la production toxinique. Les sources azotées jusqu'ici testées en culture et rapportées dans la littérature pour le genre *Pseudo-nitzschia spp.* concernaient les nitrates (source de référence dans la plupart des milieux de culture pour diatomées), l'ammonium et l'urée. La glutamine fut testée chez *P. multiseriis* (Hillebrand & Sommer, 1996) et *P. australis* (Cochlan *et al.*, 2008) mais sans rapporter de mesures de toxicité.

Nous avons donc souhaité prolonger ces travaux en y incluant de nouvelles sources azotées organiques. Nous avons pour cela choisi les espèces azotées nitrates, ammonium et urée, macro-nutriments majeurs dans la nutrition azotée des organismes marins (Syrett, 1981). Mais nous avons également inclu les acides aminés tels que le glutamate, la glutamine et l'arginine en raison de leur implication dans le métabolisme azoté. Ces acides aminés ont déjà été confirmés comme nutriments azotés potentiels pour les diatomées (Antia *et al.*, 1991). Le glutamate et la glutamine sont impliqués dans l'assimilation de l'ammonium. L'arginine peut être également dégradée en urée via le cycle de l'urée. Nous avons enfin sélectionné la taurine, car ce déchet métabolique azoté excrété par les invertébrés marins est susceptible d'être relargué en milieu côtier. Dans le cas de bassins ostréicoles comme celui de Marennes-Oléron, cette excrétion par l'huître creuse *Crassostrea gigas* peut représenter 130 à 710 μg d'azote organique.m⁻².h⁻¹ (Robert, 1982). La taurine, abondante dans les tissus de nombreux invertébrés marins (Allen & Garret, 1971), peut ainsi être utilisée comme source d'azote lors de la croissance de *Nitzschia sp. cf. ovalis* et *N. sp. acicularis* (Robert, 1982). L'influence potentielle de la taurine sur la croissance et la production d'acide domoïque chez *Pseudo-nitzschia spp.* pourrait donc être corrélée à la forte concentration d'animaux marins, comme dans le cas de parcs aquacoles.

Nous avons donc procédé à ces travaux comparatifs de la physiologie de la nutrition azotée lors des cultures en batch des souches *P. multiseriis* CCL 70 et *P. australis* PN C1 selon sept différentes sources azotées : nitrates, ammonium, urée, glutamate, glutamine, arginine et taurine. La croissance et la production d'acide domoïque chez ces souches en présence de ces sources azotées ont été suivies lors de ces cultures.

Ces sept sources azotées n'ont pas pu être toutes testées en culture continue en raison des difficultés expérimentales qu'implique ce type de culture (chapitre 2). Nous avons donc procédé à la comparaison de deux conditions azotées : nitrates et urée. A notre connaissance, aucune culture continue de *Pseudo-nitzschia spp.* réalisées en présence d'urée n'a encore été rapportée dans la littérature. Nous avons cependant sélectionné pour ces expériences deux souches de *Pseudo-nitzschia* : *P. multiseriis* CCL 70 et une souche toxique de *P. pungens* PN D10 alors à notre disposition au moment de nos expérimentations (voir détails en chapitre 2).

Enfin, la régulation et l'inhibition de l'incorporation des sources azotées nitrates et urée a été étudiée chez *P. multiseriis* CCL 70 en ajoutant dans le milieu de culture de l'hydroxyurée, un inhibiteur de l'uréase. Ces expériences avaient pour but de réaliser une première mise en évidence de l'activité uréase chez *P. multiseriis* tout en recherchant d'éventuelles compétitions entre incorporation des sources nitrates et urée chez cette diatomée.

2.1. Mise au point des conditions expérimentales

2.1.1. Suivi des cinétiques de croissance et de la production toxinique de *P. multiseriis* CCL70 et *P. australis* PN C1 en présence de différentes sources azotées.

Les cultures en batch de *P. multiseriis* CCL70 et *P. australis* PN C1 ont été réalisées dans les mêmes conditions que celles décrites dans le second chapitre. Les souches ont été préalablement carencées en azote pendant sept jours dans une culture d'eau de mer naturelle enrichie en milieu L1 + Silicium (chapitre 2) dépourvue d'azote. Un prélèvement de toxicité cellulaire a été alors réalisé et cette culture-mère fut ensuite utilisée comme inoculat pour ensemençer les cultures suivies au cours de cette expérience.

Les concentrations en sources azotées testées (tableau 13) dans le milieu de culture L1 + silicium (chapitre 2) ont été fixées de manière à respecter l'équimolarité en azote, en prenant

pour valeur de référence la concentration en nitrates (441 μM) précédemment retenue pour les milieux de culture L1 (voir chapitre 2).

Sel azoté	Souches suivies	Répliques
NaNO_3	CCL 70 / PN C1	2
NH_4Cl	CCL 70 / PN C1	2
Urée	CCL 70 / PN C1	2
Glutamate	CCL 70 / PN C1	2
Glutamine	CCL 70 / PN C1	2
Arginine	CCL 70 / PN C1	2
Taurine	PN C1	2

Tableau 13 : conditions expérimentales réalisées pour l'étude de l'influence de différentes sources d'azote sur la croissance et la production toxinique de deux souches de *Pseudo-nitzschia sp.*

Des cultures en batch de *P. multiseriis* CCL 70 ont été également réalisées dans les mêmes conditions que présenté ci-dessous mais en présence d'une source lumineuse de moindre intensité ($50 \mu\text{mol photons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Les cultures-filles ont été réalisées en un seul répliat : l'une en présence de nitrates et l'autre en présence d'urée. Les concentrations initiales en sources azotées dans le milieu de culture L1 + silicium (chapitre 2) ont été fixées de manière à respecter l'équimolarité en azote (tableau 13). Des prélèvements journaliers ont été effectués afin de mesurer la population cellulaire et la teneur toxinique (voir chapitre 2).

Une culture témoin dans du milieu L1 + silicium (voir chapitre 2) et sans apport azoté a été également préparée pour chaque souche testée et dans chaque condition d'intensité lumineuse testée. Les cultures ont été suivies pendant 20 jours maximum. Des prélèvements journaliers ont été effectués afin de mesurer la population cellulaire et la teneur toxinique (voir chapitre 2).

2.1.2. Comparaison des sources nitrates et urée lors de cultures continues en photobioréacteur chez *P. multiseriis* CCL 70

Des photobioréacteurs ont été préparés et maintenus selon les protocoles développés précédemment (voir chapitre 2) afin d'étudier l'influence des sources azotées nitrates et urée lors des cultures expérimentales de *P. multiseriis* CCL 70.

Une culture-mère de *P. multiseriis* CCL 70 a été cultivée en batch dans un milieu L1 + silicium (chapitre 2) sans source azotée pendant 7 jours avant de servir d'inoculat au cours de ces expériences. Un prélèvement a été effectué afin de doser la teneur toxinique intracellulaire avant que cette culture carencée de *P. multiseriis* CCL 70 ne soit utilisée comme inoculat.

Cette culture a ensuite été utilisée pour ensemercer deux photobioréacteurs remplis avec deux litres d'eau de mer naturelle enrichie en milieu L1 + silicium (chapitre 2) selon des conditions azotées nitrates et urées fixées dans chacun de manière équimolaire (voir tableau 13). La régulation pH dans les photobioréacteurs fut fixée à 8,2 par injection de CO₂. Les deux photobioréacteurs ont d'abord été suivis en batch puis basculés en mode continu au 3^{ème} jour en activant les pompes à un débit de 0,2 ml/min.

Une culture-mère de *P. pungens* PN D10 a été préalablement carencée en azote pendant 7 jours dans de l'eau de mer naturelle enrichie en milieu L1 + silicium (chapitre 2) dépourvue de sources azotées. Un prélèvement a été effectué afin de doser la teneur toxinique intracellulaire. Cette culture fut ensuite utilisée comme inoculat pour ensemercer un photobioréacteur rempli avec deux litres d'eau de mer naturelle enrichie en milieu L1 + silicium (chapitre 2) en présence de nitrates comme source azotée (tableau 13). Le pH fut fixé dans le volume de culture du photobioréacteur à 8,2 et régulé par injection de CO₂. Le photobioréacteur a d'abord été suivis en batch puis basculés en mode continu au 3^{ème} jour en activant les pompes avec un débit de 0,2 ml/min. Au cours de l'expérience, le milieu frais injecté dans le photobioréacteur en mode ouvert (débit : 0,2 ml/min) fut modifié au 14^{ème} jour après que la culture atteignit son état d'équilibre. Il fut alors substitué par un milieu L1 + silicium (chapitre 2) avec pour condition azotée 220 µM d'urée.

2.1.3. Inhibition de l'assimilation de l'urée et effets sur la croissance et la production toxinique de *P. multiseriis* CCL 70

De l'eau de mer artificielle modifiée à partir de la formulation Yerseke a été préparée (voir chapitre 2) et enrichie en milieu de culture L1 + silicium (chapitre 2) sans sources azotées. Des concentrations en nitrates et en urée ont été fixées et des doses variables d'hydroxyurée ont été ajoutées dans les milieux de cultures (tableau 14). Des teneurs en hydroxyurée trop fortes de l'ordre du millimolaire pouvant bloquer le cycle cellulaire (Vaulot *et al.*, 1986), nous avons fixé nos concentrations pour des valeurs 200 à 800 fois en-dessous des concentrations finales utilisées lors de travaux sur le cycle cellulaire des diatomées.

Condition	Nitrates (μM)	Urée (μM)	Hydroxyurée (μM)
Nitrates + 0 μM d'hydroxyurée	441	0	0
Nitrates + 17 μM d'hydroxyurée	441	0	17
Urée + 0 μM d'hydroxyurée	0	220	0
Urée + 8,5 μM d'hydroxyurée	0	220	8,5
Urée + 17 μM d'hydroxyurée	0	220	17
Urée + 34 μM d'hydroxyurée	0	220	34

Tableau 14 : conditions expérimentales mises en place en duplicat au cours de l'expérience d'inhibition de la croissance de *P. multiseriis* CCL 70 en présence d'hydroxyurée.

Un inoculat de *P. multiseriis* CCL 70 a été préalablement carencé en azote pendant sept jours dans une culture en batch d'eau de mer artificielle de formulation Yerseke modifiée enrichie en milieu L1 + silicium (chapitre 2) sans azote. Cette culture-mère fut utilisée comme inoculat pour ensemercer chaque culture expérimentale. Les cultures réalisées en duplicat ont été suivies en batch (voir chapitre 2) jusqu'à la fin de leur phase stationnaire. Des prélèvements pour le comptage cellulaire ont été réalisés régulièrement mais la teneur toxinique intracellulaire des diatomées n'a pas été rapportée durant cette expérience.

2.2. Résultats

2.2.1. Suivi des cinétiques de croissance et de la production toxinique de *P. multiseriis* CCL70 et *P. australis* PN C1 en présence de différentes sources azotées.

2.2.1.1. Croissance moyenne en phase exponentielle et biomasse moyenne en phase stationnaire des souches *P. multiseriis* CCL 70 et *P. australis* PN C1 en présence de différentes sources azotées

Les taux de croissance en phase exponentielle de *P. multiseriis* CCL 70 ont été maximaux en présence d'ammonium ($1,12 \text{ J}^{-1}$) (figure 37), alors que les taux de croissance des cultures en présence d'arginine, glutamine, urée et nitrates, les croissances furent très similaires (entre $0,59$ et $0,63 \text{ J}^{-1}$). En présence de glutamate, la souche présenta un faible taux de croissance en phase exponentielle ($0,08 \text{ J}^{-1}$) comparable au témoin sans azote. Les cultures réalisées en présence d'ammonium présentèrent également les plus importantes biomasses moyennes lors de la phase stationnaire rapportées expérimentalement (160567 cellules/ml). Les cultures produisirent très peu de biomasse en présence de glutamate (13750 cellules/ml) ou en absence de sources azotées. Les biomasses moyennes rapportées en phase stationnaire se situèrent dans une fourchette de valeurs étroite (entre 114525 et 139063 cellules/ml) en présence de nitrates, d'urée, d'arginine et de glutamine (figure 38).

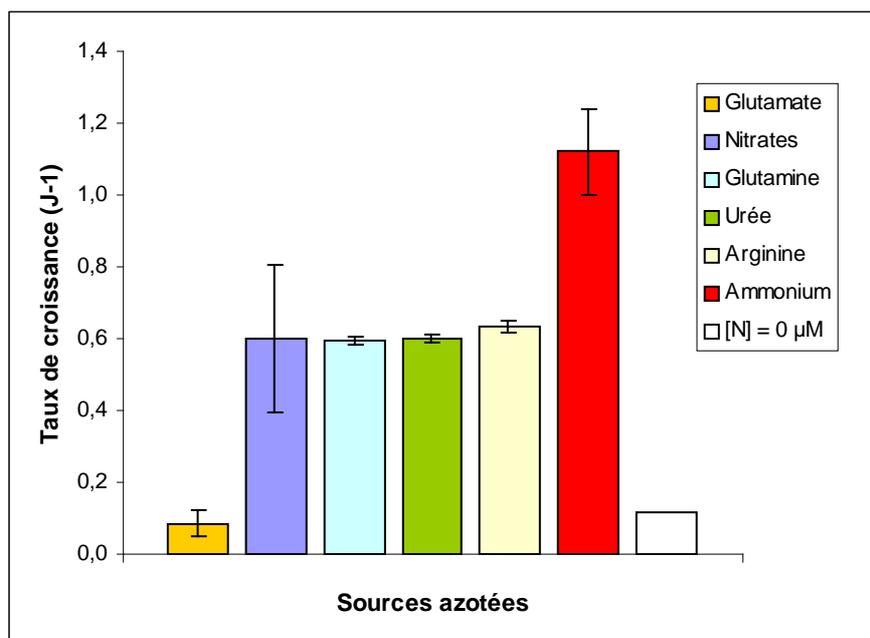


Figure 37 : taux de croissance moyens lors de la phase exponentielle de cultures de *P. multiseriis* CCL 70 mises en présence de différentes sources azotées ($n=2$).

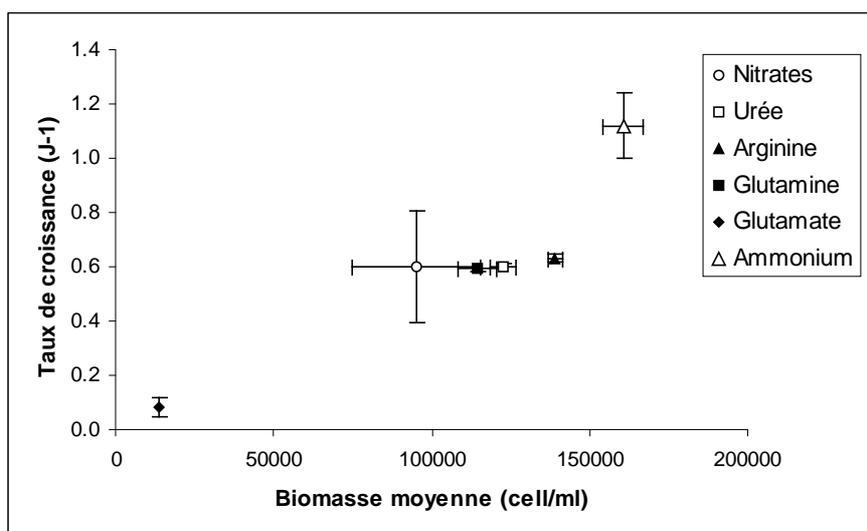


Figure 38 : taux de croissance en phase exponentielle de *P. multiseriis* CCL 70 en fonction de la biomasse moyenne en phase stationnaire lors de cultures selon différentes conditions azotées ($n = 2$ à 5).

Il apparaît, après analyse de ces résultats (figure 38) par régression linéaire, une corrélation positive ($P < 0,01$; $R^2 = 0,88$) entre taux de croissance moyen en phase exponentielle et biomasse moyenne en phase stationnaire ($n = 2$ à 5). Le test de Spearman appliqué à ces deux séries de données confirme également cette corrélation forte et positive ($\rho = 0,964$; $P < 0,001$).

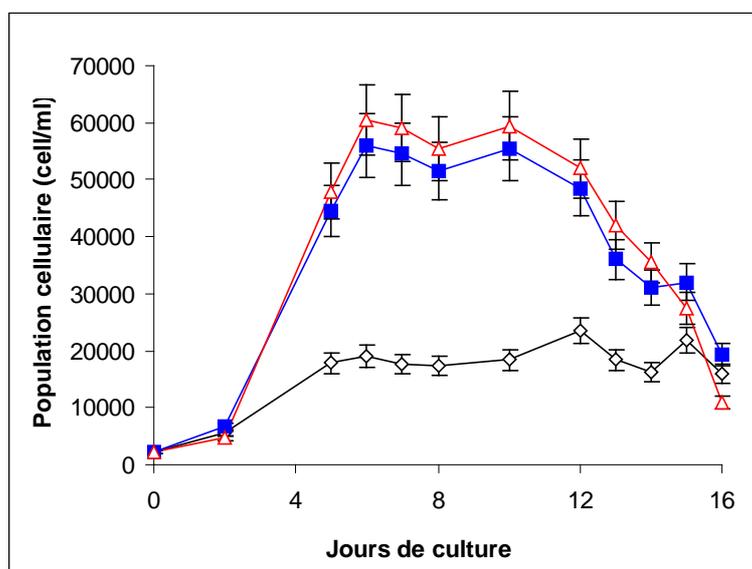


Figure 39 : cinétiques de croissance de *P. multiseriis* CCL 70 lors de cultures en batch à faible intensité lumineuse ($50 \mu\text{mol photons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) en présence de nitrates (courbe bleue), urée (courbe rouge) et sans source azotée (courbe noire) ($n=1$).

Lors du suivi des cultures en batch de *P. multiseriis* CCL 70 à faible intensité lumineuse (figure 39), les taux de croissance en phase exponentielle furent maximaux en présence d'urée ($0,67 \text{ J}^{-1}$) et de nitrates ($0,56 \text{ J}^{-1}$) contre un faible taux de croissance pour la culture témoin sans azote ($0,33 \text{ J}^{-1}$). Les biomasses moyennes en phase stationnaire furent également plus fortes pour les cultures enrichies en urée (58625 cellules/ml) et en azote (54500 cellules/ml) que pour la culture-témoin (19566 cellules/ml).

Le suivi de l'influence de différentes sources azotées chez la souche *P. australis* PN C1 montra que toutes les conditions azotées testées permirent la croissance de la souche par rapport à la culture témoin sans azote (figure 40). *P. australis* PN C1 présenta les taux de croissance moyen en phase exponentielle les plus importants en présence de glutamine ($0,6 \text{ J}^{-1}$) et d'ammonium ($0,56 \text{ J}^{-1}$), alors que les résultats pour les sources azotées nitrates et arginine restèrent sensiblement comparables ($0,48 \text{ J}^{-1}$). Les taux de croissances les plus faibles furent rapportés en présence d'urée ($0,44 \text{ J}^{-1}$), de glutamate ($0,37 \text{ J}^{-1}$) et de taurine ($0,33 \text{ J}^{-1}$). Les résultats présentèrent de faibles variations entre chaque réplica suivi expérimentalement.

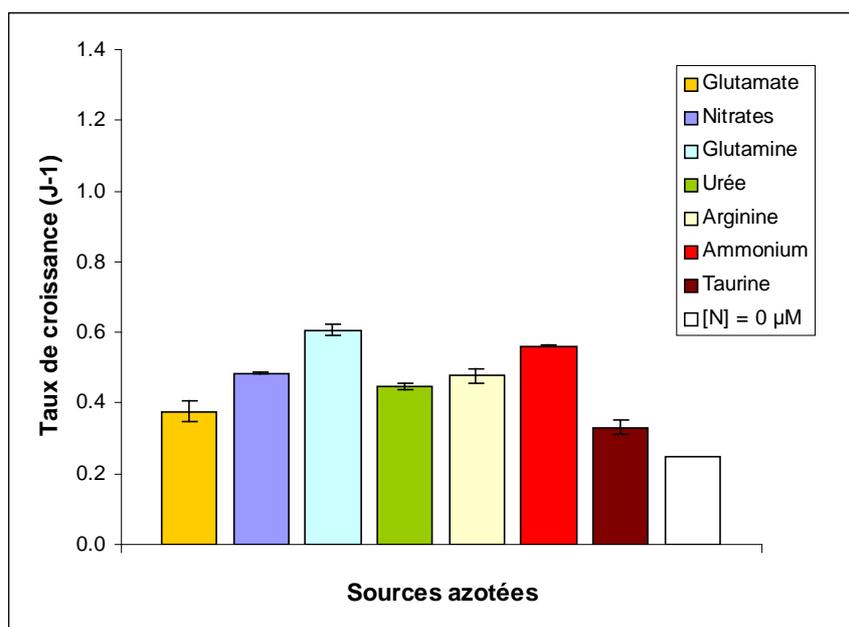


Figure 40 : taux de croissance moyen en phase exponentielle de cultures de *P. australis* PN C1 mises en présence de différentes sources azotées ($n=2$).

Les plus fortes biomasses moyennes en phase stationnaire (figure 41) furent rapportées en présence de taurine (365000 cellules/ml), d'urée (336063 cellules/ml), d'arginine (360333 cellules/ml) et de nitrates (336000 cellules/ml), alors que les cultures en présence d'ammonium (191250 cellules/ml), de glutamine (156700 cellules/ml) et de glutamate (136048 cellules/ml)

présentèrent des biomasses comparables mais sensiblement plus faibles qu'en présence des autres sources azotées.

Par rapport aux taux de croissance en phase exponentielle, les cultures réalisées avec de la taurine comme source azotée présentèrent des taux de croissance moyen en phase exponentielle les plus faibles et des biomasses en phase stationnaire importantes. Les cultures en présence d'ammonium et de glutamine présentèrent les biomasses parmi les plus faibles et les taux de croissance les plus forts (figure 41). Seules les cultures en présence de glutamate présentèrent des taux de croissance moyen et des biomasses faibles.

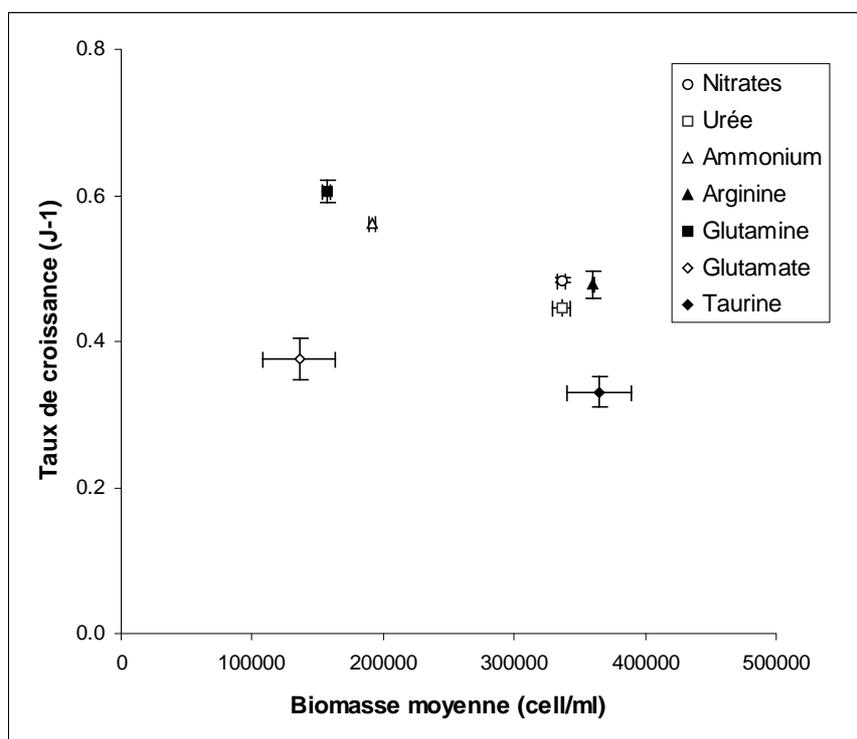


Figure 41 : taux de croissance moyen en phase exponentielle de *P. australis* PN C1 en fonction de la biomasse moyenne en phase stationnaire lors de cultures en présence de différentes sources d'azote ($n = 2$ à 5).

Il n'apparaît pas, après analyse de ces résultats (figure 41) par régression linéaire, de tendance négative significative ($P = 0,67$; $R^2=0,03$) entre taux de croissance moyen en phase exponentielle et biomasse moyenne en phase stationnaire ($n = 2$ à 5). Le test de Spearman appliqué à ces jeux de données ne permet pas non plus de distinguer de tendance en comparant ces résultats ($\rho = 0,04$; $P = 0,885$).

2.2.1.2. Concentration toxinique intracellulaire des souches *P. multiseriis* CCL 70 et *P. australis* PN C1 en présence de différentes sources azotées

La comparaison des teneurs intracellulaires moyennes en acide domoïque en fonction des biomasses moyennes obtenues durant la phase stationnaire a été effectuée pour les cultures en batch des souches de *P. multiseriis* CCL 70 et *P. australis* PN C1.

Dans les cultures de *P. multiseriis* CCL 70 (figure 42), les teneurs toxiniques moyennes lors de la phase stationnaire furent maximales en présence d'urée (2,18 pg/cellule) et de nitrates (1,38 pg/cellule). Les cultures mises en présence des sources azotées organiques glutamine et arginine donnèrent des teneurs intracellulaires moyennes en acide domoïque lors de la phase stationnaire (respectivement de 0,22 et de 0,49 pg/cellule) nettement inférieures aux teneurs détectées en présence d'urée et de nitrates. La source glutamate fut la seule source azotée testée qui ne permit pas la production d'acide domoïque. La plus faible teneur intracellulaire toxinique moyenne en phase stationnaire rapportée lors de ces expériences correspondit aux cultures réalisées en présence d'ammonium (0,14 pg/cellule). La culture-témoin suivie en absence de source azotée ne permit pas également la production de toxines.

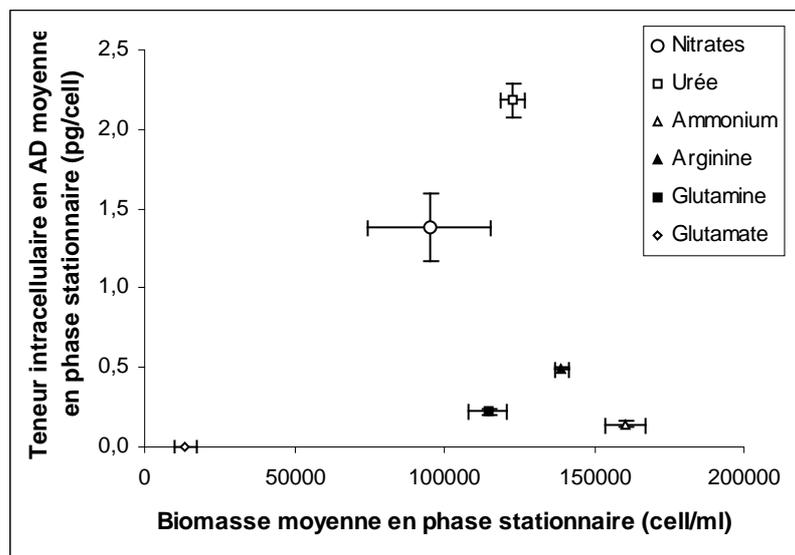


Figure 42 : teneur intracellulaire moyenne en acide domoïque en fonction de la biomasse moyenne de *P. multiseriis* CCL 70 en phase stationnaire pour des cultures mises en présence de différentes sources azotées ($n = 2$ à 5).

L'analyse statistique des résultats obtenus (figure 42) ne permet pas de mettre en évidence de tendance entre teneur toxinique intracellulaire moyenne et biomasse moyenne à la phase stationnaire : en effet, la régression polynomiale indique une tendance négative ($P = 0,145$; $R^2 = 0,387$) tandis que le test de Spearman indique une tendance positive faible ($\rho = 0,450$; $P = 0,255$).

Concernant la comparaison entre taux de croissance moyen en phase exponentielle et teneur toxinique intracellulaire moyenne durant la phase stationnaire (figure 43), l'analyse statistique des résultats ne permet pas non plus d'obtenir de tendance. L'analyse par régression polynomiale donne une tendance négative faible ($P = 0,142$; $R^2 = 0,426$), tandis que le test de Spearman donne une tendance positive interprétable comme faible ($\rho = 0,523$; $P = 0,181$).

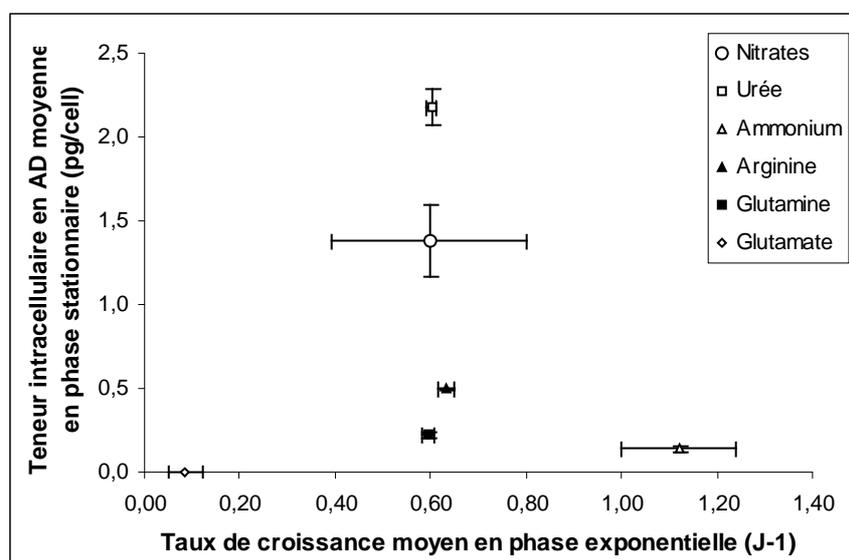


Figure 43 : teneur intracellulaire moyenne en acide domoïque en fonction du taux de croissance moyen de *P. multiseriis* CCL 70 en phase exponentielle pour des cultures mises en présence de différentes sources azotées ($n = 2$ à 5).

Lors du suivi des cultures en batch de *P. multiseriis* CCL 70 à faible intensité lumineuse, la production toxinique (figure 44) débuta en phase stationnaire au 7^{ème} jour pour la culture en présence d'urée et au 8^{ème} jour pour la culture en présence de nitrates. La teneur intracellulaire en acide domoïque fut maximale pour la culture en présence d'urée (5,17 pg/cellule) dès le 8^{ème} jour avant de décroître à des valeurs comprises entre 2,75 pg/cellule et 3,22 pg/cellule, tandis que la teneur intracellulaire en toxines pour la culture en présence de nitrates resta située entre des valeurs de 2,57 pg/cellule à 3,16 pg/cellule. Un pic isolé fut détecté (0,19 pg/cellule) pour la culture témoin sans source azotée.

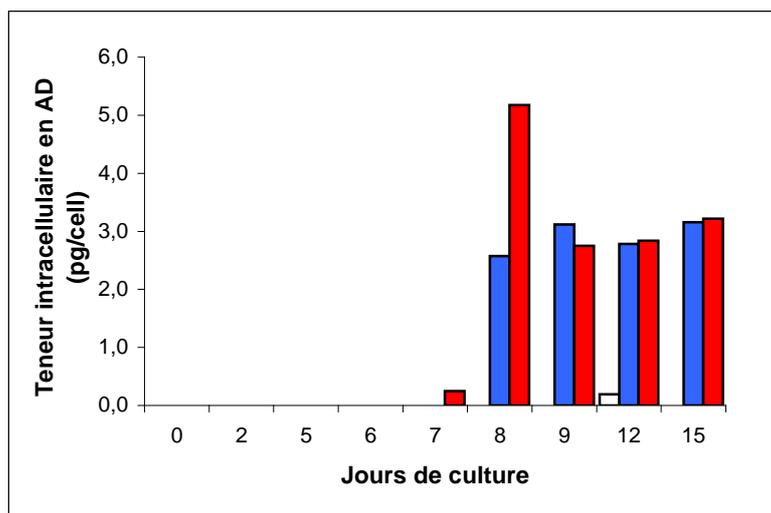


Figure 44 : teneur intracellulaire en acide domoïque de *P. multiseriis* CCL 70 lors de cultures en batch à faible intensité lumineuse ($50 \mu\text{mol photons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) en présence de nitrates (aires bleues), urée (aires rouges) et sans source azotée (aire blanche) ($n = 1$).

La souche *P. australis* PN C1 produit de l'acide domoïque en présence de nitrates, d'urée, d'ammonium et de glutamate, mais les autres sources azotées testées ne favorisèrent pas la présence de toxines dans les cellules (figure 45). Les plus fortes teneurs intracellulaires moyennes en acide domoïque détectées lors de la phase stationnaire ont été obtenues en présence des sources azotées glutamate (22,57 fg/cellule) et ammonium (19,49 fg/cellule). La souche étudiée présenta une teneur intracellulaire moyenne en phase stationnaire plus importante en présence de nitrates (12,33 fg/cellule) qu'en présence d'urée (7,93 fg/cellule) (figure 45).

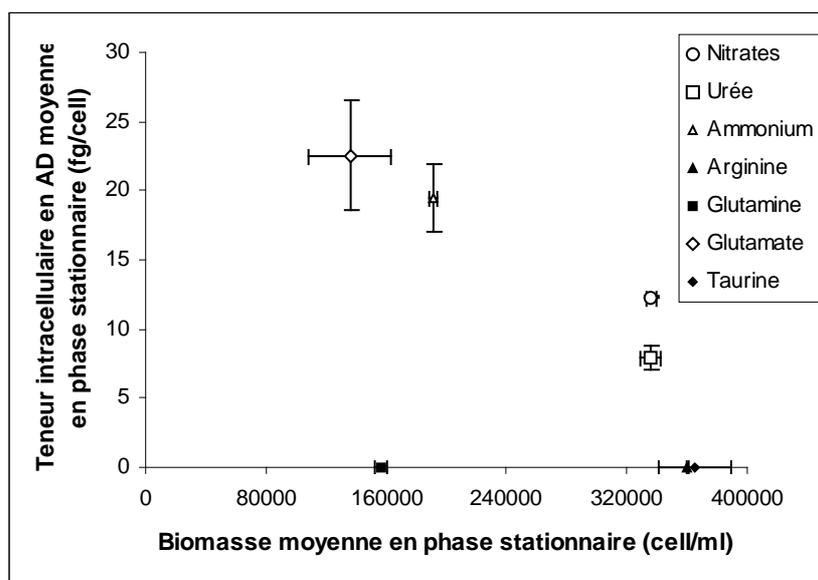


Figure 45 : teneur intracellulaire moyenne en acide domoïque en fonction de la biomasse moyenne de *P. australis* PN C1 en phase stationnaire pour des cultures mises en présence de différentes sources azotées.

L'analyse statistique des données (figure 45) indique une tendance négative entre la teneur intracellulaire moyenne en acide domoïque et la biomasse moyenne en phase stationnaire ($n = 2$ à 5). Par régression linéaire, cette tendance négative est faible ($P = 0,622$; $R^2 = 0,04$), de même que par le test de Spearman ($\rho = -0,266$; $P = 0,498$).

La comparaison entre taux de croissance moyen en phase exponentielle et la teneur intracellulaire moyenne en acide domoïque en phase stationnaire ($n = 2$ à 5) (figure non représentée) permet d'obtenir une tendance statistique positive très faible par régression linéaire ($P = 0,733$; $R^2 = 0,02$) comme par test de Spearman ($\rho = 0,178$; $P = 0,662$).

Les dynamiques de production d'acide domoïque au cours de la croissance diffèrent nettement selon la souche étudiée et la condition azotée. Elles ont été comparées chez les deux souches *P. multiseriis* CCL 70 (figures 46 et 47) et *P. australis* PN C1 (figures 48 et 49).

Chez *P. multiseriis* (figure 46), les cultures en présence ammonium présentèrent une teneur intracellulaire précoce de toxines, dès le début de la phase exponentielle (3^{ème} jour) alors que les taux de croissance augmentèrent (figure 47), tandis que pour les conditions nitrates et urées, la présence de toxines intracellulaires commença en fin de phase exponentielle (5^{ème} jour et 7^{ème} jour) (figure 46). Les cultures enrichies en sources azotées glutamine et arginine donnèrent des teneurs intracellulaires en toxines détectées dès le début de la phase stationnaire (5^{ème} jour).

Dans les cultures en présence de source azotée urée, la toxicité intracellulaire chez *P. multiseriis* CCL 70 sembla décroître après une rapide production toxinique dès la fin de la phase exponentielle (7^{ème} jour) (figure 46), contrairement aux dynamiques observées pour les cultures mises en présence de nitrates, arginine ou glutamine où la concentration intracellulaire en acide domoïque sembla augmenter tout au long de la phase stationnaire (figure 46).

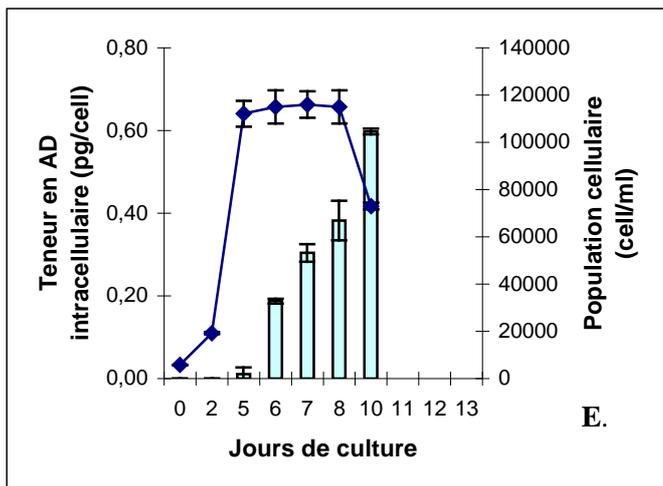
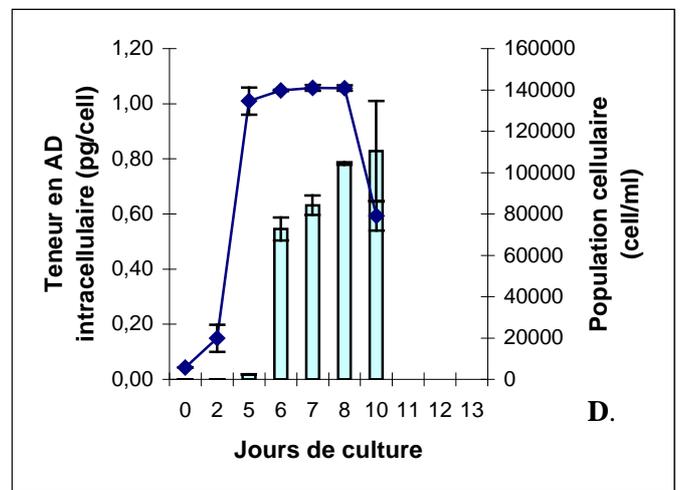
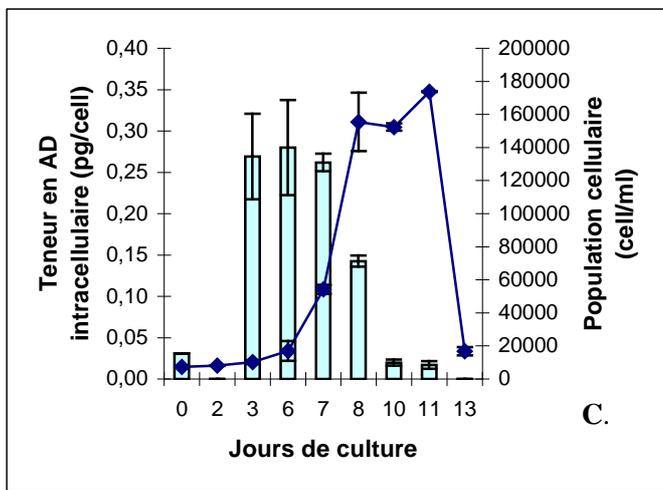
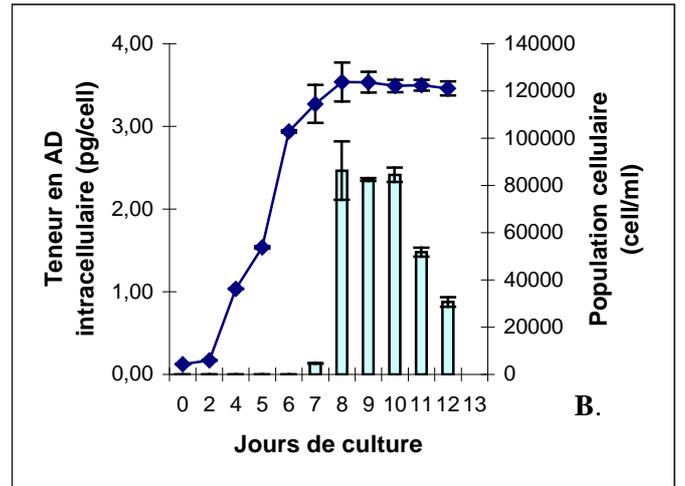
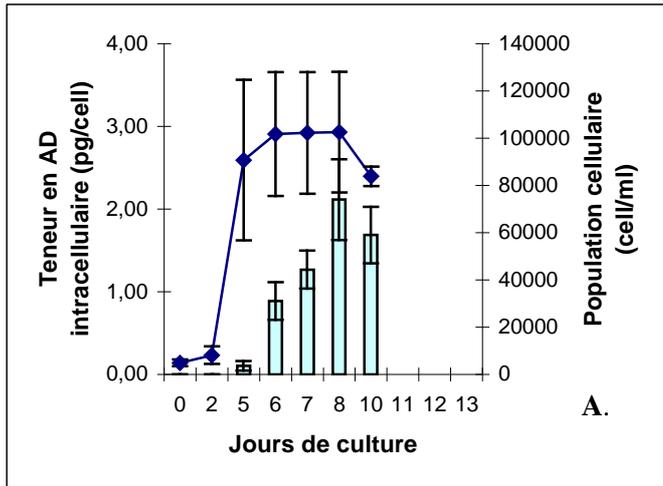


Figure 46: comparaison entre la teneur intracellulaire moyenne en acide domoïque (histogramme) et la population cellulaire (courbe) au cours du suivi des cultures ($n=2$) de *P. multiseriis* CCL 70 selon la condition azotée. A : nitrates. B : urée. C : ammonium. D: arginine. E : glutamine.

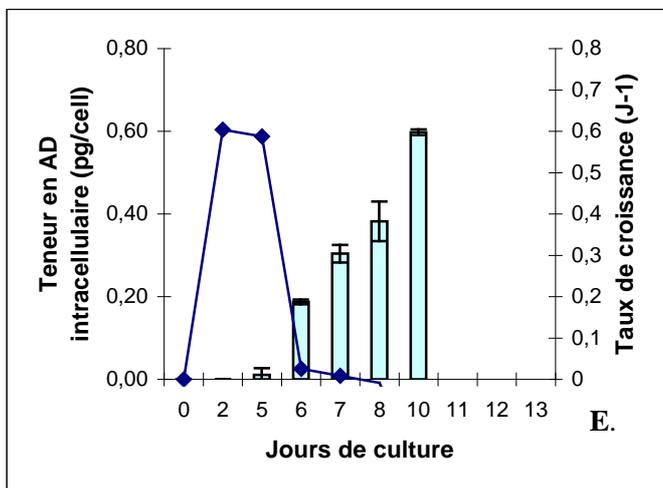
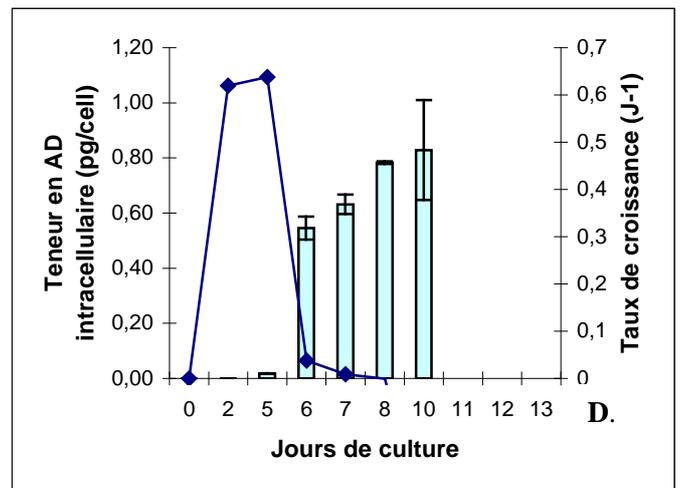
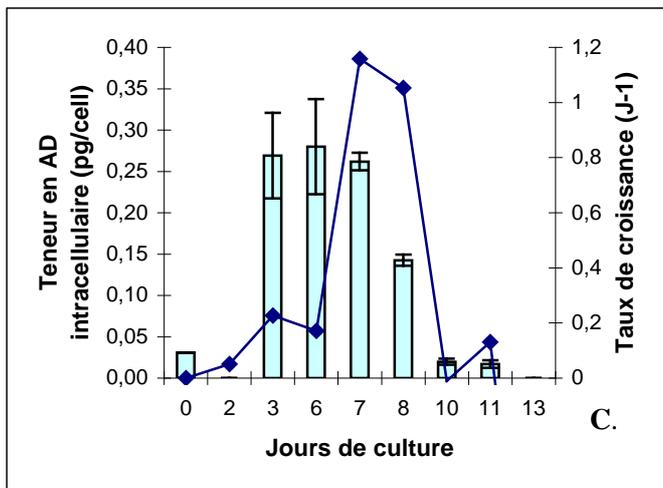
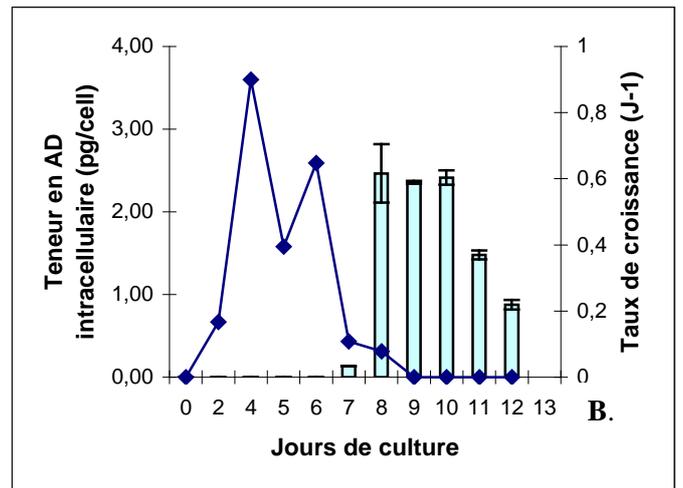
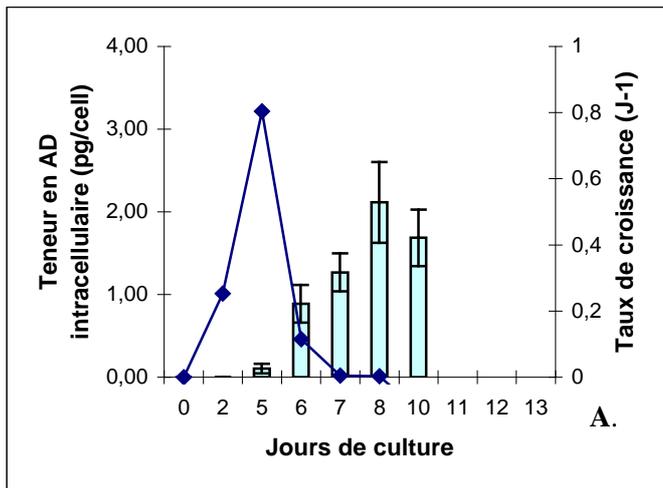


Figure 47: comparaison entre la teneur intracellulaire moyenne en acide domoïque (histogramme) et le taux de croissance moyen (courbe) au cours du suivi des cultures ($n=2$) de *P. multiseriis* CCL 70 selon la condition azotée. A : nitrates. B : urée. C : ammonium. D: arginine. E : glutamine.

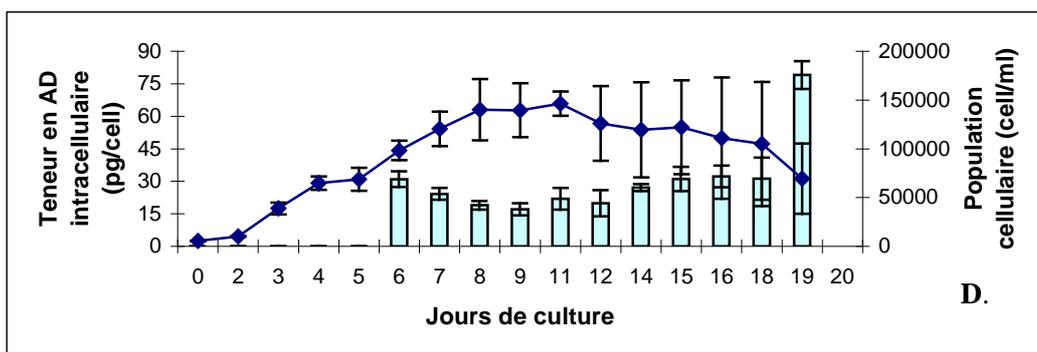
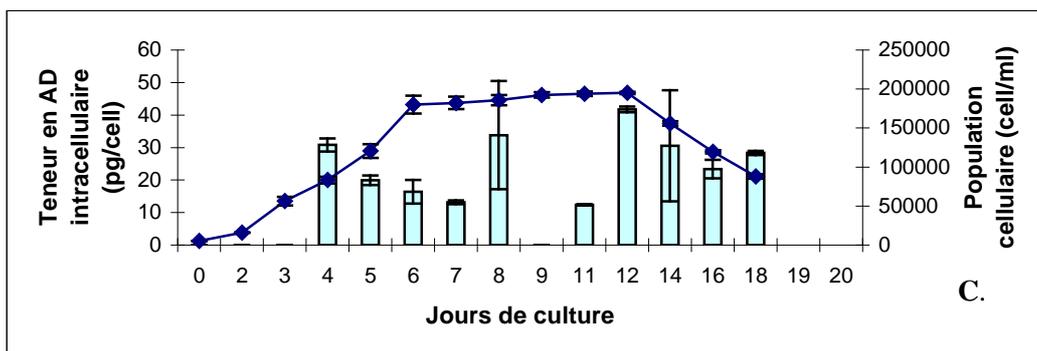
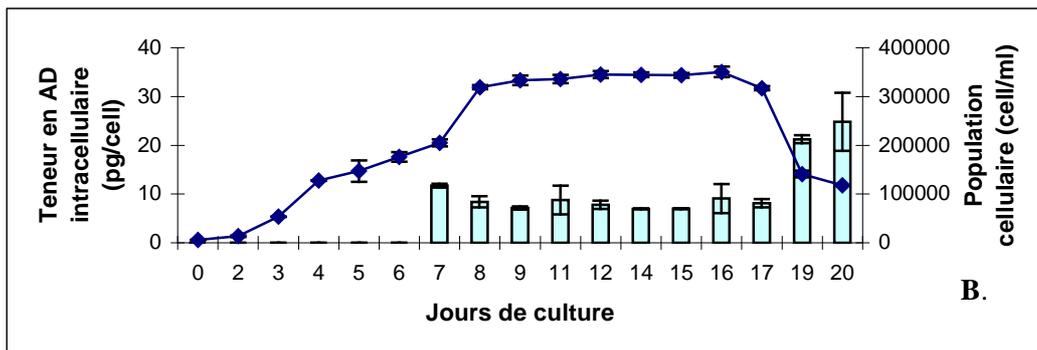
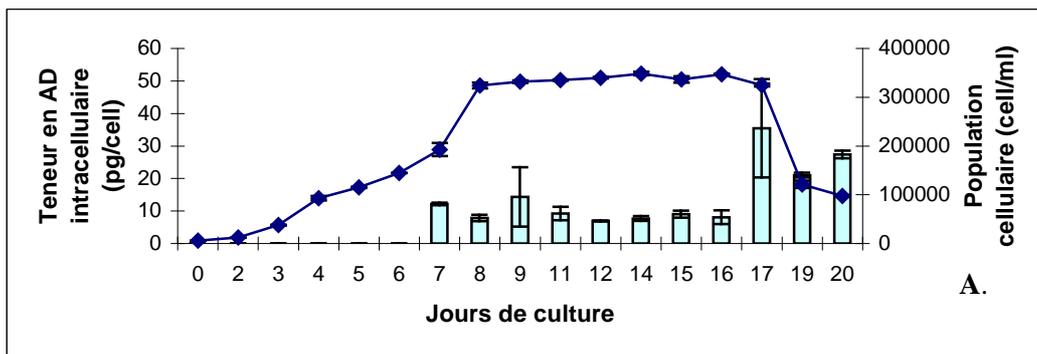


Figure 48 : comparaison entre la teneur intracellulaire moyenne en acide domoïque (histogrammes) et la population cellulaire moyenne (courbes) au cours du suivi des cultures ($n=2$) de *P. australis* PN C1 selon la condition azotée. A : nitrates. B : urée. C : ammonium. D : glutamate.

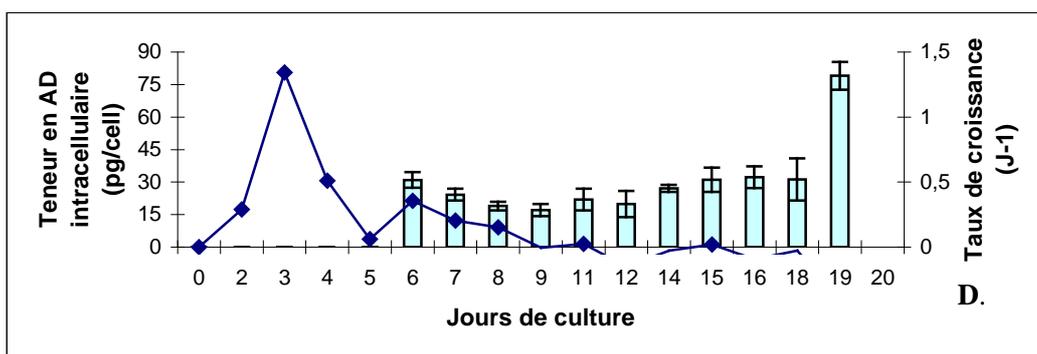
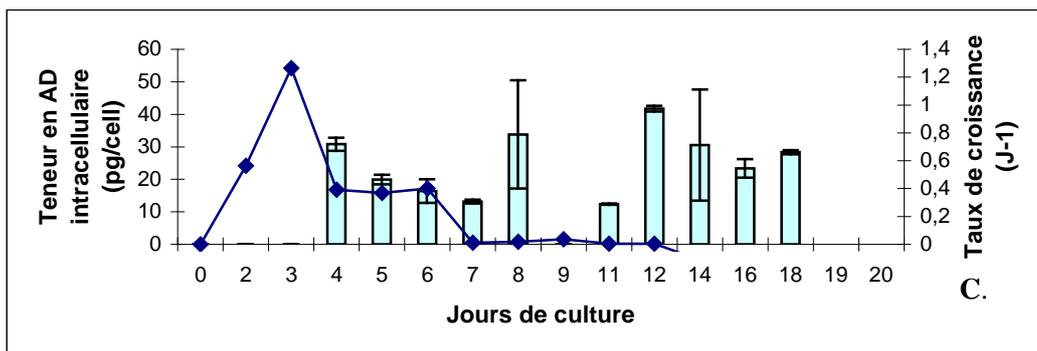
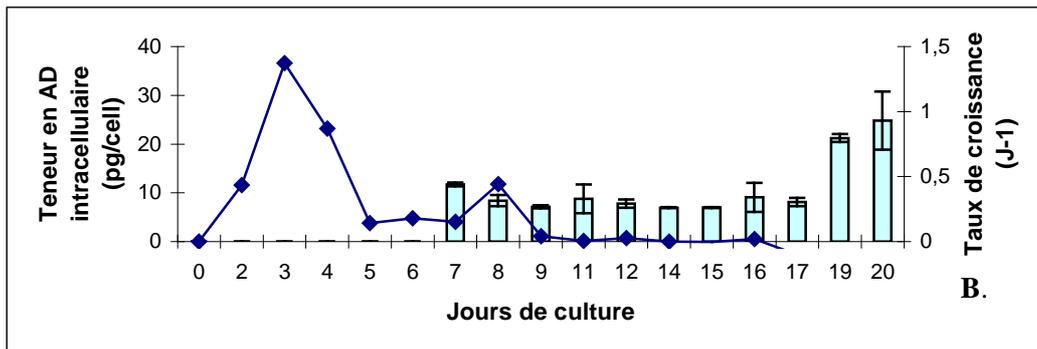
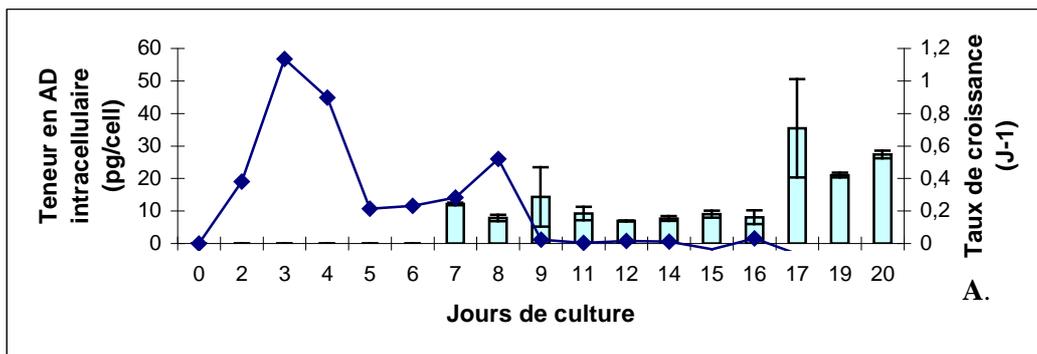


Figure 49 : comparaison entre la teneur intracellulaire moyenne en acide domoïque (histogrammes) et le taux de croissance moyen (courbes) au cours du suivi des cultures ($n=2$) de *P. australis* PN C1 selon la condition azotée.

A : nitrates. B : urée. C : ammonium. D : glutamate.

Les concentrations intracellulaires en acide domoïque de *P. australis* PN C1 furent inférieures d'un rapport de l'ordre de x100 en comparaison des concentrations mesurées dans les cultures de *P. multiseriis* CCL 70. Les cellules de *P. australis* PN C1 présentèrent une toxicité intracellulaire dès la fin de phase exponentielle pour les sources azotées nitrates (7^{ème} jour), d'urée (7^{ème} jour) ou de glutamate (6^{ème} jour), avec une augmentation des teneurs intracellulaires en fin de phase de stationnaire et durant la phase de sénescence (figure 48). Le déclenchement de ces phases de production toxinique correspondit à des chutes du taux de croissance (figure 49). Les cultures en présence d'ammonium donnèrent deux étapes de production toxinique : une première en cours de phase exponentielle, avec un arrêt brutal au cours du 9^{ème} jour de culture confirmé dans les deux cultures en réplique (figure 48), puis une seconde durant la phase stationnaire du 8^{ème} au 13^{ème} jour de culture. La première phase de production fut reliée à la chute brutale des taux de croissance, alors que la seconde phase de production se déroula vers la fin de la phase stationnaire. Les teneurs toxiniques intracellulaires au cours de la phase de sénescence furent encore plus accentuées en présence de glutamate (figure 48).

L'ensemble des résultats obtenus lors des cultures en batch de *P. multiseriis* CCL 70 et *P. australis* PN C1 selon différentes sources azotées a été rapporté dans le tableau final ci-dessous (tableau 15).

Les taux de croissance (indiqués par la lettre grecque μ dans le tableau) fournis dans ce tableau correspondent aux taux de croissance moyen en phase exponentielle calculés selon les équations développées au chapitre 2. La population maximale indiquée est rapportée pour l'ensemble des jours de suivi au cours des cultures, et la biomasse moyenne correspond à la moyenne de la population suivie uniquement lors de la phase stationnaire.

Les données sur l'acide domoïque concernent les teneurs intracellulaires maximales détectées lors des suivis (pDA maximal), la teneur toxinique intracellulaire moyenne lors de la phase stationnaire (pDA moyen en phase stationnaire) et la teneur intracellulaire moyenne lors du suivi global des cultures (pDA moyen).

<i>P. multiseriis</i> CCL 70 intensité lumineuse : 110 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$						
	μ (J-1)	Population maximale (cell/ml)	Biomasse moyenne (cell/ml)	pDA maximal (pg/cell)	pDA moyen en phase stationnaire (pg/cell)	pDA moyen (pg/cell)
[Nitrates] = 441 μM	0,598	96120	95116	2,12	1,38	1,21
[Urée] = 220 μM	0,601	125200	122620	2,53	2,18	1,62
[Ammonium] = 441 μM	1,120	173800	160567	0,30	0,14	0,17
[Arginine] = 110 μM	0,632	141000	139063	0,87	0,49	0,49
[Glutamine] = 220 μM	0,593	116000	114525	0,60	0,22	0,22
[Glutamate] = 441 μM	0,085	18500	13750	0	0	0
Sans azote	0,117	22300	20500	0	0	0
<i>P. multiseriis</i> CCL 70 intensité lumineuse : 50 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$						
	μ (J-1)	Population maximale (cell/ml)	Biomasse moyenne (cell/ml)	pDA maximal (pg/cell)	pDA moyen en phase stationnaire (pg/cell)	pDA moyen (pg/cell)
[Nitrates] = 441 μM	0,56	56000	54500	5,17	2,33	2,33
[Urée] = 220 μM	0,67	60500	58625	3,16	2,85	2,85
<i>P. australis</i> PN C1 intensité lumineuse : 110 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$						
	μ (J-1)	Population maximale (cell/ml)	Biomasse moyenne (cell/ml)	pDA maximal (fg/cell)	pDA moyen en phase stationnaire (fg/cell)	pDA moyen (fg/cell)
[Nitrates] = 441 μM	0,484	348500	336000	37,14	12,33	14,47
[Urée] = 220 μM	0,446	350500	336063	24,84	7,93	10,80
[Ammonium] = 441 μM	0,561	195000	191250	43,94	19,49	22,76
[Arginine] = 110 μM	0,478	379500	360333	0	0	0
[Glutamine] = 220 μM	0,606	174500	156700	0	0	0
[Glutamate] = 441 μM	0,376	150000	136048	79,05	22,57	30,34
[Taurine] = 441 μM	0,331	394500	365000	0	0	0
Sans azote	0,246	58100	56875	0	0	0

Tableau 15 : bilan des croissances et productions toxiques en batch de *P. multiseriis* CCL 70 et *P. australis* PN C1 en présence de différentes sources azotées dans le milieu de culture ($n = 2$ à 5).

2.2.1.3. Concentration toxinique extracellulaire des souches *P. multiseriis* CCL 70 et *P. australis* PN C1 en présence de différentes sources azotées

Lors des cultures de la souche *P. multiseriis* CCL 70, de l'acide domoïque dissout dans les milieux de culture a été détecté uniquement pour les cultures suivies à faible intensité lumineuse ($50 \mu\text{mol photons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Aucune teneur d'acide domoïque extracellulaire n'a été rapportée pour les cultures en batch réalisées à plus forte intensité lumineuse ($110 \mu\text{mol photons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$).

Les toxicités mesurées dans le milieu de culture (figure 50) furent détectées durant la phase de sénescence dès le 12^{ème} jour pour la culture en présence d'urée (maximum de 140 ng/ml) et au 15^{ème} jour pour la culture en présence de nitrates (150 ng/ml). Une très faible toxicité a été observée au 15^{ème} jour dans le milieu extracellulaire en fin de phase stationnaire pour la culture témoin (1,2 ng/ml). Chez les trois cultures suivies à faible intensité lumineuse, ces pics de toxicité extra-cellulaire appaurent après une chute de la teneur toxinique intracellulaire.

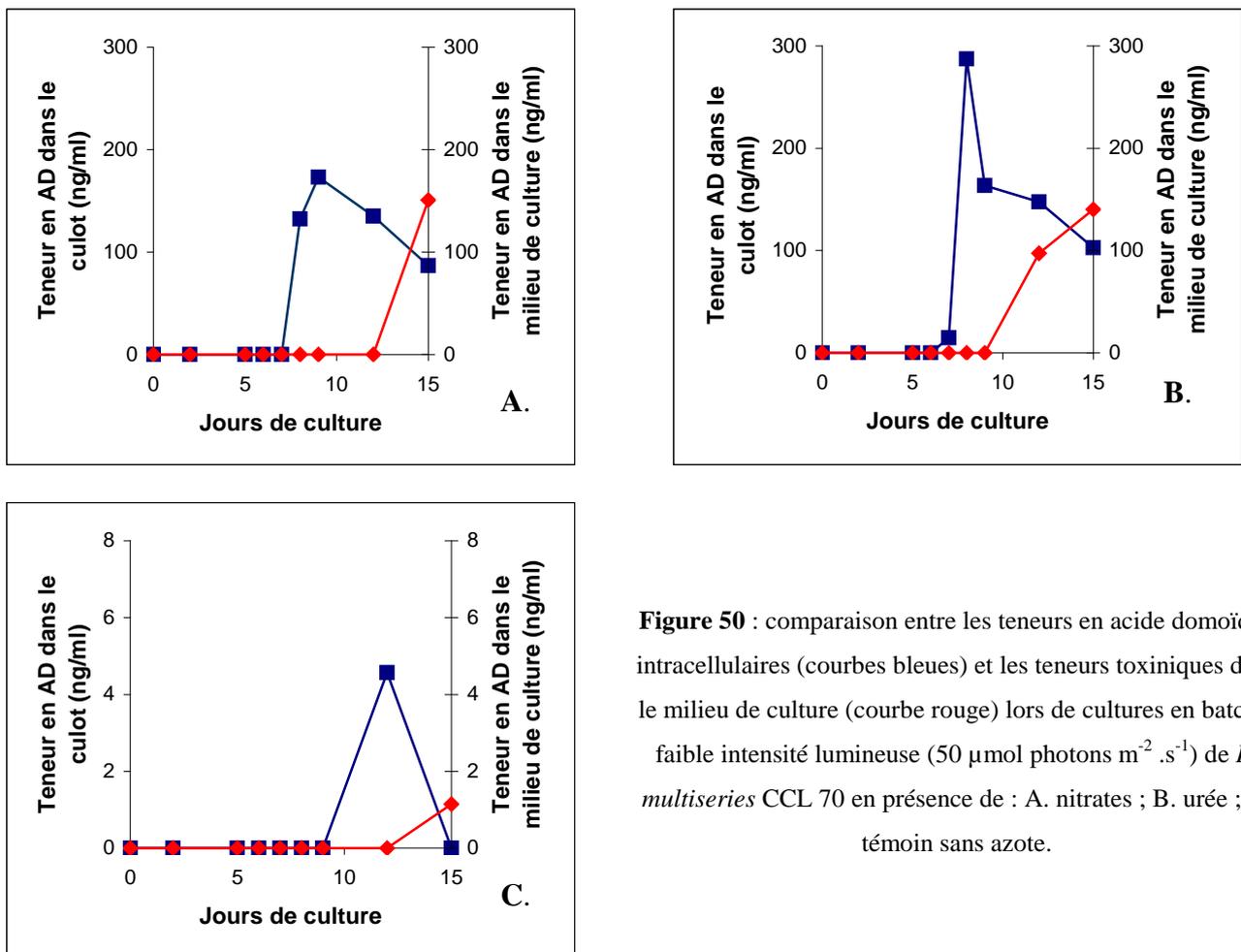


Figure 50 : comparaison entre les teneurs en acide domoïque intracellulaires (courbes bleues) et les teneurs toxiniques dans le milieu de culture (courbe rouge) lors de cultures en batch à faible intensité lumineuse ($50 \mu\text{mol photons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) de *P. multiseriis* CCL 70 en présence de : A. nitrates ; B. urée ; C. témoin sans azote.

Lors des cultures en batch de *P. australis* PN C1, seules les cultures dans lesquelles une concentration toxinique intracellulaire a été détectée présentèrent également des teneurs en acide domoïque dissout dans le milieu de culture (figure 51).

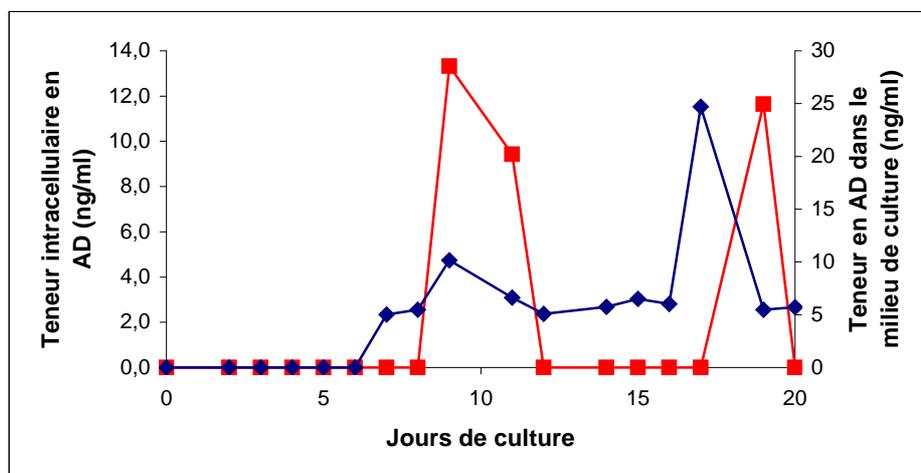


Figure 51 : moyenne des teneurs intracellulaires en acide domoïque particulaire (courbe bleue) et des teneurs en acide domoïque dissout dans le milieu de culture (courbe rouge) pour la souche *P. australis* PN C1 lors de cultures en batch en condition nitrate.

La comparaison des teneurs en acide domoïque particulaire et dissout au cours des cultures en batch en présence de nitrate (figure 51) nous indique que deux phases de relargage de toxines dans le milieu de culture eurent lieu : une première en début de phase stationnaire (10^{ème} jour) (28,54 ng/ml dans le milieu de culture) et une seconde en fin de phase stationnaire (24,9 ng/ml dans le milieu de culture) (18^{ème} jour). Ces deux phases furent également corrélées avec des hausses des teneurs intracellulaires en acide domoïque (figure 48) au 9^{ème} jour (14,3 fg/cellule) et au 17^{ème} jour (35,4 fg/cellule).

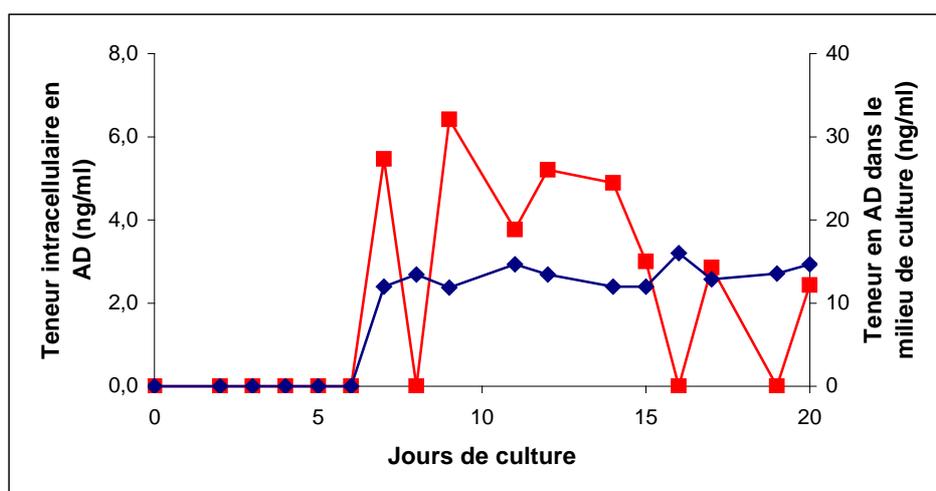


Figure 52 : moyenne des teneurs intracellulaires en acide domoïque particulaire (courbe bleue) et des teneurs en acide domoïque dissout dans le milieu de culture (courbe rouge) pour la souche *P. australis* PN C1 lors de cultures en batch en présence d'urée.

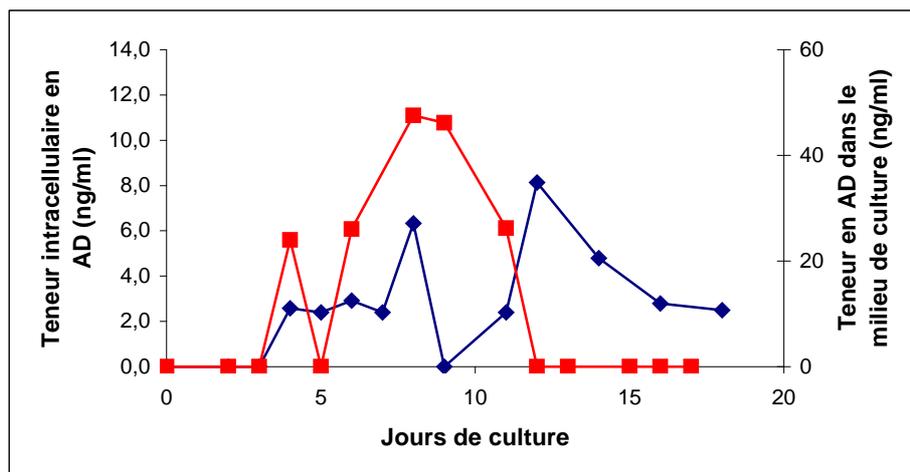


Figure 53 : moyenne des teneurs intracellulaires en acide domoïque particulaire (courbe bleue) et des teneurs en acide domoïque dissout dans le milieu de culture (courbe rouge) pour la souche *P. australis* PN C1 lors de cultures en batch en présence d'ammonium.

Lors des cultures en batch de *P. australis* PN C1 en présence d'urée, la teneur en acide domoïque particulaire a peu varié (entre 2,37 et 3,2 ng/ml) du début jusqu'à la fin de la phase stationnaire, du 7^{ème} jour au 20^{ème} jour de culture (figure 52). L'évolution observée en teneurs d'acide domoïque par cellule (figure 48) est différente : la toxicité intracellulaire augmenta à la phase de sénescence, ce qui n'est pas observé ici (figure 52). De l'acide domoïque dissout dans le milieu de culture a été détecté dès le début de la phase stationnaire, mais les teneurs rapportées varient sensiblement (de 0 à 32 ng/ml) au cours de la phase stationnaire (figure 52).

Les données collectées lors des cultures en batch de *P. australis* PN C1 en présence d'ammonium (figure 53) indiquèrent une présence d'acide domoïque intracellulaire et dans le milieu de culture dès la phase exponentielle du 4^{ème} au 9^{ème} jour, suivie d'une chute brutale des teneurs intracellulaires en acide domoïque avant une seconde phase de production (maximum au 12^{ème} jour) au cours de la phase stationnaire. Cette dynamique fut superposée avec un pic de toxines extracellulaires détecté dans le milieu de culture entre le 5^{ème} et le 12^{ème} jour (jusqu'à 49 ng/ml). Cette évolution correspond également aux dynamiques rapportées précédemment (figure 48).

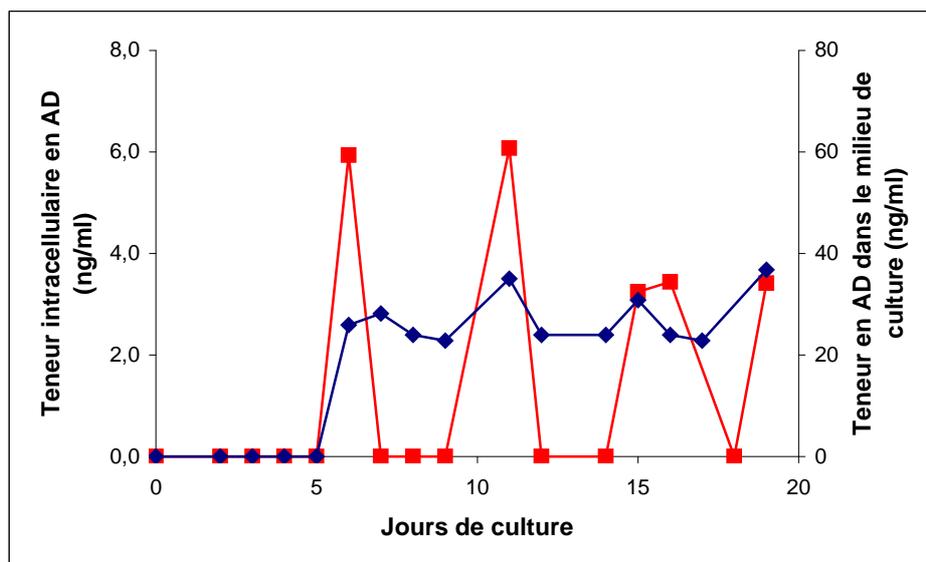


Figure 54 : moyenne des teneurs intracellulaires en acide domoïque particulaire (courbe bleue) et des teneurs en acide domoïque dissout dans le milieu de culture (courbe rouge) pour la souche *P. australis* PN C1 lors de cultures en batch en condition glutamate.

La culture en batch de *P. australis* PN C1 en présence de glutamate permet d'obtenir une teneur intracellulaire en acide domoïque dès le début de la phase exponentielle (figure 48). Les teneurs en acide domoïque dans le milieu de culture (figure 54) furent très irrégulières (0 à 61 ng/ml), avec de nombreux jours de suivi rapportés sans acide domoïque dissout, mais les phases d'apparition dans le milieu présentèrent une tendance superposable à celle des teneurs intracellulaires. La hausse brutale en phase de sénescence (figure 48) n'apparut pas dans les teneurs rapportées en acide domoïque intracellulaire.

2.2.2. Comparaison des sources azotées nitrates et urée lors de cultures continues en photobioréacteur chez *P. multiseriis* CCL 70 et chez *P. pungens* PN D10

Les cultures de *P. multiseriis* CCL 70 réalisées en système ouvert en photobioréacteur ont été maintenues en équilibre pendant seize jours après activation des pompes (0,2 ml/min), pour la culture continue en présence de nitrates (figure 55) comme pour la culture continue en présence d'urée (figure 56), avant l'arrêt du suivi expérimental.

Des teneurs intracellulaires en acide domoïque ont été détectées dès le 3^{ème} jour de culture et ont augmenté au cours de l'établissement de l'état d'équilibre de la population cellulaire, pour atteindre des maximums le 17^{ème} jour à 3,38 pg/cellule en présence de nitrates (figure 55) et également le 17^{ème} jour à 8,08 pg/cellule en présence d'urée (figure 56).

Au cours du suivi de ces cultures continues en présence de nitrates comme d'urée, aucune teneur extracellulaire d'acide domoïque ne fut détectée dans le milieu de culture.

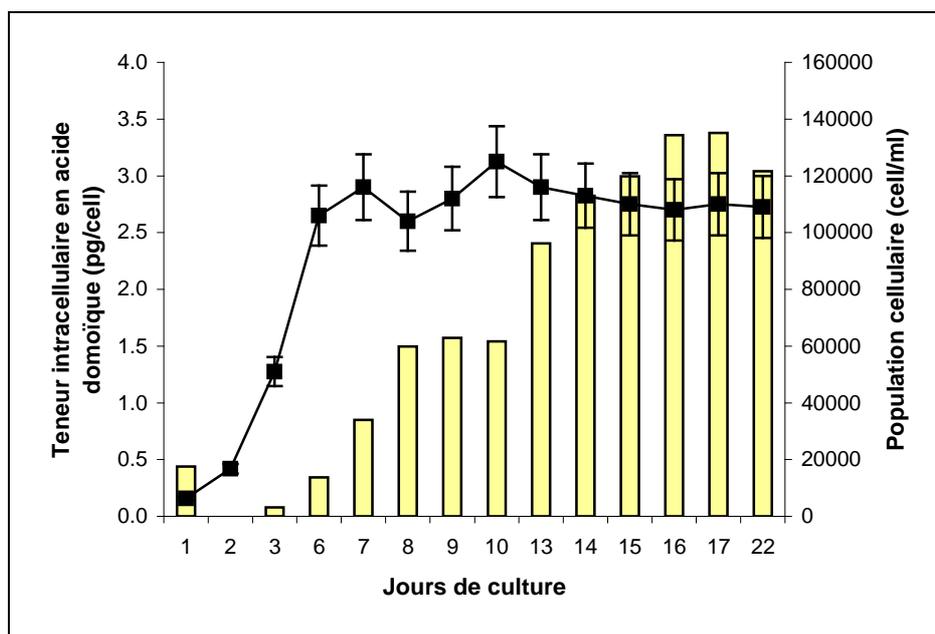


Figure 55 : teneurs intracellulaires en acide domoïque comparées à la population cellulaire au cours de la culture en photobioréacteur de *P. multiseriis* CCL 70 en condition nitrates. La culture bascule en mode continu au 3^{ème} jour avec un débit de 0,2 ml/min.

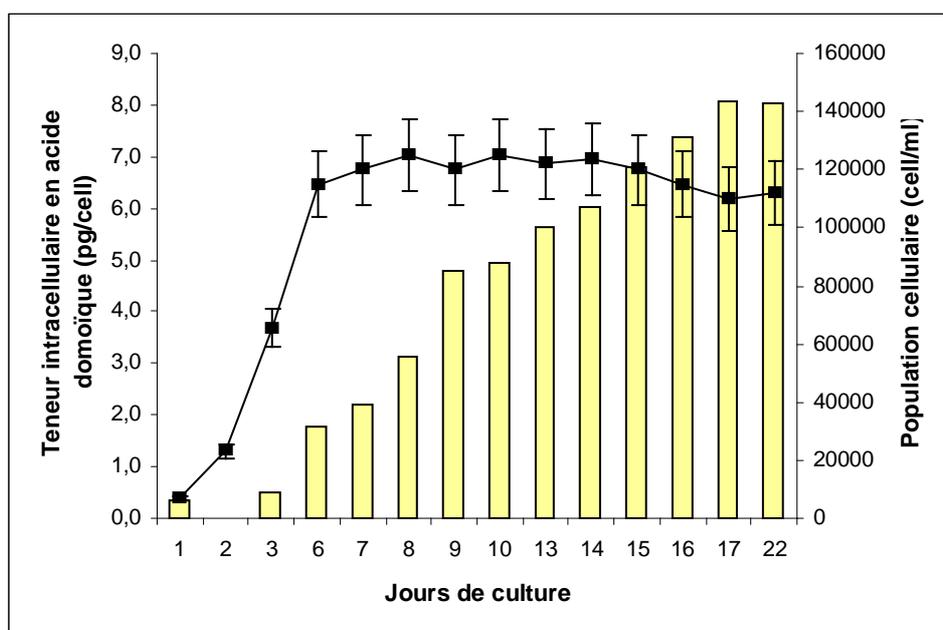


Figure 56 : teneurs intracellulaires en acide domoïque comparées à la population cellulaire au cours de la culture en photobioréacteur de *P. multiseriis* CCL 70 en condition urée. La culture bascule en mode continu au 3^{ème} jour avec un débit de 0,2 ml/min.

Les suivis de croissance lors de cette expérience indiquèrent que les populations cellulaires atteignent à leur état d'équilibre des biomasses moyennes comparables (tableau 16) en présence de nitrates (figure 55) ou d'urée (figure 56). Les concentrations intracellulaires en acide domoïque augmentèrent progressivement pour atteindre leurs maxima à partir du 17^{ème} jour de culture en présence de nitrates (figure 55) (3,38 pg/cellule) et en présence d'urée (figure 56) (8,08 pg/cellule), soit le double d'une source azotée à l'autre.

	Biomasse cellulaire moyenne à l'équilibre (cell/ml)	Teneur intracellulaire moyenne en AD à l'équilibre (pg/cell)	Teneur intracellulaire maximale en AD à l'équilibre (pg/cell)
Nitrates (441 µM)	111727	2,16	3,38
Urée (220 µM)	118864	5,35	8,08

Tableau 16 : comparaison entre les biomasses cellulaires moyennes et les teneurs intracellulaires en acide domoïque mesurées lors de l'état d'équilibre des cultures continues de *P. multiseriis* CCL 70 en conditions nitrates ou urée.

Au cours de la culture continue de la souche *P. pungens* PN D10 en photobioréacteur, nous avons procédé à la substitution de la source azotée initiale par une autre :

Après activation des pompes au 3^{ème} jour (0,2 ml/min), la culture atteignit un premier état d'équilibre avec des nitrates pour source azotée dans le milieu. Cette source azotée fut alors

substituée par de l'urée dans le milieu de culture dès le 14^{ème} jour de culture sans modifier le débit des pompes (figure 57).

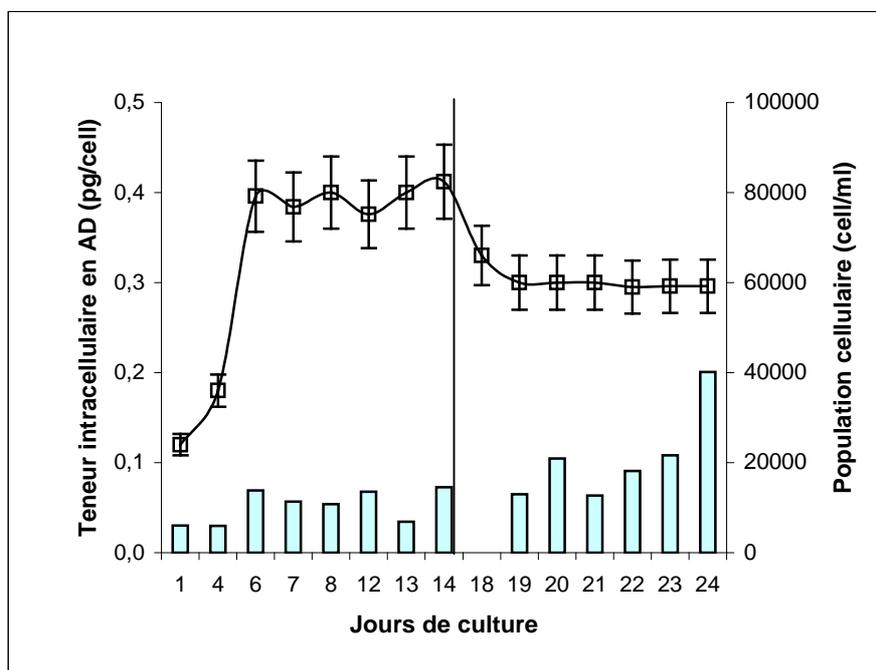


Figure 57 : suivi de la population cellulaire et de la teneur intracellulaire en acide domoïque au cours de l'expérience en photobioréacteur chez *P. pungens* PN D10 avec une substitution au 14^{ème} jour des nitrates du milieu par de l'urée.

La population cellulaire (figure 57) à l'équilibre fut plus importante en présence de nitrates (entre 70000 et 80000 cellules/ml) qu'en présence d'urée (60000 cellules/ml), très certainement en raison d'un léger lessivage de la culture au cours de la substitution des sources azotées. Les teneurs intracellulaires en acide domoïque mesurées dans les cellules de *P. pungens* PN D10 furent inférieures à 0,1 pg/cellule en présence de nitrates et augmentèrent jusqu'à doubler (0,2 pg/cellule) en présence d'urée (figure 57).

Au cours du suivi de *P. pungens* PN D10 en culture continue, aucune teneur extracellulaire en acide domoïque ne fut détectée dans le milieu de culture.

2.2.3. Inhibition de l'incorporation de l'urée et effets de l'hydroxyurée sur la croissance et la production toxinique de *P. multiseriis* CCL 70

Les résultats obtenus lors des cultures en batch de *P. multiseriis* CCL 70 montrèrent une action négative de l'hydroxyurée sur les croissances pour les cultures enrichies en urée (figure 58) comme pour les cultures enrichies en nitrates (figure 59) :

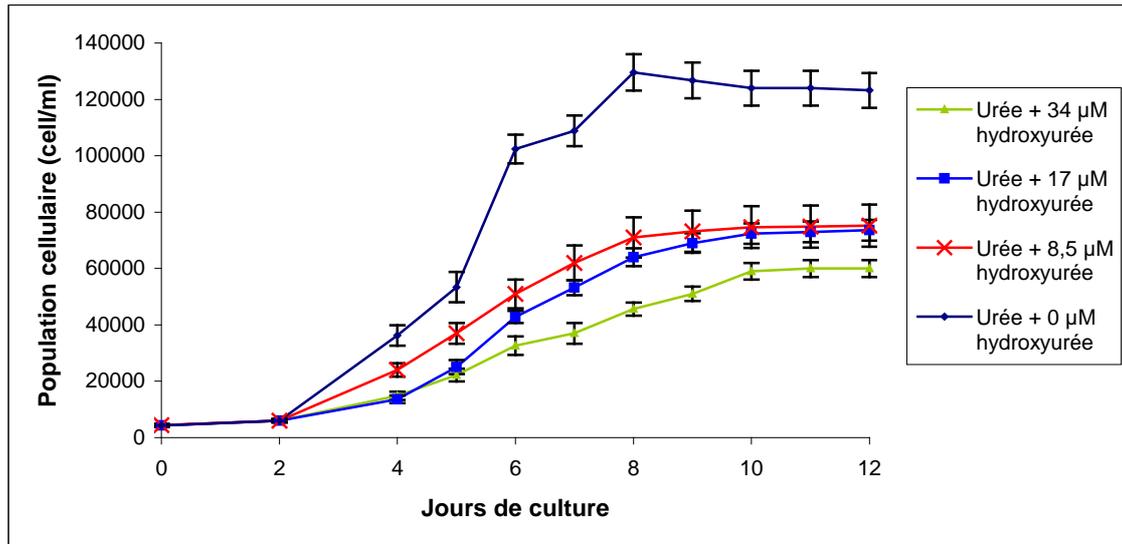


Figure 58 : cinétiques de croissance en batch de *P. multiseriis* CCL70 en présence d'urée (220 µM) et de concentrations variables en hydroxyurée (0 à 34 µM).

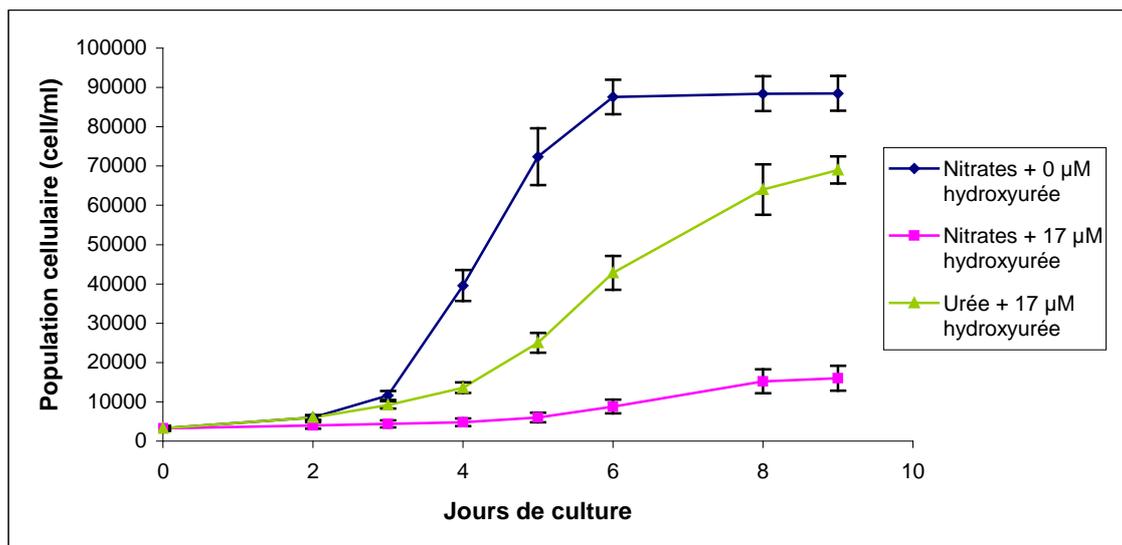


Figure 59 : comparaison des populations cellulaires en présence d'urée (courbe verte) ou de nitrates en présence d'hydroxyurée (courbe rose) ou en absence d'hydroxyurée (courbe bleue).

Les cultures réalisées en présence d'urée présentèrent des taux de croissance moyen en phase exponentielle et des biomasses moyennes en phase stationnaire (tableau 17) corrélées négativement par rapport aux concentrations initiales en hydroxyurée (figure 60 et 61). La même tendance a été notée lors de cultures en présence de nitrates (figure 59).

Condition	Hydroxyurée (µM)	Taux de croissance moyen (J ⁻¹)	Biomasse maximale (cell/ml)
Nitrates (441 µM)	0	0,71	88500
	17	0,18	13800
Urée (220 µM)	0	0,70	129000
	8,5	0,54	75200
	17	0,49	73600
	34	0,42	60000

Tableau 17 : caractéristiques moyennes de la biomasse et de la croissance en fonction de la source azotée et de l'apport en hydroxyurée dans le milieu de culture.

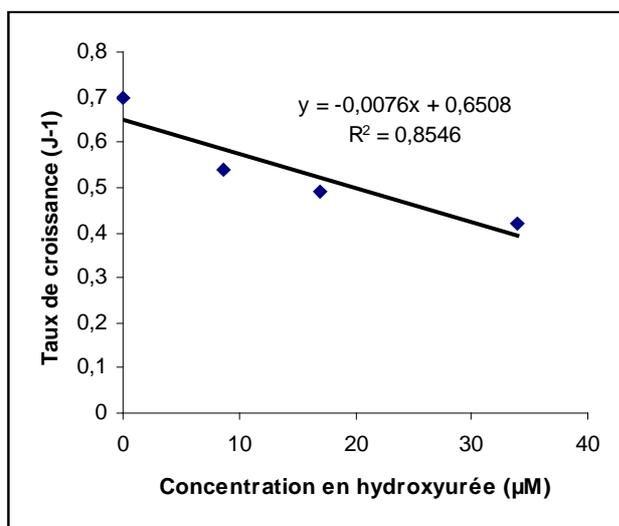


Figure 60 : relation entre le taux de croissance en phase exponentielle et la concentration initiale en hydroxyurée lors de cultures en batch de *P. multiseriis* CCL 70 en condition urée ($P < 0,1$).

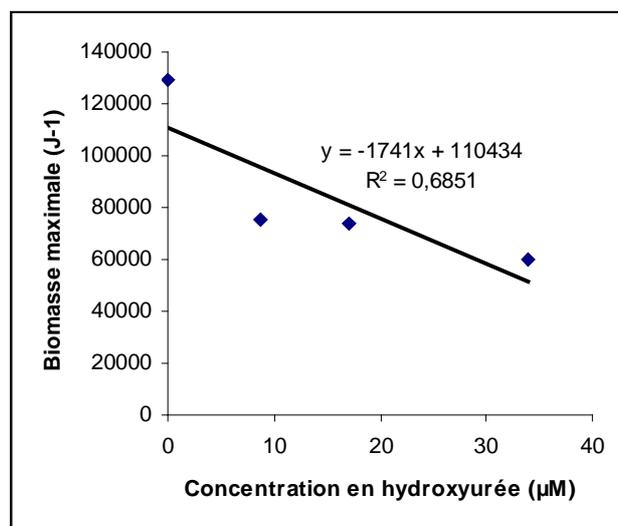


Figure 61 : relation entre la biomasse maximale en phase stationnaire et la concentration initiale en hydroxyurée lors de cultures en batch de *P. multiseriis* CCL 70 en condition urée ($P = 0,175$).

2.3. Discussion

Dans la littérature scientifique, les nitrates apparaissent comme la principale source azotée utilisée lors de l'étude des diatomées toxiques. Les données terrain disponibles concernent principalement les teneurs en nitrates : il a été ainsi rapporté qu'un déchargement en nitrates dans les eaux de rivière lors d'un bloom en baie de Cardigan (Prince Edward Island) en 1988 a augmenté de manière significative la teneur intracellulaire en acide domoïque chez un bloom de *Pseudo-nitzschia spp.* (Smith *et al.*, 1990; Bates *et al.*, 1998). Cependant, les auteurs émirent l'hypothèse que les enrichissements en azote total au détriment des teneurs en silicium dans le milieu favoriseraient la production toxinique. La principale source azotée employée lors de cultures en batch de *Pseudo-nitzschia spp.* reste également les nitrates. Leur substitution par l'ammonium (Bates *et al.*, 1993), l'urée (Howard *et al.*, 2007 ; Thessen *et al.*, 2009) ou la glutamine (Hillebrand & Sommers, 1996 ; Cochlan *et al.*, 2008) ne représentent que quelques exceptions rapportées dans la bibliographie.

Notre travail d'investigation de la croissance et de la teneur toxinique de cultures de *Pseudo-nitzschia spp.* en présence de sources azotées arginine, taurine et glutamate, ainsi que leur comparaison aux sources azotées nitrates, ammonium, urée et glutamine, représente donc une somme de résultats novateurs. De même, les cultures continues de *Pseudo-nitzschia spp.* rapportées à notre connaissance dans la littérature n'ont été suivies qu'en présence de nitrates dans le milieu de culture (Bates, 1998). Nous rapportons donc aussi des données inédites en réalisant des cultures continues de *P. multiseriis* CCL 70 en présence d'urée et en décrivant la première culture continue d'une souche toxique de *P. pungens*.

2.3.1. Croissance de *Pseudo-nitzschia sp.* en fonction des sources azotées disponibles dans le milieu de culture

Nos résultats obtenus lors de cultures en batch effectuées sur des souches de *P. multiseriis* CCL 70 et de *P. australis* PN C1, ont démontré que ces diatomées peuvent croître toutes deux en présence de nitrates, d'urée, d'ammonium, de glutamine et d'arginine.

Durant nos expériences de cultures en batch de *P. multiseriis* CCL 70, la plus forte croissance en phase exponentielle ($1,12 J^{-1}$) et la plus forte biomasse durant la phase stationnaire (173800 cellules/ml) ont été obtenues en présence d'ammonium en comparaison de toutes les autres sources azotées testées. Lors des travaux de Thessen *et al.* (2009), les cultures en batch de *P. multiseriis* présentèrent un meilleur taux de croissance avec des nitrates ($0,76 J^{-1}$) ou de l'urée ($0,68 J^{-1}$) selon la souche étudiée. Bates *et al.* (1993), quant à eux, rapportèrent lors de cultures en batch de *P. multiseriis* des biomasses cellulaires moyennes durant la phase stationnaire

toujours plus importantes en présence de nitrates qu'en présence d'ammonium (à concentration équimolaire entre les deux nutriments azotés en début de culture). Nos résultats, obtenus à partir du suivi d'une souche de *P. multiseriis* différente de celles étudiées dans ces précédents travaux, mettent donc en évidence à l'inverse un comportement préférentiel de *P. multiseriis* CCL 70 en présence d'ammonium.

Nous avons également obtenu un taux de croissance maximal chez *P. australis* PN C1 pour les sources azotées ammonium ($0,56 \text{ J}^{-1}$) par rapport aux sources azotées nitrates ($0,48 \text{ J}^{-1}$) et urée ($0,44 \text{ J}^{-1}$). A l'inverse, les biomasses moyennes en phase stationnaire furent plus importantes en présence d'urée (350500 cellules/ml) et de nitrates (348500 cellules/ml) qu'en présence d'ammonium (195000 cellules/ml). Les croissances rapportées par Howard *et al.* (2007) lors de cultures en batch de *P. australis* furent plus importantes en présence d'ammonium ($0,93 \text{ J}^{-1}$) et de nitrates ($0,89 \text{ J}^{-1}$) qu'en présence d'urée ($0,52 \text{ J}^{-1}$). Ces résultats viennent confirmer les observations d'Howard *et al.* (2007) sur *P. australis*. Contrairement aux résultats sur *P. australis* et *P. multiseriis* rapportés par la bibliographie consultée, notre souche *P. multiseriis* CCL 70 présente donc une croissance plus importante en présence d'ammonium que notre souche *P. australis* PN C1.

P. multiseriis CCL 70 cultivée en cultures continue présenta à l'état d'équilibre des biomasses cellulaires similaires en présence de nitrates comme d'urée. A l'inverse, *P. pungens* PN D10 cultivée en culture continue eut une biomasse cellulaire à l'état d'équilibre plus importante en présence de nitrates qu'en présence d'urée. Ce résultat chez *P. pungens* D10 peut cependant s'expliquer par un effet de lessivage lors de la substitution des nitrates par de l'urée dans le milieu frais, le taux de croissance à l'état d'équilibre ne variant pas car fixé par le débit en milieu nutritif frais (voir chapitre 2).

Nos résultats confirment les croissances en présence de glutamine rapportées pour *P. multiseriis* (Hillebrand & Sommers, 1996) et *P. australis* (Cochlan *et al.*, 2008), et montrent que l'arginine peut être utilisée comme source d'azote chez *P. multiseriis* et *P. australis*. La souche *P. australis* PN C1 présenta en phase exponentielle un taux de croissance maximum en présence de glutamine ($0,6 \text{ J}^{-1}$), tandis que les taux de croissance en présence d'arginine ($0,48 \text{ J}^{-1}$) ou de glutamate ($0,37 \text{ J}^{-1}$) furent plus faibles. Les biomasses moyennes en phase stationnaire furent plus importantes en présence de taurine (394500 cellules/ml) et d'arginine (379500 cellules/ml) par rapport à toute autre culture en source azotée suivie. *P. australis* PN C1 a également pu croître en présence de taurine ($0,33 \text{ J}^{-1}$) (source non-testée sur *P. multiseriis* CCL 70). La taurine n'a jamais été testée lors de cultures de *Pseudo-nitzschia* comme source organique azotée, mais sa concentration intracellulaire a cependant été étudiée et Jackson *et al.* (1992), qui ont suggéré que la taurine pourrait servir de régulateur osmotique chez *P.*

multiseries. Nos résultats ont par ailleurs montré que *P. australis* PN C1 a pu croître en présence de glutamate mais avec un faible taux de croissance en phase exponentielle ($0,37 \text{ J}^{-1}$), alors que la croissance de *P. multiseries* avec du glutamate comme source azotée n'a pas abouti. Cette absence de croissance chez *P. multiseries* CCL 70 en présence de glutamate est étonnante. L'incorporation du glutamate par différentes diatomées pennées marines a été rapportée (Antia *et al.*, 1991). Chez les diatomées marines pennées, *Phaeodactylum tricornutum*, *Nitzschia frustulum* et *N. ovalis* ont ainsi été notées comme capables de croître en présence de glutamate (Wheeler *et al.*, 1974). Il existe cependant de nombreuses exceptions rapportées dans la littérature. Des souches isolées appartenant aux espèces *Chaetoceros affinis*, *Cyclotella nana*, *Melosira sp.*, *Navicula salinarum*, *Skeletonema costatum* ou encore *Thalassiosira fluviatilis* ont été rapportées comme incapables de croître en présence de glutamate (Wheeler *et al.*, 1974). Guillard (1963) rapporta que les diatomées marines centrées assimilaient mieux la glutamine que le glutamate : la diatomée *Cyclotella cryptica*, qui est incapable d'utiliser la glutamine, peut croître en présence de glutamate (Neilson & Larsson, 1980). Il n'existe pas d'explication physiologique à ces différences de comportement nutritif chez les diatomées. Cependant, chez l'algue verte *Chlorella pyrenoidosa*, cette différence nutritive existe également et serait due à une imperméabilité de la membrane plasmique pour le glutamate (Lynch & Gillmor, 1966). A notre connaissance, cette hypothèse n'a pas été étudiée dans le cas de diatomées.

Les relations entre taux de croissance et biomasse moyenne pour toute source azotée confondue diffèrent chez les deux souches étudiées. Pour *P. multiseries* CCL 70, il apparaît une corrélation positive ($P < 0,01$) entre taux de croissance moyen en phase exponentielle et biomasse moyenne en phase stationnaire (figure 38). Chez *P. australis* PN C1, il ne semble pas exister de tendance statistique entre taux de croissance moyen en phase exponentielle et biomasse moyenne en phase stationnaire (figure 41). Thessen *et al.* (2009) notèrent quant à eux que pour *P. multiseries*, un seul isolat sur deux testés présenta une corrélation statistiquement positive entre son taux de croissance en phase exponentielle et sa production toxinique en phase stationnaire.

Les diverses croissances, en batch comme en culture continue, des différentes souches de *Pseudo-nitzschia* étudiées en réponse à la présence de sources azotées nutritives dans le milieu de culture, montrent une forte variation intra- et inter-spécifique chez *Pseudo-nitzschia sp.* Cette hypothèse a déjà été avancée à partir de résultats expérimentaux pour expliquer des différences d'assimilation entre différentes souches de micro-algues (diatomées ou autres)

provenant du même genre ou de la même famille (Antia *et al.*, 1975). Pour les *Pseudo-nitzschia*, ces variations intra- et inter-spécifiques ont été également mises en évidence expérimentalement chez 19 souches lors de l'investigation de la croissance et de la toxicité de trois espèces différentes (*P. fraudulenta*, *P. multiseriis* et *P. callientha*) en présence de nitrates, d'urée et d'ammonium (Thessen *et al.*, 2009).

Lors de nos expériences, l'hydroxyurée a perturbé la croissance de *P. multiseriis* CCL 70 cultivée en présence de nitrates et d'urée. L'inhibition de la croissance par l'hydroxyurée a été cependant beaucoup plus importante lorsque la souche a été cultivée en présence de nitrates, avec un taux de croissance moyen en phase exponentielle de $0,18 \text{ J}^{-1}$, alors que cultivée en présence d'urée et d'hydroxyurée à concentration initiale comparable, le taux de croissance moyen en phase exponentielle fut de $0,49 \text{ J}^{-1}$. L'urée inhibe l'activité de la nitrate réductase chez la diatomée *Cyclotella cryptica* (Liu & Hellebust, 1974b), et en présence d'urée, le taux d'incorporation des nitrates diminue de manière hyperbolique chez *Skeletonema costatum* (Lund, 1987). Nous pouvons donc supposer que l'hydroxyurée a remplacé l'urée et agit comme inhibiteur de la voie d'assimilation des nitrates chez *P. multiseriis* CCL 70. Ces résultats devraient cependant être complétés par le suivi de cultures en co-présence d'ammonium, d'urée, d'acides aminés et d'hydroxyurée. En effet, Les diatomées *Thalassiosira pseudonana*, *Skeletonema costatum* (Horrigan & McCarthy, 1982) et *Phaeodactylum sp* (Rees & Syrett, 1979) perdent leur capacité à incorporer de l'urée en présence d'ammoniaque. Si *P. multiseriis* CCL 70 réagit de la même manière, son taux de croissance ne devrait pas chuter en co-présence d'ammonium et d'hydroxyurée. De même, il serait intéressant d'observer si une co-présence d'acides aminés et d'hydroxyurée peut perturber la croissance.

Lors de nos cultures en batch de *P. multiseriis* CCL 70 en sources azotées nitrates ou d'urée, les taux de croissance en phase exponentielle furent supérieurs en présence d'urée par rapport aux cultures en présence de nitrates pour les deux intensités lumineuses. Le taux de croissance en présence d'urée fut plus important à $50 \mu\text{mol photons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ($0,67 \text{ J}^{-1}$) qu'à $110 \mu\text{mol photons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ($0,6 \text{ J}^{-1}$). A l'inverse, le taux de croissance en présence de nitrates fut plus faiblement à $50 \mu\text{mol photons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ($0,56 \text{ J}^{-1}$) qu'à $110 \mu\text{mol photons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ($0,60 \text{ J}^{-1}$). Les biomasses moyennes en phase stationnaire augmentèrent avec la hausse de l'intensité lumineuse d'un facteur x1,7 en présence de nitrates et d'un facteur x2,1 en présence d'urée. La biomasse moyenne en phase stationnaire fut plus importante pour *P. multiseriis* CCL 70 à $110 \mu\text{mol photons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (voir tableau 15). Le rôle de la lumière a été peu exploré chez *Pseudo-nitzschia*. Lors de cultures de *P. multiseriis* en batch (Bates *et al.*, 1991) et en semi-continu (Bates &

Léger, 1992), les diatomées mises en présence de nitrates montrèrent des taux de division plus faibles à 35-45 $\mu\text{mol photons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ et plus forts à 90-200 $\mu\text{mol photons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Lewis *et al.* (1993) ne rapportèrent aucune différence à 80 et 180 $\mu\text{mol photons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ dans les taux de division de cultures en batch de *P. multiseriis* en présence de nitrates. Lors de nos expériences, nous avons également observé une relation positive entre le taux de croissance en phase exponentielle et intensité lumineuse en présence de nitrates. La relation est en revanche négative en présence d'urée comme source azotée. La forte croissance de *P. multiseriis* CCL 70 lors de la culture en présence d'urée à 50 $\mu\text{mol photons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ pourrait s'expliquer par une préférence pour les sources azotées organiques à faible intensité lumineuse. Thessen *et al.* (2009) ont rapporté un taux de croissance maximal (0,68 J^{-1}) en phase exponentielle à 15°C, avec une saturation lumineuse des cellules de diatomées à partir de 28 $\mu\text{mol photons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Nos expériences n'investiguent pas assez de valeurs d'intensités lumineuses différentes pour proposer à notre tour des valeurs de saturation lumineuse pour *P. multiseriis* CCL 70.

2.3.2. Teneurs intracellulaires en acide domoïque chez *Pseudo-nitzschia sp.* selon les sources azotées en présence

La production d'acide domoïque en présence de différentes sources azotées a également été suivie dans nos cultures. Dans la littérature scientifique, les comparaisons rapportées entre sources azotées et teneurs intracellulaires en acide domoïque ne concernent que des cultures en batch. Nous avons pour notre part apporté de nouvelles données en comparant les teneurs intracellulaires en acide domoïque au cours de cultures en continu en présence de nitrates ou d'urée.

Nos deux souches suivies lors de cultures en batch produisirent de l'acide domoïque en présence d'ammonium, d'urée et de nitrates. La souche *P. multiseriis* CCL 70 présenta des teneurs intracellulaires moyennes en phase stationnaire plus importantes en présence d'urée (2,18 pg/cellule) qu'en présence de nitrates (1,38 pg/cellule) ou d'ammonium (0,14 pg/cellule). Bates *et al.* (1993) rapportèrent ainsi des productions d'acide domoïque chez *P. multiseriis* deux à quatre fois plus importantes lors de cultures en présence d'ammonium par rapport aux cultures en présence de nitrates. Thessen *et al.* (2009) notèrent que le maximum de teneur intracellulaire en acide domoïque pour *P. multiseriis* fut détecté soit en présence d'urée (1,8 pg/cellule), soit en présence d'ammonium (0,48 pg/cell), selon la souche étudiée. Nos résultats obtenus avec la souche *P. multiseriis* CCL 70 sont donc en désaccord avec ces études, puisque nos milieux de culture en présence d'ammonium favorisèrent les plus faibles teneurs intracellulaires d'acide domoïque par rapport aux cultures en présence de nitrates ou d'urée.

La souche *P. multiseriis* CCL 70 présenta également des teneurs intracellulaires toxiques durant la phase stationnaire en présence de glutamine (valeur moyenne 0,22 pg/cellule) ou d'arginine (valeur moyenne 0,49 pg/cellule). Il s'agit à notre connaissance de la première étude rapportant une production d'acide domoïque avec ces deux acides aminés comme source azotée organique dans le milieu de culture.

Aucune teneur toxique intracellulaire ne fut rapportée lors de notre suivi expérimental dans les cultures de *P. multiseriis* CCL 70 en présence de glutamate, malgré l'absence de croissance observée expérimentalement. La culture-témoin cultivée sur un milieu dépourvu d'azote ne produisit pas non plus de toxines. Ces résultats rejoignent les observations faites par Bates *et al.* (1991) concluant qu'une culture de *P. multiseriis* limitée en azote ne produit pas d'acide domoïque. Dans le cas des cultures réalisées en présence de glutamate, la très faible croissance et l'absence de teneur intracellulaire en toxines sont donc comparables à une culture carencée en azote, et laissent supposer que *P. multiseriis* CCL 70 fut incapable d'assimiler le glutamate présent dans le milieu de culture.

Lors des cultures en continu de *P. multiseriis* CCL 70, les teneurs intracellulaires dans les diatomées prélevées à l'équilibre furent plus importantes en présence d'urée comme source azotée qu'en présence de nitrates.

Un précédent essai de culture en continu de *P. multiseriis* CCMP 2708 avait pu être réalisé en présence de nitrates (881 μM) ou d'urée (440 μM) comme sources azotées (Calu, 2007). Rapportés dans la figure ci-dessous (figure 62) et comparés aux résultats obtenus avec la souche *P. multiseriis* CCL70, ces données confirment une tendance négative entre la teneur intracellulaire en acide domoïque et le taux de croissance en culture continue (figure 62).

Les fortes variations dans les toxicités intracellulaires mesurées et symbolisées par des barres d'erreur autour de leur valeur moyenne (figure 62) s'expliquent chez *P. multiseriis* CCL 70 par une hausse des teneurs intracellulaires en acide domoïque au cours du suivi de l'état d'équilibre des cultures continues en présence de nitrates (figure 55) comme d'urée (figure 56). Le même phénomène fut observé pour *P. multiseriis* CCMP 2708 (Calu, 2007). Les mêmes observations furent rapportées lors de cultures continues de *P. multiseriis* en présence de nitrates (Bates *et al.*, 1996) : à faible taux de division et à l'état d'équilibre, la teneur intracellulaire en acide domoïque augmenta jusqu'à atteindre un seuil maximum au bout de 15 jours de suivi. Nos cultures en continu semblèrent également stabiliser leurs teneurs intracellulaires en acide domoïque après 14 jours d'augmentation de la toxicité à l'état d'équilibre (figures 55 et 56).

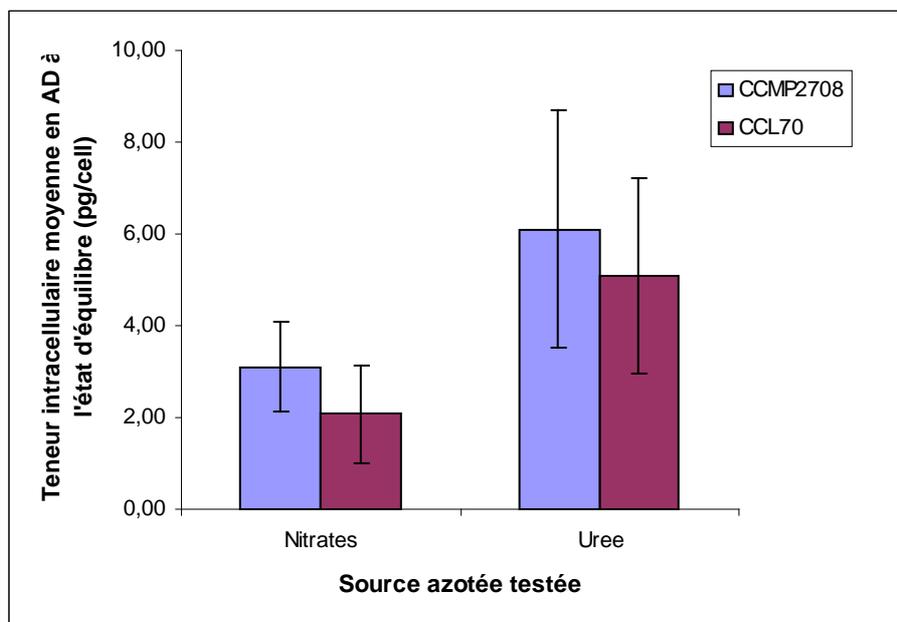


Figure 62 : comparaison entre les teneurs intracellulaires moyennes en acide domoïque à l'état d'équilibre et les sources azotées en présence lors de cultures continues de deux souches de *P. multiseriis* CCMP 2708 et CCL 70.

En culture en batch (tableau 15), comme en culture continue (figure 62), *P. multiseriis* CCL 70 présente donc une plus forte teneur intracellulaire toxinique en présence d'urée.

Etant donné les différences géographiques de prélèvement de ces deux souches de *P. multiseriis* suivies (la souche CCL70 provient de l'estuaire de la Tamise et la souche CCMP 2708 des côtes nord-américaines) lors de ces cultures en continu (figure 62), nous pouvons supposer que ces deux clones n'étaient pas identiques, bien que cette hypothèse nécessiterait une confirmation génotypique. Dans ce cas, l'hypothèse d'une réponse physiologique en culture continue généralisable à toute souche de *P. multiseriis* en présence d'urée dans des conditions de flux nutritifs ouverts (exemple d'un estuaire) peut être formulée au vu de nos résultats. Cette hypothèse n'a pas été, à notre connaissance, rapportée dans la littérature scientifique.

Nous envisageons donc comme extrapolation *in situ* qu'un déversement important d'urée dans le milieu côtier (par origine anthropique ou par excrétion d'organismes) puisse entraîner une plus forte teneur intracellulaire en acide domoïque lors d'un bloom toxique de *Pseudo-nitzschia spp.*

Durant le suivi en batch de la souche *P. multiseriis* CCL 70, les teneurs intracellulaires en acide domoïque furent maximales à faible intensité lumineuse ($50 \mu\text{mol photons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) pour les cultures en présence d'urée (5,17 pg/cellule) et en présence de nitrates (3,22 pg/cellule). A plus forte intensité lumineuse ($110 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), les teneurs intracellulaires rapportées chez *P.*

multiseries furent plus faibles (toxicités maximales rapportées de 0,6 pg/cell à 2,53 pg/cellule). La teneur intracellulaire en acide domoïque fut donc corrélée négativement à l'intensité lumineuse lors de nos expériences avec *P. multiseries* CCL 70. A l'inverse, Bates et Léger (1992) ont observé que chez les cultures en batch de *P. multiseries* en présence de nitrates, les teneurs cellulaires en acide domoïque furent plus faibles à 35 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ qu'à 90-200 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (toxicités intracellulaires comparables pour cette gamme d'intensité lumineuse). Lewis *et al.* (1993) notèrent également que chez *P. multiseries*, les taux de production d'acide domoïque furent corrélés positivement avec l'intensité lumineuse à 25°C : jusqu'à 7,5 pg/cellule à 80 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ et supérieurs à 15 pg/cellule à 180 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

La souche *P. australis* PN C1 présenta durant la phase stationnaire des teneurs intracellulaires moyennes en acide domoïque plus importantes en présence d'ammonium (19,49 fg/cellule) qu'en présence de nitrates (12,33 fg/cellule) ou d'urée (7,93 fg/cellule). La souche produit également des toxines en présence de glutamate (22,57 fg/cellule), mais ne présenta de teneurs toxiques intracellulaire lors de cultures en présence de glutamine, de taurine et d'arginine. En présence de nitrates, les teneurs intracellulaires en acide domoïque rapportées chez *P. australis* PN C1 furent en-dessous de celles rapportées par Garrison *et al.* (1992) pour la même espèce à partir d'autres isolats (12 à 31 pg/cellule), mais cependant supérieures à celles rapportées par Howard *et al.* (2007) (0,112 à 1,77 fg/cellule) lors de cultures en présence des sources nitrates, urée et ammonium. Howard *et al.* (2007) rapportèrent pour *P. australis* des teneurs intracellulaires d'acide domoïque plus importantes en présence d'urée (1,77 fg/cellule) qu'en présence de nitrates (0,165 fg/cellule) ou d'ammonium (0,112 fg/cellule). Nos résultats sont donc pour notre part différents de ceux rapportés chez Howard *et al.* (2007) lorsque nous comparons les teneurs intracellulaires d'acide domoïque obtenues en présence de ces trois sources azotées ; notre plus forte teneur toxique est observée en présence d'ammonium, et la teneur intracellulaire d'acide domoïque en présence d'urée est plus faible par rapport à celle en présence de nitrates. Nous avons donc obtenu des résultats variant de manière intraspécifique pour *P. australis* lorsque nous les comparons avec la bibliographie consultée.

Pour cette souche *P. australis* PN C1, les concentrations intracellulaires d'acide domoïque furent bien plus faibles que celles détectées chez *P. multiseries* CCL 70. Nous notons également que chez les deux souches, les teneurs intracellulaires en acide domoïque diffèrent selon la source azotée : elles furent maximales en présence de glutamate chez *P. australis* PN C1 alors que *P. multiseries* ne produit pas d'acide domoïque en présence de cette source

azotée organique, et furent minimales chez *P. australis* PN C1 en présence d'urée alors qu'il s'agit de la source azotée permettant d'obtenir les plus forts taux d'acide domoïque intracellulaire chez *P. multiseriis* CCL 70. Enfin, *P. australis* PN C1 ne produisit pas de toxines en présence de glutamine et d'arginine, contrairement à *P. multiseriis* CCL 70.

Thessen *et al.* (2009) rapportèrent des variations de croissance et de production d'acide domoïque en présence d'ammonium, d'urée et de nitrates, pour trois espèces de *Pseudo-nitzschia spp.* Nous observons également, lors de nos expériences, des variations intra- et inter-spécifiques dans la production d'acide domoïque selon la source azotée en présence chez ces deux souches de *Pseudo-nitzschia* étudiées expérimentalement.

2.3.3. Dynamique de production de l'acide domoïque chez *P. multiseriis* CCL 70 et *P. australis* PN C1

Au cours de nos expériences, les dynamiques de production intracellulaire de l'acide domoïque suivies tout au long des cultures en batch de *P. multiseriis* CCL 70 (figure 46) montrent que la production d'acide domoïque eut lieu dès le début de la phase exponentielle en présence d'ammonium et en fin de phase exponentielle en présence de nitrates et d'urée, mais n'eut lieu qu'en phase stationnaire en présence d'arginine et de glutamine. Le suivi des cultures réalisées en batch pour *P. australis* PN C1 montre que les sources nitrates, urée et glutamate permirent une production toxinique dès la fin de la phase exponentielle et au cours de la phase stationnaire, alors que la présence d'ammonium a permis une première production d'acide domoïque au cours de la phase exponentielle, et une seconde production au cours de la phase stationnaire (figure 48).

Une hypothèse généralement admise considère que la production d'acide domoïque par les souches de *Pseudo-nitzschia* toxiques se déroule durant la phase stationnaire, l'acide domoïque étant considéré comme un métabolite secondaire (Bates, 1998). Mais lors de cultures en batch de *P. multiseriis* en présence de nitrates, Bates *et al.* (1991) rapportèrent une dynamique de production initiée lors de la transition entre la fin de la phase exponentielle et le début de la phase stationnaire. Une teneur conséquente d'acide domoïque en phase exponentielle (jusqu'à 4 pg/cellule) a été également rapportée chez *P. multiseriis* en présence d'ammonium comme source azotée (Bates *et al.*, 1993). Garrison *et al.* (1992) rapportèrent quant à eux, lors du suivi en batch d'une souche de *P. australis* en présence de nitrates, une production d'acide domoïque dès la phase exponentielle et jusqu'au milieu de la phase stationnaire. Lundholm *et al.* (1994) notèrent également des traces d'acide domoïque durant la phase exponentielle lors de cultures en batch de *P. seriata* en présence de nitrates.

Nos résultats confirment donc les observations précédemment rapportés dans la bibliographie pour les cultures de *P. multiseriis* en présence de sources ammonium et nitrates et pour *P. australis* en présence de nitrates. Il semblerait donc qu'une production d'acide domoïque en phase exponentielle soit possible chez *P. multiseriis* CCL 70 comme chez *P. australis* PN C1, selon la source azotée disponible dans le milieu de culture.

Durant les productions toxiques en phase stationnaire, *P. multiseriis* CCL 70 présenta une teneur croissante en acide domoïque intracellulaire au cours du suivi pour les sources azotées nitrates, glutamine et arginine, et une teneur toxique intracellulaire décroissante en fin de phase stationnaire au cours du suivi en présence d'urée (figure 46). Mais Bates *et al.* (1991) remarquèrent également que lors de ces cultures en batch en présence de nitrates, les teneurs toxiques intracellulaires atteignirent rapidement un pic intracellulaire d'acide domoïque de 6,8 pg/cellule avant de décroître jusqu'à une teneur intracellulaire de 4,7 pg/cellule. Ce comportement pourrait donc varier selon la souche étudiée et la présence de sources azotées dans le milieu. Ce comportement n'a pas été constaté chez *P. australis* PN C1, où les teneurs intracellulaires en acide domoïque en présence de nitrates, d'urée ou d'ammonium ont continuellement augmenté au cours de phase stationnaire et durant la phase de sénescence (figure 48). Garrison *et al.* (1992) rapportèrent quant à eux pour des cultures de *P. australis* en présence de nitrates une augmentation de la toxicité intracellulaire initiée au cours de la phase exponentielle jusqu'à atteindre un pic au milieu de la phase stationnaire et décroître ensuite lentement. Nos dynamiques obtenues pour *P. australis* PN C1 semblent donc différentes de celles obtenues par Garrison *et al.* (1992). Nous n'avons cependant pas trouvé dans la littérature d'autres études nous permettant d'approfondir ces comparaisons.

Les productions d'acide domoïque observées en phase exponentielle lors de cultures en présence d'ammonium pourraient être considérées comme des réponses au stress cellulaire (Bates *et al.*, 1993). Nos résultats ont montré que chez *P. australis* PN C1, le taux de croissance moyen en présence d'ammonium durant la phase exponentielle fut important ($0,56 J^{-1}$) et suivi d'une importante teneur en acide domoïque en phase stationnaire. A l'inverse, chez *P. multiseriis* CCL 70, le taux de croissance moyen en phase exponentielle fut plus fort en présence d'ammonium ($1,12 J^{-1}$), mais la teneur intracellulaire en acide domoïque détectée au cours du suivi de ces cultures y fut la plus faible (tableau 15). La production d'acide domoïque chez *P. multiseriis* CCL 70 en présence d'ammonium coïncide avec une hausse brutale du taux de croissance moyen au cours de la phase exponentielle (figure 47). S'il semble peu probable que la production d'acide domoïque observée pour *P. australis* PN C1 soit le résultat d'un stress cellulaire accru en présence d'ammonium, les dynamiques de production observées dans

le cas de *P. multiseriis* CCL 70 laissent le champ libre à cette hypothèse, déjà formulée lors du suivi d'une autre souche de *P. multiseriis* en présence d'ammonium (Bates *et al.*, 1993). Cette observation appelle donc à examiner plus en détails les pools métaboliques d'ammonium assimilés au cours de la phase exponentielle. L'ammonium NH_4^+ est la forme azotée assimilée par le métabolisme cellulaire chez tous les organismes vivants, et donc naturellement aussi chez les organismes aquatiques autotrophes (Vincent, 1992). Ces pools d'ammonium vont être aussi bien utilisés pour les réactions biochimiques d'anabolisme (en vue de la croissance) que potentiellement utilisés dans la biosynthèse de l'acide domoïque.

2.3.4. Origine et devenir de l'acide domoïque extracellulaire détecté dans les milieux de culture au cours de ces expériences

Lors de nos expériences, nous avons détecté la présence d'acide domoïque extracellulaire dans les cultures de *P. australis* PN C1 et pour les cultures de *P. multiseriis* CCL70 seulement à faible intensité lumineuse ($50 \mu\text{mol photons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Les cultures continues réalisées avec les souches *P. multiseriis* CCL 70 et *P. pungens* PN D10 n'ont pas permis de détecter d'acide domoïque dans le milieu extracellulaire.

La comparaison pour les cultures de *P. australis* PN C1 entre les teneurs en acide domoïque particulaire dans les cellules et en acide domoïque dissout dans le milieu de culture nous a indiqué que des événements de forte production intracellulaire en acide domoïque ont été suivis de relargage des toxines dans le milieu de culture. Ces épisodes apparurent aussi bien en début qu'en fin de phase stationnaire, ce phénomène n'impliqua donc pas uniquement une libération des toxines par lyse cellulaire en phase de sénescence. Toutefois, même si l'implication d'un mécanisme de transport actif peut être supposée, il n'existe aucune donnée dans la bibliographie consultée sur un tel transporteur susceptible d'exporter l'acide domoïque en-dehors des membranes cellulaires. Il n'est donc pas possible de discuter plus en détails les mécanismes d'excrétion de l'acide domoïque au niveau cellulaire. Les concentrations d'acide domoïque dissout dans le milieu de culture fluctuèrent et ne montrèrent pas de dynamique d'accumulation durant leur suivi expérimental, les concentrations détectées alternèrent des phases d'augmentation et de disparition brutales dans le milieu de culture. Ces disparitions furent plus rapides qu'une dégradation photochimique de l'acide domoïque (Burns *et al.*, 2007), dont le temps de demi-vie est de 12 à 34 heures en milieu alcalin. Nous avons en effet observé des disparitions totales des teneurs extracellulaires en acide domoïque en 24 heures, ce qui reste trop rapide pour valider la seule hypothèse d'une dégradation photochimique.

Lors des cultures en batch de *P. multiseriis* CCL 70 avec une intensité lumineuse de 50 $\mu\text{mol photons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, des teneurs extracellulaires en acide domoïque ont été détectés durant la phase de sénescence, avec un maximum de 150 ng/ml en présence de nitrates dans la culture (figure 50). Thessen *et al.* (2009) rapportèrent pour des cultures en batch de *P. multiseriis* des teneurs extracellulaires d'acide domoïque en présence de nitrates (3,76 à 30 ng/ml), d'urée (0,16 à 2,9 ng/ml) et d'ammonium (0,19 à 103 ng/ml). Nos résultats indiquèrent également une plus forte teneur extracellulaire en présence de nitrates qu'en présence d'urée, mais nous ne disposons pas d'éléments de comparaison en présence d'ammonium. Cependant, lors de nos cultures en batch de *P. multiseriis* CCL 70 avec une intensité lumineuse de 110 $\mu\text{mol photons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, aucune teneur extracellulaire en acide domoïque ne fut détectée. Il apparaît également que lors des cultures de *P. multiseriis* CCL 70 à faible intensité lumineuse, les teneurs intracellulaires en acide domoïque furent plus importantes qu'à forte intensité lumineuse, toute condition azotée confondue. Ces dynamiques sont différentes de celles rapportées pour les cultures de *P. australis* PN C1 : les relargages n'interviennent qu'en phase de sénescence et donnent des teneurs extracellulaires plus importantes, alors que pour *P. australis* PN C1, les épisodes de relargage dans le milieu de culture peuvent avoir lieu à n'importe quel moment du suivi des cultures, à condition que des teneurs intracellulaires en acide domoïque soient détectées. Lors de cultures en batch de *P. multiseriis* en présence de nitrates (Bates *et al.*, 1991), la teneur extracellulaire en acide domoïque dans le milieu de culture augmenta dès le début de la phase stationnaire, alors que la teneur intracellulaire en acide domoïque fut également en hausse. La teneur en acide domoïque détectée dans le milieu extracellulaire haussa tout au long du suivi, jusqu'à atteindre 2,7 $\mu\text{g/ml}$ (Bates *et al.*, 1991). Ces teneurs sont bien au-dessus de nos valeurs d'acide domoïque extracellulaire pour *P. multiseriis* CCL 70.

Les teneurs d'acide domoïque détectées dans les milieux de culture pour *P. australis* PN C1 varièrent entre des maximums de 28,54 ng/ml à 61 ng/ml. A notre connaissance, dans le milieu naturel, lors de proliférations de *P. australis*, des concentrations d'acide domoïque dans l'eau de mer supérieures à 10 ng/ml ont été rapportées, notamment lors de la crise ASP de 1991 en baie de Monterey (Californie) (Walz *et al.*, 1994), ou encore jusqu'à 12,7 ng/ml dans le passage de Santa Barbara (Californie) au printemps 2004 (Schnitzer *et al.*, 2007). Nos teneurs détectées expérimentalement restèrent donc dans des échelles de concentration proches des données collectées *in situ* mais furent toutefois jusqu'à 6 fois supérieures, ce qui peut être expliqué par le confinement de nos cultures dans un volume clos, contrairement aux blooms *in situ*. La comparaison entre nos dynamiques de relargage dans le milieu de culture et les données terrain reste cependant difficile à réaliser, les données collectées *in situ* n'étant pas aussi détaillées que

le suivi d'une culture en laboratoire et les teneurs en acide domoïque dans le milieu de culture n'étant pas systématiquement rapportées lors des études *in vitro*.

Nos cultures ayant été réalisées à partir de souches non-axéniques, il est très probable que les bactéries aient pu influencer les cinétiques de teneur extracellulaire en acide domoïque, voire également les cinétiques intracellulaires.

Le rôle des bactéries dans la production d'acide domoïque fut suspecté (Bates *et al.*, 1998), en raison de la très faible production d'acide domoïque chez des souches toxiques de *P. multiseriis* rendues axéniques par traitement antibiotique (Douglas & Bates, 1992). Bates *et al.* (1995) rapportèrent pour différentes souches de *P. multiseriis* cultivées en batch en présence de nitrates des différences dans les teneurs d'acide domoïque détectées entre cultures axéniques et non-axéniques. En fin de phase stationnaire, les cultures non-axéniques présentèrent des teneurs toxiques intracellulaires (maximum de 8,23 pg/cell) supérieure à celles des cultures axéniques (maximum de 0,88 pg/cell). Les écarts maximums de teneur toxique entre les deux conditions allant jusqu'à un facteur de 9,35. Pour toutes les souches suivies lors de ces cultures, les teneurs toxiques dans les milieux de culture chutèrent fortement entre cultures non-axéniques (jusqu'à plus de 3000 ng/ml) et cultures axéniques (teneurs proches du seuil limite de détection). Les teneurs intracellulaires et extracellulaires en acide domoïque sont donc plus importantes en conditions non-axéniques. Ceci pourrait expliquer les faibles teneurs en acide domoïque détectées pour *P. australis* PN C1, la souche ayant dû être traitée aux antibiotiques pour assurer son maintien en souchothèque avant expérimentation.

Les bactéries auraient également pu intervenir en assimilant l'acide domoïque excrété. En effet, Stewart (2008) a mis en évidence la capacité d'absorption de l'acide domoïque par les bactéries épiphytes de *Pseudo-nitzschia sp.* Le devenir de l'acide domoïque ainsi assimilé par les bactéries n'est cependant pas connu.

La souche *P. australis* PN C1 a dû subir un traitement antibiotique afin de limiter les proliférations de bactéries et la maintenir dans notre souchothèque (voir chapitre 2). Des observations microscopiques nous ont montré la présence beaucoup plus faible de bactéries après traitement (données non rapportées dans ce mémoire). Le traitement antibiotique réalisé chez la souche *P. australis* PN C1 n'a pas rendu les souches axéniques, mais aurait pu entraîner une diminution assez significative de la population bactérienne, provoquer une baisse de la production toxique chez *P. australis* et ralentir l'incorporation bactérienne des toxines excrétées. Cette hypothèse expliquerait ainsi en partie les dynamiques de nos teneurs

toxiniques intracellulaires et extracellulaires pour ces cultures. Il serait possible que les chutes brutales de concentration extracellulaire d'acide domoïque correspondent à l'assimilation de la toxine par la fraction bactérienne présente dans les cultures.

La souche *P. multiseriis* CCL 70 ne fut pas traitée aux antibiotiques durant les expériences de cultures en batch réalisées en présence de différentes sources azotées. Un traitement fut cependant réalisé quelques mois auparavant. Dans le cas des cultures de *P. multiseriis* CCL 70 à différentes intensités lumineuses, nous pourrions également envisager que seuls des excès trop importants de toxines excrétées aient pu conduire à une détection d'acide domoïque dans le surnageant, des excrétions plus faibles de toxines ayant pu être totalement et rapidement incorporées par les bactéries épiphytes. Cette hypothèse permettrait d'expliquer la présence d'acide domoïque extracellulaire suite à d'importantes productions intracellulaires d'acide domoïque.

En absence de données sur les populations bactériennes en présence, il n'est cependant pas possible de discuter plus en détails ces hypothèses expérimentales.

2.3.5. Conclusion

Lors de nos expériences, pour toutes les sources azotées testées, nous n'avons pas pu établir de relation générale entre la croissance cellulaire et la teneur intracellulaire en acide domoïque. Pour *P. multiseriis* CCL 70, les tests statistiques effectués sur les données de taux de croissance moyen en phase exponentielle, de biomasse moyenne et la production intracellulaire toxinique en phase stationnaire n'ont pas permis d'établir de tendance particulière entre croissance et teneur toxinique (figures 42 et 43). Pour *P. australis* PN C1, il est apparu une tendance statistiquement négative entre la biomasse maximale moyenne et la teneur intracellulaire toxinique en phase stationnaire (figure 45) et, à l'inverse, une tendance statistiquement positive entre taux de croissance en phase exponentielle et teneur intracellulaire en acide domoïque lors de la phase stationnaire.

Nous avons également observé, lors de cultures en batch de *P. australis* PN C1 et de *P. multiseriis* CCL 70, des différences intra-spécifiques et inter-spécifiques dans les croissances et les teneurs intracellulaires en acide domoïque rapportées. Ces variations sont donc en accord avec les hypothèses formulées par Thessen *et al.* (2009) pour les sources azotées urée, nitrates et ammonium, mais élargissent cette hypothèse à de nouvelles sources azotées telles que le glutamate, l'arginine et le glutamine.

Les cultures de *P. australis* PN C1 réalisées en présence de taurine ont montré la capacité de cette souche à croître en présence de cette source d'azote organique. Cependant, si les biomasses en phase stationnaire furent importantes, aucune teneur en acide domoïque intracellulaire ne fut détectée. En raison des variations intra- et interspécifiques observées au cours de ces travaux, il serait imprudent de conclure à l'incapacité de *Pseudo-nitzschia* à produire de l'acide domoïque en présence de taurine. Il serait donc nécessaire de reproduire ces travaux sur d'autres souches toxiques afin de mieux répondre à l'influence de la taurine excrétée par les invertébrés marins sur les blooms de *Pseudo-nitzschia*.

Nos suivis des teneurs toxiques intracellulaires au cours des cultures en batch ont également permis de mettre en évidence différents épisodes de production d'acide domoïque au cours de la croissance, dont une production possible en phase exponentielle en présence d'ammonium et en fin de phase exponentielle en présence de nitrates et d'urée. Les dynamiques de production en phase stationnaire diffèrent quant à elles selon la présence initiale d'urée (teneur

intracellulaire décroissante après une brutale production d'acide domoïque) ou de nitrates et acides aminés (teneur toxinique intracellulaire croissante au cours de la phase stationnaire). L'influence métabolique de l'ammonium et de l'urée sur la production toxinique n'est pas clairement interprétable au vu de ces résultats. Il serait donc nécessaire d'effectuer des expériences métaboliques de marquage isotopique des sources azotées afin de tracer son devenir dans le métabolisme de *Pseudo-nitzschia sp.* Ces travaux, reproduits dans des conditions productrices de toxines en phase exponentielle, pourraient nous renseigner sur les enrichissements en azote marqué des voies métaboliques alors favorisées. Les résultats obtenus permettraient de mieux comprendre les mécanismes métaboliques mis en œuvre au cours des différentes phases de culture et particulièrement au cours de la production toxinique en phase exponentielle.

Enfin, l'influence des bactéries sur les teneurs extra-cellulaires d'acide domoïque lors du suivi de ces cultures non-axéniques a été suspectée, cette hypothèse permettant d'expliquer en partie les différentes dynamiques observées au cours de ces cultures. L'influence des bactéries sur la production d'acide domoïque n'étant pas encore clairement comprise, nos conclusions resteront donc à l'état d'hypothèses et nécessiteraient des expériences complémentaires afin d'être vérifiées. Cependant, si nos hypothèses venaient à être confirmées, nous pourrions ainsi envisager une interaction plus complexe entre *Pseudo-nitzschia sp.* et ses bactéries épiphytes dans leur environnement aquatique, probablement basée sur l'échange de métabolites d'intérêt pour ces deux organismes.

Partie 5 : Etude de la synthèse de kanoïdes à partir
d'hydroxyproline.

1. Introduction

Les kanoïdes sont un groupe d'acides aminés non protéogéniques. Leur motif commun, un acide pyrrolidine dicarboxylique, possède trois centres asymétriques en positions 2, 3 et 4 (voir figure 1). La structure chimique du substituant en position C-4 varie selon la nature du composé. Les kanoïdes sont utilisés de manière empirique comme insecticides par les habitants de l'île de Yakushima (Japon) (Parsons, 1996) à partir d'extraits d'algues rouges riches en acide domoïque et kaïnique. L'acide domoïque, qui appartient à la famille des kanoïdes, est en effet un puissant insecticide 14 fois plus efficace que le DDT (Maeda *et al.*, 1986). Les propriétés biologiques des kanoïdes peuvent donc être valorisées par l'industrie chimique, mais présentent également un risque en tant que contaminant alimentaire pour le consommateur.

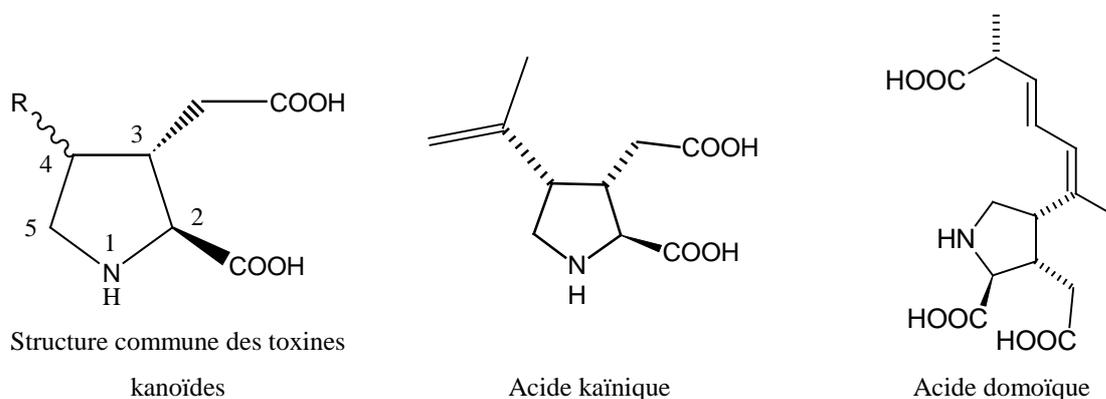


Figure 63 : structure commune des kanoïdes, de l'acide kaïnique et de l'acide domoïque.

La première molécule de cette famille de toxines, l'acide α -kaïnique (figure 63), fut isolée en 1953 à partir d'extraits de l'algue *Digenea simplex*, conjointement avec l'acide (+) allokaïnique, son épimère en position C-4 (Murakami *et al.*, 1953). Le composé fut ensuite identifié chez les Rhodophytes *Alsidium helminthocorton* et *Centroceras clavulatum* (Impellizzeri *et al.*, 1975 ; Balansard *et al.*, 1982). L'acide (-) domoïque (figure 1) fut pour sa part isolé à partir du Rhodophyte *Chondria armata* (Takemoto & Daigo, 1958). Cette molécule ne fut identifiée comme contaminant alimentaire qu'après la crise de l'île du Prince Edward (Canada), en 1987, suite à des blooms de la diatomée *Nitzschia pungens* forma *multiseriis* (Wright *et al.*, 1989). L'acide domoïque possède en position C-4 une chaîne octadiénoïque de conformation *trans-trans*- présentant plusieurs formes épimères et isomères (Parsons, 1996) (voir figure 1). Les activités insecticides de ces molécules sont fortement dépendantes de la nature de cette chaîne latérale (Maeda *et al.*, 1984).

La famille des kanoïdes regroupe d'autres espèces chimiques : parmi eux figurent les acides acroméliques et les domoïlactones. Les isomères A et B de l'acide acromélique (figure 64) furent isolés pour la première fois à partir d'extraits du Basidiomycète *Clitocybe acromelalga* (Konno *et al.*, 1983). Ils possèdent un substituant 2-pyridone en position C-4. D'autres formes isomères C, D et E ont été également isolés et caractérisés (Parsons, 1996). Les acides acroméliques sont responsables de douleurs abdominales et d'œdèmes lors de la consommation de ces champignons (Parsons, 1996). La dose létale de ces neurotoxines a été évaluée à 7-8 mg/kg pour l'acromélique A et B, et 10 mg/kg pour l'acromélique C (Fushiya *et al.*, 1990). Enfin, les domoïlactones (figure 64) sont des kanoïdes extraits de l'algue rouge *Chondria armata*, et possèdent une chaîne latérale cyclique de type γ -lactone (Maeda *et al.*, 1987).

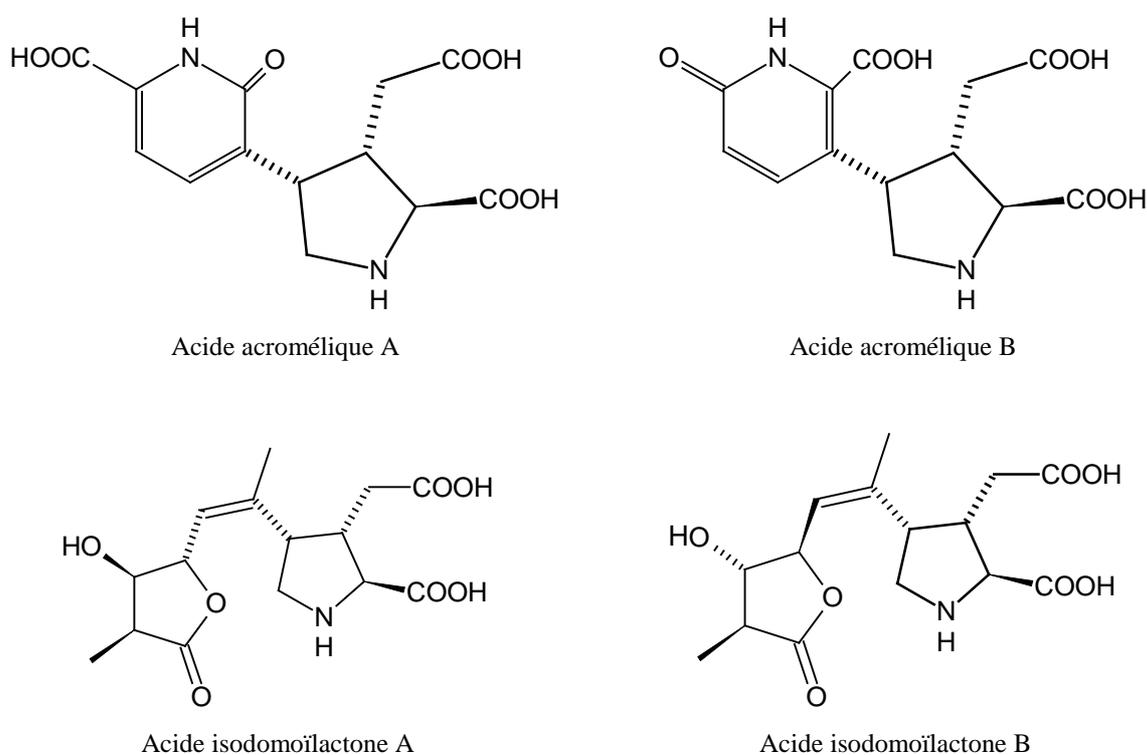


Figure 64 : structures des acides acroméliques A et B (Konno *et al.*, 1983) et isodomoïlactones A et B (Maeda *et al.*, 1987).

En raison de leurs modes d'action neurologiques, les toxines kanoïdes présentent de nombreuses activités biologiques. Ces composés naturels et leurs analogues synthétiques sont utilisés en recherche comme molécules-modèles dans de nombreuses maladies dégénératives liées à une perte importante de cellules nerveuses (McGeer *et al.*, 1978). La synthèse de ces composés représente donc un challenge pour l'industrie pharmaceutique et agronomique. La recherche de voies de synthèse chimique de ces composés naturels et la conception de dérivés

analogues a mobilisé différentes équipes de recherche, depuis l'isolement du premier composé kaïnique en 1953.

L'étape initiale de synthèse du motif commun à tous les kanoïdes nécessite la formation d'un acide pyrrolidine-2-carboxylique avec une stéréochimie correcte de ses trois centres asymétriques. En effet, toutes les molécules de la famille des kanoïdes possèdent un carbone asymétrique C2 de configuration S et une stéréochimie de type *trans* avec la fonction carboxylique sur le carbone adjacent (C-3). De plus, à l'exception de l'acide allokaïnique, tous les kanoïdes isolés à ce jour possèdent une disposition relative de type *cis* des substituants portés par les carbones C-3 et C-4.

Le composé de structure chimique la plus simple de cette famille, l'acide kaïnique, représente un intermédiaire chimique clé en vue de la synthèse de différents composés kanoïdes (Baldwin *et al.*, 1997a ; 1997b ; 1997c).

La première synthèse de l'acide kaïnique rapportée dans la littérature scientifique a été réalisée par Oppolzer et Thirring (1982). La réaction-clé consistait en une cyclisation à partir d'un diène dérivé du L-glutamate, le produit obtenu étant ensuite converti en six étapes en acide kaïnique. Cooper *et al.* (1987) ont également développé une synthèse énantiosélective à partir de l'acide L-aspartique via un réarrangement de Claisen. Takano *et al.* (1988) proposèrent une cyclisation de type hétéro-Diels-Alder à partir d'un dérivé du diéthyl L-tartrate. Mais pour ces deux stratégies de synthèse, plusieurs étapes ultérieures sont nécessaires afin d'obtenir l'acide kaïnique. Une synthèse racémique a été rapportée par Yoo *et al.* (1990). A partir d'une réaction de carbonylation de l'acétate allylique à l'aide de palladium(0), deux diastéréoisomères étaient obtenus avec des rendements d'extraction respectivement de 25 % et de 35 %, et cinq étapes supplémentaires de synthèse étaient nécessaires afin d'obtenir de l'acide kaïnique et son épimère en C-4, l'acide allokaïnique.

La L-sérine a également été suggérée comme molécule de départ de cette synthèse. Une synthèse à partir de cet acide aminé a été rapportée (Hatakeyama *et al.*, 1993) avec une étape intermédiaire de cyclisation diastéréosélective, réalisée en obtenant un bon rendement de 86%. Barco *et al.* (1991) ont fait réagir la L-sérine avec un alkène électrophile, le 2-nitro-3-methylbuta-1,3-diène, en présence d'une amine secondaire dérivée de la sérine. La réaction a permis d'isoler la pyrrolidine désirée avec un rendement de 88%. Cette voie de synthèse a également été reprise par Barco *et al.* (1993) pour synthétiser de l'acide acromélique A.

L'acide L-glutamique via une réaction de Pauson-Khand aboutit à la synthèse de deux diastéréoisomères de type ènone avec un rendement de 95%. Le produit possédant la stéréochimie *trans*- C-2 C-3 a été ensuite converti en acide kaïnique avec un rendement de 41% (Yoo *et al.*, 1993).

Baldwin *et al.* (1997a) ont proposé une voie de synthèse à partir de l'acide aminé L-hydroxyproline. Après protection des groupements amine et carboxylique, l'alcool secondaire est oxydé pour permettre l'addition de pyrrolidine. Le composé intermédiaire est alors alkylé avec du *tert*-butylbromoacetate. L'analogie kanoïde obtenu peut ensuite être utilisé comme composé intermédiaire afin de synthétiser de nouvelles molécules de cette famille toxique.

2. Synthèse chimique des kanoïdes

Dans le cadre de ce sujet de thèse, un des objectifs de recherche visait à s'intéresser à la synthèse d'analogues kanoïdes afin de proposer des molécules-cibles greffables sur des polymères activés. L'objectif de ce travail était de créer des colonnes d'affinité spécifiques aux toxines kainiques, et d'utiliser de telles colonnes dans la sélection de biorécepteurs de type anticorps ou aptamères.

La synthèse totale d'un dérivé kanoïde a été reprise à partir de la méthode de Baldwin *et al.* (1997a) afin de produire un analogue kainique greffable sur support immobilisé. La synthèse d'un dérivé kanoïde a été initiée à partir de la trans-4-hydroxy-L-proline commerciale.

Le composé obtenu doit de plus présenter une fonction chimique favorable à son greffage en C-4 sur la matrice, tandis que les fonctions acide carboxylique et amine secondaire doivent être laissées libres pour la procédure SELEX.

Cette procédure permet d'isoler des séquences d'oligonucléotides ayant la capacité théorique de reconnaître tous types de molécules cibles avec une grande affinité et une grande spécificité (Gold *et al.*, 1997). De plus, l'ajustement induit lors de la formation du couple molécule sonde/molécule cible accroît l'affinité observée. Pour des molécules de petites tailles l'ajustement induit permet d'atteindre des affinités dans la gamme micro- à picomolaire, ce qui correspond à la gamme recherchée pour la détection de l'acide domoïque. Le criblage de telles banques oligonucléotidiques aléatoires vis-à-vis de molécules d'intérêt permet donc d'envisager le développement de nouveaux outils de détection pour leur étude.

La voie de synthèse linéaire retenue comporte 5 étapes (figure 65) permettant successivement la protection des groupements amine secondaire (Portoghese & Turcotte, 1971) et acide carboxylique, puis l'oxydation de la fonction hydroxyle en C-4 et enfin l'introduction de façon stéréospécifique d'une seconde fonction acide carboxylique par alkylation en C-3 via l'énamine formée par réaction avec la pyrrolidine (Baldwin *et al.*, 1997a).

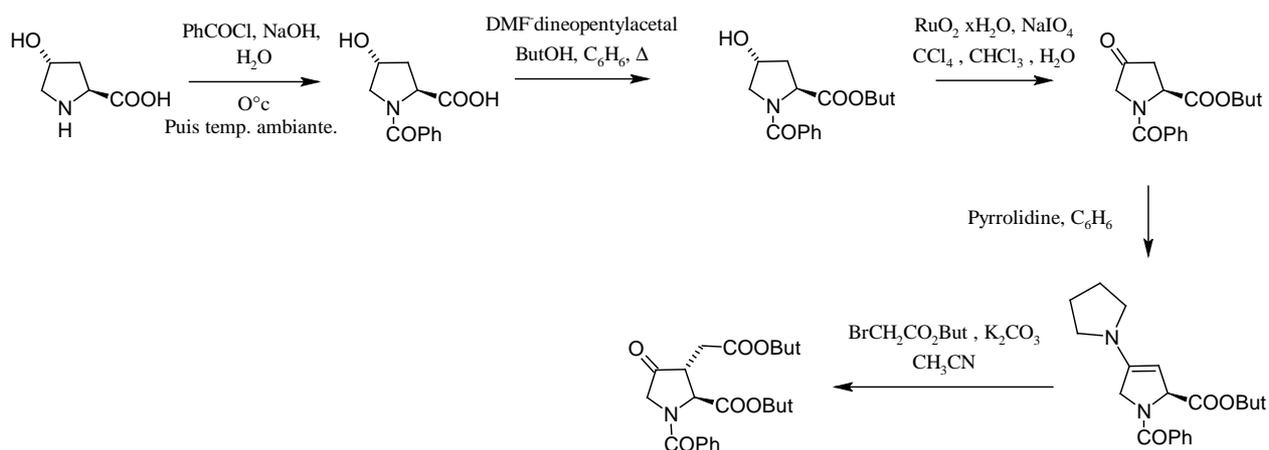


Figure 65 : synthèse linéaire du kainoïde à partir de la *trans*-4-hydroxy-L-proline (d'après Baldwin *et al.*, 1997a).

2.1. Protection de la fonction amine

Le protocole suivi a été inspiré en partie de la méthode décrite par Portoghese et Turcotte (1971) pour la benzylation des fonctions amine secondaires en mélange biphasique. La protection de la fonction amine secondaire de la *trans*-4-hydroxy-L-proline est ainsi réalisée par réaction d'acylation dans un mélange biphasique à pH basique en présence de chlorure de benzoyle (figure 66).

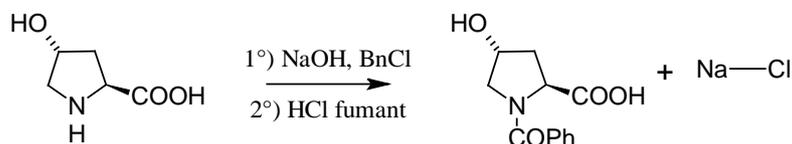


Figure 66 : réaction de protection de l'amine.

Cependant, leur protocole stipulait qu'après acidification de la phase aqueuse, les cristaux formés correspondaient au produit désiré. L'analyse RMN nous a prouvé le contraire, et une étape d'extraction à l'acétate d'éthyle a été nécessaire afin d'isoler le produit final.

2.1.1. Protocole de synthèse et caractérisation physico-chimique

2.1.1.1. Mode opératoire :

2,8 g de trans-4-hydroxy-L-proline (21,35 mmoles) sont dissous dans 50 mL de solution de NaOH (1 M) à froid. 50 mL d'éther diéthylique et 2,5 mL de chlorure de benzoyle (21,35 mmoles, 1 équ.) sont ajoutés à 0°C, puis la réaction est laissée sous agitation à température ambiante pendant 24 heures. La phase aqueuse est extraite avec de l'éther diéthylique. Le pH est ramené à 1 par ajout d'HCl fumant. Les cristaux formés sont filtrés sur Buchner. Le filtrat est extrait à l'acétate d'éthyle et la phase organique ainsi obtenue séchée sur MgSO₄ puis concentrée sous vide. Le solide visqueux jaunâtre ainsi obtenu est analysé en RMN (400 MHz, proton ¹H, solvant DMSO-d⁶).

La trans-N-benzoyl- 4-hydroxy-L-proline est obtenue avec un rendement de **44%** et sera utilisée sans purification préalable.

2.1.1.2. Caractérisation :

Rf : 0.32 (CH₂Cl₂ /CH₃OH : 3/7 - Révélateur : Molybdate de Cérium)

RMN ¹H (400MHz, DMSO-d⁶) : 2.25-2.50 (2H, m, NCHCH₂), 3.57 (1H, d, J 11 Hz, NCH₂), 4.0 (1H, dd, J 11 et 4 Hz, NCH₂), 4.55 (1H, m, CHOH), 4.80 (1H, pseudot, J 8.5 Hz, CHCO₂H), 7.75-7.85 (5H, m, H aromatiques) (voir spectre en annexes 3).

2.2. Protection de la fonction acide carboxylique

Le N,N-diméthylformamide dinéopentylacétal permet de protéger la fonction acide carboxylique extracyclique de la trans-4-hydroxy-L-proline par réaction d'estérification (figure 67). Il ne joue cependant pas le rôle de catalyseur car il n'est pas régénéré en fin de réaction mais transformé en N,N-Diméthylformamide (Büchi *et al.*, 1964).

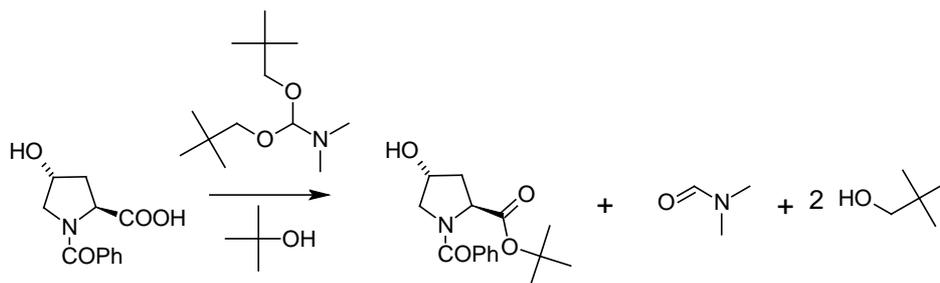


Figure 67 : estérification de la trans-4- hydroxy-L-proline N benzoylée.

2.2.1. - Protocole de synthèse et caractérisation physico-chimique

2.2.1.1. Mode opératoire :

500 mg de trans-N-benzoyl-4-hydroxy-L-proline (2.11 mmoles) sont dissous dans 3 mL de toluène et 600 μ L de tert-butanol. Le mélange est chauffé à reflux et 1,78 mL de DMF-dineopentylacetal sont ajoutés goutte à goutte. La réaction est suivie par CCM pendant 6h puis la solution jaune obtenue concentrée *in vacuo*. Le résidu est repris dans de l'acétate d'éthyle (25 mL). La phase organique est alors lavée avec une solution saturée de bicarbonate de sodium (25 mL), d'HCl 0,5 M (25 mL) et de NaCl saturée (25 mL). Après séchage sur MgSO₄, filtration et concentration sous vide. Le solide obtenu est recristallisé dans l'éther diéthylique. Le rendement final obtenu pour le trans-N-benzoyl-4-hydroxy-L-proline tert-butyl ester est de **48 %**.

2.2.1.2. Caractérisation :

Rf : 0.86 (CH₂Cl₂ /CH₃OH : 3/7 - Révélateur : Molybdate de Cérium)

RMN ¹H (400MHz, CDCl₃) : 1.22 (3H, s, CH₃), 1.48 (6H, s, CH₃), 2.12 (1H, ddd, J 13, 8.5 et 4.5 Hz, NCHCH₂), 2.25-2.40 (1H, m, NCHCH₂), 3.40 (1H, d, J 11 Hz, NCH₂), 3,74 (1H, dd, J 11 et 4 Hz, NCH₂), 4.49 (1H, m, CHOH), 4.70 (1H, pseudot, J 8.5 Hz, CHCO₂tBu), 7.30-7.55 (5H, m, H aromatiques) (voir spectre en annexes 3).

2.3. Oxydation de la fonction hydroxyle

L'oxydation de la fonction alcool en C-4 est réalisée selon les conditions optimisées de la réaction de Sharpless en présence de tétraoxyde de ruthénium. Le métapériodate de sodium vient se fixer au niveau de la fonction hydroxyle permettant l'arrachement du proton situé sur le carbone C-4 par l'oxyde de ruthénium (II) On obtient ainsi l'oxydation de la fonction alcool en C4 en cétone (figure 68).

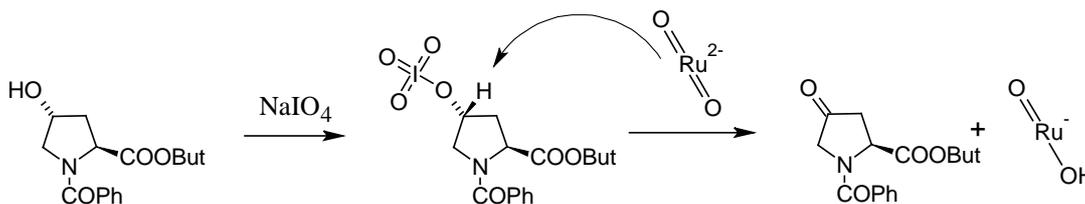


Figure 68 : mécanisme proposé pour l'oxydation de la fonction hydroxyle.

2.3.1. - Protocole de synthèse et caractérisation physico-chimique

2.3.1.1. Mode opératoire :

25,21 mg d'oxyde de ruthénium (IV) (0,215 mmoles) sont dissous à froid dans 1,52 mL de tétrachlorure de carbone. 3,9 mL d'une solution de métapériodate de sodium dans l'eau (0,4 mM) sont rajoutés et le mélange biphasique est agité fortement. 231 mg de trans-N-benzoyl-4-hydroxy-L-proline tert-butyl ester (0,79 mmoles) dissous dans 1,77 mL d'éthanol absolu sont ajoutés et le mélange est agité à température ambiante pendant 6 heures. Les deux phases sont séparées et la phase aqueuse extraite avec du chloroforme (2x10 mL). Les phases organiques sont rassemblées, filtrées sur Celite puis concentrées sous vide.

2.3.1.2. Caractérisation :

Les analyses RMN ^1H (400MHz, CDCl_3) montrent que le signal caractéristique du proton H-C4-OH ($\delta = 4.49$ ppm) est toujours présent. La réaction d'oxydation ne s'est donc pas déroulée correctement. Deux essais non concluants, suite à une erreur d'unité corrigée dans la publication de Baldwin *et al.* (1997a), aboutissent également à un échec.

2.4. Discussion

Nous n'avons pu mener à bien la stratégie d'oxydation de Baldwin *et al.* (1997a) et avons émis quelques premières hypothèses sur cette étape de la synthèse. D'après Rabasso (2006), le périodate de sodium permet de réaliser préférentiellement une coupure oxydante entre deux alcools vicinaux (figure 69).

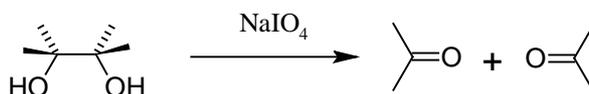


Figure 69 : clivage oxydatif d'alcools vicinaux par le métaperiodate de sodium.

Or le substrat étudié ne comporte qu'un alcool secondaire en position C-4 à oxyder. Il serait donc nécessaire d'envisager d'autres techniques d'oxydation comme celle décrite dans les conditions de Jones (figure 70), durant laquelle l'oxydation des alcools primaires et secondaires peut être réalisée grâce au dichromate de potassium ou de sodium ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ou

Na₂Cr₂O₇), ou encore avec de l'anhydride chromique (CrO₃) en solution aqueuse acide (Dupuis, 2008).

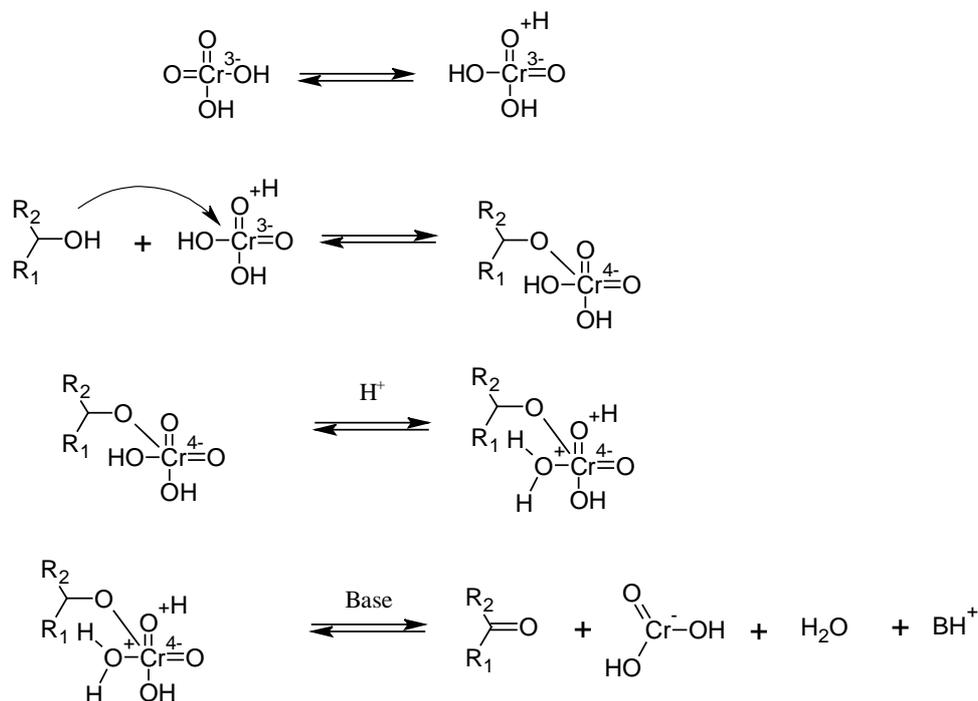


Figure 70 : principe de l'oxydation de Jones d'un alcool secondaire par le chrome.

Ces propositions n'ont malheureusement pas pu être expérimentées durant cette thèse et notre synthèse linéaire reste stoppée à cette étape. Ce premier travail a cependant permis d'acquérir des compétences techniques en maîtrisant les étapes de protection de trans-4-hydroxy-L-proline en vue du travail ultérieur de synthèse. L'objectif de synthèse pourra donc être poursuivi à la suite de ce travail de thèse en s'appuyant sur les premières contributions apportées dans ce chapitre de thèse.

Conclusion Générale

L'étude physiologique des diatomées toxiques du genre *Pseudo-nitzschia spp.* représente un domaine d'investigation scientifique relativement récent comparé à l'étude d'autres diatomées-modèles comme *Thalassiosira spp.* ou *Pheodactylum spp.*. Les connaissances physiologiques et biologiques accumulées restent en conséquence très restreintes : il demeure encore de nombreuses questions en suspens autour de la nutrition et du métabolisme toxinique de *Pseudo-nitzschia*. Les travaux d'écophysiologie réalisés au cours de cette thèse de doctorat représentent donc une contribution à l'avancée des connaissances sur la physiologie et la production toxinique par *Pseudo-nitzschia spp.*

Nos expérimentations s'inspirent tout d'abord d'améliorations techniques apportées aux cultures en batch et en continu de cette diatomée, ayant permis de mieux contrôler en laboratoire la croissance et la production toxinique des souches cultivées. Une fois ces questions techniques résolues, nous nous sommes proposés d'explorer l'impact des sources nutritives silicium et azotées sur la croissance et la production toxinique chez *Pseudo-nitzschia*.

Après une première approche visant à reproduire l'influence des teneurs en silicium sur la croissance et la production toxinique de *P. multiseriis*, nous nous sommes intéressés à l'assimilation du silicium et à son inhibition par le germanium dioxyde. Ces résultats montrent des résultats comparables à d'autres tests rapportés dans la littérature pour d'autres diatomées, et suggèrent qu'il n'existerait pas de rôle métabolique direct du silicium dans la production toxinique.

Nos travaux sur l'influence des sources azotées sur la croissance et la production toxinique de *Pseudo-nitzschia* apportent un éclairage complémentaire sur la physiologie de ces diatomées. Nous avons ainsi pu mettre en évidence une gamme plus large de sources azotées assimilables chez deux souches de *Pseudo-nitzschia* : les données obtenues en présence de glutamate, d'arginine, de taurine et de glutamine sont à notre connaissance inédites dans la littérature scientifique. La souche *P. multiseriis* CCL 70 présenta la plus forte croissance en présence d'ammonium mais fut incapable de croître en présence de glutamate. La souche *P. australis* PN C1 fut capable de croître en présence de toute source d'azote testée, avec les plus forts taux de croissance en phase exponentielle en présence de glutamine et la plus forte biomasse mesurée en phase stationnaire en présence de taurine. Les teneurs toxiniques intracellulaires furent rapportées maximales en présence de nitrates et d'urée pour *P. multiseriis* CCL 70, et en présence de glutamate pour *P. australis* PN C1. Nos résultats confirmèrent également une production toxinique dès la phase exponentielle de croissance de *P. multiseriis* et *P. australis* selon la source azotée en présence. Les cultures en continu réalisées en photobioréacteur pour

P. multiseriis CCL 70 et *P. pungens* PN D10 montrèrent pour leur part une influence positive sur la production toxinique de l'urée par rapport aux nitrates. Cette donnée ouvre la question de l'influence de l'urée, fertilisant d'origine anthropique présent dans les eaux estuariennes, sur les dynamiques toxiques *in situ* des *Pseudo-nitzschia*. De plus, les résultats de croissance et de toxicité intracellulaire varièrent fortement pour *P. multiseriis* CCL 70 et *P. australis* PN C1 selon les sources azotées testées. Des variations intra- et inter-spécifiques ont déjà été constatées en réponse à différentes sources azotées chez le genre *Pseudo-nitzschia* (Thessen *et al.*, 2009). Les résultats de ces travaux de thèse, comparés aux données de la littérature consultée, confirment donc ces variations au sein du genre *Pseudo-nitzschia*.

Les comparaisons entre teneurs intracellulaires toxiques et concentrations en acide domoïque dans le milieu de culture ont également montré des épisodes de relargage de toxines dans le milieu de culture. La brutale disparition des teneurs extracellulaires mesurées pourrait s'expliquer par l'absorption de l'acide domoïque par des bactéries présentes dans ces cultures non-axéniques. Cependant, le manque de données bibliographiques quant au devenir de l'acide domoïque assimilé par les bactéries ne nous permet pas de poursuivre notre interprétation. Enfin, un travail préliminaire d'étude de l'uréase a été réalisé, ouvrant de plus larges questions sur le rôle physiologique de l'urée chez *Pseudo-nitzschia* en tant que régulateur probable du métabolisme azoté de ces diatomées.

Ces travaux de physiologie des diatomées toxiques ouvrent la voie à de nouvelles expériences envisageables en laboratoire. Tout d'abord, une étude enzymologique plus approfondie d'enzymes-clés impliquées dans l'assimilation des sources azotées par l'emploi de radioisotopes ¹⁵N permettrait de déterminer les caractéristiques biochimiques de ces enzymes. L'emploi de ces molécules permettrait également de tracer l'assimilation des sources azotées et leur incorporation *in fine* dans les molécules d'acide domoïque. Ces travaux permettraient de répondre à la question de l'utilisation des pools d'azote assimilés, et de leur influence métabolique sur la production toxinique. Enfin, ces travaux nécessiteraient d'être couplés avec des études complémentaires sur le rôle du phosphate dans la croissance et la production toxinique de *Pseudo-nitzschia spp.* afin d'aboutir à un modèle à trois macro-nutriments (silicium, azote et phosphate) plus affiné.

Parallèlement à ces travaux de physiologie végétale, nous avons débuté un travail de synthèse chimique autour de la famille toxinique des kanoïdes. Le but de cette étude consistait à proposer une cible toxinique commune aux toxines ASP immobilisable sur supports en vue de son emploi lors de procédures de sélection de récepteurs spécifiques. Au cours de ces travaux,

une voie de synthèse linéaire de toxines kanoïdes à partir d'hydroxy-proline a été envisagée et testée. Les premiers résultats obtenus ont permis d'acquérir de premières compétences techniques en vue de la poursuite de ces travaux au-delà du cadre de cette thèse de doctorat. Nous avons déjà envisagé, une fois que cette synthèse sera achevée, une méthode d'immobilisation des toxines en vue de sélection de séquences aptamériques spécifiques lors de la procédure SELEX. Ces travaux préliminaires constituent donc une première étape vers la création de nouveaux biocapteurs innovants de détection des toxines ASP.

Ces travaux de thèse, à travers les résultats obtenus, soulignent donc l'importance du champ d'investigation scientifique représenté par l'étude du modèle *Pseudo-nitzschia* en physiologie végétale. Les objectifs de ces travaux scientifique visaient autant à apporter des résultats inédits qu'à encourager la poursuite de ces travaux scientifiques en posant de nouvelles hypothèses de travail. Cette thèse de doctorat apporte donc, par sa contribution, des éléments novateurs pour l'étude des diatomées toxiques et la prévention des épisodes de contaminations ASP dans le milieu marin.

Bibliographie

- Addison, R.F.; Stewart J.E. (1989). Domoic acid and the eastern Canadian molluscan shellfish industry. *Aquaculture*, 77, 263-269.
- Admiraal, W. ; Peletier, H. ; Laane, R.W.P.M. (1986). Nitrogen metabolism of marine planktonic diatoms ; excretion, assimilation and cellular pools of free amino acids in seven species with different cell size. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 98, 241-263.
- Admiraal, W. ; Riaux-Goblin, C. ; Laane, R.W.P.M. (1987). Interactions of ammonium, nitrate, and D- and L- amino acids in the nitrogen assimilation of two species of estuarine benthic diatoms. *Marine Ecology Progress Series* 40, 267-273.
- Akallal, R.; Mouradi, A.; Givernaud, T.; Billard, C. (2000). *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* bloom in Atlantic Moroccan waters 1999. *Harmful Algae News* 20:6-7.
- Allen, J.A.; Garrett, M.R. (1971). *Taurine in invertebrates*. In: Advances in marine biology, 9. Russel, F.S. et Yonge, M. (éds). Academic Press, London, pp. 205-253.
- Allen, A.E.; Vradi, A.; Bowler, C. (2006). An ecological and evolutionary context for integrated nitrogen metabolism and related signaling pathways in marine diatoms. *Current Opinion in Plant Biology* 9(3), 264-273.
- Allen, A.E.; LaRoche, J.; Maheswari, U.; Lommer, M.; Schauer, N.; Lopez, P.J.; Finazzi, G.; Fernie, A.R.; Bowler, C. (2008). Whole-cell response of the pennate diatom *Phaeodactylum tricorutum* to iron starvation. *PNAS* 105(30), 10438-10443.
- Almandoz, G.O.; Ferreyra, G.A.; Schloss, I.R.; Dogliotti, A.I.; Rupolo, V.; Paparazzo, F.E.; Esteves, J.L.; Ferrario, M.E. (2008). Distribution and ecology of *Pseudo-nitzschia* species (Bacillariophyceae) in surface waters of the Weddell Sea (Antarctica). *Polar Biol.* 31: 429-442.
- Almandoz, G.O. ; Hernando, M.; Ferrario, M.E. (2008). SEM observations of *Pseudo-nitzschia* from Beagle Channel: *P. seriata* in the southern hemisphere ? *Harmful Algae News* 38:8-9.

- Álvarez, G., Uribe, E.; Quijano-Scheggia, S.; López-Rivera, A.; Mariño, C.; Blanco, J. (2009). Domoic acid production by *Pseudo-nitzschia australis* and *Pseudo-nitzschia calliantha* isolated from North Chile. *Harmful Algae* 8: 938-945.
- Aminot, A. ; Kerouel, R. (2004). *Hydrologie des écosystèmes marins*. Editions Quae/Ifremer, 335 p. ISBN-10: 2844331335.
- Amy, N.K.; Garrett, R.H. (1974). Purification and Characterization of the Nitrate Reductase from the Diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Plant. Physiol.* 54, 629-637.
- Amzil, Z.; Fresnel, J.; Le Gal, D.; Billard, C. (2001a). Domoic acid accumulation in French shellfish in relation to toxic species of *pseudo-nitzschia multiseriata* and *P. pseudodelicatissima*. *Toxicon* 39, 1245-1251.
- Amzil, Z.; Vernoux, J.-P.; Pottier, I. (2001b). *Les principales classes de phycotoxines*. In: *Toxines d'algues dans l'alimentation*. Freymy J.-M & Lassus P. (coord), éd.. Ifremer, p. 160. ISBN-10: 2844330525.
- Anderson, C.R.; Brzezinski, M.A.; Washburn, L.; Kudela, R. (2006). Circulation and environmental conditions during a toxigenic *Pseudo-nitzschia australis* bloom in the Santa Barbara Channel, California. *Marine Ecology Progress Series* 327, 119-133.
- Antia, N.J.; Berland, B.R.; Bonin, D.J.; Maestrini, S.Y. (1975). Comparative evaluation of certain organic and inorganic sources of nitrogen for phototrophic growth of marine microalgae. *J. mar. biol. Ass. U.K.* 55, 519-539.
- Antia, N.J.; Berland, B.R.; Bonin, D.J.; Maestrini, S.Y. (1976). Effects of urea concentration in supporting growth of certain marine microplanktonic algae. *Phycologia* 16, 105-111.
- Antia, N.J.; Harrison, P.J.; Oliveira, L. (1991). The role of dissolved organic nitrogen in phytoplankton nutrition, cell biology and ecology. *Phycologia* 30(1), 1-89.
- Arévalo, F.F.; Bermúdez, M.; Salgado, C. (1998). *ASP toxicity in scallops: individual variability and tissue distribution*, p. 499-502. In: B. Reguera, J. Blanco, M.L. Fernández, and T. Wyatt (éds.) *Harmful algae*. Xunta de Galicia and the IOC of UNESCO, Paris.

- Armbrust, E.V. *et al.* (2004). The Genome of the Diatom *Thalassiosira pseudonana* : Ecology, Evolution, and Metabolism. *Science* 306, 79-86.
- Azam, F.; Hemmingsen, B.B.; Volcani, B.E. (1973). Germanium incorporation into the silica of diatom cell walls. *Archives of Microbiology* 92:11-20.
- Azam, F.; Hemmingsen, B.B.; Volcani, B.E. (1974). Role of silicon in diatom metabolism. *Archives of Microbiology* 97(1), 103-114.
- Balansard, G.; Gayte-Sorbier, A.; Cavalli, C. (1982). Amino acids of the Corsican moss, *Alsidium helminthocroton* Kutzing, *Jania rubens* Lamx. and *Corallina officinalis* L. *Ann Pharm Fr.* 40(6), p. 527-534.
- Baldwin, J.E.; Bamford, S.J.; ; Fryer, A.M.; Rudolph, M.P.W.; Wood, M.E. (1997a). Towards a Versatile Synthesis of Kainoids I : Introduction of the C-3 and C-4 Substituents. *Tetrahedron* 53(14), 5233-5254.
- Baldwin, J.E.; Bamford, S.J.; Fryer, A.M.; Rudolph, M.P.W.; Wood, M.E. (1997b). Towards a Versatile Synthesis of Kainoids II : Two Methods for Establishment of C-4 Stereochemistry. *Tetrahedron* 1997, 53(14), 5255-5272.
- Baldwin, J.E.; Fryer, A.M.; Spyvee, M.R.; Whitehead, R.C.; Wood, M.E. (1997c). Towards a Versatile Synthesis of Kainoids III : Efficient Methods for Control of C-4 Stereochemistry. *Tetrahedron* 53(14), 5273-5290.
- Baker, K.M.; Gobler, C.J.; Collier, J.L. (2009). Urease gene sequences from algae and heterotrophic bacteria in axenic and nonaxenic phytoplankton cultures. *J. Phycol.* 45(3), 625-634.
- Barco, A.; Benetti, S.; Pollini, G.P.; Spalluto, G.; Zanirato, V. (1991). A new enantioselective route to kainoids : application to the forma synthesis of (-)- α -kainic acid. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 6, 390-391.

- Barco, A.; Benetti, S.; Pollini, G.P.; Spalluto, G.; Zanirato, V. (1993). Enantioselective formal synthesis of acromelic acid A via tandem Michael reaction methodology. *Gazetta chimica italiana* 123(4), 185-188.
- Bates, S.S.; Bird, C.J.; de Freitas, A.S.W.; Foxall, R.; Gilgan, M.; Hanic, L.A.; Johnson, G.R.; McCulloch, A.W.; Odense, P.; Pocklington, R.; Quilliam, M.A.; Sim, P.G.; Smith, J.C.; Subba Rao, D.V.; Todd, E.C.D.; Walter, J.A.; Wright, J.L.C. (1989). Pennate diatom *Nitzschia pungens* as the primary source of domoic acid, a toxin in shellfish from eastern Prince Edward Island, Canada. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 48, 1136-1144
- Bates, S.S.; de Freitas, A.S.W.; Milley, J.E.; Pocklington, R.; Quilliam, M.A.; Smith, J.C.; Worms, J. (1991). Controls on domoic acid production by the diatom *Nitzschia pungens* f. *multiseries* in culture: nutrients and irradiance. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 48, 1136-1144.
- Bates, S.S.; Léger, C. (1992). *Response of Nitzschia pungens f. multiseries to irradiance: growth and domoic acid production*. In: Therriault, J.-C.; Levasseur, M. (Eds). Proceedings of the Third Canadian Workshop on Harmful Marine Algae. *Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci.* 1893, pp. 9-10 (abstract).
- Bates, S.S.; Worms, J.; Smith, J.C. (1993). Effects of ammonium and nitrate on domoic acid production by *Pseudonitzschia pungens* in batch culture. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 50, 1248-1254.
- Bates, S.S. ; Douglas, D.J. ; Doucette, G.J. ; Léger, C. (1995). Enhancement of domoic acid production by reintroducing bacteria to axenic cultures of the diatom *Pseudo-nitzschia multiseries*. *Nat. Toxins* 3, 428-435.
- Bates, S.S.; Léger, C.; Smith, K.M. (1996). Domoic acid production by the diatom *Pseudo-nitzschia multiseries* as a function of division rate in silicium-limited chemostat culture, p. 163-166. In: *Harmful and Toxic Algal Blooms* (Yasumoto T., Oshima Y., Fukuyo Y., eds). Intergov. Oceanogr. Comm., UNESCO, Paris.
- Bates, S.S.; Richard, J. (1996). Domoic acid production and cell division by *P. multiseries* in relation to a dark:light cycle in silicate-limited chemostat culture. In: Penney, R. (Eds).

Proceedings of the Fifth Canadian Workshop on Harmful Marine Algae. Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci. 2138, pp. 140-143.

Bates, S.S. (1998). *Ecophysiology and metabolism of ASP toxin production*, p. 405-426. In: D.M. Anderson, A.D. Cembella, and G.M. Hallegraeff (éds.). *Physiological ecology of harmful algal blooms*. Springer-Verlag, Heidelberg. ISBN-10: 3540641173.

Bates, S.S.; Garrison, D.L.; Horner, R.A. (1998). *Bloom dynamics and physiology of domoic-acid-producing Pseudo-nitzschia species*, p. 267-292. In: D.M. Anderson, A.D. Cembella, and G.M. Hallegraeff (éds.). *Physiological ecology of harmful algal blooms*. Springer-Verlag, Heidelberg. ISBN-10: 3540641173.

Bates, S.S.; Hiltz, M.F.; Léger, C. (1999). *Domoic acid toxicity of large new cells of Pseudo-nitzschia multiseriata resulting from sexual reproduction*, p. 21-26. In: J.L. Martin and K. Haya (éds.). *Proceedings of the Sixth Canadian Workshop on Harmful Marine Algae. Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci.*

Bates, S.S.; Léger, C.; Wells, M.L.; Hardy, K. (2003). *Photodegradation of domoic acid*, p. 30-35. In: S.S. Bates (éds.): *Proceedings of the Eighth Canadian Workshop on Harmful Marine Algae. Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci.* 2498.

Bates, S.S.; Gaudet, J.; Kaczmarek, I.; Ehrman, J. M. (2004). *Interaction between bacteria and the domoic-acid-producing diatom Pseudo-nitzschia multiseriata (Hasle) Hasle; can bacteria produce domoic acid autonomously ? Harmful Algae* 3(1), 11-20.

Bates, S.S.; Trainer, V.L. (2006). *The ecology of harmful diatoms*, p. 81-93. In: E. Granéli and J. Turner (éds.) *Ecology of harmful algae. Ecological Studies*, Vol. 189. Springer-Verlag, Heidelberg. ISBN-10: 3540740090.

Beardall, J.; Mukerji, D.; Glover, H.E.; Morris, I. (1976). *The path of carbon in photosynthesis by marine phytoplankton. J. Phycol.* 12, 409-417.

Belt, S. T.; Massé, G.; Allard, W.G.; Robert, J.-M.; Rowland, S. J. (2002). *Effects of auxosporulation on distributions of C₂₅ and C₃₀ isoprenoid alkenes in Rhizosolenia setigera. Phytochemistry.* 59, 141-148.

- Belmont, L. ; Miller, D.A. (1965). The utilization of glutamine by algae. *J. Exp. Bot.* 16, 318-324.
- Bekheet, I.A. ; Syrett, P.J. (1977). Urea-degrading enzymes in algae. *Br. phycol. J.* 12, 137-143.
- Berges, J.A.; Harrison, P.J. (1995). Nitrate Reductase Activity Quantitatively Predicts the Rate of Nitrate Incorporation Under Steady State Light Limitation: A Revised Assay and Characterization of the Enzyme in Three Species of Marine Phytoplankton. *Limnology and Oceanography* 40(1), 82-93.
- Berges, J.A.; Franklin, D.J.; Harrison, P.J. (2001). Evolution of an artificial seawater medium : Improvements in enriched seawater, artificial water over the past two decades. *J. Phycol.* 37, 1138-1145.
- Berman, F.W.; Murray, T.F. (1997). Domoic acid neurotoxicity in cultured cerebral granule neurons is mediated predominantly by NMDA receptors that are activated as a consequence of excitatory amino acid release. *J. Neurochem.* 69, 693-703.
- Berman, F.W.; LePage, K.T.; Murray, T.F. (2002). Domoic acid neurotoxicity in cultured cerebellar granule neurons is controlled preferentially by the NMDA receptor Ca²⁺ influx pathway. *Brain Research* 924, 20-29.
- Besiktepe, S. ; Ryabushko, L. ; Ediger, D.; Yilmaz, D.; Zenginer, A. ; Ryabushko, V.; Lee, R. (2008). Domoic acid production by *Pseudo-nitzschia calliantha* Lundholm, Moestrup et Hasle (Bacillariophyta) isolated from the Black Sea. *Harmful Algae* 7, 438-442.
- Bhattacharyya, P. ; Volcani, B.E. (1980). Sodium-dependant silica transport in the apochlorotic marine diatom *Nitzschia alba*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77, 6386-6390.
- Bilbao, M.M.; Gabas, J.M.; Serra, J.L. (1981). Inhibition of nitrite uptake in the diatom *Phaeodactylum tricorutum* by nitrate, ammonium and some L-amino acids. *Biochemical society Transactions* 9, 476-477.

- Blanco, J.; de la Puente, M.B.; Arévalo, F.; Salgado, C. ; Moroño, Á. (2002). Depuration of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) contaminated with domoic acid. *Aquat. Living Resour.* 15, 53-60.
- Blanco, J.; Acosta, C.P.; Mariño, C. ; Muñiz, S. ; Martin, H. ; Moroño, Á. ; Correa, J. ; Arévalo, F.; Saldago, C. (2006). Depuration of domoic acid from different body compartments of the king scallop *Pecten maximus* grown in raft culture and natural bed. *Aquat. Living Resour.* 19, 257-265.
- Blanco, J. ; Livramento, F. ; Rangel, I.M. (2010). Amnesic shellfish poisoning (ASP) toxins in plankton and molluscs from Luanda Bay, Angola. *Toxicon* 55, 541-546.
- Bouillon, R.-C. ; Knierim, T.L.K. ; Kieber, R.J. ; Skrabal, S.A. ; Wright, J.L.C. (2006). Photodegradation of the algal toxin domoic acid in natural water matrices. *Limnology and Oceanography* 51(1), 321-330.
- Bouillon, R.-C. ; Kieber, R.J. ; Skrabal, S.A. ; Wright, J.L.C. (2008). Photochemistry and identification of photodegradation products of the marine toxin domoic acid. *Marine Chemistry* 110, 18-27.
- Bouvier, F.; Rahier, A. ; Camara, B. (2005). Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids. *Progress in Lipid Research.* 44, 357-429.
- Bowler, C. *et al.* (2008). The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature* 456, 239-244.
- Bressler, S.L.; Saiyed, I.A. (1984). Detection of glutamine synthetase activity in marine phytoplankton: optimisation of the biosynthetic assay. *Marine Ecology* 14, 207-217.
- Brzezinski, M.A.; Olson, R.J.; Chisholm, S.W. (1990). Silicon availability and cell-cycle progression in marine diatoms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 67, 83-96.
- Büchi, H.; Stehen, K.; Eschenmoser A. (1964). N,N-Dimethylformamide Dineopentylacetal: a Reagent for Esterifying Carboxylic Acids with Benzyl Alcohols. *Angew. Chem. Internat. Edit.* 3, 62-63.

- Buck, K.R.; Uttal-Cooke, L.; Pilskaln, C.H.; Roelke, D.L.; Villac, M.C.; Fryxell, G.A.; Cifuentes, L.; Chavez, F.P. (1992). Autoecology of the diatom *Pseudonitzschia australis* Frenguelli, a domoic acid producer, from Monterey Bay, California. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 84, 293-302.
- Burns, J.M.; Schock, T.B.; Hsia, M.H.; Moeller, P.D.R.; Ferry, J.L. (2007). Photostability of Kainic Acid in Seawater. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 9951-9955.
- Cain, B.J. (1965). Nitrogen utilization in 38 freshwater chlamydomonad algae. *Can. J. Bot.* 43; 1367-1378.
- Calu, G. (2007). Action des éléments silicium et azote sur la production d'acide domoïque par *Pseudo-nitzschia multiseriis*. Rapport de stage de Master 2 (M.Sc Degree), 30 p.
- Campbell, A.V.; McKinnon, K.L.; Whitehead, R.F.; Skrabal, S.A.; Keiber, R.J.; Wright, J.L.C. (2004). *Transformation and photodegradation of domoic acid in seawater*, p. 150-152. In: K.A. Steidinger, J.H. Landsberg, C.R. Tomas, and G.A. Vargo (éds.). *Harmful Algae 2002*. Florida Fish and Wildlife Conservation Commission, Florida Institute of Oceanography, and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris.
- Carlisle, E.M. (1981). Silicon in Bone Formation. In : *Silicon and siliceous structures in biological systems*. Simpson, T.L. and Volcani, B.E. (eds). Springer-Verlag, Heidelberg, Berlin, pp. 69-94. ISBN-10: 0387905928.
- Casteleyn, G. ; Chepurnov, V.A.; Leliart, F.; Mann, D.G.; Bates, S.S.; Lundholm, N.; Rhodes, L.; Sabbe, K.; Vyverman, W. (2008). *Pseudo-nitzschia pungens* (Bacillariophyceae) : a cosmopolitan diatom species ? *Harmful algae* 7, 241-257.
- Castorph, H.; Kleiner, D. (1984). Some properties of a *Klebsiella pneumoniae* ammonium transport negative mutant (Amt⁻). *Arch. Microbiol.* 139, 245-247.
- Çavaş, T.; Könen, S. (2008). In vivo genotoxicity testing of the amnesic shellfish poison (domoic acid) in piscine erythrocytes using the micronucleus test and the comet assay. *Aquatic Toxicol.* 90, 154-159.

- Cembella, A.D., Todd, E. (1993). *Seafood toxins of algal origin and their control in Canada*. In: I.R. Falconer (Eds.), *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*. Academic Press : San Diego, CA, USA. ISBN-10: 0122479904.
- Cheng, T.C. (1975). Functional morphology and biochemistry of molluscan phagocytes. *A. Rev. N.Y. Acad. Sci.* 266, 343-379.
- Chow, D.T-W.; Robinson, R.J. (1953). Forms of silicate available for colorimetric determination. *Analytical Chemistry* 25, 646-648.
- Churro, C.I.; Carreira, C.C.; Rodrigues, F.J.; Craveiro, S.C.; Calado, A.J.; Casteleyn, G.; Lundholm, N. (2009). Diversity and abundance of potentially toxic *Pseudo-nitzschia* Peragallo in Aveiro coastal lagoon, Portugal and description of a new variety, *P. pungens* var. *aveirensis* var. nov. *Diatom Research* 24, 35–62.
- Clayden, J.; Knowles, F.E.; Baldwin, I.R. (2004). The synthesis of (-)-isodomoic acid C. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 2412 -2413.
- Clayden, J.; Read, B.; Hebditch, K.R. (2005). Chemistry of domoic acid, isodomoic acids, and their analogues. *Tetrahedron* 61, 5713-5724.
- Clayden, J.; Hebditch, K.R.; Read, B.; Helliwell, M. (2007). Oxidative fragmentation of bicyclic hydroxy silanes and stannanes: a strategy for the stereoselective synthesis of kainoids. *Tetrahedron Letters* 48, 8550-8553.
- Cochlan, W.P.; Herndon, J.; Kudela, R.M. (2008). Inorganic and organic nitrogen uptake by the toxigenic diatom *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae). *Harmful Algae* 8(1), 111-118.
- Collos, Y. (1982). Transient situations in nitrate assimilation by marine diatoms. III. short-term uncoupling of nitrate uptake and reduction. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 62(3), 285-295.

- Congestri, R.; Polizzano, S.; Albertano, P. (2008). *Toxic Pseudo-nitzschia populations from the Middle Tyrrhenian Sea (Mediterranean Sea, Italy)*, p. 197-210. In: V. Evangelista, L. Barsanti, A.M. Frassanito, V. Passarelli, and P. Gualtieri (éds): *Algal toxins: nature, occurrence, effect and detection*. NATO Science for Peace and Security. Series A: Chemistry and Biology. Springer Netherlands.
- Cooper, J.; Knight, D.W.; Gallagher, P.T. J. (1987). An enantiospecific total synthesis of (–)- α -kainic acid. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 16, 1220-1222.
- Costa, P.R.; Garrido, S. (2004). Domoic acid accumulation in the sardine *Sardina pilchardus* and its relationship to *Pseudo-nitzschia* diatom ingestion. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 284, 261-268.
- Cusack, C.K.; Bates, S.S.; Quilliam, M.A.; Patching, J.W.; Raine, R. 2002. Confirmation of domoic acid production by *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae) isolated from Irish waters. *J. Phycol.* 38, 1106-1112.
- Cvejić, J. H.; Rohmer, M. (2000). CO₂ as main carbon source for isoprenoid biosynthesis via the mevalonate-independent methylerythritol 4-phosphate route in the marine diatoms *Phaeodactylum tricornutum* and *Nitzschia ovalis*. *Phytochemistry.* 53, 21-28.
- Daigo, K. J. (1959). Constituents of *Chondria armata*. I. Detection of the anthelmintic constituents. *Yakugaku Zasshi* (J. Pharm Soc Jpn) 79, 350-353.
- Davidovich, N.A.; Bates, S.S. (1998). Sexual reproduction in the pinnate diatoms *Pseudo-nitzschia multiseries* and *P. pseudodelicatissima* (Bacillariophyceae). *J. Phycol* 34, 126-137.
- Darley, W.M.; Volcani, B.E. (1969). Role of silicon in diatom metabolism. A silicon requirement for deoxyribonucleic acid synthesis in the diatom *Cylindrotheca fusiformis* Reimann and Lewin. *Exp. Cell. Res.* 58, 334-342.
- Dortch, Q. (1982). Effect of growth conditions on accumulation of internal nitrate, ammonium, amino acids, and proteins in three marine diatoms. *J. exp. mar. Biol. Ecol.* 61, 243-264.

- Dortch, Q.; Clayton, J.R.; Thoresen, S.S.; Ahmed, S.I. (1984). Species differences in accumulation of nitrogen pools in phytoplankton. *Mar. biol.* 81, 237-250.
- Doucette, G.J.; Powell, C.L. (1997). *Algal-bacterial interactions: can they determine the PSP-related toxicity of dinoflagellates ?* In : VIII International conference on Harmful algae - Abstracts and Posters Classification. vp. 1997.
- Douglas, D.J.; Bates, S.S. (1992). Production of domoic acid, a neurotoxic amino acid, by the axenic culture of the marine diatom *Nitzschia pungens* f *multiseriis* Hasle. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 49, 85-90.
- Douglas, D.J.; Ramsey, U.P.; Walter, J.A.; Wright, J.L.C. (1992). Biosynthesis of the neurotoxin domoic acid by the marine diatom *Nitzschia pungens* forma *multiseriis*, determined with [13C]-labelled precursors and nuclear magnetic resonance. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1992, 714-716.
- Douglas, D.J.; Kenchington, E.R.; Bird, C.J.; Pocklington, R.; Bradford, B.; Silvert, W. (1997). Accumulation of domoic acid by the sea scallop (*Placopecten magellanicus*) fed cultured cells of toxic *Pseudo-nitzschia multiseriis*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 54, 907-913.
- Droop, M.R. (1955). Some new supra-littoral protista. *J. mar. biol. Ass. U.K.* 34, 233-245.
- Droop, M.R. (1961). *Haematococcus pluvialis* and its allies. III. Organic nutrition. *Rev. Algal.* 4, 247-259.
- Dugdale, R.C.; Goering, J.J. (1967). Uptake of new and regenerated forms of nitrogen in primary productivity. *Limnology & Oceanography* 12, 196-206.
- Dyson, K.; Huppert, D.D. (2010). Regional economic impacts of razor clam beach closures due to harmful algal blooms (HABs) on the Pacific coast of Washington. *Harmful Algae* 9(3): 264-271.
- Eppley, R.W.; Rogers, J.N.; McCarthy, J.J. (1969). Half-Saturation Constants for Uptake of Nitrate and Ammonium by Marine Phytoplankton. *Limnology and Oceanography* 14(6), 912-920.

- Ershov, Y. V.; Gantt, R. R.; Cunningham, F. X.; Gantt, E. (2002). Isoprenoid Biosynthesis in *Synechocystis* sp. Strain PCC6803 Is Stimulated by Compounds of the Pentose Phosphate Cycle but Not by Pyruvate or Deoxyxylulose-5-Phosphate. *Journal of Bacteriology*. 184(18), pp. 5045-5051.
- Fehling, J.; Green, D.; Davidson, K.; Bolch, C.J.; Bates, S.S. (2004). Domoic acid production by *Pseudo-nitzschia seriata* (Bacillariophyceae) in scottish waters. *J. Phycol.* 40, 622-630.
- Fisher, J.M.; Reese, J.G.; Pellechia, P.J.; Moeller, P.L.; Ferry, J.L. (2006). Role of Fe(III), Phosphate, Dissolved Organic Matter, and Nitrate during the Photodegradation of Domoic Acid in the Marine Environment. *Environ. Sci. Technol.* 40, 2200-2205.
- Flynn, K.J.; Syrett, P.J. (1986). Characteristics of the uptake system for L-lysine and L-arginine in *Phaeodactylum tricorutum*. *Marine Biology* 90, 151-158.
- Flynn, K.J.; Wright, C.R.N. (1986). The simultaneous assimilation of ammonium and L-arginine by the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum* Bohlin. *Journal of Experimental Marine Biology and ecology* 95, 257-269.
- Fogg, G.E. (1978). *Nitrogen fixation in the oceans*, p. 11-19. In: V. Granhall (eds.). *Algal culture : from laboratory to pilot plant*. Carnegie Institution of Washington Publication 600, Washington, DC.
- Fritz, L. ; Quilliam, M.A. ; Wright, J.L.C.; Beale, A.; Work, T.M. (1992). An outbreak of domoic acid poisoning attributed to the pennate diatom *Pseudonitzschia australis*. *J. Phycol.* 28, 439-442.
- Fryxel, G.A.; Reap, M.E.; Valenic, D.L. (1990). *Nitzschia pungens* Grunow f *multiseriis* Hasle: observations of a known neurotoxic diatom. *Beih. Nova Hedwigia* 100, 171-188.
- Fushiya, S.; Sato, S.; Kanazawa, T.; Kusano, G.; Nozoe, S. (1990). Acromelic acid C. A new toxic constituent of *Clitocybe acromelalga* : An efficient isolation of acromelic acids. *Tetrahedron Letters* 31, 3901-3904.

- Gao, Y.; Smith, J.; Alberte, R.S. (1993). Nitrate Reductase from the Marine Diatom *Skeletonema costatum*. *Plant. Physiol.* 103, 1437-1445.
- Garrison, D.L.; Conrad, S.M.; Eilers, P.P.; Waldron, E.M. (1992). Confirmation of domoic acid production by *Pseudonitzschia australis* (Bacillariophyceae) cultures. *J. Phycol.* 28, 604-607.
- Glibert, P.M.; Seitzinger, S.; Heil, C.A.; Burkholder, J.M.; Parrow, M.W.; Codispoti, L.A.; Kelly, V. (2005). The role of eutrophication in the global proliferation of harmful algae blooms. *Oceanography* 18(2), 198-208.
- Gilgan, M.W. ; Burns, B.G. ; Landry, G.J. 1990. *Distribution and magnitude of domoic acid contamination of shellfish in Atlantic Canada during 1988*. In: Toxic marine phytoplankton. Granéli E., Sundström B., Edler L. & Anderson D.M. (eds). Elsevier, New York, 469-474.
- Giordano, G.; Klintworth, H.M.; Kavanagh, T.J.; Costa, L.G. (2008). Apoptosis induced by domoic acid in mouse cerebellar granule neurons involves action of p38 and JNK MAP kinases. *Neurochemistry International* 52, 1100-1105.
- Gold, L.; Brown, D.; He, Y.-Y.; Shtatland, T.; Singer, B.S.; Wu, Y. (1997). From oligonucleotide shapes to genomic SELEX: Novel biological regulatory loops. *PNAS* 94(1), 59-64.
- Goldschmidt, V.M. (1958). *Geochemistry*. London : Oxford Univ. Press.
- Greenwood, E.S.; Hitchcock, P.B.; Parsons, P.J. (2003). Studies towards a total synthesis of kainic acid. *Tetrahedron* 59, 3307-3314.
- Guerrero, M.G.; Vega, J.; Losada, M. (1981). The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. *Annual Review of Plant Physiology* 32, 169-204.
- Guillard, R.R.L.; Ryther, J.H. (1962). Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. *Can. J. Microbiol.* 8: 229-239.

- Guillard, R.R.L. (1963). *Organic sources of nitrogen for marine centric diatoms*. In : Symposium on Marine Microbiology (Ed. by C.H. Oppenheimer) pp. 93-104. Thomas, Springfield, Illinois.
- Guillard, R.R.L. (1975) *Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates*. In : Culture of Marine Invertebrate Animals. Eds: Smith W.L. and Chanley M.H., Plenum Press, New York, USA. pp 26-60.
- Guillard, R.R.L.; Hargraves, P.E. (1993). *Stichochrysis immobilis* is a diatom, not a chrysophyte. *Phycologia* 32, 234-236.
- Hampson, D.R.; Huang, X.; Wells, J.W.; Walter, J.A.; Wright, J.L.C. (1992). Interaction of domoic acid and several derivatives with kainic acid and AMPA binding sites in rat brain. *European J. Pharmacol.* 218, 1-8.
- Hansen, H.P.; Koroleff, F. (1999). *Determination of silicon*. In : K. Grasshoff, K. Kremling, M. Ehrhardt (Eds.). Methods of seawater analysis, Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
- Hargraves, P.E.; Zhang, J.; Wang, R.; Shimizu, Y. (1993). Growth characteristics of the diatoms *Pseudonitzschia pungens* and *P. fraudulenta* exposed to ultraviolet radiation. *Hydrobiologia* 269-270(1), 207-212.
- Harrison, P.J. ; Waters, R.E.; Taylor, F.J.R. (1980). A broad spectrum artificial seawater medium for coastal and open ocean phytoplankton. *J. Phycol.* 16, 28-35.
- Harvey, H.W. (1933). On the rate of diatom growth. *Journ. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 253-276.
- Harvey, H.W. (1940). Nitrogen and phosphorus required for the growth of phytoplankton. *J. mar. biol. Ass. U.K.* 24, 115-123.
- Hashimoto, K.; Horikawa, M.; Shirahama, H. (1990). Simple analogs of acromelic acid, which are highly active agonists of kainate type neuroexcitant. *Tetrahedron Letters* 31, 7047-7050.

- Hasle, G.R. (1965). *Nitzschia* and *Fragilariopsis* species studied in the light and electron microscopes. II. The group *Pseudo-nitzschia*. *Skr. Norske Vidensk-Akad. I. Mat.-Nat. Km. Ny Serie* 18, 1-45.
- Hasle, G.R. (1994). *Pseudo-nitzschia* as a genus distinct from *Nitzschia* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 30, 1036-1039.
- Hasle, G.R. (1995). *Pseudo-nitzschia pungens* and *P. multiseriata* (Bacillariophyceae): nomenclatural history, morphology, and distribution. *J. Phycol.* 31, 428-435.
- Hasle, G.R.; Lange, C.B.; Syvertsen, E.E. (1996). A review of *Pseudo-nitzschia*, with special reference to the Skagerrak, North Atlantic, and adjacent waters. *Helgol. Meeresunters* 50, 131-175.
- Hasle, G.R. (2002). Are most of the domoic acid producing species of the diatom genus *Pseudo-nitzschia* cosmopolites? *Harmful Algae* 1, 137-146.
- Hatakeyama, S.; Sugawara, K.; Takano, S. (1993). Stereocontrolled construction of substituted pyrrolidines based on intramolecular protodesilylation reaction. Enantiospecific synthesis of (-)-kainic acid and (+)-allokainic acid from L-serine. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 2, 125-127.
- Hatte, C.Y.; Hodgins, G.; Jull, T.; Bishop, B.; Tesson, B. (2008). Marine chronology based on ¹⁴C dating on diatom proteins. *Mar. Chem.* 109(1-2), 143-151.
- Hellebust, J.A. ; Guillard, R.R.L. (1967). Uptake specificity for organic substrates by the marine diatom *Melosira nummuloides*. *J. Phycol.* 3, 132-136.
- Hellebust, J.A.; Lewin, J. (1977). *Heterotrophic nutrition*. In: *The Biology of Diatoms* (Ed. by D. Werner), pp. 169-197. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Hellebust, J.A. (1978). Uptake of organic substrates by *Cyclotella cryptica* (Bacillariophyceae): effects of ions, ionophores and metabolic and transport inhibitors. *Journal of Phycology* 14, 79-83.

- Hildebrand, M.; Dahlin, K.; Volcani, B.E. (1998). Characterization of a silicon transporter gene family in *Cylindrotheca fusiformis*: Sequences, expression analysis, and identification of homologs in other diatoms. *Molecular and General Genetics* 260, 480-486.
- Hildebrand, M.; Dahlin, K. (2001). Nitrate transporter genes from the diatom *Cylindrotheca fusiformis* (Bacillariophyceae) : mRNA levels controlled by nitrogen source and by cell cycl. *J. Phycol.* 36(4), 702-713.
- Hildebrand, M. (2005). Cloning and functional characterization of ammonium transporters from the marine diatom *Cylindrotheca fusiformis* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 41(1), 105-113.
- Hillebrand, H.; Sommer, U. (1996). Nitrogenous nutrition of the potentially toxic diatom *Pseudonitzschia pungens* f. *multiseries* Hasle. *J. Plank. Res.* 18, 295-301.
- Holland, P.T.; Selwood, A.I.; Mountfort, D.O.; Wilkins, A.L.; McNabb, P.; Rhodes, L.L.; Doucette, G.J.; Mikulski, C.M.; King, K.L. (2005). Isodomoic Acid C, an Unusual Amnesic Shellfish Poisoning Toxin from *Pseudo-nitzschia australis*. *Chem. Res. Toxicol.* 18, 814-816.
- Horner, R.A.; Hanson, L.; Hatfield, C.L.; Newton, J.A. (1996). Domoic acid in Hood Canal, Washington, USA. In : Yasumoto, T.; Oshima, Y.; Fukuyo, Y. (éds.) Harmful and Toxic Algal Blooms, Intergov. Oceanogr. Comm., UNESCO, Paris, pp. 127-129.
- Horrigan, S.G.; McCarthy, J.J. (1982). Phytoplankton uptake of ammonium and urea during growth on oxidized forms of nitrogen. *Journal of Plankton Research*, 4(2), 379-389.
- Howard, M.D.A; Cochlan, W.P.; Ladizinsky, N.; Kudela, R.M. (2007). Nitrogenous preference of toxigenic *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae) from field and laboratory experiments. *Harmful Algae* 6(2), 206-217.
- Ifremer. (2003). Guide pour des toxines amnésiantes (ASP). [En ligne] http://www.ifremer.fr/envlit/pdf/rephypdf/REPHY0305_guide ASP.pdf

- Impellizzeri, G.; Mangiafico, S.; Oriente, G.; Piatelli, M.; Sciuto, S.; Fattorusso, E.; Magno, S.; Santacroce, S.; Sica, D. (1975). Amino acids and low-molecular-weight carbohydrates of some marine red algae. *Phytochemistry* 14, 1549-1557.
- Jackson, A.E.; Ayer, S.W.; Laycock, M.V. (1992). The effect of salinity on growth and amino acid composition in the marine diatom *Nitzschia pungens*. *Can. J. Bot.* 70, 2198-2201.
- Jeffery, B.; Barlow, K. T.; Paul, S.M.; Boyle, C. (2004). Amnesic shellfish poison. *Food Chem. Toxicol.* 42, 545-557.
- Jeffryes, C.; Gutu, T.; Jiao, J.; Rorrer, G.L. (2008). Two-stage photobioreactor process for the metabolic insertion of nanostructured germanium into the silica microstructure of the diatom *Pinnularia sp.* *Materials Science and Engineering: C* 28(1), 107-118.
- Jones T.O. ; Whyte, J.N.C. ; Townsend, L.D.; Ginther, N.G.; Iwama, G.K. (1995). Effects of domoic acid on haemolymph, pH, pCO₂ and pO₂ in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* and the California mussel, *Mytilus californianus*. *Aquat. Toxicol.* 31, 43-55.
- Jolley, E.T.; Hellebust, J.A. (1974). Preliminary studies on the nutrition of *Navicula pelliculosa* (Breb.) Hilse, and an associated bacterium, *Flavobacterium sp.* *Journal of Phycology* 10(suppl.); 7 (abstract).
- Jolly, W.L. (1966). *The chemistry of the non-metals* (1st Edition). Englewood Cliffs, New Jersey; Prentice-Hall, Inc.
- Jones, T.O.; Whyte, J.N.C.; Ginther, N.G.; Townsend, L.D.; Iwama, G.K. (1995). Haemocyte changes in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, caused by exposure to domoic acid in the diatom *Pseudo-nitzschia pungens* f. *multiseriata*. *Toxicon* 33, 347-353
- Kaniou-Grigoriadou, I. ; Mouratidou, T. ; Katikou, P. (2005). Investigation on the presence of domoic acid in Greek shellfish. *Harmful Algae*, 4:717-723.
- Kirk, D.L.; Kirk, M.M. (1978). Carrier-mediated Uptake of Arginine and Urea by *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant. Physiol.* 61, 556-560.

- Klein, C. ; Claquin, P. ; Bouchard, V. ; Le Roy, B. ; Véron, B. (2010). Dynamics of *Pseudo-nitzschia* spp. And domoic acid production in a macrotidal ecosystem of the Eastern English Channel (Normandy, France). *Harmful Algae* 9:218-226.
- Knutsen, G. (1972). Uptake of uracil by synchronous *Chlorella vulgaris*. *FEBS Letters* 38, 16-18.
- Konno, K; Shirahama, H; Matsumoto, Y. (1983). Isolation and structure of acromelic acid A and B. New kainoids of *Clitocybe acromelalga*. *Tetrahedron Letters* 24, p. 939-942.
- Koroleff, F. (1969). Direct determination of ammonia in natural waters as indophenol blue. ICES C.M. 1969/C: 9. *Hydrol. Commun.*, p. 4.
- Koroleff, F. (1972). Determination of reactive silicate. *Cooperative Res. Rep. IGES Series A* 29, 87-90.
- Koroleff, F. (1983). *Determination of urea*. In : K. Grasshoff, M. Ehrhardt, and K. Kremling (éds.), *Methods of seawater analysis*. Verlag Chemie, p. 158-162. ISBN-10: 3527295895.
- Kotaki, Y.; Lundholm, N.; Onodera, H.; Kobayashi, K.; Bajarias, A. F. F.; Furio, E.; Iwataki, M.; Fukuyo, Y.; Kodoma, M. (2004). Wide distribution of *Nitzschia navis-varingica*, a new domoic acid-producing benthic diatom found in Vietnam. *Fisheries Sc* 70, 28-32.
- Kröger, N. (2007). Prescribing diatom morphology: toward genetic engineering of biological nanomaterials. *Current Opinion in Chemical Biology* 11, 662-669.
- Laflamme, M.Y. (1993). Contrôle de la croissance et de la production d'acide domoïque par la diatomée *Pseudo-nitzschia pungens* forma *multiseriis* en cultures continues. M. Sc. Thesis, Univ. of Moncton, Moncton, New Brunswick, Canada, 141 p.
- Lapworth, C.J.; Hallegraeff, G.M.; Ajani, P.A. (2001). *Identification of domoic-acid producing Pseudo-nitzschia species in Australian waters*, p. 38-41. In: G.M. Hallegraeff, S.I. Blackburn, C.J. Bolch, and R.J. Lewis [eds.] *Harmful Algal Blooms 2000*. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris.

- Lassus, P. ; Marcaillou-Le Baut, C. (2001) *Contamination, transformation et détoxification des produits marins*. In: Toxines d'algues dans l'alimentation. Fremy J.-M & Lassus P. (coord), éd.. Ifremer, 403-446. ISBN-10: 2844330525.
- Lawrence, J.F.; Charbonneau, C.F.; Menard, C.; Quilliam, M.A.; Sim, P.G. (1989). Liquid chromatographic determination of domoic acid in shellfish products using the paralytic shellfish poison extraction procedure of the Association of Official Analytical Chemists. *Journal of chromatography* 462, 349-356.
- Laycock, M.V.; de Freitas, A.S.W.; Wright, J.L.C. (1989). Glutamate agonists from marine algae. *Journal of Applied Phycology* 1(2), 113-122.
- Lebour, M. V. (1930). *The Planktonic Diatoms of Northern Seas*, p. 213-214. Ed. Dulau & Co., Londres.
- Lee, J.H.; Baik, J.H. (1997). Neurotoxin-producing *Pseudonitzschia multiseriis* (Hasle) Hasle, in the coastal waters of Southern Korea. II. Production of domoic acid. *Algae (Korean J. Phycol.)* 12, 31-38.
- Lefebvre, K.A. ; Powell, C.L.; Busman, M.; Doucette, G.L.; Moeller, P.D.R.; Silver, J.B.; Miller, P.E.; Hughes, M.P.; Singaram, S.; Silver, M.W.; Tjeerdema, R.S. (1999). Detection of domoic acid in northern anchovies and California sea lions associated with an unusual mortality event. *Natural Toxins*, 7 (3), 85-92
- Lefebvre, K.A.; Bargu, S.; Kieckhefer, T.; Silver, M.W. (2002). From sanddabs to blue whales: the pervasiveness of domoic acid. *Toxicon* 40, 971-977.
- Lewin, J.C. (1966). Silicon metabolism in diatoms. V. Germanium dioxide, a specific inhibitor of diatom growth. *Phycologia*, 6:1-12.
- Lewin, J.; Hellebust, J.A. (1978). Utilization of glutamate and glucose for heterotrophic growth by the marine pennate diatom *Nitzschia laevis*. *Marine Biology* 47, 1-7.
- Lewis, N.I.; Bates, S.S.; McLachlan, J.L.; Smith, J.C. (1993). *Temperature effects on growth, domoic acid production and morphology of the diatom Nitzschia pungens f. multiseriis*. In:

- Smayda, T.J. & Shimizu, Y. (Eds). Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea, Elsevier, Amsterdam, pp. 601-606.
- Liu, M.S.; Hellebust, J.A. (1974a). Uptake of amino acids by the marine centric diatom *Cyclotella cryptica*. *Canadian Journal of Microbiology* 20, 1109-1118.
- Liu, M.S.; Hellebust, J.A. (1974b). Utilization of amino acids as nitrogen sources, and their effects on nitrate reductase in the marine diatom *Cyclotella cryptica*. *Canadian Journal of Microbiology* 20, 1119-1125.
- Lowenstam, H.A. (1981). Minerals formed by organisms. *Science* 211, 1126-1131.
- Lu, M.; Stephens, G.C. (1984). Demonstration of net influx of free amino acids in *Phaeodactylum tricornutum* using high performance liquid chromatography. *Journal of Phycology* 20, 584-589.
- Lund, B.Aa. (1987). Mutual interference of ammonium, nitrate and urea on uptake of ¹⁵N sources by the marine diatom *Skeletonema costatum* (Grev.) Cleve. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 113, 167-180.
- Lundholm, N.; Skov, J.; Pocklington, R.; Moestrup, Ø. (1994). Domoic acid, the toxic amino acid responsible for amnesic shellfish poisoning, now in *Pseudonitzschia seriata* (Bacillariophyceae) in Europe. *Phycologia* 33, 475-478.
- Lynch, V.H.; Gillmor, G.G. (1966). Utilization of glutamine and glutamic acid by *Chlorella pyrenoidosa*. *Biochim. Biophys. Acta* 115, 253-259.
- McCarthy, J.J. (1970). A urease method for urea in seawater. *Limnology & Oceanography* 15, 309-313.
- McCarthy, J.J. (1972). The uptake of urea by marine phytoplankton. *J. Phycol.* 8, 216-222.
- MacPhee, D.J.; Hanic, L.A.; Friesen, D.L.; Sims, D.E. (1992). Morphology of the toxin-producing diatom *Nitzschia pungens* Grunow forma *multiseries* Hasle. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 49, 303-311.

- Madhyastha, M.S.; Novaczek, I.; Ablett, R.F.; Johnson, G.; Nijjar, M.S.; Sims, D.E. (1991). A comparative study of uptake and release of glutamic and kainic acid by blue mussel (*Mytilus edulis* L.) *Aquat. Toxicol.* 21, 15-28.
- Maeda, M.; Kodama, T.; Tanaka, T.; Ohfune, Y.; Nomoto, K.; Nishimura, K.; Fujita, T. (1984). Insecticidal and neuromuscular activities of domoic acid [isolated from seaweed, *Chondria armata*] and its related compounds [on cockroaches and houseflies]. *J. Pestic. Sci.* 9(1), 27-32.
- Maeda, M.; Kodama, T.; Tanaka, T.; Yoshizumi, H.; Takemoto, T.; Nomoto, K.; Fujita, T. (1986). Structures of isodomoic acids, A,B, and C, novel insecticidal amino acids from the red alga *Chondria armata*. *Chem. Pharm. Bull.* 34(11), 4892-4895.
- Maeda, M.; Kodama, T.; Tanaka, T.; Yoshizumi, H.; Takemoto, T.; Nomoto, K.; Fujita, T. (1987). Structures of domoic lactone A and B, novel amino acids from the red alga, *Chondria armata*. *Tetrahedron Letters* 28, 633-636.
- Maldonado, M.T.; Price, N.M. (1996). Influence of N substrate on Fe requirements of marine centric diatoms. *Marine Ecology Progress Series* 141, 161-172.
- Marangoni, C.; Pienaar, R.N.; Sym, S.D.; Pitcher, G.C. (2001). *Pseudo-nitzschia australis* Frenguelli from Lambert's Bay South Africa. *Microscopy Society of Southern Africa – Proceedings* 31, 53.
- Marchetti, A.; Lundholm, N.; Kotaki, Y. ; Hubbard, K. ; Harrison, P.J. ; Ambrust, E.V. (2008). Identification and assessment of domoic acid production in oceanic *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) from iron-limited waters in the northeast subarctic Pacific. *J. Phycol.* 44, 650-661.
- Martin, J.L.; Haya, K.; Burrige, L.E.; Wildish, D.J. (1990). *Nitzschia pseudodelicatissima* – a source of domoic acid in the Bay of Fundy, eastern Canada. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 67, 177-182.

- Martin-Jézéquel, V.; Poulet, S.A. ; Harris, R.P. ; Moal, J. ; Samain, J.F. (1988). Interspecific and intraspecific composition and variation of free amino acids in marine phytoplankton. *Marine Ecology* 44, 303-313.
- Martin-Jézéquel, V.; Hildebrand, M.; Brzezinski, M.A. (2000). Silicon metabolism in diatoms : implications for growth. *J. Phycol.* 36(5), 821-840.
- Martin-Jézéquel, V.; Lopez, P.J. (2003). *Silicon – a central metabolite for diatom growth and morphogenesis*. In: Muller, W.E.G. (éds), *Silicon biomineralization:biology, biochemistry, biotechnology* (Progress in molecular and subcellular biology), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 99-124.
- Massé, G.; Belt, S.T.; Rowland, S.J. (2004). Biosynthesis of unusual monocyclic alkenes by the diatom *Rhizosolenia setigera* (Brightwell). *Phytochemistry*. 65, 1101-1106.
- Matteson, D.S.; Singh, R.P.; Lu, J.; Yang, J.; Pharazyn, P.S. (2000). Asymmetric synthesis of trisubstituted pyrrolidines via boronic esters. *Polyhedron* 19, 587-589.
- Mazmanci, B; Çava, T. (2010). Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in liver and gill tissues of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following in vivo exposure to domoic acid. *Toxicon* 55, 734-738.
- McCarthy, J.J. (1970). A urease method for urea in seawater. *Limnology & Oceanography* 15, 309-313.
- McGerr, E.G.; Olney, J.W.; McGeer, P.L., Eds. *Kainic Acid as a Tool in Neurobiology*, Editions Raven Press, New York, 1978, 271 p. ISBN-10: 0890042799
- Menezes Rangel, I.; Silva, S. (2007). *Pseudo-nitzschia* spp. and *Prorocentrum micans* blooms in Luanda Bay, Angola. *Harmful Algae News* 33:8-9.
- Mifflin, B.J.; Lea, P.J. (1976). The pathway of nitrogen assimilation in plants. *Phytochemistry* 15, 873-885.

- Miguez, A.; Fernandez, M.L.; Fraga, S. (1996). First detection of domoic acid in Galicia (NW of Spain). In : Yasumoto, T.; Oshima, Y.; Fukuyo, Y. (éds.) Harmful and Toxic Algal Blooms, Intergov. Oceanogr. Comm., UNESCO, Paris, pp. 143-145.
- Milligan, A.J.; Harrison, P.J. (2000). Effects of non-steady-state iron limitation on nitrogen assimilatory enzymes in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 36(1), 78-86.
- Mobley, H.L.; Hausinger, R.P. (1989). Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization. *Microbiol Mol Biol Rev.* 53(1), 85-108.
- Molloy, C.J.; Syrett, P.J. (1988). Interrelationships between uptake of urea and uptake of ammonium by microalgae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 118, 85-95.
- Monn, J.A.; Valli, M.J. (1994). A Concise, Stereocontrolled Thiazolium Ylide Approach to Kainic Acid. *J. Org. Chem.* 59(10), 2773-2778.
- Morel, F.M.M. ; Rueter, J.G. ; Anderson, D.M. ; Guillard, R.R.L. (1979). Aquil : a chemically defined phytoplankton culture medium for trace metal studies. *J. Phycol.* 15, 131-141.
- Mullin, J.B.; Riley, J.P. (1955a). The colorimetric determination of silicate with special reference to sea and natural waters. *Analytica Chimica Acta* 12, 162-176.
- Mullin, J. B.; Riley, J. P. (1955b). The spectrophotometric determination of silicate—silicon in natural waters with special reference to sea water. *Analytica Chimica Acta* 12, 464–480.
- Murakami, S.; Takemoto, T.; Shimizu, Z. (1953). Studies on the effective principles of *Diogenea simplex* Aq. I: Separation of the effective fraction by liquid chromatography. *J. Pharm. Soc. Jpn* 73, p. 1026-1028.
- Nanao, M.H.; Green, T.; Stern-Bach, Y.; Heinemann, S.F.; Choe, S. (2005). Structure of the kainate receptor subunit GluR6 agonist-binding domain complexed with domoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102, 1708-1713.

- Neilson, A.H.; Larsson, T. (1980). The utilization of organic nitrogen for growth of algae : physiological aspects. *Physiologica Plantarum* 48, 542-553.
- Novaczek, I.; Madhyastha, M.S.; Ablett, R.F.; Donald, A.; Johnson, G.; Nijjar, M.S.; Sims, D.E. (1991). Uptake, deposition and depuration of domoic acid by blue mussels (*Mytilus edulis*). *Aquatic Toxicology*, 21, 103-118.
- Novaczek, I.; Madhyastha, M.S.; Ablett, R.F.; Donald, A.; Johnson, G.; Nijjar, M.S.; Sims, D.E. (1992). Depuration of Domoic Acid from Live Blue Mussels (*Mytilus edulis*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 49(2), 312–318.
- Novelli, A.; Fernandez-Sanchez, M.T.; Kispert, J.; Torreblanca, A. ; Gascon, S. ; Zitko, V. (1992). The amnesic shellfish poison domoic acid enhances neurotoxicity by excitatory amino acids in cultured neurons. *Amino Acids* 2, 233-244.
- Ohfuné, Y.; Tomita, M. (1982). Total synthesis of (-)-domoic acid. A revision of the original structure. *J. Am. Chem. Soc.* 104, 3511-3513.
- Orlova, T.Y.; Stonik, I.V.; Aizdaicher, N.A.; Bates, S.S.; Léger, C.; Fehling, J. (2008). Toxicity, morphology and distribution of *Pseudo-nitzschia calliantha*, *P. multistriata* and *P. multiseriata* (Bacillariophyta) from the northwestern Sea of Japan. *Botanica Marina* 51, 297-306.
- Oppolzer, W.; Thirring, K. (1982). Enantioselective synthesis and absolute configuration of (-)- α -kainic acid. *J. Am. Chem. Soc.* 104(18), 4978-4979.
- Osada, M.; Stewart, J.E. (1997). Gluconic acid/gluconolactone: physiological influences on domoic acid production by bacteria associated with *Pseudo-nitzschia multiseriata*. *Aquatic Microbial Ecology* 12, 203-209.
- Palenik, B.; Morel, F.M.M. (1991). Amine Oxidases of Marine Phytoplankton. *Appl. environ. Microbiol.* 57(8), 2440-2443.

- Pan, Y. (1994). Production of domoic acid, a neurotoxin, by the diatom *Pseudonitzschia pungens* f. *multiseriis* Hasle under phosphate and silicate limitation. Ph.D. Thesis, Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia, Canada. 245 p.
- Pan, Y.; Subba Rao, D.V.; Mann, K.H.; Brown, R.G.; Pocklington, R.. (1996a). Effects of silicate limitation on production of domoic acid, a neurotoxin, by the diatom *Pseudonitzschia pungens* f. *multiseriis* (Hasle). I. Batch culture studies. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 131, 225-233.
- Pan, Y.; Subba Rao, D.V.; Mann, K.H.; Brown, R.G.; Pocklington, R. (1996b). Effects of silicate limitation on production of domoic acid, a neurotoxin, by the diatom *Pseudonitzschia pungens* f. *multiseriis* (Hasle). II. Continuous culture studies. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 131, 235-243.
- Pan, Y.; Subba Rao, D.V.; Mann, K.H. (1996c). Changes in domoic acid production and cellular chemical composition of the toxigenic diatom *Pseudo-nitzschia multiseriis* under phosphate limitation. *J. Phycol.* 32, 371-381.
- Parrish, C.C.; de Freitas, A.S.W.; Bodennec, G.; MacPherson, E.J.; Ackman, R.G. (1991). Lipid composition of the toxic marine diatom, *Nitzschia pungens*. *Phytochemistry* 30, 113-116.
- Parsons, A.F. (1996). Recent developments in kainoid amino acid chemistry. *Tetrahedron* 52, 4149-4174.
- Parsons, M.L.; Dortch, Q.; Turner, R.E. (2002). Sedimentological evidence of an increase in *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) abundance in response to coastal eutrophication. *Limnology & Oceanography* 47(2), 551-558.
- Parsons, T.R.; Takahashi, M.; Hargrave, B. (1977). Biological oceanographic processes, 2nd ed. Pergamon Press, Oxford, New York.
- Peers, G.S.; Milligan, A.J.; Harrison, P.J. (2001). Assay optimization and regulation of urease activity in two marine diatoms. *J. Phycol.* 36(3), 523-528.

- Peragallo, H.; Peragallo, M. (1897–1908). *Diatomées marines de France et des districts maritimes voisins*. Ed. MJ Tempère, Grez-sur-Loing, France.
- Perl, T.M.; Bédard, L.; Kosatsky, T.; Hockin, J.C.; Todd, E.; Remis, R.S. (1990). An outbreak of toxic encephalopathy caused by eating mussels contaminated with domoic acid. *N. Engl. J. Med.* 322, 1775-1780.
- Piñeiro, N.; Leão, J.M.; Martínez, A.G.; Vázquez, J.A.R. (1999). Capillary electrophoresis with diode array detection as an alternative analytical method for paralytic and amnesic shellfish toxins. *J. Chromatogr. A* 847(1-2), 223-232.
- Portoghese, P.S.; Turcotte, J.G. (1971). Bicyclic bases : Synthesis and nuclear magnetic resonance investigation of some chiral 2-oxa-5-azabicyclo[2.2.1]Heptane derivatives. *Tetrahedron* 27, 961–967.
- Price, N.M.; Harrison, P.J. (1988). Uptake of urea C and urea N by the coastal marine diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Limnology and Oceanography*. 33, 528-537.
- Price, N.M. ; Harrison, G.L. ; Hering, J.G. ; Hudson, R.J. ; Nirel, P.M. ; Palenik, B. ; Morel, F.M.M. (1989). Preparation and chemistry of the artificial algal culture medium *Aquil*. *Biol. Oceanogr.* 6, 443-461.
- Quijano-Scheggia, S.; Garcés, E.; Flo, E.; Fernandez-Tejedor, M. ; Diogène, J.; Camp, J. (2008). Bloom dynamics of the genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) in two coastal bays (NW Mediterranean Sea). *Scientia Marina* 72(3), 577-590.
- Rabasso, N. (2006). Généralités, études des grandes fonctions et méthodes spectroscopiques. In : *Chimie organique. Tome 1*. Editions deBoeck Universités, 368 p. ISBN-10 : 2-8041-5210-3.
- Ramsey, U.P.; Douglas, D.J.; Walter, J.A.; Wright, J.L.C. (1998). Biosynthesis of domoic acid by the diatom *Pseudo-nitzschia multiseriata*. *Natural Toxins* 6, 137-146.
- Raven, J.A. (1980). Nutrient transport in microalgae. *Adv. Microb. Physiol.* 21, 47-226.

- Raven, J.A.; Wollenweber, B.; Handley, L.L. (1992). A Comparison of Ammonium and Nitrate as Nitrogen Sources for Photolithotrophs. *New Phytologist* 121(1), 19-32.
- Rees, T.A.V.; Syrett, P.J. (1979). The uptake of urea by the diatom, *Phaeodactylum*. *New Phytol.* 82, 169-178.
- Rhodes, L.; White, D.; Syhre, M.; Atkinson, M. (1996). *Pseudo-nitzschia* species isolated from New Zealand coastal waters: domoic acid production *in vitro* and links with shellfish toxicity. In : Yasumoto, T.; Oshima, Y.; Fukuyo, Y. (éds.) Harmful and Toxic Algal Blooms, Intergov. Oceanogr. Comm., UNESCO, Paris, pp. 155-158.
- Robert, J.-M. (1982). Fertilité des eaux des claires ostréicoles et verdissement : utilisation de l'azote par les diatomées dominantes. Thèse de Doctorat, Université de Nantes, 281 p.
- Rodier, M. (1984). Perturbation dans la nutrition azotée chez une diatomée marine (*Chaetoceros affinis* Lauder Hustedt). Effets sur différentes étapes de la voie métabolique de l'azote minéral : absorption, accumulation et assimilation. Thèse de Doctorat, Université Pierre et Marie Curie (Paris 6^{ème}), 131 p.
- Romero, M.L.J.; Kotaki, Y.; Lundholm, N.; Thoha, H.; Ogawa, H.; Relox, J.R.; Terada, R.; Takeda, S.; Takata, Y.; Haraguchi, K.; Endo, T.; Lim, P.-T.; Kodama, M.; Fukuyo, Y. (2011). Unique amnesic shellfish toxin composition found in the South East Asian diatom *Nitzschia navis-varingica*. *Harmful Algae* 10, 456-462.
- Round, F.E.; Crawford, R.M.; Mann, D.G. (1990). *The diatoms : Biology and morphology of the genera*. Cambridge University press, Cambridge, 758 p. ISBN-10: 0521363187.
- Rowland, S. J.; Allard, W. G.; Belt, S. T.; Massé, G.; Robert, J.-M.; Blackburn, S.; Frampton, D.; Revill, A.T.; Volkman, J.K. (2001). Factors influencing the distributions of polyunsaturated terpenoids in the diatom, *Rhizosolenia setigera*. *Phytochemistry* 58, 717-728.
- Ruiz, N. ; Petit, K. ; Vansteelandt, M. ; Kerzaon, I.; Baudet, J.; Amzil, Z.; Biard, J.-F.; Grovel, O.; Pouchus, Y.F. (2010). Enhancement of domoic acid neurotoxicity on Diptera larvae bioassay by marine fungal metabolites. *Toxicon* 55, 805-810.

- Sato, M. ; Nakano, T. ; Takeuchi, M. ; Nagahisa, E.; Sato, Y. (1996). Distribution of neuroexcitatory amino acids in marine algae. *Phytochemistry* 42, 1595-1597.
- Sahraoui, I.; Sakka, A.H.; Bates, S.S. (2006). First detection of toxic *Pseudo-nitzschia calliantha* in Bizerte Lagoon, Tunisia. *Harmful Algae News* 30, 8-9.
- Sauer, N. (1984). A general amino acid permease is inducible in *Chlorella vulgaris*. *Planta* 161, 425-431.
- Sawant, P.M.; Weare, B.A.; Holland, P.T.; Selwood, A.I.; King, K.L.; Mikulski, C.M.; Doucette, G.J.; Mountfort, D.O.; Kerr, D.S. (2007). Isodomoic acids A and C exhibit low KA receptor affinity and reduced in vitro potency relative to domoic acid in region CA1 of rat hippocampus. *Toxicon* 50, 627-638.
- Sayce, K.; Horner, R.A. (1996). *Pseudo-nitzschia* spp. In Willapa Bay, Washington, 1992 and 1993. In : Yasumoto, T.; Oshima, Y.; Fukuyo, Y. (éds.) Harmful and Toxic Algal Blooms, Intergov. Oceanogr. Comm., UNESCO, Paris, pp. 131-134.
- Schell, R.W. (1974). Uptake and regeneration of free amino acids in marine waters of Southeast Alaska. *Limnology & Oceanography* 19, 260-270.
- Schnetzer, A.; Miller, P.E.; Schaffner, R.A.; Stauffer, B.A.; Jones, B.H.; Weisberg, S.B.; DiGiacomo, P.M.; Berelson, W.; Caron, D.A. (2007). Blooms of *Pseudo-nitzschia* and domoic acid in the San Pedro Channel and Los Angeles harbor areas of the Southern California Bight, 2003-2004. *Harmful Algae* 6, 372-387.
- Schwarz, R.; Wolf, M.; Müller, T. (2009). A probabilistic model of cell size reduction in *Pseudo-nitzschia delicatissima* (Bacillariophyta). *Journal of Theoretical Biology* 258, 316-322.
- Serra, J.L.; Llama, M.J., Cadenas, E. (1978a). Nitrate Utilization by the Diatom *Skeletonema costatum*. I. Kinetics of Nitrate Uptake. *Plant Physiol* 62, 987-990.
- Serra, J.L.; Llama, M.J., Cadenas, E. (1978b). Nitrate Utilization by the Diatom *Skeletonema costatum*. II. Regulation of Nitrate Uptake. *Plant Physiol* 62, 991-994.

- Serra, J.L. ; Llama, M.J. ; Cadenas, E. (1978c). Characterization of the nitrate reductase activity in the diatom *Skeletonema costatum*. *Plant Sci. Lett.* 13, 41-48.
- Séguineau, C.; Batrel, Y.; Martin-Jézéquel, V. ; Le Gal, Y. (1987). La glutamine synthétase et l'assimilation de l'azote minéral chez *Dunaliella primolecta*. *Oceanis* 13, 515-520.
- Shimizu, Y.; Gupta, S.; Masuda, K.; Walker, C.K.; Wang, R. (1989). Dinoflagellate and other microalgal toxins: chemistry and biochemistry. *Pure Appl. Chem.* 61, 513-516.
- Sholin, C.A. ; Gulland, F. ; Doucette, G.J.; Benson, S.; Busman, M.; Chavez, F.P.; Cordaro, J.; DeLong, R.; De Vogelaere, A. ; Harvey, J. ; Haulena, M. ; Lefebvre, K. ; Lipscom, T. ; Loscutoff, S. ; Lowenstine, L.J. ; Marin III R. ; Miller P.E. ; McLellan, W.A. ; Moeller, P.D.R. ; Powell, C.R. ; Rowles, T. ; Silvagni, P. ; Silver, M. ; Spraker, T. ; Trainer, V. ; Van Dolah, F.M. (2000). Mortality of sea lions along the central California coast linked to a toxic diatom bloom. *Nature* 403:80-84.
- Sierra Beltrán, A.; Palafox-Uribe, M. ; Grajales-Montiel, J. ; Cruz-Villacorta, A. ; Ochoa, J.L. (1997). Sea bird mortality at Cabo San Lucas, Mexico: evidence that toxic diatom blooms are spreading. *Toxicon* 35, 447-453.
- Silva, E. S. (1982). Relationship between dinoflagellates and intracellular bacteria. *Mar. Algae Pharmac. Sci.* 2, 269-88.
- Silvagni, P.A. ; Lowenstine, L.J. ; Spraker, T. ; Lipscomb, T.P. ; Gulland, F.M.. (2005). Pathology of domoic acid toxicity in California sea lions (*Zalophus californianus*). *Vet. Pathol.* 42, 184-191.
- Simpson, T.L.; Volcani, B.E. (1981). *Silicon and siliceous structures in biological systems*. Springer, New York, 587 p. ISBN-10: 0387905928.
- Slawyk, G. ; Rodier, M. (1986). Glutamine synthetase activity in *Chaetoceros affinis* (Bacillariophyceae): comparison with other estimates of nitrogen utilization during nutrient perturbation. *J. Phycol.* 22:270-275.

- Sloan, P.R. ; Strickland, J.D.H. (1966). Heterotrophy of four marine phytoplankters at low substrate concentration. *J. Phycol.* 2, 29-32.
- Smil, V. (2001). *Enriching the Earth: Fritz Haber, Carl Bosh, and the Transformation of World Food*. The MIT Press, Cambridge, United Kingdom. ISBN-10: 9780262194495.
- Smith, J.C.; Cormier, R.; Worms, J.; Bird, C.J.; Quilliam, M.A.; Pocklington, R.; Angus, R.; Hanic, L. (1990). *Toxic blooms of the domoic acid containing diatom Nitzschia pungens in the Cardigan River, Prince Edward Island*. In : Granéli, E.; Sundström, B.; Edler, L.; Anderson, D.M. (eds). *Toxic Marine Phytoplankton*, Elsevier, New-York, pp. 227-232. ISBN-10: 044401523X.
- Smith, G.J.; Ladizinsky, N.; Miller, P.E. (2001). Amino acid profiles in species and strains of *Pseudo-nitzschia* from Monterey Bay California : insights into the metabolic role(s) of domoic acid. In: *Harmful Algae Blooms 2001*. Hallegraeff, G.M., Blackburn, S.I., Bolch, C.J., and Lewis, R.,J. (eds). Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO 2001.
- Solorzano, L. (1969). Determination of ammonia in natural waters by the phenol-hypochlorite method. *Limnology & Oceanography* 14, 799–801.
- Sommer, B.; Burnashev, N.; Verdoorn, T.A.; Keinanen, K.; Sakmann, B.; Seeburg, P.H. (1992). A glutamate receptor channel with high affinity for domoate and kainate. *EMBO J.* 11, 1651-1656.
- Stewart, J.E.; Marks, L.J.; Wood, C.R.; Risser, S.M.; Gray, S. (1997). Symbiotic relations between bacteria and the domoic acid producing diatom *Pseudo-nitzschia multiseries* and the capacity of these bacteria for gluconic acid/gluconolactone formation. *Aquat. Microbial. Ecol.* 12, 211-221.
- Stewart, J.E. (2008). Bacterial involvement in determining domoic acid levels in *Pseudo-nitzschia multiseries* cultures. *Aquatic Microbial Ecology* 50, 135-144.

- Subba Rao, D.V.; Quilliam, M.A.; Pocklington, R. (1988a). Domoic acid - a neurotoxic amino acid produced by the marine diatom *Nitzschia pungens* in culture. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 45, 2076-2079.
- Subba Rao, D.V.; Dickie, P.M.; Vass, P. (1988b). Toxic phytoplankton blooms in the eastern Canadian Atlantic embayments. Comm. Meeting Internat. Cons. Explor. Sea, ICES 1988/L:28 p. 1-16.
- Syrett, P.J. (1981). Nitrogen Metabolism of Microalgae. *Can. Bull Fish Aquat Sci.* 210, 182-210.
- Syrett, P.J.; Flynn, K.J.; Molloy, C.J.; Dixon, G.K.; Peplinska, A.M.; Cresswell, R.C. (1986). Effects of nitrogen deprivation on rates of uptake of nitrogenous compounds by the diatom, *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin. *New Phytologist* 102(1), 39-44.
- Syrett, P.J.; Peplinska, A.M. (1988). The effect of nickel and nitrogen deprivation on the metabolism of urea by the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *European Journal of Phycology* 23(4), 387-390.
- Takabayashi, M.; Wilkerson, F.P.; Robertson, D. (2005). Response of glutamine synthetase gene transcription and enzyme activity to external nitrogen sources in the diatom *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 41(1), 84-94.
- Takano, S.; Iwabuchi, Y.; Ogasawara, K. (1987). Concise enantioselective synthesis of acromelic acid A. *J. Am. Chem. Soc.* 109(18), 5523-5524.
- Takano, S.; Sugihara, T.; Satoh, S.; Ogasawara, K. (1988). Enantioselective synthesis of (-)-kainic acid. *J. Am. Chem. Soc.* 110(19), 6467-6471.
- Takemoto, T.; Daigo, K. (1958). Constituents of *Chondria armata*. *Chem. Pharm. Bull.* 6, 578-580.
- Tasker, R.A.R. (2002). *Domoic acid*. In: Waring, R.H.; Steventon, G.B., and Mitchell, S.C. (Eds). *Molecules of Death*, pp. 36-59. London, Imperial College Press. ISBN-10: 1860943446.

- Teitelbaum, J.S.; Zatorre, R.J.; Carpenter, S.; Gendron, D.; Evans, A.C.; Gjedde, A.; Cashman, N.R. (1990). Neurologic sequelae of domoic acid intoxication due to ingestion of contaminated mussels. *N. engl. J. med.* 322, 1781-1787.
- Tempest, D.W.; Meers, J.L.; Brown, C.M. (1970). Synthesis of glutamate in *Aerobacter aerogenes* by a hitherto unknown route. *Biochem. J.* 117, 405-407.
- Tesson, B. (2008). Mécanismes de formation, structure et composition de la paroi de deux diatomées modèles: *Phaeodactylum tricornutum* (Bohlin) et *Thalassiosira pseudonana* (Hasle et Heimdal). Thèse de Doctorat, Université de Nantes, 275 p.
- Tesson, B.; Genet, M.J.; Fernandez, V.; Degand, S.; Rouxhet, P.G.; Martin-Jézéquel, V. (2009). Surface Chemical Composition of Diatoms. *ChemBioChem* 10(12), 2011-2024.
- Thessen, A.E.; Bowers, H.A.; Stoecker, D.K. (2009). Intra- and interspecies differences in growth and toxicity of *Pseudo-nitzschia* while using different nitrogen sources. *Harmful Algae* 8(5), 792-810.
- Thessen, A.E.; Soniat, T.M.; Dortch, Q.; Doucette, G.J. (2010). *Crassostrea virginica* grazing on toxic and non-toxic diatoms. *Toxicon* 55(2-3): 570-579.
- Thomas, W.H. (1966). Surface nitrogenous nutrients and phytoplankton in the northeastern tropical pacific ocean. *Limnology & Oceanography* 11, 393-400.
- Todd, E.C.D. (1993). Domoic acid and Amnesic Shellfish Poisoning - a review. *Journal of Food Protection* 56, 69-83.
- Tombelli, S.; Minunni, M.; Mascini, M. (2005). Analytical applications of aptamers. *Biosensors and Bioelectronics* 20(12), 2424-2434.
- Trainer, V.E.; Bill, B.D. (2004). Characterization of a domoic acid binding site from Pacific razor clam. *Aquatic toxicology* 69(2), 125-132.

- Trainer, V.L.; Wells, M.L.; Cochlan, W.P.; Trick, C.G.; Bill, B.D.; Baugh, K.A.; Beall, B.F.; Herndon, J.; Lundholm, N. (2009). An ecological study of a massive bloom of toxigenic *Pseudo-nitzschia cuspidata* off the Washington State coast. *Limnology & Oceanography* 54(5), 1461-1474.
- Turell, E.; Bresnan, E.; Collins, C.; Brown, L.; Graham, J.; Grieve, M. (2008). Detection of *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) species and amnesic shellfish toxins in Scottish coastal waters using oligonucleotide probes and the Jellet Rapid Test™. *Harmful Algae* 7, 443-458.
- Urhan, O. (1932). Beiträge zur Kenntnis der Stickstoff-assimilation von *Chlorella* und *Scenedesmus*. *Jahrb. Wiss. Bot.* 75, 1-44.
- Van de Poll, W.H.; Vrieling, E.G.; Gieskes, W.W.C. (1999). Location and expression of frustulins in the pennate diatoms *Cylindrotheca fusiformis*, *Navicula pelliculosa* and *Navicula salinarum* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 35, 1044-1053.
- Vaulot, D.; Olson, R.J.; Chisholm, S.W. (1986). Light and Dark Control of the Cell Cycle in Two Marine Phytoplankton Species. *Experimental Cell Research* 167, 38-52.
- Vaulot, D.; Olson, R.J.; Merkel, S.; Chisholm, S.W. (1987). Cell-cycle response to nutrient starvation in two phytoplankton species, *Thalassiosira weissflogii* and *Hymenomonas carterae*. *Marine Biology* 95(4), 625-630.
- Villac, M.C.; Roelke, D.L.; Chavez, F.P.; Cifuentes, L.A.; Fryxell, G.A. (1993). *Pseudo-nitzschia australis* Frenguelli and related species from the west coast of the U.S.A.: occurrence and domoic acid production. *J. Shellfish Res.* 12(2), 457-465.
- Villac, M.C.; Tenenbaum, D.R. 2001. *The coastal Pseudo-nitzschia from the state of Rio de Janeiro, Brazil*, p. 34-37. In: G.M. Hallegraeff, S.I. Blackburn, C.J. Bolch, and R.J. Lewis (éds.). *Harmful Algal Blooms 2000*. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris.
- Villareal, T.A.; Roelke, D.L.; Fryxell, G.A. (1994). Occurrence of the toxic diatom *Nitzschia pungens* f. *multiseries* in Massachusetts Bay, Massachusetts, U.S.A. *Mar. Environ. Res.* 37, 417-423.

- Vincent, W.F. (1992). The daily pattern of nitrogen uptake by phytoplankton in dynamic mixed layer environments. *Hydrobiologia* 238, 37-52.
- Vrieling, E.G.; Koeman, R.P.T.; Scholin, C.A.; Scheerman, P.; Peperzak, L.; Veenhuis, M.; Gieskes, W.W.C. (1996). Identification of a domoic acid-producing *Pseudo-nitzschia* species (Bacillariophyceae) in the Dutch Wadden Sea with electron microscopy and molecular probes. *European J. Phycol.* 31, 333-340.
- Vrieling, E.G.; Beelen, T.P.M.; van Santen, R.A.; Gieskes, W.W.C. (2002). Mesophases of (bio)polymer-silica particles inspire a model for silica biomineralization in diatoms. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 41, 1543-1546.
- Walter, J.A.; Leek, D.M.; Falk, M. (1991). NMR study of the protonation of domoic acid. *Can. J. Chem.* 70, 1156-1161.
- Walz, P.M.; Garrison, D.L.; Graham, W.M., Cattey, M.A.; Tjeerdema, R.S.; Silver, M.W. (1994). Domoic-acid producing diatom blooms in Monterey Bay, California. *Nat. Toxins* 2, 271-279.
- Wang, R.; Maranda, L., Hargraves, P.E.; Shimizu, Y. (1993). *Chemical variation of Nitzschia pungens as demonstrated by the co-occurrence of domoic acid and bacillariolides*. In : Smayda, T.J.; Shimizu, Y. (éds) Harmful Marine Algal Blooms, Lavoisier, Paris, pp. 351-357. ISBN-10: 1898298114.
- Warburg, O. ; Negelein, E. (1920). Über die Reduktion der Salpetersäure in grünen Zellen. *Biochem. Z.* 110, 66-115.
- Weathers, P.J.; Chee, H.L.; Allen, M.M. (1978). Arginine catabolism in *Aphanocapsa* 6308. *Archives for Microbiology* 118, 1-6.
- Werner, D. (1966). Die Kieselsäure im Stoffwechsel von *Cyclotella cryptica* Reimann, Lewin und Guillard, *Arch. Mikrobiol.* 55, 278-308.

- Werner, D. (1967). Hemmung der Chlorophyllsynthese und der NADP⁺-abhängigen Glycerinaldehyde-3-phosphat-dehydrogenase durch Germaniumsäure bei *Cyclotella cryptica*. *Arch. Mikrobiol.* 57, 51-60.
- Wheeler, P.A.; North, B.B.; Stephens, G.C. (1974). Amino acid uptake by marine phytoplanktoners. *Limnology & Oceanography* 19, 249-259.
- Whitledge, T.E.; Dugdale, R.C. (1972). Creatine in seawater. *Limnology & Oceanography* 17, 309-314.
- Whyte, J.N.C.; Ginther, N.G.; Townsend, L.D. (1995). Formation of domoic acid and fatty acids in *Pseudonitzschia pungens* f. *multiseriata*. *J. Appl. Phycol.* 7, 199-205.
- Williams, S.K.; Hodson, R.C. (1977). Transport of urea at low concentration in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Bacteriol.* 130, 266-273.
- Work, T.M.; Barr, B.; Beale, A.M.; Fritz, L.; Quilliam, M.A.; Wright, J.L.C. (1993). Epidemiology of domoic acid poisoning in brown pelicans (*Pelecanus occidentalis*) and Brandt's cormorants (*Phalacrocorax penicillatus*) in California. *J. Zoo Wildlife Medicine* 24, 54-62.
- Wright, J.L.C.; Boyd, R.K.; deFreitas, W.; Falk, M.; Foxall, R.A.; Jamieson, W.D.; Laycock, M.V.; McCulloch, A.W.; McInnes, A.G.; Odense, P.; Pathak, V.P.; Quilliam, M.A.; Ragan, M.A.; Sim, P.G.; Thibault, P.; Walter, J.A.; Gilgan, M.; Richard, D.J.A.; Dewar, D. (1989). Identification of domoic acid, a neuroexcitatory amino acid, in toxic mussels from eastern Prince Edward Island. *Can. J. Chem.* 67, 481-490.
- Wright, J.L.C.; Falk, M.; McInnes, A.G.; Walter, J.A. (1990a). Identification of isodomoic acid D and two new geometrical isomers of domoic acid in toxic mussels. *Can. J. Chem.* 68(1), 22-25.
- Wright, J.L.C., Bird, C.J., deFreitas, A.S.W., Hampson, D., McDonald, J., and Quilliam, M.A. (1990b). *Chemistry, biology and toxicology of domoic acid and its isomers*. In: Proceedings of a Symposium, Domoic Acid Toxicity, Hynie, I. & Todd, E. C. D. (éds.). Ottawa, Ontario, Canada: Canada Diseases Weekly Report, 1990, pp. 21-26.

- Yoo, S-E.; Lee, S-H.; Yi, K-Y.; Jeong, N. (1990). Synthesis of α -kainic acid and α -allokainic acid by Pd(0) mediated olefin insertion-carbonylation reaction. *Tetrahedron Letters* 31, 6877-6880.
- Yoo, S-E.; Suh, J.H., Yi, K.Y. (1993). An Effective Diastereofacial Control by Built-in Oxazolidinone Ring System : An Application to the Total Synthesis of α -Allokainic Acid. *Bull. Korean Chem. Soc.* 14(2), 166-167.
- Zaman, L.; Arakawa, O. ; Shimosu, A.; Onoue, Y.; Nishio, S.; Shida, Y.; Noguchi, T. (1997). Two new isomers of domoic acid from a red alga, *Chondria armata*. *Toxicon* 35, 205-212.
- Zhihao, B.; Weatherspoon, M.R.; Shian, S.; Cai, Y.; Graham, P.D.; Allan, S.M.; Ahmad, G.; Dickerson, M.B.; Church, B.C.; Kang, Z.; Abernathy III, H.W.; Summers, C.J.; Liu, M.; Sandhage, K.H. (2007). Chemical reduction of three-dimensional silica micro-assemblies into microporous silicon replicas. *Nature*, 446, 172-175.
- Zingone, A.; Wyatt, T. (2004). *Harmful Algal Blooms: Keys to the Understanding of phytoplankton ecology*. In: A. R. Robinson and K. H. Brink (eds.), *The Global Coastal Ocean: Multi-Scale Interdisciplinary Processes, THE SEA, Volume 13*, Harvard University Press, pp. 867-926
- Zobell, C.E. (1935). The Assimilation of Ammonium Nitrogen by *Nitzschia Closterium* and Other Marine Phytoplankton. *PNAS* 21(9), 517-522.
- Zurzolo, C.; Bowler, C. (2001). Exploring bioinorganic pattern formation in diatoms. A story of polarized trafficking. *Plant. Physiol.* 127, 1339-1345.

Annexe 1 : formulation des eaux de mer artificielles et milieux
de culture

Eau de mer artificielle de formulation Aquil

Cette formulation d'eau de mer artificielle est tirée du milieu de culture artificiel Aquil (d'après Morel *et al.*, 1979 ; Price *et al.*, 1989). Elle peut être préparée comme eau de mer artificielle non-enrichie en ne rajoutant pas les solutions de sels nutritifs proposés par la formulation originale. Cela permet ainsi d'enrichir ce milieu artificiel selon la formulation de son choix.

Sels anhydres

Composant	Quantité	Concentration molaire finale
NaCl	24,54 g	$4,2 \cdot 10^{-1}$ M
Na ₂ SO ₄	4,09 g	$2,88 \cdot 10^{-2}$ M
KCl	0,7 g	$9,39 \cdot 10^{-3}$ M
NaHCO ₃	0,2 g	$2,38 \cdot 10^{-3}$ M
KBr	0,1 g	$8,4 \cdot 10^{-4}$ M
H ₃ BO ₃	0,003 g	$4,85 \cdot 10^{-5}$ M
NaF	0,003 g	$7,15 \cdot 10^{-5}$ M

Sels hydriques

Composant	Quantité	Concentration molaire finale
MgCl ₂ , 6 H ₂ O	11 g	$5,46 \cdot 10^{-2}$ M
CaCl ₂ , 2 H ₂ O	1,54 g	$1,05 \cdot 10^{-2}$ M
SrCl ₂ , 6 H ₂ O	0,017 g	$6,38 \cdot 10^{-5}$ M

Bibliographie :

- Morel, F.M.M. ; Rueter, J.G. ; Anderson, D.M. ; Guillard, R.R.L. (1979). Aquil : a chemically defined phytoplankton culture medium for trace metal studies. *J. Phycol.* 15, 131-141.
- Price, N.M. ; Harrison, G.L. ; Hering, J.G. ; Hudson, R.J. ; Nirel, P.M. ; Palenik, B. ; Morel, F.M.M. (1989). Preparation and chemistry of the artificial algal culture medium Aquil. *Biol. Oceanogr.* 6, 443-461.

Eau de mer artificielle de formulation ESAW

Cette formulation d'eau de mer artificielle est tirée du milieu de culture artificiel ESAW (d'après Harrison *et al.*, 1980 ; Berges *et al.*, 2001). Elle peut être préparée comme eau de mer artificielle non-enrichie en ne rajoutant pas les solutions de sels nutritifs proposés par la formulation originale. Cela permet ainsi d'enrichir ce milieu artificiel selon la formulation de son choix.

Sels anhydres

Composant	Quantité	Concentration molaire finale
NaCl	20,758 g	$3,63 \cdot 10^{-1}$ M
Na ₂ SO ₄	3,55 g	$2,5 \cdot 10^{-2}$ M
KCl	0,599 g	$8,03 \cdot 10^{-3}$ M
NaHCO ₃	0,174 g	$2,07 \cdot 10^{-3}$ M
KBr	0,0863 g	$7,25 \cdot 10^{-4}$ M
H ₃ BO ₃	0,023 g	$3,72 \cdot 10^{-4}$ M
NaF	0,0028 g	$6,67 \cdot 10^{-5}$ M

Sels hydriques

Composant	Quantité	Concentration molaire finale
MgCl ₂ , 6 H ₂ O	9,59 g	$4,71 \cdot 10^{-2}$ M
CaCl ₂ , 2 H ₂ O	1,344 g	$9,14 \cdot 10^{-3}$ M
SrCl ₂ , 6 H ₂ O	0,0218 g	$8,18 \cdot 10^{-5}$ M

Bibliographie :

Berges, J.A.; Franklin, D.J.; Harrison, P.J. (2001). Evolution of an artificial seawater medium : Improvements in enriched seawater, artificial water over the past two decades. *J. Phycol.* 37, 1138-1145.

Harrison, P.J. ; Waters, R.E.; Taylor, F.J.R. (1980). A broad spectrum artificial seawater medium for coastal and open ocean phytoplankton. *J. Phycol.* 16, 28-35.

Eau de mer artificielle de formulation Yerseke modifié

Cette formulation est utilisée pour réaliser des eaux de mer artificielles enrichies compatibles avec la culture des diatomées (recette non-publiée).

Une première solution de base, dite « eau de mer artificielle pauvre » est d'abord préparée dans 2 litres d'eau ultra-pure Milli-Q. Puis, un premier enrichissement en sels et en bicarbonate est réalisé. L'eau de mer artificielle ainsi préparée peut être ensuite enrichie de différentes manières selon les besoins expérimentaux.

Eau de mer artificielle pauvre

Composant	Quantité	Concentration molaire finale
NaCl	20 g	$3,44 \cdot 10^{-1}$ M
Na ₂ SO ₄	3,2 g	$9,93 \cdot 10^{-3}$ M
MgCl ₂ , 6H ₂ O	7 g	$34,4 \cdot 10^{-3}$ M
KCl	0,54 g	$7,24 \cdot 10^{-3}$ M
CaCl ₂ , 2H ₂ O	1,2 g	$8,16 \cdot 10^{-3}$ M

Enrichissements en sels et bicarbonate

Composant	Quantité	Concentration molaire finale
NaHCO ₃	0,18 g	$7,24 \cdot 10^{-3}$ M
H ₃ BO ₃	0,016 g	$2,58 \cdot 10^{-4}$ M
KBr	0,039 g	$3,25 \cdot 10^{-4}$ M
SrCl ₂ , 6H ₂ O	0,012 g	$4,5 \cdot 10^{-5}$ M

Milieu de culture L1 + Si

Le milieu de culture L1 (Guillard & Hargraves, 1993) enrichi en silicium est réalisé à partir des enrichissements suivants :

Composant	Quantité	Concentration molaire finale
NaNO ₃	1 mL	8,83.10 ⁻⁴ M
NaH ₂ PO ₄ , H ₂ O	1 mL	3,63.10 ⁻⁵ M
Na ₂ SiO ₃ , 9H ₂ O	1 mL	1,07.10 ⁻⁴ M
Solution trace de métaux L1	1 mL	(voir détails)
Vitamines	1 mL	(voir détails)

Composition de la solution « trace de métaux L1 »

Composant	Quantité	Concentration molaire finale
FeCl ₃ , 6H ₂ O	3,15 g	1,17.10 ⁻⁵ M
Na ₂ EDTA, 2H ₂ O	4,36 g	1,17.10 ⁻⁵ M
CuSO ₄ , 5H ₂ O	2,45 g/L	10 ⁻⁸ M
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	19,9 g/L	9.10 ⁻⁸ M
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	22 g/L	8.10 ⁻⁸ M
CoCl ₂ , 6H ₂ O	10 g/L	5.10 ⁻⁸ M
MnCl ₂ , 4H ₂ O	180 g/L	9.10 ⁻⁷ M
H ₂ SeO ₃	1,3 mg/L	10 ⁻⁸ M
NiSO ₄ , 6H ₂ O	2,7 g/L	10 ⁻⁸ M
Na ₃ VO ₄	1,84 g/L	10 ⁻⁸ M
K ₂ CrO ₄	1,94 g/L	10 ⁻⁹ M

Composition de la solution de vitamines

Composant	Quantité	Concentration molaire finale
Vitamine B ₁₂ (cyanocobalamine)	1 mL	3,7.10 ⁻¹⁰ M
Biotine	10 mL	2,1.10 ⁻⁹ M
Thiamine HCl	200 mg	3.10 ⁻⁷ M

Bibliographie

Guillard R.R.L., Hargraves P.E. (1993). *Stichochrysis immobilis* is a diatom, not a chrysophyte. *Phycologia* 32:234-236.

Milieu de culture F/2 + Si

Le milieu de culture F/2 (Guillard & Ryther, 1962 ; Guillard, 1975) est réalisé à partir des enrichissements suivants :

Composant	Quantité	Concentration molaire finale
NaNO ₃	1 mL	8,83.10 ⁻⁴ M
NaH ₂ PO ₄ , H ₂ O	1 mL	3,63.10 ⁻⁵ M
Na ₂ SiO ₃ , 9H ₂ O	1 mL	1,07.10 ⁻⁴ M
Solution trace de métaux L1	1 mL	(voir détails)
Vitamines	1 mL	(voir détails)

Composition de la solution « trace de métaux L1 »

Composant	Quantité	Concentration molaire finale
FeCl ₃ , 6H ₂ O	1,3 g	0,48.10 ⁻⁵ M
Na ₂ EDTA, 2H ₂ O	8,71,17 g	2,34.10 ⁻⁵ M
CuSO ₄ , 5H ₂ O	1 g/L	0,41.10 ⁻⁸ M
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	6,3 g/L	2,8.10 ⁻⁸ M
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	22 g/L	8.10 ⁻⁸ M
CoCl ₂ , 6H ₂ O	10 g/L	5.10 ⁻⁸ M
MnCl ₂ , 4H ₂ O	180 g/L	9.10 ⁻⁷ M

Composition de la solution de vitamines

Composant	Quantité	Concentration molaire finale
Vitamine B ₁₂ (cyanocobalamine)	1 mL	3,7.10 ⁻¹⁰ M
Biotine	10 mL	2,1.10 ⁻⁹ M
Thiamine HCl	200 mg	3.10 ⁻⁷ M

Bibliographie

Guillard R.R.L. and Ryther J.H. (1962) Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. *Can. J. Microbiol.* 8: 229-239.

Guillard R.R.L. (1975) *Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates*. In : Culture of Marine Invertebrate Animals. Eds: Smith W.L. and Chanley M.H., Plenum Press, New York, USA. pp 26-60.

Annexe 2 : réactifs et protocoles de dosages chimiques des sels
nutritifs

Dosage du silicium

Préparation des échantillons

Utiliser du matériel plastique pour éviter toute contamination par le silicium. Filtrer l'échantillon à analyser avec un filtre dépourvu de silice de type carbonate de porosité 0,5 µm de diamètre. Le filtrat peut être conservé plusieurs mois au réfrigérateur avant analyse du silicium.

Solution étalon

Utiliser de l'hexafluorosilicate de sodium anhydre de pureté garantie (Na_2SiF_6 , MM= 188,06 g/mol). Sécher préalablement cette poudre à 105°C pendant 1 heure. Peser ensuite 0,94 g d'hexafluorosilicate et dissoudre dans bécher en plastique avec 300 mL d'eau déminéralisée. Dissoudre sous agitation mécanique. Transvaser dans une fiole plastique jaugée et ajuster à 1000 mL q.s.p., puis transvaser dans un flacon plastique bien hermétique. L'étalon à préparer est de 5 µmol de silicate pour 1 mL. La solution titre à 5 mM. Conservation : plusieurs années à température ambiante à l'abri de la lumière.

Réactifs

Acide sulfurique 4.5 M :

Utiliser de l'acide sulfurique concentré (1.84 kg/L). Diluer 250 mL d'acide dans 750 mL d'eau déminéralisée. Compléter au volume après refroidissement. Transférer ensuite dans un flacon plastique. Conservation : indéfiniment.

Réactif 1 : solution d'acide de molybdate.

Dissoudre 60 g d'ammonium heptamolybdate tétrahydré $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ dans 400 mL d'eau déminéralisée. Ajouter la totalité de cette solution à 200 mL d'acide sulfurique 4,5 M en agitant régulièrement. (ne pas diluer l'acide dans la solution de molybdate). Transférer ensuite dans un flacon en plastique. Conservation : plusieurs mois à température ambiante à l'abri de la lumière.

Réactif 2 : solution d'acide oxalique.

Dissoudre 10g d'acide oxalique dihydraté dans 100 mL d'eau déminéralisée. Conservation : indéfiniment.

Réactif 3 : solution d'acide ascorbique.

Dissoudre 2,8 g dans 100 mL d'eau déminéralisée. Conservation : plusieurs semaines au réfrigérateur.

Procédure générale du dosage

Le dosage colorimétrique est à effectuer pour deux longueurs d'onde : 660 nm et 810 nm. Le seuil de détection à 0,03 $\mu\text{mol/L}$ pour une cuve de 10 cm ; diluer au-delà de 50 $\mu\text{mol/L}$ si l'on mesure à 810 nm notamment.

- Prélever 50 mL dans une éprouvette en plastique et les transférer dans un récipient de dosage.
- Ajouter 2 mL de réactif 1. mélanger.
- Attendre 7-13 minutes.
- Ajouter 2 mL de réactif 2, mélanger.
- Ajouter sans attendre 1 mL de réactif 3, mélanger. (on peut préparer une solution de réduction en avance pour se faire).
- Placer les flacons à l'obscurité pendant 30 minutes à 2 heures. Stable durant 24 heures.
- Mesurer l'absorbance (blanc de gamme : doser de l'eau déminéralisée ; échantillons : doser de l'eau de mer enrichie avec le milieu de culture).

Dosage de l'ammonium

Solution-étalon

Éviter les solutions diluées $< 500 \mu\text{M}$ prises comme solutions-mères. Il faut donc travailler avec une solution au minimum à cette concentration avant d'effectuer les dilutions successives.

On peut avoir des colorations non-désirées si l'on utilise de l'eau déminéralisée pour dissoudre l'ammonium. Il est donc important de tester préalablement l'eau et de choisir la solution la plus propice: eau milliQ, eau désionisée, eau de mer pauvre ou artificielle...

Il faut également songer à tester les colorations parasites des différents réactifs par rapport à ce même choix de l'eau. Il faut donc avoir un blanc de gamme pour l'eau et pour le mélange réactionnel.

Réactifs

Réactif 1 : solution de phénol-nitroprussiate

. Dissoudre 6,5g de phénol dans 80ml d'eau milliQ.

. Ajouter 0,15g de nitroprussiate de sodium. Q.s.p. À 100ml d'eau milliQ.

La solution est stable pendant 2 à 3 semaines en réfrigérateur.

Solution alcaline complexante

. Dissoudre 37,5g de citrate dihydrate trisodique et 3g de soude dans 80ml d'eau puis q.s.p. à 100ml.

Solution stable plusieurs mois.

Réactif 2 : solution complexante au chlore

Utiliser 0,8g de dichloroisocyanurate de sodium dans 100ml de solution alcaline complexante.

Stocker en flacon ambré. Cette solution n'est stable qu'une à deux semaines maximum.

Procédure générale du dosage

Pour 10ml d'échantillon à doser :

- Utiliser des tubes plastique propres (polypropylène ou polystyrène).
- Verser 0,5 ml de réactif 1
- Verser 0,5 ml de réactif 2

- Placer 6h les tubes à l'abri de la lumière
- Diluer si nécessaire
- Mesurer l'absorbance à 630 nm.

Calcul de l'effet de sel

$$E_s = A_e/A_s$$

A_e : échantillon absorbant avec une salinité identique à celle des gammes d'étalonnage.

A_s : échantillon absorbant à la salinité S .

Précautions particulières

Travailler sous hotte et porter des gants, une utilisation de masques à produits chimiques peut être préférable avant toute utilisation du phénol.

Dosage de l'urée

Préparation du matériel

- 1 bain marie à 85°C
- 1 portoir métallique ou plastique supportant des températures de 85°C
- 1 solution d'acide pour rincer les flacons et les tubes avant analyse (si réutilisation des consommables).
- Des tubes à centrifuger de 15 mL conique en polypropylène
- Verrerie en plastique PETG haute résistance chimique

Préparation et stockage des échantillons

Collecter 10 mL d'échantillon. Filtrer sur membrane polycarbonate 0,22 µm avant analyse. Stocker les échantillons à l'obscurité avant analyses. Congeler rapidement les échantillons à – 20°C après filtration si l'analyse ne peut être faite immédiatement, mais effectuer les dosages au plus tard une semaine après filtration.

Préparation de la solution de standards

Dissoudre 150,2 mg d'urée dans de l'eau distillée et diluer à 100 mL q.s.p. Ajouter une goutte de chloroforme comme conservateur. Peut être conservée plusieurs mois. La solution est à 5 µatgN-urée/ml.

Réactifs

Solution Thiosemicarbazide

Dissoudre 0.95 g de thiosemicarbazide dans 100 mL d'eau déminéralisée. Cette solution se conserve plusieurs mois à température ambiante en flacon verre.

Solution Ferrique

Dissoudre 0.15 g de chlorure ferrique dans 10 mL d'eau déminéralisée.

Réactif A

Dissoudre 8.5g de diacetyl monoxime $\text{CH}_3\text{COC}(\text{NOH})\text{CH}_3$ dans 250 mL d'eau déminéralisée portée à 80°C. Refroidir à température ambiante puis ajouter 10 mL de solution de thiosemicarbazide. Ce réactif est stable une semaine placé à l'abri de la lumière, en flacon de verre, à température ambiante.

Réactif B

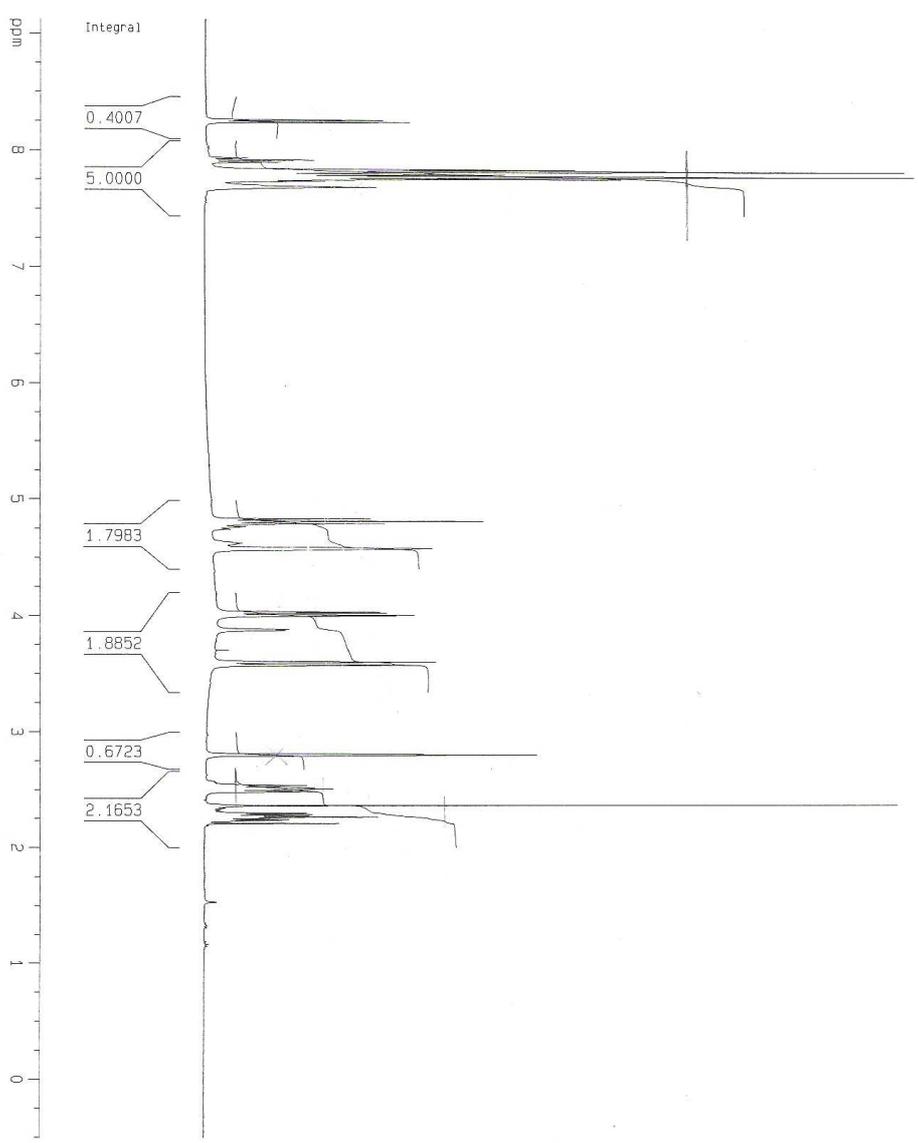
Verser 300 mL d'acide sulfurique fumant dans 235 mL d'eau distillée à 0°C. Une fois à température ambiante, ajouter 0.5 mL de solution de chlorure ferrique et homogénéiser. Ce réactif se conserve indéfiniment.

Protocole de dosage

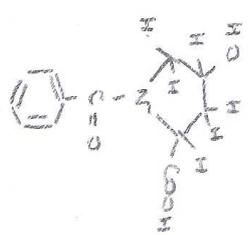
- Remplir les tubes à centrifuger avec 10 mL d'échantillon filtré.
- Ajouter 0.7 mL de **réactif A**. Boucher et agiter.
- Ajouter 2.3 mL de **réactif B**. Boucher et agiter.
- Placer les tubes au bain marie à 85°C pendant 20 minutes.
- Effectuer les dosages à 520 nm et 526 nm.

Annexe 3 : spectres RMN des étapes réalisées lors de la
synthèse chimique des toxines kainiques

trans-N-benzoyl-L-proline
 SPM30 . Spectre 4K 400MHz



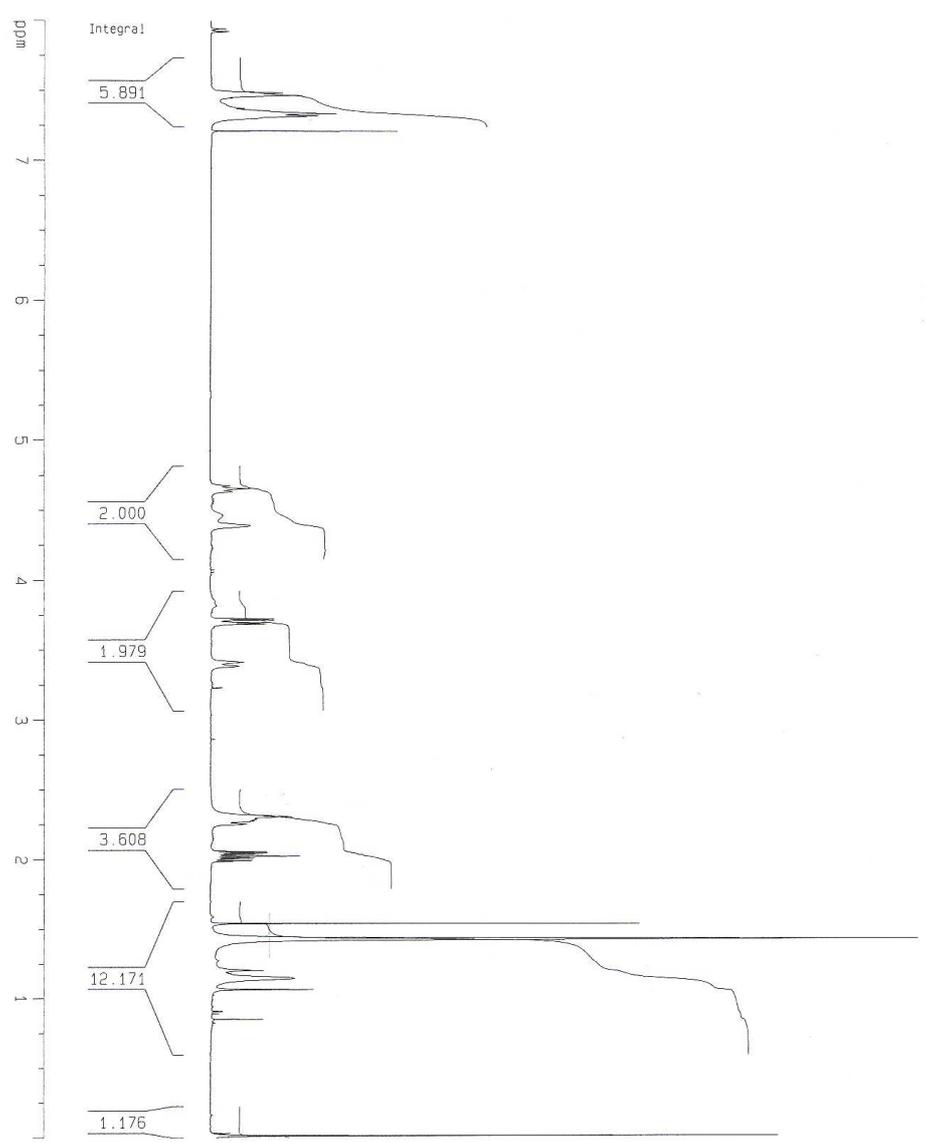
Current Data Parameters
 NAME cgs
 EXPNO 1
 PROCNO 1



Residue attendu
 Spectre OK ✓

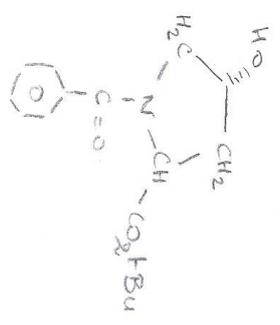
Figure : spectre RMN du *trans*-N-benzoyl-4-hydroxy-L-proline obtenu par synthèse chimique.

trans-N-Benzoyl-4-Hydroxy-L-Proline tert-Butyl ester · Premier essai
 CDCl₃ · Spectre 1H 400 MHz



Current Data Parameters
 NAME dt15
 EXPNO 1
 PROCNO 1

opérateurs : Guillaume
 RNM
 Le 6/3/8



Reliabilité attendue
 Spectre OK ✓

Figure : spectre RMN du *trans*-N-benzoyl-4-hydroxy-L-proline *tert*-butyl ester obtenu par synthèse chimique.

Annexe 4 : exemple de chromatogramme obtenu lors de
l'analyse de la toxicité d'un culot cellulaire par méthode
spectrométrique HPLC/UV

Print of window 38: Current Chromatogram(s)

=====

Injection Date	: 29/05/2009 02:11:28	Seq. Line	: 8
Sample Name	: 1/2N 14-5 C	Location	: Vial 7
Acq. Operator	: Guillaume	Inj	: 1
Acq. Instrument	: AGILENT 1100	Inj Volume	: 20 µl
Acq. Method	: C:\HPCHEM\2\METHODS\ASP.M		
Last changed	: 29/05/2009 01:15:34 by Guillaume		
Analysis Method	: C:\HPCHEM\2\METHODS\ASP.M		
Last changed	: 23/10/2008 15:08:00 by Flo		
Dosage ASP (acide domoïque).			
Colonne C18 Jupiter. CH3CN/H2O, TFA 0,1% : 10/90. d=1ml/min			
T° 40°C, 20 µl injecté			

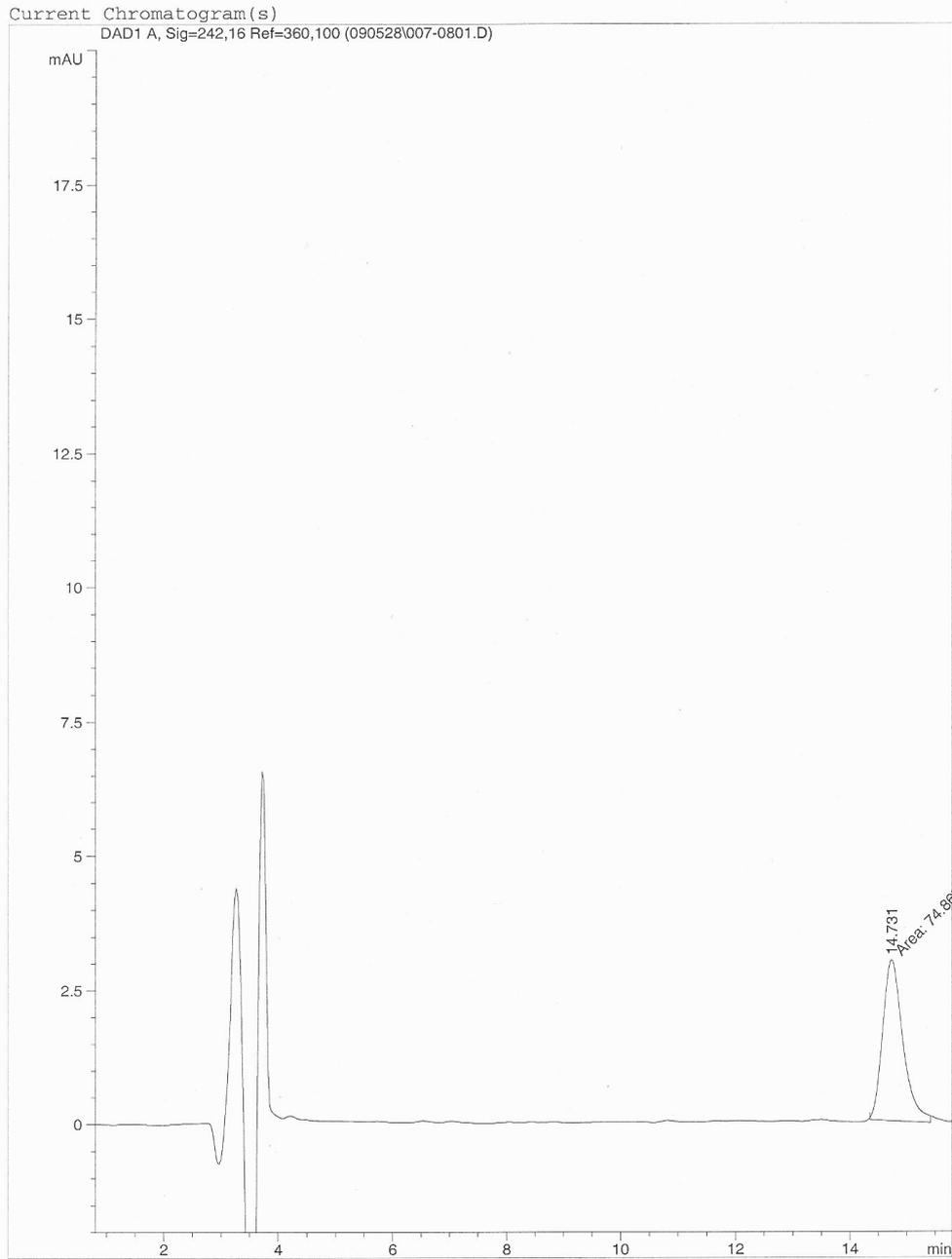


Figure : exemple de chromatogramme obtenu lors de l'analyse de la toxicité d'un culot cellulaire par méthode spectrométrique HPLC/UV.

Annexe 5 : publication parue dans *Proceedings of the seventh International Conference on Molluscan Shellfish Safety* (Nantes, 2009), Editions Quae.

The influence of nitrogen speciation on growth and toxicity of *Pseudo-nitzschia multiseriis* and *P. pungens* under batch and continuous cultures

Influence de la diversité en azote sur la croissance et la toxicité de *Pseudo-nitzschia multiseriis* et *P. pungens* lors de cultures en batch et cultures continues

Calu, Guillaume (1) ; Martin-Jezequel, Véronique (2), Lefaux, Estelle (2) ; Sechet, Véronique (1) ; Lassus, Patrick (1) ; Weigel, Pierre (3) ; Amzil, Zouher (1)

1. IFREMER, Laboratoire Phycotoxines, rue de l'Ile d'Yeu BP 21105 44311 Nantes. guillaume.calu@ifremer.fr

2. Université de Nantes, EA 2160 Laboratoire MMS (Mer, Molécule, Santé), 2 rue de la Houssinière - B.P. 92208 44322 Nantes. Veronique.martin-jezequel@univ-nantes.fr

3. Université de Nantes, UMR CNRS U3B 6204, 2 rue de la Houssinière - B.P. 92208 44322 Nantes. Pierre.weigel@univ-nantes.fr

Les apports en urée, composé utilisé comme fertilisant en agriculture, ont triplé sur les quatre dernières décennies. Ce nutriment se retrouve largement déversé dans les rivières jusqu'aux eaux côtières, et est utilisé comme nourriture par les micro-algues. Des études ont montré que de nombreuses espèces toxiques de microalgues peuvent assimiler de l'azote organique comme de l'inorganique. Ces composés pourraient être une des causes de la prolifération de certaines espèces de diatomées du genre *Pseudo-nitzschia*, qui produisent de l'acide domoïque, une neurotoxine contaminant les coquillages. De plus fortes teneurs en acide domoïque ont d'ailleurs été rapportées pour *P. australis* en présence d'urée. Nous avons étudié au laboratoire l'influence de l'urée sur la teneur en acide domoïque produit par *P. multiseriis* en batch et *P. pungens* en culture continue. Nos résultats montrent que les cellules des deux espèces contiennent plus de toxine en présence d'urée qu'en présence de nitrates. Ces résultats suggèrent l'importance de la diversité des sources d'azote dans la production d'acide domoïque par certaines espèces de *Pseudo-nitzschia*.

Acide domoïque, *Pseudo-nitzschia*, nitrates, urée.

The amount of urea used as fertilizer in agriculture has tripled over the four last decades. This nutrient is largely discharged from rivers to coastal waters, and used by many microalgae as food. Previous studies have shown that numerous toxic species can assimilate both organic and inorganic nitrogen. This has also been proposed by some researchers to be a potential cause for increased occurrence of some diatom species of the genus Pseudo-nitzschia that produce domoic acid, a neurotoxin that can contaminate shellfish. Moreover, higher domoic acid content has been reported for P. australis in the presence of urea. We have investigated the influence of urea on the content of domoic acid in P. multiseriis and P. pungens. Our results showed that, in batch cultures, P. multiseriis contains more toxin per cell in the presence of urea. In continuous cultures, substitution of nitrates by urea increases the cellular toxin content of P. pungens. These findings suggest the importance of nitrogen speciation in domoic acid production by certain species of Pseudo-nitzschia.

Keywords : domoic acid, Pseudo-nitzschia, nitrate, urea.

Introduction

Domoic acid (DA) is a neurotoxic amino acid initially extracted from the Rhodophyte *Chondria armata*. The first evidence of DA as the cause of amnesic shellfish poisoning (ASP) was reported in 1987, following human consumption of contaminated mussels at Prince Edward Island (Wright *et al.*, 1988). This crisis was linked with the occurrence of *Pseudo-nitzschia multiseriis* blooms. Clinical symptoms of amnesic shellfish poisonings (ASP) in consumers consist of gastrointestinal distress, confusion, disorientation, memory loss and in the most severe cases, death (Mos, 2001). The threat of ASP is an important consideration, as seafood demand and aquaculture activity increases throughout the world (Asche *et al.*, 2008). To that end, many research and monitoring programs for the detection of *Pseudo-nitzschia* in seawater and DA in shellfish have been recently developed. In France, the first case of DA in shellfish occurred in 2001 (Amzil *et al.*, 2001). Since that time, *Pseudo-nitzschia* has been recognized as a cosmopolitan genus in coastal French waters, and the national monitoring network regularly detects the presence of DA in shellfish.

Nitrogen metabolism and its influence on DA production by diatoms has been a subject of recent study. Few papers have focused on this subject, mostly in *P. multiseriis*, but to our knowledge, no investigations have been reported for *P. pungens*. *P. multiseriis* can be grown with nitrate, urea or glutamate as nitrogen source (Hillebrand and Sommer, 1996), and uptake rates of nitrogen, urea and ammonium have been calculated for *P. australis* (Cochlan *et al.*, 2008) and for *P. delicatissima* (Loureiro *et al.* 2009). It has been reported that *P. australis* produces more DA in presence of urea than of nitrate or ammonium (Howard *et al.*, 2007) however, toxic strains of *P. multiseriis* and *P. fraudulenta* show variable DA production in the presence of urea (Thessen *et al.*, 2009). Generally, the DA content of *Pseudo-nitzschia* cells is highest during the stationary phase of growth (Bates,

1998), but N-depleted batch cultures of *P. multiseriis* present lower DA content during this phase (Bates, 1991).

The increase of certain harmful algae blooms can be partly explained by the human activities (Masó and Garcés, 2006) such as agriculture (fertilizer and other agricultural discharges), waste waters and consumption of fossil energies (Nixon, 1995; Heisler *et al.*, 2008). In the last four decades, the amounts of urea used as fertilizer have increased in three fold in certain agricultural regions of the world (Glibert *et al.*, 2006), leading to large urea discharge from rivers to coastal waters. Many species of microalgae can use urea as nutritive source (Antia *et al.*, 1991). In North Sea, blooms of *Phaeocystis globosa* (Prymnesiophyceae) were linked to nitrate discharge by river waters (Lancelot, 1995). In addition, the occurrence of certain paralytic shellfish poisoning (PSP) episodes has been related to increasing use of urea as a fertilizer (Glibert *et al.*, 2006).

Each year, the French monitoring network (REPHY) detects domoic acid contamination in shellfish along North coasts of France. Thus, in order to better understand the risk of harmful diatoms blooms in French coastal waters, we have investigated the influence of two nitrogen sources, urea and nitrate, on the production of DA in batch and continuous culture by strains of *P. multiseriis* and *P. pungens* isolated from the English Channel waters.

Material and Methods

1.1. Strain specificities

P. multiseriis strain CCL70 was isolated from Thames estuary (U.K.) in 2007 and *P. pungens* strain D10 from West-Brittany coast (Bay of Crozon) in February 2008 by CEFAS Institute and Ifremer researchers. Non-axenic cultures were maintained in natural seawater (collected from the English Channel Sea) enriched in L1 medium with 107 μM silicium (Guillard & Hargraves, 1993). Domoic acid production in both strains was previously confirmed by LC-MS-MS analysis (unpublished data).

1.2 Batch cultures

Experimental cultures were established in culture chambers (16°C, 12:12 photoperiod). *P. multiseriis* cultures were grown in polystyrene flasks with enriched natural seawater L1 with silicium (107 μM). Experimental culture inocula were depleted of N for one week. To compare the influence of nitrate and urea, nitrogen sources were added separately in batch enriched cultures. Nitrate concentration was fixed to 441 μM and urea concentration to 220 μM .

1.3 Continuous cultures

Continuous cultures of *P. pungens* were grown in polymethylmethacrylate (PMMA) plastic (altuglass ©) 2.3 L photobioreactors, with regulated pH at 8.2, and flow rate of 0.2 mL/min. The population was first monitored in the system as a batch culture with natural enriched seawater L1 medium with silicium (107 μM), before to switching on the pump to start the continuous culture. The system was first enriched with nitrate (441 μM) then replaced by urea (220 μM) on day 14.

1.4 Cell enumeration

Samples for cell quantification were fixed with Lugol iodine solution. *Pseudo-nitzschia* cells were quantified microscopically using a Nageotte counting chamber. Precision of counts was statistically estimated following Lund *et al.* (1958). The confidence interval was $p < 0.10$.

1.5 DA extraction

A 10 ml culture aliquot was centrifuged 20 min at 3600 x g. Cell culot were suspended in 50:50 v/v methanol:water, frozen at -80°C , sonicated (500W, 20 kHz), and filtered on 0.45 μm Whatman filter under ultracentrifugation (8000G, 10 min). The supernatant was filtered on 0.45 μm Whatman filter under ultracentrifugation (8000G, 10 min) to perform DA analysis in the medium. All samples were stored at $2-8^{\circ}\text{C}$ before analysis.

1.6 DA analysis

Intracellular domoic acid was monitored by HPLC-UV method (Lawrence *et al.*, 1991), using a Jupiter C18 ($\text{Ø} = 5\mu\text{m}$, 4,6x250 mm) column thermostatically controlled at 40°C ; mobile phase : 90:10 H₂O ; 0,1 % TFA/acetonitrile (v/v); flow rate : 1ml/min.. An aliquot of 20 μl of each sample was injected, for a gradient of 20 min. DO was detected by UV absorbance ($\lambda = 242 \text{ nm}$). Standards were certificated by the National Research Council of Canada. (Halifax).

Results

Batch cultures of *P. multiseriis* strain CCL 70 showed similar growth characteristics under nitrate or urea conditions without significant differences (max. growth rate between 0.56 d^{-1} and 0.67 d^{-1}) (Figure 1). On the other hand growth under N-depleted condition was very slow (max growth 0.33 d^{-1}). Intracellular DA content was detected at the stationary phase, on day 7 in urea batch culture and on day 8 in nitrate batch culture (Figure 2). Cellular DA was greater in cultures grown on urea between the 7th and the 8th days, followed by a large decrease between the samples collected at the 8th and the 9th days. However, DA levels in the culture medium showed no increase during these days (data not shown).

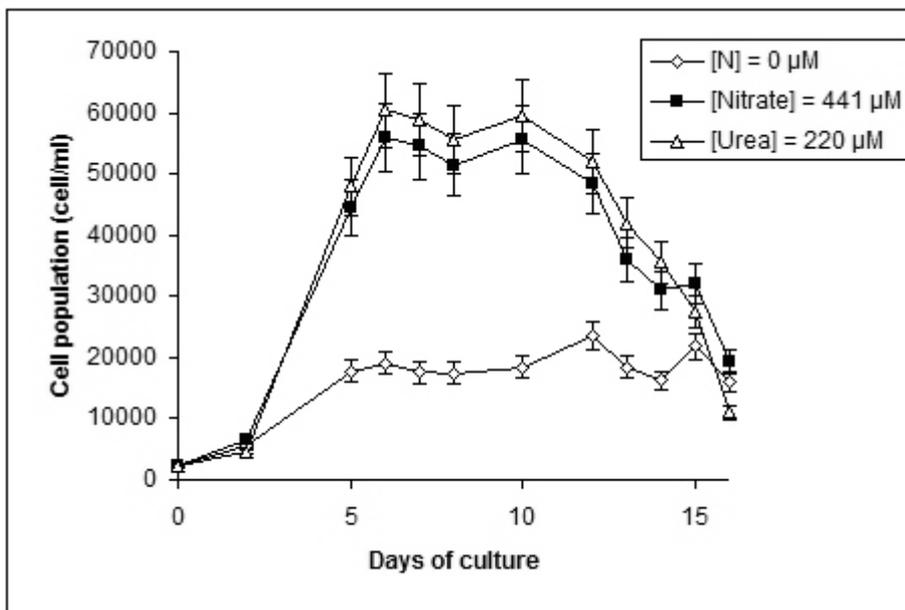


Figure 1. Growth of *P. multiseriis* CCL70 under different N conditions (batch cultures). White diamonds : no nitrogen source. White triangles : [Urea] = 220μM. Black squares : [Nitrate] = 441 μM.

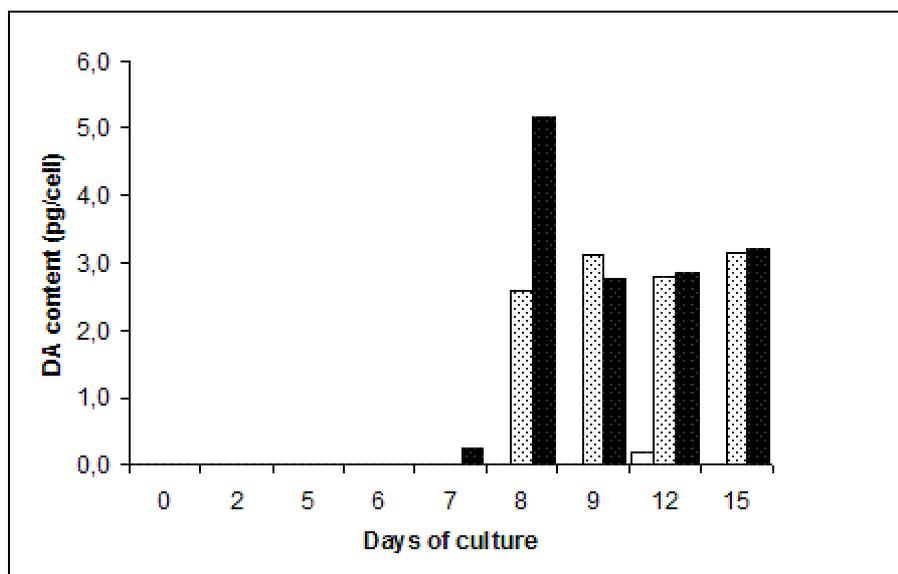


Figure 2. DA content of *P. multiseriis* CCL70 under different N conditions (batch cultures). White columns: [N] = no nitrogen source. Dotted columns : [Nitrate] = 441 μM. Black columns: [Urea] = 220 μM.

Continuous culture of *P. pungens* strain D10 was started with a high biomass (around 20.000 cells/ml) and pumps were switch on during exponential phase in order to avoid collapse of the culture (Figure 3). Cultures were at equilibrium when the biomass varied by less than 5%. Biomass was slightly higher in the nitrate (441 μM) grown culture than in the urea (220 μM) treatment. DA concentration reached a maximum steady concentration at 0.1 pg/cell in nitrate as the N source. After the transition to urea as the N source, cellular DA content increases from 0.1 pg/cell to 0.2 pg/cell, and continued to increase to the end of the experiment until day 24 in batch culture.

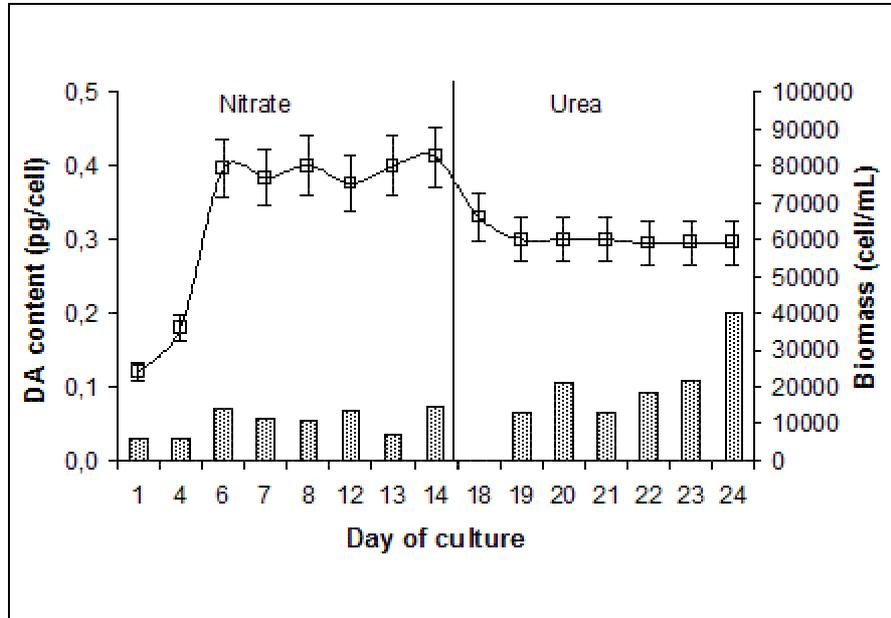


Figure 3. Abundance and DA content of *P. pungens* D10 during continuous culture. White squares : population (cell/ml). Dotted columns : toxin cells content (pg/cell). Replacement of nitrate (441 μM) by urea (220 μM) occurs at the 14th day

Discussion

Our results show that growth rates of *P. multiseriis* strain “CCL70” in batch culture are similar when grown in both nitrogen sources, from $0.56 \pm 0.06 \text{ d}^{-1}$ (nitrate) to $0.67 \pm 0.07 \text{ d}^{-1}$ (urea). This has not always been the case, as Howard *et al* (2007) reported a decrease of growth rate in *P. australis* using urea ($0.52 \pm 0.09 \text{ d}^{-1}$) as a N source in comparison with the rate of $0.89 \pm 0.08 \text{ d}^{-1}$ obtained using nitrate. For *P. multiseriis*, Thessen *et al.* (2009) provided a large set of data on intraspecific variations between strains. Their results show various growth responses with nitrate (from 0.45 d^{-1} to $0.76 \pm 0.10 \text{ d}^{-1}$) or urea (from $0.3 \pm 0.1 \text{ d}^{-1}$ to $0.68 \pm 0.07 \text{ d}^{-1}$).

In our study, the intracellular-DA contents of *P. multiseriis* increased in stationary phase, and was higher in urea compared to nitrate conditions during early and middle stationary phase. Maximum DA content per cell was 3.16 pg/cell with nitrate as inorganic nitrogen source and 5.17 pg/cell with urea as organic nitrogen source. *P. multiseriis* is known for

producing DA under batch conditions (Bates, 1991). Thessen *et al.* (2009) determined maximum DA content for *P. multiseriis* at 0.36 pg/cell for nitrate-enriched and 1.8 pg/cell for urea-enriched medium. The results we have obtained for *P. multiseriis* are in agreement with the concentrations reported in the literature (Bates, 1998).

The work of Thessen *et al.* (2009) is currently the most complete comparison of growth and DA production of *Pseudo-nitzschia* species using both organic and inorganic nitrogen sources. However, Thessen *et al.* (2009) didn't investigate the CCL 70 strain of *P. multiseriis* in their experiments. Moreover, our experimental conditions differed from theirs. Therefore, comparison is not easy between the two works, and our results show new data for *P. multiseriis*. During our experiments with this species, the high intracellular DA content found at the 8th day was not recovered neither in the cells nor in the culture medium in the following days. That may suggest that DA was assimilated by bacteria in the culture, because *P. multiseriis* CCL 70 was a non-axenic strain. Recently, epiphytic bacteria associated with the genus *Pseudo-nitzschia* were thought to assimilate DA; however the fate of DA in bacteria is unclear (Stewart, 2008). More investigations should be done to more fully understand our results.

P. pungens strain D10 produces more DA when nitrate is replaced by urea under continuous culture. To our knowledge, this is the first study on nitrogen preferences for this species.

Our results are in accordance with other authors, and clearly demonstrate that nitrogen source can affect not only the growth, but also the production of domoic acid in *Pseudo-nitzschia* species. However, the actual linkages between *Pseudo-nitzschia* nitrogen metabolism and DA synthesis pathways currently are insufficiently understood to explain how nitrogen species can affect DA production. A better understanding of the role of nitrogen metabolism in domoic acid production appears to be important in our understanding of the linkages between agricultural urea runoff and coastal ASP events.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Véronique Creach from the CEFAS Institute for having provided *P. multiseriis* strain "CCL70" and Marie-Pierre Crassous from Ifremer for having provided *P. pungens* strain "D10". This work was supported by Ifremer, the Regional Council of "Pays de la Loire", University of Nantes and the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS).

References

Asche F., Roll K.H., Tveterås S., 2008. Future Trends in Aquaculture: Productivity Growth and Increased Production, in Holmer M., Black K., Duarte C.M., Marbà N., Karakassis I. (dir.), Aquaculture in the Ecosystem, Berlin, Springer-Verlag, p. 271-292

Amzil Z., Fresnel J., Le Gal D., Billard C., 2001. Domoic acid accumulation in french shellfish in relation to toxic species of *Pseudo-nitzschia multiseriis* and *P. pseudodelicatissima*. *Toxicon*, 39, p. 1245-1251.

Antia N.J., Harrison P.J., Oliveira L., 1991. The role of dissolved organic nitrogen in phytoplankton nutrition, cell biology and ecology. *Phycologia* 30, p. 1-89.

- Bates S.S., Freitas A., Milley J.F., Pocklington R., Quilliam M.A., Smith J.C. and Worms J., 1991. Controls on domoic acid production by the diatom *Nitzschia pungens* f. *multiseriis* in culture: nutrients and irradiance. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48, p. 1136–1144.
- Bates S.S., 1998. Ecophysiology and metabolism of ASP toxin production, in Hallegraeff G.M. (dir.), *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*, Berlin, Springer-Verlag, p. 405–426.
- Cochlan W., Herndon J., Kudela R.M., 2008. Inorganic and organic nitrogen uptake by the toxigenic diatom *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae). *Harmful Algae* 8, p. 111-118.
- Glibert P.M., Seitzinger S., Heil C.A., Burkholder J.M., Parrow M.W., Codispoti L.A., Kelly V., 2006. Escalating worldwide use of urea – a global change contributing to coastal eutrophication. *Oceanography* 18, p. 198-208.
- Guillard R.R.L., Hargraves P.E., 1993. *Stichochrysis immobilis* is a diatom, not a chrysophyte. *Phycologia* 32, p. 234-236.
- Heisler J., Glibert P.M., Burkholder J.M., Anderson D.M., Cochlan W., Dennison W.C., Dortch Q., Gobler C.J., Heil C.A., Humphries E., Lewitus A., Magnien R., Marshall H.G., Sellner K., Stockwell D.A., Stoecker D.K., Suddleson M., 2008. Eutrophication and harmful algal blooms: A scientific consensus. *Harmful Algae* 8, p. 3-13.
- Hillebrand H., Sommer U., 1996. Nitrogenous nutrition of potentially toxic diatom *Pseudo-nitzschia pungens* f. *multiseriis* Hasle. *J. Plankton Res.* 18, p. 295-301.
- Howard M.D.A., Cochlan W.P., Ladizinsky N., Kudela R.M., 2007. Nitrogenous preference of toxigenic *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae) from field and laboratory experiments. *Harmful Algae* 6, p. 206-217.
- Lancelot C., 1995. The mucilage phenomenon in the continental coastal waters of the North Sea. *Science of the Total Environment* 165, p. 83-102.
- Nixon S.W., 1995. Coastal marine eutrophication: A definition, social causes, and future concerns. *Ophelia* 41, p. 199–219.
- Stewart J.E., 2008. Bacterial involvement in determining domoic acid levels in *Pseudo-nitzschia multiseriis* cultures. *Aquatic Microbial Ecology* 50, p. 135-144.
- Thessen A.E., Bowers H.A., Stoecker D.K., 2009. Intra- and interspecies differences in growth and toxicity of *Pseudo-nitzschia* while using different nitrogen sources. *Harmful Algae* 8, p. 792-810.
- Wright J.L.C., Boyd R.K., de Freitas A.S.W., Falk M., Foxall R.A., Jamieson W.D., Laycock M. V., McCulloch A.W., McInnes A.G., Odense P., Pathak V., Quilliam M.A., Ragan M.A., Sim P.G., Thibault P., Walter J.A., Gilgan M., Richard D.J.A., Dewar D., 1989. Identification of domoic acid, a neuroexcitatory amino acid, in toxic mussels from eastern Prince Edward Island. *Can. J. Chem.* 67, p. 481-490.

Contribution à l'étude de la toxicité de *Pseudo-nitzschia* : régulation de la production d'acide domoïque et synthèse d'analogues chimiques

Résumé : ce travail de thèse propose une contribution à l'étude des diatomées toxiques du genre *Pseudo-nitzschia sp.*, responsables de contaminations de fruits de mer de type ASP (Amnesic Shellfish Poisoning). L'influence des nutriments silicium et azotés sur la croissance et la production toxinique de trois espèces toxiques – *P. multiseriis*, *P. australis* et *P. pungens* – a été étudiée. La synthèse chimique d'analogues aux toxines ASP a également été explorée, en vue de développer de nouveaux biocapteurs de détection. Les travaux menés sur l'influence du silicium montrent que cet élément présent dans le milieu influe sur la teneur toxinique intracellulaire, mais sans être directement impliqué dans cette production toxinique. De nouvelles sources azotées organiques assimilables par *P. multiseriis* et *P. australis* ont été mises en évidence, montrant une corrélation négative entre taux de croissance et production toxinique. La diversité des réponses physiologiques rapportées souligne une très forte variation intra- et inter-spécifique chez *Pseudo-nitzschia sp.* Les dynamiques de production toxinique démontrent la possibilité d'une production d'acide domoïque dès la phase de croissance des diatomées selon la source azotée étudiée. Les études menées lors de cultures en continu sur les espèces *P. multiseriis* et *P. pungens* ont enfin mis en évidence une plus forte production toxinique à l'équilibre en présence d'urée qu'en présence de nitrates. Ces résultats laissent supposer une influence significative des déversements d'azote organique *in situ* (anthropiques ou naturels) sur les dynamiques naturelles d'efflorescences de *Pseudo-nitzschia*.

Mots-clés : *Pseudo-nitzschia*, Diatomées, Algues Nuisibles, ASP, Acide Domoïque, Silicium, Azote, Bioréacteurs, Spectrométrie Liquide à Haute Pression, Spectrométrie UV/Visible, Environnement.

Contribution to the study of *Pseudo-nitzschia* toxicity : regulation of domoic acid production and synthesis of chemical analogs

Abstract : this work purpose a contribution to the study of toxic diatoms from the genus *Pseudo-nitzschia sp.*, responsables for shellfish contaminations by ASP (Amnesic Shellfish Poisoning). Influence of silicium and nitrogen nutriments on growth and toxic production by tree species – *P. multiseriis*, *P. australis* et *P. pungens* – has been studied. Chemical synthesis of ASP toxic analogues has been investigated too, in order to develop new biocaptors. Experiments on silicium showed that this element influenced the intracellular toxins content, but was not directly implicated in this toxic production. New organic nitrogen species assimilated by *P. multiseriis* and *P. australis* has been identified, showing a negative correlation between growth rate and toxins production. Diversity of physiological responses showed an high intra- and interspecific variation by *Pseudo-nitzschia sp.* Toxins production dynamics showed a possible production of domoic acid during growth phase. Studies on continuous cultures on *P. multiseriis* and *P. pungens* indicated an higher toxic production at steady state in presence of urea and nitrates. Theses results gaves clues to a significative influence of organic nitrogen *in situ* (anthropic or natural) on *Pseudo-nitzschia* bloomings.

Keywords : *Pseudo-nitzschia*, Diatoms, Harmful Algae, ASP, Domoic Acid, Silicium, Nitrogen, Bioreactors, Hight Pressure Liquid Spectrometry, UV/Vis. Spectrometry, Environment.