



Effets multigénérationnels du dinoflagellé *Dinophysis sacculus* durant la phase de gamétogenèse/maturation de *Magallana gigas* et *Mytilus edulis* : aspects génotoxiques, métaboliques et physiologiques

Clément Baracchini

*Rapport de stage de deuxième année du Master mention Toxicologie Écotoxicologie, spécialité
Toxicologie Humaine et Environnementale de l'université d'Angers*

Structure d'accueil : Station Ifremer de La Tremblade Av. de Mus de Loup, 17390 La Tremblade
Unité de recherche : Unité Adaptation Santé des Invertébrés Marins – ASIM

Tutoré par : Dr Abdellah Benabdelmouna, Cadre de recherche IFREMER

Projet GénoDino, AAP générique DS IFREMER

22 Janvier 2024 - 21 Juin 2024

Résumé

L'évaluation des effets toxiques des Dinoflagellés sur les mollusques bivalves, notamment *Magallana gigas* et *Mytilus edulis*, constitue une préoccupation sanitaire majeure en raison de leur importance économique et de leur rôle en tant qu'espèces sentinelles en écotoxicologie. *Dinophysis sacculus* est un dinoflagellé capable de produire des toxines lipophiles dites "DSP" (toxines diarrhéiques des mollusques), telles que l'acide okadaïque (AO) et les pecténotoxines (PTX). Ces toxines, en s'accumulant dans les coquillages, représentent un risque sanitaire majeur, même à bas bruit, tant pour les consommateurs (humains et autres organismes prédateurs) que pour les bivalves eux-mêmes. Bien que l'intoxication DSP soit considérée comme un problème de santé publique mondial, il existe peu de publication sur l'effet de contaminations aux toxines de microalgues sur les futures générations de bivalves exposés. De plus, en raison de la mixotrophie des espèces toxiques du genre *Dinophysis* et de la difficulté de les cultiver jusqu'à récemment, peu d'études ont examiné les effets de *Dinophysis spp.*, de leurs toxines ou de combinaisons des deux sur les bivalves, tels que les huîtres et/ou les moules. Mon stage vise à tester l'hypothèse selon laquelle une micro-algue toxique pourrait avoir un impact sur la qualité cytogénétique, la physiologie ainsi que sur le métabolisme énergétique des animaux "parents" (FO) et sur leur descendance (F1). Les résultats obtenus et exploités avant le rendu de ce document valident l'hypothèse selon laquelle *D. sacculus* a un impact multigénérationnel au niveau génétique et physiologique sur FO et F1. Concernant *Magallana gigas*, les résultats montrent un impact embryotoxique, reflété par l'augmentation du nombre de larves malformées. Cet effet, accompagné par des observations du nombre de zygotes produits qui apparaît augmenté en présence de *D. sacculus* indique un risque réel pour la viabilité des générations futures après l'exposition d'une cohorte. Concernant *Mytilus edulis*, une diminution de la qualité cytogénétique, indiquée par un impact génotoxique et embryotoxique avec une augmentation du nombre de larves malformées, signale également un danger concret pour leur fitness et la pérennité des futures générations après l'exposition d'une cohorte. D'autre part, les huîtres ont vu leur capacité à capturer du phytoplancton sain (*Skeletonema marinoi*) diminuer, quel que soit le niveau de contaminants. Ceci indique que la présence de *D. sacculus* perturbe leur physiologie, les empêchant de filtrer les microalgues saines. Plus largement, ces résultats mettent en évidence le risque de mise en péril du captage naturel, dans les bassins exposés à cette microalgue toxique et de la fourniture de naissains destinés au marché européen.

Mots clefs : *Dinophysis sacculus*; Bivalves; Effet multigénérationnel; Génotoxicité; Reprotoxicité; Effets physiologiques

Abstract

The evaluation of the toxic effects of Dinoflagellates on bivalve mollusks, particularly *Magallana gigas* and *Mytilus edulis*, is a major health concern due to their economic importance and their role as sentinel species in ecotoxicology. *Dinophysis sacculus* is a dinoflagellate capable of producing lipophilic toxins known as "DSP" (diarrhetic shellfish poisoning) toxins, such as okadaic acid (OA) and pectenotoxins (PTX). These toxins, when accumulating in shellfish, pose a significant health risk, even at low levels, to consumers (humans and other predator organisms) as well as to the bivalves themselves. Although DSP intoxication is considered a global public health issue, there is little publication on the effect of microalgal toxin contamination on future generations of exposed bivalves. Additionally, due to the mixotrophy of toxic species of the genus *Dinophysis* and the difficulty of culturing them until recently, few studies have examined the effects of *Dinophysis spp.*, their toxins, or combinations of both on bivalves, such as oysters and/or mussels. My internship aims to test the hypothesis that a toxic microalga could impact the cytogenetic quality, physiology, and energy metabolism of "parent" animals (FO) and their offspring (F1). The results obtained and analyzed before the submission of this document validate the hypothesis that *D. sacculus* has a multigenerational impact at the genetic and physiological levels on FO and F1. Concerning *Magallana gigas*, the results show an embryotoxic impact, reflected by the increase in the number of malformed larvae. This effect, accompanied by observations of the increased number of zygotes produced in the presence of *D. sacculus*, indicates a real risk to the viability of future generations after the exposure of a cohort. Regarding *Mytilus edulis*, a decrease in cytogenetic quality, indicated by a genotoxic and embryotoxic impact with an increase in the number of malformed larvae, also signals a concrete danger to their fitness and the sustainability of future generations after the exposure of a cohort. On the other hand, the oysters saw their capacity to capture healthy phytoplankton (*Skeletonema marinoi*) decrease, regardless of the level of contaminants. This indicates that the presence of *D. sacculus* disrupts their physiology, preventing them from filtering healthy microalgae. More broadly, these results highlight the risk of jeopardizing natural spat collection in areas exposed to this toxic microalga and the supply of seed intended for the European market.

Keywords: *Dinophysis sacculus*; Bivalves; Multigenerational effect; Genotoxicity; Reprotoxicity; Physiological effects

Table des matières

Liste des abréviations	4	4.5 Analyses physiologiques	26
1 Introduction	5	Compteur de particules multisizer • Analyses du CR et de l'OCR	
2 Etat de l'art	6	4.6 Dosage de la citrate synthase	29
2.1 <i>Dinophysis</i> spp.	6	4.7 Dosage des toxines dans la chair des bivalves	29
Généralités, phylogénie et morphologie • Distribution • Mixotrophie		5 Discussion	29
2.2 Efflorescences algales de <i>Dinophysis</i> spp. (<i>Dinophyta</i>)	7	5.1 Mortalité	29
Toxicité • Acide okadaïque (OA) (Ehrenberg, 1841) • Pectenotoxins (PTXs) (Ehrenberg, 1841) :		5.2 Reprotoxicité	29
2.3 Intérêt des modèles bivalves <i>M. gigas</i> et <i>M. edulis</i>	8	5.3 Analyses cytogénétiques	30
3 Matériel et méthode	8	Impacts génotoxiques • Longueur des télomères	
3.1 Méthode de recherche bibliographique	8	5.4 Analyses physiologiques	31
3.2 Méthode statistique	8	Inhibition de la capacité de capture du phytoplancton • Détermination du poids sec de MO • Analyses du CR et de l'OCR	
3.3 Culture de <i>Dinophysis sacculus</i>	9	5.5 Dosage de la citrate synthase	32
3.4 Origine des animaux	9	5.6 Dosage des toxines dans la chair des bivalves	32
Origine des moules • Origine des huîtres		6 Conclusion	32
3.5 Design experimental	9	Remerciements	34
Salle d'expérimentation • Dosage des toxines		Références à faire avec Zotero	35
3.6 Acclimatation	10	Annexes	42
3.7 Contamination	10		
Concentrations environnementales de contaminants choisies, justifications • Modalités d'exposition • Consommations induites de cellules par heure • Durée d'exposition			
3.8 Analyses Cytogénétiques	11		
Extraction d'Hémolymphe • Analyse de la quantité relative d'ADN par cellule et du niveau de ploïdie chez <i>M. gigas</i> et <i>M. edulis</i> par cytométrie en flux			
3.9 Analyses physiologiques	14		
Mesures physiologiques sur banc • Comptage des particules au compteur multisizer • Détermination du poids sec de MO			
3.10 Dosage de la citrate synthase	16		
Traitement des échantillons • Préparation des solutions • Mise en puit			
3.11 Design experimental de l'élevage larvaire	17		
Experimentation principale : embryotoxicité sur la génération F1 non-exposée, descendante d'une génération FO exposée • Experimentation "Epsilon" : embryotoxicité sur la génération F1 par contact direct			
3.12 Test écotoxicologique « larve de bivalve »	17		
4 Résultats	18		
4.1 Observations hors protocole : Suivi de mortalité	18		
4.2 Effets de <i>D. sacculus</i> sur les fonctions reproductives des bivalves <i>M. edulis</i> et <i>M. gigas</i>	19		
4.3 Test écotoxicologique "larve de bivalve"	20		
4.4 Analyses cytogénétiques	24		
Niveau de ploïdie : analyses par cytométrie en flux (CEF) • Analyse de la longueur des télomères par qPCR • Analyse de la longueur des télomères par fiber-FISH			

Liste des abréviations

ASIM	Unité Adaptation Santé des Invertébrés Marins
REPHY	REseau d'observation et de surveillance du PHYtoplancton et de l'hydrologie dans les eaux littorales
PHYSALG	laboratoire de PHYsiologie des microALgues
PMMLT	Plateforme des Mollusques Marins de La Tremblade
LEMAR	Laboratoire des sciences de l'Environnement MARin
OA	Acide okadaïque
HPLC-MS	High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry
PTX2	Pecténotoxines 2
DAPI	4', 6-diamidino-2-phénylindole
PCR	Polymerase Chain Reaction
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
qsp	Quantité Substantielle Présente
tampon AW1	Tampon de Lavage 1
tampon AW2	Tampon de Lavage 2
tampon AL	Tampon de Lyse
tampon AE	Tampon d'Élution
DTT	Dithiothréitol
CR	Clearance rate
OCR	Oxygen Consumption Rate
FISH	Fluorescence In Situ Hybridization
ANP	Acide Nucléique Polymérisé
MO	Matière organique
PHYTNESS	écoPHYsiologie et Traits d'histoire de vie des orgaNismES marinS
ROS	Reactiv Oxygen Species
BDE47	2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether
PSP	Paralytic Shellfish Poison

1. Introduction

La conchyliculture occupe une place significative sur le plan économique à l'échelle mondiale. En France, l'huître du Pacifique, également connue sous le nom scientifique *Crassostrea gigas* (-*Magallana gigas* ; Thunberg, 1793), domine le marché des coquillages avec environ 84 800 tonnes vendues chaque année, suivie de près par les moules, dont les ventes s'élèvent à environ 61 000 tonnes [1]. D'autre part, les efflorescences d'algues toxiques sont en augmentation, à la fois en terme de fréquence, d'intensité mais aussi de durée. Ces nettes hausses résultent des phénomènes de changement climatique et d'eutrophisation des écosystèmes marins [2], [3], [4].

Les recherches initiales sur les huîtres ont mené à des conclusions incorrectes, suggérant que les huîtres pouvaient échapper à l'accumulation d'algues toxiques et qu'elles étaient par conséquent moins susceptibles de devenir toxiques comparées à d'autres bivalves [5]. Plus tard, il a été prouvé que certaines toxines, dont celles de *Dinophysis sacculus* avaient la capacité de s'accumuler dans les bivalves. En effet, les microalgues sont préférentiellement consommées par des organismes se nourrissant par filtration, notamment les mollusques bivalves. Certaines d'entre elles sont capables de synthétiser des métabolites secondaires toxiques qui sont alors libérés et accumulés chez ce consommateur primaire. Ainsi, plusieurs publications ont dosé ces toxines dans les bivalves. Par exemple, les pectenotoxines (PTX-2) et l'acide okadaïque ont toutes deux été dosées dans les huîtres et les moules [6]. De plus, le consommateur primaire va lui-même servir de proie à un consommateur secondaire et ainsi de suite, permettant aux métabolites de suivre un processus de bioamplification [7], [8].

De cet fait, le problème sanitaire associé aux microalgues toxiques est reconnu depuis longtemps : les premières intoxications humaines ont été mises en évidence en 1976 au Nord du Japon après la consommation de moules et de pectinidés [9], [10]. Actuellement en France, le plan de surveillance français REPHY inclut la détection de *D. sacculus* [11], considérant un risque dès la présence d'une cellule. Cette information est ensuite transmise au préfet, qui peut décider de fermer les exploitations conchylicoles concernées. Cette problématique sanitaire se répercute ainsi directement sur les conchyliculteurs français, qui subissent chaque année des pertes économiques dues à la présence de plusieurs espèces toxiques du genre *Dinophysis* [12], [13]. De plus, *D. acuminata* et *D. sacculus* sont les responsables majeurs des fermetures de fermes conchylicoles, qui historiquement ont déjà pu durer plusieurs semaines par an [11]. 124 événements dépassant le seuil d'alerte correspondant à la présence de *Dinophysis spp.* avec plus de 100 cellules par litre ont été recensés en Charente-Maritime de 1987 à 2019. De ce fait, ceux-ci ont entraîné de nombreuses interdictions de vente de coquillages. Ces microalgues toxiques posent un réel risque pour le captage naturel et la fourniture de naissains destinés aux marchés national et européen.

L'accumulation des toxines dans les mollusques bivalves et les risques liés à leur consommation, tant par l'Homme que par d'autres prédateurs dans l'environnement, sont bien étudiés. Cependant, les effets zoosanitaires demeurent encore largement méconnus, y compris pour les mollusques bivalves, en particulier en ce qui concerne les répercussions à long terme sur les générations futures. La compréhension de cette thématique est essentielle pour anticiper les impacts potentiels et réduire les dommages économiques, sanitaires et zoosanitaires.

La problématique de ce stage soulève la question suivante : "la microalgue toxique *Dinophysis sacculus* exerce-t-elle des impacts génotoxiques, reprotoxiques, métaboliques et physiologiques significatifs sur les huîtres creuses et les moules communes à travers plusieurs générations (F0 et F1) ?"

Ainsi, les objectifs de ce stage se concentrent sur l'évaluation des impacts génotoxiques, physiologiques et biochimiques de *Dinophysis sacculus* sur les huîtres creuses et les moules communes. L'intention de cette étude est de caractériser et de mesurer les divers effets potentiels rencontrés. Un autre enjeu a été d'évaluer si ces effets sont multigénérationnels. Pour cela, les analyses ont été menées sur les générations FO et F1. De plus, cette étude multidisciplinaire est réaliste sur le plan environnemental, c'est-à-dire représentative des contaminations observées dans l'environnement naturel. Plus largement, ce projet a pour objectif de répondre à des préoccupations économiques et sanitaires ainsi que de générer des données scientifiques afin de tester l'hypothèse selon laquelle la microalgue toxique *D. sacculus* pourrait avoir un impact sur la qualité cytogénétique des animaux étudiés. Il vise également à

fournir des éléments permettant d'évaluer le risque associé à *D. sacculus* pour les principales filières aquacoles, à savoir l'ostréiculture et la mytiliculture, à moyen et long terme. De plus, les connaissances acquises constitueraient une ressource précieuse pour les législateurs et les parties prenantes, les aidant à mieux gérer les écosystèmes conchylicoles et à prendre des mesures appropriées. Ce projet s'engage à produire des recommandations spécifiques pour les éleveurs d'huîtres et de moules confrontés à des problèmes de qualité de produits liés à l'exposition à *Dinophysis*, en mettant particulièrement l'accent sur *Dinophysis sacculus*, dont la propagation le long de la côte atlantique est favorisée par les changements globaux en cours.

2. Etat de l'art

2.1 *Dinophysis* spp.

2.1.1 Généralités, phylogénie et morphologie

Dinophysis est l'un des plus grands genres de dinoflagellés, avec plus de 200 espèces attribuées [14], dont 133 sont acceptées taxonomiquement [15]. Seulement dix d'entre elles, ainsi que deux espèces du genre étroitement apparenté *Phalacroma*, ont été signalées sans ambiguïté comme contenant des toxines DSP [16], [17], [18]. Le genre *Dinophysis* regroupe un ensemble de microalgues eucaryotes unicellulaires (super-classe des dinoflagellés *Dinophyta*). Ce genre cosmopolite comprend des espèces à large répartition géographique, comme *Dinophysis acuminata*, qui se trouve dans une large gamme de régimes de température [19], tandis que d'autres, comme *Dinophysis norvegica* et *Dinophysis tripos*, possèdent des tolérances environnementales plus restreintes principalement dans les eaux boréales et tropicales-tempérées [17]. Le genre *Dinophysis* comprend à la fois des dinoflagellés phototrophes et hétérotrophes [20], toxiques ou non [21]. L'identification taxonomique des *Dinophysis* spp. est principalement basée sur leur taille, leur forme et l'ornementation de leurs grandes plaques hypothécales donnant le contour de la cellule, la forme des sillons gauches et des 3 nervures qui les soutiennent [22]. La variabilité de forme peut donner lieu à des confusions d'identification, notamment entre *Dinophysis sacculus* et *Dinophysis acuminata* qui sont tout deux plats et de formes similaire.

2.1.2 Distribution

Sur le littoral français, *Dinophysis* a la particularité de ne proliférer que rarement à de fortes concentrations, mais il peut être observé en Manche, en Atlantique et en Méditerranée. Les concentrations maximales annuelles sont généralement inférieures à 10 000 cellules/L, cependant, des concentrations plus élevées de *Dinophysis* ont été enregistrées sur la côte normande en août 2016, soit un maximum de 803 000 cellules/L (valeur la plus élevée jamais atteinte pour ce taxon au cours des 30 années du programme de surveillance REPHY.). REPHY est un programme français de surveillance créé en 1984 [11]. Dans le cadre de ce programme national, *D. acuminata* et *D. sacculus* ont été identifiées comme les espèces dominantes à l'origine d'épisodes toxiques sur tout le littoral français [11].

La "saison toxique" est généralement comprise en été (entre Juin et Septembre)[23]. Bien qu'il s'agisse d'une espèce largement répandue dans les eaux froides et tempérées [24], les efflorescences de *D. sacculus* et son association avec les événements de DSP semblent être un problème strictement européen, en particulier dans les baies semi-fermées du bassin méditerranéen, y compris la mer Adriatique, la mer Tyrrhénienne et les côtes atlantiques du sud-ouest [25]. La présence de *D. sacculus* est importante dans les lagunes méditerranéennes françaises, mais elle est également observée dans d'importants sites aquacoles de l'ouest de la France [11].

2.1.3 Mixotrophie

Dinophysis sacculus est une espèce mixotrophe : elle est capable de se nourrir par hétérotrophie (cette espèce est prédatrice d'autres espèces planctonique) aussi bien que par autotrophie (via la photosynthèse) aussi bien que par hétérotrophie. Des études ultrastructurales, moléculaires et des analyses de pigments ont toutes démontrés que les espèces photosynthétiques de *Dinophysis* contiennent des plastes d'origine cryptophyte [26], [27], [28], [29], [30], [31], [32].

On a constaté que *Dinophysis* se nourrissait de *M. rubrum* par myzocytose, un type de phagotrophie où le prédateur perce sa proie à l'aide d'un pédoncule d'alimentation et en aspire le contenu. En effet, la chaîne alimentaire

de *D. sacculus* comprend trois maillons : ce dinoflagellé se nourrit du cilié *M. rubrum* par myzocytose (en aspirant ses plastes), et *M. rubrum* phagocyte *Teleaulax sp.* en intégrant ses plastes. Ainsi, les espèces mixotrophes *M. rubrum* et *Dinophysis spp.* nécessitent à la fois de la lumière et des proies vivantes pour se développer de manière durable [33], [34], [35].

2.2 Efflorescences algales de *Dinophysis spp.* (*Dinophyta*)

Suite à des études de concentrations environnementales le long des côtes françaises, il a été démontré que *Dinophysis spp.* est habituellement en contact avec les mollusques bivalves en France à une concentration de 10^2 cellules/L (REPHY, 2019). Occasionnellement, les efflorescences de *Dinophysis spp.* peuvent atteindre des densités cellulaires allant jusqu'à 10^3 - 10^7 cellules/L [17].

Les espèces toxiques du genre *Dinophysis* font l'objet d'une surveillance attentive. En revanche, les avis divergent quant à la possibilité de prédire les effets nocifs de la toxicité des DSP (Diarrhetic shellfish poisoning). Certaines études n'ont trouvé qu'une faible ou même aucune corrélation entre l'abondance des cellules de *Dinophysis spp.* et les niveaux de toxines de DSP [36], [37], [38].

À l'inverse, d'autres études ont obtenu une bonne corrélation entre l'abondance des cellules et la toxicité [39], [40]. En effet, de nombreux facteurs peuvent expliquer le caractère impondérable des efflorescences de *Dinophysis*. Tout d'abord, les efflorescences de *Dinophysis spp.* sont fortement liées aux conditions météorologiques. La stratification dans la colonne d'eau maintient ces efflorescences, et, à l'inverse, les courants induits par le vent influencent leur transport [17], de sorte que la distribution spatio-temporelle de l'efflorescence est difficile à prédire. Deuxièmement, les efflorescences de *Dinophysis spp.* présentent une forte variabilité intracellulaire des toxines au cours de l'efflorescence, et ce, même le même jour [41], [25]. Troisièmement, la dynamique de la proie *Mesodinium rubrum* est un autre facteur à prendre en compte, car sa disponibilité est l'un des principaux moteurs de l'activité de *Dinophysis spp.* ce qui modifie les quotas de toxines [42].

Pendant l'efflorescence, c'est la combinaison de l'abondance et de la toxicité des cellules qui affecte les coquillages [41], [25]. Une fois contaminés, les coquillages destinés à la consommation représentent un risque important pour la santé humaine via le transfert trophique des contaminants organiques que sont les toxines [43].

2.2.1 Toxicité

Quelques centaines de cellules de *Dinophysis spp.* toxiques par litre peuvent suffire pour provoquer des intoxications diarrhéiques chez l'Homme en consommant des mollusques et crustacés [43]. Les espèces du genre *Dinophysis* sont connues pour produire deux groupes de composés lipophiles bioactifs : l'acide okadaïque (OA) et ses dérivés, les dinophysistoxines (DTX), qui inhibent les phosphoprotéines phosphatases, qui sont des polyéthers contenant une fonctionnalité acide carboxylique et provoquent des effets diarrhéiques, tandis que les pecténotoxines (PTX) sont une famille de polyéther-lactones qui sont beaucoup moins toxiques par voie orale et n'induisent pas de diarrhée [44]. *Dinophysis sacculus* produit deux types de toxines lipophiles DSP : l'acide okadaïque (OA) et les pecténotoxines (PTX) [43]. Celles-ci ont été trouvées sans ambiguïté dans *Dinophysis sacculus* [45].

2.2.2 Acide okadaïque (OA) (Ehrenberg, 1841) :

L'acide okadaïque (AO) est un polyéther lipophile qui se caractérise par une fonction acide carboxylique avec trois assemblages de cycles de types "spiro-cétone". Il existe de nombreux dérivés acyclés de type esters pouvant être formés par voie métabolique [46], [43]. L'AO est un cytoinhibiteur très puissant dont le délai d'action est de 30 minutes à quelques heures après une exposition aiguë, c'est à dire la consommation de fruits de mer contaminés (principale voie d'exposition) à des niveaux élevés [6]. Ainsi, cette toxine est responsable des symptômes DSP chez l'Homme car elle peut provoquer des symptômes apparents de dysfonctionnement gastrique intestinal, tels que des nausées, des vomissements et une diarrhée, bien qu'elle ne soit pas considérée comme mortelle [47]. Cette diarrhée est sûrement provoquée par la stimulation de la sécrétion de Na^+ par les cellules intestinales, entraînant une accumulation de liquide gastro-intestinal intraluminal et des crampes abdominales [48]. L'AO peut également causer d'autres dommages graves chez les humains et les animaux, notamment de la neurotoxicité, de l'hépatotoxicité et de

la cytotoxicité [49]. Le seuil réglementaire pour l'acide okadaïque est fixé à 160 g d'équivalent d'acide okadaïque/kg de chair (pour l'ensemble de l'acide okadaïque, des dinophysistoxines et des pectenotoxines) [50].

En terme de mode d'action, c'est l'inhibition d'une PP2A (impliquée dans la transition de la métaphase à l'anaphase) par l'OA qui entraîne le blocage de la mitose [51]. En effet, l'acide okadaïque est reconnu pour son action inhibitrice sur l'activité des protéines phosphatases sérine/thréonine. Cette inhibition entrave la déphosphorylation des protéines qui servent de substrats à plusieurs protéinases, ce qui impacte divers processus métaboliques essentiels. Ces impacts s'étendent de la dynamique du cytosquelette et de l'adhésion cellulaire au contrôle du cycle cellulaire, ainsi qu'à la régulation globale de l'expression des gènes, notamment chez *M. edulis* [52], [53], [54].

Outre les cas d'intoxications ponctuels de DSP, des intoxications à bas bruit par l'OA existent chez l'Homme. En effet, de faibles niveaux d'OA ont altéré sur le long terme la progression du cycle cellulaire *in vitro* et *in vivo* chez des rats. L'étude du mécanisme sous-jacent a révélé que l'OA induisait des altérations du cycle cellulaire en inhibant la voie de signalisation p53 ou en induisant la voie de signalisation Jak/Stat3 [55].

2.2.3 Pectenotoxins (PTXs) (Ehrenberg, 1841) :

les PTX ont été identifiés dans un large éventail de coquillages et dans des algues du genre *Dinophysis* provenant du monde entier [56], [44]. Les pectenotoxines (PTX) sont un groupe de toxines qui comprend une quinzaine d'analogues (composés de polyéthers lactones chimiquement neutres, également appelés macrolides). La présence de ces différents analogues résultent principalement des transformations métaboliques des toxines dans les mollusques contaminés [44]. Le groupe méthyle du carbone 43 de la PTX2 subit probablement une série d'oxydation dans les glandes digestives des coquillages et donne ainsi naissance aux autres PTXn [57].

Isolées à partir de *Pactinopten yessoensis*, elles ont été identifiées comme : PTX1, PTX2, PTX3, PTX4, PTX6, PTX7 [58], [59]. Parmi ces toxines, seule la PTX2 a été détectée dans les cellules de dinoflagellés japonais [60].

Concernant le mode d'action des pectenotoxines, en particulier de PTX-2, peu d'informations sont disponibles dans la littérature. Il a été démontré que ces toxines se lient aux monomères d'actine-G et inhibent leur polymérisation en filaments. Le PTX-2 séquestre l'actine monomérique avec une constante de dissociation (Kd) de 20 nM [61].

2.3 Intérêt des modèles bivalves *M. gigas* et *M. edulis*

M. gigas et *M. edulis* sont des organismes sentinelles sessiles, en particulier dans les environnements côtiers (p. ex. [62]). Lorsqu'elles évoluent dans des environnements pollués, soumis à des apports fréquents et significatifs de substances chimiques, elles présentent une sensibilité à des polluants et présentent des anomalies génomiques, en particulier de l'aneuploidie [63], [64], [65], [66], [67].

3. Matériel et méthode

3.1 Méthode de recherche bibliographique

La méthode de recherche bibliographique, axée sur la littérature grise, s'appuie sur l'utilisation des moteurs de recherche Pubmed et Google Scholar ainsi que sur la plateforme d'archives institutionnelles de l'Ifremer nommée Archimer, en utilisant des mots-clés spécifiques. En complément, le réseau Researchgate a été consulté. Les publications ainsi recueillies ont été compilées et gérées grâce au logiciel de gestion de références Zotero. Cette approche a facilité la gestion efficace des données bibliographiques. Par la suite, la rédaction du rapport a été effectuée en utilisant le langage informatique du logiciel \LaTeX , connecté à Zotero pour assurer une intégration cohérente des références bibliographiques.

3.2 Méthode statistique

Les données brutes ont été compilées dans le logiciel excel, et exportées en format “.csv”. La méthode statistique employée dans ce stage repose principalement sur l'utilisation du logiciel R, version 4.0.5, développé par le R Core Team en 2013 [68]. R est un langage et un environnement spécialisé dans l'analyse statistique. Les graphiques ont été élaborés en utilisant le package ggplot2, conçu par Hadley Wickham en 2016 [69], qui offre des outils graphiques élégants pour l'analyse de données. De plus, les procédures spécifiques relatives à l'analyse des données

en cytogénétique se réfèrent au manuel d'exploitation et d'analyse de données de FloMax, intitulé "FloMax-Operating-Manual-Data-Analysis-1" [70]. Enfin, l'analyse de données du compteur multisizer a été effectuée avec le logiciel XLSTAT [71].

3.3 Culture de *Dinophysis sacculus*

Les cultures de cellules de *Dinophysis sacculus* utilisées durant tout le processus expérimental sont issues du laboratoire Ifremer PHYSALG (laboratoire de physiologie des microalgues) de Nantes qui est en charge de leur production pour les diverses études. La souche initiale (strain IFR-DAU-02A) a été isolée d'échantillons en provenance d'Arcachon dans ce laboratoire en 2015 et 2018 respectivement. Ces microalgues ont été cultivées dans de l'eau de mer naturelle stérilisée par filtration à 0,2 µm (FSSW).

Dinophysis sacculus est une espèce mixotrophe, c'est à dire que la chaîne trophique de cet organisme est nécessaire pour l'acquisition de sa capacité photosynthétique. En raison de la mixotrophie des espèces toxiques du genre *Dinophysis* et de la difficulté de les cultiver jusqu'à récemment, peu d'études ont examiné les effets de *Dinophysis spp.* de leurs toxines ou de combinaisons des deux sur les bivalves, tels que les huîtres [21]. Pour réaliser sa culture, *Dinophysis sacculus* a été nourri tous les deux jours avec sa proie ciliée *Mesodinium rubrum* (souche MBL-DK2009) [72], dans un rapport de 1 : 1 (prédateur : proie) selon Park et al. (2006). En ce qui concerne le cilié *M. rubrum*, celui-ci a été nourri trois fois par semaine avec le cryptophyte *Teleaulax amphioxeia* (Conrad) [73] (souche AND-0710). *Mesodinium rubrum* et *Teleaulax amphioxeia* ont été cultivées dans des flacons en L1/20-Si et L1-Si [74]. Les cultures des ciliés ont été diluées tous les jours et celles des cryptophytes toutes les semaines. Toutes les cultures ont été maintenues à $17,8 \pm 0,6$ °C, à une intensité lumineuse de $100 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Avant l'expérience, les cultures de *Dinophysis sacculus* ont été filtrées sur un tamis en nylon (avec des mailles de 11 mm) et légèrement rincé avec 75 mL de FSSW pour éliminer les cryptophytes et les ciliés. Les cultures ont ensuite été mises en attente dans 20 mL de FSSW pour obtenir des cellules avides de nourriture et pour obtenir un état en milieu de phase de croissance exponentielle le jour de l'expérience.

3.4 Origine des animaux

3.4.1 Origine des moules

Les moules communes proviennent toutes de l'écloserie expérimentale de la station Ifremer de la Tremblade PMMLT (plateforme des mollusques marins de La tremblade) où des fécondations externes *in vitro* ont été réalisées. Les animaux ont ensuite évolué à travers les locaux de zootechnie jusqu'à atteindre leur stade adulte (individus fertiles).

3.4.2 Origine des huîtres

Les huîtres proviennent également de l'écloserie du laboratoire mais ont suivi un parcours zootechnique en milieu ouvert sur estran dans le pertuis d'Antioche. Elles ont été échantillonnées et ramenées pour servir de modèles à l'étude.

3.5 Design experimental

3.5.1 Salle d'expérimentation

L'étude se déroule dans une salle d'expérimentation de niveau 2 (L2), conçue pour mener des expérimentations impliquant des agents biologiques présentant un risque potentiel de maladie chez l'Homme et/ou l'environnement, mais avec une probabilité de propagation peu élevée. L'eau de mer provenant de l'environnement naturel est filtrée par du sable et traitée aux UV (bactéricide, virucide et fongicide) puis conditionnée à différentes températures (chaude, ambiante, froide). La salle est également équipée d'un réseau électrique, ainsi que d'une cuve étanche destinée à récupérer les déchets présents dans l'eau de mer. *In fine*, l'eau collectée dans cette cuve est traitée par une entreprise spécialisée dans la gestion des déchets à risques biologiques. Une figure en annexe présente un schéma général du design expérimental (figure 20).

Mise en place du matériel

Pour chaque espèce, trois groupes ont été formés : un groupe "témoin", un lot avec une concentration de "500 cellules/L" et un lot avec une concentration de "5000 cellules/L". Chaque lot est composé de 60 individus marqués, ainsi que de 160 individus non marqués pour les huîtres et 350 individus non marqués pour les moules. Les animaux marqués (grâce à des étiquettes collées sur leurs coquilles comportant un code) sont destinés à la reproduction et aux analyses cytogénétiques ($n=20$ à T0, $n=20$ à T1/2, $n=20$ à T2). Les animaux sont stockés dans des clayettes, elles-mêmes contenues dans des bacs. Le niveau d'eau de mer s'élève à 1 cm au-dessus des animaux. Une partie des animaux non marqués est destinée aux dosages de toxines dans les chairs ainsi qu'aux analyses physiologiques (chaque lot nécessitant 16 huîtres et 45 moules). L'alimentation des bivalves est assurée par un bidon contenant 20 L d'une solution de *Skeletonema marinoi*, une microalgue utilisée comme source de nourriture naturelle (microalgue fourrage). Cette algue est cultivée au sein de la PMMLT et permet de fournir une alimentation continue aux bivalves tout au long de l'expérience. Pour ce faire, un système de goutte-à-goutte est employé pour approvisionner les bivalves en cette diatomée du lundi au samedi, 24h/24. La température ambiante est maintenue à 13°C afin de conserver l'eau des moules à cette condition. L'eau des huîtres quant à elle est maintenue à 18°C grâce à un chauffage submersible (tube en verre quartz) (Figure 20 en annexe). La maintenance, comprenant le nettoyage et le renouvellement de l'eau des bacs, est réalisée chaque lundi, mercredi et vendredi. Elle inclut également la détection d'éventuels individus morts, qui sont ensuite placés dans des poubelles dédiées à cet effet. Le processus de goutte à goutte reproduit les conditions environnementales de contacts par intervalles de temps réguliers et espacés (intoxication par vagues successives). La température des huîtres est réglée à environ 18°C pour faciliter l'obtention de la phase de gamétogenèse souhaitée [75], et celle des moules est réglée à environ 13°C (température ambiante) qui est la température optimale d'obtention de gamètes chez cet organisme. Enfin, la photopériode est fixée de 9h-17h pour recréer le cycle naturel jour/nuit. Des vérifications de l'état de santé des cellules de *D. sacculus* ont été régulièrement réalisées au microscope photonique (Figure 15 en annexe).

3.5.2 Dosage des toxines

Les animaux non marqués restants sont destinés aux analyses d'accumulation des toxines (chaque lot nécessitant 100g de chair soit 60 (témoin), 80 (500 cellules/L) et 80 (5000 cellules/L) moules et 10 huîtres pour chaque lot) et aux analyses physiologiques (chaque lot nécessitant 16 huîtres et 45 moules). Le dosage est effectué par HPLC-MS (chromatographie en phase liquide à haute performance).

3.6 Acclimatation

La phase d'acclimatation de 7 jours vise à habituer les organismes aux conditions du laboratoire afin de prévenir tout stress susceptible d'influencer de manière significative les résultats expérimentaux. Le stress peut représenter un biais expérimental majeur, altérant ainsi les résultats et les conclusions. Tous les animaux ont été acclimatés au sein du laboratoire pendant une période d'une semaine. Durant cette période, les organismes des deux espèces ont été traités de la même manière quel que soit le lot (nourrissage, éclairage, maintenance...).

3.7 Contamination

3.7.1 Concentrations environnementales de contaminants choisies, justifications

Les concentrations choisies (500 et 5000 cellules/L) sont dites environnementales, c'est à dire représentative des contaminations naturelles des bivalves. En effet, il a été démontré que l'espèce *Dinophysis spp.* est en moyenne présente à une concentration de 10^2 cellules/L (REPHY, 2019) sur les côtes française. Les taux les plus élevés reportés *Dinophysis spp.* atteignent des densités cellulaires allant jusqu'à 10^3 - 10^7 cellules/L [17].

3.7.2 Modalités d'exposition

Une fois ces volumes calculés, ces microalgues toxiques sont mélangés avec *Skeletonema marinoi* dans un becher. Pour les deux espèces et pour les deux concentrations, environ 1/3 du becher est versé directement dans le bac et les 2/3 sont versés dans le bidon car destinés à une contamination via l'alimentation, au goutte à goutte. En effet, la contamination directe par la concentration environnementale est impossible car les bivalves ferment leur coquille lorsque l'eau est trop dense en cellules, débris ou particules [76]. Un mode de contamination au goutte à

goutte est à la fois nécessaire mais aussi représentatif des conditions environnementales où les animaux sont exposés à des "vagues" de phytoplancton et non à un environnement statique dans l'espace car des pics de concentrations trop élevées engendrent la fermeture des bivalves [76].

3.7.3 Consommations induites de cellules par heure

Tout au long du rapport, les lots sont désignés par "contrôle", "500 cellules/L" et "5000 cellules/L" selon la convention. En réalité, les bivalves ne sont pas directement exposés à des concentrations de 500 et 5000 cellules par litre. Il est donc plus approprié d'adopter une approche basée sur la consommation induite de cellules par litre et par heure. Pour obtenir cette valeur, le calcul suivant a été réalisé :

Calcul pour la concentration de 500 cellules par litre :

$$\frac{\text{Cellules/L}}{\text{heures}} = \frac{500}{24} \approx 20.833 \text{ cellules/L/h}$$

Calcul pour la concentration de 5000 cellules par litre :

$$\frac{\text{Cellules/L}}{\text{heures}} = \frac{5000}{24} \approx 208.33 \text{ cellules/L/h}$$

3.7.4 Durée d'exposition

Les bivalves subissent une contamination continue, 24 heures sur 24, tous les jours, à l'exception du dimanche en raison de l'absence du personnel. Cette étude est structurée en quatre phases : une première phase d'acclimatation, une deuxième phase de contamination d'une durée de deux semaines, suivie de trois semaines sans contamination (tous les lots traités de manière identique), puis une dernière phase de deux semaines de contamination (identique à la première phase de contamination) (Tableau 1).

Au cours de la troisième phase, sans contamination, tous les lots sont traités de manière identique aux lots témoins (Figure 21 en annexe).

TABLE 1. Phases expérimentales de l'étude

Phase	Durée	Modalité de la phase
Phase 1	1 semaine	Acclimatation
Phase 2	2 semaines (J0-J14)	Contamination
Phase 3	3 semaines (J14-J28)	Repos
Phase 4	2 semaines (J28-42)	Contamination

3.8 Analyses Cytogénétiques

3.8.1 Extraction d'Hémolymphe

60 huîtres ont été placées dans un bac de 5L contenant de l'eau de mer mélangée à du chlorure de magnésium (MgCl₂) concentré à 50g/L. Après une période d'acclimatation de 30 minutes, les huîtres ont naturellement ouvert leurs coquilles. Un processus de relaxation musculaire (myorelaxation) permet l'ouverture des valves, offrant ainsi un accès au muscle adducteur. L'hémolymphe peut alors être extraite de ce muscle à l'aide d'une seringue munie d'une aiguille hypodermique de calibre 25G. Cette réaction est due à la substitution du calcium par le magnésium, qui bloque les muscles en phase de décontraction, influant ainsi sur la contractilité des muscles d'invertébrés [77].

3.8.2 Analyse de la quantité relative d'ADN par cellule et du niveau de ploïdie chez *M. gigas* et *M. edulis* par cytométrie en flux

Pour évaluer la quantité relative d'ADN par hémocyte et le niveau de ploïdie chez *M. gigas* et *M. edulis*, des analyses au cytomètre en flux (CEF) ont été réalisées. Cette section se concentre sur l'analyse du niveau de ploïdie des cellules, une caractéristique essentielle dans la compréhension de la génétique de ces mollusques bivalves. Une fois l'hémolymphe recueillie dans des tubes Eppendorf numérotés (les volumes variant selon les individus), elle doit être préparée pour l'analyse cytométrique. 1 mL de tampon a été ajouté dans chaque tube pour extraire

les noyaux et prévenir leur agrégation, puis la solution a été filtrée dans chaque tube pour récolter les noyaux en éliminant les débris et particules pouvant interférer avec l'analyse. Le contenu des tubes a été transféré dans des tubes à hémolyse numérotés de manière identique aux Eppendorf pour assurer une correspondance précise et éviter les erreurs d'identification. Ensuite, une solution de DAPI a été préparée en mélangeant le réactif de marquage spécifique à l'ADN (solution DAPI) avec du tampon de cytométrie. 20 µL de DAPI ont été ajoutés par tube pour une concentration finale de 5µg/mL et une coloration efficace avec saturation de l'échantillon, puis les tubes ont été laissés reposer 30 minutes dans l'obscurité pour permettre au DAPI de se lier à l'ADN, assurant ainsi une coloration uniforme. Les tubes ont ensuite été chargés sur le cytomètre, où les hémocytes ont été passés à travers un faisceau UV excitant le DAPI, provoquant l'émission de fluorescence bleue. Cette fluorescence ainsi que d'autres paramètres tels que la taille et la granularité des cellules ont été captés par les détecteurs du cytomètre. Les données ont été collectées et analysées par le logiciel FloMax, qui a calculé les coefficients de variation (CV%) des pics obtenus, indiquant la précision et la résolution des populations cellulaires identifiées. Un test de normalité de Shapiro-Wilk et un test de significativité de Kruskal-Wallis ont ensuite été utilisés pour comparer les violin plots des groupes témoins (t0 et tfinal) entre eux et avec ceux des groupes "500 cellules par litre" et "5000 cellules par litre".

Isolation de l'ADN contenu dans les hémocytes

200 µL de suspension cellulaire ont été ajoutés dans un tube microfuge. L'isolement de l'ADN a été effectué selon un kit d'extraction et les instructions du fabricant (Qiagen, DNeasy Blood and Tissue Kit) avec de légères modifications. 20 µL de protéinase K (600 mAU/ml) ont été ajoutés, suivis de 180 µL de tampon AL (tampon de lyse des tissus et des cellules). Le mélange a été effectué par inversion 10 à 15 fois, puis une incubation à 37°C a été réalisée. Pour les lymphocytes et les cellules cultivées, une incubation de 3 heures a été effectuée, tandis que pour les échantillons de tissus, une incubation de 6 heures ou jusqu'à complète lyse du tissu a été réalisée. Si nécessaire, 200 µL supplémentaires de tampon AL ont été ajoutés. 200 µL d'éthanol ont ensuite été ajoutés, et le mélange a été effectué par inversion, suivi d'une incubation à température ambiante pendant 3 minutes. Le mélange a été pipeté dans la colonne de purification en résine, puis une centrifugation de 6000 × g pendant 1 minute a été réalisée. Ensuite, 500 µL de tampon AW1 (tampon de lavage) ont été pipetés dans la colonne, suivis d'une centrifugation à 6000 × g pendant 1 minute. L'écoulement a été jeté, puis 500 µL de tampon AW2 (tampon de lavage) ont été pipetés dans la colonne. Une autre centrifugation à plus de 6000 × g pendant 1 minute a été réalisée, suivie d'une nouvelle élimination de l'écoulement. Une centrifugation finale à plus de 6000 × g pendant 2 minutes a été effectuée. Enfin, la colonne de résine a été transférée dans un tube microfuge propre, et 200 µL de tampon AE (tampon d'élution) ont été pipetés dans la colonne. Une incubation à température ambiante pendant 1 minute a été réalisée, suivie d'une centrifugation à plus de 6000 × g pendant 2 minutes. L'éluat a été pipeté sur la colonne, puis une incubation à température ambiante pendant 1 minute a été effectuée. Une dernière centrifugation à 6000 × g pendant 2 minutes a été réalisée, et 1 mM de DTT a été ajouté à l'éluat. La conservation à 4°C a été effectuée, car l'ADN doit être utilisé dans un délai d'une semaine.

Détermination de la concentration d'ADN par Nanodrop

L'ADN a été quantifié en triplicats à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible NanoDrop. Le blanc est réalisé avec du tampon AE. Le volume analysé par le Nanodrop est systématiquement 2µL. Un fichier excel est exporté et une moyenne de 3 valeurs par échantillons est calculée.

Standardisation des concentrations d'ADN

Les moyennes calculées sont placées dans un tableau (Tab 2) et le volume d'ADN à pipetter est déterminé. Pour les calculs du volume à pipetter nous utilisons la formule suivante : $C_i \times V_i = C_f \times V_f$. Le volume d'eau ultra pure est calculé de la manière suivante : $V_{qsp} = V_i - V_f$

TABLE 2. Tableau de calcul du volume V_i à utilisé pour obtenir une concentration de 5ng par tube, en amont de la PCR.

Sample	Ci (ng/ μ L)	Cf(ng)	Vf(μ L)	$V_i(\mu$ L)	qsp(μ L)
1	6.20	5	100	80.65	19.35
2	11.67	5	100	42.86	57.14
3	6.57	5	100	76.14	23.86
4	10.73	5	100	46.58	53.42
5	12.80	5	100	39.06	60.94
6	10.75	5	100	46.51	53.49
7	11.13	5	100	44.91	55.09
8	9.13	5	100	54.74	45.26
9	12.07	5	100	41.44	58.56
10	8.27	5	100	60.48	39.52

Ainsi, nous obtenons une concentration en ADN de 5ng/ μ L dans tous les tubes.

Test de mise au point - contrôles négatifs

Réalisation d'une électrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse sur gel d'agarose est effectuée comme une vérification qualitative de l'amplification de nos séquences. Ainsi, cette électrophorèse est effectuée à partir des tubes de la PCR précédente.

La préparation de la structure de l'électrophorèse a été réalisée en plaçant le peigne dans la boîte, en s'assurant que le peigne ne touchait pas le fond de la boîte, et en appliquant du ruban adhésif sur les deux extrémités de la boîte pour la rendre étanche. Un gel d'agarose à 1% a été préparé en pesant 1,2 g d'agarose et en l'ajoutant à 120 mL de tampon TAE. La hotte a été allumée, et sous celle-ci, la solution d'agarose a été chauffée au four à micro-ondes sans serrer le bouchon pendant deux périodes de une minute avec une pause entre les deux, et la bouteille a été retirée dès qu'elle a commencé à bouillir. La bouteille a été refroidie sous l'eau froide jusqu'à ce que la solution d'agarose soit tiède, puis 7,5 microlitres de bromure d'éthidium à 5% ont été ajoutés à la solution d'agarose. Le gel a été coulé dans la boîte sous la hotte en veillant à ne pas créer de bulles d'air. Une fois le gel d'agarose solidifié, le peigne a été retiré et placé dans la cuve de l'électrophorèse, en le plongeant dans le tampon. Ensuite, 5 microlitres de solution (dans des tubes Eppendorf) ont été déposés en contact avec une microgouttelette de colorant de charge (bleu) sur de la paraffine, et le gel a été chargé en plaçant un marqueur de taille (1Kb) à chaque extrémité. Les électrodes ont été ajoutées, en plaçant l'électrode négative en haut et la positive en bas, et il a été vérifié que les bulles d'air montaient, ce qui indiquait que le courant électrique passait et que l'électrophorèse fonctionnait correctement. Environ une heure a été attendue pour que la migration des échantillons se fasse, puis le gel a été retiré de la boîte et placé dans le tiroir du système d'imagerie (Gel Doc XR+). Enfin, le protocole "BET" a été chargé sur le système et les dimensions du gel ont été ajustées avant de lancer l'analyse et d'enregistrer les résultats.

Purification de la séquence d'ADN GADPH

Afin de purifier la séquence d'ADN amplifiée par les différentes réactions de PCR, le contenu des 12 tubes utilisés pour la PCR, y compris le témoin positif, a été rassemblé dans un seul tube de 2 mL pour réaliser une précipitation de l'ADN. Le tube a été passé au vortex, puis 0,1 volume d'acétate de potassium 3M (4,40 μ L) a été ajouté, suivi de l'ajout de 2,5 volumes d'éthanol absolu (-20°C). Ensuite, le tube a été placé à -20°C pendant 2 heures, puis repassé au vortex. Après cela, une centrifugation pendant 30 minutes à 6000 g à -4°C a été effectuée, et le surnageant a été éliminé. Le contenu du tube a été lavé avec 1 mL d'éthanol absolu (-20°C), et le surnageant a été jeté. Enfin, le tube ouvert a été posé à l'envers sur du papier absorbant, 100 μ L d'eau ultra-pure ont été ajoutés, et le tube a été placé à -20°C. Après analyse en triplicat au NanoDrop nous savons que cet ADN est concentré en moyenne à hauteur de 63,87 ng/ μ L.

Obtention des courbes de calibration

L'obtention des courbes de calibrations se fait après une série de calculs réalisés dans le but de connaître le nombre de molécules dans nos tubes et leurs poids. Pour les télomères, la concentration de l'échantillon de référence est de 2,66 ng/μL. Cet échantillon doit être dilué afin d'obtenir une concentration de 0,15 ng/μL. Dans ce travail, le gène de la glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (Gadph) a été utilisé en référence.

Réalisation des qPCR

Les télomères représentent des complexes nucléoprotéiques localisés à l'extrémité des chromosomes eucaryotes. Ils jouent un rôle crucial dans le maintien de la stabilité chromosomique en préservant les chromosomes contre la fusion, la dégradation et la recombinaison à travers toute leur longueur [78]. Les approches par qPCR et par Fiber FISH sont les deux méthodes complémentaires qui ont été préconisées pour la mesure des télomères dans notre étude. La méthode quantitative de qPCR suit le protocole de J O'Callaghan (2011) [79]. Les manipulations sont effectuées sous hôte (et lampe UV) avec des gants ainsi que des cônes, et de l'eau ultra pure autoclavée. Les qPCR sont effectués sur des plaques de 96 puits, chacune contenant l'ADN d'environ 40 individus. Pour chaque puits, les réactifs utilisés sont les suivants : 10 μL de master mix, 1 μL de Tel 1b, 1 μL de Tel 2b, 4 μL d'eau ultra pure et 4 μL d'ADN. Il y a également 2 témoins négatifs, qui ne contiennent pas d'ADN. Pour ces puits, 4 μL d'eau ultra pure sont ajoutés à la place de l'ADN. Les échantillons sont traités en duplicats, ce qui signifie que chaque individu est testé dans 2 puits, afin d'assurer la reproductibilité et la fiabilité des résultats. Tous les produits utilisés sont conservés dans la glace. Les puits de la plaque sont ensuite recouverts de barrettes pour plaque PCR, puis la plaque est placée dans un thermocycleur. Le protocole informatique pour SYBR est sélectionné et le cycle est démarré. À la fin de la manipulation, la plaque est jetée dans une poubelle prévue à cet effet, et les données sont recueillies sur une clé USB.

3.9 Analyses physiologiques

Toutes les analyses physiologiques ont été conduites au sein d'un laboratoire de niveau de sécurité biologique 2 (L2) équipé d'un banc physiologique permettant des mesures individuelles. Il est équipé de fluoromètres et d'oxymètres et offre la possibilité de réaliser en temps réel des mesures de la filtration et du taux d'oxygène sur 16 unités indépendantes (enceintes microcosme), chacune ayant un volume de 2 litres. La zone dispose de bassins pour le conditionnement des animaux en conditions hydrologiques contrôlées. Un système de bypass permet d'évacuer les eaux de rejet soit vers le réseau principal, soit vers une cuve étanche selon la dangerosité des effluents, traités par une entreprise spécialisée. La zone comprend aussi une salle sèche équipée de matériel informatique et instruments pour la biométrie animale. Les méthodes d'acquisition des paramètres sont non invasives et visent à évaluer la santé des animaux et caractériser des spécimens d'intérêt. La première unité sert de témoin (sans animaux), tandis que les 15 suivantes sont composées de bivalves exposés à *D. sacculus*. L'eau de mer (filtration à 1 μm et traitement UV), l'oxygène et le phytoplancton sont distribués à toutes les unités à l'aide de pompes à membranes. L'organisation des manipulations suit l'ordre défini dans le tableau 3 (Tab 3), respectant une progression croissante de la contamination pour garantir la conformité aux mesures sanitaires et au cadre expérimental.

TABLE 3. Déroulement des manipulations de physiologie

Jour	Durée d'exposition	Lot analysé
Jour 1	2h09	Lot témoin
Jour 2	2h09	Lot "500 cellules/L"
Jour 3	2h09	Lot "5000 cellules/L"

Phase préparatoire des analyses physiologiques

Pour amorcer les analyses physiologiques, une série d'étapes préliminaires est effectuée. Tout d'abord, le matériel expérimental ainsi que les équipements informatiques sont calibrés, et les tares sont réalisées, ce qui implique la pesée des sachets en plastique afin de soustraire ces poids ultérieurement. Par la suite, les animaux sont introduits

dans les unités numérotées de 2 à 16 (Annexe 16). Un cycle de 2 heures et 9 minutes est alors enclenché. Pendant cette période, le logiciel Labview enregistre en temps réel (à chaque seconde) les données des fluoromètres et des oxygènes dans un fichier Excel, qui sera ultérieurement soumis à une analyse (Annexe 17).

3.9.1 Mesures physiologiques sur banc

À la fin des 2 heures et 9 minutes, diverses mesures sont prises pour garantir la standardisation des procédures expérimentales. Notamment, le poids total des individus puis les coquilles seules ainsi que la chair isolée des deux espèces sont pesées afin d'uniformiser les lots, potentiellement sujets à des variations de taille et de poids. Ces différences pourraient engendrer un biais si elles se révèlent significatives entre les lots. L'eau des bacs a été prélevée à trois reprises par bac, à des intervalles de temps irréguliers afin d'effectuer des analyses avec un compteur de particules (compteur multisizer). L'heure de chaque prélèvement a été écrite. Cette eau est ensuite placée dans des piluliers, et chaque pilulier a reçu trois gouttes de formol afin d'entraver la fermentation des cellules algales. Ces échantillons sont ensuite conservés au réfrigérateur à une température de 4°C et à l'obscurité. Les mesures physiologiques sont effectuées de manière identique sur les huîtres et les moules.

Conservation du soma en vue d'analyses futures

Tous les échantillons, à l'exception des filtres, sont conditionnés dans des sachets plastiques ouverts et conservés à -20°C. Les chairs des animaux sont lyophilisées durant 48 heures pour obtenir le poids sec. Ensuite, les chairs sont à nouveau pesées. Enfin, les échantillons de manteaux sont également conservés pour des mesures futures de l'activité enzymatique.

TABLE 4. Description détaillée des différentes mesures effectuées dans le laboratoire ou déduites après traitement des données, ainsi que les calculs associés et les unités correspondantes

Mesure	Calcul	Unité
CE	Nombre de particules retenues par animal	SI ou %
CR	$ER \times \text{Débit}$	g/L/h
MES	Masse de MO par litre	mg/L
Consommation	$CR \times MES$	mg/h
Ingestion	Consommation – Masse pseudofèces	mg/h
Assimilation	Ingestion – production de fèces	mg/h
Absorption	Assimilation – respiration	J
SFG	$SFG = \text{Energie Assimilation} - \text{Energie Respiration} - \text{Energie perdue dans l'excrétion}$	J/g/h

3.9.2 Comptage des particules au compteur multisizer

Le compteur utilisé est le compteur de particules sans affichage Multisizer 4e de Beckman. Cet appareil permet le comptage des particules et la détermination de leur taille avec une résolution extrêmement élevée. Dans notre cas, il a permis de connaître le nombre de particules et la taille de chacune d'elles dans chaque volume d'eau prélevé dans les bacs du banc physiologique (un volume d'eau par bivalve). L'appareil prélève 500 µL d'eau et détermine la taille des particules grâce à la mesure de leur impédance. La taille de l'opercule choisie pour notre expérimentation est de 100 µm. Le Multisizer enregistre ensuite toutes les impulsions sous forme numérique (fichier Excel). Des rinçages réguliers ("flush") ont été effectués pour nettoyer le système. Les données incluent le nombre de particules par taille de référence et sont exportées sur une clé USB pour des analyses statistiques ultérieures. L'analyse des données a été effectuée avec les logiciels Excel et XLSTAT. Les données ont été compilées dans un même fichier, et une certaine gamme de données (identique entre individus) a été identifiée comme correspondant aux cellules *D. sacculus*. Ainsi, il a été possible de comparer les lots entre eux en termes de nombre de particules retenues ou non.

3.9.3 Détermination du poids sec de MO

Lors du deuxième pic uniquement, les fèces et les pseudofèces sont collectés dans l'eau pour chaque individu, séparément, et filtrés individuellement (puis rincés à l'eau du robinet pour enlever le sel) sur des filtres préalablement pesés et traçés (chaque filtre est associé à un support numéroté). Ensuite, ces filtres sont placés dans une étuve à

50°C pendant 24 heures, puis pesés à nouveau, avant d'être soumis à un four de laboratoire à 450°C pendant une heure pour calciner les filtres, suivis d'une pesée finale. La première étape permet d'obtenir le poids sec de la MO (fecès ou pseudofecès). La deuxième étape permet quant à elle d'obtenir le poids de la fraction inorganique contenue dans cette MO.

3.10 Dosage de la citrate synthase

Lors du premier pic seulement, une portion du manteau est prélevée puis pesée afin d'effectuer plus tard des dosages biochimiques (citrate synthase). Le dosage de la citrate synthase sur les manteaux de *M. edulis* et *M. gigas* a été effectué au sein de l'unité PHYTNESS dans le laboratoire LEMAR de Brest. Tout au long du séjour, un tableau comprenant les colonnes suivantes : "species", "individual", "batch", "treatment date", "plate number" et "generation" a été remplis. Ce tableau est crucial car il permettra aux valeurs d'être ajustées lors du traitement de données. En effet, les produits se dégradent tout au long des manipulations et il peut arriver qu'un effet "plaque" ou "produits" biaise l'expérience.

TABLE 5. Effectifs des lots pour chaque espèce et génération

Espèce	Génération	Lots	Effectif
<i>M. gigas</i>	F0	Témoins	$n = 30$
<i>M. gigas</i>	F0	Exposés	$n = 30$
<i>M. gigas</i>	F1	Témoins	$n = 15$
<i>M. gigas</i>	F1	Exposés	$n = 15$
<i>M. edulis</i>	F0	Témoins	$n = 15$
<i>M. edulis</i>	F0	Exposés	$n = 15$

3.10.1 Traitement des échantillons

Après l'expérience, les échantillons de manteaux sont prélevés, pesés et placés à -80°C. Les échantillons sont sortis du congélateur à -80°C, puis placés dans des tubes hémolyse où un volume de tampon PBS 0.1M est ajouté en fonction de la masse de l'échantillon (ratio 1 mg : 10 mL). Les manteaux avec le PBS sont broyés à l'aide d'un homogénéisateur ULTRA-TURRAX, puis centrifugés (600 g pendant 10 minutes à 4°C). Le surnageant est récupéré dans des tubes Eppendorf de 1.5 mL pour la mise en puits.

3.10.2 Préparation des solutions

Pour préparer les puits pour le dosage de la citrate synthase, plusieurs solutions doivent être préparées selon des spécifications précises. Pour la solution de PBS, 5 pastilles sont dissoutes dans 1 litre d'eau distillée. Pour la solution de Tris avec Triton X-100, 1.21 g de Tris sont dissous dans 40 mL d'eau distillée, le pH est ajusté à 8.0 avec HCl, 0.1 mL de Triton X-100 est ajouté et le volume est ajusté à 50 mL. Elle est conservée à 4°C jusqu'à 2 mois. Pour la solution d'Ac CoA (10 mM), 100 mg d'Ac CoA sont dissous dans 12.35 mL d'eau distillée et conservés à -80°C en aliquotes de 200 µL pendant plusieurs mois. Pour l'oxaloacétate (10 mM), 6.6 mg d'acide oxalacétique sont dissous dans 5 mL d'eau distillée, à préparer frais. Pour le DTNB (1 mM), 7.9 mg de DTNB sont dissous dans 20 mL de Tris 100 mM (pH 8.0), à préparer frais. Pour la BSA (50 mg mL⁻¹), 250 mg de BSA sont dissous dans 5 mL d'eau distillée et stockés en aliquotes de 1 mL à 4°C pendant jusqu'à 1 mois.

3.10.3 Mise en puit

Dans la phase de "mise en puit", les étapes sont les suivantes : pour la solution de Tris (Base) (200 mM, pH 8.0) / Triton X-100 (0.2% (vol/vol)), 100 µL sont prélevés. Pour la Solution d'Acetyl CoA (AcoA), 6 µL sont prélevés. Pour la Solution d'Oxaloacetate (10 mM), 10 µL sont prélevés. Pour la Solution de DTNB (100 µM), 20 µL sont prélevés. Enfin, pour l'Échantillon (manteau) préparé, 64 µL sont prélevés. Enfin, la concentration en protéine est calculée grâce à la méthode Bradford sur des homogénats avec PBS pour ajuster les valeurs.

3.11 Design experimental de l'élevage larvaire

3.11.1 Experimentation principale : embryotoxicité sur la génération F1 non-exposée, descendante d'une génération FO exposée

Pour chaque lot, l'aménagement comprend trois bacs de 30 L de scobalite destinés à abriter les larves des moules et des huîtres respectivement. Pour chaque espèce, neuf jarres ont été remplies avec de l'eau filtrée, traitée à l'aide de filtres physiques et de rayons UV. Par la suite, tous les deux jours, l'eau est filtrée à travers des tamis pour récolter les larves, puis de l'eau de mer filtrée fraîche est réintroduite. Au fur et à mesure de l'élevage, la taille des mailles des tamis est ajustée à celle des larves, de manière à atteindre une taille finale de 250 micromètres, à partir de laquelle les larves deviennent oeillées et pédonculées, et sont ainsi prêtes à se fixer.

3.11.2 Experimentation "Epsilon" : embryotoxicité sur la génération F1 par contact direct

En plus de l'expérience principale, une manipulation consistant à analyser l'impact direct de *D. sacculus* sur les larves D d'huîtres et de moules en contact avec *Dinophysis sacculus* à été rajoutée. 3 lots ont ainsi été formés : le lot contrôle, le lot "500 cellules par litres" et le lot "5000 cellules par litres" pour les moules. Pour les huîtres 4 lots ont été formés : le lot contrôle, le lot "500 cellules par litres", le lot "5000 cellules par litres" et le lot "50000 cellules par litres".

3.12 Test écotoxicologique « larve de bivalve »

Fécondation

Lorsque la ponte est observée dans les bacs, les parents sont regroupés dans un bécher de 5L. La solution d'eau de mer contenant des ovocytes est filtrée à travers des filtres de 85, 60 puis 45 micromètres pour ne retenir que des ovocytes, quelle que soit leur taille. Cette solution est ensuite transférée dans un autre bécher de 5L d'eau de mer.

Pour l'expérience "Epsilon", les ovocytes de moules non-contaminés (témoins) sont aussitôt répartis dans trois béchers de 1L dont un est additionné avec 500 cellules de *D. sacculus* et un avec 50000 cellules de *D. sacculus*. Pour les huîtres, quatre bechers ont été préparé : un contrôle, un becher avec 500 cellules de *D. sacculus*, un becher avec 500 cellules de *D. sacculus* et enfin un dernier becher avec 50000 cellules de *D. sacculus*. Ensuite, les ovocytes fécondés sont mis en élevage dans des jarres de 30L d'eau de mer à 25°C.

Ensemencement des jarres en écloserie expérimentale

Pour chaque jarre, 100 µL (en triplicats) de ces solutions (85, 60 et 45 micromètres) sont observés au microscope photonique pour connaître la concentration initiale en ovocytes et pour contrôler leur qualité (Figure 18).

Pour les calculs des concentrations en ovocytes dans nos jarres, nous utilisons la formule suivante : $C_i \times V_i = C_f \times V_f$. Où C_i est la concentration dans un becher donné (5L), C_f la concentration une jarre donnée, V_i est le volume pipetté (100 µL) et V_f est le volume de nos jarres (30 L).

TABLE 6. Tableau descriptif du comptage d'ovocytes dans l'objectif d'ensemencer les jarres et d'obtenir une tendance vis à vis de l'effet reprotoxique de *D sacculus*. 'Lot' désigne le nom du groupe, 'n' indique le nombre d'individus dans chaque groupe, et 'Vtotal' donne le volume total récolté pour chaque groupe, mesuré en litres (L). Les triplicats sont des mesures (cellules de Malassez) exprimées en nombre d'ovocytes dans 50 microlitres (µL). 'M (ovocytes/mL)' représente la moyenne du nombre d'ovocytes par millilitre (mL), tandis que 'M dans le Volume total' est la moyenne du nombre d'ovocytes dans le volume total récolté. Enfin, 'Nombre d'ovocytes par individu' indique le nombre moyen d'ovocytes par individu dans chaque groupe.

Lot	n	Vtotal	ovocytes/50 µL	M ovocytes par mL	M Volume total	Ovocytes/ind
Témoin	56	3L	166;184;210	3700	11200000	196 500
500 cellules/L	59	4,5L	250;246; 227	12050	54225000	919 000
5000 cellules/L	43	4L	234; 250;215	11650	46600000	1 083 000

Fixation, lecture des lames et interprétations de l'effet tératogène

Pour chaque jarre correspondant à chaque lot, et selon les catégories de 45 et 60 micromètres, les larves ont été collectées dans des tubes Eppendorf et fixées avec du formol. Ces solutions ont été homogénéisées et lues au

microscope digital avec un grossissement de 100, sur des lames en verre (5 réplicats par groupe étudié). Les larves sont triées selon 7 catégories (Tableau ?? en annexe). Pour chaque réplicat, les occurrences d'anomalies larvaires sont totalisées et converties en pourcentage en les divisant par le nombre total de larves comptées, puis en les multipliant par cent. Ensuite, un test de normalité de Shapiro-Wilk et un test de significativité de Welch ont été utilisés pour comparer les boxplots des groupes témoins avec ceux des groupes "500 cellules par litre" et "5000 cellules par litre" indépendamment.

Placement des larves en micronurserie expérimentale

À la troisième semaine du processus d'élevage larvaire, les larves pédivéligères, prêtes à subir la métamorphose, sont filtrées à travers un tamis de 250 µm, puis transférées dans des bacs en micronurserie. Elles sont disposées sur des tamis au fond desquels de la microbrisure de coquilles d'huîtres a été déposée. Cette microbrisure est suffisamment fine (<300 µm) pour qu'une seule larve puisse s'y fixer 19.

4. Résultats

4.1 Observations hors protocole : Suivi de mortalité

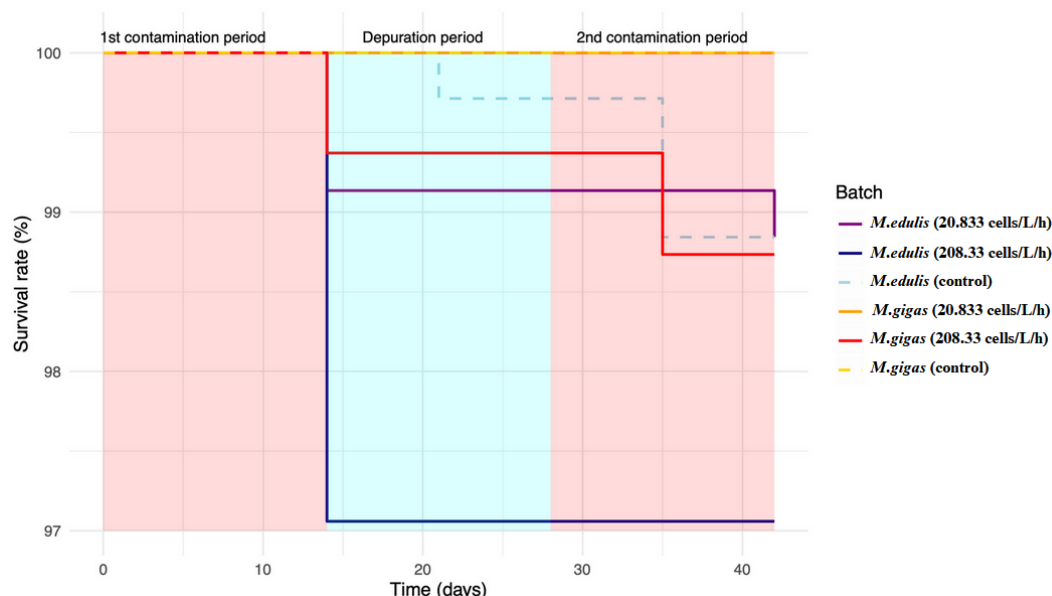


FIGURE 1. Courbe de survie des différents lots des espèces *Mytilus edulis* et *Magallana gigas* de l'étude exposés à 20,833 et 208,33 cellules de *Dinophysis sacculus* par litre et par heure lors de deux périodes de deux semaines chacunes.

TABLE 7. Tableau regroupant les pourcentage de survies des bivalves exposés aux deux concentrations de *Dynophysis sacculus* (20,833 et 208,33 cellules de *Dynophysis sacculus* par litre).

Condition	Mytilus edulis			Magallana gigas		
Time (day)	control	20.833 cells/L/h	208.33 cells/L/h	control	20.833 cells/L/h	208.33 cells/L/h
0	100	100	100	100	100	100
14	100	99.14	97.06	100	100	99.37
21	99.71	99.14	97.06	100	100	99.37
28	99.71	99.14	97.06	100	100	99.37
35	98.84	99.14	97.06	100	100	98.73
42	98.84	98.84	97.06	100	100	98.73

Les animaux morts de chaque lot ont été comptés chaque vendredi pour assurer un suivi régulier de la létalité de l'agent toxique (Tableau 7). Globalement, une mortalité plus importante est observée chez les moules exposées que chez les huîtres exposées. Le nombre de morts dans le lot "208,33 cellules/L/h" (scénario haut) est supérieur aux autres lots, quelle que soit l'espèce. Bien qu'un léger effet léthal concentration-dépendant et temps-dépendant soit observé, le nombre de morts reste globalement relativement faible (inférieur à 5% du nombre total d'individus des lots) (Figure 1). Les données relatives à la survie sont regroupées dans le tableau 7 (Tab 7).

4.2 Effets de *D. sacculus* sur les fonctions reproductives des bivalves *M. edulis* et *M. gigas*

Le nombre d'ovocytes a été dénombré une fois sur une cellule de Mallassez et rapporté au volume total de chaque bécher contenant un nombre connu de géniteurs. Ainsi, les valeurs sont exprimées en ovocytes/individu.

Les huîtres contaminées par *D. sacculus* paraissent pondre davantage que les huîtres du groupe témoin, avec un effet est dose-dépendant : les individus les plus contaminés (lot à 5000 cellules/L) paraissent avoir pondus plus que ceux du lot à 500 cellules/L. Pour des raisons de limites logistiques propre au laboratoire A2, cet effet n'a pas été observé avec des réplicats, ce qui empêche toute analyse statistique. Ces valeurs sont uniquement des observations préliminaires qui nécessitent la réalisation d'autres expériences pour confirmation (Figure 2).

Pour ce qui est des moules, le lot "500 cellules/L" semble avoir pondus 3,6 fois plus que le lot témoin, tandis que le lot "5000 cellules/L" semble avoir pondus 6,1 fois plus que le lot témoin. En ce qui concerne les huîtres, le lot "500 cellules/L" semble avoir pondus 4,6 fois plus que le lot témoin, et le lot "5000 cellules/L" semble avoir pondus 5,5 fois plus que le lot témoin.

Les contaminations par *D. sacculus* apparaissent comme n'affectant pas de façon significative le taux d'éclosion des bivalves. En effet, toutes les p-values sont supérieures à 0,05, ce qui indique un manque de significativité statistique et donc une absence d'effet notable sur ce critère (Figure 3).

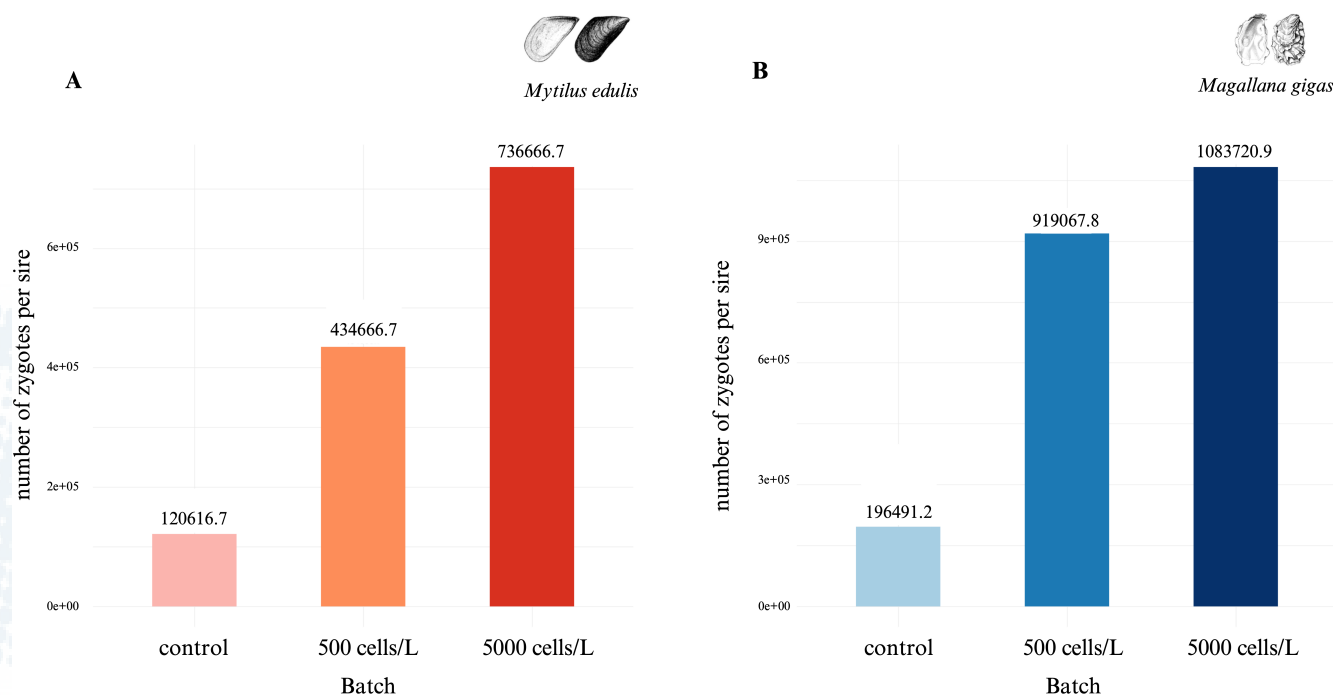


FIGURE 2. Nombre de zygotes produits par individu pour les trois groupes expérimentaux ("témoin", "500 cellules de *D. sacculus* par litre" et "5000 cellules de *D. sacculus* par litre") chez *M. edulis* (A) et *M. gigas* (B).

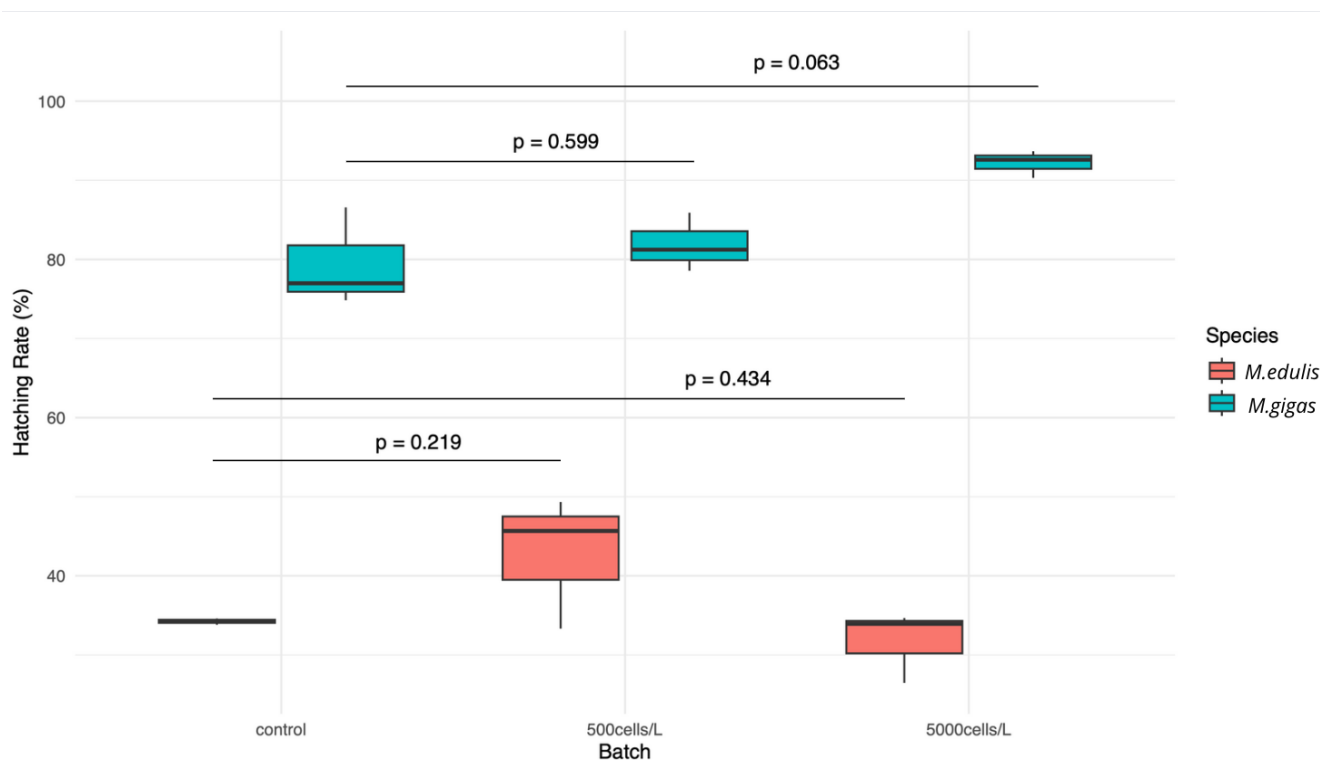


FIGURE 3. Taux d'éclosion observé pour les trois groupes expérimentaux ("témoin", "500 cellules de *D. sacculus* par litre" et "5000 cellules de *D. sacculus* par litre") chez *M. edulis* et *M. gigas*. Les p-values sont indiquées au-dessus des boxplots pour chacun des lots comparés.

4.3 Test écotoxicologique "larve de bivalve"

Effets sur *Mytilus edulis* au stade larvaire par contamination directe :

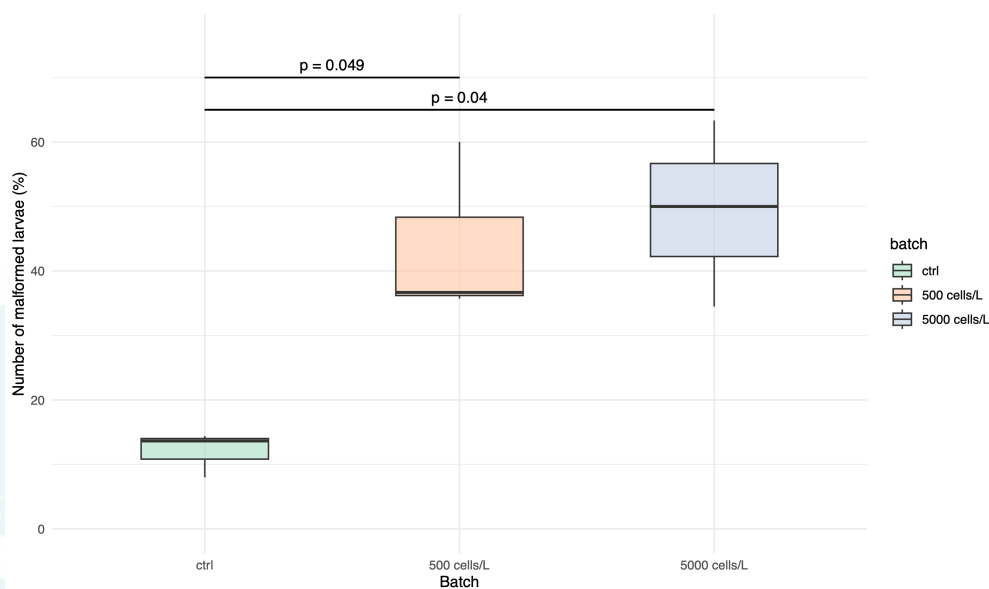


FIGURE 4. Effets de la contamination directe de *D. sacculus* sur les larves de *Mytilus edulis*. Les larves malformées ont été dénombrées et leur proportion est exprimée en pourcentage. Un filtre avec des mailles de 45 µm a été utilisé. Les différences entre le contrôle et les lots contaminés à 500 et 5000 cellules de *D. sacculus* sont statistiquement significatives lorsque $p < 0.05$.

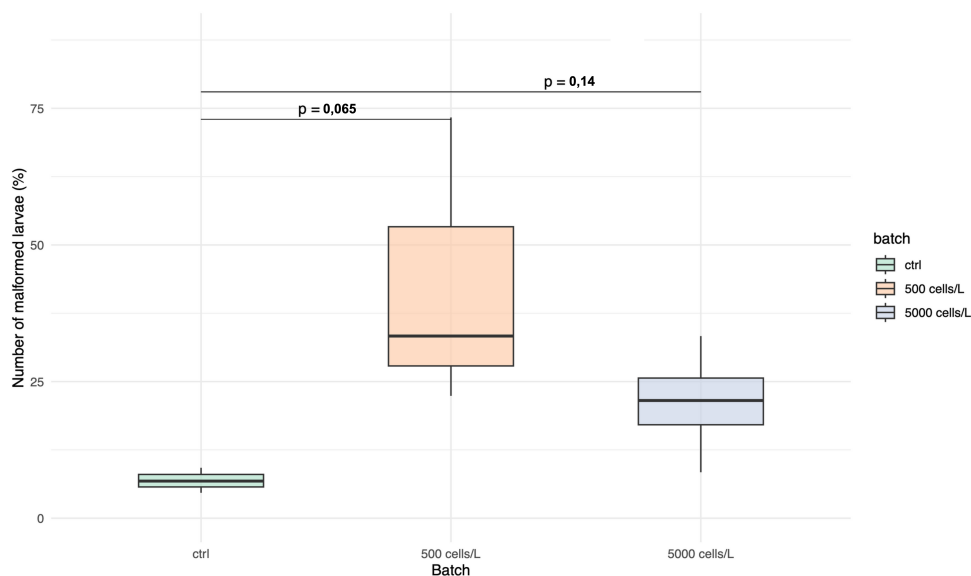


FIGURE 5. Effets de la contamination directe de *D. sacculus* sur les larves de *Mytilus edulis*. Les larves malformées ont été dénombrées et leur proportion est exprimée en pourcentage. Un filtre avec des mailles de 60 μm a été utilisé. Les différences entre le contrôle et les lots contaminés à 500 et 5000 cellules de *D. sacculus* ne sont statistiquement pas significatives car $p > 0.05$.

Les résultats montrent une augmentation nette et significative du pourcentage de larves malformées dans les groupes contaminés par rapport au contrôle pour le filtre avec des mailles de 45 μm qui est celui qui retient plus de cellules (Figure 4. Lorsque qu'un filtre avec des mailles plus larges (60 μm) est utilisé, aucune différence significative n'est observée entre le contrôle et les lots contaminés 5).

Effets sur *Mytilus edulis* au stade larvaire par contamination indirecte :

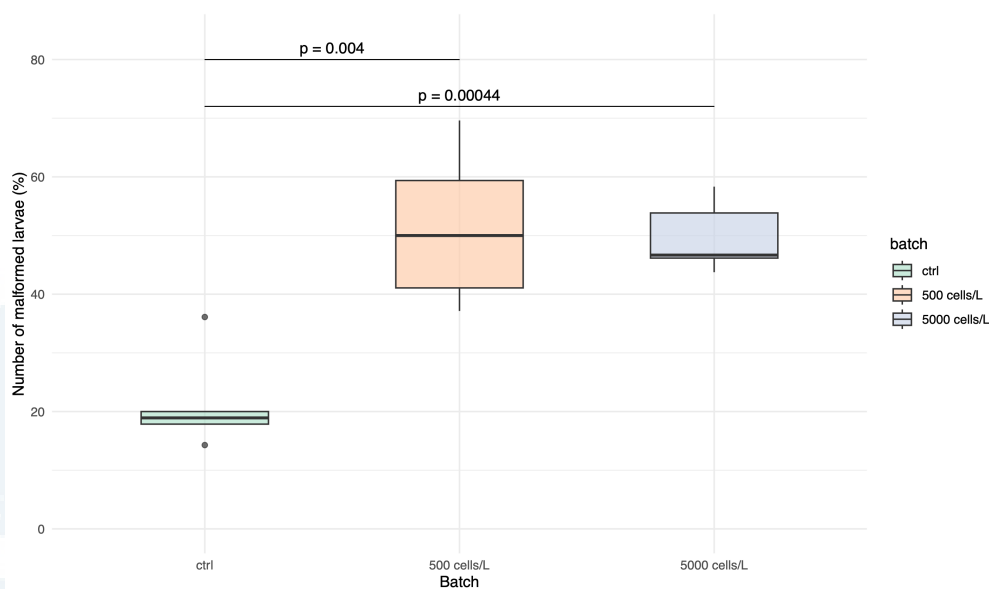


FIGURE 6. Effets de la contamination indirecte de *D. sacculus* sur les larves de *Mytilus edulis*. Les larves malformées ont été dénombrées et leur proportion est exprimée en pourcentage. Un filtre avec des mailles de 45 μm a été utilisé. Les différences entre le contrôle et les lots contaminés à 500 et 5000 cellules de *D. sacculus* sont statistiquement significatives lorsque $p < 0.05$.

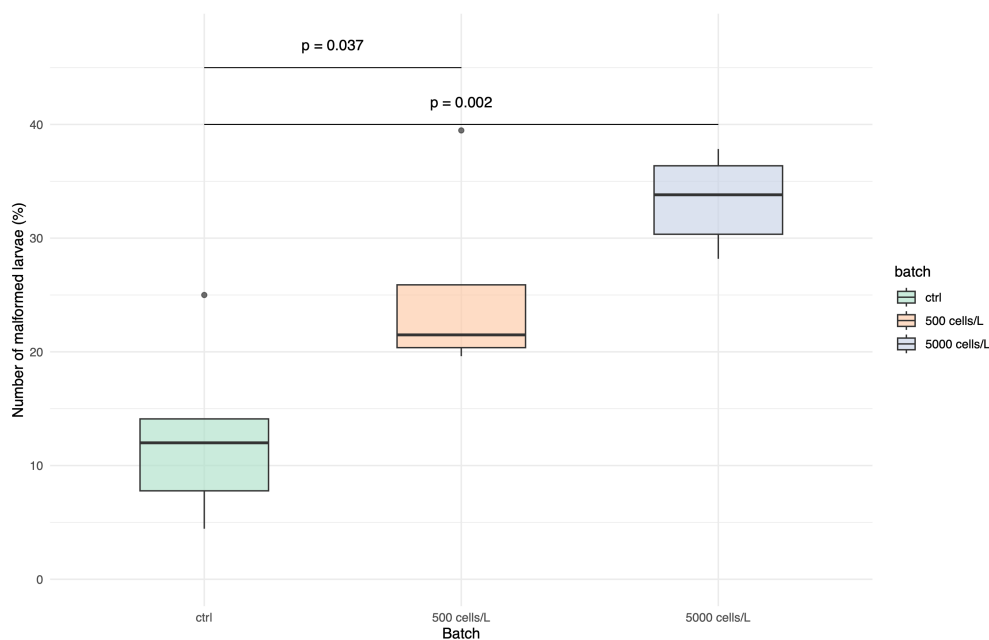


FIGURE 7. Effets de la contamination indirecte de *D. sacculus* sur les larves de *Mytilus edulis*. Les larves malformées ont été dénombrées et leur proportion est exprimée en pourcentage. Un filtre avec des mailles de 60 μm a été utilisé. Les différences entre le contrôle et les lots contaminés à 500 et 5000 cellules de *D. sacculus* sont statistiquement significatives lorsque $p < 0.05$.

Les larves exposées par contamination indirecte montrent une sensibilité similaire à celles qui sont contaminées directement, avec une augmentation significative du pourcentage de larves malformées dans les groupes contaminés par rapport au contrôle (Figure 6 et 7). Pour conclure, la contamination directe des larves D de moules par les microalgues toxiques *D. sacculus* a un impact similaire à celui de la contamination indirecte (contact direct des parents F0 uniquement).

Effets sur *Magallana gigas* au stade larvaire par contamination directe :

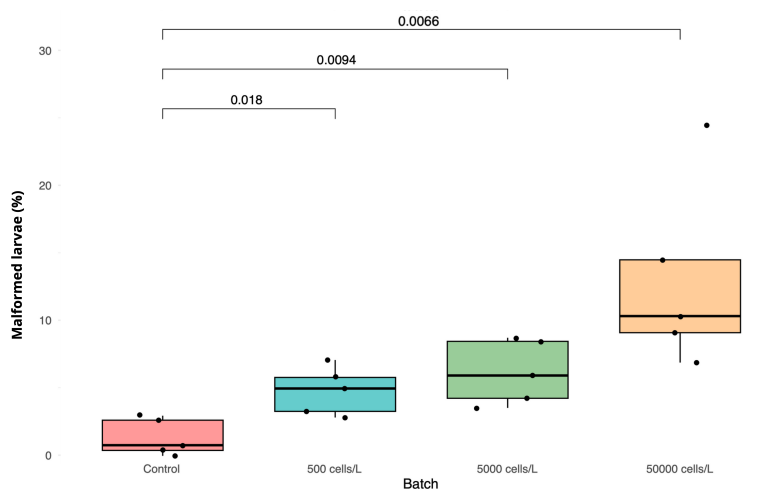


FIGURE 8. Effets de la contamination directe de *D. sacculus* sur les larves de *Magallana gigas*. Les larves malformées ont été dénombrées et leur proportion est exprimée en pourcentage. Un filtre avec des mailles de 60 μm a été utilisé. Les différences entre le contrôle et les lots contaminés à 500 et 5000 cellules de *D. sacculus* sont statistiquement significatives lorsque $p < 0.05$.

Les résultats montrent une sensibilité des larves de *Magallana gigas* à la contamination directe par *D. sacculus*, avec une augmentation significative du pourcentage de larves malformées dans les trois lots de contaminations (500, 5000 et 50000 cellules par litre). Plus la dose est élevée, plus le nombre de malformations est important. Avec une dose de 50000 cellules/L en contamination directe, on observe une proportion de près de 10% de larves malformées (Figure 8).

Effets sur *Magallana gigas* au stade larvaire par contamination indirecte :

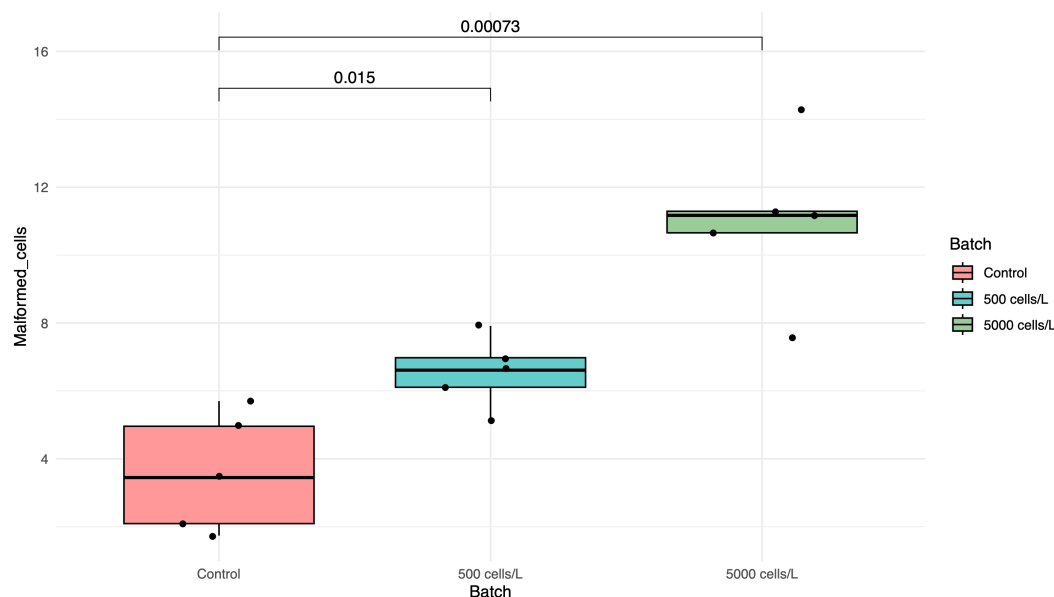


FIGURE 9. Effets de la contamination indirecte de *D. sacculus* sur les larves de *Magallana gigas*. Les larves malformées ont été dénombrées et leur proportion est exprimée en pourcentage. Un filtre avec des mailles de 60 μm a été utilisé. Les différences entre le contrôle et les lots contaminés à 500 et 5000 cellules de *D. sacculus* sont statistiquement significatives lorsque $p < 0.05$.

Les larves d’huîtres ayant subi une contamination indirecte montrent une sensibilité significative pour les deux lots de contamination, avec une différence significative du pourcentage de larves malformées dans les groupes exposés au contaminant (500 et 5000 cellules par litre) par rapport au contrôle. Ici aussi, on observe un impact qui paraît croître à mesure que la dose augmente (Figure 9).

Pour conclure, comme pour les larves de moules, la contamination directe des larves d’huîtres par les microalgues toxiques *D. sacculus* a un impact similaire à celui de la contamination indirecte (contact direct des parents F0 uniquement).

Globalement, les larves de ces bivalves subissent les mêmes dégâts, que la contamination soit directe (par contact des larves avec les microalgues toxiques) ou indirecte (par le contact direct des parents F0 uniquement). En outre, les dommages sur le développement sont quantitativement plus importants chez les moules, où jusque la moitié de la population étudiée était malformée (Figure 4).

Lors de cette analyse, les larves de *Magallana gigas* et *Mytilus edulis* ont montré des malformations de plus en plus sévères à mesure que les concentrations de *Dinophysis sacculus* augmentaient. Ces anomalies peuvent être classées en différentes catégories, allant de larves normales à des embryons sévèrement déformés (tableau 11).

4.4 Analyses cytogénétiques

4.4.1 Niveau de ploïdie : analyses par cytométrie en flux (CEF)

Chez *Magallana gigas*

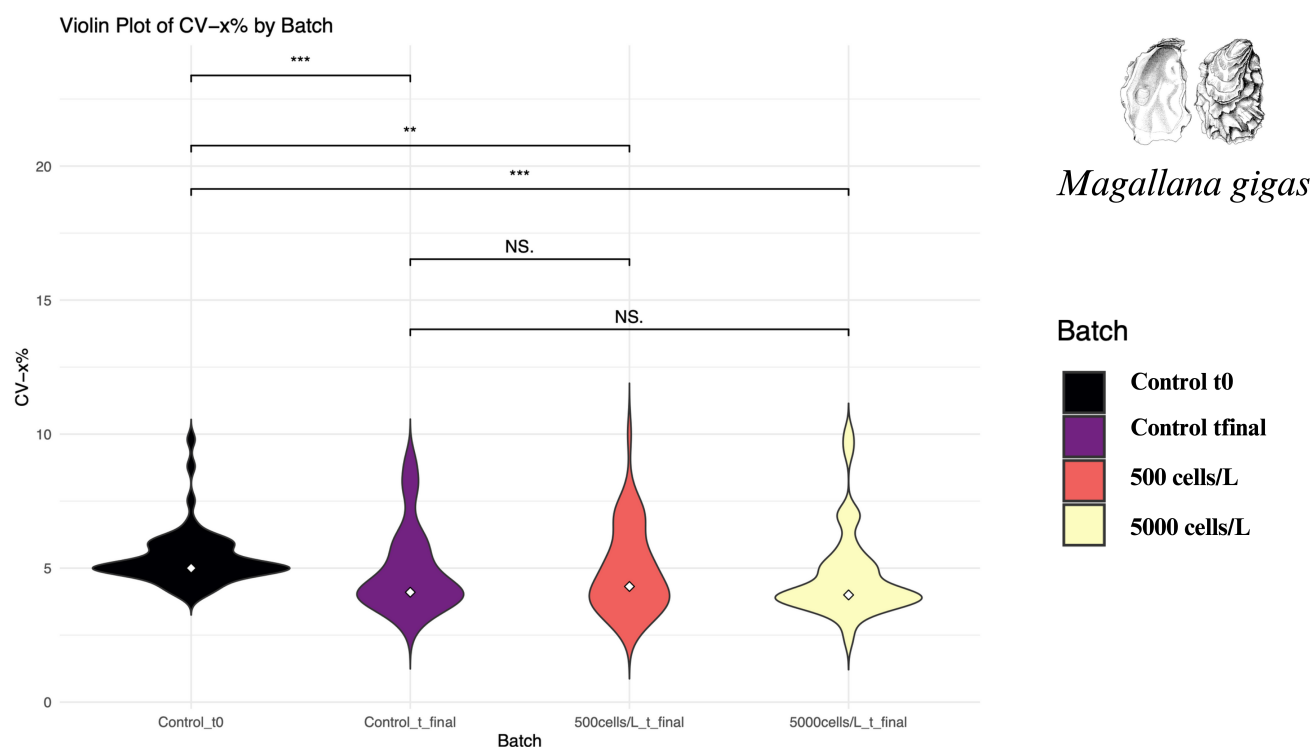


FIGURE 10. Violinplot des coefficients de variation (CV%) mesurés par la largeur à mi-hauteur (finesse) du pic. Les résultats ont été obtenus pour quatre groupes expérimentaux ("témoin t0", "témoin tfinal", "500 cellules de *D. sacculus* par litre à tfinal" et "5000 cellules de *D. sacculus* par litre à tfinal") chez *Magallana gigas*. Le lot "t0" correspond aux huîtres avant exposition, tandis que les lots "tfinal" correspondent aux huîtres après exposition. Les p-values sont indiquées au-dessus des violinplots pour chaque comparaison entre lots, avec des symboles distincts indiquant les p-values : * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$.

Le CV% du pic d'échantillon est une valeur caractéristique de l'intégrité de l'ADN, il s'agit de la largeur à mi-hauteur du pic. Un pic fin a une valeur basse de CV%, ce qui indique que l'ADN de l'échantillon est moins dégradé. En revanche, plus les pics sont larges, plus la valeur des CV% augmente, ce qui suspecte un effet clastogène sur l'ADN. Les huîtres dont l'hémolymphe a été ponctionnée et analysée ont montré une amélioration de leur qualité cytogénétique au fil du temps (Figure 10). En effet, les lots à tfinal (fin de l'expérience) sont tous différents des huîtres à t0 (début de l'expérience). En revanche, quelle que soit la concentration en microalgues toxiques, aucun effet sur l'intégrité de l'ADN n'a été noté. Les p-values attestant de la significativité des résultats sont compilées dans le Tableau 8 (Tab 8).

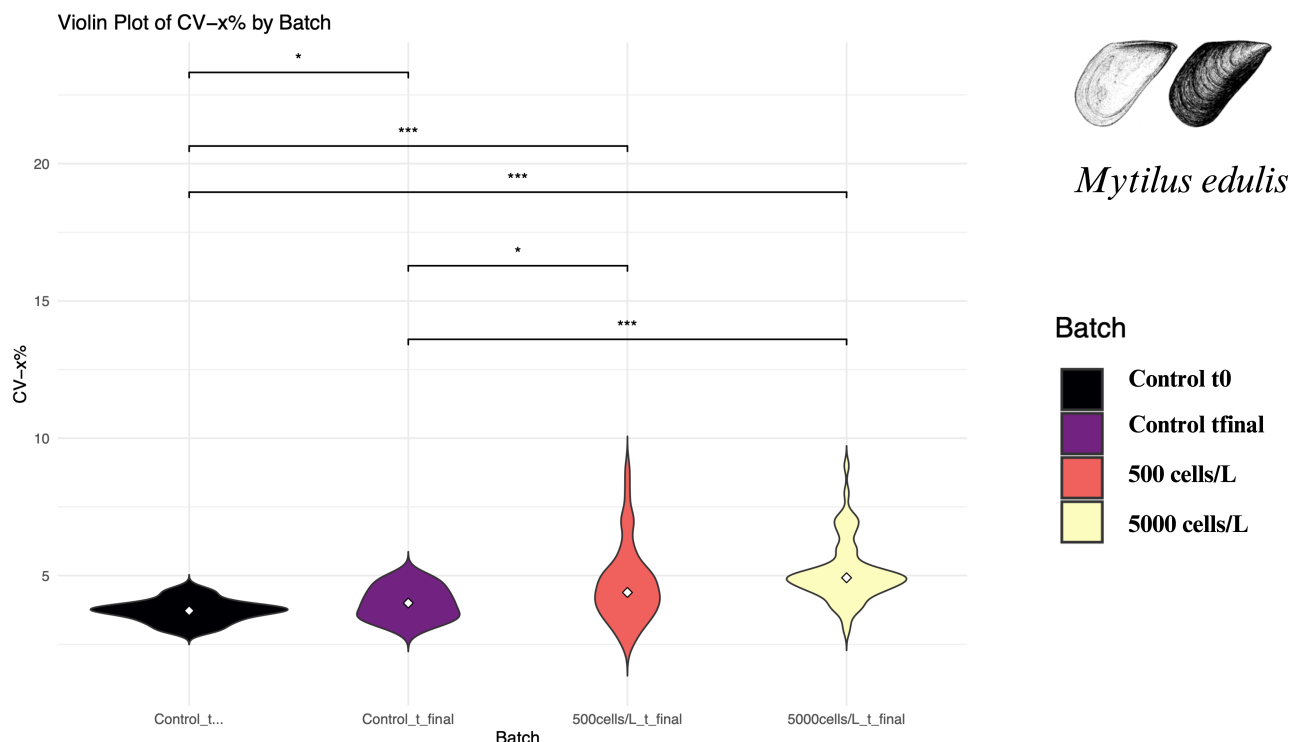
Chez *Mytilus edulis*

FIGURE 11. Violinplot des coefficients de variation (CV%) mesurés par la largeur à mi-hauteur (finesse) du pic. Les résultats ont été obtenus pour quatre groupes expérimentaux ("témoin t0", "témoin tfinal", "500 cellules de *D. sacculus* par litre à tfinal" et "5000 cellules de *D. sacculus* par litre à tfinal") chez *Mytilus edulis*. Le lot "t0" correspond aux huîtres avant exposition, tandis que les lots "tfinal" correspondent aux huîtres après exposition. Les p-values sont indiquées au-dessus des violinplots pour chaque comparaison entre lots, avec des symboles distincts indiquant les p-values : * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$.

Pour les moules, on observe un effet significatif du temps (en comparant les lots du début et de la fin de l'expérience) ainsi qu'un effet significatif des deux concentrations (en comparant le lot témoin de fin d'expérience aux lots exposés en fin d'expérience) (Figure 11). Les p-values attestants de la significativité des résultats sont compilées dans le Tableau 9 (Tab 9).

TABLE 8. Tableau comportant les p-values associées aux comparaisons des CV% entre les lots expérimentaux chez *Magallana gigas*. Les résultats ont été obtenus pour quatre groupes expérimentaux ("témoin t0", "témoin tfinal", "500 cellules de *D. sacculus* par litre à tfinal" et "5000 cellules de *D. sacculus* par litre à tfinal"). Le lot "t0" correspond aux huîtres avant exposition, tandis que les lots "tfinal" correspondent aux huîtres après exposition.

	Control_t0	Control_tfinal	500cells/L_tfinal
Control_tfinal	0.0051552135	NA	NA
500cells/L_tfinal	0.0424459710	1	NA
5000cells/L_tfinal	0.0003363315	1	1

TABLE 9. Tableau comportant les p-values associées aux comparaisons des CV% entre les lots expérimentaux chez *Mytilus edulis*. Les résultats ont été obtenus pour quatre groupes expérimentaux ("témoin t0", "témoin tfinal", "500 cellules de *D. sacculus* par litre à tfinal" et "5000 cellules de *D. sacculus* par litre à tfinal"). Le lot "t0" correspond aux moules avant exposition, tandis que les lots "tfinal" correspondent aux moules après exposition.

	Control_t0	Control_tfinal	500cells/L_tfinal
Control_tfinal	7.961675e-02	NA	NA
500cells/L_tfinal	7.334877e-05	1.006532e-01	NA
5000cells/L_tfinal	7.311518e-17	5.514573e-09	0.05939153

4.4.2 Analyse de la longueur des télomères par qPCR

Avant d'effectuer la qPCR, la qualité du matériel est testée pour savoir si la concentration en ADN est suffisante et si la taq polymérase amplifie correctement l'ADN. Pour se faire, un témoin positif (une séquence purifiée très concentrée d'huître creuse) et un témoin négatif (sans ADN) sont utilisés (Figure 12).

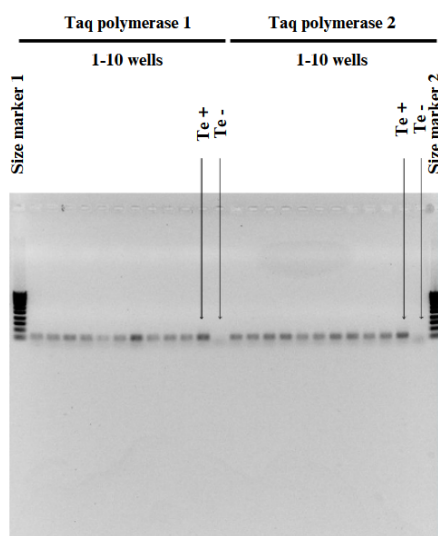


FIGURE 12. Electrophorèse en gel d'agarose des produits d'amplification de la séquence GADPH ; Comparaison entre deux produits de taq polymerases différents en vue de la PCR ; Les marqueur de poids moléculaire font 200 pb

Les résultats de l'électrophorèse en gel d'agarose montrent que les deux Taq polymérases testées amplifient efficacement la séquence GADPH. Les bandes observées dans les puits 1 à 10 pour chaque polymérase indiquent une amplification réussie de l'ADN cible. Les témoins positifs (Te+) présentent des bandes d'intensité élevée, confirmant la présence de la séquence cible dans l'échantillon. Les témoins négatifs (Te-) ne montrent aucune bande, ce qui indique l'absence de contamination ou d'amplification non spécifique (Figure 12). Ces résultats confirment que la qualité et la concentration de l'ADN sont suffisantes pour la qPCR, et que les conditions de qPCR sont optimales pour les deux polymérases testées.

4.4.3 Analyse de la longueur des télomères par fiber-FISH

Les résultats ne sont pas encore disponibles en raison de la nécessité de poursuivre les analyses de données

4.5 Analyses physiologiques

4.5.1 Compteur de particules multisizer

Les tests de comptage des particules ont été réalisés exclusivement sur l'eau des bacs des bivalves étudiés lors de l'essai de physiologie suivant le deuxième pic. Cela permet d'obtenir des données physiologiques reflétant une contamination prolongée et fluctuante, comme celle rencontrée dans des conditions naturelles.

Les figures et le tableau suivants présentent les résultats de l'efficacité de rétention des bivalves *M. edulis* et *M. gigas* soumis à différents traitements expérimentaux (contrôle, 500 cellules/L et 5000 cellules/L) lors du pic de contamination n°2 (phase 4) (Tableau 1).

Chez les moules (*M. edulis*), aucune différence significative n'a été observée entre les groupes, comme indiqué par le symbole "NS" sur le barplot (Figure 13). Cela signifie que l'exposition à 500 cellules/L ou 5000 cellules/L n'a pas affecté leur capacité de rétention par rapport au groupe contrôle.

En revanche, chez les huîtres (*M. gigas*), une différence significative a été observée entre le groupe contrôle et le groupe exposé à 500 cellules/L ($p = 0.03037$) comme indiqué par le symbole "*". De plus, une nette différence a été constatée entre le lot contrôle et le lot exposé à 5000 cellules/L ($p = 0.004709$), comme indiqué par le symbole "***" (Figure 14). Aucune différence significative n'a été trouvée entre les groupes exposés à 500 cellules/L et 5000 cellules/L ($p = 0.9087$), indiquée par "NS".

Enfin, le tableau 10 résume les résultats des tests statistiques de Shapiro-Wilk pour la normalité et de Kruskal-Wallis pour la significativité des différences entre les lots expérimentaux. Pour les moules (*M. edulis*), aucune différence significative n'a été détectée entre les groupes. Pour les huîtres (*M. gigas*), des différences significatives ont été trouvées entre le contrôle et les lots exposés, mais pas entre les deux lots exposés (500 et 5000 cellules/L) (Tableau 10).

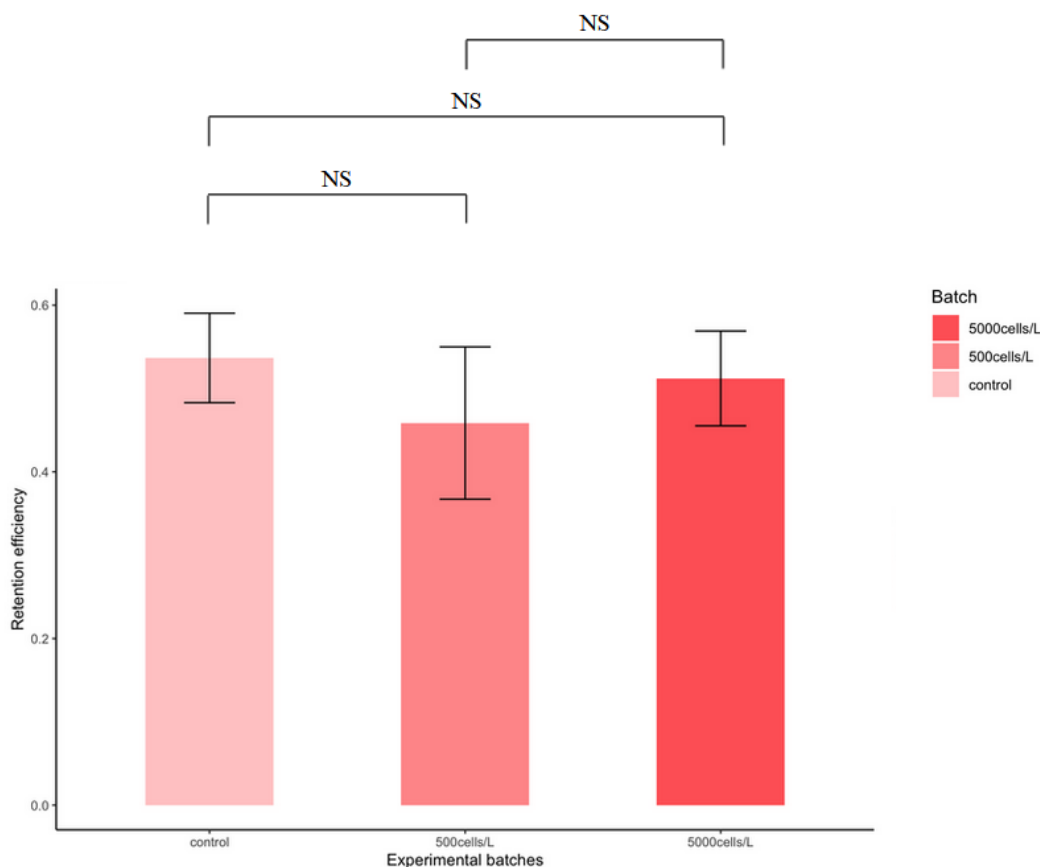


FIGURE 13. Barplot illustrant les données d'efficacité de rétention des différents lots expérimentaux de l'espèce *M. edulis* (contrôle, 500 cellules/L et 5000 cellules/L). Des tests de Kruskal-Wallis ont été réalisés pour comparer les lots et obtenir les p-values affichées entre les groupes. Les symboles distincts indiquent les valeurs p : * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$ tandis que "NS" signifie qu'aucune différence n'a été trouvée.

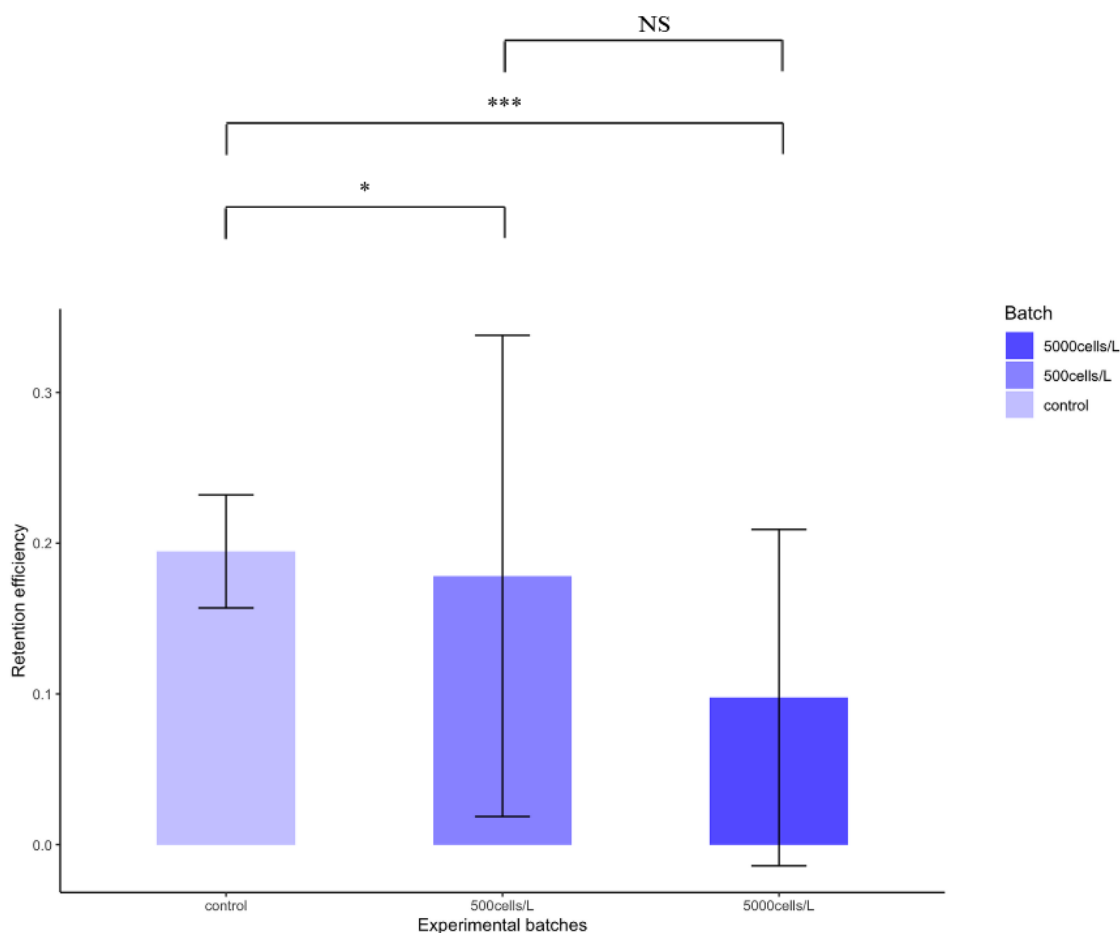


FIGURE 14. Barplot illustrant les données d'efficacité de rétention des différents lots expérimentaux de l'espèce *M. gigas* (contrôle, 500 cellules/L et 5000 cellules/L). Des tests de Kruskal-Wallis ont été réalisés pour comparer les lots et obtenir les p-values affichées entre les groupes. Les symboles distincts indiquent les valeurs p : * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$ tandis que "NS" signifie qu'aucune différence n'a été trouvée.

TABLE 10. Résultats des tests statistiques sur l'efficacité de rétention des bivalves *M. gigas* et *M. edulis*. Le test de normalité de Shapiro-Wilk ainsi que les tests de significativité de Kruskal-Wallis entre les lots ont été effectués. Une p-value inférieure à 0,05 indique une différence significative entre les lots.

Shapiro-Wilk normality test			
		W = 0.75874	p-value = 3.3e-07
Kruskal-Wallis rank sum tests			
Species	Comparison	Chi-squared	p-value
<i>M. edulis</i>	Control vs 500 cells/L	1.9308	0.1647
<i>M. edulis</i>	Control vs 5000 cells/L	0.58882	0.4429
<i>M. edulis</i>	500 cells/L vs 5000 cells/L	0.72301	0.3952
<i>M. gigas</i>	Control vs 500 cells/L	4.6882	0.03037
<i>M. gigas</i>	Control vs 5000 cells/L	7.988	0.004709
<i>M. gigas</i>	500 cells/L vs 5000 cells/L	0.013138	0.9087

4.5.2 Analyses du CR et de l'OCR

Les résultats ne sont pas encore disponibles en raison de la nécessité de poursuivre les analyses de données

4.6 Dosage de la citrate synthase

Les résultats ne sont pas encore disponibles en raison de la nécessité de poursuivre les analyses de données

4.7 Dosage des toxines dans la chair des bivalves

Les résultats ne sont pas encore disponibles en raison de la nécessité de poursuivre les analyses de données

5. Discussion

5.1 Mortalité

Une plus grande proportion de moules que d'huîtres sont mortes au cours de l'expérience. Cette différence de vulnérabilité et de sensibilité s'est manifestée non seulement entre les espèces, mais également entre le lot témoin des moules et les groupes exposés. Globalement, la mortalité a été plus élevée chez les moules que chez les huîtres, et chez les deux espèces, la présence de *D. sacculus* a augmenté le nombre de décès, même si une mortalité pourrait être attribuée aux dommages infligés au muscle adducteur par les interventions invasives répétées de ponction d'hémolymphe sur les mêmes individus au fil du temps. En revanche, il est important de noter que des effets létaux liés à l'exposition aux dinoflagellés toxiques chez les bivalves adultes sont connus (par exemple [80] pour *Mytilus galloprovincialis* contaminés avec *Ostreopsis ovata* ou encore [81] pour *Crassostrea virginica* contaminé avec *Pfiesteria shumwayae*).

5.2 Reprotoxicité

Observation d'une fécondité accrue chez *M. gigas* et *M. edulis*

Les observations concernant l'effet de la présence de *D. sacculus* sur la fécondité des bivalves ne permettent ni de valider ni de réfuter l'hypothèse selon laquelle ce contaminant a un impact reprotoxique. En effet, l'absence de réplicats empêche la réalisation d'une analyse statistique robuste. Néanmoins, cette observation ouvre la voie à d'autres études visant à valider ou réfuter l'hypothèse selon laquelle des microalgues peuvent directement influencer sur la fécondité des bivalves. Cet effet, accompagné d'une diminution de la qualité biologique, pourrait représenter un véritable risque pour la viabilité des générations suivantes après l'exposition d'une cohorte.

Dans la littérature, les expositions à des toxines ont très souvent pour conséquence de nuire à la qualité des gamètes : par exemple, le dinoflagellé *Alexandrium minutum* diminue la qualité biologique des spermatozoïdes et des ovules de *M. gigas* [82]. D'autres polluants émergents, comme les microplastiques influent négativement sur le nombre de gamètes de *Magallana gigas* [83]. En revanche, peu d'études décrivent l'influence des toxines sur le nombre de gamètes produites.

Les huîtres sont des organismes dont l'évolution a privilégié une stratégie "r", adaptée aux environnements et aux conditions changeants. Cette stratégie se caractérise par une fécondité élevée, une capacité de résilience et une évolution rapide des populations, ce qui les rend bien adaptées aux habitats instables. Cette capacité est accompagnée d'une augmentation du taux de croissance intrinsèque et de la diversité génétique des populations d'huîtres. Ces caractéristiques accroissent la probabilité de survie à long terme des espèces adaptées aux environnements instables [84]. De plus, il est envisageable que le stress induit par les toxines puisse entraîner une augmentation du nombre de zygotes produits, conformément à la logique de la stratégie "r". Cette dynamique de survie à long terme vise à générer une plus grande diversité génétique parmi les individus, dans l'espoir que certains d'entre eux soient mieux adaptés aux conditions changeantes.

Taux d'éclosion inchangé

Contrairement à nos résultats, l'article de Mu et Li paru en 2013 [85] a suggéré que les toxines de surfaces libérées par *A. catenella* peuvent affecter le succès d'éclosion des œufs de *M. gigas*, comme cela a pu être proposé auparavant [86]. En revanche, la présence de toxines de surface provenant de *Dinophysis spp.* n'a pas encore été

signalée, mais pourraient expliquer l'effet observé sur les gamètes et le succès de la fécondation [87]. L'article de Gaillard *et al* publié en 2020 donne des informations sur le succès de fécondation de gamètes de *M. gigas* en présence de différente concentration de *D. sacculus*, étape qui précède le taux d'éclosion. Cette étude a révélé pour la première fois que de faibles concentrations cellulaires (entre 500 et 5000 par litre) d'espèces toxiques du genre *Dinophysis*, notamment *D. sacculus* et *D. acuminata*, ainsi qu'une faible concentration de PTX2 (5 nM), peuvent perturber le succès de la fécondation de *M. gigas* et potentiellement affecter la reproduction de cette espèce. Une diminution du succès de la fertilisation a été observée à des concentrations aussi faibles que 500 cellules/L de *Dinophysis spp.* et 5 nM de PTX2, mais aucun effet de l'OA n'a pu être observé. L'effet sur le succès de la fécondation était plus important lorsque les deux types de gamètes étaient exposés de manière concomitante que lors d'expositions séparées, ce qui suggère un effet synergique [87].

Baisse de la viabilité des larves D : effets embryotoxique après contact direct

Les expositions à *D. sacculus* inhibent significativement le développement des larves D de *M. edulis* et de *M. gigas*. Ce résultat peut être expliqué de différentes manières. Premièrement, cette observation pourrait s'expliquer par l'effet de dommages mécaniques et/ou de toxines liées à la surface et/ou d'une libération rapide de composés bioactifs intracellulaires [86]. L'hypothèse que la présence de toxines à la surface des cellules d'une autre espèce de microalgue (*H. circularisquama*) puisse affecter les larves d'huîtres perlières après contact des cellules a été exposée par Basti *et al.* en 2011 [88]. L'acide okadaïque est reconnu comme cytotoxique. Celui-ci pourrait être en partie ou totalement responsable de ces malformations.

En effet, plusieurs articles ont prouvé l'impact embryotoxique de cette substance. Un travail réalisé sur un modèle d'embryologie, des embryons grenouilles *Xenopus laevis* a confirmé que le traitement à l'OA induit des malformations et un retard de croissance à 0.1 nM OA, une augmentation de la mortalité à 1 et 10 nM OA chez cette espèce après 2 jours d'exposition [89]. Escoffier *et al.* ont incubé des embryons de poisson médaka (*Oryzias latipes*) dans un milieu contenant de l'OA et ont observé un retard du développement de l'embryon [90].

Baisse de la viabilité : effets tératogènes multigénérationnels au niveau du développement embryonnaire

Un effet multigénérationnel a déjà été montré avec des microplastiques provenant de matériaux plastiques vieillis sur *M. gigas*. En effet, une activité locomotrice réduite, des anomalies et des arrêts de développement ainsi qu'un retard de croissance sur la génération F1 (larves D) ont été observés [91].

5.3 Analyses cytogénétiques

5.3.1 Impacts génotoxiques

Les effets génotoxiques de l'OA dépendent fortement du type de cellule et des conditions expérimentales [92], [93]. Certaines études, utilisant différents types de cellules, indiquent que l'OA est un agent aneugénique [94], [95], ce qui expliquera les dommages sur le matériel génétique des moules dans cette étude mais pas l'absence d'effet sur les huîtres.

Des essais de micronoyaux et FISH ont été menés sur la lignée cellulaire humaine Caco-2 (cellules d'adénocarcinome colorectal humain) afin de distinguer l'effet potentiellement clastogène de l'effet potentiellement aneugénique de l'OA. Les résultats indiquent que l'OA a entraîné la perte de chromosomes entiers, suggérant ainsi un potentiel aneugénique spécifique [94]. L'étude actuelle, dans l'état actuel des résultats ne suggère qu'un effet clastogène provoqué par *D. sacculus* et non un effet aneugène.

Il est donc possible que l'OA seul induise des effets aneugènes, tandis que l'exposition à *D. sacculus* puisse entraîner des effets clastogènes ou à la fois clastogènes et aneugènes. Comme mentionné précédemment, les effets génotoxiques dépendent fortement du type de cellule. Par conséquent, les hypothèses doivent être considérées avec prudence.

Chez *M. edulis*

La génotoxicité observée chez les moules peut s'expliquer par le caractère vulnérable de ces organismes vis à vis de l'OA, sur le plan génétique. En effet, après avoir exposé *Mytilus edulis* et *Magallana gigas* à ($\approx 0,1$ mg/coquillage

pendant 24 heures), ($\approx 0,05$ mg d'AO/coquillage/jour), ou (≈ 2 mg d'AO/coquillage/jour), Moira McCarthy et son équipe ont découvert en 2014 une augmentation significative de la fragmentation de l'ADN dans les cellules de l'hémolymphe et de l'hépatopancréas par rapport aux contrôles [96]. La fragmentation de l'ADN a été examinée par le test comète. Cependant, il n'y avait pas de différence dans la proportion de dommages mesurés entre les deux types de cellules, et une réponse dose-dépendante n'a pas été observée [96]. Les résultats de la présente étude démontrent quant à eux un risque accru en fonction de la dose.

Chez *M. gigas*

Dans l'article de Moira McCarthy [96], l'augmentation de la fragmentation de l'ADN due à l'OA était plus importante chez *Magallana gigas* à la concentration de toxine la plus élevée. Les résultats montrent ici que la qualité cytogénétique des huîtres s'améliore à travers le temps avec une baisse du CV% entre le t0 et les lots à tfinal. Cette observation peut-être expliquée par le fait que ces organismes ont, au cours de leur vie, vécu en environnement naturel et donc potentiellement exposés à des polluants génotoxiques. À ce jour, plusieurs publications ont mis en évidence et mesuré les effets aneugènes et clastogènes induits par les contaminants environnementaux [97], [98], [99], [100].

Le fait de les maintenir dans un environnement contrôlé, stable et idéal (température, nourrissage, entretien) a pu diminué ces altérations au cours du temps et donc réduire la largeur des pics obtenus en CEF. La réversibilité d'altération chromosomique due à des perturbations chimiques est bien connue et a déjà été démontrée dans la bibliographie en 1982 chez l'Homme [101]. Plus précisément, l'exposition d'organismes à des génotoxiques peut entraîner des lésions réversibles et irréversibles de l'ADN. Les lésions primaires de l'ADN, telles que les cassures simple ou double brin, les modifications des bases de l'ADN et les adduits à l'ADN peuvent être rapidement surmontés par la machinerie cellulaire de réparation de l'ADN [102].

5.3.2 Longueur des télomères

Les résultats ne sont pas encore disponibles en raison de la nécessité de poursuivre les analyses de données

5.4 Analyses physiologiques

5.4.1 Inhibition de la capacité de capture du phytoplancton

Les résultats obtenus à partir des analyses effectuées avec le compteur à particules montrent qu'en présence de *D. sacculus*, les huîtres présentent un taux de capture de phytoplancton diminué lors du pic n°2, et ce, pour les deux concentrations de contaminant. Ainsi, la présence de ces algues toxiques aurait un impact sur la physiologie de ces mollusques en les empêchant de capter les microalgues saines par filtration. Les premières études sur les huîtres ont conduit à des conclusions erronées selon lesquelles les huîtres pouvaient éviter l'accumulation d'algues toxiques et qu'elles étaient donc moins susceptibles de devenir toxiques que d'autres bivalves [5]. Aujourd'hui, il existe des preuves démontrant que les taux de capture des huîtres sont effectivement affectés par les dinoflagellés toxiques. En 1995, Waite *et al* ont suggéré que c'est l'interaction entre la matrice extracellulaire des cellules, les cils et le mucus des cténidies qui permettrait d'augmenter la rétention des particules [103]. Des caractéristiques propres du phytoplancton, telles que sa forme et sa flexibilité, peuvent affecter la capture des particules [104].

Ainsi, la nature des microalgues toxiques pourrait avoir un rôle dans la capacité des bivalves à capturer des cellules. En effet, la longueur moyenne de *D. sacculus* est de $38,8 \mu\text{m}$ [105] contre des tailles de l'ordre de $7,2\text{--}12,3 \mu\text{m}$ pour *S. marinoi*, la microalgue fourrage [106]. De plus, il est possible que *D. sacculus* ait eu un impact toxique sur les huîtres, les empêchant de capturer normalement les cellules planctoniques. En effet, certaines microalgues peuvent avoir un effet physiologique sur les bivalves. Par exemple, le dinoflagellé *Alexandrium spp.* a la capacité de paralyser le siphon et le muscle adducteur des bivalves qui l'ont ingéré, grâce à ses toxines paralysantes (PSP) [107].

En revanche, les moules ne voient pas leur capacité de rétention diminuer. Cette information contredit les études qui ont réalisé des expériences similaires avec la même espèce et des dinoflagellés toxiques. Une étude de 2020 a montré que le dinoflagellé *D. acuta* contenant des toxines DSP avait un effet négatif sévère sur la filtration des *M. edulis*, proportionnellement à l'accumulation de toxines retrouvées dans leur chair. Les observations de thèques vides de *D. acuta* à la fois dans le contenu de l'estomac et dans les fèces et l'absence de production de pseudo-fèces

impliquent que les moules ont effectivement ingéré et digéré les cellules de *D. acuta* contenant des toxines DSP et des PTX [108]

5.4.2 Détermination du poids sec de MO

Les résultats ne sont pas encore disponibles en raison de la nécessité de poursuivre les analyses de données

5.4.3 Analyses du CR et de l'OCR

Les résultats ne sont pas encore disponibles en raison de la nécessité de poursuivre les analyses de données

5.5 Dosage de la citrate synthase

Les résultats ne sont pas encore disponibles en raison de la nécessité de poursuivre les analyses de données

5.6 Dosage des toxines dans la chair des bivalves

Les résultats ne sont pas encore disponibles en raison de la nécessité de poursuivre les analyses de données

6. Conclusion

Les résultats de cette étude mettent en évidence plusieurs aspects importants de l'impact de *Dinophysis sacculus* sur les bivalves *Mytilus edulis* et *Magallana gigas* pour les deux concentrations choisies (20.833 cellules/L/h et 208.33 cellules/L/h). L'impact de cette microalgue toxique est à la fois générationnel (F0), avec des effets génotoxiques, reprotoxiques et physiologiques, et multigénérationnel, entraînant des malformations larvaires.

Concernant la génération F0, une différence de sensibilité à l'exposition aux toxines de *D. sacculus* a été observée entre les deux espèces étudiées. En effet, les analyses cytogénétiques ont révélé des altérations génétiques chez *M. edulis*, à la fois vis à vis du temps mais aussi de la dose. Cela met en évidence les effets génotoxiques potentiels de l'exposition à *D. sacculus* sur la génération F0 des moules. Cet effet est complété par une mortalité plus élevée chez (*M. edulis*). Les résultats concernant l'effet de ce dinoflagellé toxique sur la reproduction tendent à montrer une augmentation du nombre d'ovocytes lors de la ponte chez les deux espèces. Cependant, en l'absence de réplicats et d'analyses statistiques fiables, il est impossible de se prononcer de manière définitive sur l'impact potentiel de *D. sacculus*. Ces observations ouvrent la voie à d'autres études pour mieux comprendre cet impact, qui pourrait avoir des conséquences importantes au niveau populationnel. Les analyses physiologique ont révélées que lors du deuxième pic de contamination, les bivalves ont connus une chute de leur capacité à capturer du phytoplancton sain (*Skeletonema marinoi*) à 500 et 5000 cellules de *D. sacculus* par litre. Ceci suggère que la présence de ces microalgues toxiques perturbe leur physiologie, les empêchant de filtrer les microalgues saines.

Concernant la génération F1, des effets tératogènes importants ont été observés chez les deux espèces, avec une augmentation significative du pourcentage de larves malformées pour les deux concentrations d'exposition à *D. sacculus*. Ces résultats suggèrent donc un risque potentiel pour la viabilité et la santé des populations de bivalves dans les zones touchées par la présence de ces toxines.

Il aurait été intéressant de réaliser un suivi individuel de chaque bivalve afin de relier de manière plus robuste les analyses génétiques et physiologiques. Pour cela, les animaux devraient retourner en salle d'exposition pour pondre et être ponctionnés (t final) après les analyses sur banc physiologique, puis être sacrifiés à la fin. Cette approche permettrait de réduire les biais liés aux différences interindividuelles. Dans cette étude, les résultats sont tout de même mis en lien car ils proviennent de la même sous-population, possédant ainsi des caractéristiques similaires.

De plus, il aurait été pertinent de perfectionner le design expérimental de l'analyse de fécondité en mettant en place trois bacs par lot afin d'obtenir des triplicats. Par la suite, il faudrait séparer les individus selon leur sexe en fonction des gamètes émis durant la ponte, placer les spermatozoïdes et les ovocytes dans différents béchers (un bécher par individu), les compter, puis les mettre en contact et compter le nombre de zygotes. Enfin, les données pourraient être standardisées en fonction du poids de la chair de chaque animal. Cette approche permettrait d'obtenir des résultats plus robustes et de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents aux variations de fécondité observées.

Les multistresseurs représentent actuellement une problématique majeure en écotoxicologie. La coexistence des toxines avec d'autres contaminants et polluants émergents, tels que les plastiques (macro-, méso-, micro- et nanoplastiques), dans l'environnement marin est devenue inévitable. L'article de Lin [109] publié en 2021 souligne que la toxicité de l'acide okadaïque (OA) est exacerbée par une forte concentration de polystyrène, ce qui se traduit par une augmentation de la production de ROS (espèces réactives de l'oxygène). Cette approche est d'autant plus intéressante quand on sait qu'il a été prouvé que le potentiel génotoxique de l'OA ne se limite pas à l'induction directe de dommages dans le matériel génétique. En effet, il peut également altérer la réparation des lésions de l'ADN induites par d'autres composés génotoxiques [93].

D'autre part, les analyses transgénérationnelles pertinentes pour l'environnement offrent une réelle perspective à long terme en fournissant des résultats sur la génération F2, mais elles sont plus rares dans la littérature. Plusieurs publications réalisées sur des mollusques bivalves ont démontré des malformations de la génération F2 au stade larvaire, comme par exemple [110] avec du BDE-47 sur *Crepidula onyx* ou encore [111] avec des éléments traces métalliques sur *Crassostrea hongkongensis*. L'étude actuelle pourrait ainsi dépasser la simple quantification des effets d'une génération à l'autre en examinant la transmission des effets aux individus de la génération F2.



Remerciements

Je tiens sincèrement à remercier toutes les personnes avec qui j'ai pu travailler de près ou de loin. J'aimerais souligner l'agréable ambiance de travail et le suivi consacré aux stagiaires à l'Ifremer. Merci à chacun(e) d'entre vous pour votre générosité et votre esprit d'équipe.

À Abdellah Benabdelmouna, mon tuteur de stage qui a coordonné le projet GenoDino et encadré le volet zootechnique et cytogénétique du stage

Tout d'abord, merci Abdellah de m'avoir permis d'accéder à un nouveau stade de rigueur. Merci de m'avoir appris à douter de tout et à ne faire confiance en rien, même pas à soi-même. J'ai vraiment apprécié la bienveillance, le calme, le sérieux et la sérénité de ton encadrement.

À Joel Haure, qui a co-encadré le volet physiologie du stage

Merci Joel pour ton humour, la richesse de nos discussions, ton exigence et la pertinence de tes remarques.

À Cyrille François, qui a co-encadré le volet physiologie du stage

Merci Cyrille pour nos précieuses discussions, pour ton aide, ton honnêteté et tes conseils et plus particulièrement sur la manière d'envisager ma carrière scientifique dans la recherche.

À Christophe Ledu, avec qui j'ai travaillé en zootechnie et en cytométrie en flux

Merci Christophe pour ta disponibilité et ton aide tout au long de ce stage.

À Karine Salin, qui a encadré mes dosages enzymatiques au sein de l'unité PHYTNESS de Brest

Merci Karine pour ton accueil à Brest durant les 5 jours, ton savoir-vivre et ton sens de l'organisation. C'était un plaisir de travailler avec toi.

J'espère avoir mené ce stage à bien, avoir apporté une aide conséquente et présenté des résultats clairs et précis. Je suis convaincu que le projet prometteur GenoDino sera enrichi par de nouvelles études pertinentes et d'autres collaborations.



Références

1. DJOUADI, M. Plan aquaculture d'avenir 2021-2027. Créé : 11/03/2022. https://mer.gouv.fr/sites/default/files/2022-03/20220311_PLAN%20AQUACULTURES%20AVENIR%20version%20finale%20sign%C3%A9%20post%20SIA.pdf (mars 2022).
2. GOBLER, C. J. *et al.* Ocean warming since 1982 has expanded the niche of toxic algal blooms in the North Atlantic and North Pacific oceans. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **114**, 4975-4980. ISSN : 0027-8424, 1091-6490. <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1619575114> (2024) (9 mai 2017).
3. HALLEGRAEFF, G. M. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia* **32**, 79-99. ISSN : 0031-8884, 2330-2968. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.2216/i10031-8884-32-2-79.1> (2023) (mars 1993).
4. WELLS, R. E. *et al.* Can Adults with Mild Cognitive Impairment Build Cognitive Reserve and Learn Mindfulness Meditation? Qualitative Theme Analyses from a Small Pilot Study. *Journal of Alzheimer's Disease* **70** (éd. KHALSA, D. S.) 825-842. ISSN : 13872877, 18758908. <https://www.medra.org/servlet/aliasResolver?alias=iospress&doi=10.3233/JAD-190191> (2023) (3 août 2019).
5. SHUMWAY, S. E. A Review of the Effects of Algal Blooms on Shellfish and Aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society* **21**, 65-104. ISSN : 0893-8849, 1749-7345. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1749-7345.1990.tb00529.x> (2023) (juin 1990).
6. AMZIL, Z., SIBAT, M., ROYER, F., MASSON, N. & ABADIE, E. Report on the first detection of pectenotoxin-2, spirolide-A and their derivatives in French shellfish. *Marine Drugs* **5** (éd. INTERNATIONAL, M. D. P.) 168-179. <https://doi.org/10.3390/md504168> (2007).
7. JIANG, T., NIU, T. & XU, Y. Transfer and metabolism of paralytic shellfish poisoning from scallop (*Chlamys nobilis*) to spiny lobster (*Panulirus stimpsoni*). *Toxicon* **48**, 988-994 (2006).
8. JIANG, T., WANG, D., NIU, T. & XU, Y. Trophic transfer of paralytic shellfish toxins from the cladoceran (*Moina mongolica*) to larvae of the fish (*Sciaenops ocellatus*). *Toxicon* **50**, 639-645 (2007).
9. YASUMOTO, T., OSHIMA, Y. & YAMAGUCHI, M. Occurrence of a new type of shellfish poisoning in Tohoku district. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* **44**, 1249-1255 (1978).
10. YASUMOTO, T. *et al.* Identification of *Dinophysis fortii* as the causative organism of diarrhetic shellfish poisoning. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* **46**, 1405-1411 (1980).
11. BELIN, C., SOUDANT, D. & AMZIL, Z. Three decades of data on phytoplankton and phycotoxins on the French coast : Lessons from REPHY and REPHYTOX. *Harmful Algae* **102**. Global Harmful Algal Bloom Status Reporting, 101733. ISSN : 1568-9883. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568988319302069> (2021).
12. MARCAILLOU, B., SPENCE, G., COLLOT, J.-Y. & WANG, K. Thermal regime from bottom simulating reflectors along the north Ecuador-south Colombia margin : Relation to margin segmentation and great subduction earthquakes. *Journal of Geophysical Research : Solid Earth* **111**, 2005JB004239. ISSN : 0148-0227. <https://agupubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1029/2005JB004239> (2023) (B12 déc. 2006).
13. TRAINER, V. L. *et al.* Pelagic harmful algal blooms and climate change : Lessons from nature's experiments with extremes. *Harmful Algae* **91**, 101591. ISSN : 15689883. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1568988319300356> (2023) (jan. 2020).

14. HALLEGRAEFF, G. M. & LUCAS, I. A. N. The marine dinoflagellate genus *Dinophysis* (Dinophyceae) : photosynthetic, neritic and non-photosynthetic, oceanic species. *Phycologia* **27**, 25-42. eprint : <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-27-1-25.1>. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-27-1-25.1> (1988).
15. GUIRY, M. *Algaebase* (éd. GUIRY, M. & GUIRY, G.) World-wide electronic publication. searched on 28 February 2020. 2020. <http://www.algaebase.org>.
16. MACKENZIE, L. *et al.* Pectenotoxin and okadaic acid-based toxin profiles in *Dinophysis acuta* and *Dinophysis acuminata* from New Zealand. *Harmful Algae* **4**, 75-85. ISSN : 1568-9883. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568988303001069> (2005).
17. REGUERA, B., VELO-SUÁREZ, L., RAINE, R. & PARK, M. G. Harmful *Dinophysis* species : A review. *Harmful Algae* **14**, 87-106. ISSN : 15689883. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1568988311001442> (2024) (fév. 2012).
18. ZINGONE, A. & LARSEN, A. *Dinophysiales* (éd. ZINGONE, A. & LARSEN, J.) <http://www.marinespecies.org/hab> (2020).
19. NUR-E-KAMAL, A. *et al.* Nuclear translocation of cytochrome c during apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 24911-24914. ISSN : 0021-9258 (11 juin 2004).
20. GÓMEZ, F. A list of free-living dinoflagellate species in the world's oceans. *ACTA BOT. CROAT.* (2005).
21. GAILLARD, S. *et al.* Cultures of *Dinophysis sacculus*, *D. acuminata* and pectenotoxin 2 affect gametes and fertilization success of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Environmental Pollution* **265**, 114840. ISSN : 02697491. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749120307429> (2023) (oct. 2020).
22. LARSEN, J. & MOESTRUP, O. in *ICES Identification Leaflets for Plankton* (éd. LINDLEY, J.) 1-12 (ICES, Copenhagen, 1992).
23. MANFRIN, C. *et al.* Mediterranean Mussel Gene Expression Profile Induced by Okadaic Acid Exposure. *Environmental Science & Technology* **44**, 8276-8283. <https://doi.org/10.1021/es102213f> (nov. 2010).
24. ZINGONE, A., MONTRESOR, M. & MARINO, D. Morphological Variability of the Potentially Toxic Dinoflagellate **Dinophysis sacculus** (**Dinophyceae**) and Its Taxonomic Relationship with **D. pavillardii** and **D. acuminata**. *European Journal of Phycology* **33**, 259-273 (1998).
25. REGUERA, B. *et al.* *Dinophysis* Toxins : Causative Organisms, Distribution and Fate in Shellfish. *Marine Drugs* **12**, 394-461. ISSN : 1660-3397. <https://www.mdpi.com/1660-3397/12/1/394> (2014).
26. SCHNEPF, E. & ELBRÄCHTER, M. Cryptophycean-like double membrane-bound chloroplast in the dinoflagellate, *Dinophysis Ehrenb.* : evolutionary, phylogenetic and toxicological implications. *Botanica Acta* **101**, 196-203 (1988).
27. LUCAS, I. & VESK, M. The fine structure of two photosynthetic species of *Dinophysis* (Dinophysiales, Dinophyceae). *Journal of Phycology* **26**, 345-357 (1990).
28. HEWES, C., MITCHELL, B., MOISAN, T., VERNET, M. & REID, F. The phycobilin signatures of chloroplasts from three dinoflagellate species : a microanalytical study of *Dinophysis caudata*, *D. fortii*, and *D. acuminata* (Dinophysiales, Dinophyceae). *Journal of Phycology* **34**, 945-951 (1998).
29. TAKISHITA, K., KOIKE, K., MARUYAMA, T. & OGATA, T. Molecular evidence for plastid robbery (kleptoplastidy) in *Dinophysis*, a dinoflagellate causing diarrhetic shellfish poisoning. *Protist* **153**, 293-302 (2002).
30. HACKETT, J., MARANDA, L., YOON, H. & BHATTACHARYA, D. Phylogenetic evidence for the cryptophyte origin of the plastid of *Dinophysis* (Dinophysiales, Dinophyceae). *Journal of Phycology* **39**, 440-448 (2003).

31. JANSON, S. & GRANÉLI, E. Genetic analysis of the psbA gene from single cells indicates a cryptomonad origin of the plastid in *Dinophysis* (Dinophyceae). *Phycologia* **42**, 473-477 (2003).
32. JANSON, S. Molecular evidence that plastids in the toxin-producing dinoflagellate genus *Dinophysis* originate from the free-living cryptophyte *Teleaulax amphioxeia*. *Environmental Microbiology* **6**, 1102-1106 (2004).
33. HANSEN, P. J., NIELSEN, L. T., JOHNSON, M., BERGE, T. & FLYNN, K. J. Acquired phototrophy in Mesodinium and *Dinophysis*—A review of cellular organization, prey selectivity, nutrient uptake and bioenergetics. *Harmful Algae* **28**, 126-139 (2013).
34. MITRA, A. *et al.* Defining Planktonic Protist Functional Groups on Mechanism for Energy and Nutrient Acquisition : Incorporation of Diverse Mixotrophic Strategies. *Protist* **167**, 106-120 (2016).
35. GARCÍA-PORTELA, M. *et al.* Comparative ecophysiology of *Dinophysis acuminata* and *D. acuta* : Effect of light intensity and quality on growth, cellular toxin content and photosynthesis. *Journal of Phycology* (2018).
36. HOSHIAI, G.-i., SUZUKI, T., ONODERA, T., YAMASAKI, M. & TAGUCHI, S. A Case of Non-toxic Mussels under the Presence of High Concentrations of Toxic Dinoflagellate *Dinophysis acuminata* that Occurred in Kesenuma Bay, Northern Japan. *Fisheries science* **63**, 317-318 (1997).
37. DAHL, E. & JOHANNESSEN, T. Relationship between occurrence of *Dinophysis* species (Dinophyceae) and shellfish toxicity. *Phycologia* **40**, 223-227. eprint : <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-40-3-223.1>. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-40-3-223.1> (2001).
38. TAKAHASHI, E. *et al.* Occurrence and seasonal variations of algal toxins in water, phytoplankton and shellfish from North Stradbroke Island, Queensland, Australia. *Marine Environmental Research* **64**, 429-442. ISSN : 0141-1136. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141113607000463> (2007).
39. GODHE, A., SVENSSON, S. & REHNSTAM-HOLM, A.-S. Oceanographic settings explain fluctuations in *Dinophysis* spp. and concentrations of diarrhetic shellfish toxin in the plankton community within a mussel farm area on the Swedish west coast. *Marine Ecology Progress Series* **240**, 71-83. <https://www.int-res.com/abstracts/meps/v240/p71-83/> (2002).
40. JØRGENSEN, K. & ANDERSEN, P. RELATION BETWEEN THE CONCENTRATION OF *Dinophysis acuminata* AND DIARRHEIC SHELLFISH POISONING TOXINS IN BLUE MUSSELS (*Mytilus edulis*) DURING A TOXIC EPISODE IN THE LIMFJORD (DENMARK), 2006. *Journal of Shellfish Research* **26**, 1081-1087. [https://doi.org/10.2983/0730-8000\(2007\)26\[1081:RBTCOD\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2983/0730-8000(2007)26[1081:RBTCOD]2.0.CO;2) (2007).
41. PIZARRO, G., PAZ, B., GONZÁLEZ-GIL, S., FRANCO, J. M. & REGUERA, B. Seasonal variability of lipophilic toxins during a *Dinophysis acuta* bloom in Western Iberia : Differences between picked cells and plankton concentrates. *Harmful Algae* **8**, 926-937. ISSN : 1568-9883. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568988309000729> (2009).
42. KAMIYAMA, T. & SUZUKI, T. Production of dinophysistoxin-1 and pectenotoxin-2 by a culture of *Dinophysis acuminata* (Dinophyceae). *Harmful Algae* **8**, 312-317. ISSN : 1568-9883. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568988308000759> (2009).
43. YASUMOTO, T. *et al.* Diarrhetic shellfish toxins. *Tetrahedron* **41**, 1019-1025. ISSN : 00404020. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0040402001964695> (2024) (jan. 1985).
44. MILES, C. O., WILKINS, A. L., STIRLING, D. J. & MACKENZIE, A. L. Gymnodimine C, an Isomer of Gymnodimine B, from *Karenia selliformis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 4838-4840. ISSN : 0021-8561, 1520-5118. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf030101r> (2024) (1^{er} juill. 2003).

45. GIACOBBE, M. G. *et al.* Toxicity and ribosomal DNA of the dinoflagellate *Dinophysis sacculus* (Dinophyta). *Phycologia* **39**, 177-182. ISSN : 0031-8884, 2330-2968. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.2216/i0031-8884-39-3-177.1> (2024) (1^{er} mai 2000).
46. SUÁREZ-GÓMEZ, B., SOUTO, M. L., NORTE, M. & FERNÁNDEZ, J. J. Isolation and Structural Determination of DTX-6, a New Okadaic Acid Derivative. *Journal of Natural Products* **64**, 1363-1364. ISSN : 0163-3864, 1520-6025. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/np0100486> (2024) (1^{er} oct. 2001).
47. MANITA, D. *et al.* In vitro bioaccessibility of the marine biotoxins okadaic acid, dinophysistoxin-2 and their 7-O-acyl fatty acid ester derivatives in raw and steamed shellfish. *Food and Chemical Toxicology* **101**, 121-127. ISSN : 02786915. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S027869151730008X> (2024) (mars 2017).
48. SOLTER, P. F. & BEASLEY, V. R. in *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology (Third Edition)* 1155-1186 (Academic Press, 2013). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415759-0.00038-8>.
49. KAMAT, P. K., RAI, S. & NATH, C. Okadaic acid induced neurotoxicity : An emerging tool to study Alzheimer's disease pathology. *NeuroToxicology* **37**, 163-172. ISSN : 0161813X. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0161813X1300079X> (2024) (juill. 2013).
50. NICOLAS, M. Surveillance des phycotoxines dans les coquillages.
51. VANDRE, D. D. & WILLS, V. L. Inhibition of mitosis by okadaic acid : possible involvement of a protein phosphatase 2A in the transition from metaphase to anaphase. *Journal of Cell Science* **101**, 79-91 (1992).
52. PAUL, V. J., ARTHUR, K. E., RITSON-WILLIAMS, R., ROSS, C. & SHARP, K. Chemical Defenses : From Compounds to Communities. *Biological Bulletin* **213**, 226-251 (2007).
53. VALE, C. & BOTANA, L. M. Marine toxins and the cytoskeleton : okadaic acid and dinophysistoxins. *FEBS J* **275**, 6060-6066 (2008).
54. SVENSSON, S. & FÖRLIN, L. Intracellular Effects of Okadaic Acid in the Blue Mussel *Mytilus edulis*, and Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*. *Marine Environmental Research* **49**, 449-452 (1998).
55. HUANG, L. *et al.* Long-term exposure to low levels of okadaic acid accelerates cell cycle progression in colonic epithelial cells via p53 and Jak/Stat3 signaling pathways. *Heliyon* **8**, e10444 (sept. 2022).
56. DRAISCI, R., LUCENTINI, L. & MASCIONI, A. Pectenotoxins and yessotoxins : chemistry, toxicology, pharmacology, and analysis (éd. BOTANA, L. M.) 289-324 (2000).
57. YASUMOTO, T., MURATA, M., ISHIBASHI, Y., FUKUI, M. & LEGRAND, A.-M. *Structure determination of Ciguatoxin of moray eels and Gambierdiscus toxicus* in *Proc. Third Int. Conf. on Ciguatera fish Poisoning* (éd. TOSTESON, T. R.) (Polyscience Publications, 1990), 3-11.
58. MURATA, M., SANO, M., IWASHITA, T., NAOKI, H. & YASUMOTO, T. The structure of pectenotoxin-3, a new constituent of diarrhetic shellfish toxins. *Agricultural and Biological Chemistry* **50**, 2693 (1986).
59. YASUMOTO, T. & MURATA, M. in *Marine toxins : origin, structure and molecular pharmacology* (éd. HALL, S. & STRICHARTZ, G.) (American Chemical Society, 1990).
60. LEE, J., MURATA, M. & YASUMOTO, T. in *Mycotoxins and phycotoxins* ' 88 (éd. NATORI, S., HASHIMOTO, J. & UENO, Y.) 327-333 (Elsevier, New York, 1989).
61. SPECTOR, I., BRAET, F., SHOCHET, N. R. & BUBB, M. R. New anti-actin drugs in the study of the organization and function of the actin cytoskeleton. *Microsc. Res. Tech.* **47**, 18-37. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(19991001\)47:1%3C18::AID-JEMT3%3E3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19991001)47:1%3C18::AID-JEMT3%3E3.0.CO;2-E) (1999).
62. GOLDBERG, E. D. *et al.* The Mussel Watch. *Environmental Conservation* **5**, 101-125. ISSN : 0376-8929, 1469-4387. https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0376892900005555/type/journal_article (2024) (1978).

63. AISABTI, K. & KURELEC, B. Induction of chromosomal aberrations in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **35**, 660-665 (1985).
64. ELSTON, R., MOORE, J. & BROOKS, K. Disseminated neoplasia of bivalve mollusks. *Reviews in Aquatic Sciences* **6**, 405-466 (1992).
65. LOWCOCK, L. *et al.* Flow cytometry assay for in vivo genotoxic effects of pesticides in Green frogs (*Rana clamitans*). *Aquatic Toxicology* **30**, 241-255 (1997).
66. BIHARI, N., BATEL, R. & ZAHN, R. Flow cytometry in marine environmental research. *Periodicum Biologorum* **101**, 151-155 (1999).
67. BIHARI, N., MICK, M., BATEL, R. & ZAHN, R. Flow cytometric detection of DNA cell cycle alterations in hemocytes of mussels. *TBD*. Titre de journal à compléter (2003).
68. R CORE TEAM. R : A Language and Environment for Statistical Computing. Retrieved in 2022, March 1, from <http://www.R-project.org/> (2013).
69. WICKHAM, H. ggplot2 : Elegant Graphics for Data Analysis. Retrieved in 2022, March 1, from <https://ggplot2.org> (2016).
70. PARTEC GMBH. FloMax : Software for Cytometry Operating Manual - Data Analysis, Version 2.3. © 2001 by Partec GmbH, Münster, Germany (2001).
71. ADDINSOFT. XLSTAT. Retrieved from <https://www.xlstat.com> (1993).
72. LOHMANN, H. *Untersuchungen zur Feststellung des vollständigen Gehaltes des Meeres an Plankton* 131-370 (Schmidt Klaunig, 1908).
73. HILL, I. M. VIEWPOINT '92 Health promotion in the.
74. GUILLARD, R. R. L. & HARGRAVES, P. E. Stichochrysis immobilis is a diatom, not a chrysophyte. *Phycologia* **32**, 234-236. ISSN : 0031-8884, 2330-2968. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.2216/i0031-8884-32-3-234.1> (2024) (mai 1993).
75. MANN, R. Some biochemical and physiological aspects of growth and gametogenesis in *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis* grown at sustained elevated temperatures. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **59**, 95-110. ISSN : 0025-3154, 1469-7769. https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0025315400046208/type/journal_article (2024) (fév. 1979).
76. PASCOE, P., PARRY, H. & HAWKINS, A. Observations on the measurement and interpretation of clearance rate variations in suspension-feeding bivalve shellfish. *Aquatic Biology - AQUAT BIOL* **6**, 181-190 (juin 2009).
77. ALTURA, B. *et al.* Mg²⁺-Ca²⁺ interaction in contractility of vascular smooth muscle : Mg²⁺ versus organic calcium channel blockers on myogenic tone and agonist-induced responsiveness of blood vessels. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* **65**, 729-745 (1987).
78. AIDA, J. *et al.* Determination of Telomere Length by the Quantitative Fluorescence <i>in Situ</i> Hybridization (Q-FISH) Method. *American Journal of Analytical Chemistry* **05**, 775-783. ISSN : 2156-8251, 2156-8278. <http://www.scirp.org/journal/doi.aspx?DOI=10.4236/ajac.2014.512086> (2023) (2014).
79. O'CALLAGHAN, N. J. & FENECH, M. A quantitative PCR method for measuring absolute telomere length. *Biological Procedures Online* **13**, 3 (jan. 2011).
80. CARELLA, F. *et al.* Quantitative histopathology of the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis* L.) exposed to the harmful dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata*. *Journal of Invertebrate Pathology* **127**, 130-140. ISSN : 0022-2011. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022201115000476> (2015).

81. SHUMWAY, S. E., BURKHOLDER, J. M. & SPRINGER, J. Effects of the estuarine dinoflagellate *Pfiesteria shumwayae* (Dinophyceae) on survival and grazing activity of several shellfish species. *Harmful Algae* **5**, Ecology of *Pfiesteria*, 442-458. ISSN : 1568-9883. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1568988306000588> (2006).
82. CASTREC, J. *et al.* The toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* affects oyster gamete health and fertilization potential. *Marine Environmental Research* **169**, 105401. ISSN : 0141-1136. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141113621001574> (2021).
83. KHANJANI, M. H., SHARIFINIA, M. & MOHAMMADI, A. R. The impact of microplastics on bivalve mollusks : A bibliometric and scientific review. *Marine Pollution Bulletin* **194**, Part A, 115271. ISSN : 0025-326X. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0025326X23007051> (2023).
84. STARRFELT, J. & KOKKO, H. Bet-hedging—a triple trade-off between means, variances and correlations. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* **87**. Epub 2012 Mar 10, 742-755 (août 2012).
85. MU, C. & LI, Q. Effects of the Dinoflagellate *Alexandrium catenella* on the Early Development of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Shellfish Research* **32**, 689-694. <https://doi.org/10.2983/035.032.0310> (2013).
86. LANDSBERG, J. The Effects of Harmful Algal Blooms on Aquatic Organisms. *Reviews in Fisheries Science - REV FISH SCI* **10**, 113-390 (1^{er} avr. 2002).
87. GAILLARD, S. *et al.* Cultures of *Dinophysis sacculus*, *D. acuminata* and *pectenotoxin 2* affect gametes and fertilization success of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Environmental Pollution* **265**, 114840 (2020).
88. BASTI, L., GO, J., HIGUCHI, K., NAGAI, K. & SEGAWA, S. Effects of the Toxic Dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* on Larvae of the Pearl Oyster *Pinctada Fucata Martensii* (Dunker, 1873). *Journal of Shellfish Research* **30**, 177-186 (2011).
89. GORIS, J., HERMANN, J., HENDRIX, P., OZON, R. & MERLEVEDE, W. Okadaic acid, a specific protein phosphatase inhibitor, induces maturation and MPF formation in *Xenopus laevis* oocytes. *FEBS Letters* **245**, 91-94 (mars 1989).
90. ESCOFFIER, N. *et al.* Toxicity to medaka fish embryo development of okadaic acid and crude extracts of *Prorocentrum* dinoflagellates. *Toxicon* **49**. Epub 2007 Feb 24, 1182-1192 (juin 2007).
91. BRINGER, A. *et al.* Intergenerational effects of environmentally-aged microplastics on the *Crassostrea gigas*. *Environmental Pollution* **294**. Epub 2021 Dec 1, 118600 (fév. 2022).
92. SOUID-MENSI, G., MOUKHA, S., MOBIO, T. A., MAAROUFI, K. M. & CREPPY, E. E. The cytotoxicity and genotoxicity of okadaic acid are cell-line dependent. *Toxicon* **51**, 1338-1344 (2008).
93. VALDIGLESIAS, V. *et al.* Assessment of okadaic acid effects on cytotoxicity, DNA damage and DNA repair in human cells. *Mutat Res* **689**. Epub 2010 May 26, 74-79 (juill. 2010).
94. CARVALHO, P. S., CATIAN, R., MOUKHA, S., MATIAS, W. G. & CREPPY, E. E. Comparative study of Domoic Acid and Okadaic Acid induced-chromosomal abnormalities in the Caco-2 cell line. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **3**, 4-10 (mars 2006).
95. HÉGARAT, L. L., FESSARD, V., POUL, J., DRAGACCI, S. & SANDERS, P. Marine toxin okadaic acid induces aneuploidy in CHO-K1 cells in presence of rat liver postmitochondrial fraction, revealed by cytokinesis-block micronucleus assay coupled to FISH. *Environmental Toxicology* **19**, 123-128 (2004).
96. MCCARTHY, M., O'HALLORAN, J., O'BRIEN, N. M. & VAN PELT, F. F. Does the marine biotoxin okadaic acid cause DNA fragmentation in the blue mussel and the pacific oyster? *Marine Environmental Research* **101**, 153-160. ISSN : 0141-1136. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141113614001615> (2014).

97. DEAVEN, L. Application of flow cytometry to cytogenetic testing of environmental mutagens (éd. HSU, T.) 325-351 (1982).
98. BICKHAM, J., HANKS, B., SMOLEN, M., LAMB, T. & GIBBONS, J. Flow cytometric analysis of low-level radiation exposure on natural populations of slider turtles (*Pseudemys scripta*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **17**, 837-841 (1988).
99. BICKHAM, J. in *In Situ Evaluation of Biological Hazards of Environmental Pollutants* (éd. SANDHU, S., LOWER, W., DE SERRES, F., SUK, W. & TICE, R.) 97-108 (Plenum Press, New York, NY, USA, 1990).
100. LAMB, T., BICKHAM, J., GIBBONS, J., SMOLEN, M. & MCDOWELL, S. Genetic damage in a population of slider turtles (*Trachemys scripta*) in a radioactive reservoir. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **20**, 138-142 (1991).
101. ZAPATA-GAYON, C., ZAPATA-GAYON, N. & GONZÁLEZ-ANGULO, A. Clastogenic chromosomal aberrations in 26 individuals accidentally exposed to ortho dichlorobenzene vapors in the National Medical Center in Mexico City. *Arch Environ Health* **37**, 231-235 (juill. 1982).
102. MATEUCA, R., LOMBAERT, N., AKA, P., DECORDIER, I. & KIRSCH-VOLDERS, M. Chromosomal changes : induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie* **88**, 1515-1531 (2006).
103. WAITE, A. M., OLSON, R. J., DAM, H. G. & PASSOW, U. Sugar containing compounds on the cell surfaces of marine diatoms measured using concanavalin A and flow cytometry. *J. Phycol.* **31**, 925-933 (1995).
104. WARD, J. E. & SHUMWAY, S. E. Separating the grain from the chaff : particle selection in suspension- and deposit-feeding bivalves. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **300**, 83-130 (2004).
105. BARRERA ALBA, J., PIEDRAS, F., DUARTE, C., LOPES, R. & MOSER, G. Morphometric Characterization of *Dinophysis acuminata*/D. Sacculus Complex in Guanabara Bay, Brazil. *Biota Neotropica* **19** (2019).
106. HERNÁNDEZ-BECERRIL, D., BARÓN, S., SALAZAR-PAREDES, J. & ALONSO, R. Species of the Planktonic Diatom Genus *Skeletonema* (Bacillariophyta) from the Mexican Pacific Ocean. *Cryptogamie, Algologie* **34**, 77-87 (2013).
107. BRICELJ, V. *et al.* Sodium channel mutation leading to saxitoxin resistance in clams increases risk of PSP. *Nature* **434**, 763-766 (2005).
108. NIELSEN, P., KROCK, B., HANSEN, P. & VISMANN, B. Effects of the DSP-toxic dinoflagellate *Dinophysis acuta* on clearance and respiration rate of the blue mussel, *Mytilus edulis*. *PLoS One* **15**, e0230176 (2020).
109. LIN, P. *et al.* Do polystyrene nanoplastics aggravate the toxicity of single contaminants (okadaic acid)? Using AGS cells as a biological model. *Environmental Science : Nano* **8** (2021).
110. PO, B. H. & CHIU, J. M. Transgenerational impairments of reproduction and development of the marine invertebrate *Crepidula onyx* resulted from long-term dietary exposure of 2,2,4,4-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47). *Environmental Pollution* **235**, 730-738. ISSN : 0269-7491. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749117339052> (2018).
111. WENG, N. & WANG, W.-X. Dynamics of maternally transferred trace elements in oyster larvae and latent growth effects. *Scientific Reports* **7**, 3580. ISSN : 2045-2322. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03753-2> (juin 2017).

Annexes



FIGURE 15. Observation au microscope photonique de *D. sacculus*. L'échelle indique que le trait sur la photo fait 30 micromètres.



FIGURE 16. Photographie du dispositif expérimental de physiologie dans lequel les mollusques bivalves sont placés (salle humide, laboratoire L3).



FIGURE 17. Photographie de l'écran de l'ordinateur consacré à la visualisation en temps réel des données collectées chaque seconde. Le logiciel employé est Labview.



FIGURE 18. Photographie des jarres d'élevage larvaire utilisées pour l'expérience GenoDino, situées à l'intérieur de l'écloserie du laboratoire.

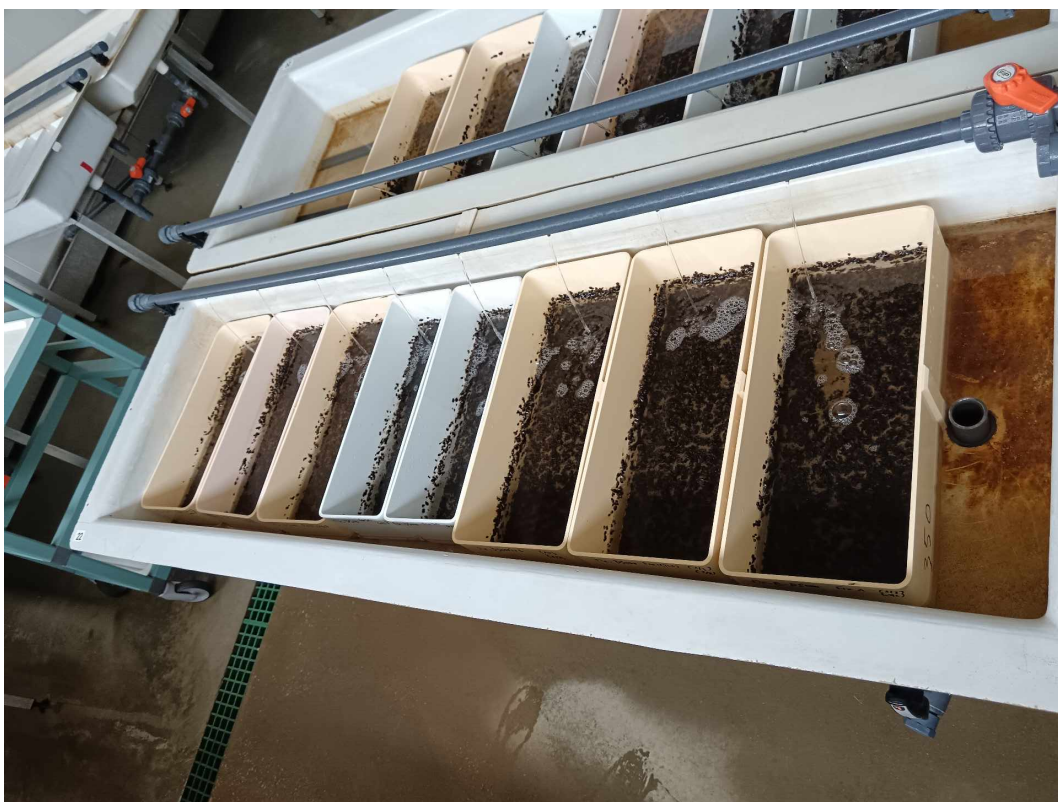


FIGURE 19. Photographie de la génération F1 des moules dans la micronurserie, résultant de la reproduction de ces bivalves et des différentes étapes de croissance des larves.

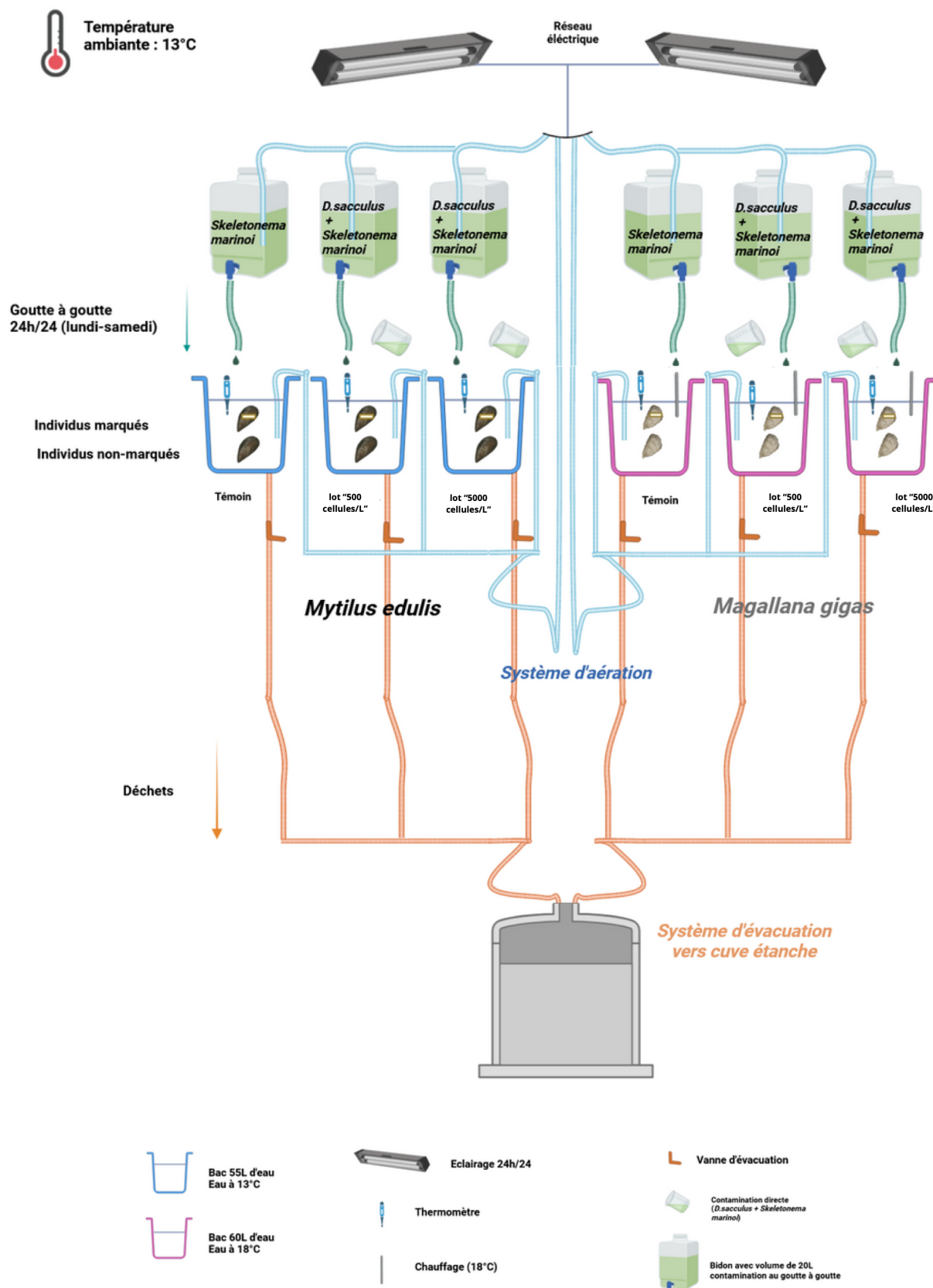
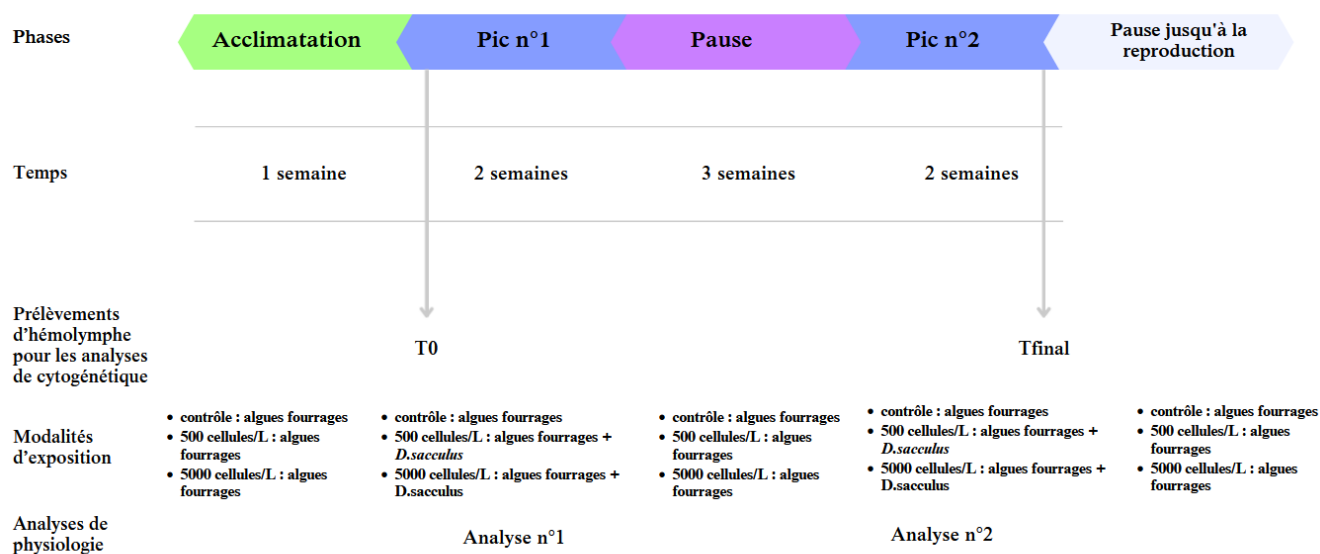


FIGURE 20. Schéma du Design expérimental de l'étude

TABLE 11. Catégories de larves normales et anomalies observables avec leurs descriptions

Catégorie de larve	Description morphologique
Type a	La larve de type a est la larve dite "normale". Elle présente deux valves régulières ayant la même taille.
Type b	La larve de type b présente une charnière concave incurvée vers l'intérieur de la larve.
Type c	La larve de type c présente une ou plusieurs échancrures à la commissure de l'une de ses valves.
Type d	La larve de type d présente une de ces deux valves anormalement développée.
Type e	La larve de type e, également appelée "baveuse", présente un vélum qui n'est pas totalement rétracté lorsque la larve est fermée, ainsi la masse viscérale n'est pas entièrement contenue dans la coquille.
Embryons dits monstrueux	Embryon difforme et globulaire.
Ovocyte fécondé mais non développé	Ovocyte n'ayant pas atteint le stade véligère

**FIGURE 21.** Chronologie des principales manipulations réalisées durant ce stage