



HAL
open science

Impacts sur la faune sauvage de la prolifération de l'algue karenia brevis dans le golfe du Mexique entre 2015 et 2019 : Etude de cas à partir des données collectées dans le centre de soins Clinic for the Rehabilitation of Wildlife à Sanibel Island (Fl. Etats-Unis)

Mathilde Vilcot

► **To cite this version:**

Mathilde Vilcot. Impacts sur la faune sauvage de la prolifération de l'algue karenia brevis dans le golfe du Mexique entre 2015 et 2019 : Etude de cas à partir des données collectées dans le centre de soins Clinic for the Rehabilitation of Wildlife à Sanibel Island (Fl. Etats-Unis). Médecine vétérinaire et santé animale. 2020. dumas-04788463

HAL Id: dumas-04788463

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04788463v1>

Submitted on 18 Nov 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Copyright

Année 2020

**IMPACTS SUR LA FAUNE SAUVAGE DE LA
PROLIFÉRATION DE L'ALGUE KARENIA BREVIS DANS LE
GOLFE DU MEXIQUE ENTRE 2015 ET 2019.
ÉTUDE DE CAS À PARTIR DES DONNÉES COLLECTÉES
DANS LE CENTRE DE SOINS CLINIC FOR THE
REHABILITATION OF WILDLIFE A SANIBEL ISLAND (FL,
ÉTATS-UNIS)**

THÈSE

pour obtenir le diplôme d'État de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE,
présentée et soutenue publiquement devant
LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE CRÉTEIL (UPEC)
Le 29 septembre 2020

par

Mathilde, Sophie VILCOT

sous la direction de

Pascal ARNÉ

Président du jury :	Pr Alexandre DE LA TAILLE	Professeur à la Faculté de Médecine de CRÉTEIL
1^{er} Assesseur :	Dr Pascal ARNÉ	Maitre de conférences à l'ENVA
2nd Assesseur :	Pr Renaud TISSIER	Professeur à l'ENVA

Liste des membres du corps enseignant



Directeur : Pr Christophe Degueurce

Directeur des formations : Pr Henry Chateau

Directrice de la scolarité et de la vie étudiante : Dr Catherine Colmin

Directeurs honoraires : MM. les Professeurs C. Pilet, B. Toma, A.-L. Parodi, R. Moraillon, J.-P. Cotard, J.-P. Mialot & M. Gogny

Département d'Élevage et de Pathologie des Équidés et des Carnivores (DEPEC)

Chef du département : Pr Grandjean Dominique - Adjoint : Pr Blot Stéphane

<p>Unité pédagogique d'anesthésie, réanimation, urgences, soins intensifs</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Fernandez Parra Rocio, Maître de conférences associée - Pr Verwaerde Patrick* <p>Unité pédagogique de clinique équine</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pr Audigé Fabrice - Dr Bertoni Léila, Maître de conférences - Dr Bourzac Céline, Chargée d'enseignement contractuelle - Dr Coudry Virginie, Praticien hospitalier - Pr Denoix Jean-Marie - Dr Giraudet Aude, Praticien hospitalier - Dr Jacquet Sandrine, Praticien hospitalier - Dr Maspouhès-Rivière Céline, Praticien hospitalier* - Dr Moiroud Claire, Praticien hospitalier - Dr Tanqueret Ludovic, Chargé d'enseignement contractuel <p>Unité pédagogique de médecine et imagerie médicale</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Bencheikroun Ghita, Maître de conférences - Pr Blot Stéphane* - Dr Canonne-Guilbert Morgane, Maître de conférences - Dr Freiche-Légros Valérie, Praticien hospitalier - Dr Maurey-Guénec Christelle, Maître de conférences 	<p>Unité pédagogique de médecine de l'élevage et du sport</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Cabrera Gonzales Joaquin, Chargé d'enseignement contractuel - Dr Fontbonne Alain, Maître de conférences - Pr Grandjean Dominique* - Dr Hoummady Sara, Chargée d'enseignement contractuelle - Dr Maenhoudt Cindy, Praticien hospitalier - Dr Nudelmann Nicolas, Maître de conférences - Dr Ribeiro dos Santos Natalia, Praticien hospitalier <p>Unité pédagogique de pathologie chirurgicale</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Decambon Adeline, Maître de conférences - Pr Fayolle Pascal - Dr Manassero Mathieu, Maître de conférences - Pr Viateau-Duval Véronique* <p>Discipline : cardiologie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pr Chetboul Valérie - Dr Saponaro Vittorio, Praticien hospitalier <p>Discipline : ophtalmologie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Chahory Sabine, Maître de conférences <p>Discipline : nouveaux animaux de compagnie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Pignon Charty, Praticien hospitalier - Dr Volait Laetitia, Praticien hospitalier
--	--

Département des Productions Animales et de Santé Publique (DPASP)

Chef du département : Pr Millemann Yves - Adjoint : Pr Dufour Barbara

<p>Unité pédagogique d'hygiène, qualité et sécurité des aliments</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Bolnot François, Maître de conférences - Pr Cartier Vincent - Dr Gauthier Michel, Maître de conférences associé - Dr Mûmet Narjes, Chargée d'enseignement contractuelle <p>Unité pédagogique de maladies règlementées, zoonoses et épidémiologie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Crozet Guillaume, Chargé d'enseignement contractuel - Pr Dufour Barbara* - Pr Haddad/Hoang-Xuan Nadia - Dr Rivière Julie, Maître de conférences <p>Unité pédagogique de pathologie des animaux de production</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pr Adjou Karim - Dr Belbis Guillaume, Maître de conférences* - Dr Delsart Maxime, Maître de conférences associé - Pr Millemann Yves - Dr Plassard Vincent, Praticien hospitalier - Dr Ravary-Plumioën Bérangère, Maître de conférences 	<p>Unité pédagogique de reproduction animale</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Constant Fabienne, Maître de conférences* - Dr Denis Marine, Chargée d'enseignement contractuelle - Dr Desbois Christophe, Maître de conférences (rattaché au DEPEC) - Dr Mauffré Vincent, Maître de conférences <p>Unité pédagogique de zootechnie, économie rurale</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Arné Pascal, Maître de conférences - Dr Barassin Isabelle, Maître de conférences - Pr Bossé Philippe* - Dr De Paula Reis Alline, Maître de conférences - Pr Grimard-Ballif Bénédicte - Pr Ponter Andrew <p>Rattachée DPASP</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Wolgust Valérie, Praticien hospitalier
---	---

Département des Sciences Biologiques et Pharmaceutiques (DSBP)

Chef du département : Pr Desquilbet Loïc - Adjoint : Pr Pilot-Storck Fanny

<p>Unité pédagogique d'anatomie des animaux domestiques</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Boissady Emilie, Chargée d'enseignement contractuelle - Pr Chateau Henry - Pr Crevier-Denoix Nathalie - Pr Robert Céline* <p>Unité pédagogique de bactériologie, immunologie, virologie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pr Boulouis Henri-Jean - Pr Eloit Marc - Dr Lagrée Anne-Claire, Maître de conférences - Pr Le Poder Sophie - Dr Le Roux Delphine, Maître de conférences* <p>Unité pédagogique de biochimie, biologie clinique</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pr Bellier Sylvain* - Dr Deshuillers Pierre, Maître de conférences - Dr Lagrange Isabelle, Praticien hospitalier <p>Unité pédagogique d'histologie, anatomie pathologique</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Cordonnier-Lefort Nathalie, Maître de conférences - Pr Fontaine Jean-Jacques - Dr Laloy Eve, Maître de conférences - Dr Reyes-Gomez Edouard, Maître de conférences* <p>Unité pédagogique de management, communication, outils scientifiques</p> <ul style="list-style-type: none"> - Mme Conan Muriel, Professeur certifié (Anglais) - Pr Desquilbet Loïc, (Biostatistique, Epidémiologie) - Dr Legrand Chantal, Maître de conférences associée - Dr Marignac Geneviève, Maître de conférences* - Dr Rose Hélène, Maître de conférences associée 	<p>Unité de parasitologie, maladies parasitaires, dermatologie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Blaga Radu, Maître de conférences (rattaché au DPASP) - Dr Briand Amaury, Assistant d'Enseignement et de Recherche Contractuel (rattaché au DEPEC) - Dr Cochet-Favre Noëlle, Praticien hospitalier (rattachée au DEPEC) - Pr Guillot Jacques* - Dr Polack Bruno, Maître de conférences - Dr Risco-Castillo Veronica, Maître de conférences <p>Unité pédagogique de pharmacie et toxicologie</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Kohlhauer Matthias, Maître de conférences - Dr Perrot Sébastien, Maître de conférences* - Pr Tissier Renaud <p>Unité pédagogique de physiologie, éthologie, génétique</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dr Chevallier Lucie, Maître de conférences (Génétique) - Dr Crépeaux Guillemette, Maître de conférences (Physiologie, Pharmacologie) - Pr Gilbert Caroline (Ethologie) - Pr Pilot-Storck Fanny (Physiologie, Pharmacologie) - Pr Tiret Laurent (Physiologie, Pharmacologie)* - Dr Titeux Emmanuelle (Ethologie), Praticien hospitalier <p>Discipline : éducation physique et sportive</p> <ul style="list-style-type: none"> - M. Philips Pascal, Professeur certifié
--	---

* responsable d'unité pédagogique

Professeurs émérites : Pr Combrisson Hélène, Pr Enriquez Brigitte, Pr Panthier Jean-Jacques, Pr Paragon Bernard.

Remerciements

Au Président du Jury de cette thèse, Professeur à la Faculté de Médecine de Créteil,
Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse.
Hommage respectueux.

À Monsieur Pascal Arné, Maître de conférences à l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort,
Pour avoir accepté d'encadrer ce projet, pour ses conseils précieux, son aide et sa disponibilité tout au long de ce travail.

Mes remerciements les plus respectueux et les plus sincères.

À Monsieur Renaud Tissier, Professeur à l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort,
Pour avoir accepté d'être mon assesseur, pour sa relecture attentive et l'intérêt qu'il a porté à ce travail.
Sincères remerciements.

À Madame Laetitia Canini, Chargée de projet de recherche en épidémiologie à l'ANSES,
Pour son aide précieuse dans l'analyse des données obtenues et ses conseils avisés.
Sincères remerciements.

Aux docteurs Heather Barron et Robin Bast, Cliniciennes à la Clinic for the Rehabilitation of Wildlife,

Pour m'avoir accueillie en stage et transmis leur passion de la faune sauvage, pour m'avoir fait découvrir la problématique qui a fondé ce travail et m'avoir permis d'accéder à toutes les données nécessaires à sa réalisation.

Thank you very much.

À mes parents,

Pour votre soutien indéfectible depuis toujours. Merci de m'avoir donné les moyens de réaliser mes rêves.

À tous mes amis,

Pour tout le bonheur que vous m'apportez quotidiennement, merci.

Table des matières

Liste des figures.....	4
Liste des tableaux.....	6
Liste des abréviations.....	7
Introduction.....	9
Première partie : étude bibliographique.....	11
1. Description de <i>Karenia brevis</i> , organisme majeur des marées rouges.....	11
A. <i>Systématique et description cellulaire de K. brevis</i>	11
a. Caractéristiques des dinoflagellés et spécificité des Kareniaceae.....	11
b. Cycle biologique.....	12
c. Motilité.....	14
B. <i>Physiologie</i>	14
a. Température de développement.....	14
b. Influence de la salinité.....	14
c. Phototropisme.....	15
d. Nutrition.....	15
C. <i>Interactions biotiques</i>	16
a. Virus.....	16
b. Bactéries.....	16
c. Copépodes.....	16
d. Allélopathie et production de toxines.....	16
2. Dynamique des populations et émergence des marées rouges.....	19
A. <i>Distribution globale des espèces de Karenia</i>	19
a. <i>Karenia mikimotoi</i>	19
b. <i>Karenia brevis</i>	19
c. Autres espèces.....	19
B. <i>Efflorescences algales</i>	20
a. Caractéristiques déterminantes des dinoflagellés.....	20
b. Facteurs physiques favorisant.....	21
c. Sources de nutriments nécessaires.....	22
C. <i>Cas particuliers des marées rouges dans le golfe du Mexique</i>	23
a. Le phénomène d'upwelling.....	23
b. Sources de nutriments.....	23
c. Une augmentation des marées rouges ?.....	25
3. Étude toxicologique des brevéttoxines.....	26
A. <i>Structure</i>	26
B. <i>Pharmacocinétique/Toxicocinétique</i>	27
a. Distribution dans les différents organes.....	27
b. Transport dans le compartiment sanguin.....	28
c. Métabolisation.....	28
C. <i>Mécanisme d'action</i>	29
a. Rappel sur les canaux sodiques-voltages dépendants (Reece, 2015).....	29
b. Action des brevéttoxines sur les VGSC.....	31
D. <i>Toxicité</i>	32
a. Toxicité expérimentale.....	32
b. Toxicité chez la faune sauvage marine.....	33
c. Effets mutagènes et génotoxiques.....	33
4. Revue des cas rapportés dans la littérature de mortalité animale due à <i>Karenia brevis</i>	34
A. <i>Cheminement des toxines au sein de la chaîne trophique</i>	35
a. Libération de toxines dissoutes « libres ».....	35
b. Ingestion de <i>K. brevis</i> et transmission vectorielle des toxines.....	35
c. Persistance de brevéttoxines dans l'écosystème.....	36
B. <i>Impact sur l'écosystème benthique</i>	37

C. Chez les mammifères marins	38
a. Brévétotoxicose chez les lamantins (<i>Trichechus manatus</i>).....	38
b. Brévétotoxicose chez les dauphins.....	40
D. Chez les oiseaux maritimes	41
a. Présentation clinique, métabolisme et clairance des brévétotoxines	42
b. Conclusion sur la brévétotoxicose chez les oiseaux maritimes.....	42
E. Chez les tortues	43
a. Présentation clinique et corrélation temporelle avec les marées rouges.....	43
b. Effet des brévétotoxines sur le système immunitaire	44
c. Transfert maternel des toxines.....	44
F. Chez les poissons	45
a. Données quantitatives sur les communautés estuariennes	45
b. Mortalité inhabituelle et brévétotoxicose chez les élasmobranches	45
c. Effets des brévétotoxines sur les paramètres neurochimiques	46
Deuxième partie : étude expérimentale	47
1. Introduction	47
2. Matériels et méthodes	48
A. Lieu de l'étude	48
B. Données collectées.....	49
C. Critères diagnostiques utilisés	49
D. Examens paracliniques.....	50
E. Concentration en <i>Karenia brevis</i>	50
F. Répartition géographique des cas et des marées rouges	50
G. Analyse de séries temporelles	51
3. Résultats	53
A. Données démographiques et cliniques.....	53
B. Données biologiques.....	54
C. Traitement et succès de la réhabilitation	54
a. Traitements mis en place au cours de l'hospitalisation	54
b. Évolution des cas et taux de réhabilitation	55
D. Répartition géographique des cas et description des efflorescences algales	56
a. Description de la marée rouge ayant sévi de novembre 2017 à novembre 2018	56
E. Analyse des séries temporelles	59
4. Discussion.....	61
A. Protocole	61
a. Choix des cormorans comme sujet d'étude	61
b. Critères d'inclusions dans l'étude.....	61
c. Dosage des brévétotoxines.....	63
d. Analyse de séries temporelles	64
B. Résultats	64
a. Anomalies cliniques et paracliniques chez les cormorans atteints	64
b. Dosage des brévétotoxines.....	66
c. Épidémiologie et succès de la réhabilitation	66
d. Surveillance spatio-temporelle des efflorescences algales et exposition des cormorans	67
e. Étude de la corrélation temporelle	68
C. Enjeux et perspectives	68
Conclusion.....	71
Liste des références bibliographiques	73
Annexe 1 : Causes d'admission des patients à CROW en 2019 (Barron et al., 2020).....	81
Annexe 2 : Fiche descriptive de <i>Phalacrocorax auritus</i> (Dorr et al., 2014)	82
1. Caractéristiques physiques	82
2. Éléments d'écologie	83
A. Répartition géographique.....	83

<i>B. Habitat</i>	83
<i>C. Alimentation</i>	83
<i>D. Reproduction et longévité</i>	84
<i>E. Comportement</i>	84
Annexe 3 : Évolution spatio-temporelle des marées rouges survenues entre 2015 et 2019 .	85
Annexe 4 : Tableau de l'évolution de l'index algal et du nombre de cormorans admis pour brevétoxicose à la CROW entre 2015 et 2019	89

Liste des figures

Figure 1 : Caractéristiques structurales de <i>K. brevis</i> (Haywood <i>et al.</i> , 2004)	12
Figure 2 : Étapes de la reproduction sexuée de <i>K. brevis</i> observée en microscopie optique (Walker, 1982).....	13
Figure 3 : Représentation schématique de la circulation de Langmuir	22
Figure 4 : Structure chimique des différents types de brevéttoxines (Brovedani <i>et al.</i> , 2016)	26
Figure 5 : Structure des hémibrevéttoxines (Brovedani <i>et al.</i> , 2016).....	27
Figure 6 : Structure protéique transmembranaire des VGSC (Nicholson et Lewis, 2006)	29
Figure 7 : Trois conformations des VGSC selon le potentiel de membrane	30
Figure 8 : Sites de fixation de différentes toxines sur les VGSC (Zhang <i>et al.</i> , 2013)	31
Figure 9 : schéma des voies de transfert et de l'impact des brevéttoxines dans l'environnement marin (Landsberg <i>et al.</i> , 2009)	37
Figure 10 : évolution de la mortalité liée à <i>K. brevis</i> de 1996 à 2019 chez <i>Trichechus manatus</i> en Floride	38
Figure 11 : répartition géographique des dauphins échoués lors des marées rouges de 1999, 2004 et 2005-2006.....	41
Figure 12 : Évolution mensuelle du nombre de tortues marines échouées lors d'une marée rouge entre janvier 2005 et novembre 2006 (Fauquier <i>et al.</i> , 2013)	43
Figure 13 : Carte de situation de la CROW (Google Maps, 2020)	48
Figure 14 : Rayon d'action de la CROW (OpenStreetMap, 2020).....	48
Figure 15 : Évolution spatio-temporelle de la marée rouge ayant sévi en 2017-2018 (<i>RStudio</i> , 2020 ; Fish and Wildlife Research Institute et Florida Fish and Wildlife Conservation Commission, 2020)	58
Figure 16 : évolution de l'index algal et du nombre de cormorans admis pour brevéttoxicose à la CROW entre 2015 et 2019 (Fish and Wildlife Research Institute et Florida Fish and Wildlife Conservation Commission, 2020).....	60
Figure 17 : évolution de l'index algal et du nombre de cormorans admis pour brevéttoxicose à la CROW entre 2015 et 2019, avec un décalage de 2 semaines.....	60
Figure 18 : Photographies de cormorans à aigrettes adultes (Macauley Library, 2017)	82
Figure 19 : Photographie d'un cormoran juvénile (Macauley Library, 2017).....	82
Figure 20 : Aires de répartition du cormoran à aigrettes en Amérique du Nord (Dorr <i>et al.</i> , 2020) .	83

Figure 21 : Représentation cartographique de la marée rouge survenue entre décembre 2015 et février 2016 et des cas de brévétoxicose chez les cormorans admis à CROW durant cette période (<i>RStudio</i> , 2020 ; « Google Maps », s. d.).....	85
Figure 22 : Cartes complémentaires de la marée rouge survenue entre novembre 2017 et novembre 2018 (<i>RStudio</i> , 2020 ; « Google Maps », s. d.)	86
Figure 23 : Représentation cartographique de la marée rouge survenue entre octobre 2016 et février 2017 et des cas de brévétoxicose chez les cormorans admis à CROW durant cette période (<i>RStudio</i> , 2020 ; « Google Maps », s. d.).....	87
Figure 24 : Représentation cartographique de la marée rouge survenue entre octobre et décembre 2019 et des cas de brévétoxicose chez les cormorans admis à CROW durant cette période (<i>RStudio</i> , 2020 ; « Google Maps », s. d.).....	88

Liste des tableaux

Tableau 1 : LD ₅₀ de deux types de PbTx chez la souris grise (<i>Mus musculus</i>), selon la voie d'administration	32
Tableau 2 : catégories d'exposition à <i>K. brevis</i> selon la concentration marine (FWCC).....	51
Tableau 3 : Présentation des signes cliniques à l'admission des cormorans (CROW 2019).....	53
Tableau 4 : Résumé des données biologiques obtenues sur les prélèvements sanguins chez les cormorans (CROW 2019).....	54
Tableau 5 : Plan de réalimentation mis en place à l'admission des cormorans à la CROW	55
Tableau 6 : Taux de mortalité et de réhabilitation des cormorans admis pour brévétotoxicose à la CROW entre 2015 et 2019	55
Tableau 7 : Caractéristiques des marées rouges s'étant produites entre 2015 et 2019 (Fish and Wildlife Research Institute et Florida Fish and Wildlife Conservation Commission, 2020)	56
Tableau 8 : Évolution des concentrations algales entre novembre 2017 et novembre 2018 (Fish and Wildlife Research Institute et Florida Fish and Wildlife Conservation Commission, 2020)	57
Tableau 9 : Coefficients de corrélation et p-value obtenus pour des délais de 0 à 11 semaines entre l'index algal et le nombre de cormorans (<i>RStudio</i> , 2020).....	59
Tableau 10 : Diagnostic différentiel de l'ataxie cérébelleuse chez les oiseaux (Samour, 2016)	62

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
Bpm	Battements par minute
BTX-B1	Brévétotoxine conjuguée à la taurine
BTX-B2	Brévétotoxine conjuguée à la cystéine
CROW	<i>Clinic for the Rehabilitation of Wildlife</i> : clinique pour la réhabilitation de la faune sauvage
CCF	<i>Cross-correlation function</i> : fonction de corrélation croisée
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> : dosage d'immunoabsorption par enzyme liée
FFWCC	<i>Florida Fish and Wildlife Conservation Commission</i> : Commission de conservation des poissons et de la faune de Floride
FWRI	<i>Fish and Wildlife Research Institute</i> : institut de recherche sur les poissons et la faune sauvage
GPS	<i>Global Positioning System</i> : système de positionnement mondial
HAB	<i>Harmful algal bloom</i> : efflorescence algale nocive
HDL	<i>High-Density Lipoprotein</i> : lipoprotéines de haute densité
Ht	Hématocrite
IUCN	<i>International Union for Conservation of Nature</i> : Union internationale pour la conservation de la nature
LD ₅₀	<i>Lethal dose 50</i> : dose létale 50
LD _{Lo}	<i>Lethal dose low</i> : dose létale minimale
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NSP	<i>Neurotoxic shellfish poisoning</i> : intoxication neurotoxique par les mollusques
PbTx _s	Brévétotoxines
PbTx-3 eq/mL	Concentration équivalente en PbTx-3 par mL
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> : réaction en chaîne par polymérase
Ppb	<i>Part per billion</i> : partie par milliard
PSU	<i>Practical Salinity Unit</i> : unité de salinité pratique

Tpm Tours par minute

VGSC *Voltage-gated sodium channel* : canal sodique voltage-dépendant

Introduction

Parmi les milliers d'espèces de phytoplanctons connues dans le monde, un petit nombre est à l'origine d'efflorescences algales nocives (ou *Harmful algal bloom* : HAB) lorsque leur prolifération surpasse les pertes liées à la mortalité cellulaire, ou que divers paramètres environnementaux permettent une concentration physique des cellules. Ces HABs sont aussi appelées « marées rouges », en raison de la coloration de l'eau qu'elles entraînent, souvent brune ou rougeâtre, et peuvent apparaître ponctuellement ou de façon récurrente dans certaines régions (Shumway *et al.*, 2003). Le caractère nocif des efflorescences peut résulter de différents mécanismes : une hypoxie locale de l'environnement, une réduction de la pénétration de la lumière dans les profondeurs, ou encore une production de composés toxiques libérés dans l'eau, dont les plus fréquemment retrouvés sont l'acide domoïque, les saxitoxines, les brevétoxines et ciguatoxines (Dennison *et al.*, 1989 ; Creekmore, 2001). L'ensemble de ces mécanismes conduit à une mortalité importante chez d'une grande diversité d'organismes aquatiques.

Si la fréquence et l'intensité des efflorescences algales semblent avoir augmenté au cours des dernières décennies (Hallegraeff, 1993), leur impact est observé dans le golfe du Mexique depuis plusieurs siècles. Des événements de mortalité massive de poissons sur les plages occidentales de Floride (États-Unis d'Amérique) ont en effet été rapportés dès le XVI^èm^e siècle, bien que l'organisme responsable de ces phénomènes n'ait à l'époque pas été identifié (Walker, 1883 ; Daugbjerg *et al.*, 2000). Les recherches se sont intensifiées depuis les années 1970, principalement en raison des effets observés de ces HABs sur la santé humaine et sur les mammifères marins (Tester, 1994 ; Fleming *et al.*, 2002). Plus de 75 % des espèces impliquées dans des HABs sont des dinoflagellés (Smayda, 1997).

La côte occidentale de la Floride connaît des « marées rouges » annuellement, le plus souvent en été et au début de l'automne, mais pouvant se produire en toute saison (Tester et STEIDINGER, 1997 ; Brand et Compton, 2007). L'espèce impliquée est *Karenia brevis*, organisme dinoflagellé connu auparavant sous le nom de *Gymnodinium breve* ou *Ptychodiscus brevis*. Les efflorescences algales ont un impact considérable sur l'ensemble de l'écosystème marin, mais constituent aussi un enjeu de santé publique et économique majeur. En effet, *K. brevis* produit plusieurs neurotoxines, appelées brevétoxines, isolées pour la première fois par Baden *et al.* en 1979. Les brevétoxines agissent sur les canaux sodiques voltage-dépendants des cellules (Landsberg, 2002 ; Naar *et al.*, 2007 ; Steidinger *et al.*, 2008).

Chez l'homme, l'exposition aux brevétoxines résulte de l'ingestion de mollusques filtreurs (moules, huîtres) ayant accumulé les toxines. On observe alors une neurotoxicité (NSP : neurotoxic shellfish poisoning) qui se manifeste par des vertiges, des douleurs musculaires, une incoordination motrice et des signes gastro-intestinaux (Morris *et al.*, 1991). En conséquence, la pêche et la consommation de ces mollusques est interdite en Floride dès lors que la concentration en *K. brevis* dépasse 5000 cellules/L d'eau de mer. Des effets respiratoires sont également décrits suite à l'inhalation de toxines transportées dans l'air (Kirkpatrick *et al.*, 2010 ; Fleming *et al.*, 2011).

Par ailleurs, les efflorescences de *K. brevis* ont été incriminées dans de nombreux événements de mortalité massive chez la faune sauvage maritime, impliquant tous les maillons du réseau trophique. En effet, l'accumulation des brevéttoxines dans les tissus des mollusques filtreurs et poissons planctivores fait de ces derniers des vecteurs de toxines pour leurs prédateurs (Landsberg *et al.*, 2009). Au cours des dernières années, des efforts ont été faits afin d'acquérir plus de données épidémiologiques de terrain, et la capacité à déterminer la concentration en brevéttoxines dans les tissus et fluides des animaux s'est grandement améliorée (Naar *et al.*, 2002). Cela a permis de confirmer le rôle de *K. brevis* dans la mortalité de lamantins (Bossart *et al.*, 1998 ; Capper *et al.*, 2013 ; Walsh *et al.*, 2015), dauphins (Geraci, 1989 ; Fire *et al.*, 2007 ; Twiner *et al.*, 2012), tortues marines (Walsh *et al.*, 2010 ; Fauquier *et al.*, 2013a ; Foley *et al.*, 2019), poissons (Gannon *et al.*, 2009 ; Flewelling *et al.*, 2010 ; Nam *et al.*, 2010) et oiseaux maritimes (Shumway *et al.*, 2003 ; van Deventer *et al.*, 2012).

Cependant, la majorité de ces études reposait sur des analyses réalisées sur des carcasses. Dès lors, les manifestations cliniques liées aux brevéttoxines, ainsi que les doses les déclenchant et le délai de leur apparition, demeurent inconnues. En raison de leur grande sensibilité aux toxiques et polluants environnementaux, les oiseaux marins constituent des espèces « sentinelles » de l'état de santé de l'écosystème au sein duquel ils évoluent (Camphuysen, 1997). Or, très peu de publications existent sur l'impact de la prolifération de *Karenia brevis* sur les oiseaux piscivores en Floride.

Ce travail a pour objectif de contribuer à mieux comprendre et caractériser la survenue de brevéttoxicose chez les oiseaux maritimes, en prenant comme objet d'études le cormoran à aigrette, *Phalacrocorax auritus*. Il a été réalisé en collaboration avec la Clinique pour la réhabilitation de la faune sauvage (CROW) de l'île de Sanibel (Floride, États-Unis d'Amérique), suite à un stage effectué sur place en 2018. Cette clinique est située dans une région particulièrement affectée par les marées rouges, comme en témoignent les milliers de poissons morts retrouvés annuellement sur les plages de l'île (FFWCC et FWRI, 2020). Parmi les animaux admis à la CROW, 11,5 % le sont pour des signes neurologiques compatibles avec une brevéttoxicose (Barron *et al.*, 2020).

La première partie de ce manuscrit présente une étude bibliographique faisant état des connaissances actuelles sur *Karenia brevis*, la dynamique des populations algales et l'émergence des efflorescences, avant de s'intéresser aux caractéristiques des brevéttoxines. Elle expose également une revue des effets connus des efflorescences algales sur la faune sauvage maritime.

La seconde partie consiste en une étude rétrospective réalisée sur l'ensemble des cormorans admis à la CROW pour des signes de brevéttoxicose entre 2015 et 2019. Nous décrirons dans un premier temps les anomalies cliniques et paracliniques des animaux atteints, mais aussi leur prise en charge dans un centre de réhabilitation et leur devenir. Nous nous intéresserons ensuite à la répartition géographique des cas, en comparaison aux zones de prolifération de *K. brevis*. Enfin, nous étudierons la corrélation temporelle entre la survenue des marées rouges et le nombre de cormorans atteints de brevéttoxicose admis à la CROW.

Première partie : étude bibliographique

1. Description de *Karenia brevis*, organisme majeur des marées rouges

Karenia brevis est un organisme unicellulaire photosynthétique appartenant au genre *Karenia*, anciennement appelé *Gymnodinium breve* et comprenant 12 espèces. Ces dernières sont retrouvées tout autour du globe, la plupart ayant été décrites dans des études examinant des problématiques de santé publique ou de mortalité animale massive. Les premières études se sont consacrées à *Karenia mikimotoi*, à l'origine d'une mortalité importante chez les poissons ostéichthyens et les huitres (*Magallana gigas*) au Japon (Oda, 1935). Lorsque *K. brevis* a été incriminée dans les phénomènes de marées rouges en Floride (Davis, 1948), elle est devenue l'espèce d'algue toxique la plus étudiée.

Cependant, de nouvelles espèces de *Karenia* ont été découvertes au cours des dernières décennies. On sait désormais que si les marées rouges se produisant dans le golfe du Mexique sont majoritairement imputables à *K. brevis*, elles associent en réalité plusieurs espèces.

A. Systématique et description cellulaire de *K. brevis*

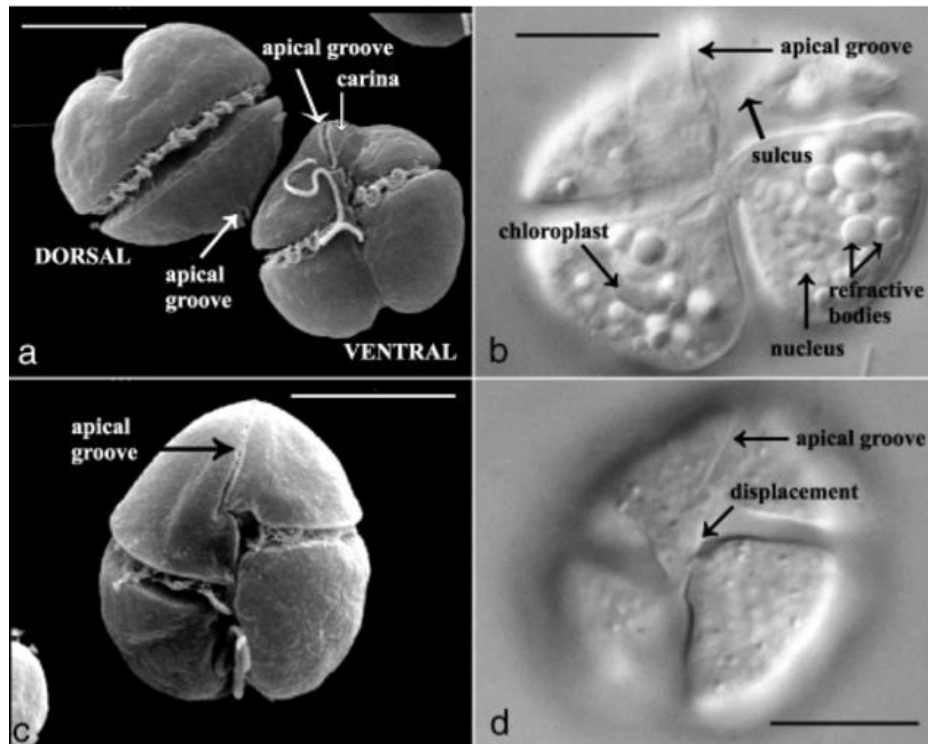
Les *Kareniaceae* sont une famille de dinoflagellés qui comporte trois genres : *Karenia*, *Karlodinium* et *Takayama*.

a. Caractéristiques des dinoflagellés et spécificité des *Kareniaceae*

Les dinoflagellés sont des microorganismes eucaryotes unicellulaires photosynthétiques aquatiques. Chez beaucoup d'espèces, la cellule est protégée par une thèque constituée de plaques rigides de cellulose incrustées de silice. Ce n'est pas le cas des espèces du genre *Karenia*. Ce dernier regroupait initialement trois espèces : *K. brevis*, *K. mikimotoi* et *K. brevisulcata*. Plus d'une quinzaine d'espèces ont été découvertes depuis.

Ces cellules mesurent de 18 à 45 µm de diamètre et contiennent un noyau qui reste condensé tout au long de la mitose, à l'instar de la plupart des dinoflagellés. La photosynthèse est réalisée grâce à 10 à 20 chloroplastes situés en périphérie de la cellule, contenant les molécules de chlorophylle et bêta-carotène. Les *Kareniaceae* possèdent également des pigments accessoires : la fucoxanthine et trois de ses dérivés. Cela les distingue de l'ensemble des autres dinoflagellés, dont le pigment accessoire majeur est la péridinine (Steidinger, 2009). La structure microscopique de *K. brevis*, est présentée sur la figure 1.

Figure 1 : Caractéristiques structurales de *K. brevis* (Haywood *et al.*, 2004)



Vues ventrale et dorsale de *K. brevis* en microscopie électronique (a+c) : présence de 2 flagelles et d'un sillon apical caractéristique (apical groove). Vues ventrales en microscopie optique (b+d). Chloroplast: chloroplaste / Nucleus : noyau / Apical groove: sillon apical. Barre d'échelle : 10 μ m.

b. Cycle biologique

Parmi les 12 espèces de *Karenia*, la plupart des études de biologie ont été réalisées sur *K. brevis*.

- *Reproduction asexuée*

La reproduction est majoritairement asexuée, avec une scission binaire se produisant tous les deux à dix jours. Comme la plupart des dinoflagellés, les *Karenia* se divisent principalement la nuit, ce processus étant sous le contrôle d'une horloge biologique (Van Dolah *et al.*, 2009).

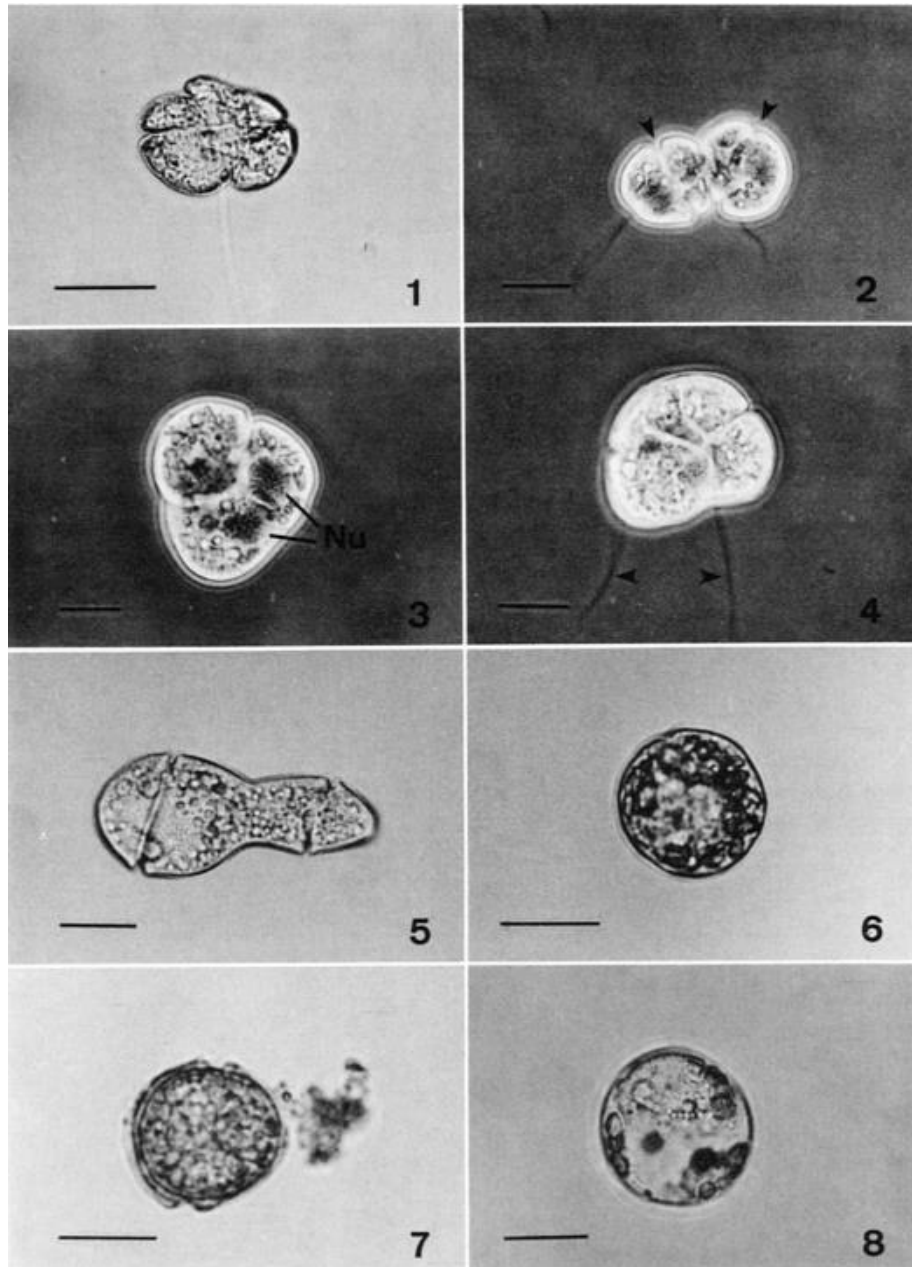
- *Reproduction sexuée*

Plusieurs travaux ont mis en évidence une capacité de reproduction sexuée, avec une augmentation de la production de gamètes lorsque différents clones de *K. brevis* étaient mélangés, et qu'ils étaient soumis à des conditions restrictives en matière d'azote disponible, de lumière ou placés à basse température (Walker, 1982).

Cette reproduction est isogame : les gamètes possèdent la même morphologie et ne peuvent être classifiés en « mâles » ou « femelles ». Il s'agit de cellules arrondies d'environ 18 à 24 μ m de diamètre. La fusion gamétique débute environ deux à trois heures après le début de la période sombre et est précédée d'une agrégation des gamètes. Les gamètes agrégés se déplacent rapidement en groupe serré avant qu'une paire ne finisse par quitter le groupe. Les deux cellules se comportent alors comme si elles étaient reliées par un fil élastique les faisant bouger d'avant en arrière dans l'eau. Ce phénomène a été observé aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. La fusion

cytoplasmique précède la fusion des noyaux et donne naissance à un planozygote : zygote doté de deux flagelles longitudinaux, d'environ 43 μm de diamètre (Walker, 1982). L'ensemble de ces étapes peut être visualisé sur la figure 2.

Figure 2 : Étapes de la reproduction sexuée de *K. brevis* observée en microscopie optique (Walker, 1982)



1 : Cellule motile asexuée / 2 : fusion des gamètes / 3 : Planozygote, les noyaux n'ont pas encore fusionné / 4 : Planozygote avec 2 flagelles longitudinaux / 5 : Forme hypothèque / 6 : Possible kyste obtenu en culture / 7 : Possible kyste issue d'une population naturelle / 8 : Forme ronde, fréquente dans les cultures soumises à un stress environnemental. Barre d'échelle : 20 μm

- **Existence d'hypnozygotes benthiques**

Wilson (1967) a émis l'hypothèse de l'existence d'hypnozygotes, zygotes à paroi épaissie qui germent après une période de dormance. Ces derniers représenteraient un stock benthique permettant le renouvellement des populations. En effet, des hypnozygotes ont été observés en cultures de *K. brevis* et de nombreuses cellules similaires ont été trouvées dans des sédiments sur la côte occidentale de la Floride ; leur appartenance à l'espèce *K. brevis* n'a toutefois pas été confirmée génétiquement (Kang, 2010). Comme de nombreuses zones de prolifération de *K. brevis* sont assez superficielles pour que la lumière atteigne le fond marin, il paraît plausible que le cycle biologique de cette espèce ait lieu pour partie dans le benthos.

Sinclair et Kamykowski (2008) ont montré que *K. brevis* est capable de nager dans les eaux interstitielles des sédiments. L'existence de telles cellules benthiques actives pourrait ainsi modifier notre vision des mécanismes d'initiation des efflorescences chez cette espèce. En effet, la plupart des recherches se sont concentrées sur les cellules situées dans la colonne d'eau et non dans le benthos.

c. Motilité

K. brevis peut se déplacer dans l'eau à une vitesse d'environ 1 m/h grâce à deux flagelles, dans des conditions environnementales (McKay *et al.*, 2006). Cette espèce présente en effet un phototropisme et un géotropisme : les microorganismes s'accumulent en surface en journée et se dispersent dans la colonne d'eau la nuit (Kerfoot *et al.*, 2002). Heil (1986) a démontré que les déplacements vers la surface et vers le fond commencent respectivement avant la photopériode et la scotopériode, suggérant l'existence d'une horloge biologique. Ce comportement pourrait interagir avec des caractéristiques hydrographiques, à l'origine d'une concentration dans certaines zones indépendamment de la multiplication des organismes. Il s'agirait alors d'un mécanisme d'initiation des efflorescences algales qui résulterait en une population monospécifique dans une zone donnée.

B. Physiologie

a. Température de développement

K. brevis a été observée dans l'eau de mer à des températures de 7 à 33°C, mais la croissance optimale en laboratoire est obtenue entre 22 et 28°C (Vargo, 2009).

b. Influence de la salinité

K. brevis se développe généralement entre 18 et 45 PSU (1 PSU=1 g de NaCl/kg d'eau), mais le taux de multiplication maximal est atteint avec une salinité de 30 à 40 PSU (Vargo, 2009). Comme *K. brevis* se développe dans des eaux salées et n'est pas retrouvée en deçà de 24 PSU, les marées rouges ont généralement lieu dans les eaux côtières, mais pas dans les estuaires, à l'exception des épisodes de sécheresse qui augmentent alors artificiellement la salinité (Steidinger et Ingle, 1972).

Un événement unique s'est produit en 1998 (Dortch *et al.*, 1998), au cours duquel les cellules de *K. brevis* ont été transportées depuis la péninsule floridienne vers le delta du Mississippi et ont alors été retrouvées dans des eaux de très faible salinité (5 PSU).

c. Phototropisme

Toutes les espèces de *Karenia* possèdent les chlorophylles de type a et c, associées à plusieurs pigments accessoires qui remplacent la péridinine retrouvée chez la plupart des dinoflagellés : fucoxanthine, 19-butanoyloxyfucoxanthine, 19-hexanoyloxyfucoxanthine et 19-hexanoyl-oxyparacentrone-3-acétate (Steidinger *et al.*, 2008). Schaeffer *et al.* (2007) ont montré que différents clones de *K. brevis* possèdent des capacités photosynthétiques significativement différentes, et sont ainsi capables de se développer sous une large gamme d'intensités lumineuses, avec toutefois une préférence pour les faibles intensités rencontrées dans les eaux profondes et au niveau des sols sédimentaires. La luminosité élevée en surface est ainsi tolérée grâce aux pigments du cycle de la xanthophylle : la diadinoxanthine et la diatoxanthine (Evens *et al.*, 2001).

Des études portant sur *K. mikimotoi* ont aussi mis en évidence une croissance sous des intensités lumineuses variables grâce à des mécanismes cellulaires de photo-adaptation : les cellules se développant en profondeur contiennent plus de chlorophylle a, ce qui améliore l'efficacité photosynthétique en conditions de faible luminosité (Gentien, 1998).

d. Nutrition

Les dinoflagellés du genre *Karenia* sont considérés comme des organismes autotrophes, mais possèdent également la capacité d'utiliser des composés organiques et d'ingérer des microorganismes. Des études de populations naturelles de *K. brevis* révèlent ainsi l'utilisation de nitrates, d'urée, d'ammonium, de glutamate, de phosphore organique et de matière organique dissoute excrétée par *Trichodesmium*, une cyanobactérie filamenteuse (Mulholland *et al.*, 2004), mais aussi de glycine, de méthionine et de valine (Baden *et al.*, 1979). Sinclair *et al.* (2009) ont démontré que *K. brevis* absorbe urée et ammonium aussi bien le jour que la nuit, ce qui pourrait jouer un rôle important pour se procurer des nutriments durant la migration verticale circadienne.

Shimizu *et al.* (1995) ont découvert que l'ajout d'urée et de glycine aux cultures de *K. brevis* stimule une transition vers un mode de nutrition plus hétérotrophe et augmente la biomasse et la production de brevotoxines d'un facteur deux à quatre. L'ingestion de cyanobactéries du genre *Synechococcus* a aussi été documentée dans des cultures de *K. brevis* ; leur taux de croissance s'en trouvait alors accru, par la diversification du type de substrat nutritionnel utilisé (Glibert *et al.*, 2009). Ce mode de nutrition pourrait ainsi jouer un rôle important dans le maintien des populations naturelles de *K. brevis* dans des eaux pauvres en nutriments azotés.

Il apparaît ainsi que ces dinoflagellés sont très polyvalents sur le plan nutritionnel, par l'utilisation de nutriments organiques et inorganiques ainsi que l'ingestion d'autres microorganismes (phagotrophie). Le fait que *K. brevis* se développe dans les milieux oligotrophes au centre du golfe du Mexique indique que cet organisme peut survivre malgré une très faible disponibilité en nutriments.

D'autres espèces de *Karenia* ont probablement des capacités similaires. Par exemple, Mountfort *et al.* (2006) ont montré que l'ajout d'acide glycolique et d'alanine aux cultures de *K. seliformis* double leur biomasse et la production de gymnodimine. Par ailleurs, l'azote a été identifié comme un nutriment clé dans la prolifération excessive de *Karenia* lors de marées rouges. *K. mikimotoi* est capable d'utiliser les nitrates, nitrites et l'urée comme sources d'azotes, ainsi que deux acides aminés (glutamine et tryptophane). Cette espèce utilise par ailleurs des sources variées, organiques comme inorganiques, de phosphore (Yamaguchi et Itakura, 1999).

C. Interactions biotiques

Les interactions entre *K. brevis* et d'autres microorganismes marins sont au cœur des études destinées à comprendre les mécanismes d'initiation, maintien et extinction des efflorescences algales. De nombreux phénomènes demeurent toutefois inconnus ou peu compris.

a. Virus

De la même façon que *K. brevis* ingère d'autres microorganismes, ces derniers peuvent également attaquer *Karenia*. Ainsi, différents virus capables de lyser *K. brevis* et *K. mikimotoi* ont été isolés (Paul *et al.*, 2002) ; leur rôle dans la dynamique des populations des espèces de *Karenia* est cependant inconnu à ce jour. Certains virus pourraient se répandre plus facilement au sein de populations denses, causant le déclin des efflorescences algales.

b. Bactéries

Doucette *et al.* (1999) ont isolé deux bactéries, naturellement présentes dans les eaux du golfe du Mexique, létales pour *K. brevis* et *K. mikimotoi*. Il s'agit de deux souches de bactéries à Gram négatif du genre *Cytophaga* notées ANSW2-2 et 41-DBG2. Cependant, cette létalité s'exprimait uniquement lorsque la concentration en bactéries dépassait un seuil de 10⁶ cellules/μL. Ainsi, cette toxicité était largement diminuée en présence d'autres bactéries, par inhibition compétitive dans le milieu. Le mécanisme d'action et la spécificité de leur pouvoir algicide envers *K. brevis* n'ont pas encore été déterminés.

c. Copépodes

Les copépodes sont un groupe de petits crustacés libres ou parasites d'autres organismes marins, se nourrissant notamment de dinoflagellés. Breier et Buskey (2007) ont montré qu'en conditions expérimentales, le copépode *Acartia tonsa* présentait des taux d'ingestion et de reproduction plus faibles lorsqu'il était nourri avec *K. brevis* qu'avec d'autres espèces de dinoflagellés, même en l'absence de production de brevotoxines par *K. brevis*.

Diverses espèces de copépodes ne se nourrissant pas de *K. brevis* sont affectées par les toxines présentes dans l'eau : celles-ci induisent chez les copépodes une tachycardie et des dysfonctionnements musculaires. Cependant, Turner et Tester (1989) ont montré que trois espèces de copépodes partageant l'habitat de *K. brevis* ingéraient le dinoflagellé sans problèmes apparents, devenant ainsi vecteurs de brevotoxines au sein de la chaîne trophique.

Les mécanismes à l'origine de cette nutrition sélective ne sont pas connus, mais pourraient réduire la pression trophique exercée sur *K. brevis* par rapport à d'autres espèces d'algues, certains copépodes se nourrissant uniquement des autres espèces de dinoflagellés présentes dans le milieu. Ainsi, il a été démontré que la composition des populations de zooplanctons est différente dans les zones de prolifération importante de *K. brevis* et en dehors de celles-ci (Lester *et al.*, 2008). Cela pourrait être dû à des effets spécifiques de *K. brevis* ou à des changements globaux de la biomasse lors de ces épisodes.

d. Allélopathie et production de toxines

L'allélopathie désigne tout phénomène biologique par lequel un organisme produit un ou plusieurs composés biochimiques qui influencent la germination, la croissance, la reproduction et la survie d'autres organismes du même biotope. Dans un environnement aquatique, l'eau disperse tout

composé soluble ; la dilution rapide réduit donc la probabilité de rencontre entre la substance produite et l'organisme aquatique. Le potentiel de l'allélopathie est maximisé lorsque l'eau est soumise à peu de courants, autorisant la concentration locale des composés libérés, et que les organismes récepteurs sont proches des émetteurs. Les effets de l'allélopathie peuvent être synergiques avec des conditions environnementales restrictives (température, salinité, luminosité, pH, dioxygène).

- *Composés organiques*

K. brevis produit des composés allélochimiques qui nuisent au développement de la majorité des autres espèces de phytoplanctons (Kubanek *et al.*, 2005). Prince *et al.* (2010) ont cependant mis en évidence que ces molécules ne sont pas des brevéttoxines, mais divers composés organiques polaires, instables. Des molécules similaires ont été identifiées chez d'autres espèces de *Karenia*, avec des effets hémolytiques et cytotoxiques (Yasumoto *et al.*, 1990). Différentes espèces produisent ainsi des lipides, stérols et acides gras polyinsaturés ayant des propriétés ichtyotoxiques.

La plupart de ces composés organiques actifs n'ont pas été vraiment caractérisés, à l'exception d'une molécule bien décrite : la gymnodimine. Il s'agit d'une substance produite par *K. selliformis* qui active les récepteurs calciques et altère les récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine dans les cellules musculaires, agissant comme un inhibiteur neuromusculaire (Mountfort *et al.*, 2006). Cette action est à l'origine de mortalité chez des espèces de vertébrés et d'invertébrés.

- *Superoxydes*

Marshall *et al.* (2005) ont montré que de nombreuses algues, dont *K. brevis* et *K. mikimotoi* produisent des superoxydes et dérivés réactifs du dioxygène à effet allélopathique contre d'autres algues ou bactéries.

Il apparaît ainsi que toutes les espèces de *Karenia* étudiées produisent des substances allélochimiques ; beaucoup synthétisent aussi des toxines létales pour diverses espèces animales marines. La diversité de ces composés n'ayant pas été totalement élucidée, il semble plausible que la plupart des substances allélochimiques actives sur d'autres microorganismes (algues, virus, bactéries, prédateurs protozoaires) puissent aussi affecter des animaux marins de grande taille du fait de la similarité de leurs métabolismes cellulaires, en particulier en cas de forte concentration comme lors des phénomènes de marées rouges. De plus, comme de nombreuses molécules sont liposolubles, on peut émettre l'hypothèse qu'une faible fraction de ces composés allélochimiques atteigne l'homme au travers de la chaîne alimentaire suite à un mécanisme de bioaccumulation.

Il n'a pas été démontré formellement que les brevéttoxines avaient un effet allélopathique. Cependant, certains composés produits par des espèces de *Karenia* affectent les transports ioniques ; ceci suggère que les brevéttoxines, qui agissent sur les canaux sodiques, peuvent également faire partie du répertoire allélopathique de *Karenia*.

L'allélopathie représente également un avantage sélectif contre les microorganismes susceptibles de s'attaquer à ces algues : des composés libérés lors du contact intercellulaire entre *Karenia* et un prédateur inhibent alors ce dernier, permettant la survie de l'algue et la propagation de son génotype (contrairement à la libération de brevéttoxines, qui survient après la lyse cellulaire). Cela ne fonctionne pas avec un prédateur métazoaire de grande taille qui concentre de nombreuses cellules phytoplanctoniques à la fois : l'algue meurt avant que la toxine ait affecté le prédateur et le génotype toxique est perdu.

Bien que non sélectionnées naturellement pour agir sur des organismes métazoaires, des substances allélochimiques actives sur des microorganismes microbiens peuvent tout de même affecter des métazoaires lors de concentrations algales très élevées, du fait de leur mécanisme d'action affectant des récepteurs ou canaux ioniques présents aussi chez ces espèces. Cela pourrait prolonger les épisodes de prolifération par la réduction de la pression de prédation, mais ne suffit pas à expliquer l'évolution explosive de faibles populations d'algues en efflorescence massive. La migration verticale des *Karenia* permettrait en revanche d'élever leur concentration localement et ainsi contribuer à déclencher le phénomène initial de prolifération, grâce à des concentrations locales de molécules allélopathiques suffisantes pour affecter les organismes métazoaires.

2. Dynamique des populations et émergence des marées rouges

A. Distribution globale des espèces de *Karenia*

La compréhension de la distribution globale des espèces de *Karenia* est probablement très incomplète, car la majorité des études sont initiées en réponse à des marées rouges sévères attirant donc l'attention ; c'est ce qui a permis l'identification des espèces connues à ce jour.

Zingone *et al.* (2006) ont mené une recherche attentive des espèces de phytoplanctons potentiellement toxiques le long de la côte occidentale de l'Italie. Ils ont alors mis en évidence la présence de plusieurs espèces de *Karenia*, sans qu'aucun effet sur les populations de poissons n'ait été rapporté. Des études similaires conduites dans d'autres parties du monde révéleront probablement l'existence d'autres espèces au sein du genre *Karenia* et étendront les aires de répartition des espèces déjà connues.

a. *Karenia mikimotoi*

Cette espèce présente une répartition mondiale ; elle a été mise en évidence dans le golfe du Mexique, le long de la côte atlantique d'Amérique du Nord, mais aussi en Espagne, France (Gentien, 1998), Irlande (Raine *et al.*, 2001), Grande-Bretagne (Pingree *et al.*, 1975), Norvège (Braarud et Heimdal, 1970), Suède (Lindahl, 1983), Danemark (Carstensen et Conley, 2004), Japon (Ono *et al.*, 1996), Allemagne (Elbrächter, 1998).

b. *Karenia brevis*

Sa distribution est bien plus restreinte que celle de *K. mikimotoi* : on trouve cette espèce principalement en pleine mer dans le golfe du Mexique, en faible concentration (Geesey et Tester, 1993). *K. brevis* forme cependant fréquemment des efflorescences toxiques sur la côte ouest de la Floride et plus rarement le long des côtes texanes et mexicaines (Steidinger, 2009). Dans de rares cas, des efflorescences initiées dans le golfe du Mexique ont été emportées par le Gulf Stream le long de la côte atlantique de l'Amérique du Nord (Tester et Steidinger, 1997).

L'ichtyotoxicité de *Karenia brevis* a été reconnue en 1946-1947, mais des mortalités de poissons sont rapportées depuis au moins 1530, suggérant que *Karenia brevis* forme des marées rouges depuis des siècles dans le golfe du Mexique. Nombre d'études ont été conduites sur la côte occidentale de la Floride depuis 50 ans ; on sait désormais que différentes espèces coexistent dans le golfe du Mexique avec notamment *K. longicanalis*; *K. mikimotoi*, *K. papilionacea* et *K. seliformis*.

c. Autres espèces

D'autres espèces de *Karenia* forment des efflorescences toxiques ailleurs dans le monde comme en Nouvelle-Zélande (Chang, 2011), au Japon, en Irlande ou encore en Afrique du Sud. Ces espèces ont aussi des effets toxiques sur la faune marine, mais n'ont pas d'impact rapporté sur la santé humaine comme *K. brevis*, et sont de ce fait moins étudiées.

B. Efflorescences algales

Comme évoqué précédemment, la plupart des études s'intéressent aux efflorescences algales délétères ayant des conséquences visibles sur la faune ; les données sont donc collectées pendant la phase de maintien de ces efflorescences. La concentration de ces microorganismes est la plupart du temps très faible et ne devient importante qu'occasionnellement et dans des aires géographiques restreintes. Par conséquent, on connaît en réalité très peu la dynamique des populations de *Karenia* en dehors de ces épisodes.

Les marées rouges dues à *K. brevis* et *K. mikimotoi* sont décrites depuis des centaines d'années et font partie intégrante de leur cycle biologique. On ignore cependant si les nouvelles espèces découvertes ont toujours proliféré de la sorte et sont seulement étudiées depuis peu, ou si ces marées récentes constituent un nouveau phénomène, potentiellement lié à un changement environnemental.

La composition spécifique des populations lors d'efflorescence est très variable : certaines sont monospécifiques et d'autres associent *Karenia* à d'autres algues. Il a été découvert récemment que de nombreuses marées rouges sont en réalité le fruit de la prolifération de plusieurs espèces de *Karenia*, suggérant que ces dernières partagent des besoins écologiques et biologiques similaires. Cela interroge néanmoins sur le phénomène d'exclusion compétitive et la façon dont ces différentes espèces peuvent coexister en occupant des niches écologiques identiques.

La question fondamentale est donc de savoir comment les espèces de *Karenia* parviennent à développer une telle biomasse. C'est une question très complexe qui implique probablement de nombreux facteurs biologiques et physiologiques. En effet, *Karenia*, comme la plupart des dinoflagellés, se réplique très lentement à savoir moins d'une fois par jour. Comment ces organismes peuvent-ils alors faire concurrence à des algues dont la multiplication est beaucoup plus rapide, telles les diatomées ?

a. Caractéristiques déterminantes des dinoflagellés

- *Motilité*

Si les dinoflagellés comptent parmi les algues dont la multiplication est la plus lente, ce sont en revanche les plus rapides à se déplacer. Les *Kareniaceae* effectuent ainsi une migration verticale selon un cycle nyctéméral, s'accumulant en surface au cours de la phase lumineuse. Ces organismes peuvent aussi accéder à des zones riches en nutriments dans des eaux stratifiées, non accessibles à la plupart des algues concurrentes (Kamykowski *et al.*, 1998). De plus, *K. brevis* est capable de se déplacer dans l'eau interstitielle des sédiments, où la concentration en nutriments inorganiques est plus élevée (Sinclair et Kamykowski, 2008).

- *Utilisation des nutriments organiques*

Comme expliqué précédemment, les *Kareniaceae* ont une plus grande capacité à utiliser des nutriments organiques que d'autres espèces d'algues. Or, les eaux côtières contiennent souvent bien plus de nutriments organiques qu'inorganiques. Cela pourrait constituer un élément favorisant le développement de *Karenia* au détriment des algues uniquement lithotrophes.

- *Allélopathie*

Les substances allélochimiques produites par *K. brevis* sont susceptibles d'expliquer leur succès comparativement à des algues à croissance plus rapide ou à des prédateurs microbiens. Ces composés ne sont en général pas actifs, à faible concentration, sur des organismes métazoaires se nourrissant des dinoflagellés. Cependant, après une prolifération importante, leur concentration élevée pourrait contribuer à inhiber ces prédateurs et à prolonger l'efflorescence.

Ces trois facteurs constituent des avantages sélectifs, mais ne suffisent pas à expliquer la distribution sporadique des efflorescences dans le temps et l'espace ni à prédire leur apparition.

b. Facteurs physiques favorisants

- *Taux de dilution et turbulences marines*

Les turbulences aquatiques sont à l'origine d'une dilution des cellules. Afin qu'une efflorescence débute et se maintienne, ce taux de dilution doit être inférieur au taux de croissance de *K. brevis*.

Les trois zones où le brassage des eaux est le plus faible dans le golfe du Mexique sont situées le long des côtes du Mexique, du Texas et de la Floride, soit précisément là où *Karenia* prolifère le plus (Olascoaga, 2010). Il semble donc que des eaux fortement stratifiées avec un faible taux de dilution lié aux turbulences soient favorables au développement de *Karenia brevis*.

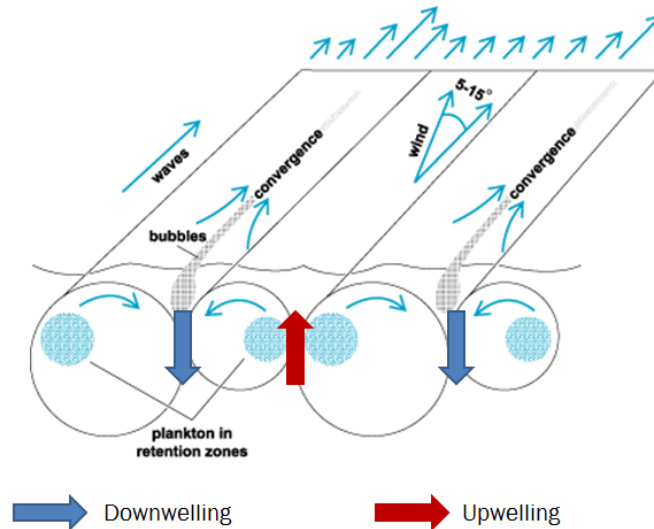
- *Concentration mécanique*

Dans quasiment tous les cas d'efflorescences rapportés, la concentration en algues augmente plus rapidement que ne le permet leur taux de croissance. Cela implique donc nécessairement un phénomène physique sous-jacent de concentration des cellules.

Du fait de sa migration verticale circadienne, *K. brevis* a tendance à s'accumuler en surface durant la journée. Ce processus ne peut concentrer les algues que d'un ordre de grandeur : par exemple, les cellules d'une colonne d'eau de 10 m nagent vers la surface et se retrouvent donc concentrées sur le premier mètre.

Les courants de circulation de Langmuir peuvent aussi concentrer les cellules dans une zone réduite, à petite échelle. La circulation de Langmuir consiste en une série de tourbillons lents en rotation inverse, à la surface de l'océan, parallèle à la direction du vent (figure 3). Ces courants se développent lorsque le vent souffle régulièrement sur la surface de la mer. Bien qu'ils soient transitoires et que leur force et leur direction dépendent des propriétés du vent et des vagues, ils facilitent le mélange des nutriments et affectent la distribution des organismes dans la couche supérieure de l'océan.

Figure 3 : Représentation schématique de la circulation de Langmuir



Downwelling: plongée d'eau / Upwelling: remontée d'eau / Bubbles: bulles / Waves: vagues / Wind: vent. Plankton in retention zones : zones de rétention des phytoplanctons dues aux courants.

Ces deux phénomènes pourraient augmenter suffisamment la densité de *Karenia brevis* localement pour accroître leur potentiel allélochimique. Les mouvements d'upwelling (remontée d'eau) et downwelling (plongée d'eau) associés peuvent, à long terme, concentrer les algues de façon bien plus importante (Hetland et Campbell, 2007).

c. Sources de nutriments nécessaires

Une grande quantité de nutriments est requise pour générer un développement majeur de la biomasse, mais pas nécessairement une concentration élevée. En effet, dans le cas de *Karenia brevis*, les cellules peuvent se développer sur une grande surface avec peu de nutriments ; puis un mécanisme physique de concentration rassemble ces cellules en une efflorescence, qui contient alors bien plus de nutriments que l'eau dans laquelle elles se développaient initialement.

Ainsi, alors que les nutriments disponibles sont un facteur limitant de nombreuses proliférations d'algues sur la planète, leur importance est moindre dans l'initiation des marées rouges de *Karenia*. Au contraire, un apport soudain de nutriments inorganiques génère plutôt un avantage compétitif aux diatomées. Les sources nutritives conférant un avantage aux *Karenia* par rapport aux diatomées sont celles situées sous la pycnocline (couche verticale où le gradient de densité de l'eau est le plus élevé) ou dans les sédiments, ainsi que les nutriments organiques que les dinoflagellés sont capables d'utiliser. Au réservoir important de nutriments organiques présent dans l'eau de mer s'ajoute pour *Karenia* la mort de populations de diatomées du biotope benthique, de poissons ou l'excrétion de nutriments par des organismes tels *Trichodesmium*.

Il est aussi important de distinguer les sources nutritives amorçant une efflorescence et celles qui permettent d'augmenter la biomasse et de les maintenir dans le temps. De nombreuses sources nutritives sont potentiellement disponibles pour augmenter la biomasse de *Karenia* ; il est donc difficile d'identifier une source à l'origine de ces efflorescences.

C. Cas particuliers des marées rouges dans le golfe du Mexique

La prolifération de *K. brevis* survient le plus souvent à l'automne le long de la côte occidentale de la Floride, entre la baie de Tampa et l'île de Sanibel soit la zone où le brassage lié aux marées est le plus faible (Olascoaga, 2010).

a. Le phénomène d'upwelling

En Floride, les vents tendent à favoriser l'upwelling en automne, ce qui a donné lieu à de nombreuses études sur le transport de *K. brevis* par ces courants. Cependant, l'upwelling seul ne suffit pas à concentrer les cellules : celles-ci vont en effet être transportées plus près des côtes, puis une fois qu'elles sont remontées en surface, les courants superficiels vont les emporter à nouveau vers le large. Le mécanisme conduisant à l'accumulation de *K. brevis* le long des côtes n'a donc pas encore été totalement élucidé. Une autre hypothèse suggère qu'une séquence complexe de courants d'upwelling et downwelling serait responsable de la concentration des cellules (Lanerolle *et al.*, 2006).

Un autre problème soulevé par l'hypothèse d'upwelling est que peu de données ont mis en évidence des quantités significatives de *K. brevis* dans les eaux profondes du plateau continental ouest floridien ; la plupart des données montrent plutôt de hautes concentrations dans les eaux de surface. Par conséquent, le courant d'upwelling conduirait à un flux de cellules vers le large. Un autre mécanisme piégeant les cellules en région côtière est nécessairement impliqué.

À l'automne, d'autres facteurs interagissent avec ce courant : la stratification verticale s'affaiblit et les vents s'intensifient (Weisberg *et al.*, 2001). Les courants côtiers changent de direction vers le sud, et les eaux superficielles, au nord, se refroidissent et génèrent des panaches d'eaux froides vers le sud, le long de la côte, produisant des fronts thermiques. Cela correspond également au pic de la saison humide et du ruissellement associé au sud de la Floride, qui provoque des fronts de salinité le long de la côte.

Ainsi il est suspecté que l'ensemble des mouvements d'eau, associés aux fronts thermiques et aux fronts de salinité, produisent, à cette période, des conditions propices à la concentration de *K. brevis*. De nombreux facteurs physiques interviennent donc certainement, mais il n'existe à l'heure actuelle aucun modèle permettant de prédire exactement où et quand *K. brevis* proliférera.

b. Sources de nutriments

Il existe de nombreuses sources potentielles de nutriments le long de la côte occidentale de la Floride, mais on ignore si l'une d'entre elles peut être déterminante ou expliquer le développement initial de ces efflorescences et leur importance.

- *Ruissellement et prolifération aux embouchures de rivières*

Certaines études ont mis en évidence des corrélations entre les eaux de ruissellement provenant des terres et la prolifération de *K. brevis* (Brand et Compton, 2007). Cependant, il existe de nombreuses exceptions, avec des épisodes de prolifération en période de sécheresse et, à l'inverse, l'absence de prolifération lors de pluies et ruissellement intenses.

Un ensemble de données collectées par l'État de Floride sur 50 ans montre qu'un certain nombre d'efflorescences ont débuté à proximité d'embouchures de fleuves. Deux épisodes, en 2004 et 2005, provenaient ainsi de l'embouchure de du fleuve Caloosahatchee, où des concentrations

élevées en silice ont été mises en évidence, indiquant que les efflorescences ont eu lieu dans des masses d'eaux soumises à un ruissellement important (Yentsch *et al.*, 2008).

Brand et Compton (2007) ont soutenu que les éléments nutritifs des eaux de ruissellement jouaient un rôle significatif dans l'augmentation de la biomasse de *K. brevis*, car celle-ci est plus importante dans les eaux côtières de faible salinité qu'au large où la salinité est plus élevée. Ils ont également souligné le fait que la biomasse de *K. brevis* a augmenté significativement au cours des 50 dernières années, période au cours de laquelle le contenu nutritif s'est accru dans les eaux de ruissellement, mais pas au large. Il faut néanmoins noter que s'il existe une forte corrélation entre le ruissellement et les efflorescences, cela ne repose pas forcément sur la concentration en nutriments. Les fronts de salinité générés pourraient aussi contribuer aux mécanismes de concentrations de *Karenia*.

En plus des eaux de surfaces issues du ruissellement terrestre, l'apport des eaux souterraines doit également être pris en compte. Du fait des diverses activités humaines, la concentration en nutriments des eaux souterraines a évolué à la hausse de façon spectaculaire au cours des dernières décennies (Scott *et al.*, 2004). Or *K. brevis* est capable de migrer dans les sédiments pour tirer profit des teneurs plus élevées en nutriments dans les eaux interstitielles. Cette richesse en nutriments est mise en évidence par la concentration en chlorophylle plus forte dans les sédiments que dans la colonne d'eau les surplombant.

- *Dépôts de phosphates*

Une caractéristique particulière du plateau occidental floridien est la présence de larges dépôts de phosphates le long de la côte et probablement sur le reste du plateau continental. Le ratio N/P est donc bas et se développe en conséquence un écosystème limité par les ressources en azote (Walsh *et al.*, 2006). Les concentrations en azote inorganique sont habituellement très faibles sur la majorité du plateau continental, même côtier. Tout apport d'azote est donc rapidement absorbé par les phytoplanctons qui ont assez de phosphore, mais sont limités en azote. Cela confère un avantage sélectif aux cyanobactéries capables de fixer l'azote inorganique.

- *Relation avec Trichodesmium et rôle du fer*

Certains chercheurs ont noté une corrélation apparente entre la prolifération de la cyanobactérie *Trichodesmium*, et *K. brevis*. *Trichodesmium* excrète en effet de l'azote organique qui peut être utilisé par *K. brevis* (Mulholland *et al.*, 2004). Les cyanobactéries, en particulier celles fixant l'azote, ont besoin de davantage de fer que les algues pour se développer. Walsh *et al.* (2006) ont suggéré que le manque de fer limite normalement le développement de *Trichodesmium* sur le plateau occidental floridien. L'apport de poussières du Sahara, riches en fer, stimulerait alors la prolifération de *Trichodesmium* et donc par la suite de *K. brevis*.

Tandis que les eaux côtières reçoivent majoritairement du fer issu du ruissellement terrestre, les poussières atmosphériques représentent probablement la source majeure de cet élément au large. Il semble plausible qu'il stimule la prolifération de *Trichodesmium* et augmente les ressources en azote disponibles pour *K. brevis* sur le plateau floridien occidental. Il est moins évident de conclure que cela constitue le facteur majeur déterminant l'initiation d'efflorescences.

Plusieurs études portant sur la concordance temporelle entre la présence de poussières atmosphériques et la prolifération de *Trichodesmium* comme de *K. brevis* ont montré une corrélation positive seulement partielle (Stumpf *et al.*, 2008). De plus, ces poussières ont tendance à couvrir de larges zones dans le golfe du Mexique, alors que les efflorescences débutent dans des zones plus restreintes.

- **Mort d'autres organismes au sein de l'écosystème**

La mort d'autres organismes et le relargage de leurs nutriments constituent une autre ressource nutritionnelle potentielle pour *K. brevis*. La décomposition des poissons morts a été envisagée : lorsque la densité de *K. brevis* est suffisamment importante pour causer la mortalité des poissons, les nutriments issus de leur décomposition peuvent contribuer au maintien de l'efflorescence algale (Walsh *et al.*, 2009).

Une autre possibilité est le dépérissement des plantes benthiques en automne, où elles subissent le plus fort stress énergétique, lorsque les températures sont encore élevées (maintenant un rythme respiratoire élevé), mais que l'intensité lumineuse décline (Brand *et al.*, 2012). La mort des macroalgues et herbiers pourrait alors fournir des nutriments permettant la croissance de *K. brevis*.

La mort de populations de diatomées constitue une autre source nutritive potentielle. De nombreuses séquences saisonnières dans le monde débutent par la prolifération de diatomées utilisant les nutriments inorganiques ; puis lorsqu'elles meurent, les dinoflagellés deviennent dominants.

Quelle que soit la source initiale de nutriments, les efflorescences sont généralement beaucoup plus importantes à proximité des côtes (Brand et Compton, 2007). Cela suggère que même si les eaux de ruissellement ne sont pas un facteur déterminant dans l'initiation de la prolifération, elles jouent un rôle dans le développement et/ou le maintien d'une biomasse plus importante.

c. Une augmentation des marées rouges ?

À l'échelle mondiale, l'augmentation de la fréquence des efflorescences algales nuisibles est manifeste. Cela est parfois relié à des apports de nutriments d'origine anthropique, mais est-ce le cas pour *Karenia* ?

Comme évoqué précédemment, certains chercheurs ont relié l'augmentation de biomasse de *K. brevis* à un apport de nutriments par les eaux souterraines et les ruissellements d'origine anthropique. Les scientifiques et l'opinion publique semblent percevoir une augmentation de la fréquence, de la répartition géographique et de la persistance dans le temps des efflorescences (Kuhar *et al.*, 2009). Au cours des vingt dernières années, de nombreuses nouvelles espèces ont été découvertes, grâce à une amélioration des techniques de détection et d'identification moléculaire. Dans certaines régions, l'aquaculture intensive peut conduire à des concentrations élevées en nutriments et donc en algues. De même, il est plausible que l'eutrophisation due aux eaux usées et aux rejets d'engrais et pesticides issus de l'agriculture soit un facteur stimulant la croissance de ces algues.

Le développement des populations de *Karenia* est cependant complexe et encore peu compris actuellement. Du fait de leur sporadicité, il est difficile de déterminer si les proliférations ont réellement augmenté au cours du temps, en fréquence ou en importance. L'eutrophisation pourrait être impliquée dans l'augmentation de certains épisodes, mais certainement pas pour tous.

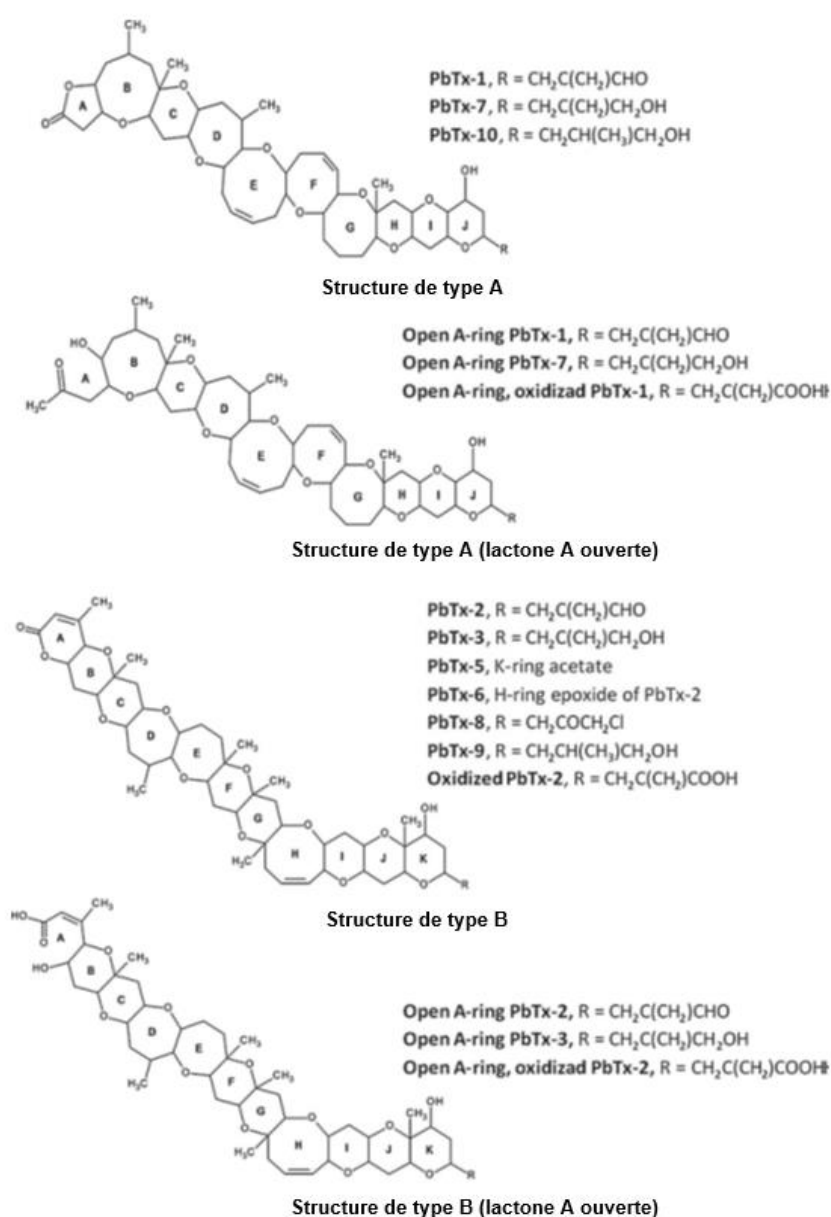
3. Étude toxicologique des brevétoxines

Les brevétoxines (PbTx) sont des polyéthers neurotoxiques produits par des dinoflagellés du genre *Karenia*, en particulier *Karenia brevis*.

A. Structure

Ce sont des composés inodores, insipides et résistants à la chaleur. Elles présentent deux formes structurales différentes, appelées types A et B (Brovedani *et al.*, 2016), présentés sur la figure 4. Le type B est le plus abondant. En fonction de la structure de la chaîne carbonée cyclique et de la fonction terminale, on peut distinguer 15 brevétoxines différentes, toutes dérivées de PbTx-1 (type A) ou PbTx-2 (type B), considérées comme les toxines mères.

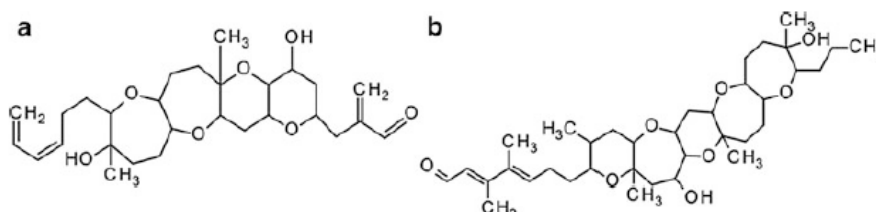
Figure 4 : Structure chimique des différents types de brevétoxines (Brovedani *et al.*, 2016)



Open A-ring : cycle A ouvert / oxidized PbTx : forme oxydée des brevétoxines

K. brevis peut aussi produire d'autres composés appelés hémibrévéttoxines, dont les structures sont présentées sur la figure 5. Ces toxines présentent une chaîne cyclique plus courte que les PbTx et sont pour cette raison considérées comme des produits incomplets de la synthèse des brevéttoxines. Plus spécifiquement, les hémibrévéttoxines présentent la même structure que les quatre derniers cycles de PbTx-2.

Figure 5 : Structure des hémibrévéttoxines (Brovodani *et al.*, 2016)



Les PbTx sont métabolisées par les crustacés et différents métabolites (résultant de réactions d'oxydation, de réduction, d'hydrolyse ou de conjugaison) ont été identifiés et caractérisés structurellement. Les herbiers (*Thalassa testudinum*) et les crustacés microphages comme les palourdes (*Macrocallista nimbosa*, *Mercenaria mercenaria*), buccins (*Busycon* sp.) et huitres (*Crassostrea virginica*, *Crassostrea gigas*), qui ne sont pas sensibles aux brevéttoxines, peuvent en accumuler en grande quantité et agir ainsi comme vecteur de contamination des espèces aquatiques ou de l'homme.

B. Pharmacocinétique/Toxicocinétique

PbTx-3 est la plus utilisée dans les études *in vivo* (Baden *et al.*, 2005). Les premières études toxicocinétiques ont cherché à caractériser la distribution, le métabolisme et l'élimination de cette toxine.

a. Distribution dans les différents organes

La première étude chez les mammifères fut réalisée par Poli *et al.* (1990) suite à l'administration intraveineuse de toxine (PbTx-3) chez des rats Sprague Dawley® (*Rattus norvegicus*). Une minute après l'administration, moins de 10 % de la dose administrée était encore en circulation. Après 30 min, la distribution dans l'organisme était la suivante : environ 70 % dans les muscles squelettiques, 18 % dans le foie et 8 % dans le tractus intestinal. De plus faibles concentrations ont été retrouvées dans le cœur, les reins, les testicules, le cerveau, la rate et les poumons. Des analyses chromatographiques sur les tissus musculaires ont révélé que seule la toxine mère était retrouvée dans les muscles squelettiques, laissant à penser que le muscle pourrait être un lieu de stockage de la toxine. À l'inverse, des métabolites de PbTx-3 étaient présents dans les fèces et la bile, suggérant que la toxine avait été métabolisée et que l'excrétion biliaire pourrait être la principale voie d'élimination. De fait, l'élimination fut principalement fécale et secondairement urinaire, et était quasi complète trois jours après exposition.

Ces résultats ont été ensuite confirmés par instillation intratrachéale chez des souris grises *Mus musculus* (Tibbetts *et al.*, 2006). Après 30 min, la toxine était rapidement éliminée des poumons et redistribuée vers le foie, les muscles et le tractus digestif. L'élimination de la toxine, quasi complète après quatre jours, s'est faite *via* les fèces (64 %) et l'urine (11 %).

Ces deux études suggèrent que PbTx-3 s'accumule principalement dans les tissus musculaires squelettiques et subit un métabolisme hépatique avec excrétion biliaire. Cependant, étant donné le caractère lipophile de ces toxines, d'autres compartiments d'accumulation ne peuvent être exclus. Par exemple, des études *in vivo* et *in vitro* d'absorption percutanée ont démontré que PbTx-3 est accumulée dans le derme après quatre heures (Kemppainen *et al.*, 1991). Ces études concordent avec l'hypothèse d'une liaison des brevétotoxines aux membranes cellulaires inhérente à leur lipophilie.

b. Transport dans le compartiment sanguin

D'autres études ont porté sur la distribution des brevétotoxines dans le compartiment sanguin ; certaines suggèrent que les toxines pourraient se lier à des protéines de transport plasmatiques. Bien que des concentrations en toxines de 25-30 nM aient été atteintes 12 h après une administration intrapéritonéale chez des souris, aucun effet toxique n'a été observé (Woofter *et al.*, 2005). En effet, 39 % de PbTx-3 était lié à des composants plasmatiques, dont environ 7 % à l'albumine. Dans la même étude, une possible liaison aux lipoprotéines a été investiguée en administrant *in vivo* une concentration élevée de PbTx-3 (100 ng/ml) par voie intraveineuse d'une part, et d'autre part en injectant la toxine par voie intrapéritonéale à des souris. Dans les deux cas, une fraction importante s'est liée à des lipoprotéines de haute densité (HDL). Ainsi le caractère lipophile des brevétotoxines confère aux lipoprotéines plasmatiques un rôle majeur dans leur transport dans le compartiment sanguin.

Cette interaction entre les brevétotoxines et les protéines plasmatiques a été caractérisée plus précisément par Wang et Ramsdell (2011) en étudiant la liaison de PbTx-3 à l'albumine sérique humaine. Des interactions covalentes et non covalentes ont été mises en évidence.

c. Métabolisation

Des complexes associant les toxines aux lipides ou aux acides aminés, résultant du métabolisme des crustacés, ont été incriminés dans la toxicité des brevétotoxines chez les mammifères les consommant, bien que leur rôle ne soit pas exactement déterminé. Ainsi certaines études ont cherché à caractériser la distribution de ces métabolites après administration intraveineuse de toxine chez des souris (Leighfield *et al.*, 2014).

Des complexes radiomarqués ont été administrés par voie intraveineuse à des souris, à dose sub létale. La distribution tissulaire et l'élimination de ces conjugués ont été comparées à celles de PbTx-3. L'élimination était quasiment complète après 48 h. Cependant, les conjugués aux acides aminés ou aux lipides ont montré des schémas de distribution et d'élimination particuliers :

- Le complexe acide aminé/toxine était principalement concentré dans les reins (8-22 % de la dose administrée) et dans le tractus digestif trois heures après administration ;
- Le complexe lipide/toxine était concentré dans le foie après trois heures puis dans les poumons après 12 h, avec une concentration croissante dans la rate à partir de 30 minutes post-administration.

Contrairement à PbTx-3, éliminée principalement dans les fèces, le conjugué acide aminé était éliminé dans les urines et le conjugué lipide à parts égales dans les urines et les fèces. La distribution et l'élimination particulières de ces composés sont dues à des différences structurales résultant de diverses réactions métaboliques se produisant chez les crustacés.

C. Mécanisme d'action

Les brévétotoxines agissent en se fixant sur les canaux sodiques-voltages dépendants (VGSC). Il est donc primordial de connaître le fonctionnement et le rôle de ces derniers afin de comprendre la physiopathologie de la brévétotoxicose.

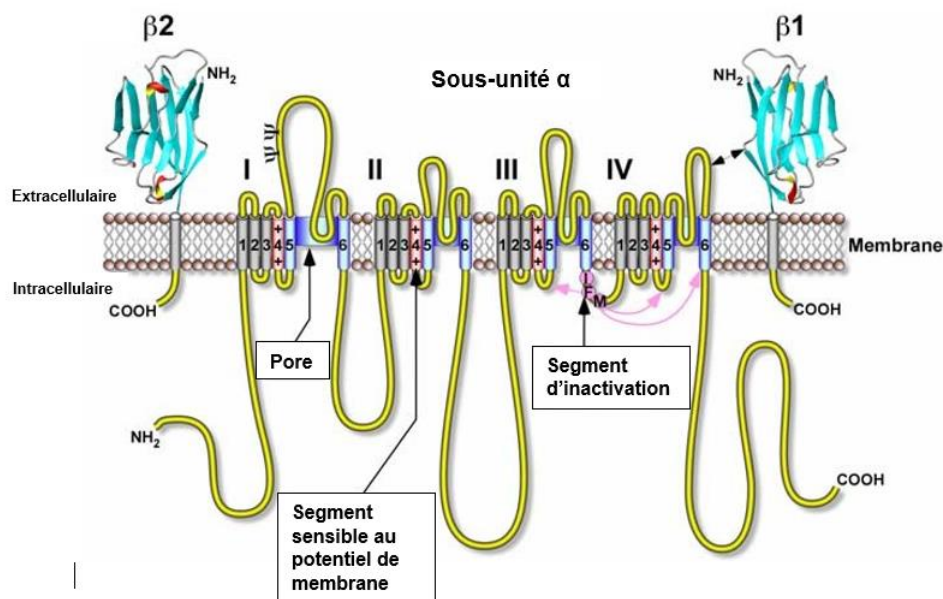
a. Rappel sur les canaux sodiques-voltages dépendants (Uemura, 2015)

Les VGSC sont des protéines transmembranaires largement répandues dans les membranes des cellules excitables, permettant un flux ionique de sodium vers l'espace intracellulaire. Ces canaux jouent un rôle majeur dans la physiologie neuronale, en permettant l'initiation de la dépolarisation membranaire à l'origine de potentiels d'actions. Ils possèdent trois caractéristiques majeures : une activation voltage-dépendante, une inactivation rapide et une sélectivité vis-à-vis des ions sodium.

- *Structure*

Les VGSC sont constitués d'une sous-unité alpha fortement glycosylée d'environ 240 à 260 kDa, associée à une ou plusieurs (jusqu'à quatre) sous-unités bêta auxiliaires (30-45 kDa) ; cette structure est présentée sur la figure 6. À ce jour, dix sous-types de canaux ont été identifiés sur la base de différences au sein de la sous-unité alpha. Chaque sous-type présente un fonctionnement électrophysiologique, une distribution tissulaire et un gène codant relativement spécifiques.

Figure 6 : Structure protéique transmembranaire des VGSC (Nicholson et Lewis, 2006)



La sous-unité alpha est elle-même composée de quatre domaines transmembranaires homologues, formés chacun de six hélices alpha hydrophobes, connectées par des boucles polypeptidiques intra et extracellulaires. L'hélice S4 contient cinq à six résidus arginine chargés positivement, sensibles au changement du potentiel de membrane. Les hélices S5 et S6 forment le pore ionique.

Les sous-unités bêta comportent un domaine transmembranaire, une petite partie C-terminale intracellulaire et un vaste domaine extracellulaire N-terminal. Elles ne sont pas directement impliquées dans la conductance ionique, mais jouent un rôle important dans la régulation de la cinétique d'activation du canal, dans l'expression des VGSC à la surface des membranes cellulaires et dans l'interaction intercellulaire.

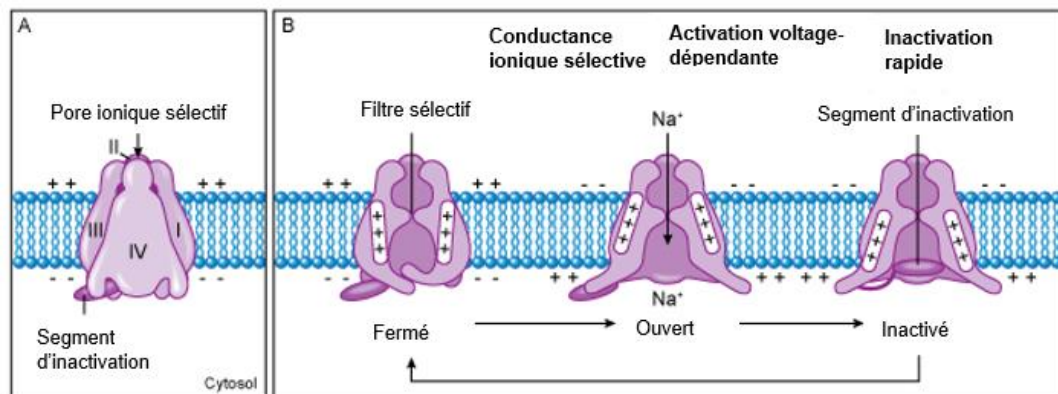
- *Fonctionnement*

Les VGSC existent sous trois conformations distinctes selon le potentiel de membrane de la cellule, représentées sur la figure 7 :

- fermée : lorsque la membrane est au potentiel de repos, le canal est fermé, ne permettant aucun flux ionique ;
- ouverte : lorsque le potentiel de membrane dépasse une valeur seuil (environ -55 mV), cela provoque l'ouverture du canal. Le flux entrant d'ions Na^+ est alors responsable de la première phase de dépolarisation membranaire du potentiel d'action ;
- inactivée : après une courte période d'ouverture, un segment d'inactivation vient obstruer le canal ionique au niveau intracellulaire. Aucun flux ionique ne peut avoir lieu.

Le passage de la forme inactivée à la forme fermée nécessite un retour du potentiel de membrane à une valeur inférieure à -55 mV. Lorsque le canal est inactivé, aucun nouveau potentiel d'action ne peut naître ; il s'agit de la période réfractaire. Cette inactivation empêche qu'un nouveau potentiel d'action ait lieu avant la fin du précédent.

Figure 7 : Trois conformations des VGSC selon le potentiel de membrane



Sous-unité alpha des VGSC, formée de 4 domaines transmembranaires constituant un pore ionique sélectif pour le sodium. À l'état fermé, le côté intracellulaire de la membrane est chargé négativement. Les résidus chargés positivement au sein de l'hélice alpha S4 sont indiqués par les signes + (Beutler et al., 2018).

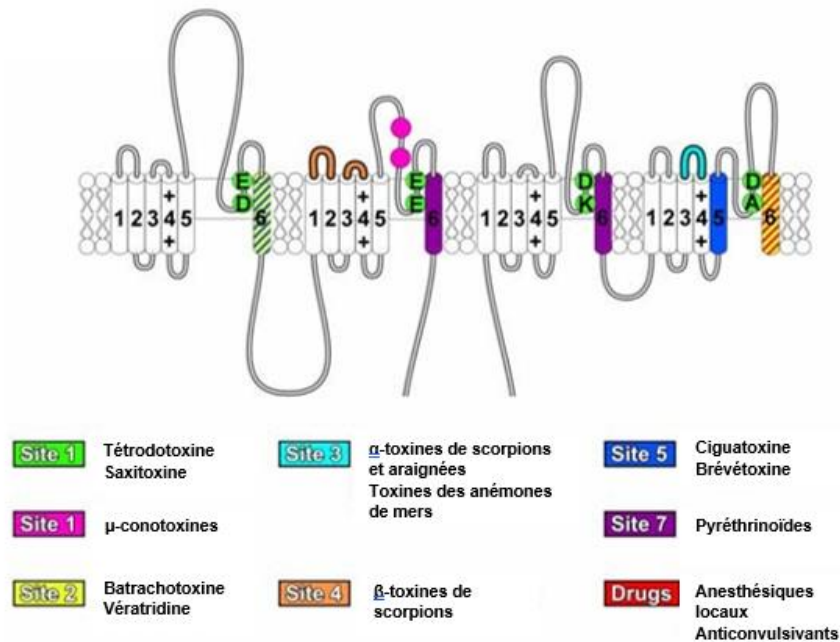
b. Action des brévétoxines sur les VGSC

La liaison des toxines PbTx aux canaux a plusieurs conséquences (Zhang *et al.*, 2013) :

- une modification du seuil d'activation des VGSC vers un potentiel de membrane plus bas, de telle sorte qu'en présence de la toxine, des canaux s'ouvrent alors qu'ils seraient fermés en conditions physiologiques ;
- une inhibition de l'inactivation des canaux, qui restent donc dans un état activé ;
- une augmentation du temps moyen d'ouverture ;
- de multiples états de sous-conductance, caractérisés par des flux transmembranaires de sodium anormaux.

Les PbTx se lient aux VGSC dans les cellules excitables sur un site spécifique nommé *neurotoxin receptor site 5*, situé sur la sous-unité alpha des récepteurs comme indiqué sur la figure 8 (Poli *et al.*, 1986), avec une orientation « inversée » : le cycle A est orienté vers l'ouverture intracellulaire et le cycle J ou K vers la surface extracellulaire du canal. La capacité de liaison maximale a lieu lorsque les PbTx-3 et les VGSC sont en proportions stœchiométriques (ratio 1 : 1).

Figure 8 : Sites de fixation de différentes toxines sur les VGSC (Zhang *et al.*, 2013)



Drugs : médicaments

Les brévétoxines de types A et B présentent des différences dans l'enchaînement interne des cycles, mais partagent une lactone sur le cycle A et une structure identique sur le dernier cycle. Ainsi il a été supposé que ces éléments communs jouent un rôle important dans l'interaction avec les récepteurs.

Différentes études (Bottein Dechraoui *et al.*, 2007 ; Ramsdell, 2008) suggèrent qu'un cycle A intact et une longueur de chaîne la plus longue possible sont nécessaires à l'activité biologique de ces toxines. De plus, la conformation du cycle carboné avec le groupe carbonyle sur le cycle A d'une part, la taille et la polarité du cycle K d'autre part sont également déterminants pour la liaison au récepteur et l'occurrence des effets biologiques de la toxine.

D. Toxicité

a. Toxicité expérimentale

- Toxicité *in vivo* après administration unique

Différentes études ont permis de déterminer la dose létale 50 (LD₅₀) des brevétoxines isolées de *K. brevis* chez des souris, indiquées dans le tableau 1.

Tableau 1 : LD₅₀ de deux types de PbTx chez la souris grise (*Mus musculus*), selon la voie d'administration

	PbTx-2 (Baden et Mende, 1982)	PbTx-3 (Kirkpatrick <i>et al.</i> , 2004)
LD ₅₀ suite à une administration intrapéritonéale (µg/kg)	200	170
LD ₅₀ suite à une administration intraveineuse (µg/kg)	200	94
LD ₅₀ suite à une administration orale (µg/kg)	6600	520

Les souris exposées par voie intrapéritonéale présentaient après 30 minutes un syndrome cholinergique avec hypersalivation, larmolement, miction excessive et défécation. Cinq heures après ingestion, PbTx-3 causait des tremblements puis des spasmes musculaires sévères, une rigidité caudale, une détresse respiratoire et finalement la mort. Les effets étaient immédiats après administration intraveineuse (Van Apeldorn *et al.*, 2001). Dans cette même étude, des chats (*Felis silvestris catus*) anesthésiés ont été exposés à PbTx-3 par voie intraveineuse, et ont alors présenté bradycardie, hypotension et bradypnée, résolues par administration d'atropine.

La toxicité aiguë des métabolites dérivés des brevétoxines, isolés à partir de crustacés, a aussi été explorée lors d'injection intrapéritonéale chez des souris (Plakas et Dickey, 2010). Les doses létales minimales (LD_{Lo}) des conjugués taurine/BTX-B1 et cystéine/BTX-B2 étaient respectivement de 50 µg/kg et 306 µg/kg. L'administration de BTX-B1 provoquait paralysie postérieure, dyspnée, ptialisme, larmolement, miction et défécation, aboutissant *in fine* à la mort par paralysie respiratoire. BTX-B2 causait paralysie postérieure, diarrhée, dyspnée et convulsions.

- Toxicité *in vivo* après administration répétée

Peu d'études ont exploré la toxicité des brevétoxines suite à une exposition répétée. Deux publications ont porté sur les effets de PbTx-3 chez des rats, lors d'administration par voie respiratoire.

Des rats ont été exposés à PbTx-3 par inhalation pendant 30 min ou deux heures par jour, pendant cinq jours consécutifs (Benson *et al.*, 2004). Les doses inhalées calculées étaient respectivement de 8,3 et 33 µg/kg/jour. Au bout des cinq jours, seuls les rats exposés à la plus forte dose ont présenté une perte de poids. Les tissus examinés n'ont pas révélé de lésions macroscopique ou microscopique ni de signes de cytotoxicité. Des lavages broncho-alvéolaires n'ont pas révélé d'inflammation des voies respiratoires, mais les macrophages alvéolaires montraient des signes d'activation. L'immunité à médiation humorale était diminuée, avec une

réduction de plus de 70 % des cellules spléniques précurseurs des lignées myéloïdes. Ces résultats suggèrent qu'une exposition respiratoire aux brevéttoxines pourrait induire un dysfonctionnement du système immunitaire.

Une autre expérience a prolongé la durée d'exposition à 22 jours, avec des doses de toxines de 0,9 ou 5,8 µg/kg/jour (Benson *et al.*, 2005). Des résultats similaires ont été obtenus : aucun signe clinique de toxicité observé, pas de lésions histopathologiques au niveau du nez, du cerveau, du foie et de la moelle osseuse, mais une perte de poids dans les deux groupes et une réduction de l'immunité à médiation humorale, ainsi qu'une augmentation des réticulocytes sanguins.

Récemment, les effets de l'inhalation répétée d'aérosols de brevéttoxines chez le mouton (*Ovis aries*) ont été évalués afin de déterminer les mécanismes conduisant à un dysfonctionnement pulmonaire (Zaias *et al.*, 2011). Deux groupes de moutons, allergiques ou non, ont été exposés à 20 respirations d'aérosols contenant des concentrations croissantes de PbTx-3 (30-300 pg/ml) pendant quatre jours consécutifs. Les deux groupes ont développé une hypersensibilité des voies respiratoires après un jour d'exposition, avec une sévérité dépendant de la concentration et particulièrement marquée dans le groupe de moutons allergiques. Les sujets ont développé une réponse inflammatoire après exposition à la dose la plus élevée, avec une neutrophilie pulmonaire persistant pendant sept jours après exposition.

b. Toxicité chez la faune sauvage marine

Durant les épisodes de prolifération intense de *K. brevis*, les brevéttoxines représentent un risque pour un grand nombre d'espèces. Ce sont de puissantes ichtyotoxines : les poissons sont tués suite à l'absorption des toxines par les branchies, l'ingestion de *K. brevis* ou de toxines présentes dans l'eau, ou encore l'ingestion d'autres espèces qui agissent alors comme contamineurs au sein de la chaîne alimentaire (Landsberg *et al.*, 2009).

Les poissons affectés présentent de nombreux symptômes : régurgitations, diarrhée, nage en spirale, paralysie des nageoires pectorales, perte d'équilibre, vasodilatation, convulsions et mort par détresse respiratoire aiguë. Les poissons exposés de façon chronique montrent peu de signes cliniques, hormis une légère hémolyse mise en évidence par une anémie, une cyanose, une hyperviscosité sanguine, une splénomégalie, une hémosidérose hépatique et une déshydratation (Landsberg, 2002).

Chez les mammifères marins, l'exposition a lieu très probablement par ingestion. Cependant dans certains cas l'inhalation d'aérosols de toxines a été rapportée. Les lamantins (*Trichechus manatus latirostris*) ainsi exposés présentent une congestion sévère du nasopharynx, des poumons, du foie, des reins et du cerveau, ainsi que des signes de rhinite, d'hémorragie et d'œdème pulmonaire. Une hémosidérose multiorganique et une leptoméningite non suppurative ont aussi été rapportées (Bossart *et al.*, 1998).

c. Effets mutagènes et génotoxiques

Murrell et Gibson (2009) ont mis en évidence que les brevéttoxines PbTx-2, -3 et -6 induisent des dommages à l'ADN de cellules humaines en culture (lignée lymphocyte T Jurkat E6-1), par des cassures simple et double brins de la molécule. Dans des monocytes humains, PbTx-2 provoquait une déplétion en glutathion, suggérant un stress oxydatif. PbTx-2 étant largement métabolisé dans l'organisme, la génotoxicité pourrait provenir de la formation d'intermédiaires nucléophiles par le cytochrome P450, qui seraient capables de former des liaisons covalentes avec l'ADN.

4. Revue des cas rapportés dans la littérature de mortalité animale due à *Karenia brevis*

Depuis leur première description dans le golfe du Mexique en 1648 (Magaña *et al.*, 2003), les « marées rouges » liées à *K. brevis* ont été incriminées dans la mortalité de centaines d'animaux de niveaux trophiques divers, tels des oiseaux, poissons, tortues et mammifères marins (Gunter *et al.*, 1948 ; Forrester *et al.*, 1977 ; Kreuder *et al.*, 2002 ; Landsberg, 2002). Malgré la corrélation spatio-temporelle entre les efflorescences algales et la mortalité animale observée, il est difficile de prouver que les brévéttoxines peuvent effectivement tuer cette diversité d'organismes aquatiques et d'espèces terrestres.

Les brévéttoxines ont été proposées comme agent causal primaire de la mort de plus de 740 grands dauphins (*Tursiops truncatus*) entre juin 1987 et février 1988 au sud-est des États-Unis d'Amérique (Geraci, 1989). Cet événement a coïncidé partiellement avec une efflorescence de *K. brevis* qui se déplaça de Floride en Caroline du Nord en 1987, correspondant à un phénomène exceptionnel. Le rôle des brévéttoxines est cependant resté équivoque, car les méthodes analytiques utilisées à l'époque ne permettaient pas de confirmer leur présence. D'autres étiologies, en particulier d'origine virale, ont été considérées comme facteurs primaires de cette mortalité (Van Dolah *et al.*, 2002).

Il convient encore de déterminer par des expériences contrôlées le niveau de toxine létal pour chaque espèce. La capacité à déterminer la concentration en toxine dans les tissus, fluides et contenus digestifs des carcasses trouvées lors de mortalité associée aux marées rouges a considérablement progressé. Ces concentrations, supposées létales, peuvent être comparées aux concentrations tissulaires chez des animaux « témoins », morts d'autres étiologies.

Au cours des dernières années, plusieurs événements de mortalité chez des vertébrés ont fourni davantage de données épidémiologiques de terrain. Des efforts ont été faits pour obtenir des tissus frais, définir précisément la localisation géographique des carcasses, comparer la distribution spatiale et temporelle de *K. brevis* avec les niveaux de brévéttoxines dans l'eau et les tissus, et identifier les vecteurs de toxines au sein des chaînes trophiques.

En Floride, des mortalités massives probablement causées par la prolifération de *K. brevis* sont survenues chez les lamantins en 1996, 2002, 2003 et 2005 ; et chez les grands dauphins en 1999-2000, 2004 et 2005-2006 (Landsberg *et al.*, 2009). Dans certains cas, la mort des mammifères avait lieu en même temps qu'une efflorescence algale, mais parfois l'exposition aux toxines était retardée.

A. Cheminement des toxines au sein de la chaîne trophique

La transmission des brevétotoxines depuis les cellules de *K. brevis* jusqu'aux animaux et humains affectés est aujourd'hui assez bien comprise grâce aux nombreuses études réalisées. *K. brevis* produit principalement PbTx-1 et PbTx-2, qui subissent ensuite diverses modifications au sein des écosystèmes : ces toxines sont notamment métabolisées grâce au cytochrome P450 chez de nombreux organismes aquatiques (Fleming *et al.*, 2011).

a. Libération de toxines dissoutes « libres »

En présence de fortes turbulences dans l'eau, en surface et le long du littoral, les cellules de *Karenia* peuvent être lysées et ainsi libérer les brevétotoxines dans l'eau ; ces dernières sont particulièrement toxiques pour les poissons du milieu. Des études menées en laboratoire ont démontré que les poissons exposés à des cellules intactes de *K. brevis* étaient bien moins affectés que ceux exposés à des cellules endommagées (Ramsdell, 2008). Le pouvoir allélopathique de *K. brevis* ne s'exerce donc que faiblement sur les poissons, et la concentration en toxines libres dans l'eau détermine alors l'intensité de l'impact des efflorescences à *K. brevis* sur la faune maritime.

Par ailleurs, Myers *et al.* (2008) ont démontré que la présence d'espèces compétitrices de phytoplanctons est susceptible de moduler les conséquences écosystémiques d'une efflorescence. En effet, plusieurs espèces de diatomées et cryptophytes (classe d'organismes unicellulaires photosynthétiques aquatiques comprenant 200 espèces) sont capables de métaboliser les brevétotoxines dissoutes dans leur environnement, conduisant à une décroissance de leur concentration au cours du temps.

Une fraction des toxines se concentre fortement dans la microcouche de surface de l'océan, correspondant au premier millimètre de la colonne d'eau. Cette couche superficielle est le lieu d'échanges importants entre l'océan et l'atmosphère ; les toxines peuvent alors former des particules d'aérosols (Rumbold et Snedaker, 1999). Ces dernières sont transportées par le vent sur des distances importantes : on en retrouve jusqu'à 1,6 km à l'intérieur des terres (Kirkpatrick *et al.*, 2010). On comprend alors que des animaux, même non aquatiques, puissent développer des signes cliniques suite à l'inhalation des toxines. Les brevétotoxines subissent dans l'air une photodégradation et d'autres processus physicochimiques ; les aérosols contiennent donc divers métabolites dérivés de brevétotoxines (Hardman *et al.*, 2004).

b. Ingestion de *K. brevis* et transmission vectorielle des toxines

Les cellules intactes de *K. brevis* sont captées par divers animaux filtreurs, lesquels sont ensuite ingérés par des poissons, rendant possible une transmission « vectorielle » des brevétotoxines. Celle-ci a été mise en évidence par Tester *et al.* (2000) : des poissons juvéniles (*Eucinostomus argenteus* et *Fundulus majalis*) ont été nourris avec des copépodes (*Temora turbinata*) qui avaient préalablement ingéré *K. brevis*. Ces toxines étaient alors retrouvées dans les tissus musculaires des poissons entre 6 et 24 h après l'ingestion. Comme évoqué précédemment, certaines espèces de copépodes ne sont pas affectées par les brevétotoxines et peuvent donc les accumuler en grande quantité dans leur organisme, représentant alors une source majeure d'intoxication pour leurs prédateurs.

Plus en amont dans la chaîne alimentaire, de nombreux poissons accumulent également les toxines, principalement dans leur tissu adipeux et secondairement dans les muscles. Longtemps après une efflorescence algale, des concentrations allant jusqu'à 1500 ppb (partie par milliard) de

brévéttoxines ont été mesurées dans les muscles et 2700 ppb dans les organes internes de poissons (Naar *et al.*, 2007). Des animaux tels les dauphins, dont le régime contient une large proportion de poissons, peuvent par conséquent ingérer de grandes quantités de toxines, qui s'accumulent dans leurs tissus jusqu'à devenir létales (Flewelling *et al.*, 2005). De même, de faibles concentrations toxiques ont été mises en évidence chez des grands dauphins de la baie de Sarasota en l'absence d'efflorescence récente (Fire *et al.*, 2007).

c. Persistance de brevéttoxines dans l'écosystème

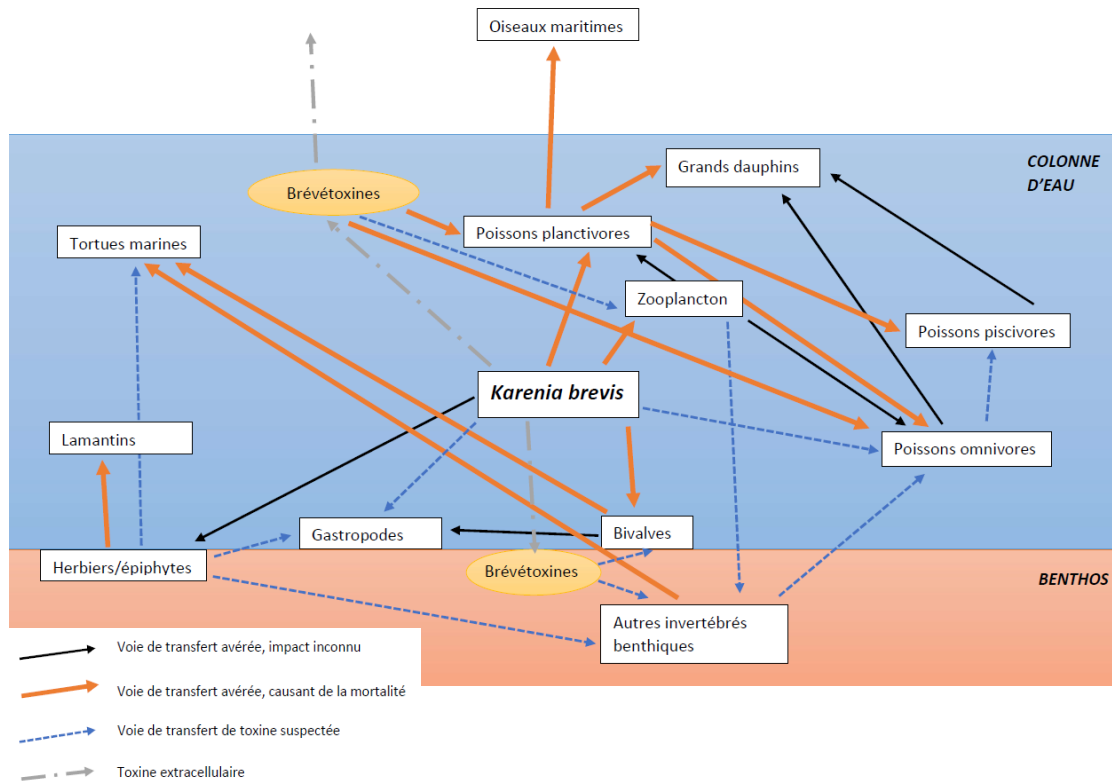
Une densité très importante de *K. brevis* tend à tuer rapidement la faune marine ; les toxines gagnent alors le réseau trophique détritique et peuvent être retrouvées dans les sédiments (Mendoza *et al.*, 2008). En concentration plus faible, en revanche, ces toxines n'ont pas un effet létalet immédiat. Par un phénomène d'accumulation tissulaire, elles se propagent au sein de la chaîne alimentaire jusqu'à atteindre chez les carnivores prédateurs des concentrations létales. En conséquence, les marées rouges sévères tuent plutôt les animaux en bas de la chaîne trophique, puis indirectement par le biais de la bioaccumulation affectent le haut de cette chaîne. Il en résulte un possible décalage spatial et temporel entre l'efflorescence observée et la mortalité animale occasionnée (Flewelling *et al.*, 2005).

Les mollusques benthiques tels les moules (*Mercenaria sp.*), huitres (*Crassostrea gigas*) et palourdes stockent aussi de fortes concentrations de brevéttoxines dans leurs tissus adipeux suite à l'ingestion de *K. brevis*. Le métabolisme et l'élimination complète des toxines s'étalent en général sur deux à huit semaines chez les mollusques (Landsberg *et al.*, 2009). Les mollusques se nourrissant par filtration sont capables de capter énormément de cellules phytoplanctoniques ; on comprend alors que l'accumulation de toxines en grande quantité n'exige pas nécessairement une densité élevée de *K. brevis*. Ces mollusques sont donc considérés comme potentiellement toxiques en présence de 5000 cellules/L.

Les lamantins, herbivores se nourrissant d'herbiers et macroalgues, sont aussi affectés par *K. brevis*, mais une période de latence peut apparaître entre les marées rouges et la mortalité des siréniens. Flewelling *et al.* (2005) rapportent ainsi le cas de 34 lamantins morts en Floride au printemps 2002, alors même que la concentration cellulaire en *K. brevis* dans l'eau était faible à cette période. Le contenu stomacal des animaux a été analysé : il contenait presque exclusivement des herbes marines (*Thalassia testudinum*), et des brevéttoxines ont été mises en évidence en grande quantité dans le fluide gastrique. Or, des échantillons d'herbiers de cette espèce prélevés dans des zones affectées par *K. brevis* contenaient également de fortes concentrations en brevéttoxines, en particulier dans leur fraction épiphytique. Les herbiers constituent donc un réservoir de toxines dans l'écosystème marin, susceptible de provoquer une intoxication aux brevéttoxines chez des vertébrés décalée dans le temps par rapport à la survenue des marées rouges. L'ensemble des modes de transfert de *K. brevis* et des brevéttoxines est illustré par la figure 9.

Figure 9 : schéma des voies de transfert et de l'impact des brevétoxines dans l'environnement marin (Landsberg *et al.*, 2009)

AIR



B. Impact sur l'écosystème benthique

Malgré la récurrence des « marées rouges » chaque année, les efflorescences algales prolongées, persistant pendant des mois, et leur impact sur l'écosystème sont moins documentés. La première description d'une mortalité de masse impliquant à la fois poissons et invertébrés de la communauté benthique a eu lieu en 1971, après qu'une efflorescence a persisté au sud-est de la Floride d'avril à août (Simon et Dauer, 1972 ; Steidinger et Ingle, 1972 ; Steidinger *et al.*, 1973). La faune des récifs côtiers entre Charlotte Harbour et Tampa Bay était touchée sur plus de 1500 km². Au niveau des récifs côtiers, situés entre 12 et 18 m de profondeur, de 45 à 58 espèces de poissons endémiques présentaient une densité de population fortement réduite. La persistance de l'efflorescence a causé, directement ou indirectement, la disparition presque complète du biote récifal : poissons, coraux, mollusques, crustacés décapodes, tuniciers, échinodermes et algues benthiques.

Si cette mortalité a été attribuée en partie à la toxicité directe de *K. brevis*, la prolifération intense du dinoflagellé a aussi eu des conséquences indirectes sur l'écosystème telles que l'hypoxie, l'excès de sulfure d'hydrogène et une diminution de la transparence de l'eau inhibant la photosynthèse des coraux et algues benthiques. De nombreuses espèces de poissons de toutes tailles ont été touchées ; leur décomposition a ensuite contribué à l'épuisement du dioxygène dissous.

Un épisode similaire a été décrit en 2005 dans la baie de Tampa (Landsberg *et al.*, 2009) : une « marée rouge » a persisté neuf mois, s'étendant sur plus de 5600 km² et causant la mort de nombreux poissons, crustacés, coraux, échinodermes et tortues marines (*Caretta caretta*, *Chelonia mydas*, *Lepidoche kempji*). Les mêmes mécanismes ont été évoqués, ainsi qu'une augmentation de la température de l'eau, allant jusqu'à 33°C.

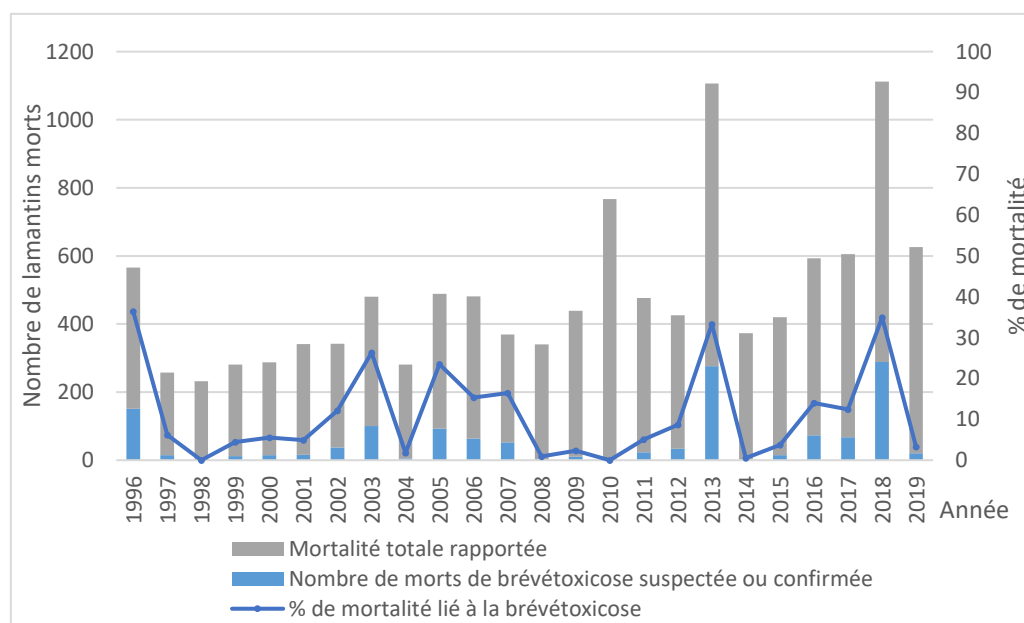
On constate ainsi que les efflorescences de *K. brevis* ont un impact immédiat sur la faune marine par la libération de brevéttoxines, mais également des conséquences plus différées et indirectes par les modifications des conditions d'oxygénation, de luminosité et de température du milieu.

C. Chez les mammifères marins

a. Brevétoxicose chez les lamantins (*Trichechus manatus*)

Les lamantins comptent parmi les mammifères marins les plus menacés et figurent sur la liste rouge au statut « vulnérable » de l'Union internationale pour la conservation de la nature (IUCN). Le taux de renouvellement des populations est limité, avec la production d'un jeune tous les 2 à 2,5 ans. Tout événement causant une mortalité massive de lamantins adultes notamment a donc un impact majeur sur la population totale. La Florida Fish and Wildlife Conservation Commission (FWCC) édite un rapport annuel de la mortalité des lamantins en Floride, notamment liée à *K. brevis* ; les résultats sont présentés dans la figure 10. Comme évoqué précédemment, les lamantins cumulent deux voies d'exposition aux brevéttoxines les rendant particulièrement vulnérables : digestive et respiratoire. L'importance relative de ces deux voies est toutefois difficile à déterminer.

Figure 10 : évolution de la mortalité liée à *K. brevis* de 1996 à 2019 chez *Trichechus manatus* en Floride



- *Description des lésions associées à la brévétotoxicose (Bossart et al., 1998)*

En 1996, 149 lamantins ont été trouvés morts le long de la côte occidentale floridienne, majoritairement autour de l'estuaire du fleuve Caloosahatchee, alors même qu'une efflorescence de *K. brevis* sévissait dans la région. Soixante-quatorze animaux ont été autopsiés afin de caractériser les lésions macro et microscopiques présentes, ainsi que pour confirmer l'étiologie de cette mortalité. La présence de brévétotoxines a été démontrée par immunohistochimie dans les macrophages et lymphocytes de multiples tissus chez tous les animaux, en particulier dans les méninges, la rate ainsi qu'au niveau du tractus respiratoire.

Macroscopiquement, les lamantins présentaient des lésions de congestion sévère affectant de nombreux organes : tissus naso-pharyngés, poumons, foie, reins, méninges et plexus choroïdes. La totalité des animaux autopsiés avait une inflammation catarrhale active du tractus respiratoire, avec une infiltration lymphocytaire et plasmocytaire de la sous-muqueuse. Quarante-huit pour cent des lamantins souffraient d'une hémossidérose multiorganique, suggérant un processus hémolytique. Une leptoméningite multifocale non suppurée, affectant souvent le cervelet et pouvant expliquer les signes neurologiques décrits lors de brévétotoxicose, était observée chez 48 % d'entre eux.

Les lésions sévères des voies aériennes supérieures, en l'absence d'autre agent causal infectieux ou toxique isolé, indiquent qu'une voie possible d'exposition aux brévétotoxines est respiratoire, par inhalation des particules d'aérosols.

Malgré tous ces éléments, il convient de nuancer l'imputabilité de cette mortalité à une marée rouge. En effet, en raison de la récurrence de ce phénomène, les lamantins sont exposés aux brévétotoxines tout au long de leur vie, et la concentration tissulaire résultant de cette exposition chronique, ainsi que la dose toxique chez cette espèce, ne sont pas connus.

- *Effets d'une exposition sublétales sur le système immunitaire*

Les animaux exposés à des doses sublétales de brévétotoxines peuvent survivre s'ils sont soustraits à cette exposition et traités. Les brévétotoxines ayant été isolées dans les cellules immunitaires chez différentes espèces, Walsh *et al.* (2015) se sont intéressés à l'impact d'une exposition chronique sur le système immunitaire des lamantins.

Des échantillons ont été prélevés sur 12 lamantins traités pour brévétotoxicose au Lowry Park Zoo, sur dix autres siréniens au moment de leur relâcher après leur traitement dans le même centre et sur 11 individus non exposés évalués cliniquement à Crystal River, en Floride. Dans cette étude, tous les lamantins exprimant des signes cliniques de brévétotoxicose avaient des niveaux détectables de toxines dans le plasma, sans corrélation établie entre la concentration en toxine et la sévérité des signes cliniques.

Les lamantins atteints de brévétotoxicose présentaient une prolifération lymphocytaire significativement réduite par rapport aux individus supposés sains, corrélée positivement à la concentration plasmatique en toxine. L'activité lysosomale ne montrait en revanche pas de différence significative entre les deux groupes.

Les lamantins exposés manifestaient également une augmentation du stress oxydatif, quantifié par la mesure de l'activité plasmatique de la superoxyde dismutase et de la production d'espèces réactives du dioxygène et de l'azote. La biotransformation des brévétotoxines implique des conjugués avec le glutathion ; des dérivés réactifs du dioxygène pourraient se former durant ce

processus. Le stress oxydatif peut cependant se développer dans d'autres circonstances (stress thermique, pollution, hypoxie...) et n'est donc pas spécifique d'une brévétotoxicose.

Cette étude a donc mis en évidence une altération de la réponse immunitaire à médiation cellulaire chez les lamantins exposés aux brévétotoxines, par une diminution de la prolifération des lymphocytes T. Or, leur réponse immunitaire repose majoritairement sur ces cellules. Les brévétotoxines pourraient donc prédisposer les lamantins à d'autres affections par l'immunosuppression induite. Le stress oxydatif également mis en évidence peut provoquer de nombreux dommages à l'organisme : production de radicaux libres, inflammation, altération de l'ADN.

b. Brévétotoxicose chez les dauphins

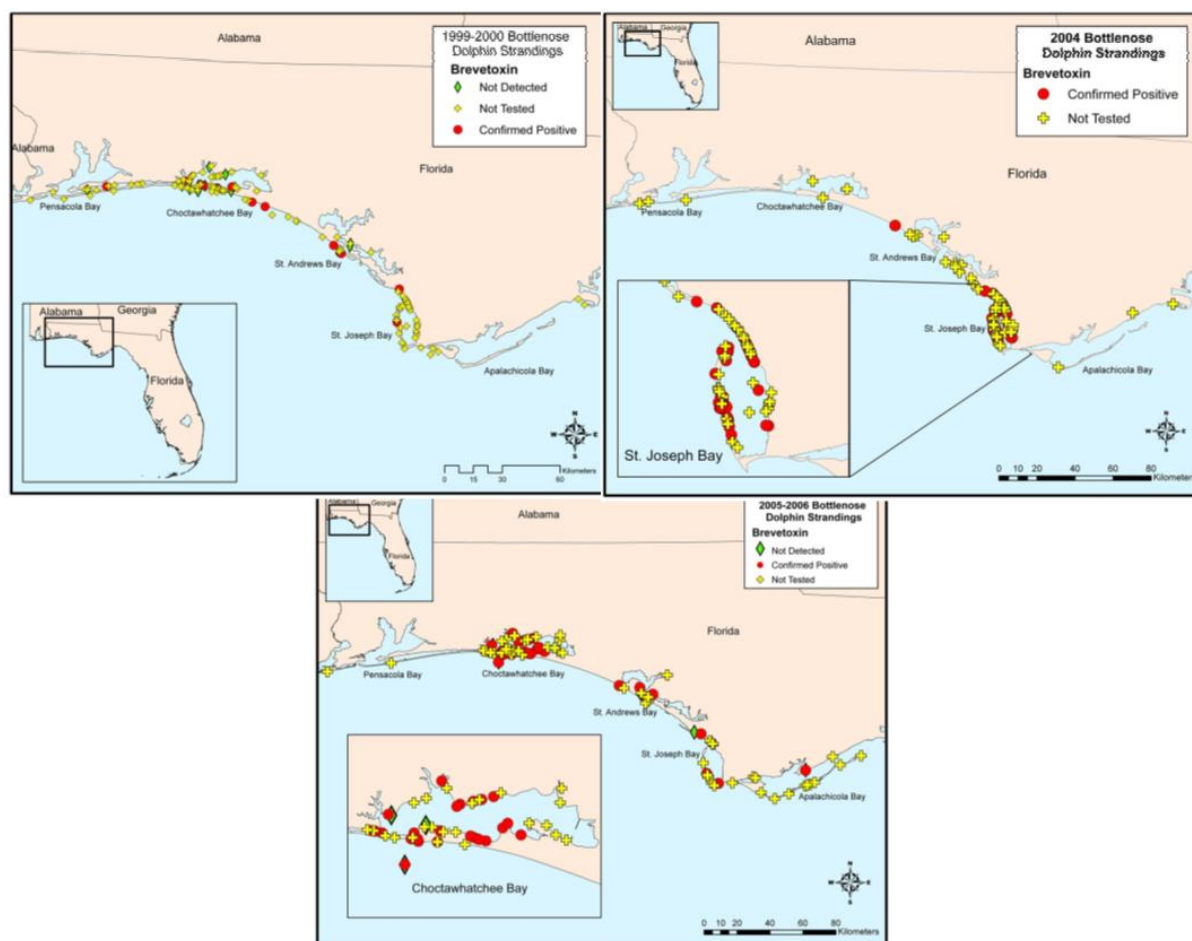
Les grands dauphins constituent, de par leur rôle de prédateurs opportunistes, une espèce « sentinelle » au sein des écosystèmes marins. Ils se nourrissent en effet de diverses espèces de poissons (notamment *Lagodon rhomboides*, *Orthopristis chrysoptera*, *Mugil cephalus*, *Leiostomus xanthurus*), de crustacés et d'herbiers marins, et sont relativement sédentaires tout au long de l'année au sein d'un réseau de baies côtières. Ainsi, l'évolution de leur état de santé constitue un bon indicateur de celui des autres espèces de l'écosystème, situées plus en aval de la chaîne trophique.

En 2007, 12 dauphins se sont échoués en quatre jours sur les plages situées entre Palm Bay et New Smyrna (soit une étendue d'environ 120 km), sur la côte est de la Floride, alors que sévissait dans cette région une marée rouge due à *K. brevis* (Fire *et al.*, 2015). La concentration en *K. brevis* dépassait 10^6 cellules/L d'eau de mer. Des prélèvements tissulaires ont été effectués sur les dauphins (contenu gastrique, foie, poumons, sang, muscles, rate, reins) et ont révélé que 92 % d'entre eux contenaient des brévétotoxines. La concentration maximale se trouvait dans le contenu digestif (626 ng/g), suggérant là encore une contamination par voie digestive. La co-occurrence de l'efflorescence algale et de la mortalité des dauphins, ainsi que la présence de toxine dans leurs tissus, confirmait avec quasi-certitude le lien de causalité entre ces deux phénomènes.

Trois événements similaires se sont produits au nord de la Floride en 1999, 2004, et en 2005-2006 (Twiner *et al.*, 2012), comme indiqué sur la figure 11. En 1999, 152 dauphins ont été trouvés morts suite à une efflorescence algale importante, où la concentration en *K. brevis* a atteint $1,6 \cdot 10^7$ cellules/L. La brévétotoxine PbTx-3 a été détectée chez 52 % des dauphins testés, avec une concentration atteignant 500 ng/g dans le contenu digestif. De même, 100 % et 93 % des dauphins testés étaient positifs lors des épisodes de 2004 et 2005, respectivement. Par ailleurs, des poissons presque intacts étaient présents dans l'estomac de 19 dauphins, et ont donc pu être prélevés pour rechercher la présence de brévétotoxines. Tous contenaient PbTx-3 en grande concentration, en particulier le menhaden de l'Atlantique (*Brevoortia tyrannus*), dont la teneur en toxine dans les viscères dépassait 23.000 ng/g.

L'ensemble de ces données confirme que les dauphins sont également affectés par la prolifération de *K. brevis*, principalement par voie digestive, par l'ingestion de poissons contenant de grandes concentrations de brévétotoxines.

Figure 11 : répartition géographique des dauphins échoués lors des marées rouges de 1999, 2004 et 2005-2006



Sites d'échouages (strandings) des grands dauphins (Bottlenose dolphins) : confirmés positifs pour la présence de brevétocines (brevetoxins) tissulaires (confirmed positive), négatifs (not detected) ou non testés (not tested).

D. Chez les oiseaux maritimes

Peu de données ont été publiées sur les effets des brevétocines sur les oiseaux maritimes. Cependant, de nombreuses espèces se nourrissent de petites proies invertébrées sur les plages de Floride, tels les bécasseaux sanderling (*Calidris alba*), les tournepierres à colliers (*Arenaria interpres*) ou encore les pluviers argentés (*Pluvialis squatarola*). Ces oiseaux sont opportunistes et sont susceptibles de consommer les poissons échoués suite à une efflorescence algale. Ainsi Van Deventer *et al.* (2012) ont étudié leur comportement alimentaire au cours d'une marée rouge en 2005 ; ils ont pu observer 19 espèces d'oiseaux se nourrir de poissons échoués, dont des analyses ont mis en évidence la présence de brevétocines dans tous les tissus prélevés (yeux, branchies, muscles). Par ailleurs, des carcasses d'oiseaux collectées à la même période dans des centres de réhabilitation ont également révélé la présence de brevétocines, à des concentrations variables, dans leur tube digestif. Bien que les doses létales ne soient pas connues pour les oiseaux sauvages, les concentrations tissulaires retrouvées chez les poissons prélevés ici étaient probablement létales pour un oiseau de petite taille (<100 g).

a. Présentation clinique, métabolisme et clairance des brevéttoxines

Une étude menée par Fauquier *et al.* (2013) s'est intéressée au métabolisme et à la clairance des brevéttoxines chez les oiseaux maritimes. Entre février 2005 et novembre 2006, 95 oiseaux recueillis dans un centre de réhabilitation du comté de Sarasota (Floride) ont été testés, par des prélèvements fécaux et sanguins, alors que la concentration en *K. brevis* dans la baie dépassait 10^5 cellules/L. Il s'agissait principalement de cormorans à aigrettes (*Phalacrocorax auritus*) et de pélicans bruns (*Pelecanus occidentalis*). Les signes cliniques rapportés incluaient une perte de réflexe palpébral et de tonus du sphincter cloacal, une désorientation, une ataxie voire une incapacité à tenir debout. Les cormorans semblaient présenter une atteinte plus sévère, confirmant les résultats obtenus par Kreuder *et al.*(2002).

Sur 36 échantillons fécaux, 86 % contenaient des brevéttoxines, avec une concentration moyenne de 207 ng de PbTx-3/g. La concentration en toxine a diminué de 50 % en 1 à 4 jours, et une élimination complète a été mise en évidence en 7 jours maximum. Concernant les dosages sanguins, 45 % des oiseaux testés étaient positifs ; la concentration moyenne en brevéttoxine était de 2,6 ng/mL. Une clairance complète a été constatée en l'espace de 10 jours.

Enfin, la concentration en brevéttoxine a également été mesurée dans les tissus et fluides de 39 oiseaux morts ou euthanasiés (cerveau, rein, foie, poumon, contenu gastrique, bile). Un résultat positif a été obtenu dans au moins un tissu chez 92 % des volatiles, et dans au moins 3 tissus chez 72 % d'entre eux. Les brevéttoxines étaient retrouvées le plus fréquemment dans la bile, le contenu gastrique et le foie. Cependant, aucune lésion histologique caractéristique n'a été mise en évidence.

b. Conclusion sur la brevéttoxicose chez les oiseaux maritimes

L'ensemble de ces publications démontre l'existence d'une contamination des oiseaux de rivage par les brevéttoxines lors d'efflorescence algale, essentiellement par voie digestive après l'ingestion d'invertébrés ou de poissons contaminés. Les signes cliniques rapportés sont essentiellement neurologiques et semblent affecter les différentes espèces avec une sévérité variable.

Si les brevéttoxines font l'objet d'une excrétion hépatique, une étude suggère l'existence d'un cycle entéro-hépatique, conduisant à la persistance de faibles niveaux de toxine dans les tissus pendant des durées prolongées (Woofter *et al.*, 2005). Des concentrations plus élevées ont été mesurées dans les fèces que dans le sang ; ainsi les prélèvements fécaux pourraient constituer un meilleur substrat à visée diagnostique pour les centres de réhabilitation grâce à une sensibilité plus élevée et une facilité de prélèvement accrue.

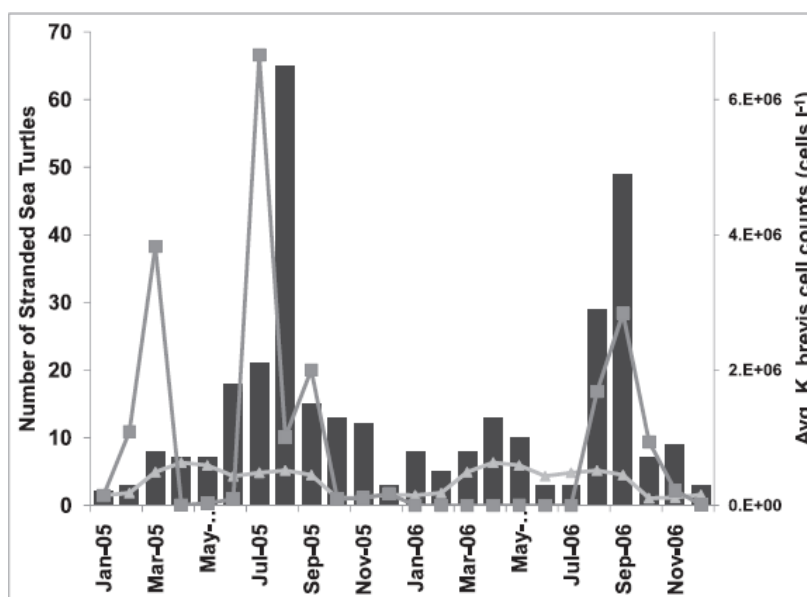
E. Chez les tortues

Plusieurs espèces de tortues marines fréquentent le golfe du Mexique, dont les principales sont les caouannes (*Caretta caretta*), les tortues de Kemp (*Lepidochelys kempii*) et les tortues vertes (*Chelonia mydas*), toutes trois considérées comme des espèces menacées selon la loi américaine sur les espèces en voie de disparition (US Endangered Species Act). Plus de 90 % des caouannes des États-Unis d'Amérique pondent ainsi sur les plages de Floride. Ces tortues marines sont exposées à de nombreux dangers dans leur environnement : destruction d'habitat par l'anthropisation des côtes, désorientation des nouveau-nés par l'éclairage artificiel, prédation, pollution marine, etc. À ces dangers s'ajoutent les marées rouges sévissant dans cette région, dont l'impact sur les populations de tortues a été démontré par plusieurs études.

a. Présentation clinique et corrélation temporelle avec les marées rouges

Lors de deux épisodes de marée rouge en 2005-2006, caractérisés par une densité algale supérieure à 10^5 cellules/L, 318 tortues marines se sont échouées dans la baie de Sarasota (Floride), alors que la moyenne sur 12 ans était de 43 échouages pour une même période (Fauquier *et al.*, 2013a). Ces résultats sont présentés sur la figure 12.

Figure 12 : Évolution mensuelle du nombre de tortues marines échouées lors d'une marée rouge entre janvier 2005 et novembre 2006 (Fauquier *et al.*, 2013)



Évolution du nombre de tortues marines échouées entre janvier 2005 et novembre 2006 (marqueurs carrés), en comparaison au nombre moyen (entre 1992 et 2004) de tortues marines échouées durant ces mêmes mois (marqueurs triangulaires). L'histogramme représente la moyenne mensuelle des comptages cellulaires de *K. brevis* (en cellules/L).

Soixante et une tortues échouées ont été admises en centre de réhabilitation ; elles présentaient toutes des signes neurologiques : hypovigilance, parésie, marche en cercle. Des brevéttoxines ont été isolées dans au moins un tissu chez 98 % des tortues mortes (n=255) et 93 % des tortues vivantes, avec une concentration plasmatique médiane de 31 ng de PbTx-3 eq/mL

(reflète la concentration globale en brevétotoxines ou dérivés dans l'échantillon). Une brevétotoxicose aiguë a donc été considérée comme la cause de la mort chez ces tortues débilisées présentées durant une période de marée rouge, sans autre anomalie clinique spécifique détectable que les troubles neurologiques cités précédemment.

Par ailleurs, l'étude de données colligées sur les tortues marines mortes ou échouées entre 1986 et 2013 sur la côte ouest-floridienne a mis en évidence que la survenue d'une marée rouge était associée à une augmentation significative du nombre de tortues échouées concomitamment, mais aussi un à deux mois après (Foley *et al.*, 2019). L'incidence des échouages et la concentration tissulaire en brevétotoxine étaient significativement plus élevées chez les caouannes et tortues de Kemp que chez les tortues vertes. Cela pourrait s'expliquer par une moindre exposition de ces dernières, dont l'alimentation est principalement constituée d'herbiers, tandis que les deux autres espèces se nourrissent d'invertébrés benthiques.

b. Effet des brevétotoxines sur le système immunitaire

À l'instar des lamantins, l'exposition des tortues marines aux brevétotoxines est associée à une modification du fonctionnement de leur système immunitaire. Cela se traduit, chez les tortues exposées aux marées rouges, par une augmentation de l'activité lysosomale plasmatique et une modification de l'expression de gènes impliqués dans le stress oxydatif, la signalisation cellulaire et le métabolisme des xénobiotiques (Perrault *et al.*, 2017). Ainsi, des PCR (réaction en chaîne par polymérase) quantitatives en temps réel ont démontré une multiplication par 2 de l'expression génétique de la superoxyde dismutase, et par 10 de la thiopurine S-méthyltransférase, dans des leucocytes de tortues exposés *in vitro* à 500 ng/mL de PbTx-2 pendant 18 h (Walsh *et al.*, 2010). Ce stress oxydatif est susceptible d'affecter de nombreuses fonctions cellulaires et a donc un impact important sur l'état de santé des tortues.

c. Transfert maternel des toxines

Le transfert maternel de molécules liposolubles est bien documenté chez les tortues marines. En effet, elles accumulent des réserves lipidiques importantes avant la saison de ponte, et se nourrissent ensuite très peu. Des toxines préalablement ingérées, et stockées dans divers tissus (graisse, foie) peuvent alors être libérées lors de la lipolyse, et transmises aux descendants.

Cela a été démontré dans le cas des brevétotoxines par une étude de Perrault *et al.* (2016), réalisée sur 34 tortues marines à Casey Key (Floride), un an après la dernière marée rouge survenue dans cette zone. Des prélèvements sanguins ont montré que 100 % des tortues présentaient une brevétotoxémie significative (moyenne : 9,1 ng de PbTx-3 eq/mL). Des œufs non éclos, des nouveau-nés morts et les sacs vitellins issus de ces femelles ont ensuite été prélevés, et ont révélé la présence de brevétotoxine dans 100 % des foies des nouveau-nés et des sacs vitellins, et 70 % des œufs.

Or, la vitellogenèse débute huit à dix mois avant la ponte. Ainsi, la densité algale en *K. brevis* et la concentration en brevétotoxine à cette période influencent probablement fortement la charge en toxine dans les follicules. Les variations de concentration en brevétotoxines dans les œufs seraient alors liées à l'exposition des mères sur leur zone d'alimentation lors de la vitellogenèse, et pendant leur migration vers les sites de nidification.

Au-delà de la mortalité directe induite par la brévétotoxicose aiguë chez les tortues marines, plusieurs études suggèrent ainsi des effets à long terme de l'exposition aux brévétotoxines, impactant le système immunitaire, la reproduction et la survie globale des individus comme de leur descendance.

F. Chez les poissons

a. Données quantitatives sur les communautés estuariennes

De nombreuses publications, déjà évoquées, ont démontré la présence de brévétotoxines dans divers tissus chez les poissons lors d'efflorescences algales en Floride. Ainsi, d'après la base de données de la FFWCC, 96 % de la mortalité rapportée chez les poissons est observée en période de marée rouge (densité de *K. brevis* supérieure à 10^5 cellules/L d'eau de mer).

Une étude observationnelle menée par Gannon *et al.* (2009) dans la baie de Sarasota (Floride) entre 2003 et 2007 a démontré que la mortalité liée aux efflorescences de *K. brevis* modifie significativement la structure des communautés ichthyennes (abondance et diversité d'espèces). Parmi toutes les variables environnementales considérées (salinité, température, quantité de dioxygène dissous), la densité en *K. brevis* était la seule associée significativement avec l'abondance et la diversité des poissons dans la zone étudiée, suggérant que cette mortalité était reliée directement à la densité algale plutôt que secondaire à un phénomène d'hypoxie. Gannon *et al.* (2009) rapportent une diminution de densité des populations globales de 37 % en période de marée rouge, avec une variation de 10 à 60 %, en zone d'herbiers marins et de mangrove, respectivement.

Une famille de poissons se distingue cependant dans cette étude : les clupéidés ne semblaient pas affectés par les marées rouges (pas de diminution de densité de population). Le mécanisme de cette « résistance » n'est pas élucidé, et pourrait être dû à une moindre sensibilité aux brévétotoxines, une métabolisation différente de ces molécules ou à une capacité à détecter et éviter les fortes densités d'algues. Compte tenu de la très forte mortalité observée chez les autres familles de poissons, les clupéidés sont donc susceptibles de constituer une proportion plus importante du régime des piscivores (oiseaux, dauphins) durant les épisodes de marée rouge, et d'agir comme vecteurs majeurs de brévétotoxines pour les niveaux trophiques supérieurs. Durant la marée rouge sévère de 2005, un changement de comportement alimentaire a ainsi été observé chez les dauphins, avec une consommation plus importante de clupéidés.

La prolifération de *K. brevis* est donc à l'origine d'une modification importante de l'écosystème marin, par une diminution de la densité et de la diversité des communautés ichthyennes qui impacte les niveaux trophiques supérieurs.

b. Mortalité inhabituelle et brévétotoxicose chez les élasmobranches

Des événements de mortalité inhabituelle et massive sont également décrits chez les raies et les requins exposés aux marées rouges. En octobre 2000, entre 100 et 300 requins bordés (*Carcharhinus limbatus*) se sont échoués dans la région de Panama City, au nord de la Floride, alors qu'une marée rouge y sévissait depuis août 2000. Des tissus collectés sur quatre requins avaient montré la présence de brévétotoxine, et aucune autre étiologie n'avait permis d'expliquer cette mortalité.

Une corrélation positive forte est rapportée entre la fréquence des efflorescences algales de *K. brevis* et la concentration tissulaire moyenne en brevététoxine mise en évidence chez les requins et les raies (Flewelling *et al.*, 2010). Dans cette étude portant sur 301 requins et 22 raies vivants, collectés entre 2000 et 2008 en Floride, les muscles, le foie, les branchies et le contenu gastro-intestinal ont fait l'objet d'une recherche de brevététoxine par technique ELISA. La toxine a été détectée dans 97 % des foies testés, avec des concentrations s'élevant jusqu'à 27.760 ng/g, et dans 87 % des branchies. La toxine peut donc s'accumuler jusqu'à des niveaux très élevés sans causer la mort des individus, en particulier dans le foie. Chez les requins, le foie est un organe majeur de stockage de lipides et constitue donc un site d'accumulation privilégié pour cette toxine lipophile. La bioaccumulation se produit probablement au cours du temps, suite à une exposition chronique. Les concentrations en toxine étaient significativement plus élevées chez les animaux collectés pendant une période de marée rouge, mais 19 % des muscles d'animaux collectés hors d'une marée rouge contenaient tout de même des brevététoxines en faible concentration.

La comparaison des concentrations chez les différentes espèces de requins suggère que l'accumulation pourrait varier selon l'espèce : elle était plus faible chez le requin-aiguille de l'Atlantique (*Rhizoprionodon terraenovae*) que chez les requins marteaux (*Sphyrna zygaena*) ou les requins bordés. Par ailleurs, les concentrations tissulaires mesurées chez les raies mortes de brevététoxine étaient bien plus élevées que chez les requins, potentiellement en lien avec leurs différences de biotopes et d'alimentation.

c. Effets des brevététoxines sur les paramètres neurochimiques

Si la neurotoxicité des brevététoxines par fixation sur les canaux sodiques est bien connue, elles pourraient aussi provoquer une série d'effets neurochimiques plus complexes. Une association entre la concentration en PbTx dans le cerveau et des modifications de marqueurs biochimiques neuronaux a ainsi été mise en évidence chez le requin-citron (*Negaprion brevirostris*) lors d'exposition naturelle à une efflorescence algale de *K. brevis* (Nam *et al.*, 2010). Les brevététoxines sont en effet capables de franchir la barrière hématoencéphalique et atteignent des concentrations significatives dans le système nerveux central, à l'origine d'altérations du fonctionnement neuronal.

Nam *et al.* (2010) rapportent ainsi une diminution de l'activité enzymatique de l'acétylcholine estérase et une augmentation de la densité de récepteurs muscariniques en lien avec la concentration tissulaire cérébrale en PbTx. Ces modifications pourraient avoir des conséquences délétères à long terme, comme une neurogenèse retardée et des modifications comportementales au sein des populations sauvages de requins.

Le système dopaminergique est également affecté, par une diminution de l'activité de la monoamine-oxydase, susceptible de provoquer une nette augmentation de la libération de catécholamines circulantes. Parallèlement, la densité des récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate) était réduite de 74,2 % chez les requins exposés aux brevététoxines, suggérant l'existence d'un mécanisme compensateur visant à limiter l'excitotoxicité induite par les PbTx.

L'ensemble de ces publications confirme ainsi que les poissons pélagiques et les élaémobranches sont affectés par les brevététoxines lors de marée rouge. La distribution tissulaire et les conséquences cliniques sont similaires à ce qui est rapporté chez d'autres espèces, comme les mammifères marins.

Deuxième partie : étude expérimentale

1. Introduction

Des « marées rouges », liées à la prolifération de l'algue dinoflagellé *Karenia brevis*, se produisent annuellement dans le golfe du Mexique, affectant particulièrement le sud-ouest de la Floride (Brand et Compton, 2007). *K. brevis* produit plusieurs neurotoxines, appelées brevétoxines, agissant sur les canaux sodiques voltage-dépendants (Landsberg, 2002 ; Naar *et al.*, 2007 ; Steidinger *et al.*, 2008). L'exposition de la faune sauvage à ces toxines par ingestion, inhalation ou par contact direct dans l'eau, cause des signes cliniques aigus (respiratoires, neurologiques et digestifs) ou chroniques (troubles de la reproduction, altération du système immunitaire) pouvant conduire à la mort des animaux. Ainsi, les efflorescences algales de *K. brevis* ont été incriminées dans plusieurs événements de mortalité massive chez des lamantins (Bossart *et al.*, 1998 ; Capper *et al.*, 2013 ; Walsh *et al.*, 2015), dauphins (Geraci, 1989 ; Fire *et al.*, 2007 ; Twiner *et al.*, 2012), tortues marines (Walsh *et al.*, 2010 ; Fauquier *et al.*, 2013a ; Foley *et al.*, 2019), poissons (Gannon *et al.*, 2009 ; Flewelling *et al.*, 2010 ; Nam *et al.*, 2010) et oiseaux maritimes (Shumway *et al.*, 2003 ; van Deventer *et al.*, 2012) tout le long de la côte occidentale de Floride.

L'effet des brevétoxines sur les oiseaux piscivores est assez peu connu, bien que quelques études aient mis en évidence une augmentation de l'incidence des troubles neurologiques chez les cormorans à aigrettes et pélicans bruns lors de marées rouges (Kreuder *et al.*, 2002 ; Fauquier *et al.*, 2013b). La présence de brevétoxines dans divers tissus a été démontrée chez des oiseaux morts durant une marée rouge ; cependant peu de données sont disponibles sur leur concentration sanguine chez des oiseaux vivants et sur la présentation clinique associée. Par ailleurs, l'ingestion de poissons contaminés, agissant comme vecteurs de brevétoxines, est envisagée comme voie d'exposition principale (Tester *et al.*, 2000). Ce phénomène de bioaccumulation suggère que l'apparition de signes cliniques compatibles avec une brevétoxicose pourrait survenir chez les oiseaux piscivores après une marée rouge, et non pas simultanément à celle-ci.

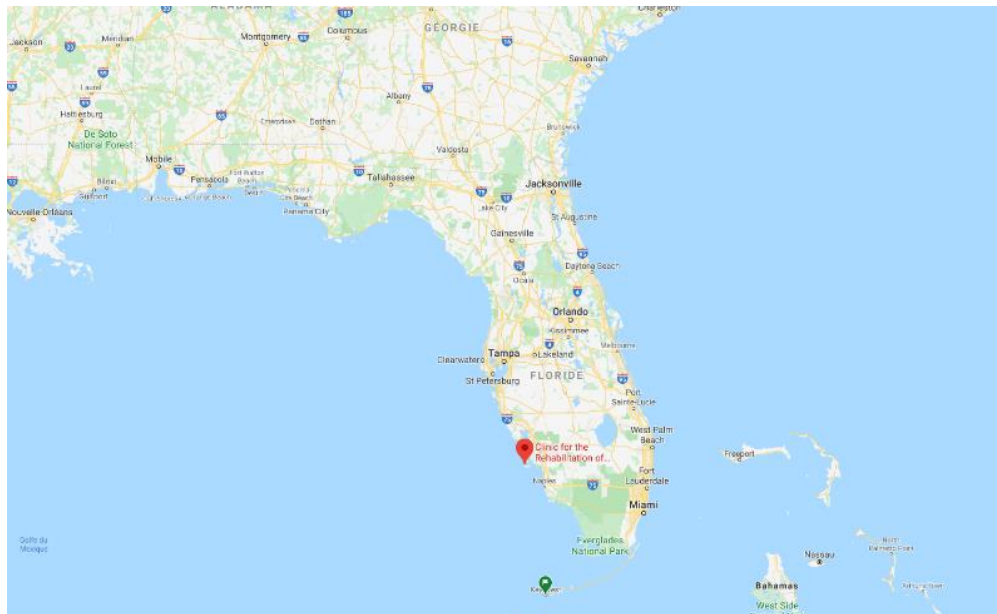
Un nombre important de cormorans à aigrettes est présenté chaque année avec un historique de troubles neurologiques à la Clinique pour la réhabilitation de la faune sauvage (CROW) de l'île de Sanibel (Floride), région particulièrement affectée par les marées rouges. Nous avons donc mis en œuvre cette étude afin de mieux caractériser la brevétoxicose chez cette espèce. L'objectif était de décrire les anomalies cliniques et paracliniques des animaux atteints, mais aussi le succès de leur prise en charge dans un centre de réhabilitation. Nous nous sommes également intéressés à la répartition géographique des cas, en comparaison aux zones de prolifération de *K. brevis*. Enfin, nous avons étudié la corrélation temporelle entre la survenue des marées rouges et le nombre de cormorans atteints de brevétoxicose admis à la CROW, afin de proposer un délai moyen de survenue des manifestations cliniques pouvant résulter de la transmission alimentaire des toxines à l'avifaune ciblée.

2. Matériels et méthodes

A. Lieu de l'étude

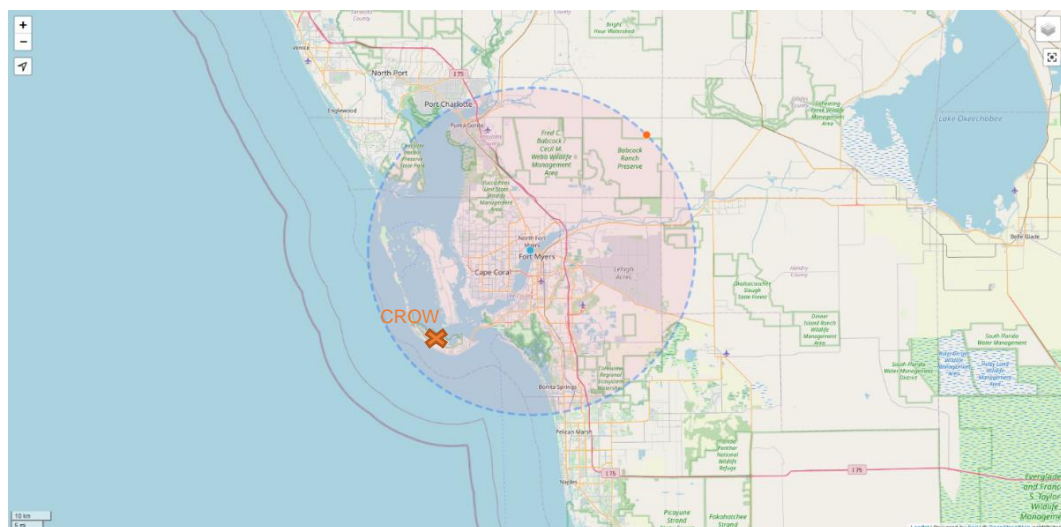
La présente étude s'appuie sur les données issues de la clinique pour la réhabilitation de la faune sauvage (CROW), située sur l'île de Sanibel, en Floride (États-Unis d'Amérique), comme le présente la figure 13.

Figure 13 : Carte de situation de la CROW (Google Maps, 2020)



La CROW est un hôpital uniquement dédié à la faune sauvage endémique, fondé en 1968. Il reçoit chaque année un nombre croissant de patients, ayant évolué d'environ 3000 en 2000 à plus de 5300 en 2019. Les patients admis à la CROW sont des animaux trouvés par des particuliers ou des bénévoles de l'association, dans un rayon d'environ 40 km autour de Fort Myers (Figure 14).

Figure 14 : Rayon d'action de la CROW (Maps & Directions, 2020)



La CROW est en capacité de recevoir des animaux appartenant à des taxons variés : en 2019 les oiseaux représentaient 54 % des patients, les mammifères 36 %, les reptiles 8 % et les amphibiens 2 % (Barron *et al.*, 2020). Les causes d'admissions les plus fréquentes sont présentées en annexe 1.

L'hôpital emploie deux vétérinaires à plein temps, dont une diplômée du collège américain de médecine aviaire, deux internes et de nombreux étudiants vétérinaires stagiaires chargés de la réalisation des soins aux patients hospitalisés. Ce centre dispose également d'infrastructures de réhabilitation lorsque les animaux ne nécessitent plus de soins médicaux avancés en hospitalisation, afin de permettre leur réintroduction ultérieure dans leur milieu naturel.

Les dossiers médicaux des cormorans présentés à la CROW entre janvier 2015 et décembre 2019, pour lesquels un diagnostic de brévétotoxicose a été établi, ont fait l'objet d'une étude rétrospective.

B. Données collectées

L'étude menée ici portait sur une unique espèce de l'avifaune locale : les cormorans à aigrettes, *Phalacrocorax auritus*. Des éléments de physiologie et d'écologie relatifs à cette espèce sont détaillés en annexe 2. Les données que nous avons extraites des dossiers numériques incluaient l'ensemble des paramètres d'admission des patients : l'examen clinique complet (dont un examen neurologique) réalisé par un interne ou un vétérinaire senior, le poids, l'âge de l'animal (classé en « adulte » ou « juvénile » selon leur plumage et la couleur de leurs yeux), l'hématocrite et le taux de protéines totales sanguines, des radiographies du corps entier, ainsi que la localisation géographique du lieu de collecte de l'animal. Les traitements administrés au cours de l'hospitalisation et l'évolution clinique des cormorans étaient également connus.

Ma présence à la CROW durant un mois, en juillet 2018, m'a permis de participer à l'ensemble des étapes de prise en charge des animaux : examen clinique d'admission, examens complémentaires, soins en hospitalisation et relâcher à l'issue de la réhabilitation. J'ai ainsi contribué à récolter une partie des données que nous exploitons par la suite dans cette étude.

C. Critères diagnostiques utilisés

Le diagnostic de brévétotoxicose chez les cormorans était basé sur les critères d'inclusion suivants : présence d'une ataxie cérébelleuse (mouvements hypermétriques, tremblements intentionnels, pertes d'équilibre, nystagmus, port de tête altéré), non imputable à une autre cause évidente, associée ou non à la mise en évidence d'une brévétotoxémie (PbTx-3) à l'admission. Ce diagnostic était donc envisagé si les cormorans présentaient des troubles neurologiques caractéristiques, sans autre anomalie à l'examen clinique (en particulier, pas de signes de trauma ou de maladie infectieuse systémique).

Les cormorans atteints d'une affection concomitante mise en évidence à l'examen clinique (signes d'atteinte cardiorespiratoire ou orthopédique, maladie infectieuse, parasitisme), ou présentant des anomalies radiographiques à l'admission ont été exclus de l'étude. Les animaux morts à l'admission ou au cours de leur examen initial en raison d'un état trop critique ont également été exclus.

D. Examens paracliniques

À l'admission, du sang était prélevé par une ponction veineuse jugulaire ou basilique (au niveau de l'aile) à l'aide d'une aiguille de 25 gauges (25G), immédiatement transféré dans des tubes à microhématocrite, puis centrifugé pendant 3 min à 10.000 tours par minute (centrifugeuse Leading Edge® RHINO). L'hématocrite était ensuite mesuré avec une grille de lecture adéquate et le taux de protéines totales plasmatiques était déterminé par réfractométrie (réfractomètre Reichert® VET).

Afin de déterminer la concentration sanguine en brevétoxine chez les cormorans, une ponction veineuse jugulaire (2 mL) était réalisée avec une aiguille de 25G, puis le sang était transféré dans un tube sec et stocké à 4°C jusqu'à analyse par le laboratoire de l'Institut de recherche sur les poissons et la faune sauvage (FWRI : Fish and Wildlife Research Institute). Après centrifugation pendant 15 min à 3000 tpm, une analyse par technique ELISA compétitive sur sérum était réalisée, selon les étapes décrites par Naar *et al.* (2002). Le résultat est indiqué en équivalent PbTx-3/mL, qui reflète la concentration globale en brevétoxines ou dérivés dans l'échantillon. La limite de détection pour ce test était de 1,0 ng/mL.

E. Concentration en *Karenia brevis*

Les données sur la densité marine de *Karenia brevis* autour de l'île de Sanibel, du 1^{er} janvier 2015 au 31 décembre 2019, ont été fournies par la FFWCC (Florida Fish and Wildlife Conservation Commission, 2020). La concentration en cellules par litre d'eau de mer était déterminée par un comptage microscopique, conformément aux méthodes décrites par Sellner *et al.* (2003). La date du prélèvement, la localisation géographique (latitude et longitude) ainsi que la profondeur d'échantillonnage étaient connues pour chaque concentration fournie. La limite de détection était de 333 cellules/L.

Seuls les prélèvements effectués à moins de 8 m de profondeur ont été conservés pour la suite des analyses. Cela correspond en effet à la profondeur maximale à laquelle 90 % des cormorans plongent pour se nourrir (Coleman *et al.*, 2005 ; Neuman *et al.*, 2011).

F. Répartition géographique des cas et des marées rouges

À partir de la localisation précise du lieu où chacun des cormorans atteints a été récupéré, les coordonnées GPS du site ont été déterminées afin de pouvoir les représenter cartographiquement, à l'aide du logiciel R. Pour chaque localisation, le nombre total de cormorans trouvés chaque mois a été déterminé.

Par ailleurs, la concentration maximale de *K. brevis* (en cellules/L) obtenue au cours de chaque mois de la période d'étude, pour chaque site de prélèvement par la FFWCC, a aussi été déterminée. Une marée rouge a été définie par l'obtention d'une concentration supérieure à 10⁵ cellules/L sur un ou plusieurs prélèvements dans la zone d'étude au cours d'un mois. Les concentrations ont également été classées selon cinq catégories classiquement utilisées dans le cadre de la surveillance des marées rouges par la FWCC, présentées dans le tableau 2.

Tableau 2 : catégories d'exposition à *K. brevis* selon la concentration marine (FWCC)

Catégorie d'exposition	Concentration de <i>K. brevis</i> (cellules/L)
Basale	≤ 1 000
Faible	1 000 à 10 000
Modérée	10 000 à 100 000
Élevée	100 000 à 1 000 000
Très élevée	> 1 000 000

G. Analyse de séries temporelles

Afin d'étudier la corrélation entre la concentration en *K. brevis* et le nombre de cormorans admis à la CROW pour des signes de brévétotoxicose, une analyse de séries temporelles a été effectuée.

Les efflorescences algales étant très inégales dans le temps et l'espace, un index algal hebdomadaire a été calculé afin de quantifier l'exposition des cormorans, avec la formule suivante :

$$\text{Index algal} = \log_{10}(1 + \text{concentration moyenne en } K. \text{ brevis sur l'ensemble de la zone d'étude})$$

Une concentration moyenne a été calculée, car le site de contamination exact des cormorans au sein de la région ne pouvait être connu. Par ailleurs, le nombre total de cormorans admis chaque semaine pour brévétotoxicose a également été calculé pour toute la période d'étude. Ainsi deux séries temporelles ont été obtenues : l'index algal (nommé x_t dans les formules ci-après) et le nombre de cormorans (y_t). Leur analyse a ensuite reposé sur le calcul de coefficients de corrélation croisée avec le logiciel R, utilisant la fonction de corrélation croisée (CCF) définie par l'expression suivante :

$$CCF_k^{xy} = \frac{g_k^{xy}}{\sqrt{SD_x \times SD_y}}$$

Où k est le retard entre les séries x_t et y_t , SD_x et SD_y les écarts-types respectifs des deux séries temporelles, et g_k^{xy} la fonction de covariance croisée correspondante. Cette fonction est définie par l'expression suivante :

$$g_k^{xy} = \frac{1}{n} \sum_{t=1}^{n-k} (y_t - \bar{y})(x_{t+k} - \bar{x})$$

Où n est le nombre d'échantillons communs aux deux séries temporelles, \bar{y} et \bar{x} les moyennes respectives de y_t et x_t .

Le calcul d'un coefficient de corrélation croisée permet de rendre compte du degré d'association entre deux séries temporelles, en prenant en compte les couples successifs de valeurs synchrones (y_t et x_t) dans les deux séries. Ce coefficient peut aussi être calculé en introduisant un décalage temporel k constant entre les séries ; on obtient alors la fonction de corrélation croisée en réalisant ce calcul pour un ensemble de décalages, positifs et négatifs.

Nous avons ainsi étudié la corrélation entre l'index algal et le nombre de cormorans admis au cours d'une semaine pour différentes valeurs de décalage temporel, afin de déterminer l'influence de la prolifération des algues sur le nombre de cormorans atteints de brévétotoxicose, et le délai selon lequel s'exerce cette influence. Le délai correspondant à la corrélation maximale a été déterminé, ainsi que tous les décalages temporels pour lesquels une corrélation positive significative a été obtenue (définie par une p-value < 0,05).

3. Résultats

A. Données démographiques et cliniques

La clinique a admis 1018 cormorans présentant des signes cliniques compatibles avec la brévétotoxicose, sur un total de 1250 cormorans reçus entre janvier 2015 et décembre 2019. Parmi ces animaux, 142 ont été exclus de l'étude, car ils présentaient une affection concomitante évidente, et 16 sont morts au cours de leur examen d'admission, ne permettant pas d'établir le diagnostic. La population d'étude finale comptait donc 860 cormorans.

Concernant l'âge des cormorans, 363 étaient des individus juvéniles, 334 étaient des adultes, tandis que l'âge n'a pas été renseigné pour 163 animaux.

Lors de leur examen clinique initial, tous ces cormorans présentaient une ataxie cérébelleuse de sévérité variable, caractérisée par des mouvements hypermétriques et une augmentation du polygone de sustentation, et allant jusqu'à un état non ambulateur dans 22,4 % des cas (n=193). Des tremblements de la tête étaient présents chez 49,7 % des animaux (n=427). Le réflexe palpébral était absent ou incomplet chez 14,5 % des cormorans (n=125); un nystagmus horizontal a par ailleurs été observé chez une petite proportion d'animaux (4,3 %). Enfin, 11,5 % (n=99) des cormorans présentaient une bradycardie (fréquence cardiaque inférieure à 140 bpm) lors de leur admission.

Des signes digestifs ont aussi été rapportés, avec du méléna et des régurgitations. L'ensemble des signes cliniques observés sont rassemblés par ordre de fréquence décroissante dans le tableau 3.

Tableau 3 : Présentation des signes cliniques à l'admission des cormorans (CROW 2019)

Signes cliniques	Pourcentage de cormorans atteints
Ataxie	100 %
Déshydratation supérieure à 5 %	87,4 % (n=752)
Maigreur (définie par une note d'état corporel inférieure à 3/5)	81,9 % (n=704)
Tremblements de la tête	49,7 % (n=427)
Méléna	30,5 % (n=262)
État non ambulateur	22,4 % (n=193)
Régurgitations	16,9 % (n=145)
Réflexe palpébral absent ou incomplet	14,5 % (n=128)
Bradycardie	11,5 % (n=99)
Nystagmus horizontal	4,3% (n=37)

B. Données biologiques

Une prise de sang a été réalisée à l'admission chez 699 cormorans ; l'hématocrite et le taux de protéines totales moyens étaient respectivement de 34,7 % et 26,9 g/L. Une anémie (définie ici par un taux d'hématocrite inférieur à 20 %) était présente chez 16,0 % des cormorans (n=112), et 33,5 % (n=234) présentaient une hypoprotéïnémie totale, définie par un taux de protéines inférieur à 20 g/L.

Un dosage sanguin de brevétotoxine a été réalisé chez 29 cormorans ; tous ont montré une concentration sanguine en PbTx-3 supérieure à la limite de détection, allant de 1,01 ng/mL à 7,88 ng/mL. La concentration moyenne était de 3,82 ng/mL. L'ensemble de ces données est résumé dans le tableau 4.

Tableau 4 : Résumé des données biologiques obtenues sur les prélèvements sanguins chez les cormorans (CROW 2019)

	Hématocrite (%)	Protéines totales (g/L)	PbTx-3 eq (ng/mL)
Moyenne	34,7 (n=699)	26,9 (n=699)	3,82 (n=29)
Écart-type	11,8	11,7	1,73
Minimum	4	2	1,01
Maximum	66	58	7,88

C. Traitement et succès de la réhabilitation

a. Traitements mis en place au cours de l'hospitalisation

Le plan de traitement mis en place pour l'ensemble des cormorans atteints de brevétotoxicose était le suivant, à visée essentiellement symptomatique :

- Réhydratation sous-cutanée avec un cristalloïde isotonique (NaCl 0,9 %), à raison de 50 mL/kg deux fois par jour pendant trois jours (traitement prolongé en cas de persistance de la déshydratation) ;
- Prise en charge de possibles ulcérations du tube digestif proximal et du risque de prolifération bactérienne associé, par l'administration des principes actifs suivants :
 - Sucralfate, à la dose de 50 mg/kg trois fois par jour *per os* ;
 - Oméprazole, à la dose de 20 mg/kg une fois par jour *per os* ;
 - Famotidine, à la dose de 1 mg/kg une fois par jour *per os* ;
 - Métronidazole, à la dose de 25 mg/kg deux fois par jour *per os*.
- Plan de réalimentation visant à prévenir la survenue d'un syndrome de renutrition, présenté dans le tableau 5. En cas de régurgitations, la durée de chaque étape pouvait être prolongée. Des poissons entiers n'étaient distribués qu'après résolution d'éventuels troubles digestifs (méléna).

Tableau 5 : Plan de réalimentation mis en place à l'admission des cormorans à la CROW

Jours	Aliment distribué	Nombre de repas	Quantité par repas
1	EmerAid Piscivore®	3	5 % du poids vif
2	Fish Analog®	3	5 % du poids vif
3	Poissons entiers congelés de type mulets	3	5 % du poids vif
Après 3 jours		3	Augmentation progressive de la quantité donnée, ajustée selon l'évolution du poids

En cas d'hypoprotéïnémie et d'anémie à l'admission, un cathéter veineux jugulaire était posé afin d'administrer un bolus de soluté colloïdal (Hetastarch®), à raison de 10 mL/kg sur 20 min, puis une perfusion de cristalloïde isotonique était mise en place pendant 48 h (40 mL/kg/jour), se substituant à la réhydratation sous-cutanée. Les cormorans recevaient par ailleurs une injection intramusculaire de vitamine B12 à 25 µg/kg et une complémentation en fer à 10 mg/kg par voie intramusculaire également, en une seule administration.

Par ailleurs, dans le cadre d'une autre étude menée par l'équipe de la CROW, 19 cormorans ont reçu à l'admission une émulsion lipidique intraveineuse, administrée en un bolus initial de 2 mL/kg sur 15 min, puis en perfusion continue à 0,25 mL/kg/min pendant 60 min. Une réduction des signes cliniques a en effet été démontrée chez les tortues marines atteintes de brévétotoxicose après administration d'émulsion lipidique intraveineuse (Cocilova *et al.*, 2019), expliquée par le caractère lipophile des brévétotoxines.

b. Évolution des cas et taux de réhabilitation

Parmi les 860 cormorans admis avec des signes cliniques évocateurs de brévétotoxicose, 457 ont été relâchés. Le taux de létalité globale (cormorans morts et euthanasiés) était de 46,9 %, dont 47,9 % au cours des 24 h suivant l'admission à la CROW (*cf.* tableau 6). La durée médiane ([1^{er} quartile ; 3^{em} quartile]) d'hospitalisation et de réhabilitation des cormorans relâchés était de 10 [9 ;13] jours.

Tableau 6 : Taux de mortalité et de réhabilitation des cormorans admis pour brévétotoxicose à la CROW entre 2015 et 2019

Devenir des cormorans	Pourcentage de cormorans
Euthanasiés dans les 24 h suivant l'admission	5,6% (n= 48)
Euthanasiés après 24 h	5,9 % (n=51)
Morts dans les 24 h suivant l'admission	16,9 % (n=145)
Morts après 24 h	18,5 % (n=159)
Relâchés	53,1 % (n=457)

D. Répartition géographique des cas et description des efflorescences algales

Du 2 janvier 2015 au 31 décembre 2019, 6450 échantillons d'eau de mer ont été prélevés autour de l'île de Sanibel dans le cadre du programme de surveillance des efflorescences algales de *K. brevis*. Cela représente 1010 sites de prélèvements différents. D'autre part, les coordonnées géographiques de collecte des cormorans ont pu être obtenues pour 784 individus, parmi les 860 cormorans inclus dans l'étude.

D'après les critères préalablement définis, quatre épisodes de marée rouge ont été mis en évidence entre 2015 et 2019, dont la plus longue s'est étendue sur une année complète, entre novembre 2017 et novembre 2018. Les caractéristiques principales des marées rouges de plus courte durée sont résumées dans le tableau 7, les cartes correspondantes sont présentées en annexe 3.

Tableau 7 : Caractéristiques des marées rouges s'étant produites entre 2015 et 2019 (Florida Fish and Wildlife Conservation Commission, 2020)

Période de marée rouge	Décembre 2015 – février 2016	Octobre 2016 – février 2017	Octobre 2019 – décembre 2019
Nombre de prélèvements réalisés	312	540	404
Dont % de catégorie « Elevée »	8,3 %	11,3 %	24,0 %
Dont % de catégorie « Très élevée »	2,6 %	0,75 %	21,0 %
Concentration maximale de <i>K. brevis</i> atteinte (cellules/L d'eau de mer)	5,59.10 ⁶	5,94.10 ⁶	38,52.10 ⁶
Nombre de cormorans atteints de brévétotoxicose pendant cette période	48	170	112
<i>Dont géolocalisés</i>	42	158	110

a. Description de la marée rouge ayant sévi de novembre 2017 à novembre 2018

Cet épisode fait l'objet d'une description plus étayée, car il se distingue des autres par sa durée exceptionnellement longue, d'une année complète. Ainsi, entre novembre 2017 et novembre 2018, une concentration en *K. brevis* supérieure à 10⁵ cellules/L a été obtenue sur plusieurs prélèvements chaque mois.

L'évolution quantitative mensuelle de cette marée rouge est présentée dans le tableau 8. Des variations de concentrations très importantes ont eu lieu durant cette année, à la fois spatialement et temporellement. La concentration moyenne sur toute la zone d'étude était supérieure au seuil de 10⁵ cellules/L pendant six mois sur 12, dont trois mois consécutifs entre juillet et septembre 2018. Durant ces trois mois, de 19,9 à 27,9 % des prélèvements ont révélé une

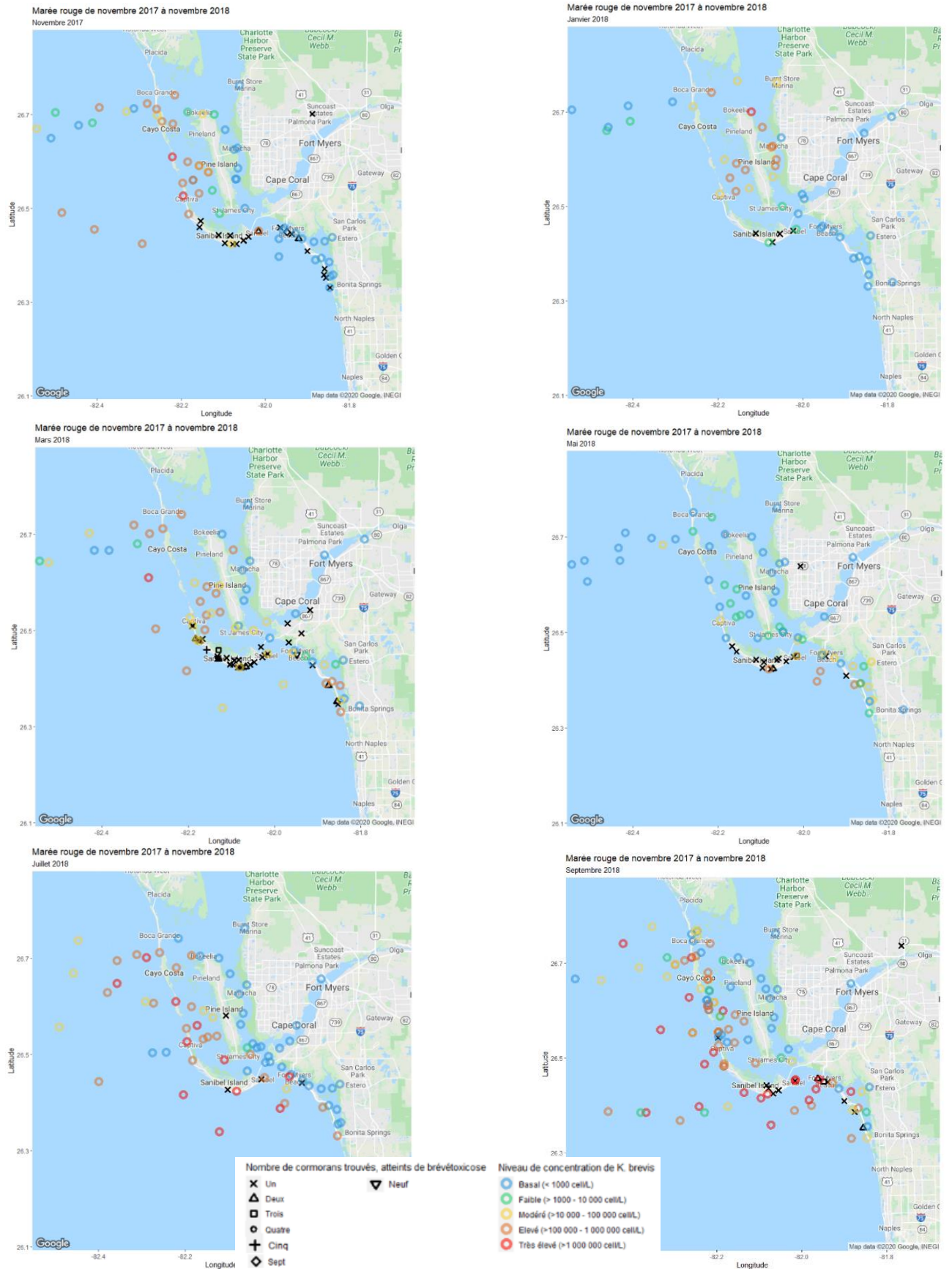
concentration supérieure à 10^5 cellules/L, et la concentration maximale atteinte était de $27,7 \cdot 10^6$ cellules/L. La concentration maximale sur toute la période de marée rouge a été atteinte en novembre 2018, avec $50,2 \cdot 10^6$ cellules/L.

Tableau 8 : Évolution des concentrations algales entre novembre 2017 et novembre 2018 (Florida Fish and Wildlife Conservation Commission, 2020)

Mois	Nb de prélèvements réalisés	% de catégorie « Elevée »	% de catégorie « Très élevée »	Concentration maximale de <i>K. brevis</i> (cellules/L)	Concentration moyenne de <i>K. brevis</i> (cellules/L)
Nov-17	117	20,5	1,71	$1,34 \cdot 10^6$	81 143
Dec-17	123	16,3	3,25	$2,56 \cdot 10^6$	120 656
Jan-18	85	11,8	1,18	$1,31 \cdot 10^6$	49 286
Fev-18	109	10,1	0	881 073	41 510
Mars-18	109	17,4	0,92	$2,45 \cdot 10^6$	78 112
Avril-18	148	13,5	2,70	$3,14 \cdot 10^6$	100 829
Mai-18	129	3,9	0	890 633	24 735
Juin-18	155	12,3	3,23	$1,81 \cdot 10^6$	97 352
Juillet-18	156	19,9	8,3	$20,1 \cdot 10^6$	369 590
Août-18	240	27,9	26,7	$27,7 \cdot 10^6$	$1,12 \cdot 10^6$
Sept-18	172	23,3	14,0	$21,8 \cdot 10^6$	706 392
Oct-18	147	8,2	0	829 920	29 335
Nov-18	142	16,9	8,45	$50,2 \cdot 10^6$	$1,28 \cdot 10^6$

L'efflorescence algale s'est tout d'abord manifestée au nord de l'île de Captiva en novembre 2017, puis s'est déplacée vers Cape Coral en janvier 2018. À partir de février, des concentrations élevées ont été relevées en particulier aux environs de Fort Myers Beach. À l'été 2018, toute la zone d'étude montrait des concentrations très élevées de *K. brevis*. Enfin, en novembre 2018, l'efflorescence algale semblait s'être à nouveau déplacée vers le large de l'île de Captiva. Cette évolution spatiale, ainsi que les lieux où des cormorans atteints de brévétotoxicose ont été trouvés, est présentée sur les cartes suivantes (figure 15). On note que la grande majorité des cormorans ont ainsi été trouvés sur les plages de Sanibel, Captiva et Fort Myers Beach, tout au long de cette marée rouge.

Figure 15 : Évolution spatio-temporelle de la marée rouge ayant sévi en 2017-2018 (RStudio, 2020 ; Fish and Wildlife Research Institute et Florida Fish and Wildlife Conservation Commission, 2020)



E. Analyse des séries temporelles

L'évolution de l'index algal et du nombre de cormorans admis chaque semaine à la CROW pour des signes de brévétocose entre 2015 et 2019 est présentée sur la figure 16 (données chiffrées en annexe 4). Les moyennes du nombre de cormorans admis et de l'index algal étaient respectivement de 3,3 (écart-type : 4,8) et 2,3 (écart-type : 2,2).

L'analyse de séries temporelles réalisée avec le logiciel R (*RStudio* - 1.3.1056, 2020) a mis en évidence une corrélation positive significative entre l'index algal d'une part, et le nombre de cormorans admis à la CROW avec des décalages par rapport à l'efflorescence allant de 0 à 11 semaines plus tard d'autre part. La corrélation maximale a été obtenue pour un délai de deux semaines (coefficient de corrélation = 0,46 ; $p=1,83.10^{-13}$) ; nous avons donc réalisé un second graphique (Figure 17) pour visualiser cette corrélation, en décalant de deux semaines les valeurs du nombre de cormorans par rapport à l'index algal correspondant. L'ensemble des coefficients de corrélation croisée obtenus est par ailleurs présenté dans le tableau 9.

Tableau 9 : Coefficients de corrélation et p-value obtenus pour des délais de 0 à 11 semaines entre l'index algal et le nombre de cormorans (*RStudio* - 1.3.1056, 2020)

Décalage temporel (semaines)	Coefficient de corrélation croisée	P-value
11	0,12	$4,67.10^{-02}$
10	0,15	$1,44.10^{-02}$
9	0,17	$4,86.10^{-03}$
8	0,22	$3,05.10^{-04}$
7	0,27	$1,69.10^{-05}$
6	0,28	$5,50.10^{-06}$
5	0,35	$1,72.10^{-08}$
4	0,39	$4,80.10^{-10}$
3	0,43	$6,55.10^{-12}$
2	0,46	$1,83.10^{-13}$
1	0,45	$3,19.10^{-13}$
0	0,42	$1,20.10^{-11}$

Figure 16 : évolution de l'index algal et du nombre de cormorans admis pour brevétotoxicose à la CROW entre 2015 et 2019 (Florida Fish and Wildlife Conservation Commission, 2020)

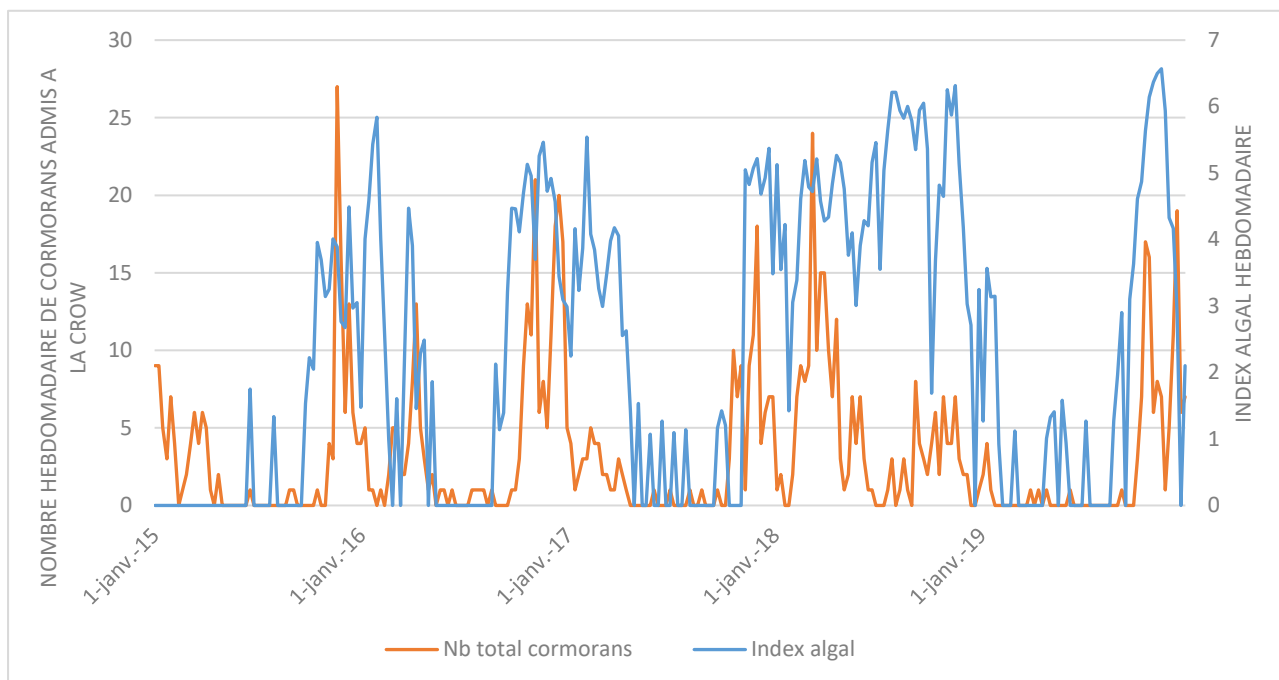
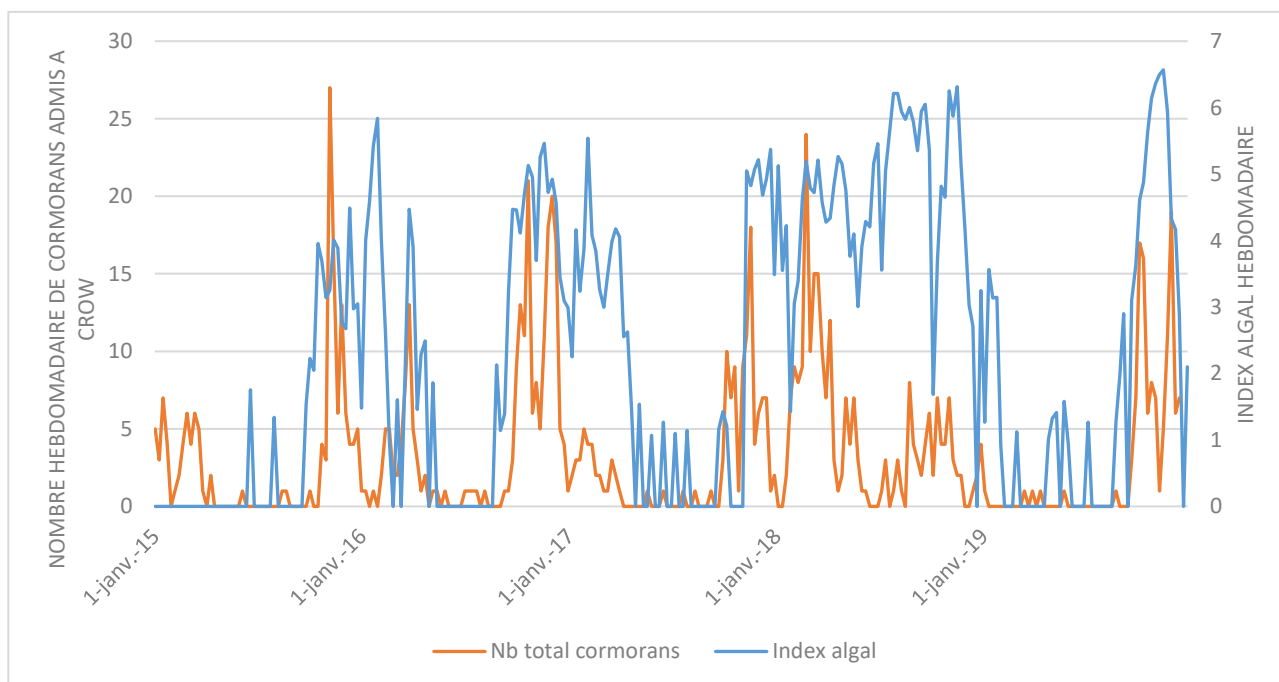


Figure 17 : évolution de l'index algal et du nombre de cormorans admis pour brevétotoxicose à la CROW entre 2015 et 2019, avec un décalage de 2 semaines



4. Discussion

Cette étude, ayant pour objectif d'évaluer la prolifération de *Karenia brevis* et ses effets sur les cormorans en Floride, s'est attachée à développer trois axes majeurs : (1) réaliser une description clinique et épidémiologique de la brévétotoxicose chez les cormorans admis en centre de réhabilitation (2) étudier la répartition spatio-temporelle des marées rouges et des cormorans atteints de brévétotoxicose, et (3) mettre en évidence une corrélation temporelle entre la prolifération de *K. brevis* et le nombre de cas de brévétotoxicose chez les cormorans.

A. Protocole

a. Choix des cormorans comme sujet d'étude

Le choix des cormorans à aigrette comme sujet d'étude a été motivé par des arguments pratiques et écologiques. Cette espèce, sensible aux effets de la toxine, est en effet la plus représentée parmi les oiseaux maritimes admis à la CROW, avec 1250 individus admis entre 2015 et 2019, contre 565 pélicans bruns et 362 mouettes atricilles *Leucophaeus atricilla* (WRMD, 2020) ; elle constituait ainsi une population d'étude de grande taille. La conduite d'une autre étude par les vétérinaires de la CROW a par ailleurs permis d'obtenir des examens sanguins et des dosages de brévétotoxines non réalisés en routine sur d'autres espèces. Bien que stressés en hospitalisation, les cormorans demeurent une espèce sauvage assez facile à médicaliser, permettant ainsi le suivi fréquent (*a minima* quotidien) de paramètres cliniques et biologiques.

D'autre part, les cormorans sont des prédateurs opportunistes, qui se concentrent sur les proies les plus facilement accessibles (*cf.* annexe 2). Ils sont alors susceptibles de consommer des poissons morts ou malades de brévétotoxicose en période de marée rouge ; leur risque d'exposition aux brévétotoxines par voie digestive en est majoré. Les publications concernant la brévétotoxicose chez les oiseaux maritimes ont de plus mis en évidence une plus grande morbidité chez cette espèce (Atwood, 2008 ; Fauquier *et al.*, 2013b).

b. Critères d'inclusions dans l'étude

Entre 2015 et 2019, 860 cormorans ont été admis à la CROW avec des signes cliniques compatibles avec la brévétotoxicose, et ont donc été inclus dans cette étude. Les critères d'inclusions utilisés ici étaient essentiellement cliniques, par la mise en évidence d'une ataxie cérébelleuse à l'admission des animaux, et l'exclusion d'autres causes évidentes pouvant expliquer les troubles neurologiques observés. Cela reposait sur la réalisation d'un examen clinique complet ne mettant pas en évidence d'autres signes cliniques, et de radiographies du corps entier visant à exclure l'hypothèse d'une origine traumatique. Cependant, la décision d'inclusion *versus* exclusion des animaux a été compliquée par un degré de précision variable de la description clinique dans les dossiers médicaux. Ainsi, de nombreux cormorans diagnostiqués par la CROW comme atteints de brévétotoxicose ont été exclus par manque d'information sur les signes neurologiques présents à l'admission.

Ces troubles neurologiques ont été décrits par plusieurs auteurs s'étant intéressés à la brévétotoxicose chez les cormorans. Ainsi, Kreuder *et al.* décrivaient en 2002 une ataxie sévère, caractérisée par une augmentation du polygone de sustentation, une incoordination tronculaire, une démarche hypermétrique, des tremblements intentionnels de la tête, ainsi qu'un nystagmus vertical chez 50 % des cormorans atteints. La résolution spontanée des signes cliniques après quelques jours en hospitalisation, ainsi que l'absence de lésions histologiques chez des animaux autopsiés,

suggérerait fortement une neurotoxicité due aux brevéttoxines. Fauquier *et al.* (2013) a également mis en évidence ces signes neurologiques chez d'autres espèces d'oiseaux (pélicans bruns notamment), avec une atteinte plus sévère des cormorans.

Dans un contexte d'exposition probable aux brevéttoxines, la survenue de ces signes cliniques chez de nombreux cormorans place la brevéttoxine en tête du diagnostic différentiel. Il existe cependant d'autres hypothèses, bien que moins probables, qui n'ont pas été explorées et formellement exclues ici (*cf.* tableau 10). On envisage en particulier un possible traumatisme sans lésion radiographiquement visible, ou une origine toxique autre que les brevéttoxines. En outre, les vétérinaires peuvent être plus enclins à attribuer les troubles neurologiques à la brevéttoxine s'ils ont connaissance d'une récente augmentation de la concentration de *K. brevis* dans la zone concernée par leur activité, commettant alors un biais de classement différentiel. Il ne s'agit donc pas d'un diagnostic de certitude, mais d'une forte présomption grâce aux arguments préalablement énoncés.

Tableau 10 : Diagnostic différentiel de l'ataxie cérébelleuse chez les oiseaux (Sanchez-Migallon Guzman et Cooper, 2016)

Origine possible d'une ataxie cérébelleuse	Hypothèses diagnostiques
Dégénérative	<ul style="list-style-type: none"> • Maladie de stockage lysosomal • Dégénérescence cérébelleuse idiopathique
Anomalie congénitale	<ul style="list-style-type: none"> • Hydrocéphalie
Métabolique	<ul style="list-style-type: none"> • Troubles de la natrémie à l'origine d'une encéphalopathie • Hypocalcémie ionisée, hypomagnésémie
Néoplasique	<ul style="list-style-type: none"> • Primaire : astrocytome, méningiome, oligodendrocytome, etc. • Métastatique
Nutritionnelle	<ul style="list-style-type: none"> • Déficit en thiamine (B1) • Hypovitaminose B6 • Hypovitaminose E
Infectieux	<ul style="list-style-type: none"> • Encéphalite bactérienne : <i>Salmonella</i> spp *, <i>Klebsiella</i> spp, <i>Mycobacterium</i> spp • Granulome fongique : <i>Aspergillus</i> spp, <i>Cryptococcus</i> spp • Encéphalite parasitaire : <i>Baylascaris procyonis</i>, <i>Toxoplasma gondii</i> • Infection virale : maladie de Newcastle (forme neurotrophe) *, virus West-Nile, encéphalomyélite aviaire, virus de l'encéphalite équine de l'Est *
Traumatique	<ul style="list-style-type: none"> • Lésions cérébrales avec ou sans fractures du crâne *
Toxique	<ul style="list-style-type: none"> • Brevéttoxines * • Métaux lourds (plomb, zinc) • Organophosphorés • Acide domoïque * • Saxitoxines *
Vasculaire	<ul style="list-style-type: none"> • Embolie lipidique • Accident ischémique

* : affections décrites chez les cormorans *Phalacrocorax* spp. (Work *et al.*, 1993 ; Clavijo *et al.*, 2001 ; White *et al.*, 2015 ; Bovedani *et al.*, 2016 ; Pedersen *et al.*, 2016)

Une faible proportion de ces affections a été décrite chez les cormorans ; il s'agit en particulier des maladies infectieuses et intoxications. La maladie de Newcastle est assez bien caractérisée chez ces oiseaux, et plusieurs épizooties remarquables ont eu lieu aux États-Unis d'Amérique depuis les années 1990 (White *et al.*, 2015), généralement dans les états du Midwest. Ce paramyxovirus affecte cependant majoritairement les jeunes de 4 à 6 semaines, et se manifeste par un torticolis, des tremblements, une ataxie, une parésie des pattes ou des ailes, parfois unilatérale. La mortalité peut atteindre 90 % au sein d'une colonie (Meteyer *et al.*, 1997). D'autre part, une étude menée sur l'avifaune sauvage de 44 états des États-Unis d'Amérique a révélé une séroprévalence de 2,5 % pour l'encéphalite équine de l'Est et de 31,7 % pour le virus West-Nile chez les cormorans (Pedersen *et al.*, 2016). Enfin, l'acide domoïque, produit par l'algue rouge *Chondria armatausep* et les diatomées du genre *Pseudo-nitzschia*, est plutôt retrouvé lors d'efflorescences algales sur la côte occidentale des États-Unis d'Amérique. Il est à l'origine d'une léthargie sans troubles neurologiques manifestes chez les cormorans (Work *et al.*, 1993).

c. Dosage des brevéttoxines

Un dosage sérique des brevéttoxines a été obtenu chez seulement 29 cormorans, au cours de l'année 2018, dans le cadre d'une autre étude menée par la CROW. La technique ELISA, développée par (Naar *et al.* (2002), demeure aujourd'hui la plus largement utilisée dans le cadre d'études consacrées à la brevéttoxose chez la faune sauvage. Cependant, elle ne permet pas de différencier les différents types de toxines en jeu et ne reconnaît que les brevéttoxines ayant une structure de type B (qui représentent 80 % des toxines produites par *K. brevis*).

Il est par ailleurs important de noter que le sang (sang total ou sérum) constitue un prélèvement donnant davantage de résultats faux négatifs pour la détection des brevéttoxines. En effet, dans l'étude de Fauquier *et al.* (2013), 62 % des cormorans testés étaient positifs aux brevéttoxines sur prélèvement sanguin, *versus* 70 % à partir du cerveau et 86 % après analyse des fèces. Les concentrations mesurées étaient également plus élevées dans les fèces, avec une médiane de 207 ng de PbTx-3 eq./g. Les brevéttoxines sont plus fréquemment isolées dans la bile, le foie et le contenu digestif, avec des concentrations très élevées pouvant atteindre plus de 9000 ng de PbTx-3 eq./g (Atwood, 2008 ; Fauquier *et al.*, 2013b). Cette répartition tissulaire des brevéttoxines a déjà été observée chez d'autres espèces affectées par les marées rouges, tels les dauphins et les lamantins (Bossart *et al.*, 1998 ; Capper *et al.*, 2013 ; Fire *et al.*, 2015), et est attribuée au métabolisme des molécules concernées, principalement hépatique et suivi d'une excrétion fécale.

Ainsi, les prélèvements fécaux pourraient constituer un meilleur support de diagnostic et de suivi en centre de réhabilitation. Il faut pour cela obtenir un échantillon homogénéisé de 2,5 g, dont les brevéttoxines sont ensuite extraites en utilisant de l'acétone (4 mL/g), par centrifugation (10 min à 3200 g) puis récupération du surnageant, opération répétée 2 fois. Le surnageant est ensuite évaporé à sec, puis redissous dans du méthanol aqueux à 80 % et de l'hexane. La fraction de méthanol est à nouveau évaporée, puis le résidu est dissous dans du méthanol à 100 % (Naar *et al.*, 2002). L'ensemble de ces étapes pré-analytiques est nécessaire avant de pouvoir réaliser le dosage ELISA. La stabilité des brevéttoxines dans les matrices biologiques n'est pas connue, cependant de précédentes études ont révélé de fortes concentrations de toxines dans des échantillons conservés plusieurs années à -20°C (Flewelling *et al.*, 2005).

Il aurait aussi été intéressant de réaliser des prélèvements tissulaires (foie, bile et contenu digestif en priorité) sur les animaux décédés en hospitalisation, afin de déterminer leur niveau de contamination de manière plus pertinente (Atwood, 2008).

d. Analyse de séries temporelles

L'analyse de séries temporelles grâce à la fonction de corrélation croisée est un outil mathématique qui vise à prédire l'évolution d'une série en fonction des valeurs de la seconde. C'est un modèle simple où l'on suppose une corrélation linéaire entre les deux séries. Dans le cas présent, il s'agissait de prédire le nombre de cas de brévétotoxicose parmi les cormorans admis à la CROW, en fonction des valeurs passées de l'index algal. On peut cependant imaginer que la force de cette influence varie au cours du temps, en fonction d'autres paramètres environnementaux (type de proies consommées, période de reproduction, etc.) ; la corrélation serait alors non linéaire. Un tel modèle n'a pas été testé ici.

Enfin, si cela permet de mettre en évidence des corrélations mathématiquement significatives, cette analyse ne conclut pas à un lien de causalité entre les deux séries et les résultats doivent s'interpréter à la lumière de leur pertinence biologique et physiopathologique.

B. Résultats

a. Anomalies cliniques et paracliniques chez les cormorans atteints

Au-delà des troubles neurologiques sévères précédemment décrits, les signes cliniques les plus fréquemment observés chez les cormorans atteints étaient des signes non spécifiques, tels que la déshydratation (87,4 %) et la maigreur (81,9 %). L'amaigrissement, voire la cachexie, sont souvent les seuls signes cliniques et lésionnels présents chez les animaux atteints de brévétotoxicose ayant fait l'objet d'une autopsie. Cela a été bien décrit chez les mammifères marins (Fire *et al.*, 2015), les tortues (Fauquier *et al.*, 2013a) et les oiseaux marins (Fauquier *et al.*, 2013b). Cet amaigrissement résulterait d'une incapacité à chasser ou plonger pour se nourrir, due à une faiblesse généralisée ou à d'autres troubles neurologiques liés aux brévétotoxines, ou bien d'une diminution de l'abondance des proies liée à l'ichtyotoxicité majeure des brévétotoxines.

- *Bradycardie*

Une bradycardie a été notée à l'admission chez 11,5 % des cormorans. Cela n'avait pas été rapporté précédemment chez des oiseaux atteints de brévétotoxicose, et plus généralement dans la faune sauvage. La bradycardie est cependant un symptôme connu, bien que rare, lors d'intoxication chez l'homme par des crustacés contaminés (Bovedani *et al.*, 2016).

Les canaux sodiques voltage-dépendants sont responsables de la dépolarisation des cellules excitables, comme les neurones et les cardiomyocytes. Les brévétotoxines, en se fixant sur la sous-unité alpha, entraînent l'activation des VGSC au potentiel de membrane normal et inhibent leur inactivation, augmentant par conséquent la perméabilité cellulaire au sodium. Au niveau cardiaque, les VGSC jouent un rôle essentiel dans le couplage excitation-contraction des cardiomyocytes, et dans la propagation de la dépolarisation au sein du tissu de conduction. Différentes expériences ont démontré que les brévétotoxines peuvent se fixer sur les canaux sodiques du myocarde et altérer la fonction cardiaque. Ainsi, Wang *et al.* (2015) ont observé une réduction significative de la contraction des cardiomyocytes exposés *in vitro* à 25 nmol/L de PbTx-2. L'affinité des brévétotoxines pour les canaux semble dépendre du type tissulaire, mais aussi de l'espèce concernée : PbTx-3 se lie au tissu cardiaque avec une moindre affinité qu'au tissu cérébral ou musculaire chez les mammifères, tandis que l'affinité est la même pour les trois tissus chez les poissons (Bottein Dechraoui *et al.*, 2006). En outre, les effets cardiovasculaires sont également

variables selon le type de toxine en jeu : lors d'une expérience menée sur des embryons de médaka (*Oryzias latipes*), l'exposition à PbTx-3 induisait une tachycardie tandis que PbTx-1 générait une bradycardie (Colman et Ramsdell, 2003).

Plusieurs mécanismes d'action sont proposés pour expliquer les effets cardiaques des brévétotoxines : une action directe sur les canaux sodiques voltage-dépendants d'une part, et un effet chronotrope médié par le système nerveux sympathique d'autre part, qui serait prédominant chez les mammifères. Ainsi, lors d'administration intraveineuse de brévétotoxines à des chiens (*Canis lupus familiaris*) anesthésiés, Johnson *et al.* (1985) ont observé une bradycardie, une hypotension et une hypopnée caractéristiques du réflexe de Bezold-Jarish. Ce dernier implique une augmentation du tonus vagal en réponse à des *stimuli* nocifs détectés par les ventricules. La bradycardie observée ici chez les cormorans (fréquence cardiaque de 100 à 120 bpm) pourrait donc s'expliquer par l'action directe ou indirecte des brévétotoxines sur la contraction cardiaque. Ce paramètre n'a pas fait l'objet d'un suivi régulier, mais il serait intéressant de déterminer son évolution, en lien avec celle des autres symptômes observés.

- *Signes digestifs*

Les troubles digestifs observés ici, avec du méléna et des régurgitations, constatés respectivement chez 30,5 % et 16,9 % des cormorans, constituent également des signes cliniques non rapportés précédemment chez les oiseaux maritimes. Ces signes digestifs se résolvait généralement par quelques jours de traitement symptomatique et une réalimentation progressive.

Le contenu du tube digestif, le foie et la vésicule biliaire contiennent le plus souvent les concentrations les plus élevées en brévétotoxines, aussi bien chez les oiseaux que chez les mammifères marins, poissons et tortues (Flewelling *et al.*, 2010 ; Capper *et al.*, 2013 ; Fauquier *et al.*, 2013a ; Fauquier *et al.*, 2013b). Cependant, par manque d'études *pre-mortem*, les conséquences cliniques sur le système digestif ne sont pas connues. Les signes de gastro-entérite (douleur abdominale, vomissements, diarrhée) constituent des symptômes majeurs lors d'intoxication par des crustacés ou du poisson contaminés chez l'homme. On peut envisager que des mécanismes similaires soient mis en jeu lors de brévétotoxicose chez les cormorans.

Cependant, des examens complémentaires supplémentaires devraient être réalisés avant de conclure à un effet direct des brévétotoxines sur le tractus digestif des cormorans. En effet, méléna et régurgitations peuvent également être la conséquence d'infections provoquées par des entérobactéries (*Pseudomonas* spp.), d'infections virales (maladie de Newcastle) ou de parasitisme (coccidies, *Capillaria* spp). La recherche de parasites dans les fèces devrait donc être associée systématiquement à la prise en charge des cormorans présentant ces troubles digestifs, ce qui n'a pas été réalisé dans le cadre de cette étude.

- *Anémie et hypoprotéinémie*

Parmi les 699 cormorans ayant subi une prise de sang lors de leur admission, 16,0 % présentaient une anémie et 33,5 % présentaient une hypoprotéinémie totale. Ces proportions sont plus faibles que celles rapportées dans l'étude de Fauquier *et al.* (2013), où 42,4 % et 60,6 % des animaux présentaient respectivement une anémie et une hypoprotéinémie.

Plusieurs hypothèses sont envisagées pour expliquer ces anomalies biologiques. L'anémie pourrait ainsi être secondaire aux saignements digestifs chroniques observés (méléna). Cependant, une hémosidérose multiorganique a été mise en évidence chez des cormorans, lamantins et

poissons exposés aux brevétotoxines (Bossart *et al.*, 1998 ; Kreuder *et al.*, 2002), suggérant une composante hémolytique lors d'exposition chronique. D'autre part, l'hypoprotéïnémie pourrait résulter de pertes digestives, d'un défaut d'apport consécutif à l'anorexie prolongée, d'une hépatotoxicité des brevétotoxines ou bien d'une affection concomitante (parasitisme, néphropathie, hépatopathie, etc.). Ainsi, la réalisation d'un hémogramme complet associé à un frottis sanguin, et d'un bilan biochimique, permettrait de mieux statuer sur l'origine de ces anomalies.

b. Dosage des brevétotoxines

Les 29 cormorans testés en 2018 ont tous présenté une concentration détectable de PbTx, variant entre 1,01 et 7,88 ng PbTx-3 eq/mL. Si ces résultats confirment l'exposition des cormorans aux brevétotoxines, l'interprétation des concentrations demeure délicate. En effet, les doses toxiques minimale et létale ne sont pas connues chez les cormorans. De plus, la clairance sanguine des brevétotoxines est rapide : une diminution de 50 % a été observée en deux à quatre jours chez des cormorans naturellement exposés aux brevétotoxines lors d'une marée rouge (Fauquier *et al.*, 2013b). Enfin, un effet cumulatif des brevétotoxines lors d'exposition chronique est également suspecté. Il est donc difficile de relier les valeurs mesurées à la symptomatologie observée chez les cormorans.

Les concentrations obtenues ici sont similaires à celles observées dans d'autres études, bien que les données *pre-mortem* soient rares chez les cormorans. Ainsi, lors de l'efflorescence algale dans la baie de Sarasota en 2005, la concentration sanguine de brevétotoxine mesurée chez 42 cormorans admis en centre de réhabilitation variait de 0 à 15 ng PbTx-3 eq./mL (Fauquier *et al.*, 2013b). Une étude menée sur 101 cormorans entre 2002 et 2006 a fourni des concentrations sériques *post-mortem* variant entre 0 et 12 ng/mL (Atwood, 2008).

c. Épidémiologie et succès de la réhabilitation

Dans notre étude, juvéniles et adultes étaient atteints en proportion quasiment égale (52 % de juvéniles), contrairement à ce qui avait été observé par Kreuder *et al.*(2002). Ces derniers avaient en effet mis en évidence une surreprésentation des jeunes cormorans parmi les patients admis en centre de réhabilitation pour brevétotoxicose (78,7 %). L'hypothèse formulée était alors que les jeunes, peu expérimentés à la pêche, seraient plus enclins à consommer des poissons morts ou contaminés. Une plus grande sensibilité aux brevétotoxines était également envisagée. Des expérimentations contrôlées seraient nécessaires afin d'évaluer l'âge comme facteur de risque ou non de la brevétotoxicose.

Quarante-six pour cent des cormorans admis à la CROW avec des signes de brevétotoxicose sont morts, dont 47,9 % dans les 24 h suivant leur admission. Les 24 premières heures apparaissent ainsi comme une période critique de la prise en charge, nécessitant le plus souvent des soins intensifs. Les cormorans sont par ailleurs plus sujets au stress en captivité que d'autres espèces prises en charge à la CROW, comme les pélicans bruns, ce qui peut compromettre leur évolution clinique et leur réhabilitation. Il est difficile d'évaluer l'impact des marées rouges sur les populations de cormorans à aigrette en Floride ; les animaux inclus dans cette étude représentant seulement une fraction des cormorans potentiellement exposés aux brevétotoxines, qui ont été trouvés dans des lieux accessibles à l'homme, et pris en charge par des bénévoles de l'association. On peut cependant raisonnablement supposer qu'en l'absence de soins appropriés, la mortalité globale liée à *Karenia brevis* est en réalité bien plus élevée.

d. Surveillance spatio-temporelle des efflorescences algales et exposition des cormorans

Nous avons, dans cette étude, cherché à quantifier l'exposition des cormorans aux brevétocines, par le suivi des comptages cellulaires de *K. brevis* effectués par la FWRI dans le comté de Lee. Ces données ont permis de mettre en évidence quatre épisodes de marées rouges, caractérisés par un ou plusieurs comptages successifs supérieurs à 10^5 cellules/L au cours d'un mois. Si trois d'entre elles semblaient montrer une saisonnalité, avec la survenue d'efflorescences algales en hiver, une marée rouge exceptionnelle s'est prolongée durant une année entière.

Il faut cependant noter que ces efflorescences algales sont extrêmement labiles et inégales dans le temps comme dans l'espace ; des pics de concentrations sont atteints localement pendant une courte durée, puis se dissolvent et un pic apparaît dans une autre zone. Les concentrations maximales atteintes sont également très variables selon les épisodes, de $5,59 \cdot 10^6$ cellules/L en 2015 à un pic de $50,2 \cdot 10^6$ en 2018. Les relevés ponctuels effectués dans le cadre de la surveillance des efflorescences algales nocives sont donc un indicateur imparfait de la dynamique des populations de *K. brevis*, d'autant plus que leur fréquence dépend directement des concentrations mesurées. Ainsi, des échantillons sont prélevés fréquemment si les concentrations obtenues sont importantes, mais la phase d'initiation des marées rouges n'est souvent pas documentée.

Par ailleurs, la libération de brevétocines dans l'eau résulte d'une lyse cellulaire, qui se produit après qu'une efflorescence a atteint une phase stationnaire (Vargo, 2009). Comme évoqué précédemment, les brevétocines persistent dans l'environnement benthique et subissent une bioaccumulation chez les crustacés, herbiers et poissons (Brand *et al.*, 2012). Par conséquent, la concentration cellulaire ponctuelle en algue peut ne pas être représentative de l'exposition réelle des cormorans aux brevétocines, essentiellement d'origine alimentaire.

Dans notre étude, la majorité des cormorans a été trouvée sur les plages de Sanibel, Captiva ou Fort Myers. Si cela ne permet pas de conclure avec certitude sur leur site de contamination, on sait néanmoins que les déplacements quotidiens des cormorans entre leur colonie et leur site de prédation se cantonnent à un rayon d'une dizaine de kilomètres. Ainsi Coleman *et al.* (2005) ont observé chez des cormorans du lac Oneida (New York, États-Unis d'Amérique) des déplacements de 2,9 km en moyenne ($SE \pm 180$ m, max = 14,19 km). Par ailleurs, 52 % des sites de prédation étaient situés à moins de 2 km de la colonie. Des parcours plus importants ont été décrits chez d'autres populations de cormorans à aigrettes, variant entre 4 et 21 km ; le périmètre de recherche de nourriture varie ainsi selon la localisation des colonies, la saison (reproduction ou non) et la disponibilité des proies (Blackwell et Krohn, 1997).

D'autres méthodes de détections des efflorescences algales ont été développées, reposant sur la détection de pigments par imagerie satellite (Carvalho *et al.*, 2011), sur des véhicules automatiques sous-marins embarquant un système d'analyse en cytométrie de flux (Olson et Sosik, 2007) ou un spectrophotomètre identifiant le spectre d'absorption des algues dans un échantillon d'eau de mer (Robbins *et al.*, 2006). Cependant, aucune de ces méthodes ne résout les problèmes d'interprétation des comptages cellulaires soulevés précédemment.

e. Étude de la corrélation temporelle

L'analyse de l'évolution de l'index algal, calculé à partir des comptages cellulaires de *K. brevis*, et le nombre hebdomadaire de cormorans admis à la CROW avec des signes de brévétotoxicose, a mis en évidence une corrélation significative entre la valeur de l'index algal et le nombre de cormorans admis entre 0 et 11 semaines plus tard. Le coefficient de corrélation maximal a été obtenu pour un retard de 2 semaines ($r=0,46$; $p<0,01$), mais les coefficients étaient également supérieurs à 0,4 pour des décalages temporels situés entre 0 et 3 semaines. La corrélation mise en évidence, bien que significative statistiquement, était plus faible pour les délais de 8 à 11 semaines (coefficients inférieurs à 0,2).

Cette corrélation positive conforte l'hypothèse d'un lien de cause à effet entre la prolifération des algues et les manifestations cliniques chez les cormorans, mais de nombreux biais ne permettent pas de conclure définitivement. Une étude menée par Kreuder *et al.* (2002), portant sur 360 cormorans entre 1995 et 1999, avait mis en évidence une corrélation entre l'augmentation simultanée de l'index algal et du nombre de cormorans admis en centre de réhabilitation avec des signes de brévétotoxicose, mais avait révélé une corrélation maximale pour un délai de 8 semaines ($r=0,31$, $p<0,001$).

Plusieurs mécanismes déjà évoqués peuvent être à l'origine de ce décalage temporel. En effet, les brévétotoxines sont libérées dans l'eau lorsque les cellules sont lysées. Or, les efflorescences algales surviennent régulièrement à des intensités variables, les cormorans peuvent donc être affectés cliniquement seulement lorsque le niveau de toxine absorbée dépasse un certain seuil (inconnu). Cela pourrait se produire suite à une exposition aiguë ou chronique aux toxines.

Un autre mécanisme majeur résulte de la bioaccumulation des brévétotoxines dans les proies, à l'origine d'une exposition différée des cormorans aux toxines par rapport à la survenue de l'efflorescence algale. Ce transfert des toxines *via* la chaîne trophique a été mis en évidence chez diverses espèces par plusieurs études : certaines espèces de poissons, herbiers ou mollusques stockent ainsi de grandes quantités de toxines et agissent comme réservoirs (Tester *et al.*, 2000 ; Flewelling *et al.*, 2005 ; Mendoza *et al.*, 2008).

C. Enjeux et perspectives

La brévétotoxicose constitue donc une affection majeure parmi les cormorans admis à la CROW ; cependant de nombreux éléments doivent encore être étudiés afin de mieux la caractériser. En particulier, des examens complémentaires visant à confirmer la présence des brévétotoxines, dans le sang ou les fèces, devraient être systématisés à l'admission d'oiseaux présentant des troubles neurologiques, complétés par des dosages tissulaires (foie) chez les cormorans morts en hospitalisation. Cependant, l'interprétation de ces dosages requiert la détermination de la concentration toxique chez les cormorans dans le cadre d'expérimentations contrôlées, difficilement réalisables en pratique. Les signes digestifs observés dans cette étude n'avaient pas été rapportés précédemment ; l'exclusion d'autres causes serait nécessaire avant de les inclure dans la symptomatologie imputable aux brévétotoxines.

Enfin, la dynamique des efflorescences algales et leur influence sur des cas de brévétoxicose demeurent mal comprises. Si une corrélation significative a bien été mise en évidence ici, l'obtention d'un diagnostic de certitude chez les cormorans en renforcerait le poids. L'analyse du contenu digestif des cormorans affectés et de la concentration tissulaire en toxine chez les proies qu'ils consomment permettraient d'explorer le mécanisme de bioaccumulation et de mieux caractériser l'exposition des cormorans.

Conclusion

Les « marées rouges » dues à *Karenia brevis* sont particulièrement fréquentes et intenses sur la côte sud-ouest de la Floride, affectant une grande diversité d'organismes aquatiques et d'oiseaux maritimes par la libération de brévétotoxines (Walsh *et al.*, 2006). En agissant sur les canaux sodiques voltage-dépendants, ces brévétotoxines sont à l'origine de troubles neurologiques bien décrits chez l'homme et en conditions expérimentales, mais peu connus chez les oiseaux. Une étude précédente a cependant mis en évidence une augmentation de l'incidence de troubles neurologiques chez les oiseaux piscivores lors de marées rouges (Kreuder *et al.*, 2002). Sur la base de cette observation, cette étude a permis de mieux caractériser la brévétotoxicose au sein d'un échantillon de 860 cormorans à aigrettes, admis en centre de réhabilitation en Floride entre 2015 et 2019 pour des signes compatibles avec cette affection.

Tous les cormorans atteints présentaient une ataxie cérébelleuse de sévérité variable, caractérisée par des mouvements hypermétriques et une augmentation du polygone de sustentation, et allant jusqu'à un état non ambulatoire dans 22,4 % des cas (n=193). Les autres signes neurologiques étaient des tremblements de la tête chez 49,7 % des animaux (n=427), un réflexe palpébral absent ou incomplet (14,5 % ; n=125) et enfin plus rarement un nystagmus horizontal (4,3 %). De façon plus surprenante, et non rapportée précédemment dans la littérature scientifique, une bradycardie et des signes digestifs ont été observés ici, avec du méléna (30,5 %) et des régurgitations (16,9 %). Ces résultats sont cependant à nuancer par l'absence d'explorations visant à exclure d'autres étiologies de ces symptômes. Nous avons pu également mettre en évidence des anomalies biologiques : 16 % des cormorans étaient anémiés et 33,5 % présentaient une hypoprotéinémie totale. Ces anomalies n'ont pas été plus explorées cependant et plusieurs hypothèses demeurent quant à leur origine. Le taux de réhabilitation était de 53,1 % et les premières 24 h suivant l'admission se sont révélées cruciales dans la prise en charge, puisque 47,9 % des cormorans décédés sont morts durant cette période.

Les dosages sériques de brévétotoxines réalisés chez 29 cormorans ont mis en évidence des concentrations similaires à celles précédemment publiées chez cette espèce (Atwood, 2008 ; Fauquier *et al.*, 2013b), variant entre 1,01 et 7,88 ng PbTx-3 eq/mL. La dose toxique demeure cependant inconnue, et on ignore si ces concentrations résultent d'une exposition aiguë ou chronique aux brévétotoxines.

Un autre objectif de cette étude visait à décrire la dynamique spatio-temporelle des efflorescences algales autour de l'île de Sanibel. Les résultats obtenus mettent en évidence une occurrence annuelle des HABs dans la région, dont la durée varie de quelques mois à une année entière. Les concentrations cellulaires en *K. brevis* sont extrêmement variables et nous avons pu observer que les zones de forte concentration se déplacent au cours d'une efflorescence. La concentration maximale atteinte sur notre période d'étude était de $50,2 \cdot 10^6$ cellules/L d'eau de mer, le seuil définissant une marée rouge étant fixé à 10^5 cellules/L. La localisation des cormorans trouvés était quant à elle peu variable, principalement sur les plages de Sanibel et Fort Myers.

Enfin, notre travail a permis de confirmer l'hypothèse d'une corrélation positive significative entre la concentration algale et le nombre de cormorans présentant des signes de brévétotoxicose admis en centre de réhabilitation simultanément ou jusqu'à 11 semaines plus tard. Cette corrélation était maximale pour un décalage de 2 semaines ($r=0,46$; $p<0,01$), suggérant un délai inhérent à la transmission des brévétotoxines par la chaîne trophique (consommation de poissons ou crustacés contaminés).

Une poursuite de ce travail s'avère néanmoins nécessaire afin de renforcer les moyens diagnostiques mis en œuvre et leur interprétation (dosages des brévétotoxines). À l'échelle de l'écosystème, les voies et délais de contamination des cormorans restent également à déterminer. Il serait en outre intéressant d'évaluer l'effet à plus long terme des marées rouges sur les populations de cormorans, à la fois en termes d'effectifs, mais aussi de comportement alimentaire (modification des sites de prédation, des distances parcourues, etc.). Bien que ne pouvant être étendus en l'état à l'ensemble de la population de cormorans à aigrettes vivant en Floride, ces résultats ont permis de dégager des tendances, complétant une littérature scientifique peu abondante et légitimant de prochaines études.

Liste des références bibliographiques

- ATWOOD K.E. (2008) Brevetoxin body burdens in seabirds of Southwest Florida. Master of Science Thesis. University of South Florida, Tampa
- BADEN D.G., MENDE T.J., BLOCK R.E. (1979) Two similar toxins isolated from *Gymnodinium breve*. In *Toxic Dinoflagellate Blooms*, Eds Taylor D.L., Seliger H.H., Elsevier. ed. New York, pp 327-334
- BADEN D.G., BOURDELAIS A.J., JACOCKS H., MICHELLIZA S., NAAR J. (2005) Natural and Derivative Brevetoxins: Historical Background, Multiplicity, and Effects. *Environ Health Persp* 113(5), 621-625
- BARRON H., BAST R., NICHOLS D., *et al.* (2020) CROW's Annual Report 2019. Rapport d'activité annuel. Sanibel, FL, Clinic for the Rehabilitation Of Wildlife
- BENSON J., HAHN F., MARCH T., *et al.* (2004) Inhalation toxicity of brevetoxin 3 in rats exposed for 5 days. *J. Tox. Env. Health* 67(18), 1443-1456
- BENSON J.M., HAHN F.F., MARCH T.H., *et al.* (2005) Inhalation toxicity of brevetoxin 3 in rats exposed for twenty-two days. *Environ Health Persp* 113(5), 626-631
- BEUTLER B., TIMMS H., SMART N.G., MURRAY A. (2018) Mutagenetix Phenotypic Mutation « Tremord ». In *Mutagenetix* Center for the Genetics of Host Defense, UT Southwestern Medical Center, Dallas, TX (USA). [<https://mutagenetix.utsouthwestern.edu/>] (consulté le 20/08/2020).
- BLACKWELL B.F., KROHN W.B. (1997) Spring Foraging Distribution and Habitat Selection by Double-Crested Cormorants on the Penobscot River, Maine USA. *Colon. Waterbird* 20(1), 66-76
- BOSSART G.D., BADEN D.G., EWING R.Y., ROBERTS B., WRIGHT S.D. (1998) Brevetoxicosis in Manatees (*Trichechus manatus latirostris*) from the 1996 Epizootic: Gross, Histologic, and Immunohistochemical Features. *Toxicol Pathol* 26(2), 276-282
- BOTTEIN DECHRAOUI M.-Y., WACKSMAN J.J., RAMSDELL J.S. (2006) Species selective resistance of cardiac muscle voltage gated sodium channels: Characterization of brevetoxin and ciguatoxin binding sites in rats and fish. *Toxicon* 48(6), 702-712
- BOTTEIN DECHRAOUI M.-Y., WANG Z., RAMSDELL J.S. (2007) Intrinsic potency of synthetically prepared brevetoxin cysteine metabolites BTX-B2 and desoxyBTX-B2. *Toxicon* 50(6), 825-834
- BRAARUD T., HEIMDAL B.R. (1970) Brown water on the Norwegian coast in autumn 1966. *Nytt mag for bot.* 17, 91-97
- BRAND L.E., CAMPBELL L., BRESNAN E. (2012) Karenia: The biology and ecology of a toxic genus. *Harmful Algae* 14, 156-178
- BRAND L.E., COMPTON A. (2007) Long-term increase in *Karenia brevis* abundance along the Southwest Florida Coast. *Harmful Algae* 6(2), 232-252
- BREIER C.F., BUSKEY E.J. (2007) Effects of the red tide dinoflagellate, *Karenia brevis*, on grazing and fecundity in the copepod *Acartia tonsa*. *J Plankton Res* 29(2), 115-126
- BROVEDANI V., PELIN M., D'ORLANDO E., POLI M. (2016) Brevetoxins: toxicological profile. In *Marine and Freshwater Toxins*, Eds Gopalakrishnakone. New York, NY, Springer Berlin Heidelberg, pp 113-128
- CAMPHUYSEN C. (1997) Seabirds as monitors of the marine environment. *ICES J Mar Sci* 54, 726-737
- CAPPER A., FLEWELLING L.J., ARTHUR K. (2013) Dietary exposure to harmful algal bloom (HAB) toxins in the endangered manatee (*Trichechus manatus latirostris*) and green sea turtle (*Chelonia mydas*) in Florida, USA. *Harmful Algae* 28, 1-9
- CARSTENSEN J., CONLEY D.J. (2004) Frequency, composition, and causes of summer phytoplankton blooms in a shallow coastal ecosystem, the Kattegat. *Limnol Oceanogr* 49(1), 191-201

- CARVALHO G.A., MINNETT P.J., BANZON V.F., BARINGER W., HEIL C.A. (2011) Long-term evaluation of three satellite ocean color algorithms for identifying harmful algal blooms (*Karenia brevis*) along the west coast of Florida: A matchup assessment. *Remote Sens Environ* 115(1), 1-18
- CHANG F.H. (2011) Toxic effects of three closely-related dinoflagellates, *Karenia concordia*, *K. brevisulcata* and *K. mikimotoi* (Gymnodiniales, Dinophyceae) on other microalgal species. *Harmful Algae* 10(2), 181-187
- CLAVIJO A., ROBINSON Y., LÓPEZ J. (2001) Isolation of Newcastle disease virus and *Salmonella typhimurium* from the brain of double-crested cormorants (*Phalacrocorax auritus*). *Avian Dis.* 45(1), 245-250
- COCILOVA C.C., FLEWELLING L.J., GRANHOLM A.A., MANIRE C.A., MILTON S.L. (2019) Intravenous lipid emulsion treatment reduces symptoms of brevetoxicosis in turtles (*Trachemys scripta*). *J. Zoo Wildlife Med.* 50(1), 33-44
- COLEMAN J.T.H., RICHMOND M.E., RUDSTAM L.G., MATTISON P.M. (2005) Foraging Location and Site Fidelity of the Double-crested Cormorant on Oneida Lake, New York. *Waterbirds* 28(4), 498-510
- COLMAN J.R., RAMSDELL J.S. (2003) The type B brevetoxin (PbTx-3) adversely affects development, cardiovascular function, and survival in Medaka (*Oryzias latipes*) embryos. *Environ Health Persp* 111(16), 1920-1925
- CORNELL LAB OF ORNITHOLOGY (2014) All about birds : Double-crested Cormorant. In *Birds of the World*. [https://www.allaboutbirds.org/guide/Double-crested_Cormorant/id] (consulté le 20/08/2020).
- CREEKMORE L.H. (2001) Birds: Algal Toxins. In *Field Manual of Wildlife Diseases - General Field Procedures and Diseases of Birds, Biological Resources Division - Information and Technology Report 1999-001*, U.S. Geological Survey. ed. Washington D.C., pp 263-266
- DAUGBJERG N., HANSEN G., LARSEN J., MOESTRUP Ø. (2000) Phylogeny of some of the major genera of dinoflagellates based on ultrastructure and partial LSU rDNA sequence data, including the erection of three new genera of unarmoured dinoflagellates. *Phycologia* 39(4), 302-317
- DAVIS C.C. (1948) *Gymnodinium Brevis* Sp. Nov., A Cause of Discolored Water and Animal Mortality in the Gulf of Mexico. *Bot Gaz* 109(3), 358-360
- DENNISON W.C., MARSHALL G.J., WIGAND C. (1989) Effect of "Brown Tide" Shading on Eelgrass (*Zostera Marina* L.) Distributions. In *Novel Phytoplankton Blooms, Coastal and Estuarine Studies*. State University of New York, NY, October 27-28, Springer, pp 675-692
- DOUCETTE G.J., MCGOVERN E.R., BABINCHAK J.A. (1999) Algicidal Bacteria Active Against *Gymnodinium Breve* (dinophyceae). I. Bacterial Isolation and Characterization of Killing Activity1,3. *J. Phycol.* 35(6), 1447-1454
- ELBRÄCHTER M. (1998) Exotic flagellates of coastal North Sea waters. *Helgolander Meeresun* 52(3), 235
- EVENS T.J., KIRKPATRICK G.J., MILLIE D.F., CHAPMAN D.J., SCHOFIELD O.M.E. (2001) Photophysiological responses of the toxic red-tide dinoflagellate *Gymnodinium breve* (Dinophyceae) under natural sunlight. *J Plankton Res* 23(11), 1177-1194
- FAUQUIER D.A., FLEWELLING L.J., MAUCHER J., et al. (2013a) Brevetoxin in blood, biological fluids, and tissues of sea turtles naturally exposed to *Karenia brevis* blooms in central west Florida. *J. Zoo Wildlife Med.* 44(2), 364-375
- FAUQUIER D.A., FLEWELLING L.J., MAUCHER J.M., et al. (2013b) Brevetoxicosis in seabirds naturally exposed to *Karenia brevis* blooms along the central west coast of Florida. *J. Wildlife Dis.* 49(2), 246-260
- FFWCC, FWRI (2020) Fish Kill Report. In *Florida Fish and Wildlife Conservation Commission*. [<https://public.myfwc.com/fwri/FishKillReport/searchresults.aspx>] (consulté le 22/08/2020).
- FIRE S.E., FAUQUIER D., FLEWELLING L.J., et al. (2007) Brevetoxin exposure in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) associated with *Karenia brevis* blooms in Sarasota Bay, Florida. *Mar Biol* 152(4), 827-834

- FIRE S., FLEWELLING L., STOLEN M., *et al.* (2015) Brevetoxin-associated mass mortality event of bottlenose dolphins and manatees along the east coast of Florida, USA. *Mar Ecol Prog Ser* 526
- FLEMING L.E., BACKER L., ROWAN A. (2002) The Epidemiology of Human Illnesses Associated with Harmful Algal Blooms. In *Handbook of Neurotoxicology*. Totowa, NJ, Humana Press, pp 363-381
- FLEMING L.E., KIRKPATRICK B., BACKER L.C., *et al.* (2011) Review of Florida Red Tide and Human Health Effects. *Harmful Algae* 10(2), 224-233
- FLEWELLING L.J., NAAR J.P., ABBOTT J.P., *et al.* (2005) Red tides and marine mammal mortalities. *Nature* 435(7043), 755-756
- FLEWELLING L.J., ADAMS D.H., NAAR J.P., *et al.* (2010) Brevetoxins in sharks and rays (Chondrichthyes, Elasmobranchii) from Florida coastal waters. *Mar Biol* 157(9), 1937-1953
- FLORIDA FISH AND WILDLIFE CONSERVATION COMMISSION (2020) 2015 - 2019 Lee County *Karenia brevis* abundance data, *Harmful Algal Bloom Monitoring Database*, St Petersburg, FL, USA, Fish and Wildlife Research Institute
- FOLEY A., STACY B., SCHUELLER P., *et al.* (2019) Assessing *Karenia brevis* red tide as a mortality factor of sea turtles in Florida, USA. *Dis. Aquat. Org.* 132(2), 109-124
- FORRESTER D.J., GASKIN J.M., WHITE F.H., *et al.* (1977) An epizootic of waterfowl associated with a red tide episode in Florida. *J. Wildlife Dis.* 13(2), 160-167
- GANNON D., BERENS MCCABE E., CAMILLERI S., *et al.* (2009) Effects of *Karenia brevis* harmful algal blooms on nearshore fish communities in southwest Florida. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 378, 171-186
- GEESEY M., TESTER P. (1993) *Gymnodinium breve*: Ubiquitous in Gulf of Mexico waters? *Dev. Mar. Bio.* , 251-255
- GENTIEN P. (1998) Bloom dynamics and ecophysiology of the *Gymnodinium mikimotoi* species complex. In *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*, Eds Anderson D.M., Cemballa A.D., Hallegraeff G. Berlin ; New York, Springer, pp 155-173
- GERACI J.R. (1989) Clinical investigation of the 1987-88 mass mortality of bottlenose dolphins along the U.S. central and south Atlantic coast: final report to National Marine Fisheries Service and U.S. Navy Office of Naval Research and Marine Mammal Commission. National Marine Fisheries Service
- GLIBERT P., BURKHOLDER J., KANA T., *et al.* (2009) Grazing by *Karenia brevis* on *Synechococcus* enhances its growth rate and may help to sustain blooms. *Aquat. Microb. Ecol.* 55, 17-30
- GOOGLE MAPS (2020) Clinic for the Rehabilitation of Wildlife - Wildlife hospital. In *Google Maps*. [<https://goo.gl/maps/D2pWhvBEaato2oUX9>] (consulté le 19/08/2020).
- GUNTER G., WILLIAMS R.H., DAVIS C.C., SMITH F.G.W. (1948) Catastrophic Mass Mortality of Marine Animals and Coincident Phytoplankton Bloom on the West Coast of Florida, November 1946 to August 1947. *Ecological Monographs* 18(3), 309-324
- HALLEGRAEFF G. (1993) A Review of Harmful Algal Blooms and Their Apparent Global Increase. *Phycologia* 32(2), 79-99
- HARDMAN R.C., COOPER W.J., BOURDELAIS A.J., GARDINALI P., BADEN D.G. (2004) Brevetoxin Degradation and By-Product Formation via Natural Sunlight. *Harmful Algae* 2002 (2002) 10, 153-154
- HETLAND R.D., CAMPBELL L. (2007) Convergent blooms of *Karenia brevis* along the Texas coast. *Geophys. Res. Lett.* 34(19)
- JOHNSON G.L., SPIKES J.J., ELLIS S. (1985) Cardiovascular effects of brevetoxins in dogs. *Toxicol* 23(3), 505-515
- KAMYKOWSKI D., MILLIGAN E.J., REED R.E. (1998) Relationships between geotaxis/phototaxis and diel vertical migration in autotrophic dinoflagellates. *J Plankton Res* 20(9), 1781-1796
- KANG Y. (2010) The Distribution of Dinoflagellate Cysts along the West Florida Coast (WFC). Master of Science Thesis. University of Miami
- KEMPPAINEN B.W., REIFENRATH W.G., STAFFORD R.G., MEHTA M. (1991) Methods for in vitro skin absorption studies of a lipophilic toxin produced by red tide. *Toxicology* 66(1), 1-17

- KERFOOT J., KIRKPATRICK G., LOHRENZ S., *et al.* (2002) Vertical migration of a *Karenia brevis* bloom: implications for remote sensing of harmful algal blooms. *In Xth International Conference on Harmful Algae*, St. Pete Beach, Florida, October 21-25, 2002, Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, pp 213-215
- KIRKPATRICK B., FLEMING L.E., SQUICCIARINI D., *et al.* (2004) Literature Review of Florida Red Tide: Implications for Human Health Effects. *Harmful Algae* 3(2), 99-115
- KIRKPATRICK B., PIERCE R., CHENG Y.S., *et al.* (2010) Inland Transport of Aerosolized Florida Red Tide Toxins. *Harmful Algae* 9(2), 186-189
- KREUDER C., MAZET J.A.K., BOSSART G.D., *et al.* (2002) Clinicopathologic features of suspected brevetoxicosis in double-crested cormorants (*Phalacrocorax auritus*) along the Florida Gulf Coast. *J. Zoo Wildlife Med.* 33(1), 8-15
- KUBANEK J., HICKS M.K., NAAR J., VILLAREAL T.A. (2005) Does the red tide dinoflagellate *Karenia brevis* use allelopathy to outcompete other phytoplankton? *Limnol Oceanogr* 50(3), 883-895
- KUHAR S.E., NIERENBERG K., KIRKPATRICK B., TOBIN G.A. (2009) Public Perceptions of Florida Red Tide Risks. *Risk Anal* 29(7), 963-969
- LANDSBERG J. (2002) The Effects of Harmful Algal Blooms on Aquatic Organisms. *Rev. Fish. Sci.* 10, 113-390
- LANDSBERG J.H., FLEWELLING L.J., NAAR J. (2009) *Karenia brevis* red tides, brevetoxins in the food web, and impacts on natural resources: Decadal advancements. *Harmful Algae* 8(4), 598-607
- LANEROLLE L.W.J., TOMLINSON M.C., GROSS T.F., *et al.* (2006) Numerical investigation of the effects of upwelling on harmful algal blooms off the west Florida coast. *Estuar. Cost. Shelf S.* 70(4), 599-612
- LEIGHFIELD T.A., MUHA N., RAMSDELL J.S. (2014) Tissue distribution of amino acid- and lipid-brevetoxins after intravenous administration to C57BL/6 mice. *Chem. Res. Toxicol.* 27(7), 1166-1175
- LESTER K.M., HEIL C.A., NEELY M.B., *et al.* (2008) Zooplankton and *Karenia brevis* in the Gulf of Mexico. *Cont. Shelf Res.* 28(1), 99-111
- LINDAHL O. (1983) On the development of a *Gyrodinium aureolum* occurrence on the Swedish west coast in 1982. *Mar. Biol.* 77(2), 143-150
- MAGAÑA H.A., CONTRERAS C., VILLAREAL T.A. (2003) A historical assessment of *Karenia brevis* in the western Gulf of Mexico. *Harmful Algae* 2(3), 163-171
- MAPS & DIRECTIONS (2020) Dessiner une carte de rayon. *In Maps & Directions*. [<https://www.mapsdirections.info/fr/carte-cercle-rayon/>] (consulté le 19/08/2020).
- MARSHALL J.-A., DE SALAS M., ODA T., HALLEGRAEFF G. (2005) Superoxide production by marine microalgae: I. Survey of 37 species from 6 classes. *Mar Biol* 147, 533-540
- MCKAY L., KAMYKOWSKI D., MILLIGAN E., SCHAEFFER B., SINCLAIR G. (2006) Comparison of swimming speed and photophysiological responses to different external conditions among three *Karenia brevis* strains. *Harmful Algae* 5, 623-636
- MENDOZA W.G., MEAD R.N., BRAND L.E., SHEA D. (2008) Determination of brevetoxin in recent marine sediments. *Chemosphere* 73(8), 1373-1377
- METEYER C.U., DOCHERTY D.E., GLASER L.C., *et al.* (1997) Diagnostic findings in the 1992 epornitic of neurotropic velogenic Newcastle disease in double-crested cormorants from the upper midwestern United States. *Avian Dis.* 41(1), 171-180
- MORRIS P.D., CAMPBELL D.S., TAYLOR T.J., FREEMAN J.I. (1991) Clinical and epidemiological features of neurotoxic shellfish poisoning in North Carolina. *Am J Public Health* 81(4), 471-474
- MOUNTFORT D., BEUZENBERG V., MACKENZIE L., RHODES L. (2006) Enhancement of growth and gymnodimine production by the marine dinoflagellate, *Karenia selliformis*. *Harmful Algae* 5(6), 658-664
- MULHOLLAND M.R., HEIL C., BRONK D., O'NEIL J., BERNHARDT P. (2004) Does nitrogen regeneration from the N₂ fixing cyanobacteria *Trichodesmium* spp. fuel *Karenia brevis* blooms in the Gulf of Mexico. *Harmful Algae* 2002 59, 47-49

- MURRELL R.N., GIBSON J.E. (2009) Brevetoxins 2, 3, 6, and 9 show variability in potency and cause significant induction of DNA damage and apoptosis in Jurkat E6-1 cells. *Arch. Toxicol.* 83(11), 1009-1019
- MYERS T.L., PRINCE E.K., NAAR J., KUBANEK J. (2008) Loss of waterborne brevetoxins from exposure to phytoplankton competitors. *Harmful Algae* 7(6), 762-771
- NAAR J., BOURDELAIS A., TOMAS C., *et al.* (2002) A competitive ELISA to detect brevetoxins from *Karenia brevis* (formerly *Gymnodinium breve*) in seawater, shellfish, and mammalian body fluid. *Environ Health Persp* 110(2), 179-185
- NAAR J.P., FLEWELLING L.J., LENZI A., *et al.* (2007) Brevetoxins, like ciguatoxins, are potent ichthyotoxic neurotoxins that accumulate in fish. *Toxicon* 50(5), 707-723
- NAM D.-H., ADAMS D.H., FLEWELLING L.J., BASU N. (2010) Neurochemical alterations in lemon shark (*Negaprion brevirostris*) brains in association with brevetoxin exposure. *Aquatic Toxicology* 99(3), 351-359
- NEUMAN J., PEARL D., EWINS P., *et al.* (2011) Spatial and temporal variation in the diet of double-crested cormorants (*Phalacrocorax auritus*) breeding on the lower Great Lakes in the early 1990s. *Can J Fish Aquat Sci* 54, 1569-1584
- NICHOLSON G., LEWIS R. (2006) Ciguatoxins: Cyclic Polyether Modulators of Voltage-gated Ion Channel Function. *Mar Drugs* 4, 82-118
- OLASCOAGA M.J. (2010) Isolation on the West Florida Shelf with implications for red tides and pollutant dispersal in the Gulf of Mexico. *Nonlinear Proc Geoph* 17(6), 685-696
- OLSON R.J., SOSIK H.M. (2007) A submersible imaging-in-flow instrument to analyze nano- and microplankton: Imaging FlowCytobot. *Limnol. Oceanogr. Meth.* 5(6), 195-203
- ONO C., YOSHIMATSU S., MATSUOKA S. (1996) Monitoring system of harmful and toxic phytoplankton in Kagawa Prefecture, Japan. *Harm and Tox Alg Blooms*, 23-25
- PAUL J.H., HOUCHIN L., GRIFFIN D., *et al.* (2002) A Filterable Lytic Agent Obtained from a Red Tide Bloom that Caused Lysis of *Karenia brevis* (*Gymnodinium breve*) Cultures. *Aquat. Microb. Ecol.* 27, 21-27
- PEDERSEN K., MARKS D.R., WANG E., *et al.* (2016) Widespread Detection of Antibodies to Eastern Equine Encephalitis, West Nile, St. Louis Encephalitis, and Turlock Viruses in Various Species of Wild Birds from Across the United States. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 95(1), 206-211
- PERRAULT J.R., BAUMAN K.D., GREENAN T.M., *et al.* (2016) Maternal transfer and sublethal immune system effects of brevetoxin exposure in nesting loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) from western Florida. *Aquat Toxicol* 180, 131-140
- PERRAULT J.R., STACY N.I., LEHNER A.F., *et al.* (2017) Potential effects of brevetoxins and toxic elements on various health variables in Kemp's ridley (*Lepidochelys kempii*) and green (*Chelonia mydas*) sea turtles after a red tide bloom event. *Sci Total Environ* 605-606, 967-979
- PINGREE R.D., PUGH P.R., HOLLIGAN P.M., FORSTER G.R. (1975) Summer phytoplankton blooms and red tides along tidal fronts in the approaches to the English Channel. *Nature* 258(5537), 672-677
- PLAKAS S.M., DICKEY R.W. (2010) Advances in monitoring and toxicity assessment of brevetoxins in molluscan shellfish. *Toxicon* 56(2), 137-149
- POLI M.A., MENDE T.J., BADEN D.G. (1986) Brevetoxins, unique activators of voltage-sensitive sodium channels, bind to specific sites in rat brain synaptosomes. *Mol. Pharmacol.* 30(2), 129-135
- POLI M.A., TEMPLETON C.B., THOMPSON W.L., HEWETSON J.F. (1990) Distribution and elimination of brevetoxin PbTx-3 in rats. *Toxicon* 28(8), 903-910
- PRINCE E.K., POULSON K.L., MYERS T.L., SIEG R.D., KUBANEK J. (2010) Characterization of allelopathic compounds from the red tide dinoflagellate *Karenia brevis*. *Harmful Algae* 10(1), 39-48
- RAINE R., O'BOYLE S., O'HIGGINS T., *et al.* (2001) A satellite and field portrait of a *Karenia mikimotoi* bloom off the south coast of Ireland, August 1998. *Hydrobiologia* 465, 187-193

- RAMSDELL J. (2008) The Molecular and Integrative Basis to Brevetoxin Toxicity. *In Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology, and Detection, Second Edition*, Eds Carmichael W. New York, NY, Marcel Dekker, pp 519-550
- ROBBINS I.C., KIRKPATRICK G.J., BLACKWELL S.M., *et al.* (2006) Improved monitoring of HABs using autonomous underwater vehicles (AUV). *Harmful Algae* 5(6), 749-761
- RStudio - 1.3.1056 (2020) . [Logiciel], Boston, Massachusetts, RStudio PBC
- RUMBOLD D., SNEDAKER S. (1999) Sea-surface microlayer toxicity off the Florida Keys. *Mar Environ Res* 47(5), 457-472
- SANCHEZ-MIGALLON GUZMAN D., COOPER J.E. (2016) Disorders of the nervous system. *In Avian Medicine, Third Edition*. St. Louis, Missouri, Elsevier, pp 421-433
- SCHAEFFER B.A., KAMYKOWSKI D., MCKAY L., SINCLAIR G., MILLIGAN E.J. (2007) A Comparison of Photoresponse Among Ten Different *Karenia Brevis* (dinophyceae) Isolates. *Journal of Phycology* 43(4), 702-714
- SCOTT T.M., MEANS G.H., MEEGAN R.P., *et al.* (2004) Springs of Florida, *Florida Geological Survey* Tallahassee, Florida, State of Florida Department of Environmental Protection
- SELLNER K.G., DOUCETTE G.J., KIRKPATRICK G.J. (2003) Harmful algal blooms: causes, impacts and detection. *J Ind Microbiol Biot* 30(7), 383-406
- SHIMIZU Y., WATANABE N., WRENSFORD G. (1995) Biosynthesis of brevetoxins and metabolism of *Gymnodinium breve*. *In Harmful algal blooms. Technique et Documentation*, Eds Lassus P., Arzul G., Erard E., Gentien P., Marcaillou C., Lavoisier, Intercept Ltd. ed. pp 351-357
- SHUMWAY S.E., ALLEN S.M., DEE BOERSMA P. (2003) Marine birds and harmful algal blooms: sporadic victims or under-reported events? *Harmful Algae* 2(1), 1-17
- SIMON J.L., DAUER D.M. (1972) A Quantitative Evaluation of Red-Tide Induced Mass Mortalities of Benthic Invertebrates in Tampa Bay, Florida. *Environ Lett* 3(4), 229-234
- SINCLAIR G., KAMYKOWSKI D., GLIBERT P.M. (2009) Growth, uptake, and assimilation of ammonium, nitrate, and urea, by three strains of *Karenia brevis* grown under low light. *Harmful Algae* 8(5), 770-780
- SINCLAIR G.A., KAMYKOWSKI D. (2008) Benthic–pelagic coupling in sediment-associated populations of *Karenia brevis*. *J Plankton Res* 30(7), 829-838
- SMAYDA T.J. (1997) Harmful algal blooms: Their ecophysiology and general relevance to phytoplankton blooms in the sea. *Limnol Oceanogr* 42(5part2), 1137-1153
- STEIDINGER K., BURKLEW M., INGLE R.M. (1973) The effects of *Gymnodinium breve* toxin on estuarine animals. *In Marine Pharmacognosy: Action of Marine Toxins at the cellular level*, Eds Martin D.F., Padilla G.M., Academic Press. ed. New York, NY, pp 179-202
- STEIDINGER K.A., LANDSBERG J.H., FLEWELLING L.J., KIRKPATRICK G.J. (2008) Toxic dinoflagellates. *In Oceans and Human Health: Risks and Remedies from the Seas*. Burlington, Academic Press, pp 239-256
- STEIDINGER K. (2009) Historical perspective on *Karenia brevis* red tide research in the Gulf of Mexico. *Harmful Algae* 8, 549-561
- STEIDINGER K.A., INGLE R.M. (1972) Observations on the 1971 Summer Red Tide in Tampa Bay, Florida. *Environ Lett* 3(4), 271-278
- STUMPF R.P., LITAKER R.W., LANEROLLE L., TESTER P.A. (2008) Hydrodynamic accumulation of *Karenia* off the west coast of Florida. *Cont. Shelf Res.* 28(1), 189-213
- TESTER P.A. (1994) Harmful Marine Phytoplankton and Shellfish Toxicity Potential Consequences of Climate Change. *Ann NY Acad Sci* 740(1 Disease in Ev), 69-76
- TESTER P.A., TURNER J.T., SHEA D. (2000) Vectorial transport of toxins from the dinoflagellate *Gymnodinium breve* through copepods to fish. *J Plankton Res* 22(1), 47-62
- TESTER P., STEIDINGER K. (1997) *Gymnodinium breve* red tide blooms: Initiation, transport, and consequences of surface circulation. *Limnol Oceanogr* 42, 1039-1051
- TIBBETTS B.M., BADEN D.G., BENSON J.M. (2006) Uptake, tissue distribution, and excretion of brevetoxin-3 administered to mice by intratracheal instillation. *J. Tox. Env. Health* 69(14), 1325-1335

- TURNER J., TESTER P. (1989) Zooplankton Feeding Ecology: Copepod Grazing During an Expatriate Red Tide. *In Novel Phytoplankton Blooms, Coastal and Estuarine Studies*, Eds Cosper E.M., Bricelj V.M., Carpenter E.J. New York, NY, Springer-Verlag, pp 359-374
- TWINER M.J., FLEWELLING L.J., FIRE S.E., *et al.* (2012) Comparative analysis of three brevetoxin-associated bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) mortality events in the Florida Panhandle region (USA). *PLoS ONE* 7(8), e42974
- UEMURA E.E. (2015) Electrochemical Basis of Neuronal Function. *In Dukes' Physiology of Domestic Animals*, Eds Reece W.O., Erickson H.H., Goff J.P., 13^e ed. John Wiley & Sons, pp 13-22
- VAN APELDORN M., VAN EGMOND H., SPEIJERS G. (2001) Neurotoxic shellfish poisoning: A review. RVIM Report. Bilthoven, Pays-Bas, National Institute for Public Health and the Environment
- VAN DEVENTER M., ATWOOD K., VARGO G.A., *et al.* (2012) *Karenia brevis* red tides and brevetoxin-contaminated fish: a high risk factor for Florida's scavenging shorebirds? *Bot Mar* 55(1)
- VAN DOLAH F., DOUCETTE G., GULLAND F., ROWLES T., BOSSART G. (2002) Impacts of algal toxins on marine mammals. *In Toxicology of Marine Mammals*. London, United Kingdom, Taylor & Francis, pp 247-269
- VAN DOLAH F.M., LIDIE K.B., MONROE E.A., *et al.* (2009) The Florida red tide dinoflagellate *Karenia brevis*: New insights into cellular and molecular processes underlying bloom dynamics. *Harmful Algae* 8(4), 562-572
- VARGO G.A. (2009) A brief summary of the physiology and ecology of *Karenia brevis* Davis (G. Hansen and Moestrup comb. nov.) red tides on the West Florida Shelf and of hypotheses posed for their initiation, growth, maintenance, and termination. *Harmful Algae* 8(4), 573-584
- WALKER S.T. (1883) Fish mortality in the Gulf of Mexico. *In United States National Museum* 6, Washington D.C., pp 105-109
- WALKER L.M. (1982) Evidence for a Sexual Cycle in the Florida Red Tide Dinoflagellate, *Ptychodiscus brevis* (=Gymnodinium breve). *T Am Microsc Soc* 101(3), 287-293
- WALSH J.J., JOLLIFF J.K., DARROW B.P., *et al.* (2006) Red tides in the Gulf of Mexico: Where, when, and why? *J. Geophys. Res.* 111(7), 1-46
- WALSH J.J., WEISBERG R.H., LENES J.M., *et al.* (2009) Isotopic evidence for dead fish maintenance of Florida red tides, with implications for coastal fisheries over both source regions of the West Florida shelf and within downstream waters of the South Atlantic Bight. *Prog Oceanogr* 80(1), 51-73
- WALSH C., LEGGETT S., CARTER B., COLLE C. (2010) Effects of brevetoxin exposure on the immune system of loggerhead sea turtles. *Aquat Toxicol* 97, 293-303
- WALSH C.J., BUTAWAN M., YORDY J., *et al.* (2015) Sublethal red tide toxin exposure in free-ranging manatees (*Trichechus manatus*) affects the immune system through reduced lymphocyte proliferation responses, inflammation, and oxidative stress. *Aquat Toxicol* 161, 73-84
- WANG Q., FANG J., CAO D., *et al.* (2015) An improved functional assay for rapid detection of marine toxins, saxitoxin and brevetoxin using a portable cardiomyocyte-based potential biosensor. *Biosens Bioelectron* 72, 10-17
- WANG Z., RAMSDELL J.S. (2011) Analysis of Interactions of Brevetoxin-B and Human Serum Albumin by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.* 24(1), 54-64
- WEISBERG R.H., LI Z., MULLER-KARGER F. (2001) West Florida shelf response to local wind forcing: April 1998. *J Geophys Res-Oceans* 106(C12), 31239-31262
- WHITE C.L., IP H.S., METEYER C.U., *et al.* (2015) Spatial and temporal patterns of avian paramyxovirus-1 outbreaks in double-crested cormorants (*Phalacrocorax auritus*) in the USA. *J. Wildlife Dis.* 51(1), 101-112
- WOOFTER R.T., SPIESS P.C., RAMSDELL J.S. (2005) Distribution of Brevetoxin (PbTx-3) in Mouse Plasma: Association with High-Density Lipoproteins. *Environ Health Persp* 113(11), 1491-1496

- WORK T.M., BARR B., BEALE A.M., *et al.* (1993) Epidemiology of Domoic Acid Poisoning in Brown Pelicans (*Pelecanus occidentalis*) and Brandt's Cormorants (*Phalacrocorax penicillatus*) in California. *J. Zoo Wildlife Med.* 24(1), 54-62
- WRMD (2020) Analytics - Prevalent patients. *In Wildlife Rehabilitation MD, Clinic for the Rehabilitation Of Wildlife.* [<https://www.wrmd.org/analytics#/patients/prevalent-patients>] (consulté le 21/08/2020).
- YAMAGUCHI M., ITAKURA S. (1999) Nutrition and growth kinetics in nitrogen- or phosphorus-limited cultures of the noxious red tide dinoflagellate *Gymnodinium mikimotoi*. *Fisheries Sci* 65, 367-373
- YASUMOTO T., UNDERDAL B., AUNE T., *et al.* (1990) Screening for hemolytic and ichthyotoxic components of *Chrysochromulina polylepis* and *Gyrodinium aureolum* from Norwegian coastal waters. *In Toxic Marine Phytoplankton. In Fourth International Conference on Toxic Marine Phytoplankton*, Lund, Sweden, June 26-30, Elsevier, pp 436-440
- YENTSCH C.S., LAPOINTE B.E., POULTON N., PHINNEY D.A. (2008) Anatomy of a red tide bloom off the southwest coast of Florida. *Harmful Algae* 7(6), 817-826
- ZAIAS J., FLEMING L.E., BADEN D.G., ABRAHAM W.M. (2011) Repeated exposure to aerosolized brevetoxin-3 induces prolonged airway hyperresponsiveness and lung inflammation in sheep. *Inhal Toxicol* 23(4), 205-211
- ZHANG F., XU X., LI T., LIU Z. (2013) Shellfish toxins targeting voltage-gated sodium channels. *Mar Drugs* 11(12), 4698-4723
- ZINGONE A., SIANO R., D'ALELIO D., SARNO D. (2006) Potentially toxic and harmful microalgae from coastal waters of the Campania region (Tyrrhenian Sea, Mediterranean Sea). *Harmful Algae* 5(3), 321-337

Annexe 1 : Causes d'admission des patients à CROW en 2019 (Barron *et al.*, 2020)

Cause d'admission à CROW en 2019	Pourcentage d'animaux concernés
Trauma d'origine inconnue	13,7 %
Jeune tombé du nid	11,4 %
Brévétotoxicose	11,3 %
Destruction d'habitat	9,3 %
Percuté par un véhicule (voiture, vélo, etc.)	9,2 %
Inconnue	9,1 %
Orphelin	8,7 %
Espèce envahissante	8,0 %
Attaque par un chien/chat	6,5 %
Maladie infectieuse	3,3 %
Événements naturels divers	2,3 %
Événements divers liés à l'activité humaine	2,1 %
Attaque par un prédateur	2,0 %
Hameçon/ligne de pêche	2,0 %
Attaque humaine intentionnelle	0,4 %
Percuté par un bateau	0,2 %
Électrocution	0,2 %
Intoxication par un pesticide/rodenticide	0,16 %
Maladie de Carré	0,10 %

Annexe 2 : Fiche descriptive de Phalacrocorax auritus (Cornell Lab of Ornithology, 2014)

1. Caractéristiques physiques

Les cormorans à aigrettes sont des oiseaux aquatiques de grande taille, avec un corps trapu, un long cou et une queue de taille moyenne. Ils atteignent 70 à 90 cm de longueur, pour une envergure de 114 à 123 cm et un poids adulte de 1,2 à 2,5kg. Il n'y a pas de dimorphisme sexuel. Cette espèce est caractérisée par une évolution du plumage permettant de distinguer les adultes (figure 18) des jeunes (figure 19) :

- Les adultes ont un plumage et un bec sombre ; leur peau est orange à la base du bec. Les aigrettes, petites touffes blanches ou noires, sont présentes au-dessus des yeux uniquement lors de la période de reproduction.

Figure 18 : Photographies de cormorans à aigrettes adultes (Cornell Lab of Ornithology, 2014)



- Les jeunes présentent un plumage plus gris ou brunâtre, avec des parties inférieures plus pâles que le dos. Leur bec est coloré, à la différence des adultes.

Figure 19 : Photographie d'un cormoran juvénile (Cornell Lab of Ornithology, 2014)

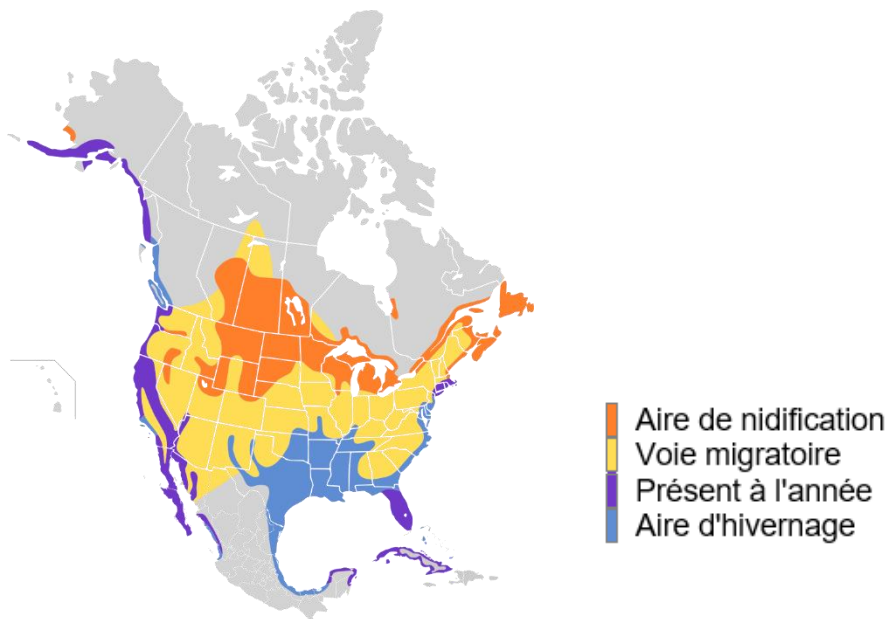


2. Éléments d'écologie

A. Répartition géographique

Le cormoran à aigrettes est une espèce commune et répandue en Amérique du Nord, du sud de l'Alaska jusqu'à la Floride et même au Mexique. La figure 20 présente les aires de nidification et d'hivernage de ces oiseaux, ainsi que les zones où ils sont présents toute l'année.

Figure 20 : Aires de répartition du cormoran à aigrettes en Amérique du Nord (Cornell Lab of Ornithology, 2014)



B. Habitat

Les cormorans sont des oiseaux aquatiques majoritairement piscivores, qui recherchent leur nourriture sur de grandes étendues d'eau. Cependant, ils peuvent se percher et former des colonies de reproduction sur des lagunes ou étangs plus petits, puis parcourir jusqu'à 65 km pour atteindre une zone d'alimentation.

Les cormorans passent une grande partie du temps perché à se reposer après la pêche, sur des rochers, cimes d'arbres, mâts de bateau, etc. Ils ont tendance à former des colonies de reproduction dans des arbres voisins dans ou à proximité de l'eau. Après un certain temps, l'accumulation de guano peut tuer les arbres et les faire basculer ; les cormorans entreprennent alors la nidification sur le sol.

C. Alimentation

Leur régime alimentaire se compose presque entièrement de poissons, ainsi que de faibles quantités d'insectes, crustacés ou amphibiens. Ils mangent une grande variété de poissons (plus de 250 espèces rapportées).

Leur technique de pêche consiste à plonger et chasser les poissons sous l'eau avec une puissante propulsion grâce à leurs pattes palmées. La pointe du bec, en forme de crochet, leur

permet d'attraper les proies, qu'ils avalent sous l'eau lorsqu'elles sont de petite taille. Ils se nourrissent généralement dans les eaux de surface (<8 m de profondeur), à moins de 5 km du rivage.

D. Reproduction et longévité

Les cormorans sont monogames et forment des colonies pouvant rassembler jusqu'à 3000 couples. Les mâles choisissent un site puis effectuent une parade nuptiale pour attirer les femelles. La période de reproduction s'étend d'avril à août, avec un pic de mai à juillet. Les nids peuvent être au sol, sur des rochers ou des récifs sans végétation, ou au sommet d'arbres, qui peuvent être vivants lorsqu'une colonie de cormorans se forme pour la première fois, mais meurent généralement après quelques années après l'accumulation de leurs déjections (guano). Les nids sont d'abord construits au centre de la colonie, puis se développent vers la périphérie de celle-ci.

La reproduction a lieu une fois par an, à partir de l'âge de 2 ans. Les couvées contiennent en moyenne 2 à 7 œufs, qui éclosent après 25 à 28 jours d'incubation. L'oisillon est nu, a les yeux fermés et ne se déplace pas à la naissance. Il commence à quitter le nid vers 3 à 4 semaines, vole à 6 semaines et sera complètement indépendant à l'âge de 10 semaines.

Les cormorans vivent en moyenne 6 ans, le plus vieil individu connu ayant atteint 17 ans et 9 mois.

E. Comportement

Les cormorans sont des oiseaux très grégaires, qui vivent en groupe de taille variable aussi bien en période de reproduction que l'hiver, toujours à proximité de l'eau. Ils migrent également en groupe.

Ils se nourrissent pendant la journée, en plongeant, puis recherchent un endroit surélevé pour se percher, les ailes déployées, probablement afin de faire sécher superficiellement leurs plumes. La glande uropygienne des cormorans produit moins de sécrétions imperméabilisantes que chez d'autres oiseaux, comme les anatidés chez qui elle permet une étanchéité du plumage. Bien que cela semble être un handicap, cela est considéré comme une adaptation qui permet aux cormorans de chasser sous l'eau plus efficacement.

Annexe 3 : Évolution spatio-temporelle des marées rouges survenues entre 2015 et 2019

Figure 21 : Représentation cartographique de la marée rouge survenue entre décembre 2015 et février 2016 et des cas de brévétotoxicose chez les cormorans admis à CROW durant cette période (RStudio - 1.3.1056, 2020 ; Google Maps, 2020)

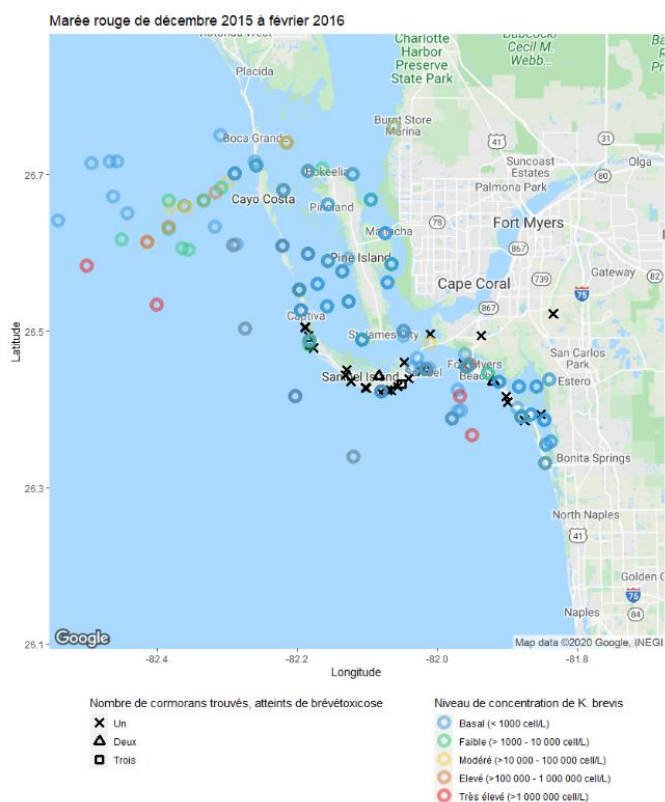


Figure 22 : Cartes complémentaires de la marée rouge survenue entre novembre 2017 et novembre 2018 (RStudio - 1.3.1056, 2020 ; Google Maps, 2020)

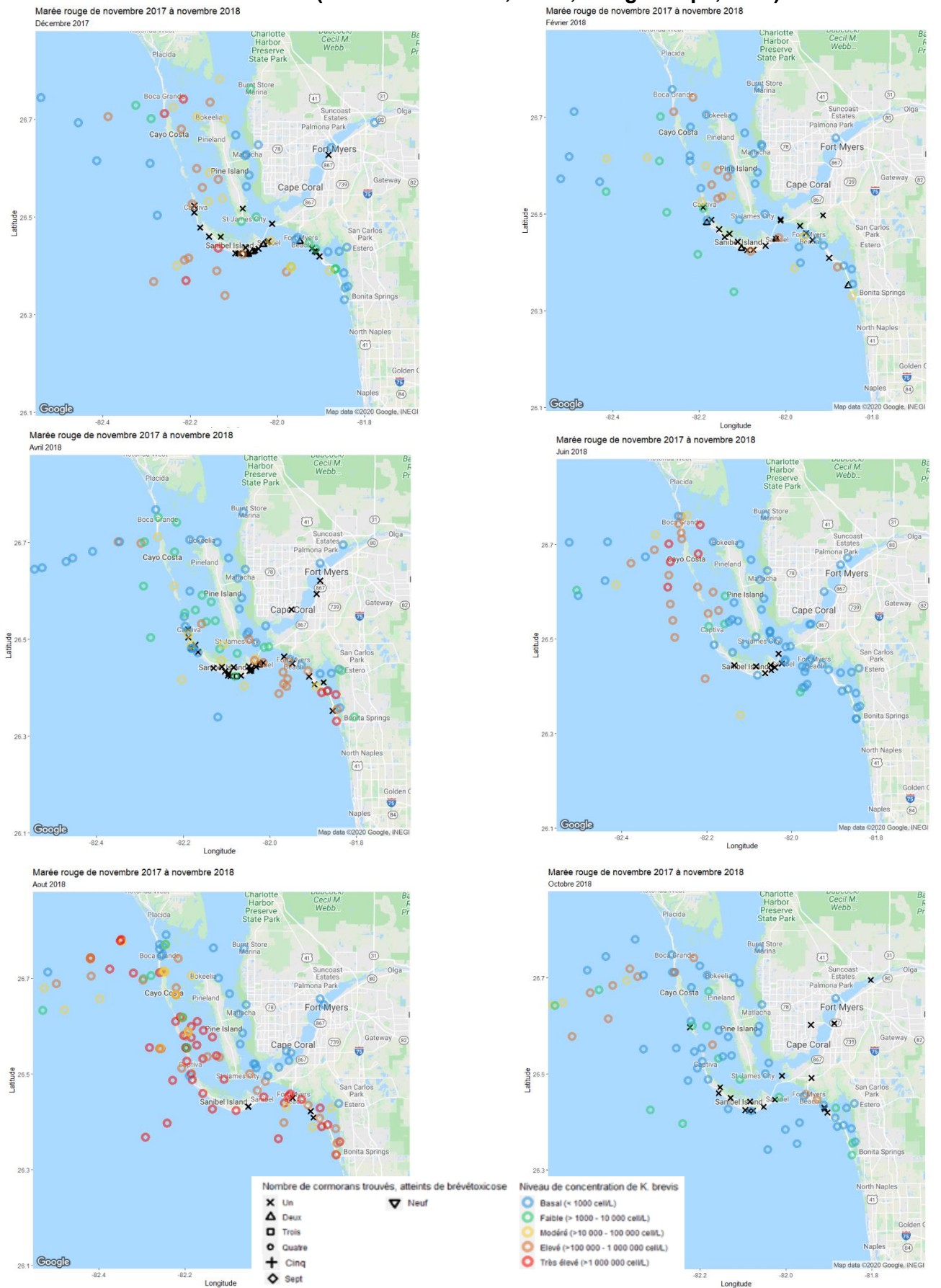


Figure 23 : Représentation cartographique de la marée rouge survenue entre octobre 2016 et février 2017 et des cas de brévétoxicose chez les cormorans admis à CROW durant cette période (RStudio - 1.3.1056, 2020 ; Google Maps, 2020)

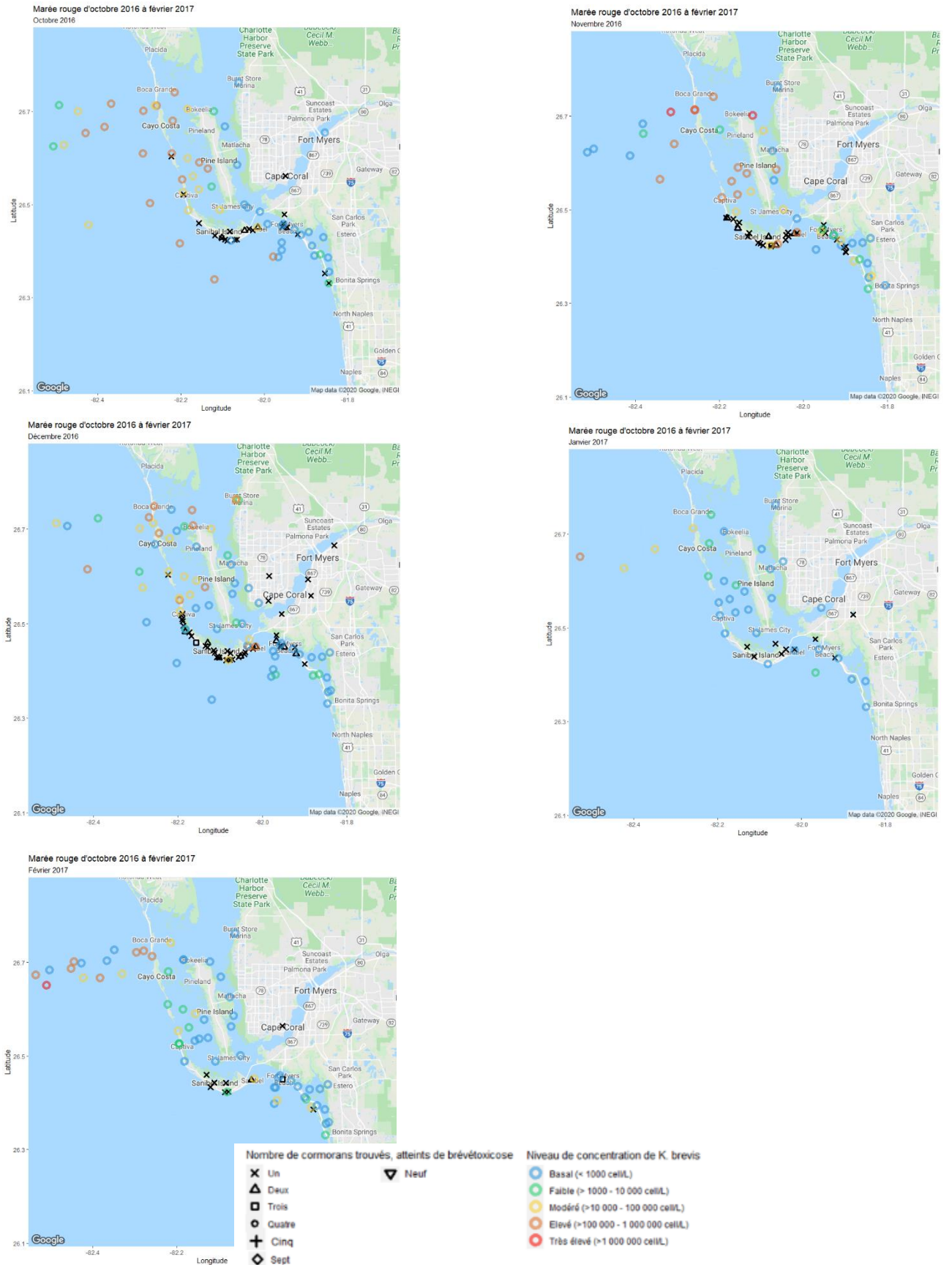
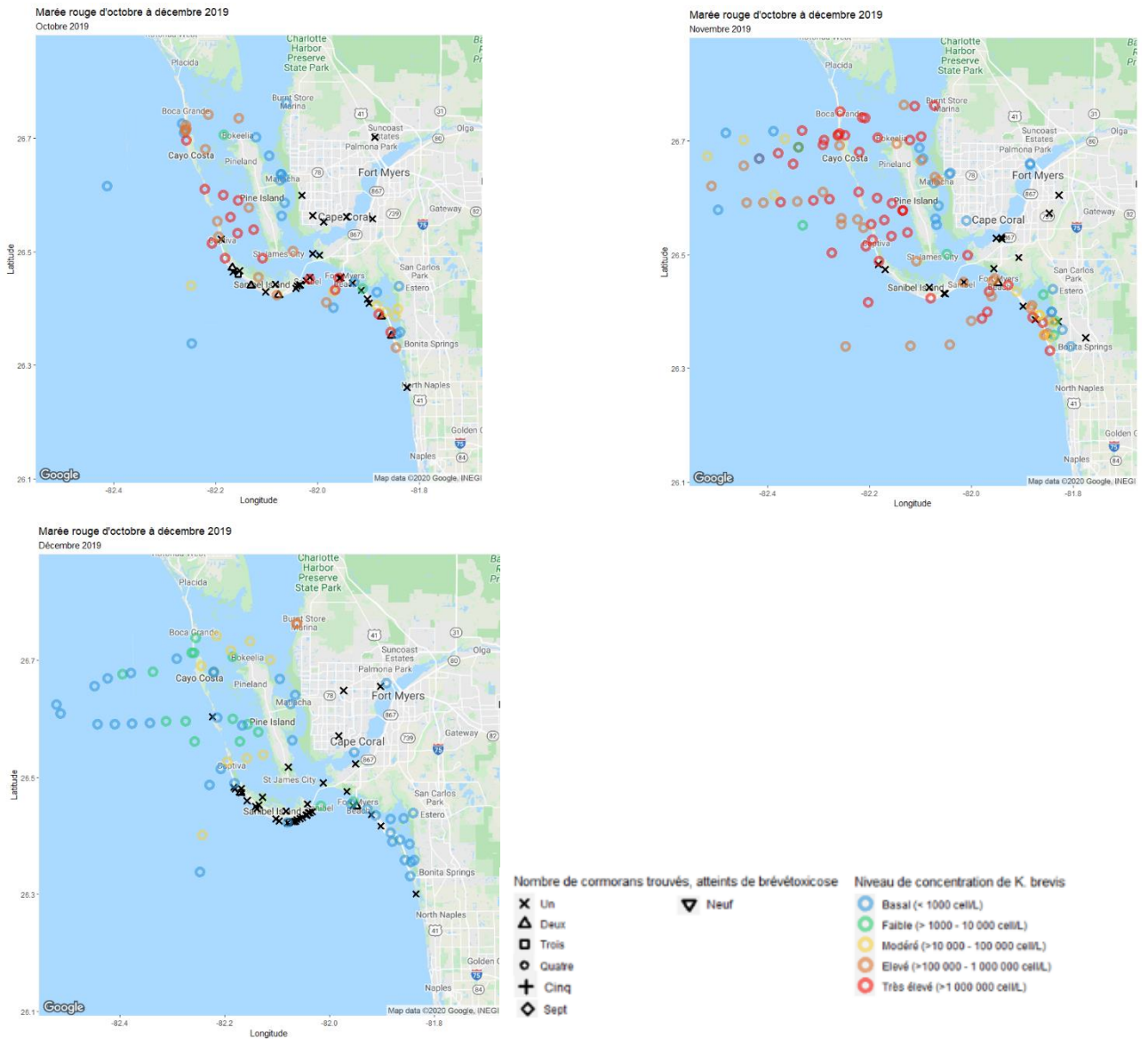


Figure 24 : Représentation cartographique de la marée rouge survenue entre octobre et décembre 2019 et des cas de brévétoxicose chez les cormorans admis à CROW durant cette période (RStudio - 1.3.1056, 2020 ; Google Maps, 2020)



Annexe 4 : Tableau de l'évolution de l'index algal et du nombre de cormorans admis pour brévétotoxicose à la CROW entre 2015 et 2019

Semaine	Index algal	Nombre de cormorans admis	Semaine	Index algal	Nombre de cormorans
1-janv.-15	0	9	27-août-15	0	1
8-janv.-15	0	9	3-sept.-15	0	1
15-janv.-15	0	5	10-sept.-15	0	0
22-janv.-15	0	3	17-sept.-15	0	0
29-janv.-15	0	7	24-sept.-15	1,53529412	0
5-févr.-15	0	4	1-oct.-15	2,22448597	0
12-févr.-15	0	0	8-oct.-15	2,04964866	0
19-févr.-15	0	1	15-oct.-15	3,95428594	1
26-févr.-15	0	2	22-oct.-15	3,69594112	0
5-mars-15	0	4	29-oct.-15	3,14189051	0
12-mars-15	0	6	5-nov.-15	3,25193009	4
19-mars-15	0	4	12-nov.-15	4,00786799	3
26-mars-15	0	6	19-nov.-15	3,88967316	27
2-avr.-15	0	5	26-nov.-15	2,76879115	16
9-avr.-15	0	1	3-déc.-15	2,67416404	6
16-avr.-15	0	0	10-déc.-15	4,48920013	13
23-avr.-15	0	2	17-déc.-15	2,97043986	6
30-avr.-15	0	0	24-déc.-15	3,04959012	4
7-mai-15	0	0	31-déc.-15	1,47712125	4
14-mai-15	0	0	7-janv.-16	4,00722486	5
21-mai-15	0	0	14-janv.-16	4,58594129	1
28-mai-15	0	0	21-janv.-16	5,42766697	1
4-juin-15	0	0	28-janv.-16	5,83745229	0
11-juin-15	0	0	4-févr.-16	4,00899916	1
18-juin-15	1,75204845	1	11-févr.-16	2,58704414	0
25-juin-15	0	0	18-févr.-16	0,98959031	2
2-juil.-15	0	0	25-févr.-16	0	5
9-juil.-15	0	0	3-mars-16	1,60460718	5
16-juil.-15	0	0	10-mars-16	0	2
23-juil.-15	0	0	17-mars-16	2,16676303	2
30-juil.-15	1,33870544	0	24-mars-16	4,47228295	4
6-août-15	0	0	31-mars-16	3,90743184	8
13-août-15	0	0	7-avr.-16	1,45926681	13

1-avr.-16	2,48834923	3	2-mars-17	2,99435382	2
28-avr.-16	0	1	9-mars-17	3,4865868	2
5-mai-16	1,85990992	2	16-mars-17	3,98080301	1
12-mai-16	0	0	23-mars-17	4,17672234	1
19-mai-16	0	1	30-mars-17	4,05519431	3
26-mai-16	0	1	6-avr.-17	2,5540996	2
2-juin-16	0	0	13-avr.-17	2,6259174	1
9-juin-16	0	1	20-avr.-17	1,42513275	0
16-juin-16	0	0	27-avr.-17	0	0
23-juin-16	0	0	4-mai-17	1,53571597	0
30-juin-16	0	0	11-mai-17	0	0
7-juil.-16	0	0	18-mai-17	0	0
14-juil.-16	0	1	25-mai-17	1,06973969	0
21-juil.-16	0	1	1-juin-17	0	1
28-juil.-16	0	1	8-juin-17	0	0
4-août-16	0	1	15-juin-17	1,26778906	0
11-août-16	0	0	22-juin-17	0	0
18-août-16	0	1	29-juin-17	0	1
25-août-16	2,12807601	0	6-juil.-17	1,09631057	0
1-sept.-16	1,1401211	0	13-juil.-17	0	0
8-sept.-16	1,39420144	0	20-juil.-17	0	0
15-sept.-16	3,21112054	0	27-juil.-17	1,1401211	0
22-sept.-16	4,46999982	1	3-août-17	0	1
29-sept.-16	4,46277546	1	10-août-17	0	0
6-oct.-16	4,11389045	3	17-août-17	0	0
13-oct.-16	4,70171441	9	24-août-17	0	1
20-oct.-16	5,13255311	13	31-août-17	0	0
27-oct.-16	4,95771893	11	7-sept.-17	0	0
3-nov.-16	3,69960168	21	14-sept.-17	0	0
10-nov.-16	5,25573771	6	21-sept.-17	1,16177256	1
17-nov.-16	5,46257476	8	28-sept.-17	1,42513275	0
24-nov.-16	4,72594122	5	5-oct.-17	1,20780567	0
1-déc.-16	4,92117059	11	12-oct.-17	0	3
8-déc.-16	4,56621817	18	19-oct.-17	0	10
15-déc.-16	3,4469982	20	26-oct.-17	0	7
22-déc.-16	3,09503516	17	2-nov.-17	0	9
29-déc.-16	2,98995806	5	9-nov.-17	5,04851283	1
5-janv.-17	2,24912639	4	16-nov.-17	4,82809811	9
12-janv.-17	4,16165796	1	23-nov.-17	5,07218562	11
19-janv.-17	3,23525644	2	30-nov.-17	5,21770148	18
26-janv.-17	3,87116846	3	7-déc.-17	4,6823484	4
2-févr.-17	5,53881546	3	14-déc.-17	4,92908299	6
9-févr.-17	4,081466	5	21-déc.-17	5,37329977	7
16-févr.-17	3,84401613	4	28-déc.-17	3,48679873	7
23-févr.-17	3,2613881	4	4-janv.-18	5,12477057	1

11-janv.-18	3,54932518	2	22-nov.-18	5,13847611	3
18-janv.-18	4,22388402	0	29-nov.-18	4,18500862	2
25-janv.-18	1,42513275	0	6-déc.-18	3,03212405	2
1-févr.-18	3,05615922	2	13-déc.-18	2,71276446	0
8-févr.-18	3,38951005	7	20-déc.-18	0	0
15-févr.-18	4,61183712	9	27-déc.-18	3,24868295	1
22-févr.-18	5,19020814	8	3-janv.-19	1,26778906	2
1-mars-18	4,79062663	9	10-janv.-19	3,56438986	4
8-mars-18	4,72140525	24	17-janv.-19	3,13762187	1
15-mars-18	5,21322329	10	24-janv.-19	3,14703946	0
22-mars-18	4,57629847	15	31-janv.-19	0,92427929	0
29-mars-18	4,27780715	15	7-févr.-19	0	0
5-avr.-18	4,33603457	10	14-févr.-19	0	0
12-avr.-18	4,83682616	7	21-févr.-19	0	0
19-avr.-18	5,2638564	12	28-févr.-19	1,12041341	0
26-avr.-18	5,15441872	3	7-mars-19	0	0
3-mai-18	4,7601173	1	14-mars-19	0	0
10-mai-18	3,76365725	2	21-mars-19	0	0
17-mai-18	4,10146966	7	28-mars-19	0	1
24-mai-18	3,00838723	4	4-avr.-19	0	0
31-mai-18	3,90664775	7	11-avr.-19	0	1
7-juin-18	4,28619623	3	18-avr.-19	0	0
14-juin-18	4,20641112	1	25-avr.-19	1,01072387	1
21-juin-18	5,16082501	1	2-mai-19	1,3265841	0
28-juin-18	5,45660532	0	9-mai-19	1,40999571	0
5-juil.-18	3,55348583	0	16-mai-19	0	0
12-juil.-18	5,04185664	0	23-mai-19	1,58020668	0
19-juil.-18	5,64803329	1	30-mai-19	0,94171939	0
26-juil.-18	6,21298551	3	6-juin-19	0	1
2-août-18	6,21514718	0	13-juin-19	0	0
9-août-18	5,93945703	1	20-juin-19	0	0
16-août-18	5,82401721	3	27-juin-19	0	0
23-août-18	6,00420436	1	4-juil.-19	1,26778906	0
30-août-18	5,7840969	0	11-juil.-19	0	0
6-sept.-18	5,35305431	8	18-juil.-19	0	0
13-sept.-18	5,9429439	4	25-juil.-19	0	0
20-sept.-18	6,04986788	3	1-août-19	0	0
27-sept.-18	5,36247254	2	8-août-19	0	0
4-oct.-18	1,68701908	4	15-août-19	0	0
11-oct.-18	3,68057571	6	22-août-19	1,27547589	0
18-oct.-18	4,81842684	2	29-août-19	1,96335847	0
25-oct.-18	4,65186605	7	5-sept.-19	2,90216466	1
1-nov.-18	6,25283714	4	12-sept.-19	0	0
8-nov.-18	5,87282636	4	19-sept.-19	3,10424712	0
15-nov.-18	6,31536684	7	26-sept.-19	3,63372809	0

3-oct.-19	4,61281464	3	21-nov.-19	5,93428908	1
10-oct.-19	4,87277162	7	28-nov.-19	4,3250442	5
17-oct.-19	5,63807084	17	5-déc.-19	4,16815483	11
24-oct.-19	6,14260913	16	12-déc.-19	2,88055735	19
31-oct.-19	6,36690968	6	19-déc.-19	0	6
7-nov.-19	6,49874164	8	26-déc.-19	2,10037055	7
14-nov.-19	6,56915063	7			

IMPACTS SUR LA FAUNE SAUVAGE DE LA PROLIFÉRATION DE L'ALGUE *KARENIA BREVIS* DANS LE GOLFE DU MEXIQUE ENTRE 2015 ET 2019. ÉTUDE DE CAS À PARTIR DES DONNÉES COLLECTÉES DANS LE CENTRE DE SOINS CLINIC FOR THE REHABILITATION OF WILDLIFE À SANIBEL ISLAND (FL, ÉTATS-UNIS)

Auteur : Mathilde VILCOT

RÉSUMÉ :

Des « marées rouges », liées à la prolifération de l'algue dinoflagellé *Karenia brevis*, se produisent annuellement au sud-ouest de la Floride. *K. brevis* produit plusieurs neurotoxines, appelées brevéttoxines. L'exposition de la faune sauvage à ces toxines par ingestion ou inhalation cause des signes cliniques aigus ou chroniques pouvant conduire à la mort des animaux. L'effet des brevéttoxines sur les oiseaux piscivores est assez peu connu, bien que quelques études aient mis en évidence une augmentation de l'incidence des troubles neurologiques lors de marées rouges. Un nombre important de cormorans à aigrettes est présenté avec des troubles neurologiques à la Clinique pour la réhabilitation de la faune sauvage (CROW) de l'île de Sanibel (Floride). Nous avons mis en œuvre cette étude afin d'évaluer la prolifération de *Karenia brevis* et ses effets sur les cormorans, en développant trois axes majeurs : (1) réaliser une description clinique et épidémiologique de la brevéttoxicoïse chez les cormorans admis en centre de réhabilitation (2) étudier la répartition spatio-temporelle des marées rouges et des cormorans atteints, et (3) mettre en évidence une corrélation temporelle entre la prolifération de *K. brevis* et le nombre de cas de brevéttoxicoïse chez les cormorans. Au total, 860 cormorans admis à la CROW entre 2015 et 2019 ont été inclus dans cette étude rétrospective, et 6450 comptages cellulaires de *K. brevis* dans l'eau de mer. La brevéttoxicoïse s'exprimait par une ataxie cérébelleuse de sévérité variable (avec un état non ambulatoire chez 22,4 % des animaux), des tremblements de la tête (49,7 %), un réflexe palpébral altéré (14,5 %) et une bradycardie (11,5 %). Des signes digestifs ont aussi été observés, avec du méléna (30,5 %) et des régurgitations (16,9 %). Une anémie et une hypoprotéïnémie étaient présentes respectivement chez 16 % et 33,5 % des cormorans. Un dosage sérique de brevéttoxines par technique ELISA, réalisé chez 29 animaux, a révélé la présence de toxines chez 100 % des animaux testés, en concentration variant de 1,01 à 7,88 ng PbTx-3 eq/mL. L'analyse des comptages de *K. brevis* a révélé 4 efflorescences algales entre 2015 et 2019, d'une durée de 3 à 13 mois et d'intensité très variable. Enfin, nous avons confirmé l'hypothèse d'une corrélation positive significative entre la concentration algale et le nombre de cormorans présentant des signes de brevéttoxicoïse, admis en centre de réhabilitation simultanément ou jusqu'à 11 semaines plus tard. Cette corrélation était maximale pour un décalage de 2 semaines ($r=0,46$; $p<0,01$), suggérant un délai lié à la transmission des brevéttoxines par la chaîne trophique (consommation de poissons ou mollusques contaminés). La systématisation des dosages de brevéttoxines à l'admission des cormorans et la détermination de la concentration toxique chez cette espèce seront nécessaires afin de compléter la caractérisation de cette affection, de mieux comprendre les voies d'exposition des cormorans et l'impact de la prolifération de *K. brevis* à l'échelle des populations d'oiseaux.

MOTS CLÉS : ALGUE / KARENIA BREVIS / TOXICITÉ / EFFLORESCENCE / CORMORAN / PHALACROCORAX AURITUS / BRÉVÉTOXICOÏSE / FAUNE MARITIME / CENTRE DE SOIN / FLORIDE

JURY :

Président : Pr Alexandre De La Taille

1^{er} Assesseur : Dr Pascal Arné

2nd Assesseur : Pr Renaud Tissier

IMPACTS OF KARENIA BREVIS ALGAL BLOOMS ON WILDLIFE IN THE GULF OF MEXICO BETWEEN 2015 AND 2019. CASE STUDY FROM DATA COLLECTED AT THE CLINIC FOR THE REHABILITATION OF WILDLIFE, ON SANIBEL ISLAND (FL, UNITED STATES)

Author: Mathilde VILCOT

SUMMARY:

« Red Tides » due to the dinoflagellate *Karenia brevis* algal blooms occur annually in South-West Florida. *K. brevis* produces several neurotoxins named brevetoxins. Wildlife exposure to these toxins, through ingestion or inhalation, causes acute or chronic symptoms that can lead to the animals' death. The brevetoxins' effect on piscivorous birds is poorly understood, although some studies showed an increase in neurological symptoms' occurrence during red tides. A large number of double-crested cormorants are admitted with neurologic signs to CROW, on Sanibel Island. We conducted this study to evaluate *Karenia brevis*'s proliferation and its effects on cormorants, by focusing on three major goals : (1) to give a clinical and epidemiological description of brevetoxicosis in cormorants admitted to rehabilitation centres (2) to study the spatiotemporal distribution of red tides and affected cormorants, and (3) to demonstrate a temporal correlation between *K. brevis* proliferation and the number of brevetoxicosis affected cormorants. In total, 860 cormorants admitted to CROW between 2015 and 2019 were included in this retrospective study, as well as 6450 cell counts of *K. brevis* in sea samples. Brevetoxicosis symptoms included cerebellar ataxia of varying severity (22,4 % of the cormorants were non-ambulatory), head tremors (49,7 %), impaired palpebral reflex (14,5 %) and bradycardia (11,5%). Gastrointestinal signs were also observed, with melena (30,5%) and regurgitation (16,9 %). Anemia and hypoproteinemia were present in 16 % and 33,5 % of cormorants, respectively. A serum assay of brevetoxins by ELISA technique, carried out in 29 animals, revealed the presence of toxins in 100% of the animals tested, in concentration varying from 1,01 to 7,88 ng PbTx-3 eq/mL. Analysis of the *K. brevis* counts revealed 4 algal blooms between 2015 and 2019, that lasted 3 to 13 months and showed a highly varying intensity. Finally, we confirmed the hypothesis of a significant positive correlation between algal abundance and the number of cormorants showing signs of brevetoxicosis, admitted to a rehabilitation centre simultaneously or up to 11 weeks later. This correlation was maximal for a 2-week lag ($r=0,46$; $p<0,01$), suggesting a delay related to the transmission of brevetoxins through the food chain (consumption of contaminated fish or shellfish). Systematic brevetoxin assays at cormorants' admittance and determination of the toxic dose for this species are necessary to complete the description of this disease and to better understand the exposure routes and the impact of algal blooms on a birds' population scale.

KEYWORDS : ALGAE / KARENIA BREVIS / TOXICITY / BLOOM / CORMORANT / PHALACROCORAX AURITUS / BREVETOXICOSIS / MARINE WILDLIFE / REHABILITATION CENTRE / FLORIDA

JURY:

Chairperson: Pr Alexandre De La Taille

1st Assessor: Dr Pascal Arné

2nd Assessor: Pr Renaud Tissier