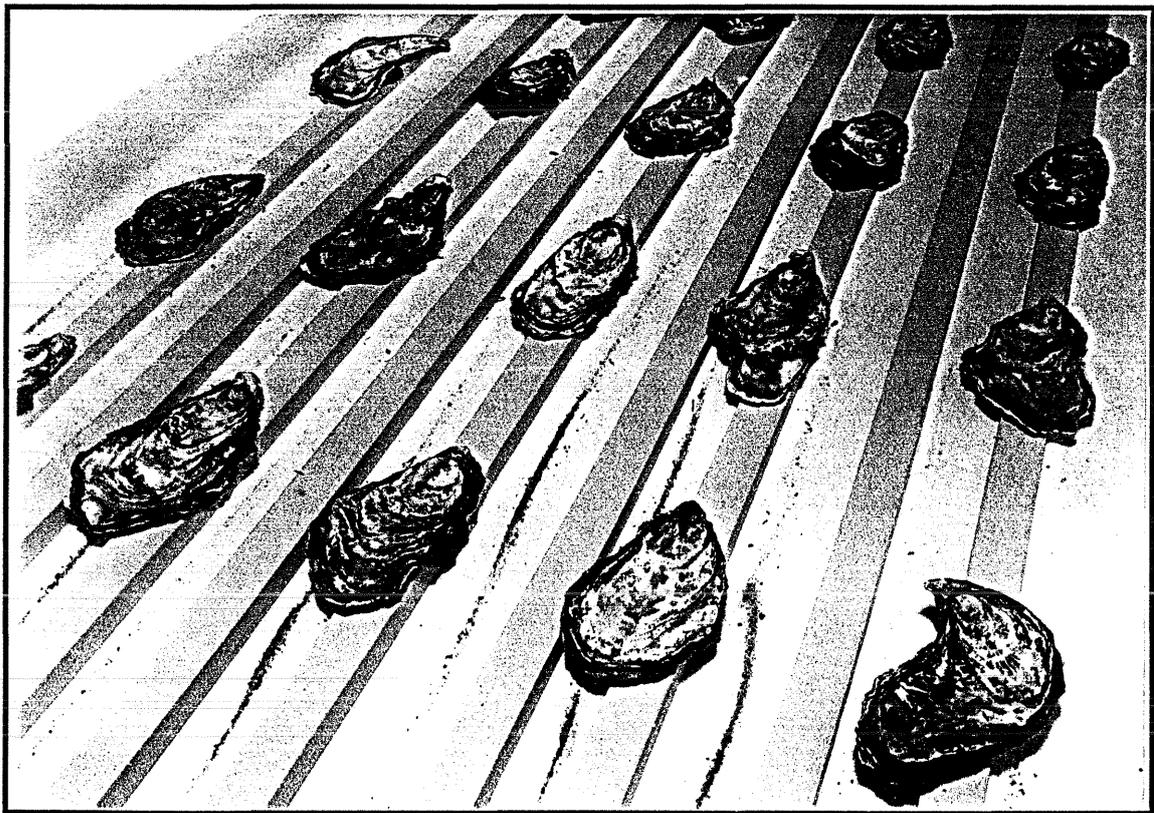


**DECONTAMINATION EXPERIMENTALE
DE BIVALVES TOXIQUES :
APPLICATION AUX PHYCOTOXINES PARALYSANTES**

RAPPORT FINAL

**Subvention n° 94 203 du Ministère de l'Environnement
(SRAE)**

P. Lassus, M. Bardouil, P. Masselin, M. Naviner et P. Truquet



FICHE DOCUMENTAIRE

Numéro d'identification du rapport : DEL/MP/RST/97/702 Diffusion : libre <input type="checkbox"/> restreinte <input checked="" type="checkbox"/> interdite <input type="checkbox"/> Validé par : Patrick LASSUS, Directeur Département MP Version du document : définitive		date de publication 23 juin 1997 nombre de pages 35 bibliographie : Oui illustrations : Oui langue du rapport français
Titre et sous-titre du rapport : <p align="center">Décontamination expérimentale de bivalves toxiques : Application aux phycotoxines paralysantes.</p> Titre traduit :		
Auteur(s) principal(aux) : nom, prénom <p align="center"><i>P. Lassus, M. Bardouil, P. Masselin, M. Naviner, P. Truquet</i></p>		Organisme / Direction / Service, laboratoire
Collaborateur(s) : nom, prénom		Organisme / Direction / Service, laboratoire
Travaux universitaires : diplôme : _____ discipline : _____ établissement de soutenance : _____ année de soutenance : _____		
Titre du contrat de recherche :		n° de contrat IFREMER Subvention n° 94 203
Organisme commanditaire : nom développé, sigle, adresse Ministère de l'Environnement (SRAE) Organisme(s) réalisateur(s) : nom(s) développé(s), sigle(s), adresse(s) IFREMER - Centre de Nantes DEL/MP BP 21105 44311 NANTES CEDEX 3 Responsable scientifique : <i>Patrick LASSUS</i>		
Cadre de la recherche : Programme : _____ Convention : _____ Projet : _____ Autres (préciser) : _____ Campagne océanographique : (nom de campagne, année, nom du navire)		

FICHE DOCUMENTAIRE

Résumé :

Un circuit fermé en eau de mer recirculante a été mis au point dans le cadre de l'étude. Il permet de mesurer les réponses physiologiques et écophysiologiques de 25 huîtres (*Crassostrea gigas*) nourries avec des cultures du dinoflagellé toxique *Alexandrium minutum* (producteur de phycotoxines paralysantes) puis détoxifiées avec des algues couramment utilisées en aquaculture (*I. galbana*, *T. suecica*, *S. costatum*, *T. weissflogii*). Le taux de chlorophylle est maintenu constant dans chaque cas et ajusté pour avoir la même valeur nutritive (0,5 mg/l de TPM). L'exposition à l'espèce faiblement toxique *A. minutum* (0,5 pg.éq.STX.cellule⁻¹) fait apparaître une efficacité de filtration, de consommation, et une activité valvaire réduites par rapport aux algues non-toxiques, mais peu différente de la souche témoin (dinoflagellé non-toxique) *Scropsiella trochoidea*. L'activité valvaire réduite en présence d'*A. minutum* (50 % de la population active) n'empêche pas une accumulation de toxine dans les tissus en 15 jours jusqu'à des max. de 300 µg.éq.STX/100 g⁻¹. L'épuration réalisée les 15 jours suivants amène rapidement (4 jours) les concentrations en toxines B (GTX₂/GTX₃) en dessous du seuil sanitaire de 80 µg.éq.STX.100 g⁻¹, quel que soit le régime utilisé, mais avec, apparemment, une meilleure efficacité avec *I. galbana*, espèce présentant des proportions plus élevées en lipides. On ne note pas de différence significative, quel que soit le régime, sur la composition biochimique des huîtres en fin d'épuration. Les variations individuelles importantes de contenu toxinique par huître ne peuvent être interprétées qu'en fonction de l'activité valvaire moyenne individuelle pendant la période de contamination.

Abstract :

A sea water recirculating flume was especially designed in the framework of this study. It improves physiological and ecophysiological evaluation of a 25 oysters (*C. gigas*) set fed on PSP toxic *A. minutum* cultures and then detoxified with commonly used aquaculture species (*I. galbana*, *T. suecica*, *S. costatum*, *T. weissflogii*). Chlorophyll a levels are kept steady in each case and adjusted in order to reach the same food value in each tank (0,5 mg/l TPM). When exposed to the mildly toxic species *A. minutum* (0,5 pg.eq.STX.cell⁻¹) oysters depict a reduced clearance rate, food uptake and shell-valves activity (compared to non-toxic algal diets). The same physiological parameters do not show any significant differences when oysters are exposed to the control algal diet, i.e the non-toxic dinoflagellate *S. trochoidea*. Decreased shell-valve activity with *A. minutum* (only 50 % oyster actively clearing) do not prevent toxin accumulation in oyster tissues within 15 days, up to max. level of 300 µg.eq.STX.100 g⁻¹. The following 15 d depuration period rapidly (4 days) makes B toxins levels falling down below the 80 µg.eq.STX.100 g⁻¹ sanitary threshold, whatever algal diet used, but with a higher depuration efficiency with *I. galbana*, which displays higher proportions of lipids. No significant difference in biochemical composition is observed in oysters at the end of depuration phase, whatever microalgal diet is considered.

Elevated individual variations of toxin content by oyster cannot be properly understood without considering the individual mean shell-valve activity during contamination period.

Mots-clés : Epuration, *Crassostrea gigas*, *Alexandrium minutum*, PSP, écophysiologie

Keywords : Depuration, *C. gigas*, *A. minutum*, PSP, ecophysiology

Commentaire :

**DECONTAMINATION EXPERIMENTALE DE BIVALVES TOXIQUES :
APPLICATION AUX PHYCOTOXINES PARALYSANTES**

P. Lassus, M. Bardouil, P. Masselin, M. Naviner et P. Truquet

1. INTRODUCTION	1
2. MATERIEL ET METHODES	3
2.1. Matériel biologique	3
2.2. Système expérimental	4
2.3. Paramètres écophysiologicals	5
2.4. Analyses biochimiques	6
2.5. Analyses des toxines	7
3. RESULTATS	9
3.1. Essais préliminaires	9
3.2. Expériences à long terme	10
3.2.1. Conditions générales	13
3.2.2. Paramètres écophysiologicals	16
3.2.3. Paramètres toxicologiques	24
3.2.4. Paramètres biochimiques	28
4. DISCUSSION ET CONCLUSIONS	30
5. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	33

λ λ
λ

DECONTAMINATION EXPERIMENTALE DE BIVALVES TOXIQUES : APPLICATION AUX PHYCOTOXINES PARALYSANTES

P. Lassus, M. Bardouil, P. Masselin, M. Naviner et P. Truquet

1. INTRODUCTION

Différents types de toxines peuvent être produits par les organismes marins. Sur le plan sanitaire et épidémiologique, les phycotoxines, poisons synthétisés par certaines microalgues, ont pris une importance croissante ces dix dernières années. En effet, bien que leurs effets sur l'homme par voie alimentaire (mollusques, crustacés et poissons) soient connus depuis l'antiquité, la détermination des espèces responsables remonte seulement aux années 1930 et l'intensification des réseaux de surveillance conchylicole dans les pays industrialisés a permis de répertorier un nombre croissant d'espèces toxiques et de toxines produites. Depuis dix ans, on assiste à une extension géographique et saisonnière régulière de ces phénomènes. Plusieurs pays européens contrôlent depuis 1975 la présence de dinoflagellés neurotoxiques ou diarrhéiques dans les eaux côtières et la France a dû également se pourvoir de tels systèmes de surveillance depuis les intoxications de 1983. Compte tenu de la complexité des études fondamentales et pluridisciplinaires (physiologie, écologie, taxonomie, océanographie côtière, etc.) nécessaires en amont des opérations de surveillance, il a fallu accroître le potentiel scientifique consacré à ces études.

En effet, depuis 1983 pour les phycotoxines diarrhéiques, et 1988 pour les phycotoxines paralysantes, les bivalves commerciaux des côtes françaises, principalement les moules, sont régulièrement contaminés par les microalgues produisant ces composés.

Dans la mesure où la prédiction des efflorescences toxiques à l'origine de la contamination reste encore très difficile à établir (les facteurs déclenchant dépendent souvent de la météorologie locale) une des actions alternatives les plus efficaces consiste à chercher à améliorer les conditions de désintoxication des mollusques.

En ce qui concerne le coquillage, de nombreux travaux tendent à montrer que les bivalves comestibles réagissent différemment à la présence de dinoflagellés toxiques dans leur régime alimentaire. Certains coquillages fouisseurs (*Mercenaria mercenaria*) peuvent rétracter leur siphon et fermer leurs valves en présence d'*Alexandrium* spp toxiques (Shumway, 1989).

D'autres, comme la moule ou la coquille Saint-Jacques, ont des réactions variables selon que l'on considère le taux de filtration seul ou un ensemble de paramètres caractéristiques de la physiologie alimentaire (Bricelj *et al.*, 1990 ; Shumway et Cucci, 1987). De plus, les concentrations relatives d'algues toxiques et non toxiques dans le flux de particules filtré par le coquillage sont un facteur important de modification de l'éthologie alimentaire.

Parmi les espèces les plus sensibles à l'ingestion d'*Alexandrium* spp toxiques, les huîtres sont souvent citées dans la littérature (Shumway *et al.*, 1990) et passent pour être capables d'opérer un tri sélectif dans leur nourriture (Shumway *et al.*, 1985 a, b).

C'est pour cette raison que nous avons choisi l'huître du Pacifique, *Crassostrea gigas*, comme modèle expérimental, afin de mesurer l'impact réel d'un régime toxique sur le comportement alimentaire, en particulier dans le cadre d'expositions prolongées à un régime toxique. Un prototype de circuit fermé permettant d'étudier conjointement l'écophysiologie des bivalves contaminés et les cinétiques d'épuration a été testé pour cette étude, avec deux souches de microalgues : *A. minutum* (toxique) et un autre dinoflagellé de même taille et de même valeur nutritive (*Scrippsiella trochoidea*) servant de témoin non toxique. Rappelons que le circuit fermé a l'avantage de réduire énormément les risques de contamination de l'environnement du laboratoire par des eaux résiduaires et qu'il permet d'augmenter sensiblement la durée de la phase de contamination en optimisant l'utilisation des cultures. Il permet, surtout, d'augmenter les flux de particules, d'ajuster les débits aux conditions optimales de filtration des coquillages expérimentés et enfin d'augmenter le nombre de bivalves pour travailler sur des populations aux effectifs significatifs.

La souche toxique d'*A. minutum* a été choisie préférentiellement du fait de proliférations épisodiques (Erard-Le Denn, 1991) sur les côtes françaises (Bretagne Nord et Méditerranée) et de sa responsabilité dans des épisodes toxiques dans les Abers, en baie de Morlaix, en estuaire de Rance et à Toulon. Sa répartition sur nos côtes est large et des concentrations maximales annuelles variant entre 200 et 18.10^6 cellules.l⁻¹ peuvent être rencontrées l'été aussi bien en Bretagne Nord que sur les côtes Atlantiques et la Méditerranée (données du REPHY).

Espèce peu toxique (seulement deux gonyautoxines prépondérantes) *A. minutum* n'entraîne pas d'inhibition alimentaire chez la moule (Lassus *et al.*, 1995) et peut donc être consommé apparemment sans rejet par le coquillage. Ses effets sur l'huître devaient être vérifiés, en particulier la détermination du seuil d'accoutumance du coquillages. Le rôle de la valeur nutritive de différents régimes alimentaires proposés en phase d'épuration (phytoflagellés et diatomées non toxiques) a également été considéré dans le cadre du développement possible d'unités-pilotes d'épuration biologique et également pour mieux comprendre le processus d'élimination des toxines en fonction de l'activité de filtration et de la valeur nutritive du régime non toxique.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Matériel biologique

Les huîtres (huître creuse japonaise : *Crassostrea gigas* Thunberg), proviennent d'un élevage ostréicole de la Baie de Bourgneuf (Vendée), zone où aucun épisode d'efflorescences algales toxiques dû au genre *Alexandrium* n'a été répertorié à ce jour. Les huîtres, sélectionnées selon leur taille, présentent un poids total moyen de $51,2 \pm 3,9$ g (octobre 1996) et de $51,3 \pm 5,1$ g (mars 1997).

Avant leur transfert dans les raceways expérimentaux, les huîtres sont acclimatées pendant une période de 5 à 6 jours dans des bacs de 35 litres (20 individus par bac), alimentés en eau de mer naturelle⁽¹⁾ à 16°C et sous une photopériode de 12 h J/ 12 h N. L'eau est renouvelée tous les jours et aérée en permanence pour assurer l'oxygénation du milieu. Pendant cette période, les huîtres sont nourries avec la microalgue *Scropsiella trochoidea*, Dinoflagellé non toxique.

Les différentes algues utilisées - *Alexandrium minutum* Halim (AM89BM, isolée en Baie de Morlaix en 1989) pour la contamination et *Tetraselmis suecica* Kysin, *Isochrysis galbana* T-iso, *Thalassiosira weissflogii* (CCAP1085-1), *Skeletonema costatum* Cleve pour la décontamination ainsi que *Scropsiella trochoidea* Paulsen (CCAP11134-1) - sont toutes cultivées au laboratoire. Les cultures sont réalisées en flacons Pyrex de 10 litres avec de l'eau de mer naturelle (8 litres) filtrée sur membrane Millipore (porosité 0,22 µm) et enrichie avec une solution nutritive (2 ml/l) pour obtenir le milieu ES décrit par Provasoli (1966). Les milieux de culture ainsi constitués sont stérilisés à 120°C pendant 15 minutes. Un apport de silice est effectué uniquement pour la culture des Diatomées. La salinité est de 36 ‰, la température est maintenue à 16°C et l'éclairage fournit une intensité de 2500 ± 200 lx (50 ± 4 µE. m⁻². s⁻¹), avec une photopériode J/N de 12 h/ 12 h.

Les différentes souches utilisées lors des expériences ont été introduites dans le circuit en fin de phase exponentielle, c'est-à-dire pour des nombres de jours de culture et des concentrations cellulaires variables (tabl. 1).

Espèce	inoculum (nombre de cell./ ml)	nombre de jours de culture	nombre final de cellules/ ml
<i>Alexandrium minutum</i>	1 500-2 000	15	35 000 - 45 000
<i>Scropsiella trochoidea</i>	2 000	21	30 000
<i>Skeletonema costatum</i>	100 000-150 000	6	1 - 1,5 million
<i>Thalassiosira weissflogii</i>	25 000	10	350 000 - 400 000
<i>Tetraselmis suecica</i>	50 000	18	1 million
<i>Isochrysis galbana</i>	240 000	18	6 millions

Tableau 1 : Rendement de culture des algues

La souche d'*Alexandrium minutum* utilisée présente une toxicité de 0,5 pg éq. STX par cellule, estimée par analyse en CLHP-AI selon la méthode décrite par Oshima *et al.*, 1989 et détaillée plus loin.

⁽¹⁾ Les besoins en eau de mer du centre sont assurés par un stockage en citerne d'eau de mer prélevée au Croisic (Loire-Atlantique).

2.2. Système expérimental

Pour chaque régime microalgal testé, le circuit fermé (fig. 1) comprend un raceway de 100 litres, alimenté en eau de mer naturelle (pH 8,00 - 8,09 ; salinité 36 ‰). Le débit est de 750 à 800 l/h et l'oxygénation de l'eau est assurée par rupture de la colonne d'eau en sortie de bac. La température de l'eau fixée à 16°C est contrôlée par une sonde thermique et régulée par une résistance chauffante placée dans le bac (30 litres) disposé en sortie de raceway.

L'apport en microalgues est réalisé, au niveau de la chute d'eau, à partir des ballons de culture (10 litres), à l'aide d'une micropompe péristaltique (Ismatec) dont le débit est en permanence ajusté selon les consignes imposées par l'expérimentateur. Un spectrofluorimètre Turner permet en effet de mesurer et d'intégrer en continu au niveau du bac intermédiaire la biomasse phytoplanctonique active par détection en fluorescence de la chlorophylle a. L'étalonnage est réalisé soit avec de la chlorophylle a purifiée, soit avec un équivalent (coproporphyrine), la régulation du débit des micropompes (MP) s'effectue grâce à une carte d'acquisition et de commande (interface ADClone) en fonction d'un seuil imposé de chlorophylle (consigne).

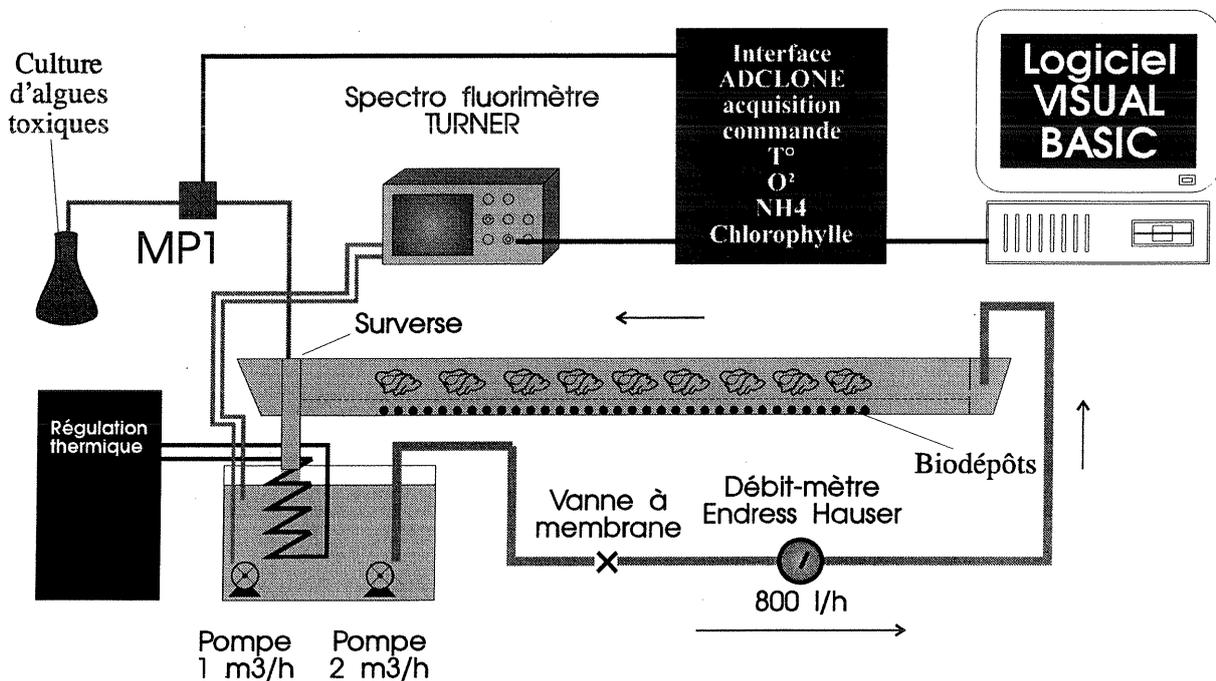


Figure 1 : Diagramme simplifié d'un module expérimental en circuit fermé montrant le bac principal de 100 l (raceway), le bac intermédiaire de 30 l thermorégulé et alimenté en culture (MP1 = micropompe ISMATEC) et le système de régulation de l'apport en chlorophylle a.

Les huîtres sont débarrassées de leurs épibiontes (afin de supprimer un facteur de filtration non négligeable), puis disposées par 9 sur 5 lignes équidistantes (soit 45 huîtres par raceway), l'ouverture de la coquille étant dirigée vers l'arrivée d'eau de telle sorte que les pseudo-fécès éjectés par la région ventrale se trouvent

séparés des fécès éjectés par la région dorsale. Elles sont fixées à l'aide d'un mastic (Futex) sur des tiges de PVC permettant de les surélever légèrement par rapport au fond du bassin.

La contamination des huîtres est prévue sur une période de 14 jours avec un apport permanent et constant d'*Alexandrium minutum*. La décontamination s'effectue également sur une quinzaine de jours en alimentant les huîtres par un régime monospécifique d'algues "fourrages", c'est-à-dire du type de celles utilisées en aquaculture extensive. Les espèces utilisées sont deux Diatomées (*Skeletonema costatum* et *Thalassiosira weissflogii*), une Prymnesiophycée (*Isochrysis galbana*) et une Prasinophycée (*Tetraselmis suecica*) et sont distribuées en phase de croissance exponentielle.

2.3. Paramètres écophysologiques

Le taux de microalgues présentes dans l'eau doit être maintenu constant au cours du temps afin de garantir un apport nutritif (estimé par la teneur en matière particulaire totale ou TPM) équivalent pour chaque régime testé, de l'ordre de 0,5 mg/l. Ce taux, calculé pour chaque espèce d'algue utilisée, est établi à partir d'une équivalence de la quantité d'*Alexandrium minutum* nécessaire pour obtenir un taux de contamination des coquillages supérieur au seuil de salubrité au bout de 15 jours. Ainsi, les concentrations dans le bassin devront être de 120 cellules par ml pour *Alexandrium minutum*, de 1 900 cellules par ml pour *Skeletonema costatum*, de 340 cellules par ml pour *Thalassiosira weissflogii*, de 12 000 cellules par ml pour *Isochrysis galbana* et de 2 000 cellules par ml pour *Tetraselmis suecica*.

Ces valeurs sont contrôlées au niveau du bac par la mesure en continu de la teneur en chlorophylle a et par un comptage cellulaire d'un échantillon d'eau prélevé toutes les 20 minutes environ. La teneur en matière particulaire totale (TPM) est mesurée à partir d'un volume de 8 litres d'eau prélevés chaque matin, filtré sur membrane Whatman GF/C et pesé après séchage à 60°C pendant 24 heures. Les réajustements nécessaires sont effectués pour atteindre les valeurs souhaitées.

Le taux d'ammoniac de l'eau est contrôlé tous les matins. Le dosage est effectué selon la méthode de Koroleff (1969), basé sur une réaction colorimétrique.

Pour éviter une accumulation des déchets azotés dans le raceway (circuit fermé), après la récolte des biodépôts (fécès et pseudofécès), matin et soir, destinés à l'évaluation des paramètres écophysologiques, une vidange de 30 litres est effectuée tous les matins et la totalité du volume d'eau circulant est remplacée tous les 5 jours en période de contamination et tous les 4 jours en période d'épuration après nettoyage du bassin. Avant son rejet à l'égout, l'eau contenant *A. minutum* subit un traitement à l'eau de Javel pure pendant quelques heures dans un raceway-tampon pour éliminer toute toxicité.

Le comportement alimentaire des huîtres est suivi selon deux paramètres écophysologiques : le taux de filtration (*clearance rate* CR) exprimé en l/ h et le taux de consommation (*filtration rate* FR) exprimé en mg/ h.

$$CR = \frac{[\text{PIM des biodépôts (féces et pseudo-féces) en mg/ h}]}{[\text{PIM de l'eau de mer en mg/ l}]}$$

$$FR = [\text{PIM des biodépôts (féces et pseudo-féces) en mg/ h}] \times \frac{\text{TPM de l'eau de mer en mg/ l}}{\text{PIM de l'eau de mer en mg/l}}$$

ou encore $FR = CR \times \text{TPM (eau de mer)}$

avec PIM : Matière Particulaire Inorganique

TPM : Matière Particulaire Totale (TPM = PIM + POM)

POM : Matière Particulaire Organique

Le taux de filtration est calculé à partir des dépôts fécaux selon la formule de Hawkins *et al.* (1996) préférée à la méthode de Bayne *et al.* (1985) qui utilisait une comparaison entre les flux particulaires entrant et sortant au niveau des bassins. Le taux de filtration étant un processus très variable au cours du temps, même à l'échelle de quelques minutes, il est préférable de se baser sur la quantité de féces déposée sur plusieurs heures, plutôt que sur la moyenne de différentes mesures instantanées, obtenues par comparaison de concentrations particulaires avec les flux entrant et sortant des dispositifs expérimentaux. En résumé, le taux de filtration représente le volume d'eau de mer "épuré" de ses particules par heure et le taux de consommation, la masse de particules filtrées par heure (Hawkins *et al.*, 1997).

Des échantillons d'eau de mer (8 litres) sont prélevés tous les matins pour le calcul de la teneur en matière particulaire totale (TPM). L'ensemble des biodépôts (féces + pseudoféces) sont prélevés manuellement à l'aide d'une pipette automatique le matin vers 9 heures (production de la nuit) et le soir vers 17 heures (production de la journée).

La valeur en TPM est déterminée par la pesée des volumes d'eau de mer ou de biodépôts filtrés sur filtres Whatman GF/ C séchés à 60°C pendant 24 heures après un rinçage avec 100 ml d'eau distillée pour éliminer toutes traces de sel. Les valeurs en PIM sont déterminées après combustion à 450°C pendant une heure de ces mêmes filtres. La valeur en POM s'obtient par différence entre la valeur en TPM et la valeur en PIM.

L'activité des huîtres (coquille de l'huître ouverte ou fermée) est également notée (type réponse oui - non) approximativement toutes les heures de la journée.

2.4. Analyses biochimiques

L'évolution de la composition biochimique de la chair des bivalves en fonction du régime microalgal utilisé au cours de la phase d'épuration des toxines paralysantes est appréciée par le dosage des sucres totaux, des lipides totaux, des protéines totales et des cendres (matière minérale).

Les huîtres (une dizaine) sont prélevées après tirage au sort le premier jour de la phase de contamination ainsi que les premier et dernier jours de la phase d'épuration. Après pesée de l'individu entier (coquille + chair + eau intravalvaire), la totalité de la chair égouttée sur Büchner pendant 2 heures environ est pesée puis congelée (- 80°C) et lyophilisée pendant 48 heures.

Les protides sont analysés selon la méthode de Lowry *et al.* (1951), utilisant les réactifs du Biuret et de Folin Ciocalteu, après une extraction à la soude normale 1 N. Les lipides sont extraits par un mélange chloroforme-méthanol-eau (1-1-1) d'après la méthode de Bligh et Dyer (1959). Les sucres totaux sont dosés par la méthode de Dubois *et al.* (1956) au phénol sulfurique, les glucides ayant été préalablement extraits à + 4°C dans de l'acide trichloroacétique à 15 %. Les mesures sont effectuées par spectrophotocolorimétrie avec comme étalon la sérum albumine bovine (BSA-Sigma Diagnostics) pour les protéines et du glucose (D-glucose Merck) pour les glucides. Tous les résultats sont exprimés en % de matière sèche.

Le dosage des matières minérales (cendres) s'effectue à partir d'un échantillon de 100 mg de chair lyophilisée carbonisée à 450°C dans un four à moufle pendant 24 heures.

L'analyse de la composition biochimique des algues s'effectue selon les mêmes méthodes. Les algues sont récoltées par centrifugation (1 800 g) en phase de croissance exponentielle à partir d'un ballon de culture de 10 litres. Elles sont ensuite congelées et lyophilisées.

2.5. Analyses des toxines

Les toxines paralysantes constituent une famille de 12 molécules, dont le noyau de base est celui de la saxitoxine (STX). En fonction des substituants présents et de leurs propriétés chromatographiques, les toxines peuvent être classées en trois groupes :

- le groupe A, avec la saxitoxine et la néosaxitoxine qui n'ont pas de substituant soufré,
- le groupe B, avec les gonyautoxines (GTX) 1, 2, 3 et 4 ainsi que les GTX B1 et B2. Ces molécules possèdent un radical soufré,
- le groupe C, avec les toxines C1, C2, C3 et C4, qui possèdent deux radicaux soufrés.

Chacune de ces molécules possède une toxicité spécifique, qui décroît du groupe A vers le groupe C. Des méthodes analytiques performantes sont donc nécessaires pour séparer, identifier puis quantifier chacune de ces toxines. La chromatographie liquide haute performance par appariement d'ions (CLHP-AI) constitue, à l'heure actuelle, la méthode analytique la plus utilisée. C'est la méthode décrite par Oshima (1984, 1989) permettant de séparer toutes les toxines présentes dans un échantillon qui sera utilisée ici.

Afin de suivre l'évolution de la teneur en toxines paralysantes dans les coquillages, des prélèvements d'huîtres (3 individus) sont effectués tous les deux jours pendant la phase de décontamination.

L'extraction est réalisée sur la totalité de la chair du coquillage, à froid (+ 4°C) par l'acide acétique 0,1 N. Cette méthode d'extraction a été préférée à la technique d'extraction à chaud par l'acide chlorhydrique 0,1 N recommandée par l'*Association of Official Analytical Chemists (A.O.A.C)* car elle permet de mieux estimer la toxicité réelle de l'échantillon, l'hydrolyse à chaud par un acide fort provoquant une conversion des toxines présentes vers des formes plus toxiques.

La concentration de l'acide utilisé est élevée (0,1 N) de façon à maintenir le pH de l'échantillon proche de 3,5, zone dans laquelle les toxines, de la famille des hydropurines, sont chimiquement stables.

La séparation des toxines s'effectue sur une colonne phase inverse par chromatographie liquide d'appariements d'ions. Cette technique de chromatographie met en jeu une paire d'ions constituée d'un co-ion (ici les toxines ionisées) et d'un contre-ion formé d'une chaîne carbonée portant un ion de charge opposée à celle des toxines (ion C7 sulfonate pour les toxines A et B, ion tetrabutylammonium pour les toxines C). La variation de distribution de ces paires d'ions, entre la phase stationnaire apolaire constituée par la silice greffée C8 et la phase mobile hydroorganique (mélange binaire eau-acétonitrile contenant le contre-ion et un tampon de pH approprié), constitue la base de la séparation chromatographique.

Une fois les toxines séparées, il est nécessaire, pour pouvoir les quantifier, de modifier la structure chimique des molécules pour les rendre fluorescentes. Ceci se fait par action de l'acide périodique en milieu alcalin. Cette réaction d'oxydation est arrêtée et stabilisée par acidification de l'éluant avec l'acide acétique. La détection s'effectue par fluorescence aux longueurs d'ondes d'émission et d'excitation de 330 nm et 390 nm respectivement.

La chaîne d'analyse est constituée d'une pompe programmable à gradient Merck L-6200, d'un injecteur automatique HP-1100, d'un four de colonne à effet Peltier, de deux pompes isocratiques Merck L-6000, d'un bain-marie thermostaté et d'un spectrofluorimètre Merck F-1080. Le système d'acquisition de données et de traitement de chromatogrammes utilisé est le logiciel HP-Chem.

Après vérification de la stabilité de la réponse et des temps de rétention, 5 µl de chaque échantillon sont injectés deux fois pour chaque groupe de toxines. La quantification s'effectue par étalonnage externe à l'aide de standards de référence. Les étalons utilisés sont les standards certifiés de saxitoxine, néosaxitoxine, gonyautoxine-2 et 3, toxines C1 et C2 commercialisés à l'exception des deux derniers par le MACSP/IMB- Halifax, Canada. La concentration molaire obtenue est convertie, affectée des facteurs de dilution, en µg éq. STX/100 g de chair en utilisant les coefficients de conversion définis par Hungerford (Ledoux, 1992). Les standards sont injectés de manière périodique pour vérifier la permanence de la qualité de la séparation chromatographique.

Les deux avantages de la méthode décrite par Oshima sont :

- la stabilité des paramètres chromatographiques liée à une élution isocratique,
- une composition d'éluant spécifique à chaque groupe de toxines qui permet de séparer individuellement chaque toxine à l'intérieur de son groupe, et notamment les toxines C.

Les résultats sont analysés à l'aide du test W de Wilcoxon (test non paramétrique) au risque α de 5 % et sous l'hypothèse H_0 d'identité des populations.

3. RESULTATS

3.1. Essais préliminaires

Les différents essais préliminaires réalisés à chaque fois pendant quatre jours avec des cultures d'*A. minutum* ou d'un témoin non toxique : *S. trochoidea* ont permis de confirmer plusieurs points du protocole expérimental en circuit fermé :

- a) L'injection à $t = 0$ dans le bac de 30 l d'un volume de culture permettant d'obtenir 400 cellules / ml "théoriques" entraîne, à 800 l.h⁻¹ de débit, une sédimentation rapide puisqu'environ 60 % des cellules d'*A. minutum* sédimentent en 400 mn. Ces résultats sont encore plus marqués avec *S. trochoidea*. Des essais ultérieurs d'injection progressive de la culture par le biais de la micropompe ont démontré l'efficacité de ce procédé qui a été ensuite conservé pour les expériences longue durée.
- b) Le dénombrement d'*A. minutum*, mais surtout de *S. trochoidea*, au compteur de particules provoque une surestimation des concentrations réelles due à une prise en compte simultanée des kystes temporaires et des thèques vides. L'observation microscopique a donc été privilégiée dans la suite des essais pour ces deux espèces. Le Multisizer n'a été conservé que pour le dénombrement de cellules ne formant pas de chaîne et ne subissant pas de "stress cellulaire" pendant la mesure, c'est-à-dire *T. suecica* et *T. weissflogii*.
- c) En ce qui concerne les valeurs d' NH_4 dans le système, elles montrent une augmentation systématique lors de la mesure du matin, avant renouvellement partiel (30 L) ou total (130 L) de l'eau de mer, ce qui est normal par rapport aux quantités plus importantes de biodépôts produits la nuit. En régime diurne, les concentrations d' NH_4 varient de 8 à 12 $\mu\text{atg N/l}$ en trois jours pour *A. minutum*, et de 2 à 10 pour *S. trochoidea*. Ces observations ont confirmé la nécessité de renouveler totalement l'eau du circuit tous les trois jours, même si la valeur la plus élevée d'ammoniaque se rencontre souvent dans l'environnement des parcs conchylicoles (Moreau, 1993 ; Na, 1986 ; Villetard, 1980).

- d) Les essais de pilotage automatique de l'apport en chlorophylle a en fonction d'une consigne donnée (ex : 150 cellules/ml pour *A. minutum*) se sont révélés parfaitement opérationnels. La carte d'acquisition ADLink (transformation du signal analogique en données numériques) et la carte de Commande "Industrial Automation" ont été validées et conservées pour la suite des expériences, en lieu et place de l'interface des premiers essais.
- e) Les comparaisons de production de biodépôts (en mg de seston par heure) réalisées à deux reprises entre *S. trochoidea* et *A. minutum* (fig. 2) montrent une activité alimentaire importante le premier jour pour *A. minutum* (de l'ordre de 13,5 mg TPM/h) avec un tassement rapide autour de 2 à 4 mg TPM/h les jours suivants. A concentration cellulaire et valeur nutritive égale, les productions de *S. trochoidea* sont globalement supérieures (4 à 6 mg) à très supérieure (4 à 10 mg). Ces données ont servi de repères pour les expériences longues durées réalisées par la suite.
- f) L'observation continue, en cours d'expérience, des taux d'activité des huîtres (pourcentages d'huîtres ouvertes et entrouvertes au cours du temps) a permis de constater une relative stabilité au cours de la journée mais des écarts journaliers et individuels, en particulier chez *A. minutum* (fig. 3), qui montrent l'intérêt de ce paramètre : 1) pour expliquer les variations individuelles de taux de rétention des toxines, 2°) globalement, pour l'ensemble de la population, pour relier ces activités aux taux de filtration et de consommation.

Ainsi, pour ce qui est de l'expérimentation de juin 1996, on constate une activité de l'ordre de 80 - 90 % le premier jour de mise en contact avec *A. minutum*, puis un déclin graduel les trois jours suivants jusqu'à une activité réduite à 40 - 50 % de la population.

3.2. Expériences à long terme

Pour des raisons de disponibilités matérielles, les expérimentations longue durée se sont déroulées en deux phases :

- du 23 septembre au 24 octobre 1996 : régime de détoxification avec *Isochrysis galbana* et *Tetraselmis suecica* ;
- du 5 au 27 mars 1997 : régime de détoxification avec *Skeletonema costatum* et *Thalassiosira weissflogii*.

Si la période de contamination des huîtres par *Alexandrium minutum* fut bien de 15 jours au mois de septembre, elle s'est trouvée limitée à 8 jours en mars en raison d'une consommation beaucoup plus importante, conséquence possible d'un hiver rigoureux. La période de détoxification a été de 15 jours pour tous les régimes testés.

Comparaison des productions de biodépôts

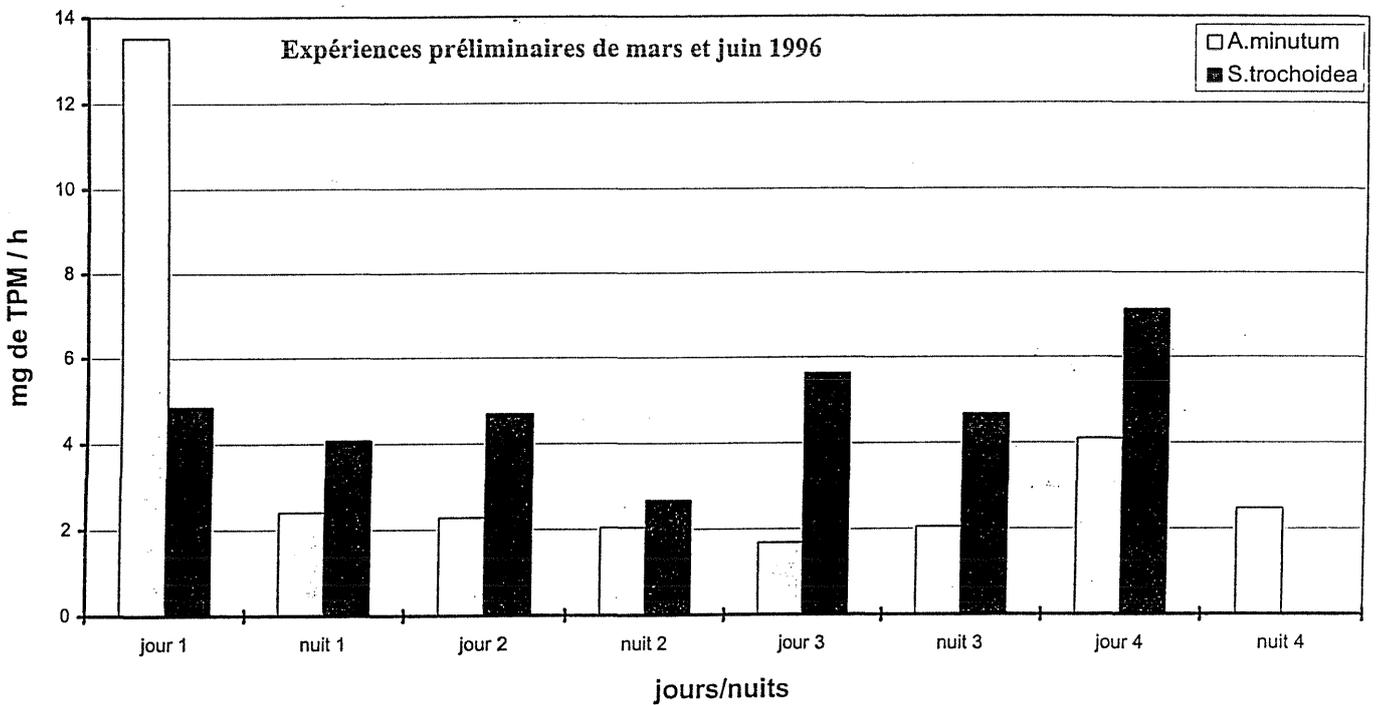
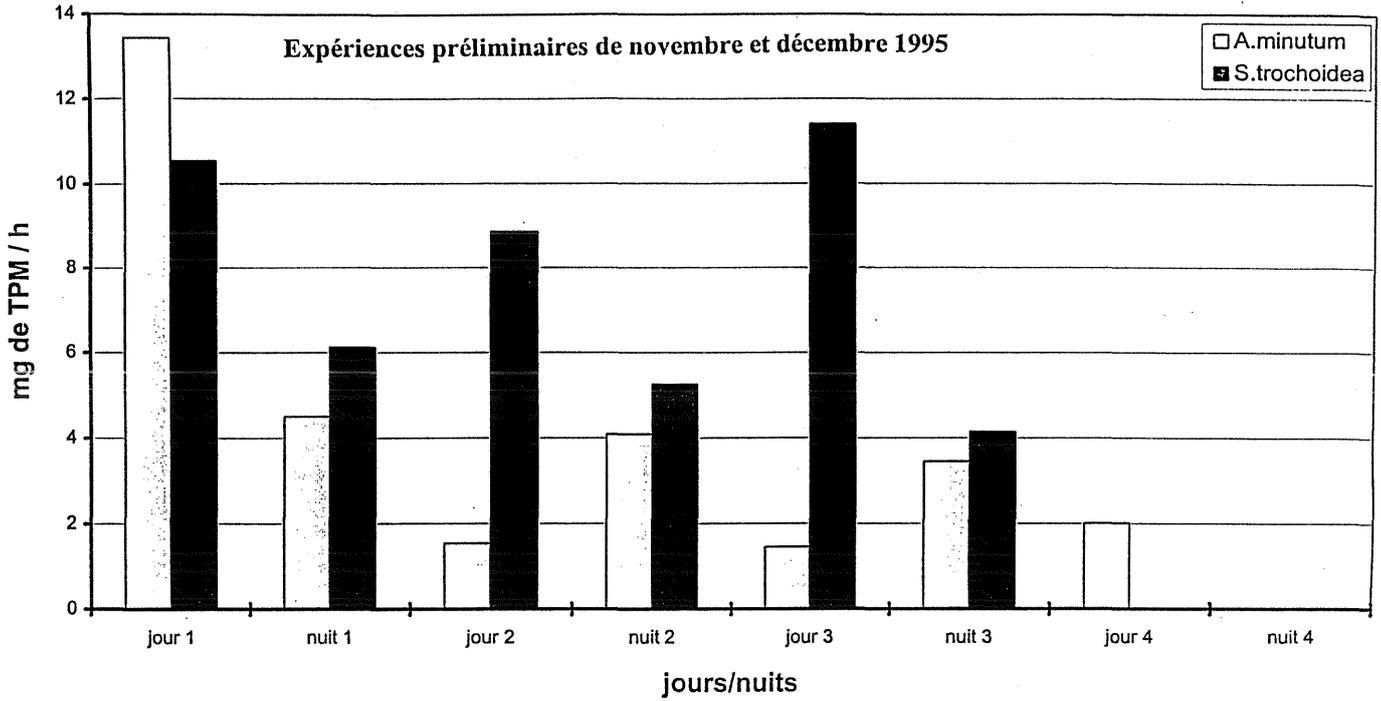


Figure 2 : Comparaison des productions de biodépôts en 4 jours d'exposition respectivement pour *A. minutum* et *S. trochoidea* maintenus à $150 \text{ cellules.ml}^{-1}$ dans le circuit. Expériences préliminaires de 1995 et 1996. TPM = matériel particulaire total.

Activités des huîtres

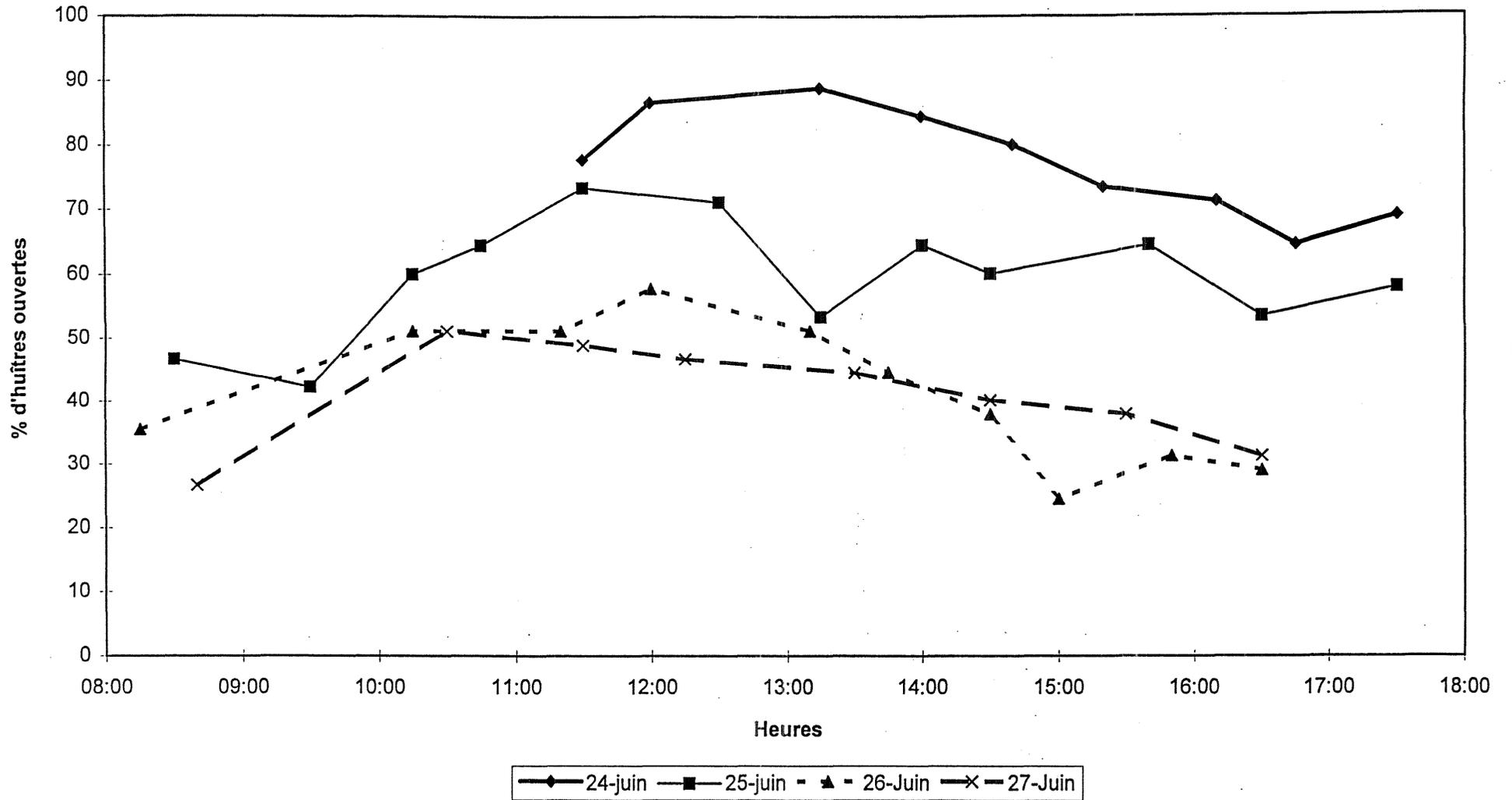


Figure 3 : Activités (pourcentages d'individus ayant les valves ouvertes ou entrouvertes) des huîtres nourries avec *A. minutum* en fonction de l'heure (phase diurne) et du jour d'expérience.

3.2.1. Conditions générales

La température est restée stable dans les différents bacs recevant les régimes non toxiques (min = $15,3 \pm 0,5^\circ \text{C}$, mx = $15,9 \pm 0,4^\circ \text{C}$). En ce qui concerne l'ammoniac (figures 4 et 5) des concentrations élevées ont été mesurées pour le bac 1 (décontamination par *Isochrysis galbana*) en octobre, en dépit des renouvellements d'eau fréquents. Ces valeurs ne semblent pas cependant avoir été préjudiciables aux huîtres. On peut remarquer (exception faite du bac 2 en octobre qui présente une valeur relativement stable tout au long de l'expérimentation) que les concentrations en ammoniac augmentent lors de la phase de décontamination, et peuvent, occasionnellement, dépasser la valeur indicative de $20 \mu\text{atg}$ d'azote par litre (valeur maximale observée en milieu naturel lors des proliférations phytoplanctoniques estivales).

Cette augmentation, comme on le verra plus loin, correspond à une activité alimentaire plus élevée des huîtres.

En ce qui concerne la concentration cellulaire d'*A. minutum* pendant la contamination, et la moyenne journalière des TPM (tabl. 2), on constate, pour les bacs 1 et 2 (octobre 1996), une différence significative (risque voisin de 10 %) en ce qui concerne les concentrations cellulaires. Les moyennes des bacs 1 et 2 (mars 1997) ne présentent pas de différence significative au risque d'erreur de 5 %.

Les valeurs observées sont voisines de l'objectif initial de 120 cellules par ml. Les valeurs en TPM des différents bacs ne diffèrent pas significativement au risque de 5 %.

	TPM (mg/ ml)	nombre de cellules/ ml
Bac 1 (octobre 1996)	$0,52 \pm 0,11$	110 ± 33
Bac 2 (octobre 1996)	$0,54 \pm 0,16$	122 ± 50
Bac 1 (mars 1997)	$0,52 \pm 0,20$	119 ± 56
Bac 2 (mars 1997)	$0,51 \pm 0,14$	107 ± 45

Tableau 2 : Estimation de l'apport en algues en phase de contamination

Par rapport aux consignes affichées, le nombre de cellules moyen observé pendant la phase d'épuration est de : $12\,459 \pm 4\,912$ cellules par ml pour *Isochrysis galbana* (objectif : 12000 cellules/ml), $2\,404 \pm 1\,716$ cellules par ml pour *Tetraselmis suecica* (objectif : 2000 cellules/ml), $2\,181 \pm 1\,375$ cellules par ml pour *Skeletonema costatum* (objectif : 1900 cellules/ml), 372 ± 211 cellules par ml pour *Thalassiosira weissflogii* (objectif : 340 cellules/ml).

Les écart-types élevés reflètent la difficulté à maintenir un niveau algal constant dans le milieu en raison des fluctuations de la demande des huîtres et des rééquilibrages à chaque changement d'eau (fig. 6).

Les TPM sont respectivement de $0,45 \pm 0,17$ mg/l, $0,72 \pm 0,26$ mg/l, $0,51 \pm 0,12$ mg/l et $0,71 \pm 0,23$ mg/l pour les phases d'épuration par *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica*, *Skeletonema costatum* et *Thalassiosira weissflogii*.

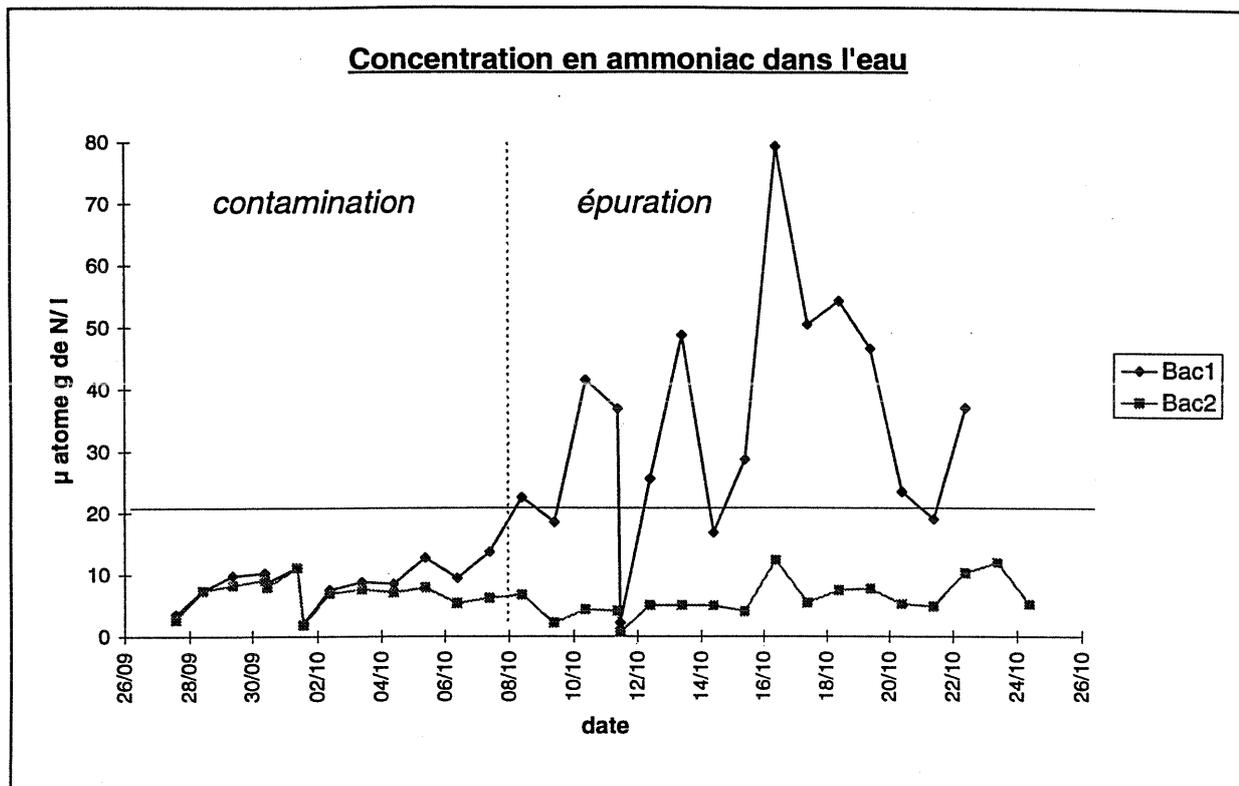


Figure 4 : Evolution du taux d'ammoniac
(octobre 1996, décontamination : bac 1 : *Isochrysis galbana* ; bac 2 : *Tetraselmis suecica*)

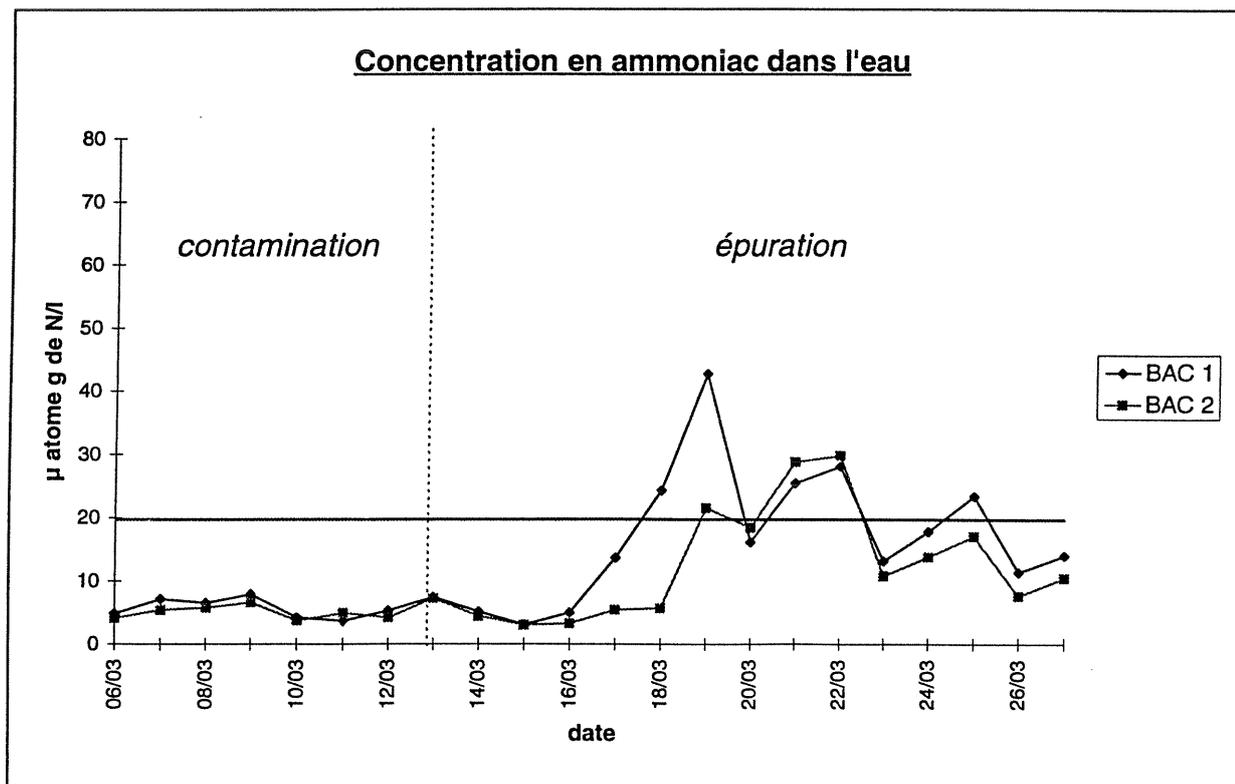


Figure 5 : Evolution du taux d'ammoniac
(mars 1977, décontamination: bac 1 : *Skeletonema costatum* ; bac 2 : *Thalassiosira weissflogii*)

Alexandrium minutum

Raceway 1 Suivi de la concentration cellulaire et de la chlorophylle

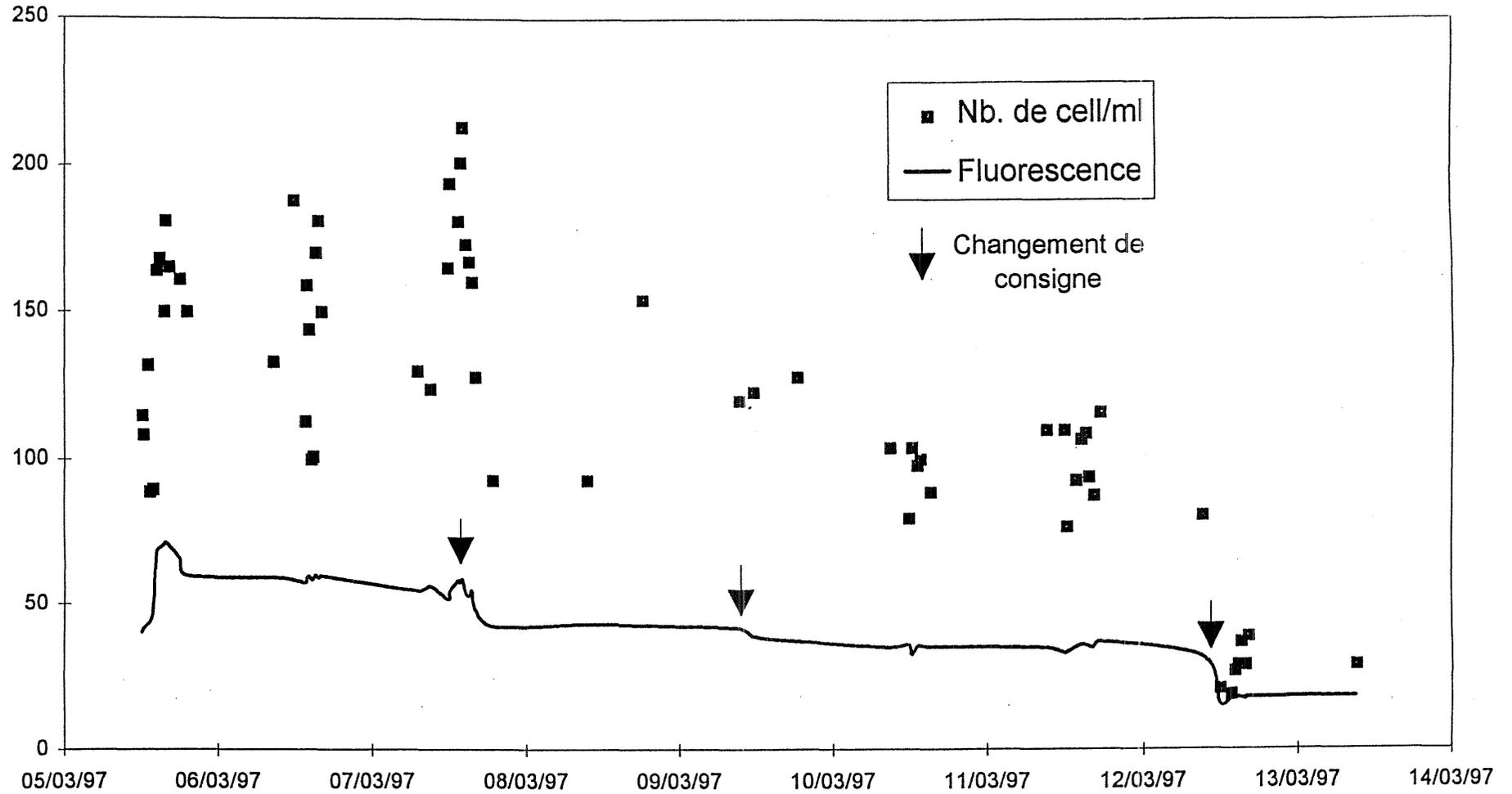


Figure 6 : Mesures comparées de la concentration cellulaire en *A. minutum* dans le circuit et de la fluorescence de la chlorophylle a au spectrofluorimètre Turner. Résultats obtenus au cours de l'expérience longue durée de mars 1997, sur un raceway.

3.2.2. Paramètres écophysologiques

En octobre 1996, le taux de filtration présente de nombreuses fluctuations au cours de la phase de contamination comme de la phase d'épuration et ce pour chaque bac. Les taux de filtration des bacs 1 et 2 ne présentent pas de différence significative au risque de 5 % (figures 7 et 8).

En mars 1997, on observe également des fluctuations importantes des taux de filtration, avec des valeurs maximales en début de contamination (bac 1) et en début de décontamination (bacs 1 et 2), les valeurs étant supérieures en décontamination. Le taux de filtration du bac 1 est significativement supérieur à celui du bac 2 (risque de 5 %) pendant la phase de contamination (figures 9 et 10).

Les taux de filtration sont nettement plus élevés lors de l'expérimentation du mois de mars. Ceci est vraisemblablement la conséquence d'une reprise de l'activité métabolique à cette période de l'année à laquelle s'ajoute le transfert des animaux dans des conditions expérimentales plus favorables que celles du milieu extérieur (température, alimentation à volonté). On note que jusqu'au 6^{ème} jour les taux de filtration sont plus élevés avec un régime à base de diatomées qu'avec *A. minutum*. Après le 6^{ème} jour de décontamination, les taux de filtration ont tendance à être du même ordre que pendant la contamination.

Les caractéristiques de l'évolution du taux de consommation sont comparables à celles du taux de filtration pour chaque expérimentation. Les taux de consommation mesurés en mars sont plus élevés que ceux d'octobre. En phase de contamination en mars, les huîtres du bac 1 ont un taux de consommation moyen significativement supérieur (risque de 5 %) à celles du bac 2 (figures 11 à 14).

On retrouve également, en mars, des consommations supérieures à celles obtenues avec *A. minutum*, pendant les six premiers jours de décontamination.

Pour ce qui est du taux d'activité (fig. 15 a et b) des huîtres, on note une modification identique du comportement des huîtres lors des deux expérimentations (octobre et mars). L'activité moyenne (bac 1 : 35 ± 13 % et bac 2 : 38 ± 13 % en octobre ; bac 1 : 49 ± 12 % et bac 2 : 50 ± 10 % en mars) pendant la phase de contamination par *Alexandrium minutum* augmente considérablement pendant la phase d'épuration (bac 1 : 76 ± 17 % et bac 2 : 46 ± 15 % en octobre ; bac 1 : 86 ± 20 % et bac 2 : 76 ± 25 % en mars). Seul le bac soumis à une décontamination par *Tetraselmis suecica* (bac 2, octobre 1996) ne présente pas d'augmentation très nette d'activité et diffère significativement au risque de 5 % de son bac homologue (bac 1, octobre 1996 - phase de décontamination). Il faut néanmoins tenir compte du fait que ces valeurs ne prennent pas en compte l'activité des huîtres la nuit.

En ce qui concerne les productions de biodépôts (figures 16 et 17, a et b) on remarque, au cours de la contamination par *A. minutum* de septembre 1996 des successions de cycles avec une augmentation de la production dans les deux bacs entre le 8^{ème} et le 15^{ème} jour de contamination.

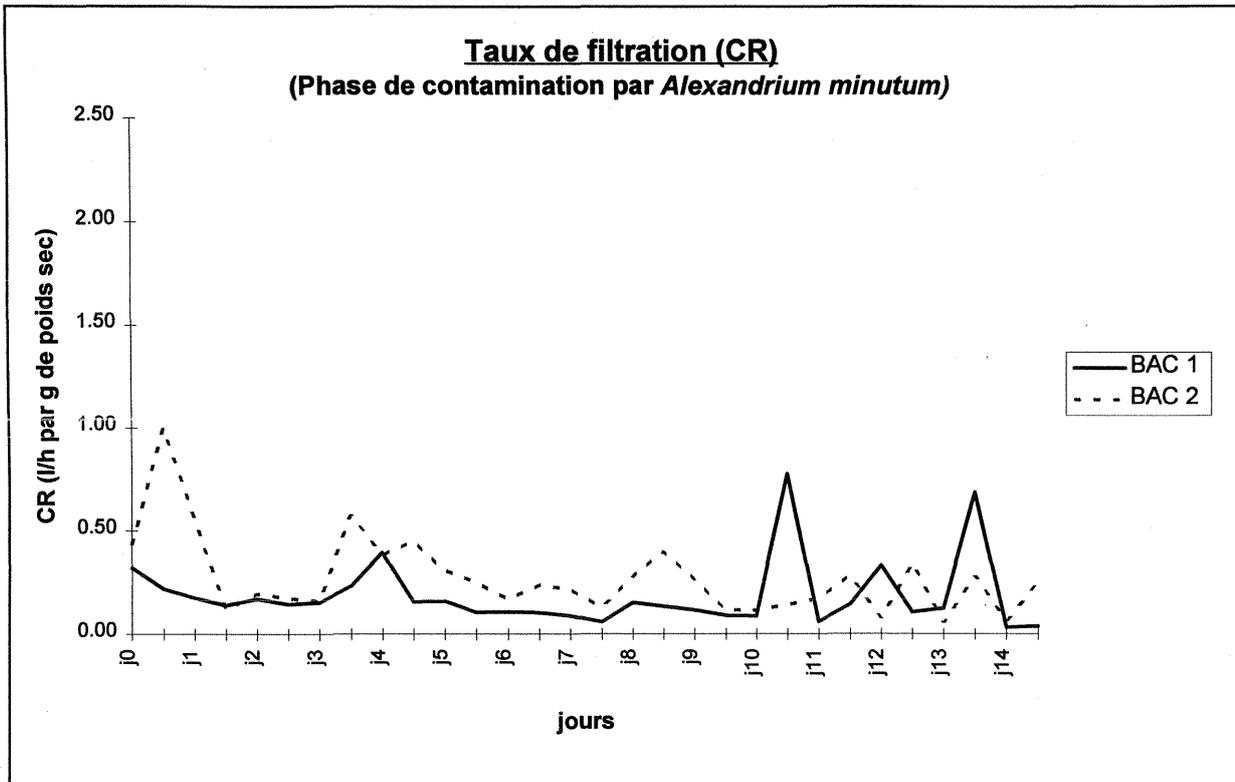


Figure 7 : Evolution du taux de filtration. Phase de contamination (octobre 1996).

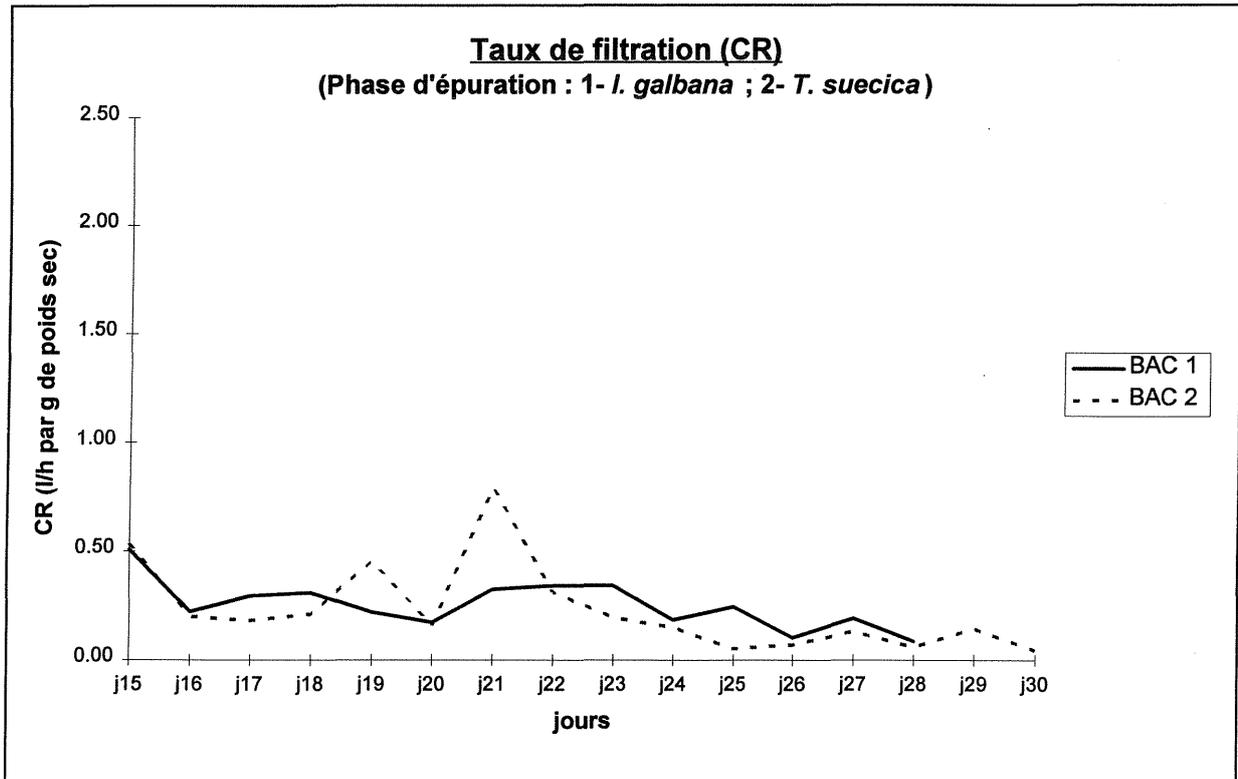


Figure 8 : Evolution du taux de filtration. Phase d'épuration (octobre 1996).

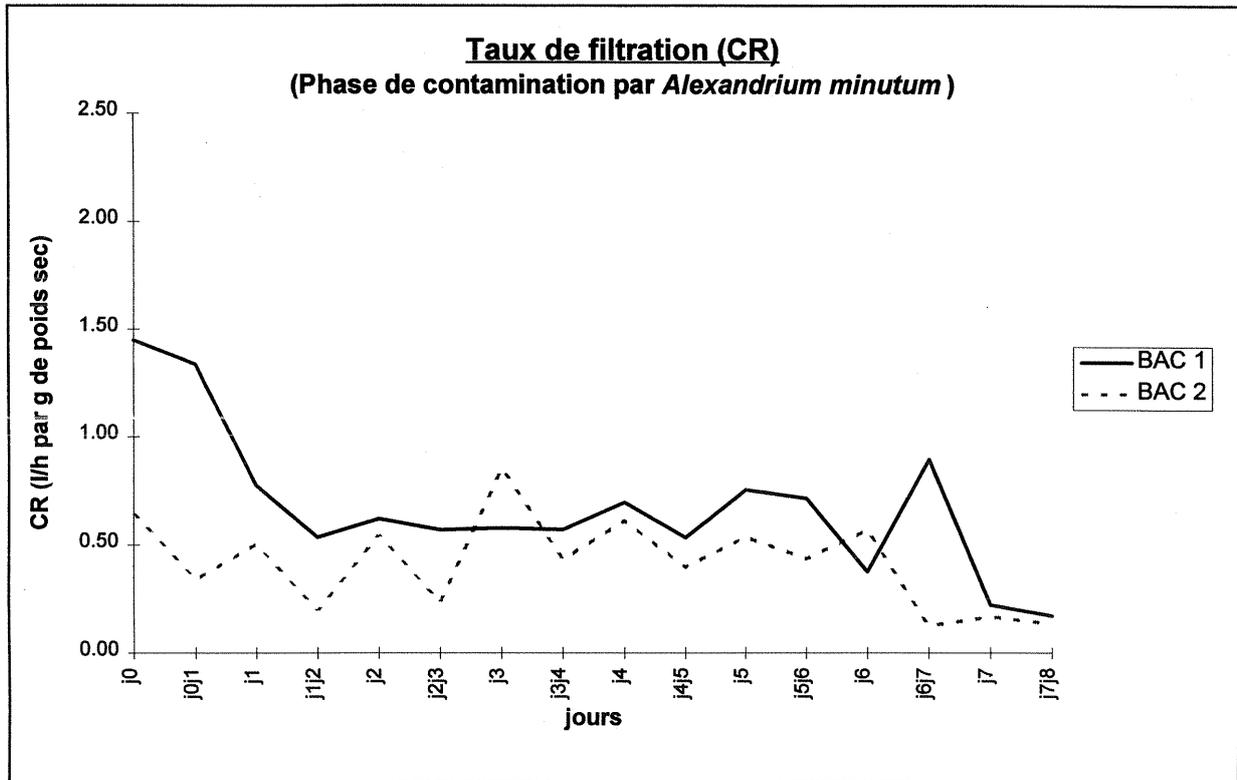


Figure 9 : Evolution du taux de filtration. Phase de contamination (mars 1997).

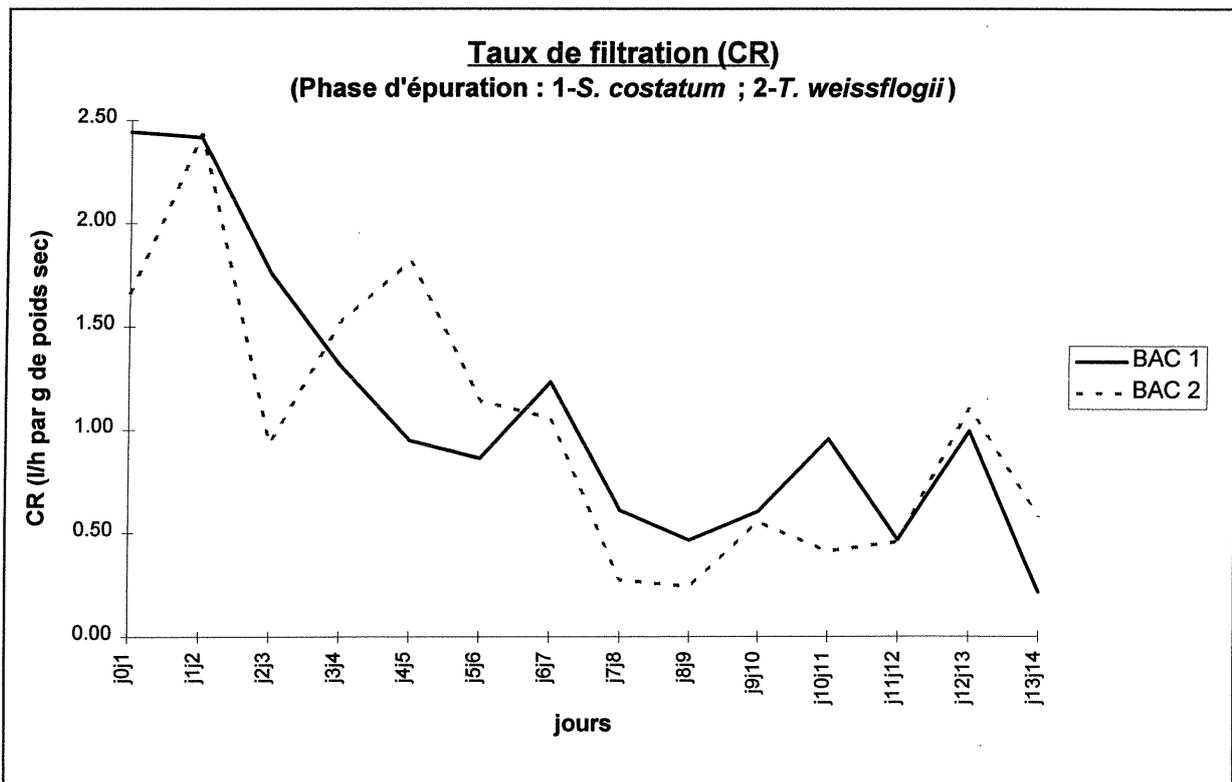


Figure 10 : Evolution du taux de filtration. Phase d'épuration (mars 1997).

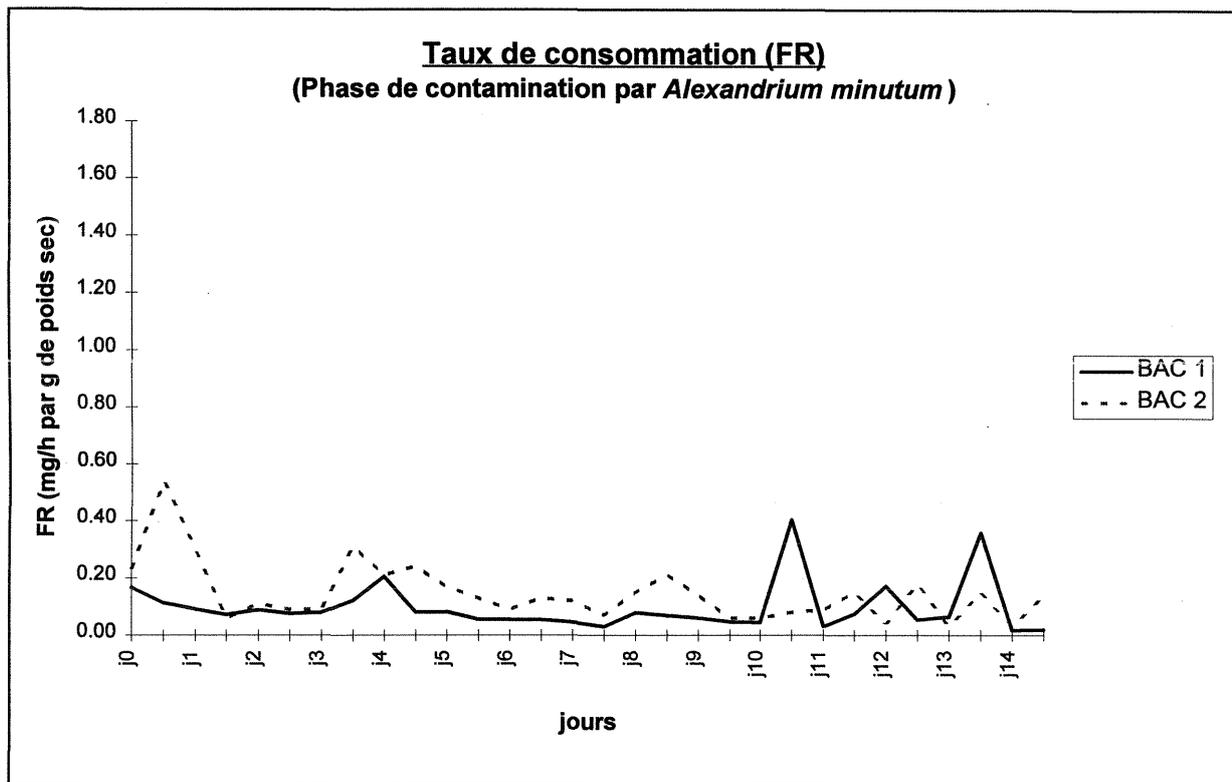


Figure 11 : Evolution du taux de consommation. Phase de contamination (octobre 1996).

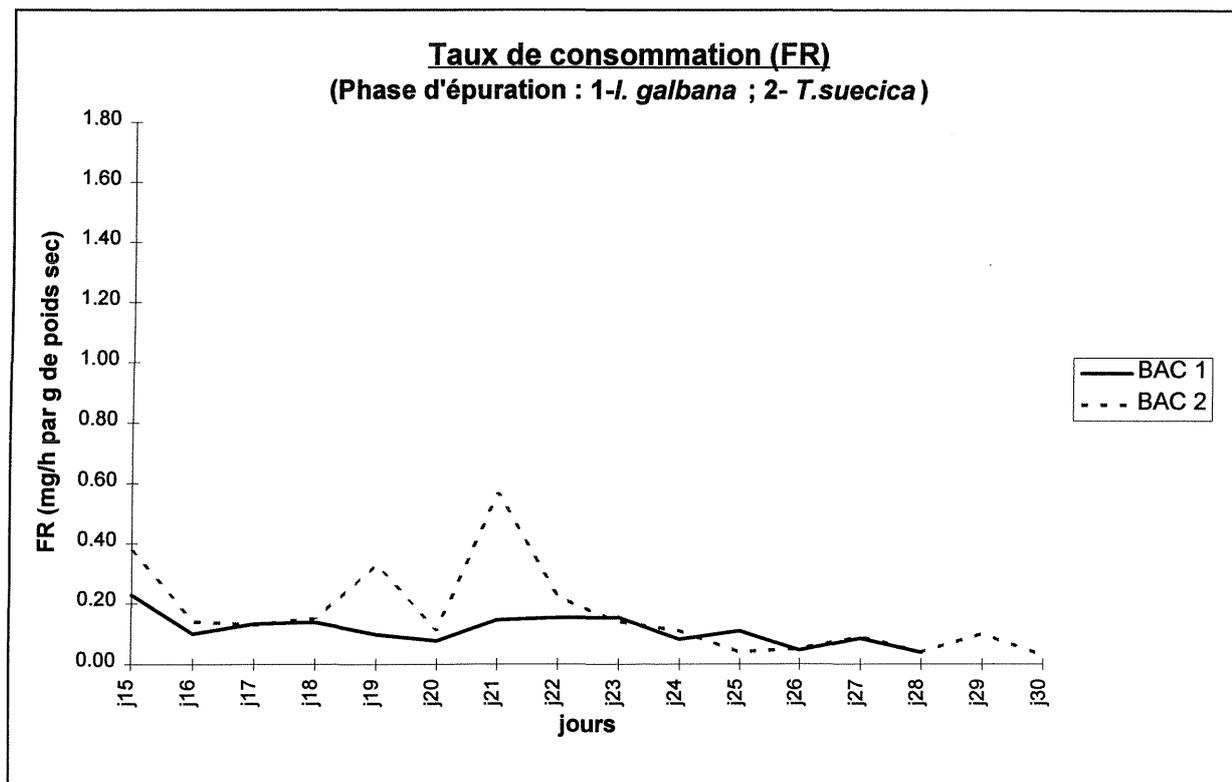


Figure 12 : Evolution du taux de consommation. Phase d'épuration (octobre 1996).

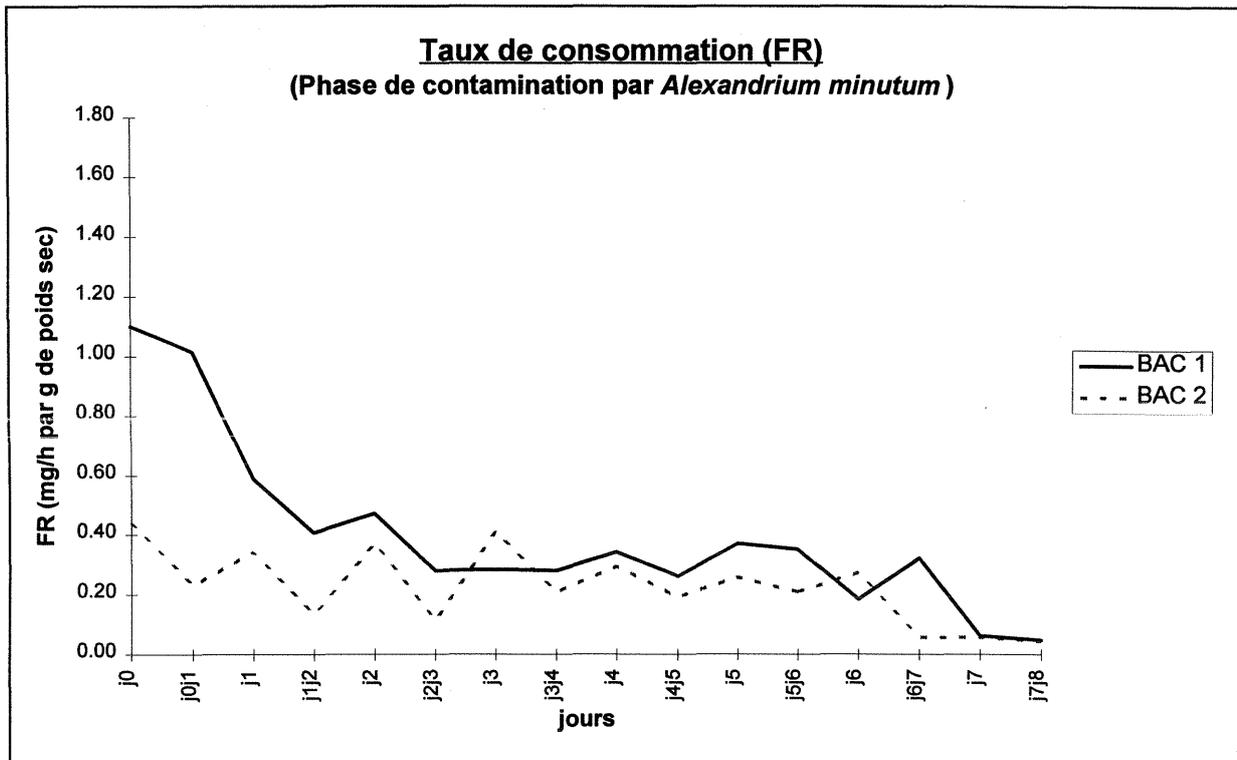


Figure 13 : Evolution du taux de consommation. Phase de contamination (mars 1997).

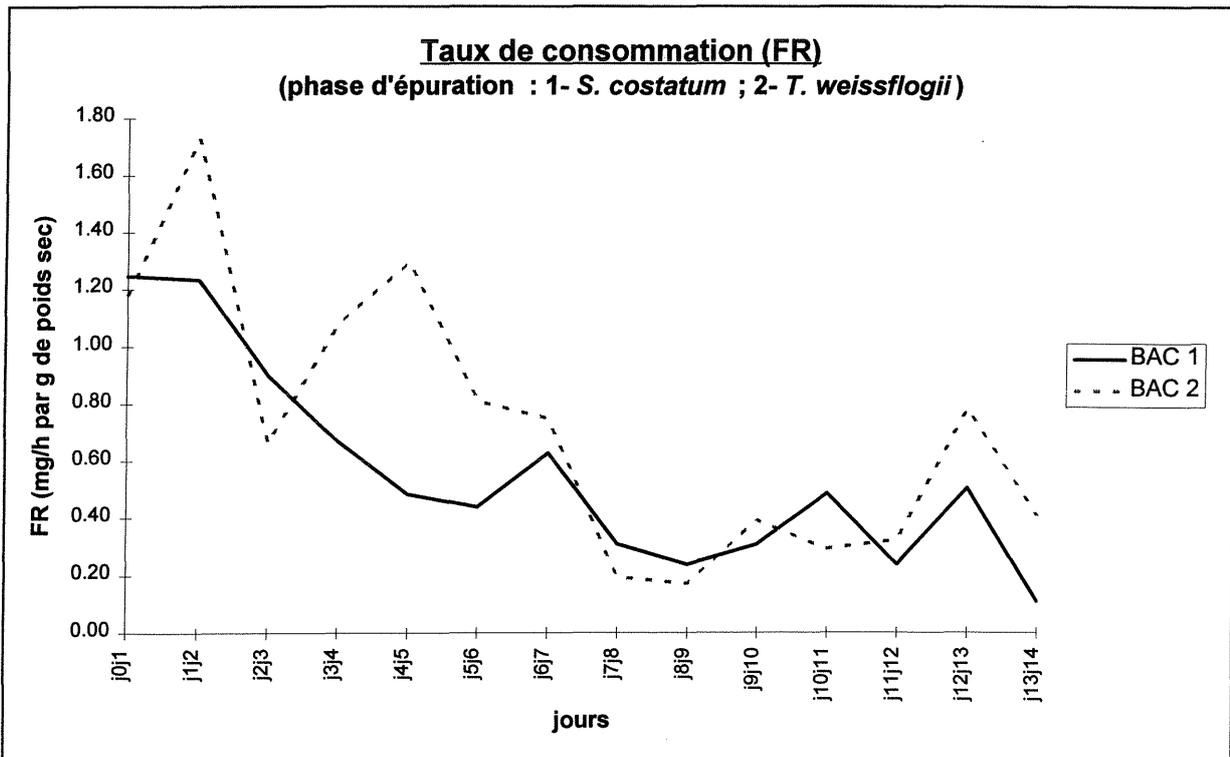
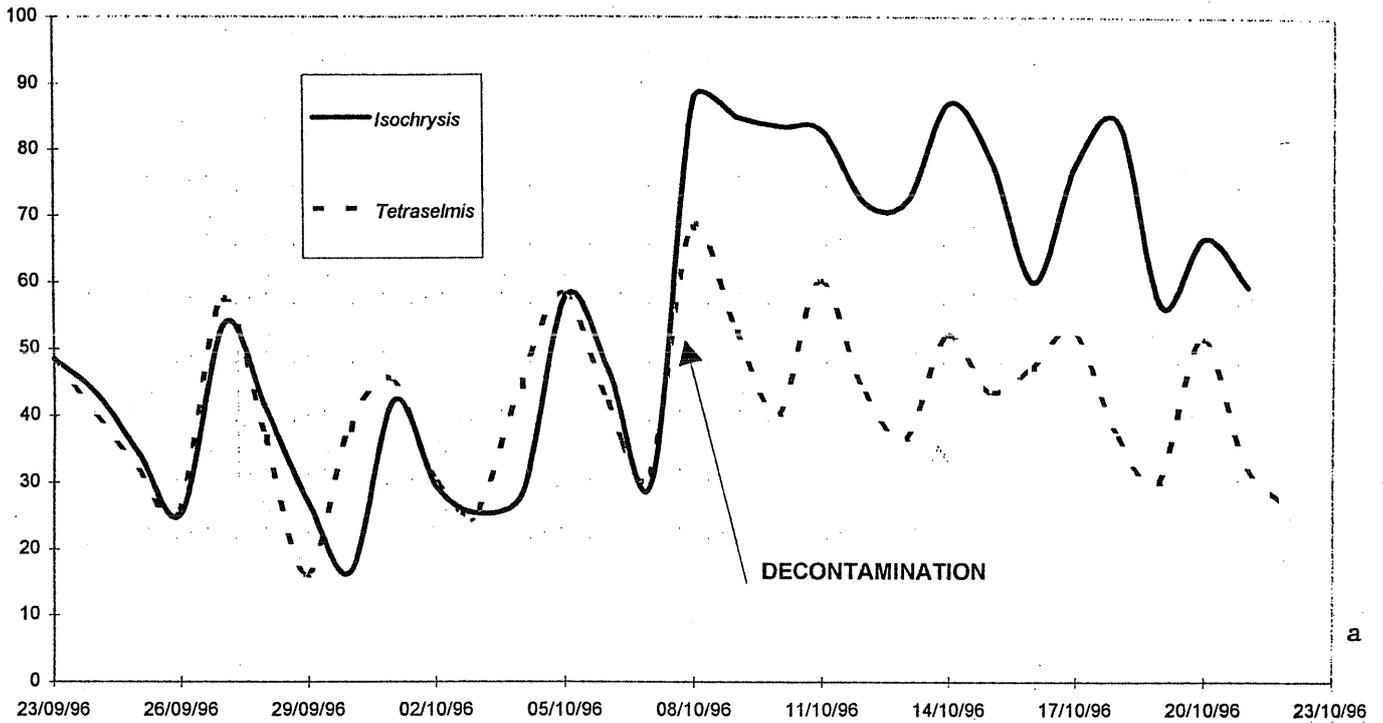


Figure 14 : Evolution du taux de consommation. Phase d'épuration (mars 1997).

Activité moyenne en % au cours du temps



Activité moyenne en % au cours du temps

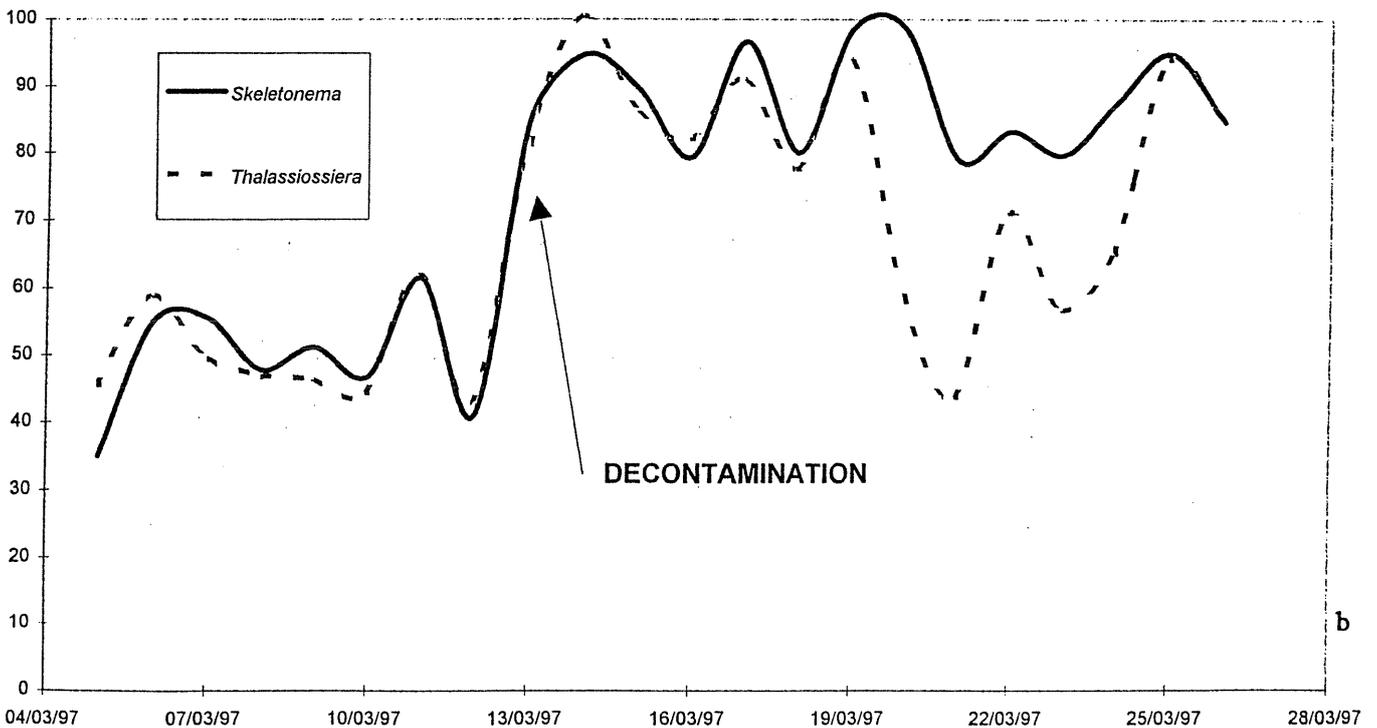


Figure 15 : Activités moyennes journalières des huîtres mesurées sur l'ensemble des deux expériences longues durées de septembre 1996 (a) et de mars 1997 (b), en fonction des régimes alimentaires testés : *A. minutum* pendant la contamination, flagellés et diatomées (voir légendes) en décontamination.

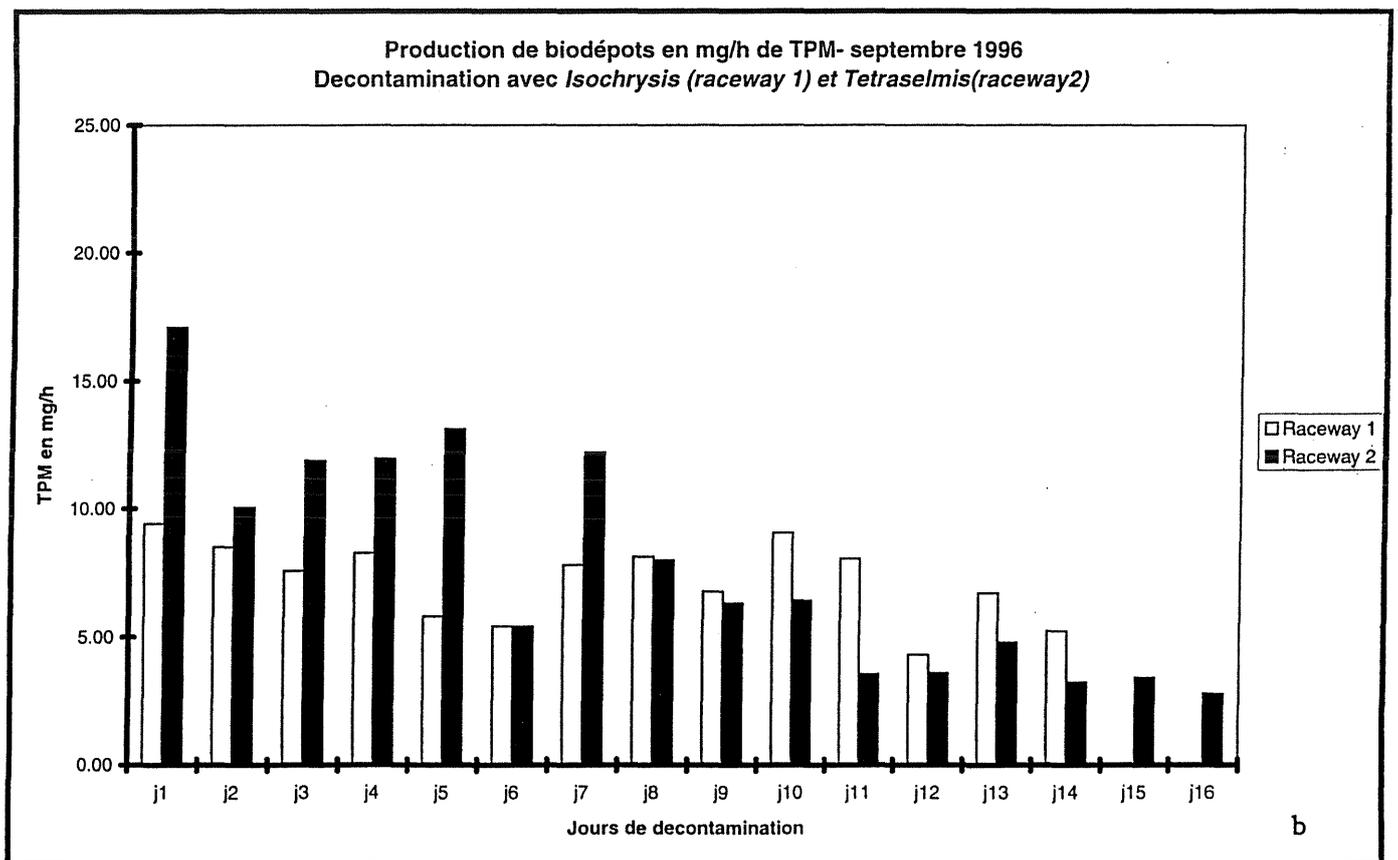
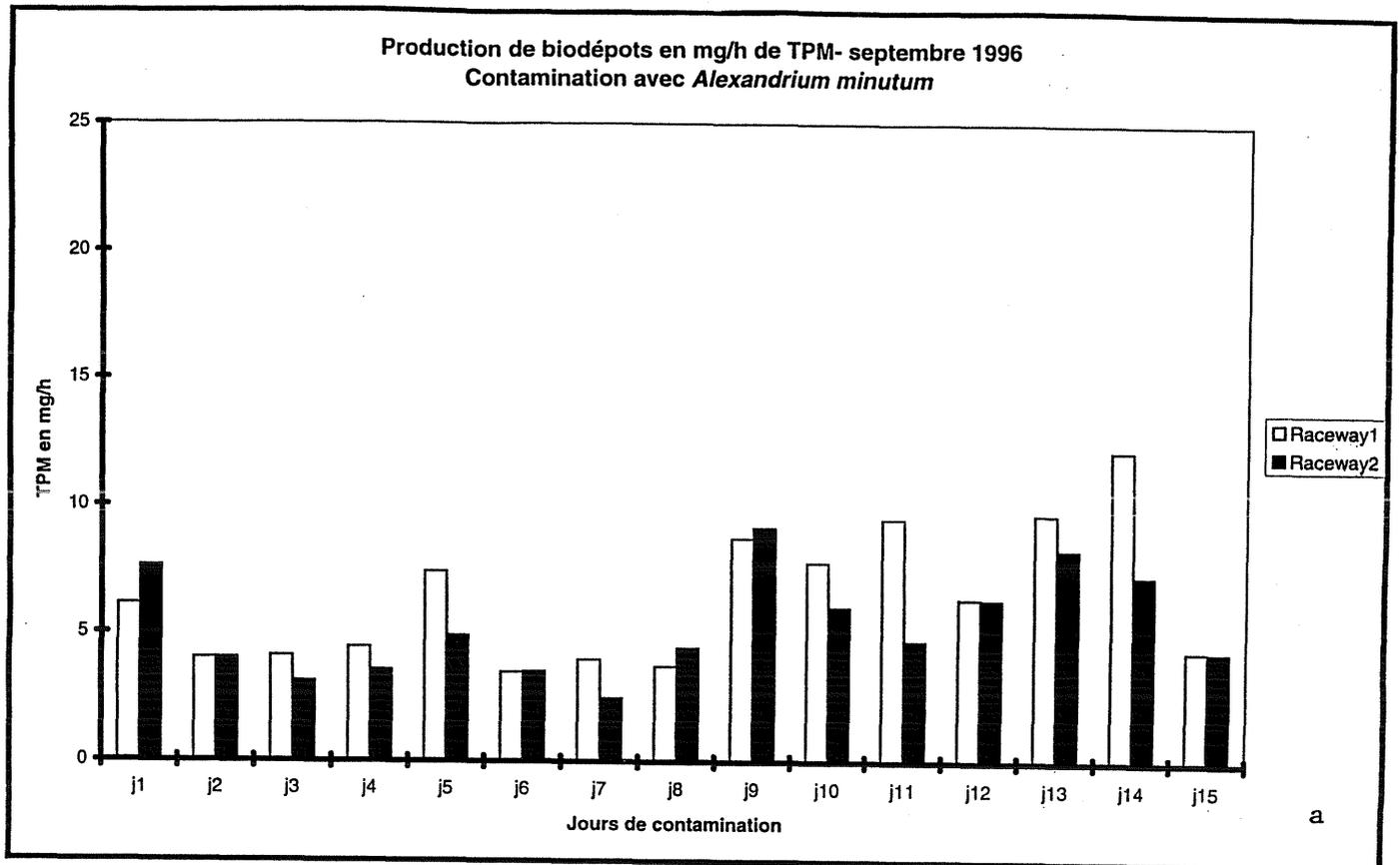


Figure 16 : Productions comparées de biodépôts dans chaque raceway au cours de la contamination (a) et de la décontamination (b). Expérience longue durée de septembre 1996.

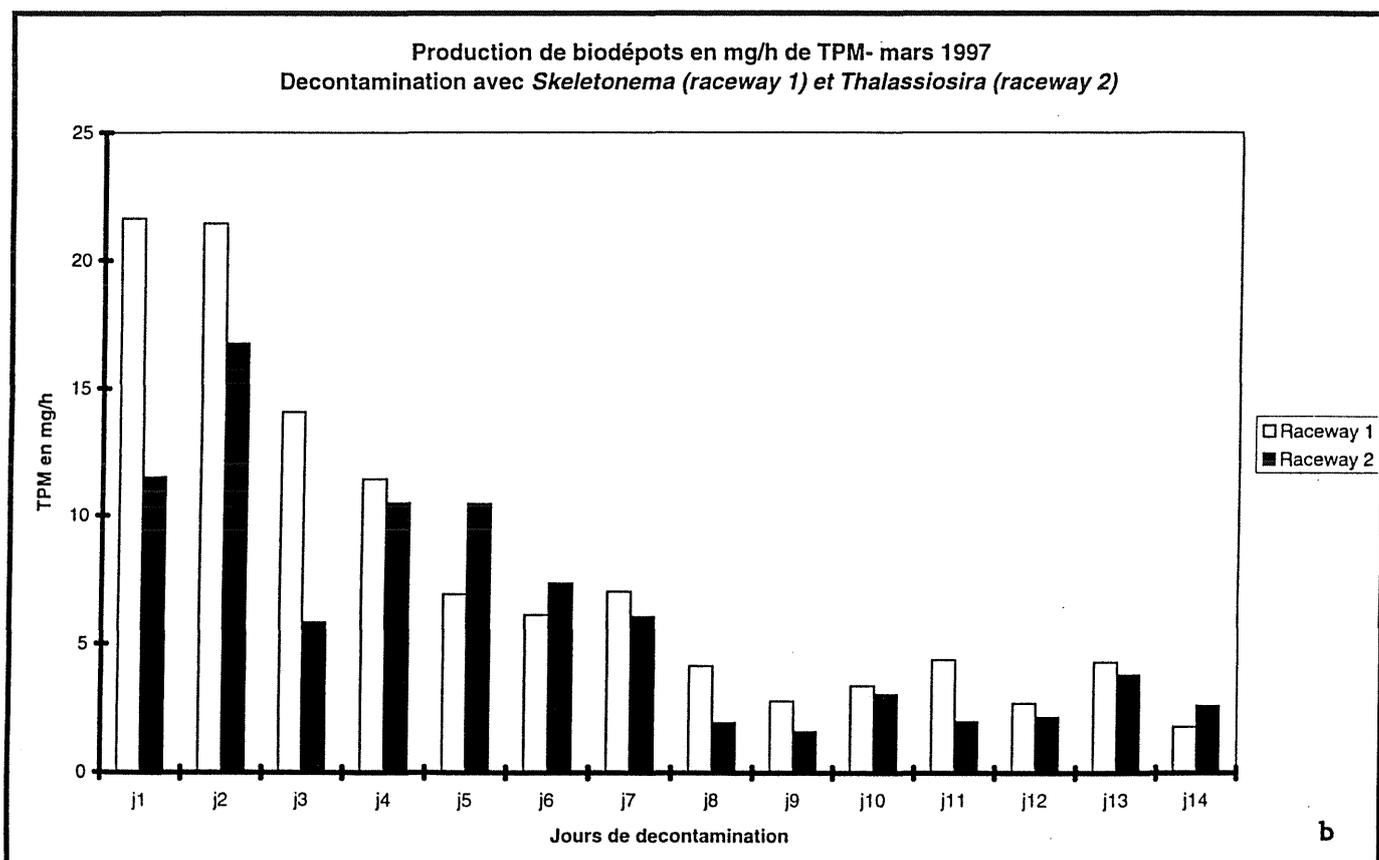
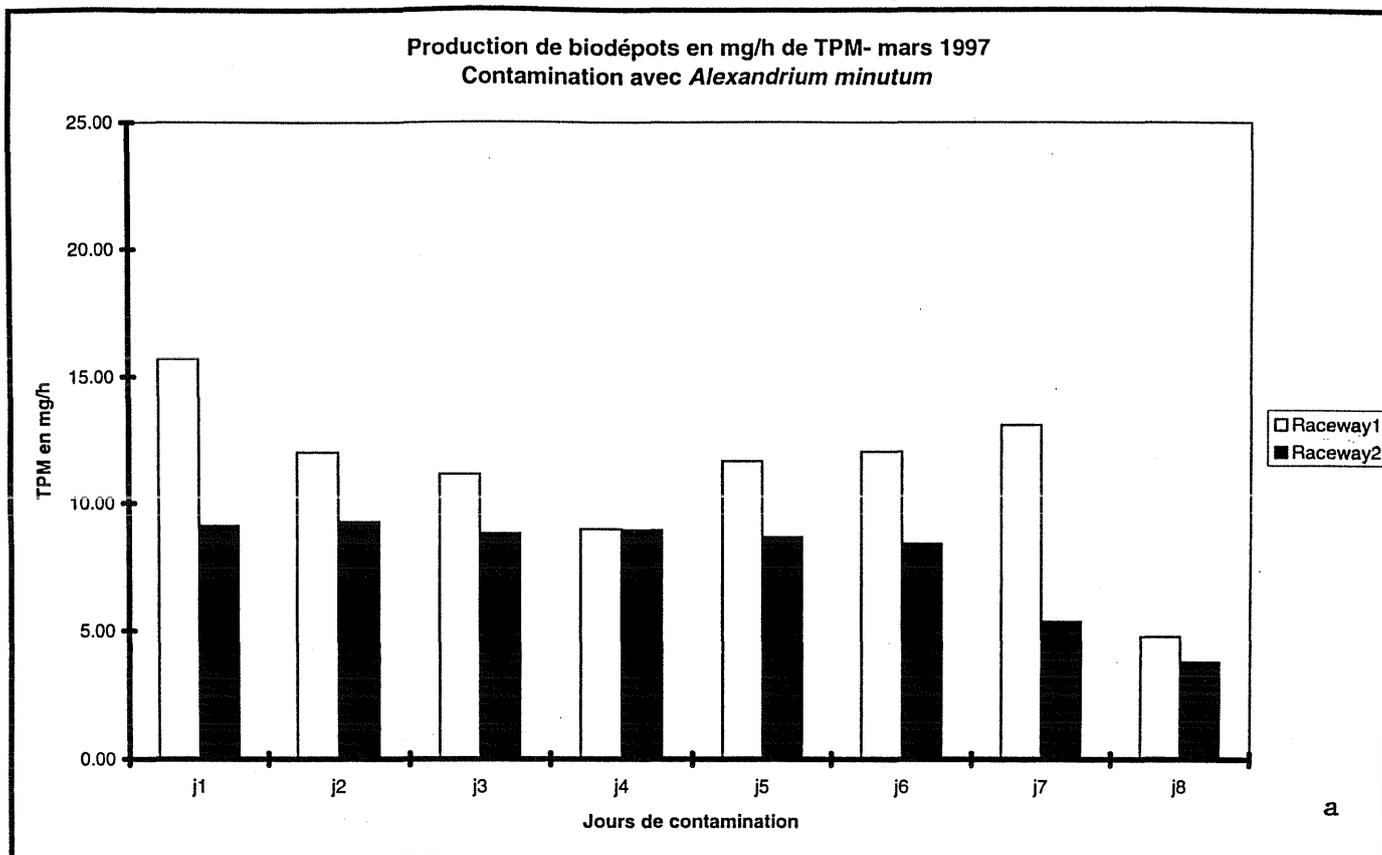


Figure 17 : Productions comparées de biodépôts dans chaque raceway au cours de la contamination (a) et de la décontamination (b). Expérience longue durée de mars 1997.

Au cours de l'épuration avec les flagellés la production est d'abord plus élevée avec *T. suecica* puis la tendance s'inverse après le 9^{ème} jour de décontamination. Globalement, les productions sont du même ordre qu'avec *A. minutum*.

En mars, pour une durée de contamination plus courte (8 jours) les productions sont légèrement supérieures (entre 8 et 10 mg/h TPM) à celles observées avec *A. minutum* au cours de l'expérience précédente. En ce qui concerne l'épuration, les productions sont supérieures à celles observées avec les flagellés au cours des quatre premiers jours, puis diminuent notablement pour se stabiliser entre 2 et 3 mg/h.TPM après le 8^{ème} jour de décontamination soit une production deux fois moindre qu'avec les flagellés.

Dans les deux types d'expérience, on note globalement, des productions de début d'épuration supérieures à très supérieures aux productions de fin d'épuration. Cette observation pourrait signifier une activité de filtration accrue suivie d'un phénomène de saturation. L'examen des activités journalières (fig. 15 a et b) montre bien une différence notable entre régime dinoflagellé et régimes phytoflagellés / diatomées suivi soit d'une décroissance lente (en tendance) des pourcentages d'activité au cours de l'épuration (flagellés), soit d'un niveau à peu près constant d'activité (diatomées). Ces derniers résultats confirment la différence de comportement (activité valvaire) importante entre les huîtres décontaminées avec *T. suecica* et *I. galbana*.

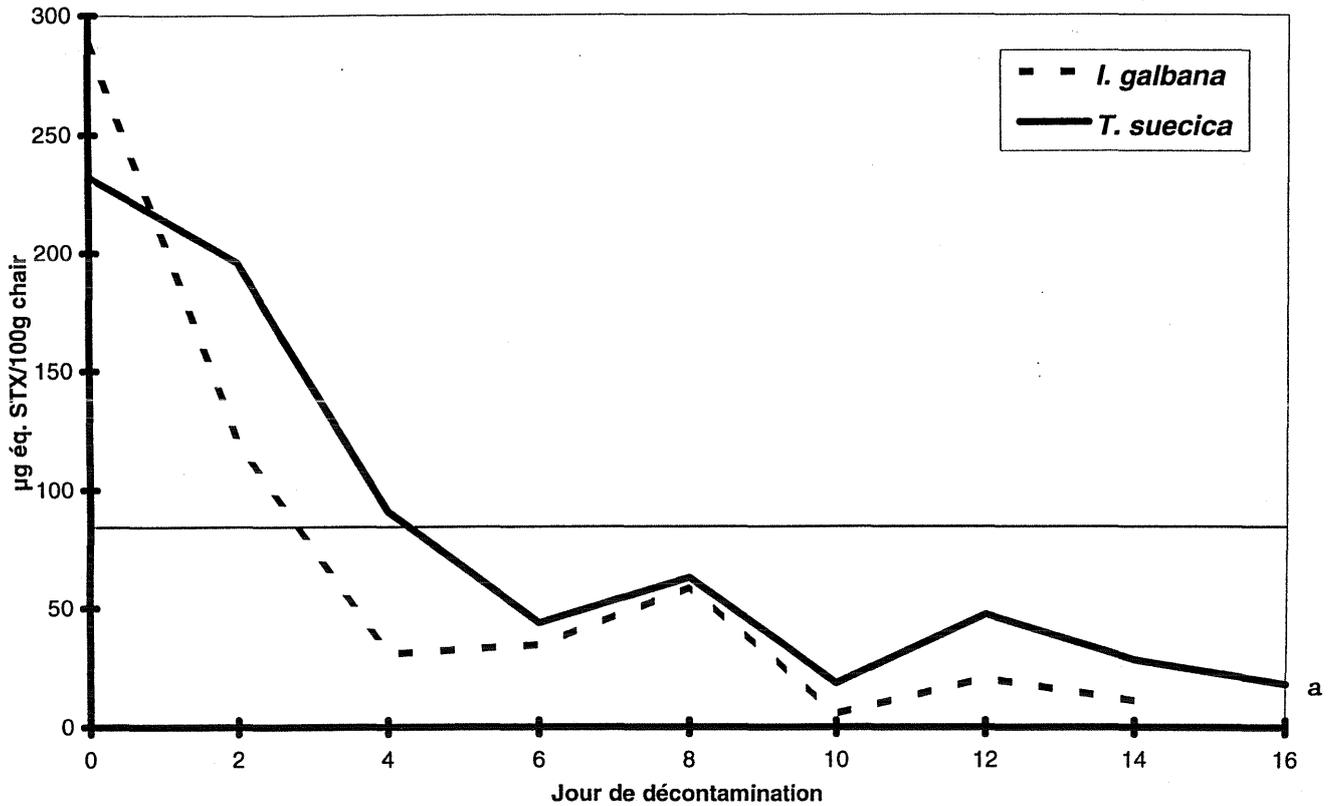
3.2.3. Paramètres toxicologiques

Seuls les résultats concernant le dosage des toxines B et d'une partie des toxines C sont disponibles. L'analyse de ces toxines a été effectuée prioritairement, le profil toxinique de la souche d'*Alexandrium minutum* indiquant la seule présence de GTX3, GTX2 et de quelques traces de toxines C.

La décontamination des huîtres s'effectue selon un mode biphasique (fig. 18 a et b). On note pour les deux expérimentations une première phase de décroissance rapide de la concentration en toxines B (valeurs inférieures à la norme d'interdiction de commercialisation des coquillages de 80 µg éq. STX/100 g de chair humide entre 4 et 6 jours), suivie d'une phase de décontamination plus lente avec une légère remontée des concentrations, celles-ci restant cependant inférieures au seuil de salubrité de 80 µg éq. STX.100 g.

Le bac 2 de l'expérimentation de mars présente une concentration maximale en toxines B au deuxième jour de décontamination alors que la valeur maximale devrait être observée à J0. Cet artefact s'explique par le nombre d'analyses limité à 3 ou 4 huîtres par point cinétique et par la différence d'activité entre les individus : sur les 3 huîtres prélevées à J0, 2 ont eu en effet des taux d'activité faibles pendant la période de contamination, à la différence des huîtres prélevées à J2 pour ce même bac. On observe une très grande variabilité individuelle de la teneur en toxines B des huîtres, suite à la contamination par *A. minutum*.

Décontamination Huîtres 96



Décontamination Huîtres 97

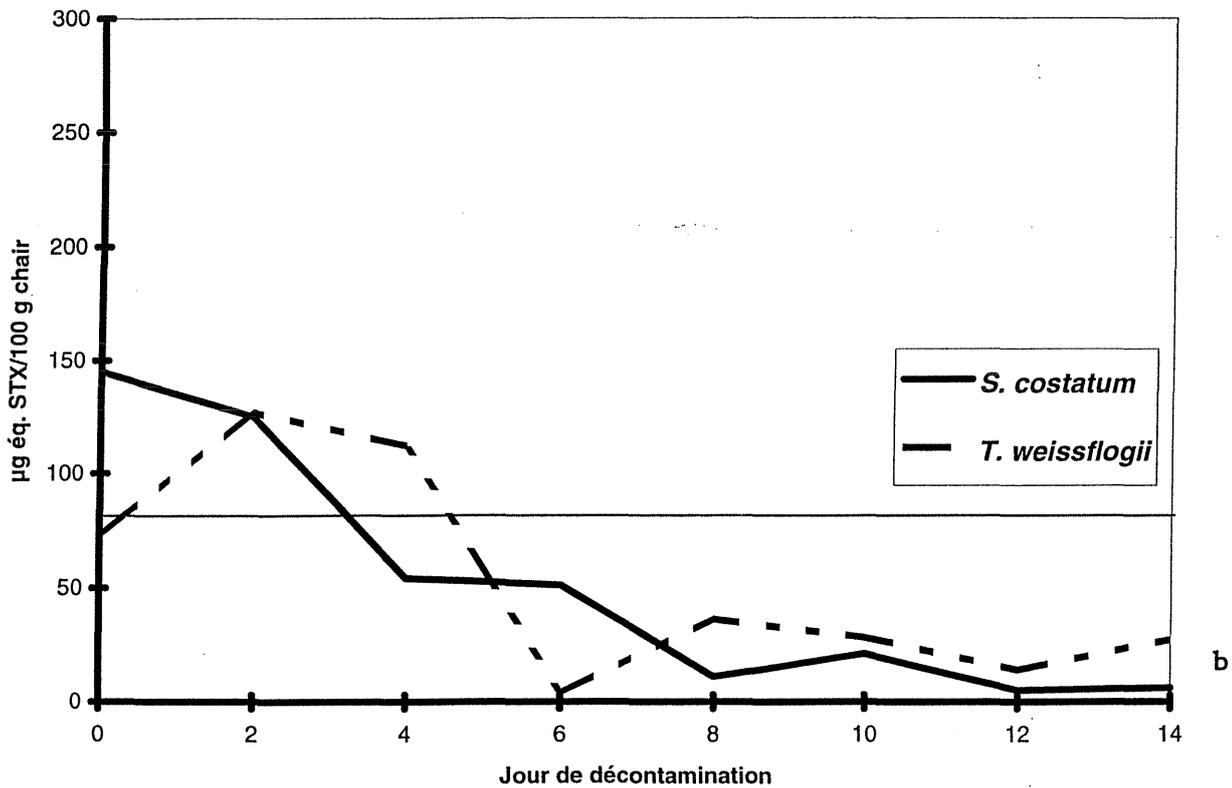


Figure 18 : Décontamination (taux moyens) exprimée en concentration totale de toxines paralysantes dans les tissus des huîtres au cours des expériences de septembre 1996 (a) et mars 1997 (b). Les régimes microalgaux non toxiques correspondants sont indiqués sur les graphes et le seuil de salubrité (80 µg.éq.STX/100 g) représenté par un trait horizontal.

L'utilisation des algues *Isochrysis galbana* ou *Tetraselmis suecica* ainsi que *Skeletonema costatum* ou *Thalassiosira weissflogii* pour l'épuration d'huîtres contaminées par *A. minutum* ne modifie pas significativement au risque de 5 % la cinétique de décontamination en toxines B.

La contamination des huîtres par *A. minutum* apparaît plus importante en terme de concentration en toxines B en octobre qu'en mars, alors que l'apport en algues toxiques a été équivalent et que l'on a pu noter une activité globale et un taux de filtration supérieurs en mars pendant la phase de contamination. Cette différence pourrait peut-être s'expliquer par une durée d'exposition à l'algue toxique plus courte au mois de mars.

L'évolution de la teneur en toxines C (fig. 19) au cours de la phase de décontamination présente le même profil que celui des toxines B, selon deux phases. On constate également que les concentrations en toxines C dans la chair des coquillages sont très basses et nettement inférieures à la norme de 80 μg $\text{STX}/100$ g de chair humide. De plus, la cinétique de décontamination des huîtres selon le régime algal utilisé en phase d'épuration (*Skeletonema costatum* ou *Thalassiosira weissflogii*) ne diffère pas significativement au risque d'erreur de 5 % pour les toxines C.

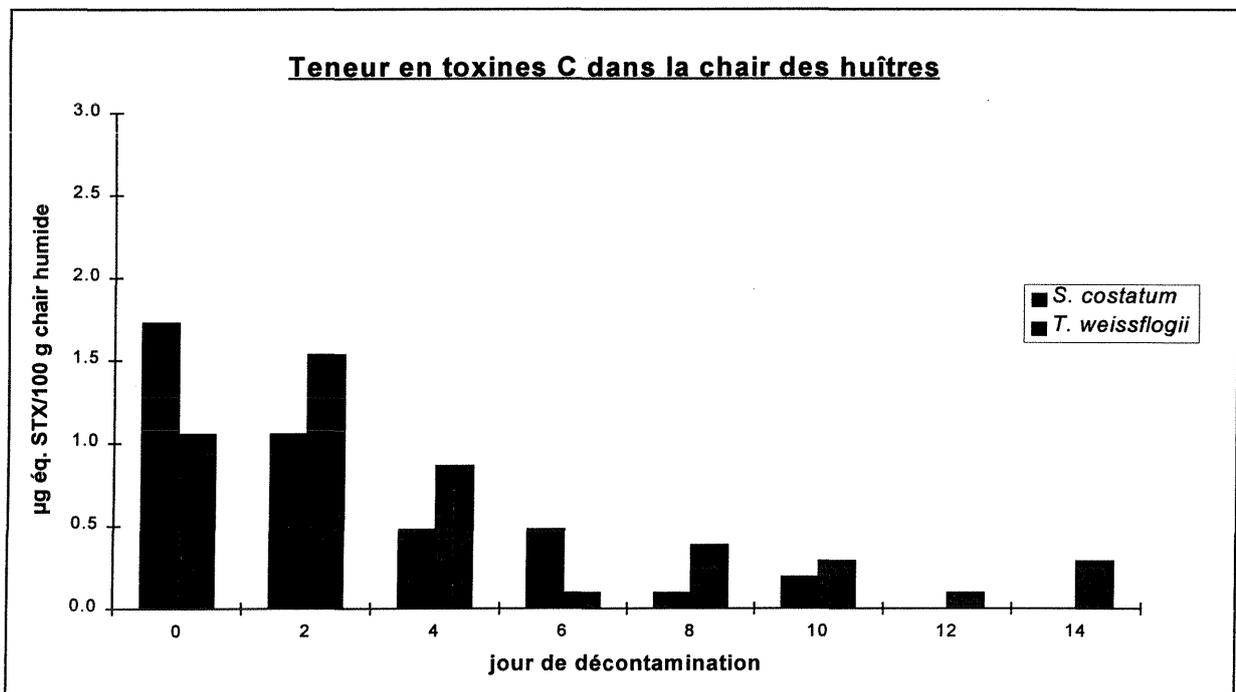


Figure 19 : Evolution du taux de toxines C dans la chair des huîtres. Epuration par *S. costatum* et *T. weissflogii*.

Afin de comparer les valeurs observées de contenu toxinique des coquillages au cours de l'épuration avec l'apport théorique en toxine dans l'eau recirculante une approche globale a été réalisée.

On peut, en effet, essayer d'estimer la quantité de toxine théoriquement accumulée par les bivalves en utilisant le taux de filtration, la concentration cellulaire à l'instant t dans le bac et le contenu toxinique moyen de chaque cellule d'*A. minutum* (0,5 μg . STX par cellule).

Le calcul théorique du taux de toxine accumulé par les huîtres serait alors le suivant :

Taux de filtration x Concentration cellulaire par litre x temps x 0,5 =
quantité de toxines paralysants (en pg) accumulées pendant la durée de l'expérience.

Les résultats ont été ramenés à des g de PS de bivalves, puis à 100 g de chair humide, pour être comparables avec les données de l'analyse en CLHP (tabl. 3).

	Théoriques	Observées
Expérience 1 (octobre 96)	120	232 289
Expérience 2 (mars 97)	53	73 145

Tableau 3 : Valeurs théoriques et observées d'accumulation de toxines PSP dans les tissus (en µg.éq.STX/100 g).

L'écart important entre ces valeurs peut résulter de différents facteurs : 1) modification de la toxicité de la souche d'*A. minutum* dans les conditions expérimentales (facteur de stress entraînant une production accrue de toxine), 2) sur-estimation de la concentration toxinique dans les tissus du fait de la variation individuelle.

Ces deux hypothèses nécessiteront, lors des prochaines expériences, de contrôler la toxicité d'*A. minutum* non plus seulement en culture mais dans des échantillons prélevés dans les raceways, et également de comparer l'activité des huîtres prélevées pour analyse chimique à l'activité moyenne globale de la population.

A titre indicatif, pour l'expérience 2 le pourcentage moyen d'activité de chaque population d'huître pendant 8 jours a été respectivement de 49 % pour le raceway 1 et de 50 % pour le raceway 2.

Lorsque l'on compare les valeurs de toxicité et de pourcentage d'activité moyen par huître pour chaque raceway (tabl. 4) il apparaît clairement que la quantité de toxine est bien liée à l'activité de l'huître analysée et qu'elle est d'autant plus importante que l'activité individuelle est supérieure à la moyenne des activités.

	Huître	% Activ.	µ.éq.STX
Raceway 1	1	58	371
	2	52	76
	3	23	11
Raceway 2	1	62	222
	2	4	5
	3	35	17

Tableau 4 : Pourcentages d'activités individuelles et concentrations toxiques correspondantes dans les tissus des huîtres prélevées au jour 0 de décontamination dans chaque raceway.

3.2.4. Paramètres biochimiques

Afin de comparer les valeurs nutritives de chaque régime microalgal testé, des analyses de GLP ont été réalisées sur chaque souche (tabl. 5).

Echantillon	<i>I. galbana</i>	<i>T. suecica</i>	<i>S. costatum</i>	<i>T. weissflogii</i>	<i>A. minutum</i>
Nbr de cellules / ml	6.3 10 ⁶	1.15 10 ⁶	1.7 10 ⁶	0.4 10 ⁶	0.068 10 ⁶
Poids cell (pg)	19.10	131.10	63.21	319.56	1000
<u>Cendres</u>					
(% de MS)	10.75	18.08	39.81	41.88	17.49
(pg / cell)	2.05	23.7	25.2	133.8	174.9
<u>Sucres totaux</u>					
(% de MS)	3.41	0.43	3.12	3.39	0.45
(pg / cell)	0.65	0.56	1.97	10.83	4.5
<u>Protéines</u>					
(% de MS)	41.81	46.91	27.7	24.79	14.41
(pg / cell)	7.99	61.50	17.51	79.22	144.10
<u>Lipides</u>					
(%de MS)	26.68	14.44	10.04	9.6	10.88
(pg / cell)	5.10	18.93	6.35	3.07	108.80

Tableau 5 : Composition biochimique des algues.

Les diatomées (*S. costatum* et *T. weissflogii*) qui possèdent une enveloppe riche en silice contiennent de forts taux de matière inorganique (autour de 40 %). L'analyse met en évidence une composition pauvre en glucides, de 0,5 % à 3,5 % environ selon les algues.

Le taux de protéines varie de 25 % environ pour les diatomées jusqu'à des valeurs plus importantes (40 - 45 % environ) pour *I. galbana* et *T. suecica*.

Le taux de lipides varie de 10 % environ pour les diatomées et *A. minutum* jusqu'à 27 % pour *I. galbana*.

En ce qui concerne la chair des huîtres, elle est composée d'une teneur élevée en protéines (de 40 à 45 % environ), d'un taux de lipides oscillant autour de 5 - 15 %, et d'une plus faible quantité de glucides (3 % environ) avec de très fortes variations individuelles. La matière inorganique représente 15 % environ du poids sec de l'individu (figures 20 et 21).

Selon le régime algal utilisé pour l'épuration des coquillages, on observe des différences dans la composition biochimique des huîtres.

Au mois d'octobre, le taux de lipides diminue pour les huîtres nourries avec *T. suecica* et leur taux de matière inorganique augmente par rapport aux huîtres alimentées avec *I. galbana*.

Dans l'expérimentation du mois de mars, la teneur en lipides et en matière inorganique ne diffèrent pas significativement d'un régime à l'autre, par contre, l'augmentation en glucides des huîtres nourries avec *T. weissflogii* est significative au risque de 5 % de même que l'augmentation du taux de protéines pour les huîtres alimentées avec *S. costatum*.

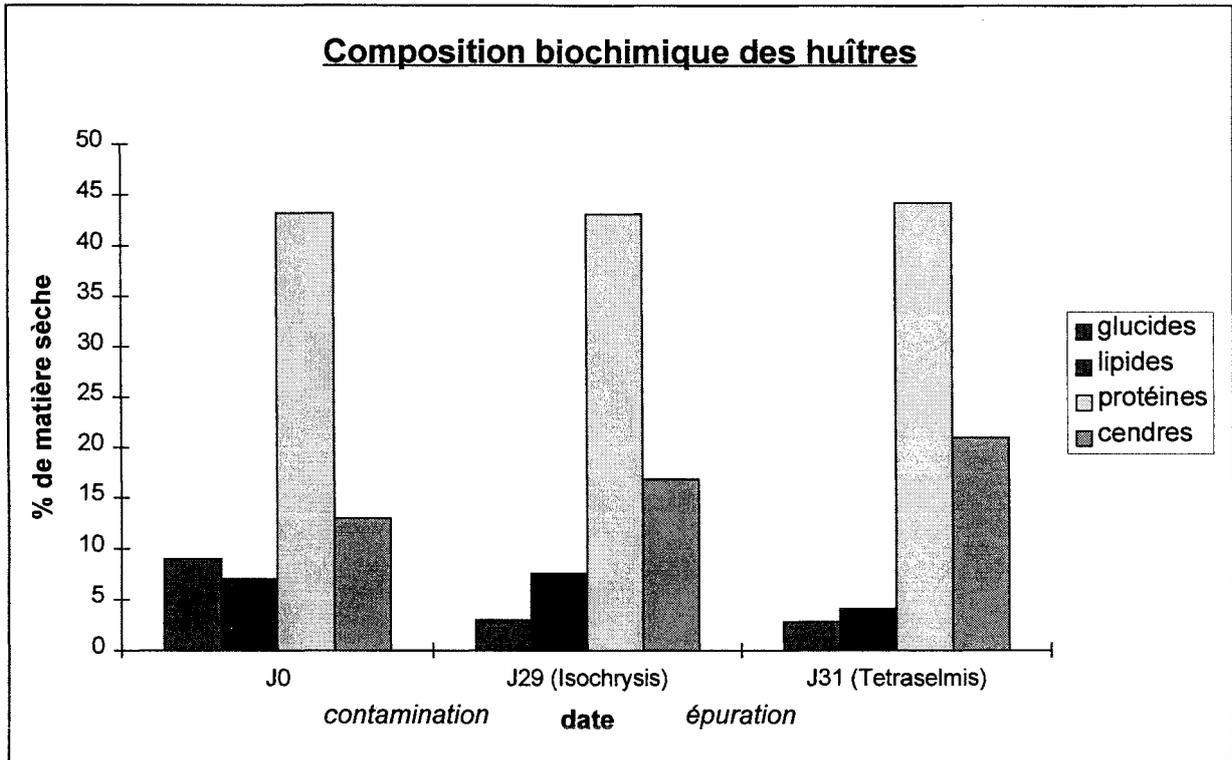


Figure 20 : Evolution de la composition biochimique de la chair des huîtres (octobre 1996).

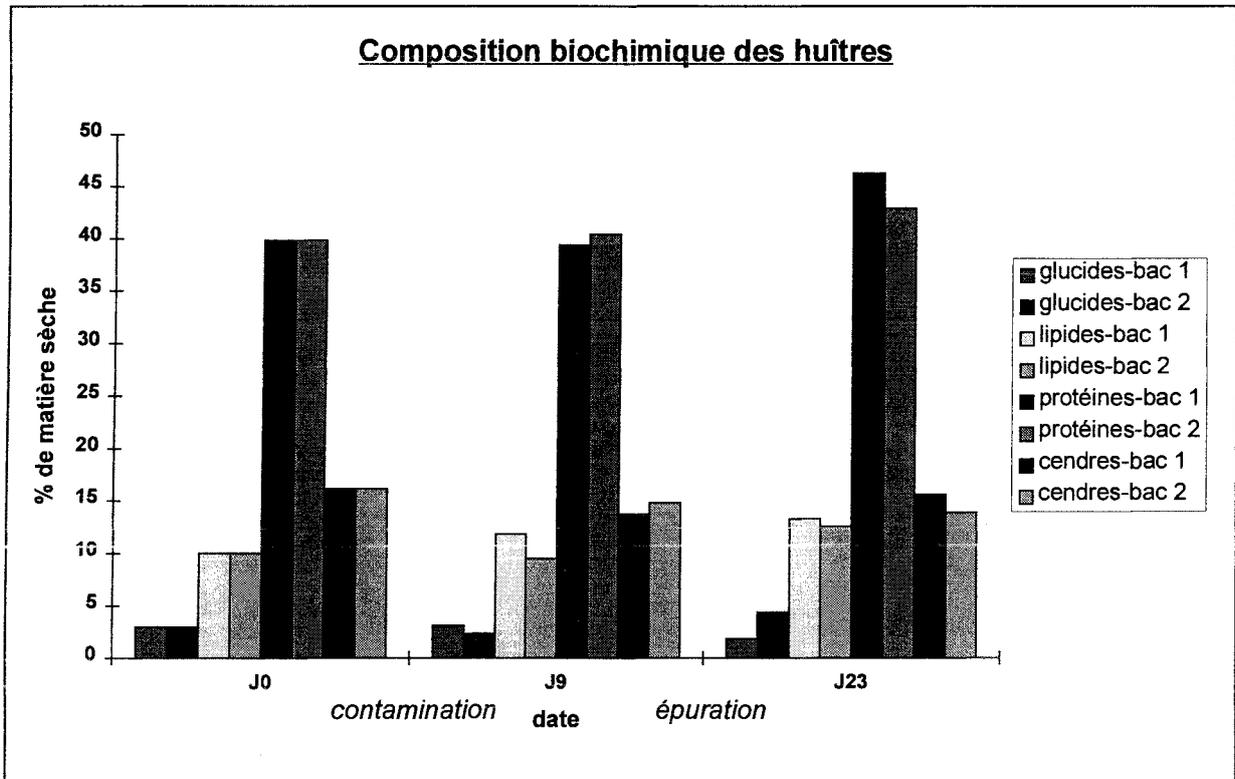


Figure 21 : Evolution de la composition biochimique de la chair des huîtres (mars 1997, bac 1 : *S. costatum* ; bac 2 : *T. weissflogii*).

4. DISCUSSION ET CONCLUSIONS

La mise au point du module expérimental a nécessité de nombreux essais préliminaires. Il s'agissait, en effet, de passer d'un système en circuit ouvert (Bardouil *et al.*, 1993), favorisant l'étude individuelle d'un petit nombre de bivalves (six huîtres) mais avec des débits faibles (5 l.h^{-1}) et des concentrations cellulaires importantes ($2\,000 \text{ cellules.ml}^{-1}$) pour compenser la faiblesse de l'apport, à un système en circuit fermé permettant des mesures et observations sur une population de 45 individus).

Les essais préliminaires ont permis : 1) d'optimiser la méthode : modes de dénombrement cellulaire, injection progressive des cultures, fréquence de renouvellement d'eau en fonction de la teneur journalière en ammoniac, mise au point du système de régulation automatique du taux de chlorophylle a, mais aussi 2) de comparer les activités de filtration et la production de biodépôts chez *Alexandrium minutum*, espèce de dinoflagellé producteur de toxines paralysantes (seule espèce toxique PSP recensée actuellement sur les côtes françaises) et chez *Scrippsiella trochoidea*, dinoflagellé non toxique de même taille ($29,5 \mu\text{m}$ et $26,9 \mu\text{m}$ respectivement) et de valeur nutritive comparable ($1,9$ et $1,2 \text{ mg/millions de cellules de TPM}$, respectivement).

Dans ce dernier cas, il a été constaté des productions supérieures de biodépôts en quatre jours d'exposition et quelle que soit la saison pour *S. trochoidea*, bien que la production soit systématiquement supérieure avec *A. minutum* le premier jour d'exposition. Une consommation plus importante le premier jour de contact peut s'expliquer par les effets du transport et du conditionnement qui placeraient les bivalves en régime alimentaire "réduit" avant l'expérience et entraîneraient une activité accrue le premier jour, puis stabilisée par la suite.

Il semblerait, en outre, que les huîtres manifestent une préférence pour *A. minutum* mais qu'un certain effet inhibiteur, par rapport à *S. trochoidea*, se mette en place assez rapidement. Cet effet est visible sur les taux d'activités des huîtres nourries avec *A. minutum* puisqu'ils passent en quatre jours de 90 à 50 % et se stabilisent ensuite, avec des oscillations, autour de cette valeur pour les durées d'exposition plus longues.

En ce qui concerne les expériences longue durée, on constate que les paramètres physiologiques des huîtres nourries avec *A. minutum* varient peu d'un bac à l'autre et que les taux de filtration sont faibles, de l'ordre de $0,25 \text{ l.h}^{-1}$ en octobre et de $0,5$ à $0,6 \text{ l.h}^{-1}$ en mars, soit un peu plus élevés. Les taux de consommation sont du même ordre dans les deux expériences : $0,10$ à $0,20 \text{ mg.h}^{-1}$. Ces résultats ne sont pas très éloignés de ceux trouvés avec un système en circuit ouvert (Bardouil *et al.*, 1993) pour les filtrations, mais sont inférieurs, pour la consommation, à ce qui avait été observé avec des espèces plus toxiques (Lassus *et al.*, 1996).

Il faut noter que selon certains auteurs (Lesser et Shumway, 1993) les résultats peuvent varier de façon non négligeable selon la saison, en particulier pour le taux de filtration : *Crassostrea virginica* et *Ostrea edulis* nourries avec des cultures

pures d'*A. tamarense* toxique et d'*Isochrysis* sp montrent un comportement inverse entre hiver et été, la préférence allant vers *A. tamarense* en été.

Les productions de biodépôts (fécès + pseudofèces) semblent cycliques en octobre (succession de maximums et minimums). Elles présentent un aspect inversé : légèrement plus importantes en fin de contamination et décroissantes enfin de décontamination. Les productions sont plus importantes avec *Tetraselmis* en début de décontamination, et avec *Isochrysis* dans la deuxième partie de la décontamination. En mars, les productions sont légèrement plus importantes qu'en octobre pour *A. minutum*, ce qui confirme les observations sur les taux de filtration et de consommation. En régime de décontamination il n'y a pas de différence marquée entre les deux diatomées testées mais les productions sont maximales (entre 10 et 15 mg TPM.h⁻¹) les trois premiers jours.

Tous ces résultats, de même que l'aspect des cinétiques d'épuration, sont à rapprocher des activités moyennes des 45 huîtres au cours des deux expériences : du même ordre pour *A. minutum* et faible (seulement 40 à 50 % d'activité) cette activité passe à 80 - 90 % dès le changement de régime, pour *Isochrysis*, *Skeletonema* et *Thalassiosira*. Il n'y a pas de différence, en revanche, avec *Tetraselmis*. En terme d'épuration des toxines B, les concentrations toxiques décroissent rapidement, en 4 jours et pour les deux expériences, pour se stabiliser en dessous du seuil sanitaire (80 µg.éq.STX.100 g⁻¹). Cet aspect biphasique correspond à ce qui est décrit dans la littérature en ce qui concerne la cinétique d'épuration des biotoxines PSP dans les bivalves (Silvert et Cembella, 1995 ; Lassus *et al.*, 1989).

Il est difficile, à partir de ces résultats, de définir si une des espèces fourrages a un effet favorable sur la cinétique d'épuration. Tout au plus, peut-on dire, malgré les écarts importants entre individus, que la décontamination avec *Isochrysis* semble plus rapide.

Il convient de remarquer les modifications de composition biochimique des microalgues du type de celles utilisées pour la décontamination, selon les auteurs et les conditions de culture. Les résultats d'analyse présentés dans ce rapport ne sont pas très éloignés de ceux de Brown (1991) pour *Skeletonema costatum*. En revanche, des teneurs trouvées en GLP pour *T. suecica* sont différentes et seule le pourcentage de lipides d'*I. galbana* est comparable. Le choix du milieu de culture, pour cette dernière espèce, peut modifier considérablement la proportion des protéines et lipides (Canizares *et al.*, 1994). Par ailleurs, *I. galbana* est connue pour contenir de grandes quantités de lipides utiles à la croissance des bivalves, d'où sa large utilisation en aquaculture (Sukenic et Wahnou, 1991). Néanmoins, les proportions d'acides gras saturés et insaturés varient avec la quantité d'azote disponible dans le milieu et la luminosité.

En ce qui concerne *T. suecica*, les taux d'activités faibles des huîtres et la diminution de production des biodépôts au cours de la décontamination, indiquent une utilisation moins intéressante de ce flagellé bien qu'il soit cité comme une nourriture complémentaire d'*I. galbana* améliorant la croissance de la moule (Herrero Lopez *et al.*, 1992).

Si l'on considère les analyses biochimiques sur les huîtres, on constate peu de différence, selon les régimes, entre la composition à $J = 0$ et en fin de décontamination, excepté pour les glucides qui augmentent significativement avec le régime à base de *T. weissflogii*.

En conclusion, il apparaît donc que :

1. Le système en circuit fermé mis au point dans le cadre de l'étude correspond aux exigences des objectifs fixés contractuellement.
2. L'utilisation, sur le plan alimentaire, de la souche faiblement toxique *A. minutum* (largement distribuée en France), fait apparaître une efficacité de filtration, de consommation et une activité valvaire réduites par rapport aux espèces habituellement utilisées en aquaculture (algues fourrages). Néanmoins, cette espèce est consommée à peu près de la même façon qu'un autre dinoflagellé non toxique, *S. trochoidea*. L'effet inhibiteur de la toxine sur le comportement alimentaire serait donc réel mais réduit et n'empêcherait pas les huîtres de stocker les toxines paralysantes dans leurs tissus.
3. L'épuration des huîtres avec des régimes constitués de phytoflagellés ou de diatomées non toxiques amène rapidement (4 jours) les concentrations en toxines B en dessous du seuil de salubrité, quel que soit le régime utilisé, administré en valeur alimentaire équivalente au régime d'*A. minutum*. Il semble cependant que le régime à base d'*I. galbana* entraîne une décontamination un peu plus rapide (3 jours).
4. La composition biochimique des algues fourrages n'apporte pas d'information décisive sinon qu'*I. galbana* présente les proportions les plus élevées en lipides, par rapport aux autres régimes.
Ce résultat est sans effet sur la composition des huîtres après 15 jours d'épuration, soit une durée d'alimentation relativement courte.
5. Les variations individuelles importantes entre chaque huître rendent difficile l'interprétation des résultats toxicologiques : le suivi individuel de l'activité des huîtres permettrait éventuellement, lors de prochaines expériences, de choisir en début d'épuration les individus ayant filtré pendant toute la durée de la contamination et donc d'obtenir un indice de contamination maximale, ce qui ne représenterait plus la population. Ce procédé, en lieu et place de la méthode de choix "au hasard" des bivalves destinés à l'analyse, est à discuter.
6. La composition biochimique des algues fourrages et la teneur en toxines d'*A. minutum* peuvent très probablement varier selon l'âge de la culture et les conditions d'éclairage. Ces variations peuvent dès lors modifier les cinétiques d'accumulation et d'épuration. Un contrôle plus rigoureux de ces conditions initiales (avant expérience) est donc souhaitable.

5. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BARDOUIL M., BOHEC M., CORMERAIS M., BOUGRIER S. & LASSUS P. (1993). Experimental study of the Effects of a Toxic microalgal diet on feeding of the oyster *Crassostreas gigas* Thunberg. *J. Shell fish Res.* 12 (2) : 417-422.
- BAYNE B.L., BROWN D.A., BURNS K., DIXON D.R., IVANOVICI A., LIVINGSTONE D.R., LOWE D.M., MOORE M.N., STEBBING A.R.D. & WIDDOWS J. (1985). The effects of stress and pollution on marine animals. *Praeger Scientific, New York*, 384 p.
- BLIGH E.G. & DYER W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37 : 911-917.
- BRICELJ V.M., LEE J.H., CEMBELLA A.D. & ANDERSON D.M. (1990). Uptake of *Alexandrium fundyense* by *Mytilus edulis* and *Merceneria merceneria* under controlled conditions. In : *Toxic Marine Phytoplankton*. Graneli *et al.*, (Editors) : 269-274. New York, Elsevier Sci. Publi. Co.
- BROWN M.R. (1991). The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. *J. exp. Mar. Biol. Ecol.* 145 (1) : 79-99.
- CANIZARES R.O., MOLINA G. & DOMINGUEZ A.R. (1994). Chemical composition of two marine microalgae used as food in mariculture. *Cryptogamie. Algol.* 15 (2) : 121-133.
- DUBOIS M., GILLES K.A., HAMILTON J.K., REBERS P.A. & SMITH F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chemistry*, 28 (3) : 350-356.
- ERARD-LE DENN E. (1991). *Alexandrium minutum* (Dinophycées). In : *Le phytoplancton nuisible des côtes de France*, Sournia *et al.*, eds, IFREMER/CNRS Publish : 83-90.
- HAWKINS A.J.S., SMITH R.F.M., BAYNE B.L. & HERAL M. (1996). Novel observations underlying fast growth of suspension-feeding shellfish in turbid environments : *Mytilus edulis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 131, 179-190.
- HAWKINS A.J.S., SMITH R.F.M., BOUGRIER S., BAYNE B.L. & HERAL M. (1997). Manipulations of dietary conditions for maximal growth in mussels, *Mytilus edulis*, from the Marennes-Oleron Bay, France. *Aquat. Living Resour.* vol. 10 n° 1, 13-22.
- KOROLEFF F. (1969). Direct determination of ammonia in natural waters as indophenol blue. *ICES, C.M. 1969/C* : 9 Hydr. Comm.
- LASSUS P., BARDOUIL M., LEDOUX M., MURAIL I., BOHEC M., TRUQUET P., FREMY J. M. & ROHMER V. (1992). Paralytic phycotoxin uptake by scallops (*Pecten maximus*). *Aquat. Living Resour.* 5 (3).

- LASSUS P., FREMY J.M., LEDOUX M., BARDOUIL M., BOHEC M. (1989). Patterns of experimental contamination by *Protogonyaulax tamarensis* in some French commercial shellfish. *Toxicon* 27 (12) : 1313-1321.
- LASSUS P., BARDOUIL M., LEDOUX M., BOHEC M., MURAIL I. & FREMY J. M. (1996). Role of the kidneys in bioaccumulation of paralytic toxins by scallop (*Pecten maximus*) tissues. *J. Natural Toxins*, 5 (1) : 107-115.
- LEDOUX M. (1992). Optimisation d'un dosage par CLHP des phycotoxines paralysantes ; application à l'étude de la contamination de fruits de mer. Mémoire ingénieur. C.N.A.M., 68 p.
- LESSER M.P. & SHUMWAY S.E. (1993). Effects of toxic dinoflagellates on clearance rates and survival in juvenile bivalve molluscs. *J. Shellfish. Res.* 12 (2) : 377-381.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A L. & RANDALL RT.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193 : 263-275.
- MOREAU C. (1993). Caractéristiques et gestion des eaux souterraines salées de la baie de Bourgneuf : synthèse des connaissances et standardisation de protocoles communs d'analyse des paramètres de qualité. *Rapport ISOMER/Syndicat Dév. Aquac. Pays de la Loire*, 80 pp.
- OSHIMA Y., MACHIDA M., SASAKI K., TAMAOKI Y. & YASUMOTO T. (1984). Liquid chromatographic-fluorometric analysis of paralytic shellfish toxins. *Agric. Biol. Chem.* 48, 1707-1711.
- OSHIMA Y., SUGINO K. & YASUMOTO T. (1989). Latest advances in HPLC analysis of paralytic shellfish toxins. *In* : Mycotoxins and Phycotoxins'88 (S. NATORI, K. HASHIMOTO, Y. UENO, eds), Amsterdam, Elsevier, 319 - 326.
- PROVASOLI L. (1966). Media and prospects for the cultivation of marine algae. *In* : Culture and Collection of algae Proc. U.S. - Japan Conference held at Hakone, Sept. 12-15, 1966. The Jap. Soc. of Plant Physiologists.
- SHUMWAY S.E., 1989. Toxic algae, a serious threat to shellfish aquaculture. *World Aquaculture*. 20 (4) : 65-74.
- SHUMWAY, S. E., BARTER J. & SHERMAN-CASWELL (1990). Auditing the impact of toxic algal blooms on oysters. *Environmental Auditor*. 2 (1) : 41-56.
- SHUMWAY S. E. & CUCCI T. L. (1987). The effects of the toxic dinoflagellate *Protogonyaulax tamarensis* on the feeding and behaviour of bivalve molluscs. *Aquatic Toxicology*, 10 : 9 - 27.
- SHUMWAY S. E. CUCCI T. L., GAINEY L. & YENTSCH, C. M. (1985a). A preliminary study of the behavioral and physiological effects of *Gonyaulax tamarensis* on bivalve molluscs. *In* : *Toxic Dinoflagellates*. Anderson et al., (Eds) : 389-394. Amsterdam, Elsevier Sci. Publi. Co.

- SHUMWAY S.E., CUCCI T.L., NEWELL R.D., YENTSCH C.M. (1985b) Particle selection, ingestion, and absorption in filter-feeding bivalves. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 91 : 77-92.
- SILVERT W.L. & CEMBELLA A.D. (1995). Dynamic modelling of phycotoxin kinetics in the blue mussel, *Mytilus edulis*, with implications for other marine invertebrates. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 52 : 521-531.
- SUKENIK A. & WAHNON R. (1991). Biochemical quality of marine unicellular algae, with special emphasis on lipid composition. *Aquaculture*, 97 (1) : 61-72.
- VILLETARD V. (1980). Etude des eaux de forage sur la station Aqualive, île de Noirmoutier (Vendée). *Rapport de stage France - Aquaculture*, 22 pp.