

## Étude d'un système de filtration de l'eau de mer pour l'alimentation des bassins conchylicoles insubmersibles durant des efflorescences toxiques

Rapport de fin de contrat

Cas d'une efflorescence à *Alexandrium minutum* et à *Dinophysis* spp.

Auteurs et Coordination

Florence MONDEGUER, Claire MARCAILLOU

Collaborateurs

Manoëlla SIBAT, Elizabeth NEZAN,

Dominique LE GAL, Jean-Claude LE SAUX, Grégory ROCHER

Convention ACT/018/2006-Ifremer Ctt n° 03/1214 794/F



# Sommaire

Contexte et objectif de l'étude .....	3
---------------------------------------	---

## **Première partie : Cas d'une efflorescence à *Alexandrium minutum***

<b>1. Quelques généralités sur les toxines paralysantes et <i>A. minutum</i></b> .....	5
1.1. <i>Structure et propriétés des toxines</i> .....	5
1.2. <i>Description d'<i>Alexandrium minutum</i></i> .....	6
<b>2. Description de l'expérience</b> .....	7
2.1. <i>Historique du déclenchement des opérations</i> .....	7
2.2. <i>Description du lieu et du déroulement de l'étude</i> .....	7
2.3. <i>Matériel et méthodes</i> .....	10
2.3.1. <i>Evaluation de la concentration en <i>Alexandrium minutum</i> dans l'eau</i> .....	10
2.3.2. <i>Dosage des toxines paralysantes par le test biologique</i> .....	11
2.3.3. <i>Dosage physico-chimique des toxines paralysantes</i> .....	11
<b>3. Résultats et discussion</b> .....	13
3.1. <i>Suivi de la concentration en <i>A. minutum</i></i> .....	13
3.2. <i>Toxicité du phytoplancton</i> .....	13
3.3. <i>Suivi des coquillages</i> .....	14
<b>4. Conclusion sur le cas <i>Alexandrium</i></b> .....	18

## **Deuxième partie : Cas d'une efflorescence à *Dinophysis spp***

<b>1. Généralités sur le genre <i>Dinophysis</i> et ses toxines</b> .....	19
1.1. <i>Description du genre <i>Dinophysis</i></i> .....	19
1.2. <i>Les <i>Dinophysistoxines</i> ou <i>DTXs</i></i> .....	19
<b>2. Description du lieu et du déroulement de l'étude</b> .....	21
<b>3. Matériel et méthodes</b> .....	24
3.1. <i>Evaluation de la concentration en <i>Dinophysis acuminata</i></i> .....	24
3.2. <i>Evaluation de la toxicité des bivalves par le test biologique</i> .....	24
3.3. <i>Dosage physico-chimique des <i>dinophysistoxines</i></i> .....	24
<b>4. Résultats et discussion</b> .....	25
4.1. <i>Suivi de la concentration en <i>Dinophysis spp</i></i> .....	25
4.2. <i>Evaluation de la toxicité des coquillages</i> .....	27
4.3. <i>Evaluation de la toxicité de <i>Dinophysis spp</i></i> .....	27
<b>5. Conclusion sur le cas <i>Dinophysis</i></b> .....	28

**Troisième partie : Mise en évidence d'une contamination éventuelle des moules par de l'eau de mer filtrée contenant de l'acide okadaïque dissous**

<b>1. Introduction</b> .....	29
<b>2. Matériel et méthodes</b> .....	29
2.1. <i>Evaluation de la concentration nominale en AO</i> .....	29
2.2. <i>Expérience préliminaire de maintien des moules</i> .....	29
2.3. <i>Contamination expérimentale</i> .....	29
2.4. <i>Mesure de l'indice de condition</i> .....	30
2.5. <i>Dosage de l'AO dans les moules et l'eau de mer</i> .....	30
<b>3. Résultats</b> .....	31
3.1. <i>Etat des moules par l'indice de condition</i> .....	31
3.2. <i>Evaluation de la toxicité</i> .....	31
<b>Conclusion</b> .....	32
<b>Bibliographie</b> .....	33

# Étude d'un système de filtration de l'eau de mer pour l'alimentation des bassins conchylicoles insubmersibles durant des efflorescences toxiques

Convention ACT/018/2006-IFREMER Ctt n°03/1214 794/F

Rapport de fin de contrat

Cas d'une efflorescence à *Alexandrium minutum* et à *Dinophysis spp*

Auteurs et Coordination

Florence MONDEGUER, Claire MARCAILLOU

Collaborateurs :

Manoëlla SIBAT, Elizabeth NEZAN, Dominique LE GAL, Jean-Claude LE SAUX, Grégory ROCHER, Claire MARCAILLOU

## Contexte et objectif de l'étude

Le littoral français est touché tous les ans par des proliférations d'algues toxiques dont l'ampleur géographique et la durée sont très variables selon les genres/espèces et les années.

Par exemple, à partir du mois de mai, voire fin avril certaines années, les côtes sud de la Bretagne et celles des Pays de la Loire sont touchées par des proliférations de *Dinophysis spp*, genre responsable des intoxications diarrhéiques et cause la plus fréquente des fermetures de zones conchylicoles. Depuis 1988, la côte nord de la Bretagne est exposée à des efflorescences à *Alexandrium minutum*, producteur de toxines paralysantes.

Ces fermetures répétées s'accompagnent d'une diminution, voire d'une cessation d'activité pour les établissements d'expédition car l'interdiction des ventes de coquillages fait perdre aux établissements affectés, une clientèle fidélisée.

Pourtant, les professionnels dont les établissements sont situés dans une zone provisoirement fermée pourraient maintenir une activité commerciale en proposant des coquillages sains, en provenance de zones non affectées, soit parce qu'ils y possèdent eux-mêmes d'autres parcs, soit parce qu'ils s'approvisionnent auprès de leurs confrères. Ce maintien nécessite simplement un lieu de stockage à l'abri des algues toxiques. Or, certains conchyliculteurs ont équipé leurs installations de bassins insubmersibles, alimentés en eau de mer filtrée sur un filtre à sable pour l'épuration microbiologique des coquillages. Ils souhaiteraient utiliser cet équipement pour maintenir des bivalves sains dans de bonnes conditions quand leur secteur est affecté par une efflorescence toxique.

La mise en place de cette étude a donc été décidée suite à la conjonction de trois facteurs :

- la prise en compte de la demande des professionnels par le Ministère de l'Agriculture et de la pêche,
- l'existence de cet équipement dans de nombreux établissements bretons où les efflorescences toxiques sont fréquentes,
- les résultats d'une étude préliminaire réalisée avec ce type d'équipement par le laboratoire côtier IFREMER de Concarneau en août 1995, qui avaient été encourageants et méritaient d'être confirmés.

Elle a été cofinancée par les régions Pays de Loire et Bretagne, le Comité National de la Conchyliculture, la Direction Générale de l'Alimentation et une subvention européenne IFOP (Instrument Financier d'Orientation de la Pêche).

L'objectif de l'étude a été de démontrer l'efficacité des bassins filtrants dans les conditions d'utilisation habituelle, c'est-à-dire démontrer la capacité des filtres (à sable, avec ou non système complémentaire) à retenir les algues toxiques et à conserver les coquillages indemnes de toxines phytoplanctoniques. Ces données sont destinées à l'administration pour établir une réglementation quant à l'utilisation et au contrôle de telles installations.

Les deux genres toxiques présentant le plus grand risque : *Alexandrium spp* et *Dinophysis spp* ont été ciblés pour la réalisation de cet objectif. Les contraintes liées à la recherche du maximum de probabilité de leur prolifération et à la disponibilité d'une installation conchylicole adéquate pour y installer les expériences nous ont amené à retenir deux sites géographiques : l'un en Bretagne Sud et l'autre en Bretagne Nord. En 2003, malgré des conditions météorologiques favorables aux développements des deux genres toxiques, une seule expérimentation a pu être réalisée avec *Alexandrium minutum*. Heureusement, en 2004, une prolifération de *Dinophysis spp* en baie de Concarneau nous a permis de mettre en place le deuxième volet de l'étude portant sur *Dinophysis spp*.

Par ailleurs, l'utilisation des filtres à sable dans la filtration de l'eau de mer pose la question du devenir des toxines dans l'eau filtrée, suite à la lyse des cellules retenues et d'une éventuelle contamination des coquillages sains. Pour tenter d'y répondre, une expérience de contamination directe de moules par de l'eau contenant la principale toxine de *Dinophysis*, a été mise en place au laboratoire.

Les deux premières parties du rapport présenteront les résultats obtenus sur les deux cas d'étude : d'abord le cas d'une efflorescence à *Alexandrium minutum* dans l'Aber Benoît, puis le cas d'une prolifération à *Dinophysis* dans la baie de Concarneau.

Une troisième partie exposera les observations recueillies sur l'expérience de contamination directe par l'eau, menée au laboratoire.

## Première partie : Cas d'une efflorescence à *Alexandrium minutum*

### 1. Quelques généralités sur les toxines paralysantes et *A. minutum*

#### 1.1. Structure et propriétés des toxines

D'un point de vue chimique, les toxines paralysantes constituent une famille d'une vingtaine de molécules dont le squelette commun est la saxitoxine (fig. 1). Selon leurs propriétés chromatographiques, on distinguera trois groupes (Hall *et al.*, 1980) :

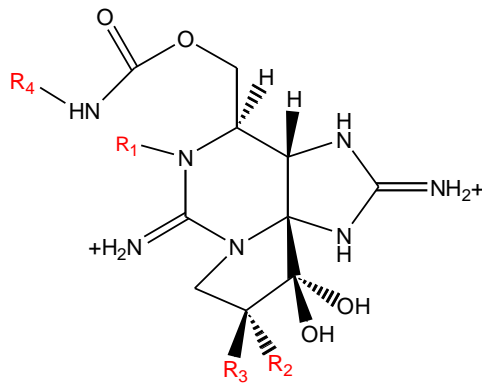
Groupe A : molécules non soufrées, moyennement polaires et très électro-positives : saxitoxine (STX), néoSTX, dcSTX et dcnéoSTX.

Groupe B : molécules mono-soufrées, (substitution d'un groupement sulfate à un hydrogène), polaires et électropositives : gonyautoxines 1 à 4 (GTX1-4), gonyautoxines 5 et 6 ou B1 et B2, dcGTX 1 à 4.

Groupe C : molécules di-soufrées, (dérivés décarbamoyle) très polaires, électronégatives ou sans charge : gonyautoxines C 1 à 4.

Elles sont hydrosolubles, stables à la chaleur et en milieu acide.

Du point de vue de la relation structure/activité, chaque molécule a une activité biologique propre, appelée toxicité spécifique, exprimée en unités souris ou US par micromole de toxine. L'US est définie comme étant la quantité de toxine qui, injectée par voie intrapéritonéale, tue une souris mâle de 20 g en 15 minutes. La présence des sulfonates diminue la toxicité de la molécule. Ainsi, les plus actives sont la STX et la néoSTX, les moins toxiques regroupent les toxines B et C tandis que les dérivés décarbamoyle, dcSTX et dcnéoSTX ont une toxicité intermédiaire. La connaissance de la toxicité spécifique permet de calculer un coefficient de conversion qui sert à traduire la quantification pondérale ou molaire de chaque toxine, obtenue par le dosage chimique, en toxicité exprimée en  $\mu\text{g eq.STX}$ . Les valeurs de ces coefficients seront données pour les toxines qui nous intéressent dans le paragraphe « matériel et méthodes ».



R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	Noms	Toxines	
H	H	H	H	STX	<b>Toxines A</b>	
OH	H	H	H	NéoSTX		
H	H	H	OSO <sub>3</sub> H	B1	<b>Toxines B</b>	
OH	H	H	OSO <sub>3</sub> H	B2		
H	H	OSO <sub>3</sub> H	H	GTX3		{ Epimères
H	OSO <sub>3</sub> H	H	H	GTX2		
OH	H	OSO <sub>3</sub> H	H	GTX1	{ Epimères	
OH	OSO <sub>3</sub> H	H	H	GTX4		
H	H	OSO <sub>3</sub> H	OSO <sub>3</sub> H	C1	<b>Toxines C</b>	
H	OSO <sub>3</sub> H	H	OSO <sub>3</sub> H	C2		
OH	H	OSO <sub>3</sub> H	OSO <sub>3</sub> H	C3		
OH	OSO <sub>3</sub> H	H	OSO <sub>3</sub> H	C4		

Figure 1 : Structure chimique et noms des toxines paralysantes.

## 1.2. Description d'*Alexandrium minutum*

*Alexandrium minutum* est un petit dinoflagellé cuirassé (fig. 2). En effet, la cellule arrondie sans corne ni épine, d'une vingtaine de microns de diamètre, est recouverte d'une thèque et possède deux flagelles qui la rend très mobile. Sa détermination taxinomique repose sur la description de la forme et de la disposition des petites plaques qui constituent la thèque. Elle n'est pas aisée en microscopie optique. C'est une espèce des eaux marines tempérées à chaudes qui peut être à l'origine de vrai bloom (quelques millions de cellules par litre). En France, la première prolifération a eu lieu dans les Abers bretons (Aber-Wrach et Aber Benoît) en août 1988. En juillet 1989, le bloom s'est développé en baie de Morlaix à raison de 3 millions de cellules par litre. L'extension de ces proliférations vers l'est de la côte bretonne pourrait s'expliquer par la dispersion de kystes de résistance décrits dans le cycle biologique de cette espèce et qui ont été trouvés dans les sédiments des Abers. L'espèce française est toxigène mais le profil toxinique est assez simple : il comprend essentiellement deux des gonyautoxines, les GTX2 et 3 et des traces de toxines C.

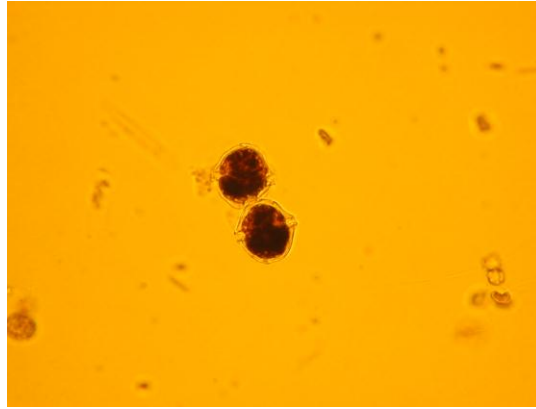


Figure 2 : *Alexandrium minutum* (photo E. Nézan, Concarneau).

## 2. Description de l'expérience

### 2.1. Historique du déclenchement des opérations

Le laboratoire Ifremer/Del de Concarneau qui suit l'évolution des concentrations d'algues toxiques en Bretagne Nord, dans le cadre du REPHY, avait pour mission de déclencher l'alerte quand la concentration en *Alexandrium* dépasserait 500 000 cellules par litre. Le 9 juin, en rivière de Penzé, baie de Morlaix, cette valeur a été atteinte mais quand les conditions matérielles de l'expérimentation ont été réunies, les concentrations sur le site avaient beaucoup diminué : moins d'un millier de cellules par litre le 17 juin et ces faibles valeurs se sont maintenues tout le mois de juillet. Parallèlement, le suivi dans l'Aber Benoît a montré un développement à *Alexandrium*, en amont, qui a atteint 2 millions de cellules par litre le 23 juillet au matin (point hors REPHY). Face à ces conditions de vrai bloom, idéales car proche du site d'expérimentation choisi, il a été décidé de déclencher les opérations dans la journée du 23 juillet.

Pour illustrer l'état de la contamination dans une zone plus large et durant les deux quinzaines qui ont encadré le moment de l'étude, nous rapportons ici les résultats du réseau de surveillance enregistrés par le laboratoire de Concarneau pour les deux points situés en amont et en aval du lieu d'étude (fig. 3).

Au lieu dit Keramoal (en amont de Prat ar Coum), la concentration en *A. minutum* s'est maintenue à une valeur supérieure à 200 000 cellules par litre du 15 juillet au 18 août, tandis que le secteur a été fermé durant toute cette période, les coquillages dépassant le seuil de toxicité.

Au lieu dit Le Vill, (en aval de Prat ar Coum), durant la même période, la densité en *A. minutum* n'a pas dépassé 5 000 cellules par litre ce qui n'a pas justifié de contrôle des coquillages.

### 2.2. Description du lieu et du déroulement de l'étude

L'étude s'est déroulée dans l'établissement conchylicole du site de Prat Ar Coum de Monsieur Madec dans la partie aval de l'Aber (fig. 3). Dans l'établissement, nous disposons de deux bassins insubmersibles, en ciment, d'une capacité de 6 m<sup>3</sup> chacun, alimentés par une pompe de débit variable (20 m<sup>3</sup>/heure au maximum, en circuit fermé) et d'un système d'aération qui assure l'homogénéisation de l'eau. L'un des deux est équipé d'un filtre à sable. Les caractéristiques d'un bassin type sont décrites dans la figure 4.



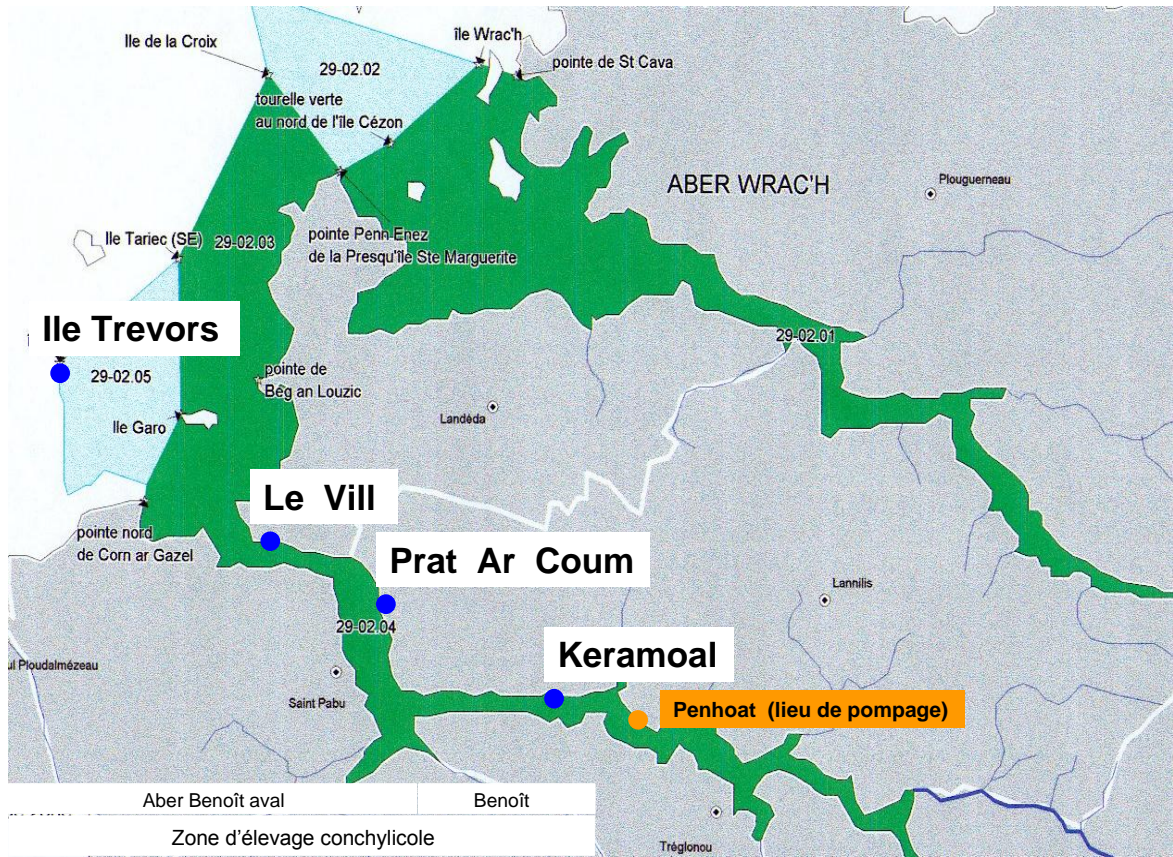


Figure 3 : Carte de l'Aber Benoît.

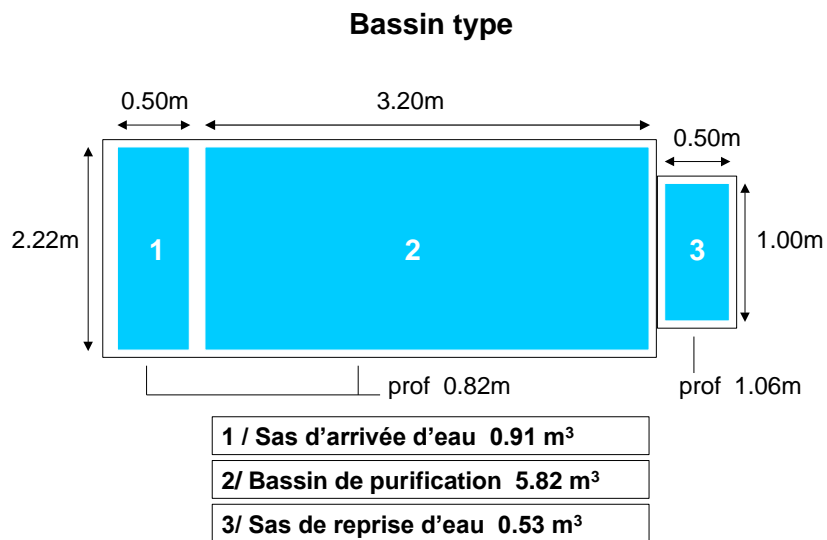


Figure 4 : Bassin type.

Pour mieux cerner la concentration maximale en algues toxiques, les bassins ont été remplis par une eau pompée un peu plus en amont de l'établissement, au point dit Penhoat où les conditions de salinité étaient celles liées habituellement à ce maximum recherché. Le premier pompage ayant fourni une eau très boueuse, il a été effectué un second pompage, ce qui explique l'heure tardive du début de l'expérimentation.

L'eau de remplissage a été déversée en plusieurs fois alternativement dans les deux bassins afin de bien mélanger les volumes délivrés.

Les deux bassins ont été identifiés de la manière suivante :

- Le bassin n° 1 ou bassin témoin positif où l'eau de mer toxique est mise en circulation mais n'est pas filtrée.
- Le bassin n° 2 ou bassin essai, où l'eau de mer toxique est filtrée en circuit fermé sur le filtre à sable.

Les deux bassins ont reçu la même quantité de coquillages mais avec un retard pour le bassin essai, retard défini par une estimation de la concentration d'algues toxiques qui doit être faible à nulle.

Trois espèces de bivalves, fournies par M. Thaéron en Bretagne sud, et sensées indemnes de toxines, ont été testées : des huîtres (*Crassostrea gigas*, 10 kg), des moules (*Mytilus edulis*, 100 kg) et des coques (*Ruditapes decussatus*). Elles ont été réparties d'une manière à peu près égale dans des paniers et un même nombre de paniers a été immergé par bassin à des emplacements à peu près identiques (fig. 5).

L'étude de l'efficacité de la filtration a consisté, d'une part, en un suivi de la diminution de la concentration en algues toxiques, et d'autre part, en un suivi de l'éventuelle toxicité/non toxicité des coquillages expérimentés et ceci dans les deux bassins. La durée de l'étude a été arrêtée à quatre jours car cela correspond à la durée de stockage des coquillages pratiquée par les professionnels.

En pratique, des prélèvements d'eau -à raison de trois replitquats par bassin- ont été programmés sur la durée de l'expérience et des prélèvements de coquillages ont été réalisés quotidiennement en quantité suffisante pour l'évaluation toxicologique par le test biologique et l'analyse chimique. Plusieurs individus par paniers sont prélevés et écoquillés pour constituer un pool de chair homogène. Le déroulement des opérations dans le temps a été récapitulé dans le tableau 1.



Figure 5 : Paniers de coquillages d'un bassin filtrant.

Jour	Bassin Témoin	Bassin Essai
1er jour: 23/07/03	22h00 : Remplissage 22h45 : 3 prélèvements d'eau à T0 23h05 à 23h20 : Immersion des coquillages (Moules, Coques et Huîtres) + mise en route aération	22h00 : Remplissage 22h45 : 3 prélèvements d'eau à T0  00h00 : Mise en route Filtration
2ème jour: 24/07/03	11h45 : Prélèvements des 3 Coquillages puis: Ecoquillage, Egouttage, Broyage, Stockage,,,	05h00 : Prélèvements T1=T0+5h 10h30 : Prélèvements T2=T0+10h30  15h00 : Prélèvements T3=T0+15h 18h00 : Immersion des coquillages mise en route aération Prélèvements T4=T0+18h
3ème jour: 25/07/03	11h00 : Prélèvements T5=T0+36h  11h15 : Prélèvements des 3 coquillages	11h00 : Prélèvements T5=T0+35h  15h00 : Prélèvements des 3 coquillages
4ème jour: 26/07/03	9h15 : Prélèvements T6=T0+58h et Prélèvements des 3 coquillages	11h00 : Prélèvements T6=T0+54h30 et Prélèvements des 3 coquillages
5ème jour: 27/07/03	9h00 : Prélèvements T7=T0+79h et Prélèvements des 3 coquillages	11h15 : Prélèvements T7=T0+77h30 et Prélèvements des 3 coquillages
6ème jour: 28/07/03	9h30 : Prélèvements T8=T0+103h30 et Prélèvements des 3 coquillages	9h30 : Prélèvements des 3 coquillages  11h30 : Prélèvements T8=T0+102h

Tableau 1: Déroulement chronologique des actions.

## 2.3. Matériel et méthodes

### 2.3.1. Évaluation de la concentration en *Alexandrium minutum* dans l'eau

Trois échantillons d'eau, de 0,5 ou 1 litre, prélevés dans chaque bassin sont fixés avec quelques millilitres d'une solution de lugol en attendant le comptage. Le dénombrement cellulaire s'effectue sous microscope optique, sur un aliquote d'eau de 10 ml, mis à décanter au moins 5 heures dans une cuve à sédimenter (Utermohl, 1958). Afin de garder une bonne précision, les premiers prélèvements ont fait l'objet d'une dilution au cinquième. La limite de détection de ce comptage est de 100 cellules par litre.

### 2.3.2. Dosage des toxines paralysantes par le test biologique

Le test souris est la méthode officielle européenne dont la procédure, standardisée, est décrite en détail (AOAC, 1990) et utilisée par le réseau de surveillance. Comme elle comprend la détermination d'un coefficient de correction qui tient compte des conditions de réalisation du test, les résultats obtenus sont comparables entre laboratoire.

Pour ce bioessai, l'extrait est réalisé à partir d'un broyat de chair totale de coquillage dans une solution d'acide chlorhydrique 0,1 N (x g de chair pour x ml de solution). La suspension est portée à ébullition douce en maintenant l'agitation pendant 5 minutes puis refroidie avant d'être ramenée à un volume connu. Après centrifugation, l'extrait est prêt pour l'injection. Cette procédure transforme les formes substituées des toxines paralysantes en saxitoxine. Puis, l'essai consiste à injecter par voie intrapéritonéale un millilitre d'un extrait acide de coquillage à des souris de 20 g (plus ou moins 1 g) et à mesurer précisément le temps écoulé entre la fin de l'injection et la mort de la souris appelé temps de survie. Le temps de survie est traduit en nombre d'unités-souris à l'aide de la table de Sommer ; l'unité-souris (US) étant définie comme la quantité de toxine paralysante qui, injectée par voie intrapéritonéale, tue une souris de 20 g en 15 minutes. Ce nombre d'US est converti en équivalent saxitoxine (éq.STX) à l'aide du facteur de conversion que chaque laboratoire doit déterminer dans une étape de standardisation préalable à la réalisation des tests. Le seuil de détection du bio-essai est de 35-40 µg éq.STX pour 100 g de chair test et le coefficient de variation de 20 %.

Le seuil au-dessus duquel la vente des coquillages est interdite, est de 80 éq.STX pour 100 g de chair de coquillage.

### 2.3.3. Dosage physico-chimique des toxines paralysantes

Pour l'analyse chimique, les toxines sont aussi extraites de la chair avec une solution d'acide chlorhydrique 0,1 N à froid pour ne pas modifier le profil toxinique (2 x ml pour x g de chair totale égouttée). Après homogénéisation au broyeur et centrifugation, le pH est ajusté entre 3 et 3,5. Puis un aliquot de 2 ml est purifié par ultracentrifugation et le filtrat est conservé à 4 °C en attendant l'analyse.

Pour l'analyse du phytoplancton brut, des volumes croissants (100 à 1000 ml) d'un prélèvement d'eau de l'Aber Benoît ont été filtrés sur des membranes de types GFC. Ces filtres ont été immergés dans 5 ml d'acide acétique 0,3 N et conservés à -80 °C. Pour casser les cellules, ils sont décongelés et soniqués puis congelés et décongelés de nouveau avant l'extraction par ultracentrifugation.

La méthode de dosage utilisée est une Chromatographie Liquide Haute Performance d'Appariements d'Ions (CLHP-AI) en phase inverse avec dérivation post-colonne : les toxines paralysantes sont séparées en fonction de leur capacité à former des paires d'ions avec des molécules chargées incluses dans la phase mobile (Oshima, 1995 ; Masselin, 1996). Après séparation, les toxines sont rendues fluorescentes par oxydation en milieu alcalin puis dosées en spectrofluorescence après acidification pour stopper et stabiliser la réaction d'oxydation. La composition d'éluant et le pH sont spécifiques de chaque groupe de toxines, A ou B et permettent la séparation de toutes les toxines d'un groupe. Faute de standard, les toxines C sont transformées en toxines B par hydrolyse à chaud et sont analysées dans les mêmes conditions. L'analyse d'un échantillon nécessite donc trois séparations chromatographiques.

La quantification s'effectue par un étalonnage externe à l'aide de standards de référence. Ici, les étalons utilisés sont : STX, Néo-STX, GTX 2 et 3, commercialisés sous le nom de PSP-1 par le MACSP/IMP, Halifax, Canada. Les standards, dilués au 1/200, sont injectés tous les 5-6 échantillons pour vérifier la stabilité de la réponse et de la séparation. Trois injections sont réalisées par échantillon.

La concentration d'une toxine ( $C_t$  en  $\mu\text{M.l}^{-1}$ ) dans l'échantillon est calculée de la manière suivante :

$$C_t = C_{\text{étalon}} \times (A_{\text{échantillon}} / A_{\text{étalon}}) \times (V_{\text{étalon}} / V_{\text{échantillon}})$$

$C_{\text{étalon}}$  : Concentration de l'étalon en  $\mu\text{M.l}^{-1}$

$A_{\text{échantillon}}$  : Aire du pic chromatographique de l'échantillon en unité d'aire

$A_{\text{étalon}}$  : Aire moyenne de l'étalon en unité d'aire

$V_{\text{étalon}}$  : Volume de l'étalon injecté en  $\mu\text{l}$

$V_{\text{échantillon}}$  : Volume de l'échantillon injecté en  $\mu\text{l}$

Pour obtenir des résultats comparables avec le test souris, la concentration molaire a été convertie en  $\mu\text{g}$  eq. STX pour 100 g de chair de bivalve en utilisant les facteurs de conversion spécifique de chaque toxine, reporté dans le tableau 2.

Toxines	Coefficient de conversion
STX	<b>372</b>
GTX3	<b>297</b>
GTX2	<b>186</b>
C	<b>48</b>

Tableau 2 : Coefficients de conversion exprimés en  $\mu\text{g}$  eq.STX pour une mole de toxine (Hungerford, cité par Ledoux, 1992).

La toxicité spécifique en équivalent STX pour une toxine ( $T_s$ ) et pour 100 g de chair se calcule d'après la formule :

$$T_s = (C_t \times T \times D) / 1000$$

$C_t$  : concentration de la toxine t dans l'échantillon en  $\mu\text{M.l}^{-1}$

T : coefficient de conversion

D : dilution de l'échantillon (100 g de chair dans 200 ml)

La toxicité totale de l'extrait est la somme des toxicités spécifiques des toxines présentes dans l'extrait.

La variation du dosage effectué sur un échantillon est de 5% (  $35,52 \pm 1,8 \mu\text{g}$  eq.STX/100g ; n=5).

### 3. Résultats et discussion

#### 3.1. Suivi de la concentration en *A. minutum*

Au moment du remplissage des bassins (T0), la concentration moyenne était de 220 000 cell.l<sup>-1</sup>. Le dénombrement des trois repliquats témoigne d'une bonne homogénéité intra et inter bassin, l'erreur relative étant de 5 % et 9 % respectivement pour l'essai et le témoin (fig. 6).

Au bout de 36 heures de filtration, l'observation microscopique sans pratiquement de délai de décantation laissait à penser qu'il n'y avait pratiquement plus de cellules toxiques (moins de 10 cellules dans la cuve de 10 ml) et il a été décidé d'immerger les coquillages dans le bassin essai. En fait, il en restait 12 000 cell.l<sup>-1</sup>.

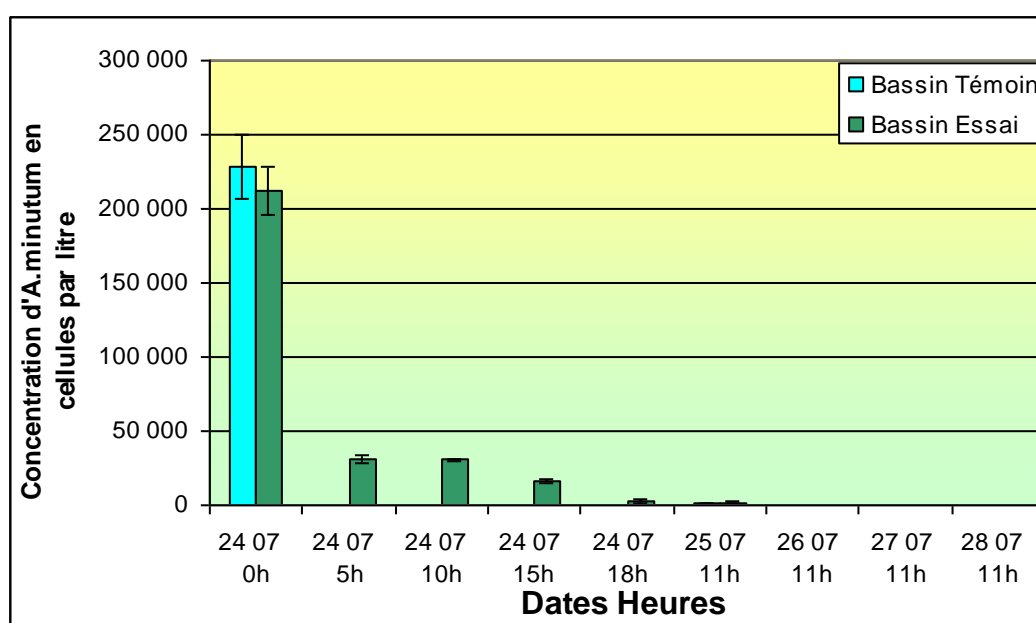


Figure 6 : Décroissance de la concentration en algues toxiques dans les deux bassins (les prélèvements sont plus fréquents dans le bassin filtré).

Au bout de 36 heures la concentration en *Alexandrium* approche de zéro dans les deux bassins, le phytoplancton a donc été consommé par les coquillages dans le bassin témoin et retenu par le filtre dans le bassin essai.

#### 3.2. Toxicité du phytoplancton

Le prélèvement utilisé pour l'évaluation de la toxicité du phytoplancton contenait 669 000 cel.l<sup>-1</sup> ( $\pm 31\ 000\ \text{cel.l}^{-1}$ ). La toxicité du phytoplancton, estimée à partir des volumes filtrés croissants, était de  $8,7 \pm 0,07\ \text{pg eq.STX par cellule}$ . Il n'a pas été trouvé de saxitoxine dans l'échantillon et la gonyautoxine 3 représente 95 % de l'ensemble des toxines détectées. Des travaux précédents effectués sur *A. minutum* récolté en rivière de Morlaix affichaient une valeur de 6 pg eq.STX par cellule (Masselin *et al.*, 1996).

### 3.3. Suivi des coquillages

Les trois espèces de coquillages étaient dépourvues de toxines avant la mise en expérimentation : le test souris s'est révélé négatif et les dosages chimiques n'ont pas détecté de toxine.

#### 3.3.1. Dans le bassin témoin (non filtré)

Les tests souris réalisés sur les prélèvements effectués après 24 heures et 4 jours d'exposition ont été négatifs. Les résultats de l'analyse chimique sont présentés sur la figure 7. Ils portent uniquement sur les toxines B (gonyautoxines) car d'une part, il n'a pas été détecté de toxines A (saxitoxines ou néosaxitoxine) dans les échantillons et d'autre part, étant donné la faiblesse de la contamination, la recherche des toxines C n'a été entreprise que sur le prélèvement le plus toxique sur lequel nous reviendrons à la fin de ce chapitre.

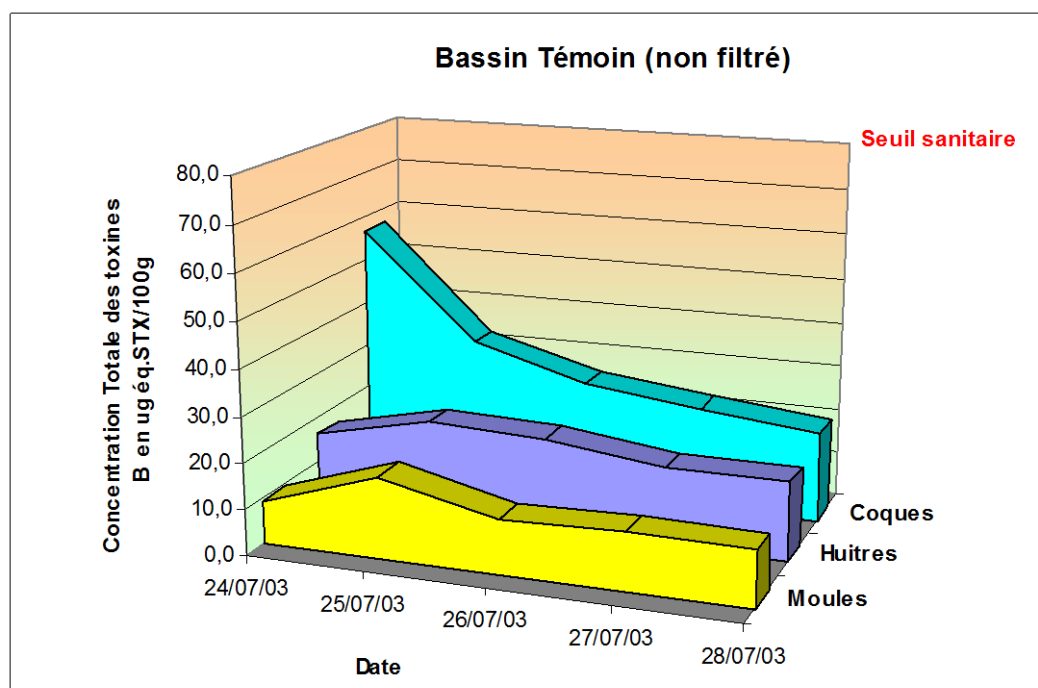


Figure 7 : Suivi de la toxicité des trois espèces de coquillages dans le bassin témoin.

Comme attendu, la consommation des algues toxiques se traduit par une détection de toxines dans les trois espèces mais la concentration reste très inférieure au seuil de santé publique de 80 µg éq. STX pour 100 g de chair.

Il apparaît aussi que les coques se contaminent plus vite et plus fort que les huîtres et les moules mais la valeur maximale atteinte de 53 µg éq. STX/100 g dès le premier jour reste dans le domaine du seuil de détection du test souris. Ce prélèvement a donc fait l'objet d'une recherche des toxines C en procédant à une hydrolyse de l'extrait pour les transformer en toxines B. La quantité de toxines C est équivalente à la différence entre la quantité de toxines B obtenue sur l'extrait hydrolysé et celle obtenue sur l'extrait non hydrolysé. Sur une toxicité globale de 53 µg éq. STX /100 g, les toxines C représente 1,4 % dans cet échantillon ce qui justifie que l'on se limite à la quantification des toxines B pour l'évaluation de la toxicité globale des autres échantillons.

### 3.3.2. Dans le bassin essai (filtré)

De même que pour le bassin témoin, les tests souris effectués sur les trois espèces de bivalves ont été négatifs. La figure 8 présente les résultats des dosages chimiques en fonction du temps d'expérimentation.

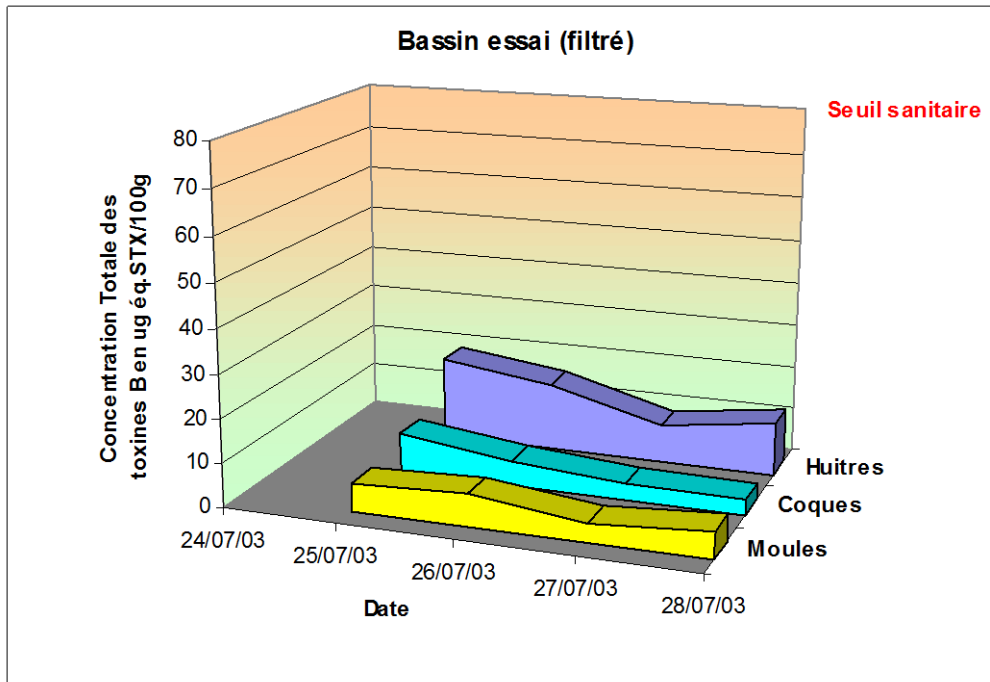


Figure 8 : Suivi de la toxicité dans les trois espèces de coquillages dans le bassin essai.

On observe des traces de toxines dans les trois espèces inférieures à 20  $\mu\text{g}$  éq.STX/100 g. Ce résultat n'est pas surprenant car lors de l'immersion des coquillages il y avait encore quelques 12 - 13 000 cellules toxiques par litre dans le bassin (dénombrement connu à posteriori) qui sont vraisemblablement à l'origine de la faible contamination. Toutefois, celle-ci n'est pas équivalente pour chaque espèce.

### 3.3.3. Examen par espèce de coquillage

La figure 9 reprend les toxicités par espèce de bivalve, dans les deux bassins.



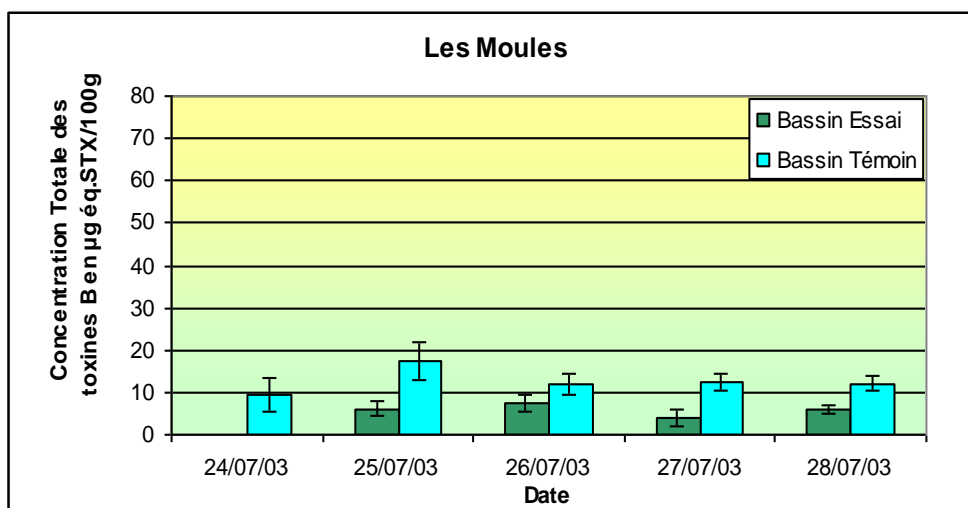
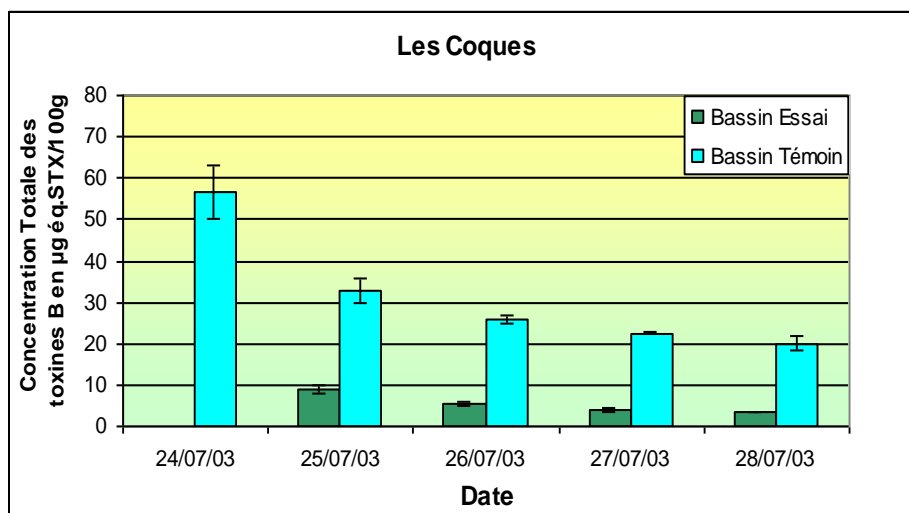
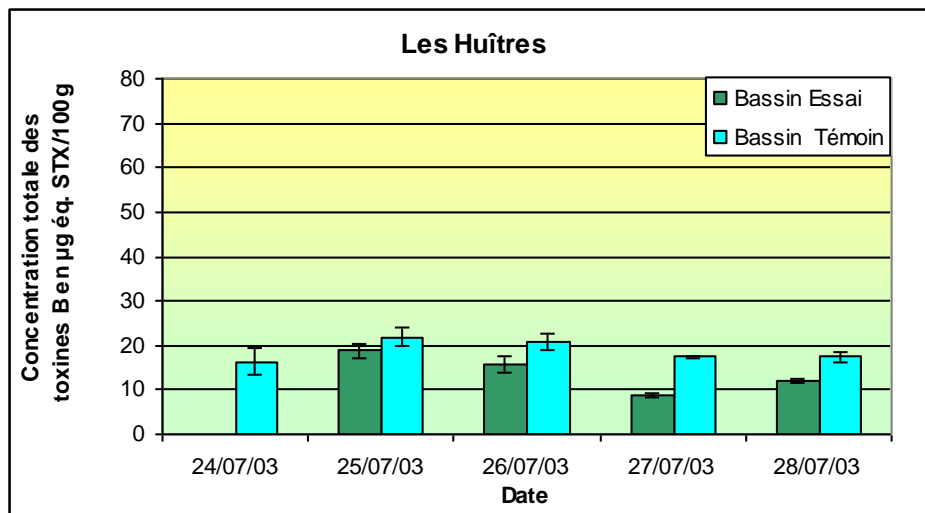


Figure 9 : Evolution de la toxicité résiduelle dans les deux bassins pour chaque espèce de bivalve.

Bien que les conditions d'exposition aux algues toxiques (la durée et la concentration) ne soient pas les mêmes dans les deux bassins, il est remarquable d'observer que les niveaux de toxicité des moules et des huîtres, bien que très faibles, ne sont pas différents compte tenu de la variabilité de la mesure et qu'ils ne baissent pas de façon significative au cours des quatre jours de suivi.

Cette remarque n'est pas vraie pour les coques qui semblent réagir très rapidement aussi bien pour se contaminer que pour s'épurer. En effet, en moins de 24 heures dans le bassin témoin, elles affichent le niveau de toxicité le plus élevé (53  $\mu\text{g}$   $\text{STX}/100\text{g}$ ) qui s'abaisse de près de 50 % le jour suivant alors qu'il n'y a pratiquement plus d'*Alexandrium* dans l'eau.

#### 4. Conclusion sur le cas *Alexandrium*

Dans les conditions expérimentées, à savoir une concentration de départ de 220 000 cell.l<sup>-1</sup> d'*A. minutum*, on a assisté à une baisse de 94 % de cette concentration en 18 heures de filtration en circuit fermé (avec un débit de 20m<sup>3</sup>.h<sup>-1</sup> et un volume de 6 m<sup>3</sup>). Cette valeur est valable pour l'ensemble du bassin puisque les dénombrements en tripliquats ont une faible variabilité (moins de 10 %).

Le test souris officiel s'est avéré négatif au premier et au dernier jour d'expérience pour les trois espèces de bivalves testées. Toutefois, dans le bassin filtré, les trois espèces de bivalve ont montré des traces de toxines paralysantes à un niveau très inférieur au seuil de santé publique (3 à 10 fois moins selon l'espèce). Les coquillages étant indemnes de toxines à la livraison, cette faible contamination est imputable à la concentration résiduelle d'algues toxiques au moment de leur immersion, concentration ayant été certainement sous estimée du fait que le dénombrement des cellules toxiques a été réalisé avant la sédimentation complète des cellules.

L'exposition à cette faible toxicité peut être évitée par deux précautions : en augmentant le temps de filtration et en attendant le temps de décantation nécessaire pour mieux apprécier la concentration réelle en cellules toxiques résiduelles. Des techniques de concentration du prélèvement décisif peuvent aussi être adaptées pour abaisser la limite de détection du comptage.

Concernant cette expérimentation, la faiblesse de la concentration de départ en algues toxiques peut restreindre la portée des résultats de l'étude mais la quantité d'*Alexandrium* joue vraisemblablement un rôle négligeable dans le pouvoir de rétention du filtre qui doit être largement dépendant de la charge particulaire totale de l'eau filtrée. En effet, le laboratoire de Concarneau qui avait réalisé une étude équivalente dans les mêmes installations mais à partir d'un bloom de plus de 2 millions d'*A. minutum* par litre (Piclet *et al.*, 1995) a trouvé une diminution de la concentration de l'algue de 95 % en trois heures et de 99 % en 24 heures. La filtration a donc été plus rapide pour une concentration de départ bien supérieure.

## Deuxième partie : Cas d'une efflorescence à *Dinophysis spp*

### 1. Généralités sur le genre *Dinophysis* et ses toxines

#### 1.1. Description du genre *Dinophysis*

Une des algues toxiques les plus fréquentes sur les côtes françaises est un dinoflagellé du genre *Dinophysis*. Les cellules de genre *Dinophysis*, classe des Dinophycées, sont de dimension variable entre 30 et 100 µm. La détermination taxonomique est basée sur la taille et la forme de la thèque cellulosique qui possède deux sillons perpendiculaires abritant chacun un flagelle comme beaucoup de dinoflagellés (fig. 10). La littérature compte quelques 200 espèces mais pour l'étude concernée ici, il s'agit essentiellement de *Dinophysis acuminata* même si on observe quelques cellules de *D. rotundata* et encore plus rarement de *D. acuta*. Sa nutrition, sa reproduction et son écophysiologie sont très mal connues et toutes les tentatives de mise en culture ont échoué jusqu'à maintenant. Bien que la plupart des organismes du genre possèdent des pigments, leur caractère strictement autotrophe est mis en cause. Le genre est représenté dans toutes les mers du globe et semble se multiplier dans les zones côtières. Toutefois, les densités cellulaires atteintes au cours d'une efflorescence restent modestes : quelques milliers de cellules par litre et contrairement au genre *Alexandium* elles sont rarement responsables d'une coloration de l'eau.



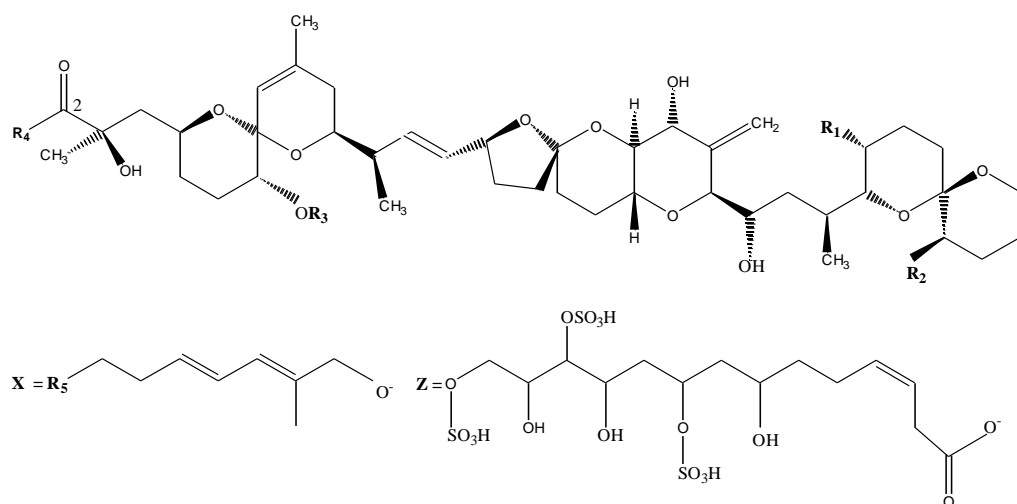
Figure 10 : *Dinophysis acuminata* (photo E. Nezan, Concarneau).

#### 1.2. Les *Dinophysistoxines* ou *DTXs*

Les toxines du genre se regroupent sous deux familles : l'acide okadaïque (AO) et ses molécules apparentées (DTX1-2-3-4) et les pectenotoxines (PTXs). Les yessotoxines sont souvent associées aux DTXs dans les coquillages mais il n'a jamais été prouvé que son origine provenait du genre *Dinophysis*. Comme l'espèce qui nous préoccupe ici appartient au complexe *acuminata* on se limitera aux DTXs (Fig.11). L'AO, son isomère (DTX-2) et son dérivé méthylé (DTX-1) sont des polyéthers cycliques comportant une fonction acide carboxylique dont les propriétés sont semblables. Moyennement polaires, ils sont solubles dans de nombreux solvants organiques. Tous les trois sont des inhibiteurs de protéines phosphatases, enzymes essentielles dans la multiplication cellulaire. Cet effet nocif peut expliquer les symptômes observés dans les intoxications : douleurs abdominales et diarrhée. Dans la cellule phytoplanctonique, on trouve les trois toxines, AO, DTX 1-2, isolément ou en mélange en proportion variable selon les espèces (Lee *et al.*, 1989).

Mais on trouve aussi des structures plus complexes qui correspondent à des esters de ces molécules (DTX4 et diol-esters). Ces formes, plus lourdes, ont été mises en évidence chez une autre espèce cultivable en laboratoire : *Prorocentrum lima* mais dont la niche écologique est très différente. Les auteurs qui les ont mises en évidence (Quilliam *et al.*, 1996) pensent que ces molécules sont hydrolysées lors de la lyse cellulaire pour redonner les structures simples que l'on dose dans les coquillages.

Dans les coquillages, ces dernières peuvent subir des transformations par ajout d'une chaîne d'acide gras saturée ou non (7-O-AO/DTX ou DTX-3). Ces acyles-esters (DTX3) n'ont pas la propriété d'inhibition des protéines phosphatases mais ils peuvent redonner de l'AO ou ses substitués dans le tube digestif. Quelles que soient leur forme chimique, ces composés sont surtout concentrés dans la glande digestive des bivalves.



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	Poids moléculaire
Acide okadaïque (AO)	CH <sub>3</sub>	H	H	OH	-	804,5
Dinophysistoxine1 (DTX1)	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	OH	-	818,5
Dinophysistoxine2 (DTX2)	H	CH <sub>3</sub>	H	OH	-	804,5
Dinophysistoxine3 (DTX3)	(CH <sub>3</sub> ou H)	(CH <sub>3</sub> ou H)	Acyle	OH	-	1014 - 1082
Diol-ester d'AO	CH <sub>3</sub>	H	H	X	OH	928,5
Dinophysistoxine4 (DTX4)	CH <sub>3</sub>	H	H	X	Z	1472,6

Acyles typiques de la DTX3

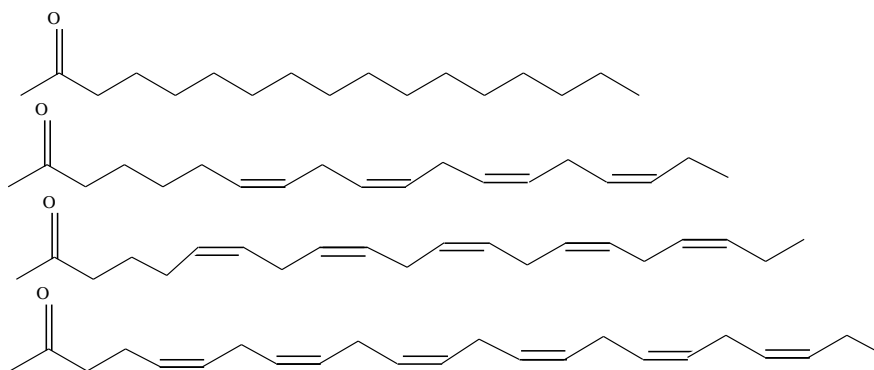


Figure 11: Structure moléculaire des différentes dinophysistoxines rencontrées chez *Dinophysis* (AO, DTX 1-2, diol-ester et DTX 4) et dans les coquillages contaminés (AO, DTX 1-2-3).

## 2. Description du lieu et du déroulement de l'étude

L'étude a été conduite dans l'établissement conchylicole de Monsieur Thomas dans la baie de La Forest-Fouesnant située au fond de la baie de Concarneau (fig. 12).



Figure 12: Situation de l'établissement conchylicole dans la baie de Concarneau.

Le suivi des concentrations en phytoplancton toxique réalisé par le laboratoire Ifremer de Concarneau nous a fourni les données pour apprécier au mieux le démarrage de l'étude. Le point du réseau de surveillance étant situé à quelques kilomètres de l'établissement en aval.

Les trois premières semaines de mai, la concentration en *Dinophysis* oscillait entre 100 et 300 cellules par litre puis fin mai la concentration a atteint un millier de cellules. Comme les prélèvements montraient une grande quantité de cellules en division il était fort probable que nous étions en période d'efflorescence et il a été décidé de réaliser l'étude le 4 juin.

Pour l'expérimentation nous disposons de deux bassins insubmersibles en ciment d'une capacité de 10 m<sup>3</sup> chacun. Une fois remplis à l'aide d'une pompe avec l'eau de mer du chenal, un système de circulation de l'eau permet d'une part leur aération et d'autre part leur filtration par un filtre à sable. Les caractéristiques du filtre à sable sont les suivantes :

- un lit filtrant supérieur de gravier de 1 à 2 mm (285 kg),
- un lit filtrant inférieur de sable de 0,4 à 0,8 mm (485 kg),
- hauteur totale 60 cm,
- vitesse de filtration de 30 m<sup>3</sup> par heure.

L'un des bassins ou bassin témoin positif a été rempli avec l'eau de mer brute (contenant les cellules toxiques) qui est mise en circulation sans filtration (fig. 13).



Figure 13: Aperçu d'un des bassins de l'établissement conchylicole où les paniers sont immergés.

L'autre bassin ou bassin essai a été rempli avec la même quantité d'eau brute qui est oxygénée et filtrée sur le filtre à sable en circuit fermé.

Les deux bassins ont reçu la même quantité de coquillages mais avec un retard pour le bassin essai, retard défini par une estimation de la concentration résiduelle en *Dinophysis* qui devait être non détectable avec la méthode utilisée par le REPHY (seuil de détection de 100 cellules par litre).

Trois espèces de bivalves, en provenance de régions non contaminées, ont été réparties également et d'une manière homogène dans les deux bassins :

- 90 kg de moules (*Mytilus edulis* des Bouchots de Saint-Brieuc),
- 90 kg d'huîtres creuses (*Crassostrea gigas* du golfe du Morbihan),
- 50 kg de palourdes (*Ruditapes decussatus* des Iles Chausey).

L'efficacité de la filtration a été estimée par un suivi de la concentration en *Dinophysis* dans l'eau et de la toxicité éventuelle des coquillages dans les deux bassins sur une durée de 4 jours.

En pratique, des prélèvements d'eau ont été programmés à différents intervalles de temps : courts puis plus longs sur la durée de l'expérience. Les prélèvements de coquillages ont été effectués quotidiennement en vue de l'analyse biologique et chimique des toxines.

Le déroulement des opérations est décrit dans le tableau 3.

Jour	Bassin témoin	Bassin essai
1 <sup>er</sup> jour 4 juin 2004	18h00 : Remplissage et prélèvements d'eau 18h30 : Mise en route de l'aération et immersion des coquillages 19h10 : Prélèvements d'eau 22h15 : Prélèvements d'eau	18h00 : Remplissage et prélèvements d'eau 18h30 : Mise en route de la filtration 19h10 : Prélèvement d'eau 22h15 : Prélèvement d'eau
2 <sup>ème</sup> jour 5 juin 2004	7h00 : Prélèvements d'eau et de coquillages 11h45 : Prélèvements d'eau	11h45 : Prélèvements d'eau 15h30 : Immersion des coquillages
3 <sup>ème</sup> jour 6 juin 2004	8h00 : Prélèvements d'eau et de coquillages	8h00 : Prélèvements d'eau et de coquillages
4 <sup>ème</sup> jour 7 juin 2004	8h30 : Prélèvements d'eau et de coquillages	8h30 : Prélèvements d'eau et de coquillages
5 <sup>ème</sup> jour 8 juin 2004	8h30 : Prélèvements d'eau et de coquillages	8h30 : Prélèvements d'eau et de coquillages

Tableau 3 : Déroulement chronologique des actions.

En fait, les comptages dans l'eau de pompage réalisés après la mise en route des opérations ont révélé des concentrations bien inférieures à celles espérées.

Il a été décidé de réitérer un suivi de la concentration cellulaire huit jours plus tard uniquement dans le bassin filtré et sans ajout de coquillages en espérant obtenir une concentration de départ de plus d'un millier de cellules par litre. Le tableau 4 donne la chronologie de cette deuxième série de prélèvements.

Jour	14.06.04	14.06.04	14.06.04	15.06.04	15.06.04	15.06.04	16.06.04
Heure	14h00	17h35	21h00	5h15	15h30	18h30	5h15

Tableau 4 : Chronologie des prélèvements d'eau de la deuxième expérience.

Pour évaluer la toxicité de *Dinophysis* durant la période d'expérimentation, des concentrats en cellules ont été réalisés en filtrant de grands volumes d'eau sur un tamis de 20 µm et en recueillant le volume final, réduit à 300-500ml. Ce concentrat a été ensuite séparé en aliquots pour le comptage des cellules toxiques et pour l'analyse chimique.

Tous les échantillons destinés à l'analyse chimique ont été congelés dans l'azote liquide et conservés au congélateur jusqu'à leur traitement.



### **3. Matériel et méthodes**

#### **3.1 Evaluation de la concentration en *Dinophysis acuminata***

Deux ou trois échantillons d'eau d'un litre prélevés dans chaque bassin, sont fixés avec quelques millilitres d'une solution de lugol en attendant le comptage. Le dénombrement cellulaire s'effectue sous microscope optique sur un aliquot de 10 ml, mis à décanter au moins 5 heures dans une cuve à sédimenter (Utermöhl, 1958). Les concentrations initiales s'étant révélées assez faibles, un procédé de concentration a été appliqué aux échantillons. Un volume d'échantillon (de 250 à 1000ml) est filtré sur une soie de 20 µm et la soie est lavée dans un volume réduit d'eau de mer filtrée (en général 50 ml). Le comptage est effectué sur 10 ml de ce concentrat.

La limite de détection du comptage est ainsi abaissée au-dessous de 100 cellules par litre, d'un facteur équivalent au facteur de concentration.

Quand parfois il a été trouvé une cellule de *D. rotundata*, elle a été ajoutée au nombre de celle de *D. acuminata*.

#### **3.2. Evaluation de la toxicité des bivalves par le test biologique**

Le test officiel pour détecter en routine les toxines diarrhéiques est un essai sur souris dont la procédure a été décrite par Yasumoto *et al.* (1984). Elle consiste à injecter à 3 souris mâles (d'un poids de  $20 \pm 2$ g chacune), un extrait de glandes digestives de coquillages et à observer le temps de mortalité. L'extrait est obtenu à partir de 30 g de tissu qui sont broyés dans l'acétone. Après évaporation du solvant, le résidu aqueux est repris dans du dichlorométhane qui est lavé plusieurs fois pour éliminer les interférences avec les toxines polaires éventuellement présentes. La phase dichlorométhane est récupérée, le solvant évaporé et le résidu est repris dans 5 ml d'une solution de Tween 60 à 1 %. Un millilitre de cette suspension est injecté à chaque souris. Le test est considéré comme positif si on observe la mort de 2 souris sur 3 avant 24 heures. En terme de concentrations dans la chair des coquillages, les valeurs autorisées ne doivent pas dépasser  $0,16 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  pour l'AO et  $0,144 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  pour la DTX 1.

#### **3.3. Dosage physico-chimique des dinophysistoxines**

L'acquisition dans le cadre de ce contrat d'un automate d'extraction (Aspect XLI, Gilson), a permis au laboratoire de mettre au point un procédé automatisé d'extraction sur phase solide (SPE) des glandes digestives de moules pour l'identification et la quantification des dinophysistoxines. Ce procédé et sa validation sur un échantillon de référence (MUS-2, IBM, CNRC, Canada), ayant été publié (Mondeguer, 2004), nous en résumerons les différentes étapes. Pour les dérivés acylés, il n'y a pas de standard, ils sont dosés sous forme d'AO après une étape d'hydrolyse qui transforme les acyles en AO libre.

Le dosage comprend trois étapes qui suivent la décongélation des échantillons :

- a) l'extraction à partir de la matrice biologique (glandes digestives ou concentrats de phytoplancton). Pour les glandes digestives le solvant utilisé est l'acétone. A ce stade, l'extrait est divisé en deux pour comparer la phase hydrolysée sur laquelle on dosera l'AO total avec la phase non hydrolysée sur laquelle on dosera l'AO libre. La différence entre les deux résultats correspond au contenu

en DTX3. Pour le phytoplancton, les échantillons sont laissés à température ambiante pendant 24 h pour qu'à la décongélation les esters soient hydrolysés en AO sous l'action des activités enzymatiques, puis, 5 ml de la suspension brute sont traités sur cartouches.

- b) la pré-purification des toxines sur cartouches SPE de silice. Cette étape est conduite par l'automate qui assure les différentes tâches (le conditionnement des cartouches, le dépôt de l'extrait, les lavages avec différents solvants et l'élution finale des toxines séchées et reprises dans 1ml de méthanol).
- c) la séparation, l'identification et la détection par CLHP/SM<sup>2</sup>. L'appareil utilisé est une Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à un Spectromètre de Masse à piégeage d'ions, quadripolaire et avec interface d'électro-nébulisation. La quantification est faite selon un étalonnage externe à partir d'un standard d'acide okadaïque. La méthode a un seuil de détection et de quantification de respectivement 0,006 ng et 0,186 ng injecté (Mondeguer, 2002). Les rendements d'extraction sont de 94,6 %  $\pm$  2,2 pour la matrice coquillage et de 92,3 %  $\pm$  7,2 pour la matrice phytoplancton.

## 4. Résultats et discussion

### 4.1. Suivi de la concentration en *Dinophysis spp*

Le prélèvement d'eau effectué durant le remplissage des bassins a révélé une concentration de départ de 413 cell.l<sup>-1</sup>. D'une part, cette valeur est inférieure à celle espérée puisque le réseau de surveillance observait environ un millier de *Dinophysis* par litre. D'autre part, la concentration relevée juste avant l'immersion des coquillages est encore plus faible soit environ 200 cell.l<sup>-1</sup>.

**Dans le bassin filtré.** L'évolution de la concentration en *Dinophysis spp* au cours des deux expériences (du 4 au 8 juin et du 14 au 16 juin) est présentée dans la figure 14. Elle montre un abattement de la concentration en cellules toxiques d'au moins 50 % en 3 heures (91 % dans le deuxième essai) et d'au moins 91 % en 17 heures (98 % dans le deuxième essai).

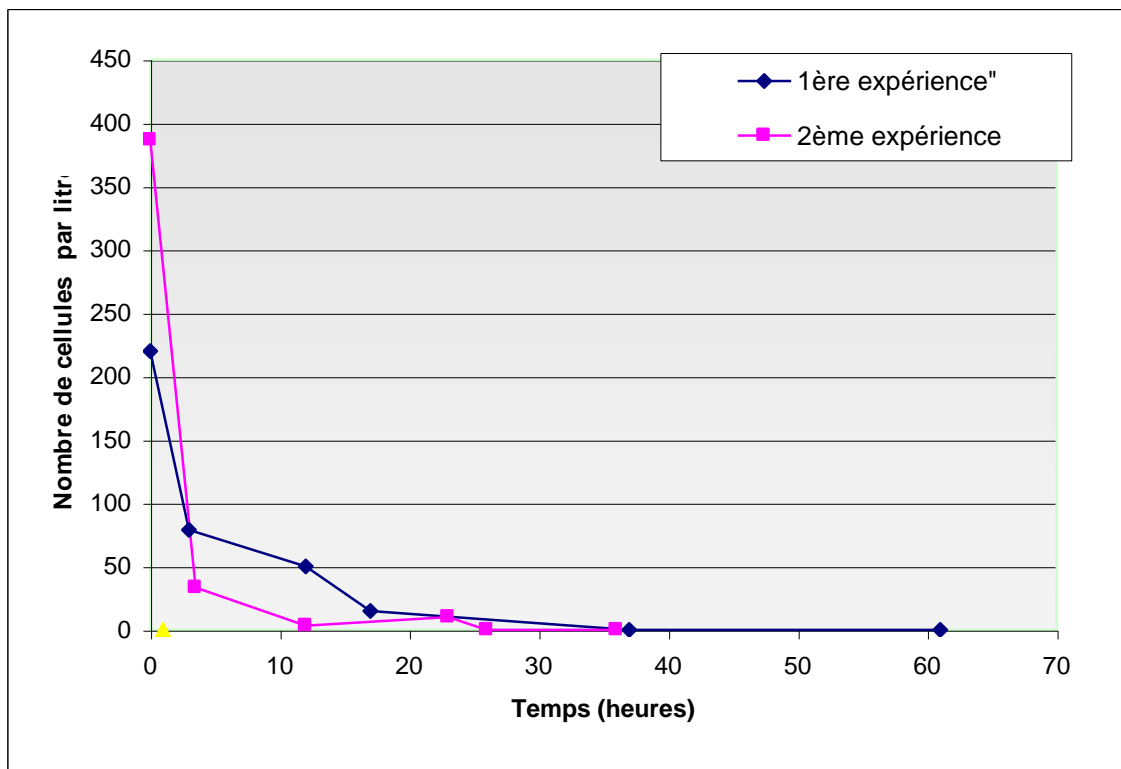


Figure 14: Evolution de la concentration en *Dinophysis spp* dans le bassin filtré.

La faiblesse de la concentration de départ rend l'expérimentation peu probante en terme de toxicité mais si l'on s'en tient au pouvoir de filtration stricte on peut en juger en cumulant le dénombrement des cellules de *Dinophysis* et de *Prorocentrum micans*. Ce dernier dinoflagellé est de taille similaire à celle de *Dinophysis* et l'accompagne très fréquemment. L'évolution cumulée des deux espèces de Dinoflagellé est présentée dans la figure 15.

Le taux de rétention de ces cellules est pratiquement de 100 % dans un délai de 24 heures.

**Dans le bassin témoin non filtré.** Les cellules de *Dinophysis* ne sont plus détectables après 3 heures d'immersion des coquillages tandis qu'une concentration résiduelle d'environ 30 cell.l<sup>-1</sup> en *P. micans* est dénombrée après 17 heures d'immersion.

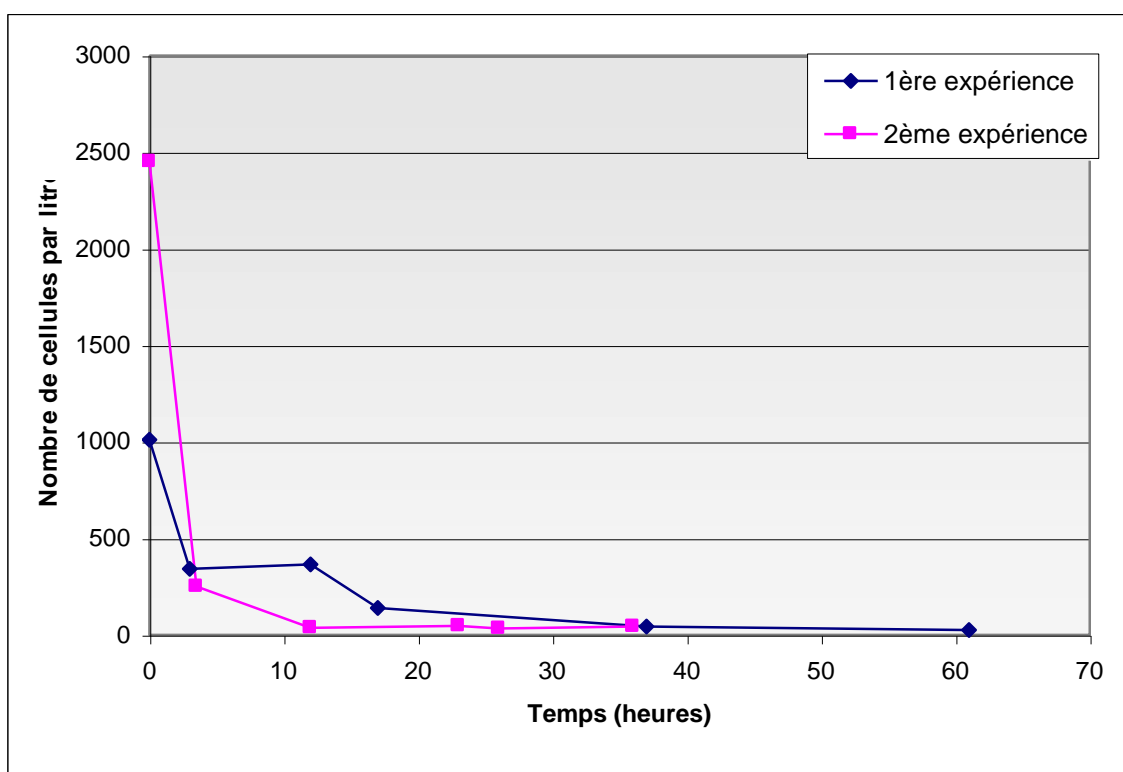


Figure 15: Evolution de la concentration cumulée des cellules de *Dinophysis spp* et de *Prorocentrum micans*.

#### 4.2. Evaluation de la toxicité des coquillages

Les coquillages étaient indemnes de toxines avant expérimentation.

Le test biologique sur souris s'est avéré négatif pour les trois espèces de coquillages qui ont été immergées dans le bassin non filtré. L'analyse chimique n'a révélé aucune toxine dans les coquillages prélevés dans les deux bassins au cours du temps d'expérimentation.

Des moules saines au départ et laissées sur l'estran durant la période de manipulation se sont aussi révélées indemnes de toxines.

#### 4.3. Evaluation de la toxicité de *Dinophysis spp*

La toxicité de *D. acuminata* étant très variable (Marcaillou *et al*, 2005) il était nécessaire d'avoir une évaluation de la toxicité de la fraction planctonique.

Trois concentrats ont été effectués : deux dans la baie de Concarneau avant et après l'expérimentation et un troisième au début de l'expérimentation à partir de l'alimentation des bassins (tabl. 5).

Dates lieu	2 juin baie de Concarneau	4 juin début expérimentation	18 juin baie de Concarneau
Concentration en pg.cell <sup>-1</sup>	90,3 - 89,5	240 - 218	87,2 - 97,1

Tableau 5 : Toxicité des concentrats en *Dinophysis spp*.

Les résultats confirment la toxicité des cellules de *Dinophysis*.

## **5. Conclusion sur le cas *Dinophysis***

Dans les conditions expérimentales, la rétention des cellules toxiques est obtenue en moins de 24 heures.

Que l'eau ait été filtrée ou non, les moyens d'investigation mise en œuvre n'ont montré aucune contamination des coquillages même dans le bassin filtré . Bien que les cellules aient contenu de la toxine, dans le bassin non filtré, leur nombre était insuffisant et/ou l'exposition des coquillages trop courte pour contaminer les animaux d'une manière détectable.

## **Troisième partie : Mise en évidence d'une contamination éventuelle des moules par de l'eau de mer filtrée contenant de l'acide okadaïque dissous**

### **1. Introduction**

L'autorisation d'utiliser les bassins filtrants repose sur la démonstration que les filtres à sable qui les équipent sont efficaces pour retenir les microalgues toxiques, et que les coquillages sont indemnes de toxines après leur temps de séjour dans les bassins.

Toutefois, une question complémentaire restait posée : la rétention des algues toxiques dans le filtre ne risquait-elle pas de contaminer l'eau circulant par la libération du contenu cellulaire due à la lyse des micro-organismes ?

Pour le vérifier, il faut avoir à disposition des méthodes de concentration des toxines à partir de l'eau, méthodes qui n'étaient pas encore disponibles pour les toxines paralysantes au moment de la réalisation de l'expérience. En revanche, cela a été possible pour les toxines diarrhéiques mais les concentrations *in situ* pouvant être inférieures au seuil de détection, une expérience en laboratoire a été envisagée pour contaminer des moules par immersion directe dans de l'eau de mer contenant de l'acide okadaïque (AO) en solution.

### **2. Matériel et méthodes**

#### **2.1. Evaluation de la concentration nominale en AO**

On se place dans l'éventualité d'une efflorescence à 5000 cellules de *Dinophysis spp* par litre, valeur maximale rencontrée de 1193 à 1999 en baie de Concarneau au point de prélèvement REPHY (Kerist).

Après remplissage d'un bassin d'expérimentation de 20 m<sup>3</sup> et mise en circulation de l'eau, le filtre retiendra au maximum : 100.10<sup>6</sup> cellules toxiques.

Si on considère une toxicité spécifique de 100 pg d'AO par cellule, en théorie on a 10 mg d'AO dans le bassin de 20 m<sup>3</sup> ou une concentration de 0,5 µg par litre.

#### **2.2. Expérience préliminaire de maintien des moules**

Afin de vérifier la bonne tenue des coquillages dans les conditions expérimentales, 150 individus ont été maintenus dans deux aquariums différents (moules de 4 cm dans l'un, moules de 5 cm dans l'autre), sans nourriture, pendant 4 jours et à 16 °C la circulation et l'aération étant assurée par une simple pompe immergeable. Des prélèvements d'eau ont été réalisés pour le dosage de l'ammoniaque en début et fin d'expérience.

Nous n'avons pas observé de mortalité et les animaux semblaient en bonne condition. Le taux de NH<sub>4</sub> au bout de 4 jours était de 76 et 78 µatgN<sub>2</sub>.l<sup>-1</sup> pour 0,1 µatgN<sub>2</sub>.l<sup>-1</sup> en début d'expérience.

#### **2.3. Contamination expérimentale**

L'expérience a été conduite dans une salle climatisée à 16°C (fig. 16).

Les moules ont été conditionnées deux jours avant l'expérience : environ 500 moules de taille comprise entre 4,5 et 5 cm ont été placées dans deux bacs aérés en circuit fermé avec une pompe immergeable et ont reçu 1 litre d'une culture de *Skeletonema costatum* à environ  $2.10^6$  cellules par litre.

Quatre aquariums de 50 litres ont été utilisés pour la contamination, tous ont été remplis avec 40 litres d'eau de mer brute décantée aérée par la pompe. Trois d'entre eux, identifiés A, B, C, ont reçu 105 moules, le quatrième étant le témoin.

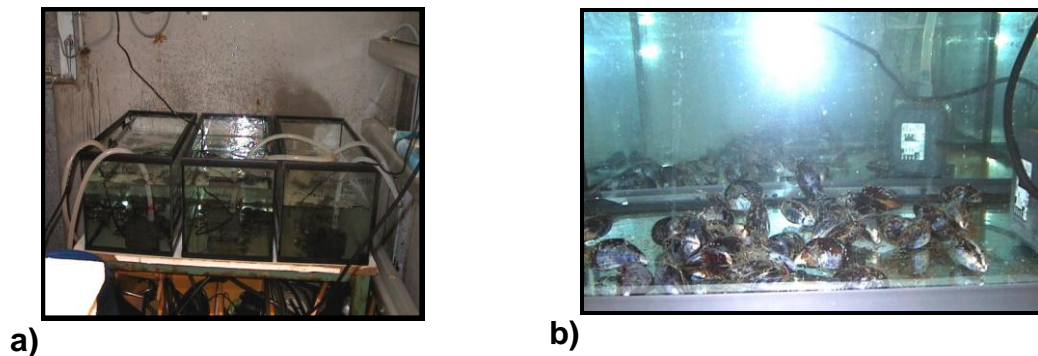


Figure 16: **a)** Vues des trois aquariums essai avec les moules immergées dans l'eau de mer toxique ; **b)** gros plan sur les bivalves.

Vingt individus ont été mis à part pour le calcul de l'indice de condition de départ. Puis, il a été ajouté 200  $\mu$ l d'une solution à 0,1 $\mu$  d'AO par  $\mu$ L avec une seringue CLHP et 100 ml d'une culture de *S. costatum* à environ  $2.10^6$  cell.ml<sup>-1</sup> dans les aquariums A et B.

Des prélèvements d'eau (trois fois 40 ml) et de 20 moules par aquarium ont été réalisés deux et cinq heures après la mise en route du système puis une fois par jour les trois jours suivants. Tous les prélèvements sont conservés à 0°C en attendant l'analyse.

A la fin de l'expérimentation, 20 moules ont été traitées pour le calcul de l'indice de condition.

#### **2.4. Mesure de l'indice de condition**

L'indice choisi est celui recommandé par Lucas et Beninger (1985) qui consiste à calculer le rapport du poids de chair sèche sur le poids de la coquille sèche. Pour cela, chaque moule est écoquillée et la chair séparée de la coquille soigneusement. La chair est lyophilisée et la coquille séchée à 60°C pendant 24 heures.

#### **2.5. Dosage de l'AO dans les moules et l'eau de mer**

Les analyses sur les moules ont été réalisées selon un protocole d'extraction automatisée et de détection par CLHP/MS mis au point au laboratoire (Mondeguer, 2002 ; 2004) et validées sur un échantillon de référence (MUS2 CNRC, Halifax Canada). La quantification se fait par rapport à un étalonnage externe de l'AO.

Un matériel certifié pour le dosage de la toxine diluée dans l'eau de mer n'existe pas. Pour évaluer le rendement, des quantités croissantes ont été diluées dans un volume d'eau de mer puis extraites comme pour l'analyse du phytoplancton toxique concentré dans un volume réduit.

### 3. Résultats

#### 3.1. Etat des moules par l'indice de condition

Les indices de condition en début d'expérience et dans les trois aquariums en fin d'exposition sont présentés dans le tableau 6.

	Témoin (avant exposition à l'AO)	Aquarium A (sans nourriture)	Aquarium B (apport de <i>S. costatum</i> )	Aquarium B (apport de <i>S. costatum</i> )
Moyenne (n=20)	0,135	0,118	0,128	0,132
Ecart-types (n=20)	0,032	0,024	0,025	0,027

Tableau 6 : Valeurs des indices de conditions des moules avant et en fin d'exposition à l'eau toxique.

Il n'y a pas de différence significative entre les différents indices.

Un test de comparaison de moyennes a été réalisé entre le témoin et A :

t calculé = 1,489 pour t de la table = 2,045 pour un risque de 5 % et dd = 38.

#### 3.2. Evaluation de la toxicité

Les rendements d'extraction de la toxine diluée dans l'eau de mer, filtrée ou décantée ont été de l'ordre de 50 %, ce qui est plus faible que le rendement trouvé après ajout de toxine pure à une suspension de phytoplancton (cf deuxième partie). Nous n'avons pas d'explication rationnelle à cette observation mais elle suggère que l'environnement de la molécule joue un rôle important dans sa disponibilité vis à vis des solvants d'extraction.

Les dosages dans l'eau et les coquillages n'ont pas montré un niveau détectable en acide okadaïque.

La toxine en suspension dans l'eau ne semble pas s'accumuler dans les moules.



## Conclusion

Ce travail s'inscrit dans les études prospectives qui tendent à proposer des solutions réalistes pour minimiser l'impact économique des efflorescences phytoplanctoniques toxiques qui sévissent sur le littoral. Les bassins insubmersibles équipés de filtre à sable qui existent dans de nombreux établissements où ils sont utilisés pour la purification des coquillages, sont un des outils pour répondre à cet objectif.

Dans les deux cas de prolifération toxique traités ici, ils ont montré leur efficacité en moins de 24 heures. Plus de 90 % des algues sont retenus par le filtre et les coquillages sauvegardés dans les bassins filtrés n'ont pas montré de toxicité, le test officiel ayant été négatif au bout du délai de stockage pour les trois espèces de bivalves testées.

Les expériences, prévues pour l'étude, ont été déclenchées par des concentrations élevées signalées par le REPHY dans la zone où se situaient les deux établissements. Pourtant, la concentration en algues toxiques dans l'eau pompée à marée haute a révélé une concentration bien moindre que celle attendue, aussi bien pour *Alexandrium* que pour *Dinophysis*. Ce qui explique que dans les bassins témoins, non filtrés, les coquillages n'ont pas atteint le seuil de toxicité les rendant impropres à la consommation.

Cette faiblesse dans la concentration en algues toxiques n'affecte pas la pertinence de l'étude de faisabilité car l'efficacité d'un filtre à sable est plutôt meilleure quand la charge particulaire augmente.

Le devenir des toxines des cellules, retenues dans le filtre, n'a été abordée que d'une manière indirecte dans les expérimentations. Pour le cas *Dinophysis*, les coquillages stockés ont été indemnes de toxines. Pour le cas *Alexandrium*, le fait qu'il y ait des traces de toxines dans les bivalves laisse une incertitude sur leur origine. En effet, sont-elles le résultat de l'ingestion des cellules résiduelles présentes au moment de l'immersion des coquillages ou d'une contamination par l'eau ? D'après la littérature, ces toxines sont dégradées en milieu alcalin (Schantz *et al.*, 1975) ce qui rend la seconde hypothèse moins crédible. Toutefois, le rôle des toxines en suspension ou dissoutes dans l'eau mériterait d'être étudié plus à fond.

Les techniques utilisées pour l'eau de boisson peuvent être un modèle car l'approvisionnement en eau potable est aussi confronté au problème de micro-organismes producteurs de toxines dont certaines sont apparentées aux toxines paralysantes et le filtre à sable est un élément des systèmes qui sont utilisés actuellement (V. Bonnelye *et al.*, 1995).

Le bassin insubmersible équipé d'un filtre à sable peut donc être un bon outil pour maintenir des coquillages sains dans une eau saine mais il doit être utilisé avec un contrôle rigoureux de l'absence d'algues toxiques au moment où les coquillages seront immergés.

## Bibliographie

- Bonnelye V., Baudin I., Bernazeau F., Gislette Ph., Mouchet P., 1995. Elimination des algues planctoniques : efficacité des filières modernes de traitement. Dans : Elimination des algues dans l'eau de boisson. TSM., n°10, 721-727.
- Hall S., Reichardt P.B., Neve R.A., 1980. Toxins extracted from alaskan isolate of *Protogonyaulax* sp. Biochem. Biophys. Res. Comm., 97, 649-653.
- 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.
- Lee J.S., Igarashi T., Fraga S., Dahl E., Hovgaard P., Yasumoto T. 1989. Determination of diarrhetic shellfish toxins in various dinoflagellate species. J. appl. Phycol. 1: 147-152.
- Lucas A., Beninger P.G., 1985. The use of physiological condition indices in marine bivalve aquaculture. *Aquaculture*, 44, 185-200.
- Marcaillou C., Mondegue F., Gentien P., 2005. Contribution to toxicity assessment of *Dinophysis acuminata* (Dinophyceae). J. of Appl. Phycol. Vol. 17, n°2, 155-160.
- Masselin P., Le Saux J.C., Le Gal D., Lassus P., 1996. Dosage par CLHP des toxines paralysantes de coquillages contaminés par *Alexandrium minutum* en rivière de Morlaix et de la Penzé en 1994. R.INT. DEL/ 96.04 Nantes.
- Mondegue F. 2002. Un nouvel outil dans l'identification et la quantification des dinophysistoxines (DTXs): le couplage chromatographie liquide haute performance / spectrométrie de masse par piégeage d'ions quadripolaire et interface d'électro-nébulisation (CLHP/SM<sup>2</sup>). Rapport interne RST.DEL/02.01.PN
- Mondegue F., Genin E., Mestre G., Nsengiyumva C., 2004. Validation of an automated procedure of solid phase extraction of mussel digestive glands for identification and quantification of dinophysistoxins in LC/ESI/MS2 by quadrupole ion trap. (Proceedings of the 5th International Conference on Molluscan Shellfish Safety, Galway, Ireland, 14<sup>th</sup>-18<sup>th</sup> June 2004.
- Oshima Y., 1995. Postcolumn derivatization liquid chromatographic method for paralytic shellfish toxins. J. AOAC Int. 78, 528-532.
- Piclet G., Le Saux J.C., Le Gal D., Nézan E., Raguenès P., 1995. Etude de l'efficacité d'un système de filtration d'une eau colorée (*Alexandrium minutum*) dans un établissement de purification. Rapport interne Ifremer.
- Quilliam M.A., Hardstaff W.R., Ishida N., McLachlan J.L., Reeves A.R., Ross N.W., Windust A.J. 1996. Production of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins by *Prorocentrum lima* in culture and development of analytical methods. In: Yasumoto T., Oshima Y. and Fukuyo Y. (eds), Harmful and Toxic Algal Blooms, IOC of UNESCO, 289-292.
- Schantz E.J., Ghazarossian V.E., Schnoes H.K., Stong F.M., Springer J.P., Pezzanite J.O., Clardy J., 1975. The structure of saxitoxine. J. Am. Chem. Soc., 97, 1238-1239.
- Utermöhl H., 1958. Zur vendhommung der quantitativen phytoplankton. Methodik. Int. Ver. Theoret. Argueur. Limnol, 9:1-38.
- Yasumoto T., Murata M., Oshima Y., Matsumoto G.K., Clardy J., 1984. Diarrhetic Shellfish Poisoning. In: Seafood Toxins, E. Ragelis (eds). Am. Chem. Soc. Symposium Ser. 262 ; 207-214.