

Direction de l'Environnement et de l'Aménagement Littoral

Département Microbiologie et Phycotoxines
Nantes

Code B 13005

Ifremer

Modélisation de la contamination des bivalves par les toxines d'*Alexandrium* spp

Rapport final

PNEC ART3, 2001 - 2002

Coordination : *Patrick Lassus*

Z. Amzil, M. Bardouil, R. Baron, M. Bohec, S. Bougrier, P. Garen,
M. Laabir, D. Leguay, P. Masselin, P. Truquet, V. Séchet
(*collaborateurs*)

C. Bablon, J.-B. Bérard, C. Carré, V. Cheignon, S. Lecamp, M. Mabit
(*stagiaires*)

août 2002

Direction de l'Environnement et de l'Aménagement Littoral

Département Microbiologie et Phycotoxines
Nantes

Code B 13005

ifremer

Modélisation de la contamination des bivalves par les toxines d'*Alexandrium* spp

Rapport final

PNEC ART3, 2001 - 2002

Coordination : *Patrick Lassus*
DEL/MP, Nantes

Z. Amzil¹, M. Bardouil¹, R. Baron², M. Bohec¹, S. Bougrier³, P. Garen³,
M. Laabir⁴, D. Leguay³, P. Masselin¹, P. Truquet¹, V. Séchet¹
(*collaborateurs*)

C. Bablon¹, J.-B. Bérard¹, C. Carré¹, V. Cheignon^{1,2}, S. Lecamp¹,
M. Mabit¹ (*stagiaires*)

¹ DEL/MP/PN, Nantes

² DRV/VP/GA, Nantes

³ DRV/RA/CREMA, L'Houmeau

⁴ Département Génie Biologique, Université de Montpellier II

Modélisation de la contamination des bivalves par les toxines d'*Alexandrium* spp

Rapport final - PNEC ART3, 2001 - 2002

Sommaire

1. Préambule	1
2. Introduction	2
3. Méthodes	3
3.1. Prélèvements <i>in situ</i>	3
3.2. Système expérimental	3
3.3. Matériel biologique	6
3.4. Analyses chimiques	8
3.4.1. Chromatographie liquide en phase inverse	8
3.4.2. Chromatographie ionique	8
3.5. Analyses physiologiques	9
4. Résultats	12
4.1. Observations en Penzé	12
4.2. Simulation de différents cycles de contamination	15
4.2.1. Concentrations résiduelles	17
4.2.2. Salinités	20
4.2.3. Seston, productions de biodépôts, taux d'absorption	20
4.2.4. Durées d'activité alimentaire	24
4.2.5. Cinétiques de contamination	26
4.3. Comparaison entre FTA et toxicités	28
4.4. Essais de riviviscence des biodépôts	30
4.5. Définition d'un modèle de contamination / détoxification	32
4.6. Premiers essais de modélisation	32
4.7. Production d'<i>Alexandrium catenella</i> en bioréacteurs	32
5. Discussion et perspectives	36
6. Références bibliographiques	38

Modélisation de la contamination des bivalves par les toxines d'*Alexandrium* spp

Rapport final

PNEC ART3, 2001 - 2002

Patrick Lassus (*coordination*)

Zouher Amzil, Michèle Bardouil, Régis Baron, Madeleine Bohec, Serge Bougrier,
Pierre Garen, Mohamed Laabir, Didier Leguay, Pierre Masselin, Philippe Truquet,
Véronique Séchet (*collaborateurs*)

Clotilde Bablon, Jean-Baptiste Bérard, Camille Carré, Valérie Cheignon,
Sylvain Lecamp, Marie Mabit (*stagiaires*)

1. Préambule

L'objectif général de l'étude est de simuler les épisodes de contamination de certains bivalves (huîtres et moules) par les toxines d'*Alexandrium minutum* et *A. catenella* à partir d'un module expérimental adapté, et en vue de construire un modèle de contamination applicable à ces espèces. Ce modèle sera ensuite susceptible d'être couplé aux modèles biologiques locaux (estuaire de Penzé et étang de Thau) de déterminisme des blooms, ainsi qu'aux modèles hydrodynamiques développés par différentes équipes (Ifremer, Université de Montpellier).

La première année (2001-2002) était consacrée à la simulation des contaminations en estuaire de Penzé (*Alexandrium minutum*) et au développement de cultures en masse d'*A. catenella* de Thau en bioréacteurs.

2. Introduction

Depuis 1983 pour les phycotoxines diarrhéiques, 1988 pour les phycotoxines paralysantes et 1999 pour les toxines amnésiantes, les bivalves commerciaux des côtes françaises, principalement la moule, 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 difficile à établir, une des actions alternatives les plus efficaces a consisté, jusqu'ici, à améliorer les conditions de désintoxication des mollusques.

Des travaux expérimentaux, réalisés entre 1996 et 2000 et financés pour partie par Ifremer et pour partie par le Ministère de l'Environnement et la Région Charentes-Poitou, ont permis d'élargir notablement le champ des connaissances en ce qui concerne : 1) la réponse physiologique des coquillages les plus affectés (huîtres) par les toxines paralysantes (Bardouil *et al.*, 1996 ; Lassus *et al.*, 1996 et 1999 ; Wildish *et al.*, 1998) et, 2) les cinétiques de détoxification de plusieurs types de bivalves en fonction du régime alimentaire (Bougrier *et al.*, 2001 ; Lassus *et al.*, 1996 et 2000).

Au cours de ces essais, qui seront résumés plus loin, et d'après la littérature internationale, il est apparu clairement que la cinétique de contamination et de détoxification des bivalves était assimilable à une fonction mathématique simple. Par ailleurs, des essais de modélisation *a posteriori* de la contamination PSP (Paralytic Shellfish Poisoning) des bivalves en zone côtière (équipes espagnoles et canadiennes) ont montré qu'à partir d'un niveau de toxicité connu des cellules algales et de la connaissance des facteurs environnementaux (température, salinité, seston total), il était tout à fait possible de simuler précisément les épisodes toxiques observés.

En France, deux sites géographiques complètement différents sont concernés par des proliférations estivales (Manche) ou automnales (Méditerranée) d'*Alexandrium* toxiques : les côtes nord-bretonnes avec *A. minutum*, espèce faiblement toxique mais facilement ingérée par les moules et les huîtres, et l'étang de Thau avec *A. catenella*, espèce assez toxique d'introduction récente et contaminant, apparemment, surtout les moules et peu les huîtres.

Dans le premier cas, la contamination des coquillages a lieu dans des zones estuariennes à forte turbidité et sous la dominance des courants de marée, alors que dans le second cas la diffusion des algues dans les différentes parties de l'étang suit des processus hydroécologiques plus complexes.

Les résultats, qui vont être présentés dans ce rapport, concernent donc la première tranche d'étude (2001-2002) qui a reçu une aide financière du PNEC ART3 en 2001. Les travaux réalisés consistent en une étude de faisabilité (octobre 2000), un suivi 24 h d'un épisode d'eau rouge en Penzé en juin 2001 (recalage des paramètres expérimentaux), le développement d'un programme d'automatisation et d'acquisition des données adapté aux modules expérimentaux (août-septembre 2001), quatre expériences de simulation des contaminations en Penzé en octobre-novembre 2001 et quatre autres expériences en avril 2002, ainsi que des essais de production en masse d'*A. catenella* en bioréacteurs (juillet-novembre 2001).

Tous les résultats ne sont pas encore dépouillés. Une autre intervention en Penzé est prévue en juin 2002 ainsi qu'une autre série de quatre expériences en octobre 2002 pour répondre aux questions posées dans le cadre de l'étude 2002-2003 (prolongation prise en charge par le PNEC).

3. Méthodes

3.1. Prélèvements *in situ*

Les prélèvements en rivière de Penzé (fig. 1) ont été réalisés les 12 et 13 juin 2001 à l'occasion de phénomènes d'eaux rouges à *Heterocapsa triquetra* et *Alexandrium minutum* observées dans l'estuaire externe de Penzé et en un point amont (Goaz ar Rouz) la semaine précédente. D'un point fixe situé sous le pont de la Corde (à 50 m des premiers parcs à huîtres), des prélèvements d'eau ont été réalisés toutes les heures pendant 24 h à partir du 12 juin (13 h 00). Les échantillons (250 ml) fixés au lugol acétique ont été conservés pour dénombrement de la microflore planctonique. Les mesures de température et de salinité ont été réalisées en temps réel avec un thermoconductimètre WTW tandis que les turbidités ont été mesurées au laboratoire sur turbidimètre HACH 2100A. La transformation des valeurs de turbidité (NTU) en concentrations équivalentes de matières en suspension (MES en mg / L) ont été effectuées à partir de 70 couples de données MES / NTU mesurées en Penzé en juin 2000 par Evelyne Erard (DEL/EC/PP). La relation est de la forme :

$$\text{MES} = 3.2373 \text{ NTU} + 1.4229, \quad \text{avec un } R^2 = 0.467$$

Quelques mesures de concentrations en chlorophylle a ont été réalisées au spectrofluorimètre Turner à partir d'échantillons de 100 mL d'eau filtrés sur Whatman GF/F (filtres extraits à l'acétone).

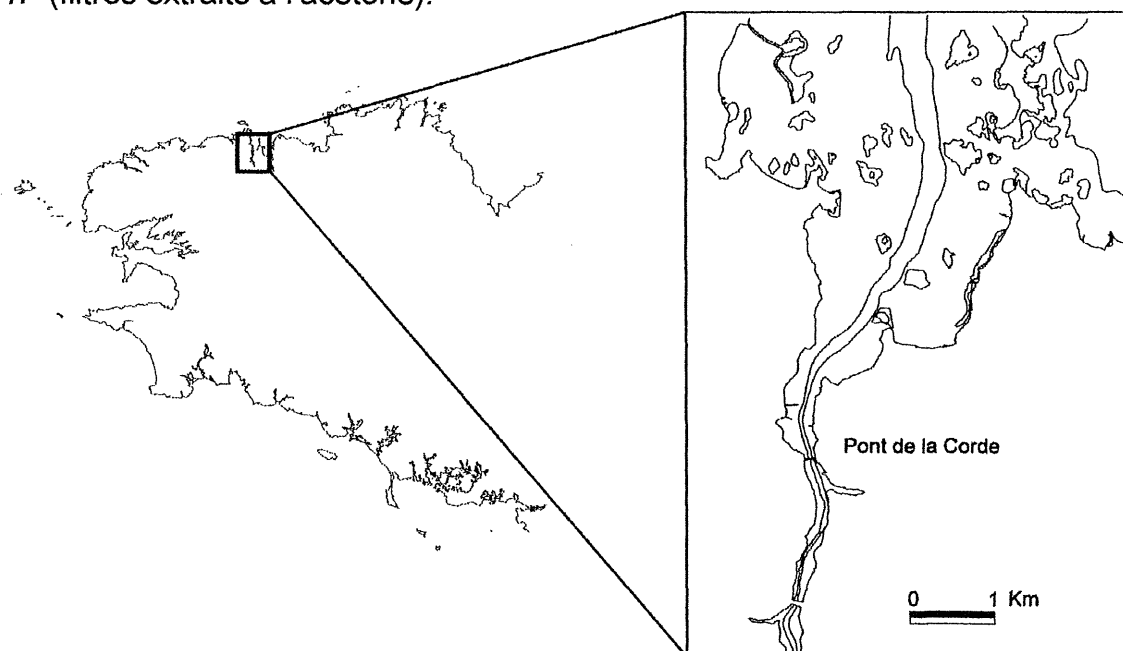


Figure 1 : Localisation de la rivière de Penzé et du pont de la Corde.

3.2. Système expérimental

Le système pour le suivi individuel a été défini par Serge Bougrier. Il est composé de trois stands sur lesquels sont disposées six boîtes individuelles dont une boîte « témoin » qui contient une coquille d'huître vide. La circulation d'eau dans le circuit est assurée par une pompe (débit = 400 L / h), qui puise alternativement, selon un

programme d'automatisation, l'eau de mer seule ou additionnée de cultures algales dans les bacs d'*Alexandrium*, de *Skeletonema costatum* et de « rinçage », selon les différents cycles en cours d'étude (fig. 2).

A la différence des expériences précédentes qui visaient seulement à alimenter en continu des bivalves avec une concentration constante d'*Alexandrium minutum* puis d'une micro algue non toxique de référence, le système de simulation comporte un programme régulant des cycles successifs *Alexandrium* / algue non toxique, selon un rythme 2 heures / 4 heures comparable aux observations réalisées en estuaire de Penzé. En fait, le temps de contact avec *A. minutum* peut varier de 30 min à un maximum de 2 h mais il a été jugé préférable, dans un premier temps, de se situer dans les conditions de terrain les plus défavorables.

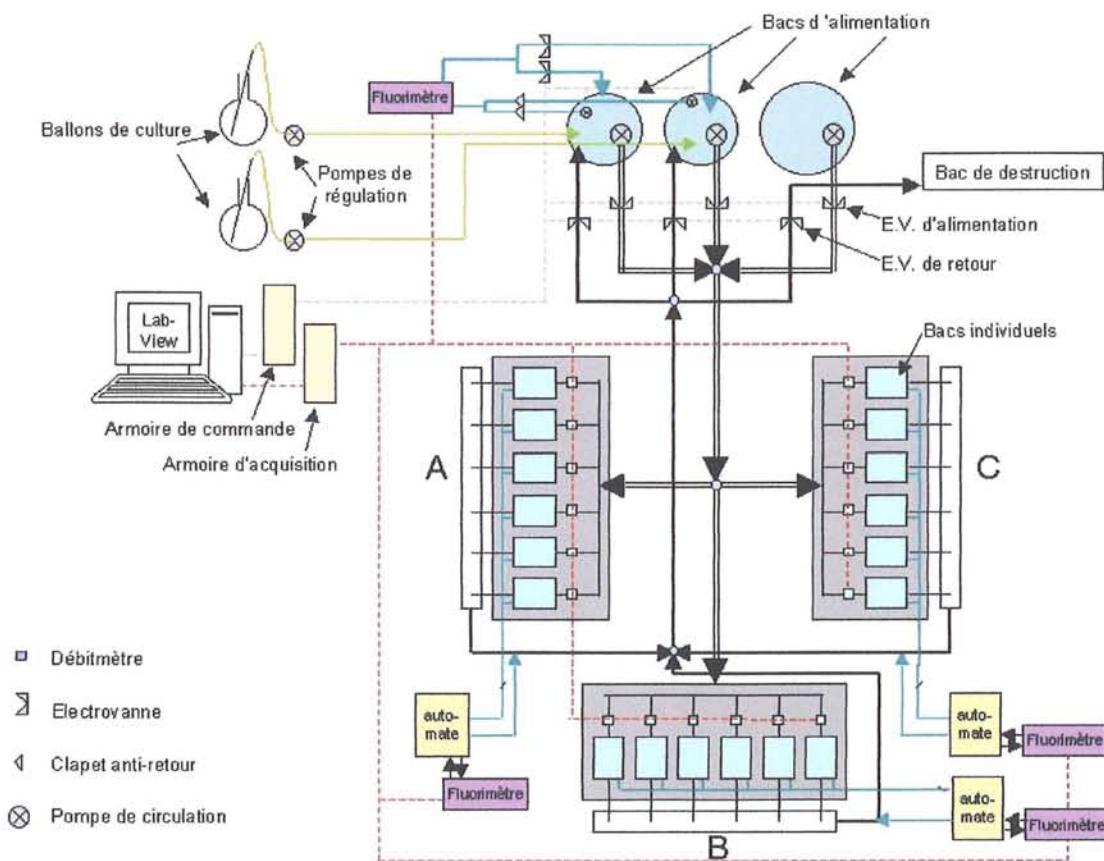


Figure 2 : Schéma général du dispositif expérimental représentant : 1) les trois stands de six boîtes individuelles (A, B, C), 2) les bacs d'alimentation, 3) l'ensemble régulation / acquisition (EV : électrovannes).

Le programme de commande / acquisition et de régulation des flux en circulation, a été conçu sur le logiciel Lab-View dans le cadre d'un stage (Sylvain Lecamp, Ecole Centrale de Nantes). Sans entrer dans le détail de ce programme, il est important de retenir qu'il régule, entre autres, les phases d'alimentation en *Alexandrium minutum* et *Skeletonema costatum*, le rinçage du circuit entre chaque cycle avec les périodes nécessaires de temporisation, l'acquisition en continu des signaux de fluorescence enregistrés par les fluorimètres en sortie des trois stands (A, B, C). La concentration dans le bac d'alimentation en « service » est régulée par une micropompe Ismatec

asservie à un 4^{ème} fluorimètre : la fluorescence correspondant à la concentration algale nominale est utilisée comme « consigne » (régulation des valeurs de fluorescences entre un seuil haut et un seuil bas encadrant la consigne) pour la commande de l'ouverture ou de la fermeture de la pompe introduisant la culture d'*Alexandrium* ou de *Skeletonema* dans le bac d'alimentation correspondant.

A l'entrée de chaque stand, se trouve une chambre d'homogénéisation qui permet d'obtenir la même concentration d'*Alexandrium* dans toutes les boîtes contenant les huîtres (fig. 3). Les huîtres sont orientées dans les boîtes de telle façon que la région postérieure soit en face de l'arrivée d'eau. Sept tubes flexibles sont reliés à cette chambre : six sont connectés à des débitmètres qui régulent le flux hydrique passant à travers chacune des six boîtes individuelles, et le dernier permet d'évacuer les bulles d'air emprisonnées dans la chambre d'homogénéisation.



Figure 3 : Stand sur lequel sont disposées les six boîtes individuelles contenant chacune une huître. On distingue derrière le stand la chambre d'homogénéisation.

En sortie des boîtes individuelles, un trop plein permet l'évacuation de l'eau vers le bac d'alimentation (circuit fermé) tandis qu'une prise d'eau située sous le niveau d'eau des boîtes permet le raccordement à un automate de mesure : six électrovannes déclenchent alternativement une prise d'eau d'une minute dans chaque boîte pour analyse en temps réel de la fluorescence en sortie de boîte (spectrofluorimètre Turner). Par connexion à une carte d'acquisition, ces mesures sont enregistrées sur ordinateur et transcrites en volts en fonction du temps.

En aval des électrovannes, une pompe immergée assure la circulation de l'eau dans le système tandis qu'un ordinateur commande le mécanisme d'ouverture / fermeture des électrovannes. Afin d'économiser les cultures microalgales, une « temporisation » a été introduite au début de chaque phase de rinçage du circuit

(entre deux régimes alimentaires) : l'électrovanne de retour vers le bac d'alimentation (quel qu'il soit) n'est fermée que deux minutes après la fermeture de l'électrovanne d'alimentation. Cet intervalle de temps a été défini expérimentalement de façon à récupérer un maximum de la culture qui était introduite précédemment dans le circuit. Cette opération a lieu avant le rinçage à l'eau de mer seule du circuit (15 min), l'électrovanne de retour activée, dans ce cas, étant l'électrovanne dirigeant l'effluent vers le bac de destruction.

Lors des expériences d'avril 2002 des vases (pélites) de l'estuaire ont été introduites dans le circuit après avoir été préalablement brûlées à 450 °C pour détruire la matière organique. L'objectif était de mettre en évidence un effet de la matière minérale (MMA = matière minérale ajoutée) sur l'activité alimentaire et sur les taux de bioaccumulation. Compte tenu de l'environnement des huîtres cultivées dans la partie externe de l'estuaire, il était important de prendre ce facteur en considération. En pratique, les vases calcinées étaient pesées puis mises en suspension dans 10 L d'eau de mer. La suspension était injectée par micropompe dans le bac d'alimentation en cours avec une régulation de l'apport opérée de la même façon que l'apport en cultures. Dans ce cas, la mesure en continue des unités NTU était réalisée par un turbidimètre (Digital Direct-Reading) Orbeco-Hellige, et l'acquisition des données était relayée par Lab View.

3.3. Matériel biologique

Les huîtres (*Crassostrea gigas*) ont été obtenues chez un producteur de la baie de Morlaix (île Callot, Finistère Nord). Elles ont été élevées sur table et ne présentent pas de précédent en matière de contamination PSP. Les individus étaient en phase de repos sexuel avec un poids moyen (poids humide), respectivement de $51,3 \pm 5,1$ g (poids de chair humide : 3,81 g et poids sec : 0,83 g). Avant d'être transférés dans les unités expérimentales, les animaux ont été nettoyés, débarrassés de leurs épibiontes et acclimatés pendant cinq à six jours en eau de mer naturelle à $16 \pm 0,5$ °C alimentés avec *Heterocapsa triquetra*, dinoflagellé non toxique de même taille et valeur énergétique qu'*A. minutum* (Bardouil *et al.*, 1993).

Les cultures en statique d'*A. minutum* et *H. triquetra* ont été réalisées en ballons de 10 L et en barils de 25 L à $16 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$, avec une intensité lumineuse de $50 \pm 4 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ et un rythme d'éclairement jour / obscurité de 12 h / 12 h. Les cellules sont inoculées dans un milieu constitué d'eau de mer naturelle stérile et enrichie en milieu F/2 de Guillard. La souche AM89BM d'*A. minutum* isolée en baie de Morlaix en 1989 possède une toxicité moyenne en culture de $2,4 \pm 0,1$ pg.eq.STX par cellule, à la fin de la phase exponentielle de croissance. Les cultures ont été utilisées à ce stade et la toxicité a été réévaluée sur un aliquot de chaque nouveau ballon de culture utilisé au cours des expériences. Lors des expériences d'octobre-novembre 2001 la toxicité moyenne était de $1,4 \pm 0,2$ pg.eq.STX par cellule et en avril 2002 de $1,58 \pm 0,29$ pg.eq.STX par cellule. Les cultures de *S. costatum* ont pu être développées en ballons de 10 L dans les mêmes conditions de croissance, mais avec un milieu ES de Provasoli.

La souche d'*Alexandrium catenella* provient de l'étang de Thau et est maintenue en culture statique dans du milieu F/2 de Guillard réalisé avec de l'eau de mer de Thau

(39 ‰) enrichie avec les solutions nutritives correspondantes. Du milieu K (Keller *et al.*, 1985, 1987) a été également utilisé avec une eau de mer artificielle lors des manipulations en bioréacteurs. Ceux-ci ont été développés par le laboratoire de Production et Biotechnologie des Algues du centre Ifremer de Nantes (rapport Algues et Mer, G. Bougaran, 1997). D'une contenance de 2,5 L de culture, ces unités (fig. 4) sont construites en altuglas et sont entièrement démontables pour le nettoyage. Le corps cylindrique est boulonné à deux plaques (supérieure et inférieure), l'étanchéité des surfaces en contact est obtenue par l'ajout de silicone. L'architecture principale de chaque bioréacteur est aménagée pour recevoir diverses sondes. Une turbine *Rushton* entraînée par un moteur de 12 V est fixée verticalement au centre du volume et permet l'homogénéisation de la culture ainsi que la circulation de celle-ci dans le circuit d'absorption optique. La vitesse de rotation de la turbine peut varier de 0 à 200 tours.min⁻¹. Une canne d'aération injecte de l'air stérile (filtré sur 0,2 µm) selon un débit réglable.

Le prélèvement quotidien d'échantillons de culture est réalisé au moyen d'une sonde constituée d'une canne plongeant à mi-hauteur du volume et reliée à une seringue stérile par de la tuyauterie souple.

Les sondes de mesure sont les suivantes : 1) une sonde (LM 35DZ) revêtue d'acier inoxydable, qui contrôle la température à 0,2 °C près, 2) une sonde pH (modèle Mettler Toledo, InLab 420), qui est reliée à un système de correction de l'augmentation du pH par injection de dioxyde de carbone, 3) enfin, une sonde d'absorption optique, située dans la partie inférieure du volume : la suspension cellulaire circule entre une diode électroluminescente et une photorésistance. La variation d'intensité lumineuse à une certaine longueur d'onde par rapport à un signal de base (eau de mer à l'obscurité), indique une variation de concentration de la culture (Loi de Beer Lambert).

Ce système permet un suivi en continu de la population cellulaire.

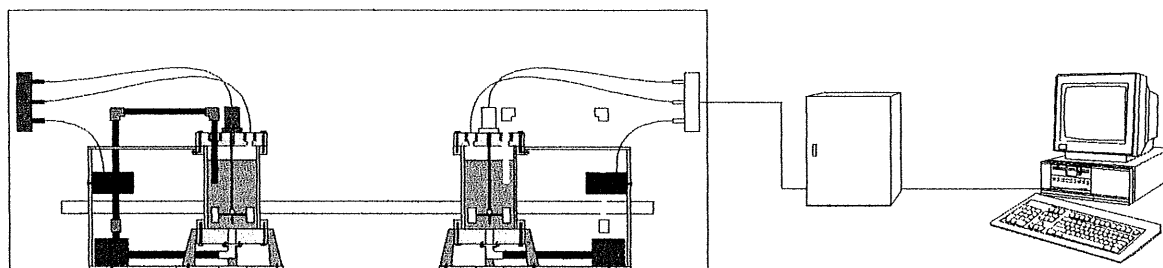


Figure 4 : Schéma général montrant deux bioréacteurs montés face à une rampe d'éclairage de la salle de culture, avec leurs connexions aux interfaces d'acquisition de mesure.

L'eau de mer contenant le milieu de culture est autoclavée (à 120 °C pendant 15 min), puis injectée via la canne de vidange. L'inoculum est introduit de la même façon, ou bien versé grâce à un entonnoir stérile qui plonge à travers un presse-étoupe (manipulation sous hotte à flux laminaire).

Les différentes sondes sont reliées à un système d'acquisition analogique des divers signaux. Le signal « pH » passe d'abord par un analyseur multichaîne (CONSORT C834) qui permet l'étalonnage, l'acquisition des signaux toutes les dix secondes et le

couplage au système de régulation de l'ensemble de ces sondes. La totalité des signaux est numérisée sur un ordinateur et traitée par le logiciel PHYSIO 1.3 : suivi en continu des paramètres et intégration sous forme de courbes évolutives transférables sur Excel 5.0. Le logiciel LAPLINK permet, par ailleurs, de surveiller à distance la salle de culture en mettant en réseau plusieurs ordinateurs.

3.4. Analyses chimiques

3.4.1. Chromatographie liquide en phase inverse

Les analyses des phycotoxines paralysantes ont été réalisées quotidiennement par CLHP-AI, pendant la période de contamination, sur chaque individu et selon la méthode d'Oshima *et al.* (1995). La chair totale a été broyée dans du CH₃COOH 0,1 N à 4 °C sur une base V/M. Après centrifugation (3 000 x g, 15 min, 4 °C) le pH des extraits était ajusté à 3,0 - 3,5 avec de l'acide acétique glacial. Après demi-dilution les surnageants étaient ultrafiltrés (20 000 Da, Sartorius Centrisart) et conservés à 4 °C jusqu'à l'analyse. Pour les cultures des *Alexandrium* spp, dix mL ont été pipetés en fin de phase exponentielle. Les cellules ont été dénombrées sur cellules hématimétriques et les échantillons centrifugés (15 min, 3 000 g, 4 °C). Après prélèvement du surnageant de l'acide acétique 0,1 M est ajouté au culot et les cellules sont cassées par méthode de congélation / décongélation.

Des solutions diluées à 1:200 de chaque composé d'un matériel de référence PSP1-C (MACSP, CNR-Halifax, Canada) ont été utilisées comme étalons externes pour la détection quantitative. Compte tenu des facteurs de dilution, la concentration molaire a été convertie en µg STX eq.100 g⁻¹ de chair de bivalve en utilisant les facteurs de conversion d'Oshima (1995), c'est-à-dire 297 µg.STX.eq.µM pour la GTX3, 168 pour la GTX2, 48 pour les C1 ; C2, 28 pour la B1 et 354 pour la GTX4. Pour les toxines d'*A. catenella*, certaines (B1, C1, C2) sont quantifiées de manière indirecte après une hydrolyse acide (Masselin *et al.*, 2001).

La chaîne d'analyse est composée d'une pompe programmable, de deux pompes isocratiques, d'un injecteur automatique thermostaté, d'un four de colonne thermostatable par effet Peltier, d'un bain-marie thermostaté, d'un spectrofluorimètre. Un ordinateur pilote l'ensemble du système grâce au logiciel de chromatographie HP-CHEM .

3.4.2. Chromatographie ionique

Les ions contenus dans le milieu de culture d'*A. catenella* peuvent être dosés par une chaîne d'analyse chromatographique échangeuse d'ions DIONEX. Le dosage repose sur le niveau d'absorption des différents ions à analyser à travers une colonne remplie de résine, en fonction de l'éluant utilisé. L'utilisation d'éluants spécifiques au dosage des anions et des cations nécessite l'utilisation de deux colonnes et de deux suppresseurs séparés (augmentation du signal relatif à un ion donné et diminution de la conductivité résiduelle due à la solution). Les séparations se font en mode isocratique ; sur colonne Ion Pac AS 9-Hc 4 mm pour les anions (éluant : Na₂CO₃ 9mM) et sur colonne Ion Pac CS 12, 4 mm pour les cations (éluant : acide méthane sulfonique 13 mM).

La chaîne est constituée d'un passeur d'échantillons AS 40, d'une pompe à gradient GP 40, d'un module chromatographique LC 20 (contenant les deux colonnes) et d'un détecteur électrochimique ED 40. Le système est relié à un ordinateur via un logiciel d'acquisition et de traitement des chromatogrammes PEAKNET.

3.5. Analyses physiologiques

Plusieurs paramètres écophysologiques permettent de suivre le comportement alimentaire individuel des huîtres qui a été évalué de deux façons :

- une méthode utilise le temps d'activité des huîtres ou Feeding Time Activity (FTA) et l'évolution du différentiel de fluorescence entre « entrée » et « sortie » du stand ;
- une autre méthode permet de calculer les taux de filtration et de consommation de l'huître, à partir de mesures du seston dans l'eau et de la production de biodépôts.

Paramètres relatifs au milieu

Le POM (Particular Organic Matter = Matière Organique Particulaire ou : MOP) est la partie organique du seston, il est exprimé en mg.L^{-1} .

Le PIM (Particular Inorganic Matter = Matière Inorganique Particulaire ou : MIP) est la partie inorganique du seston, il est exprimé en mg.L^{-1} .

Le TPM (Total Particular Matter : Matière Particulaire Totale) est l'ensemble de la matière (organique et inorganique) contenue dans le seston. Il est exprimé en mg.L^{-1} et lié au PIM et au POM par la relation :

$$\text{TPM} = \text{PIM} + \text{POM}$$

Paramètres relatifs à l'animal

Le CR (Clearance Rate ou taux de filtration) représente le volume théorique entièrement épuré de toute particule, filtré par l'huître et par unité de temps, il s'exprime en L.h^{-1} .

$$\text{CR} = [(C1-C2) / C1] \times D$$

Avec C1 : concentration d'algues à l'entrée (boîte témoin), C2 : concentration d'algues à la sortie des boîtes individuelles, D : débit.

C1 et C2 peuvent être remplacées par F1 et F2, les fluorescences à l'entrée et à la sortie.

Le FR (Filtration Rate ou taux consommation) est la quantité de nourriture consommée par unité de temps et par masse de poids sec, il s'exprime en $\text{mg.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$ de masse sèche.

Le FR peut également être calculé grâce à la détection en continu de la chlorophylle a par le spectrofluorimètre TURNER. La concentration en *A. minutum* de l'eau de mer qui alimente les boîtes individuelles est connue : c'est celle qui est détectée à la sortie de la boîte témoin et qui sert de référence. La différence entre cette concentration et celle enregistrée à la sortie de chacune des boîtes pendant un

temps défini peut être calculée à partir de la relation : fluorescence de la chlorophylle a / nombre de cellules.

Expérimentalement, on intègre le FR par périodes de six minutes sur quatre jours avec un temps de prélèvement d'une minute.

$$FR = (Q_{\text{témoin}} - Q_{\text{animal}}) \times \text{débit}$$

$Q_{\text{témoin}}$: quantité de matière en sortie de la boîte témoin

Q_{animal} : quantité de matière en sortie de boîte contenant une huître

Le RR (Rejection Rate ou taux de production de pseudofèces) est l'ensemble de la matière filtrée, rejetée sous forme de pseudofèces. On peut le subdiviser en deux parties : l'IRR (Inorganic Rejection Rate) et l'ORR (Organic Rejection Rate) qui correspondent respectivement aux matières inorganiques et organiques présentes dans les pseudofèces. Le RR s'exprime en $\text{mg.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$ de masse sèche.

L'ER (Egestion Rate ou taux de production de fèces) est la matière ingérée puis rejetée par l'animal sous forme de fèces au niveau de l'anus. Comme dans le cas du Rejection Rate on peut le subdiviser en deux parties : l'IER (Inorganic Egestion Rate) et l'OER (Organic Egestion Rate). L'ER s'exprime en $\text{mg.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$ de masse sèche.

Le BR (Biodeposition Rate ou taux de production de bio dépôts) est la quantité de bio dépôts produite par unité de temps. Nous l'exprimons également en $\text{mg.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$ de masse sèche.

$$BR = RR + ER$$

L'IR (Ingestion Rate ou taux d'ingestion) est l'ensemble de la matière filtrée et ingérée par l'animal au niveau de sa bouche. Il s'exprime en $\text{mg.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$ de masse sèche.

$$IR = FR - RR$$

Dans le cas particulier où le coquillage est expérimentalement nourri avec des cultures d'algues à des concentrations insuffisantes pour entraîner la production de pseudofèces, on peut considérer que $RR \neq 0$ et $IR \neq FR$.

L'AR (Absorption Rate ou taux d'absorption) se définit comme étant la matière ingérée puis absorbée lors de son passage dans le tube digestif au niveau de l'hémolymphe. Il est exprimé en $\text{mg.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$ de masse sèche.

$$AR = FR - (RR + ER)$$

Il est également possible d'intégrer les quantités de toxine comme des marqueurs de l'absorption. Ainsi, des prélèvements ont été réalisés sur les cultures pures d'*Alexandrium minutum*, afin d'établir les relations entre nombre de cellules et POM et entre nombre de cellules et quantité de toxines.

Pour cela, 120 mL de culture ont été prélevés dans chaque ballon utilisé au cours des expériences de simulation : 10 mL réservés à l'analyse toxinique par CLHP-AI, 10 mL pour le comptage et 100 mL filtrés pour les pesées du TPM et du PIM.

En pratique, lors des expériences « témoins » comprenant 2 h de contact avec *A. minutum* et 4 h d'alimentation en eau de mer seule (semaines 1 et 4), la méthode classique des biodépôts a été utilisée : des échantillons de 1 à 5 L ont été prélevés quotidiennement pendant les périodes d'alimentation en *Alexandrium* pour analyse

du TPM et du PIM du seston. L'ensemble des biodépôts (fèces et pseudofèces) était prélevé manuellement (pipette automatique) dans chaque boîte deux fois par jour. Au cours de ces expérimentations et pendant les expériences à régimes mixtes (*A. minutum* / *S. costatum* en alternance 2 h / 4 h), la mesure en continu du différentiel de fluorescence en sortie des boîtes « essai » et des boîtes « témoin » a permis d'estimer :

- le temps d'activité de consommation (FTA), soit le pourcentage de temps pendant lequel le coquillage consomme les microlagues,
- le FR à partir de la relation : nombre de cellules / fluorescence.

Lors des expériences de novembre 2001 la relation Concentration cellulaire / Fluorescence n'a été que difficilement mesurée dans la mesure où les couples de valeurs étaient très rapprochés (concentrations maintenues constantes par le programme de régulation du taux de chlorophylle). Pour cette raison, les expériences d'avril 2002 ont été réalisées de façon à augmenter la dispersion en valeur des couples de données : concentrations cellulaires faibles pendant les phases « eau » (résiduel d'*A. minutum*) et « temporisation ». De cette façon il a été possible d'établir que la relation liant la fluorescence au nombre de cellules était de type linéaire et passait pratiquement par l'origine (fig. 5).

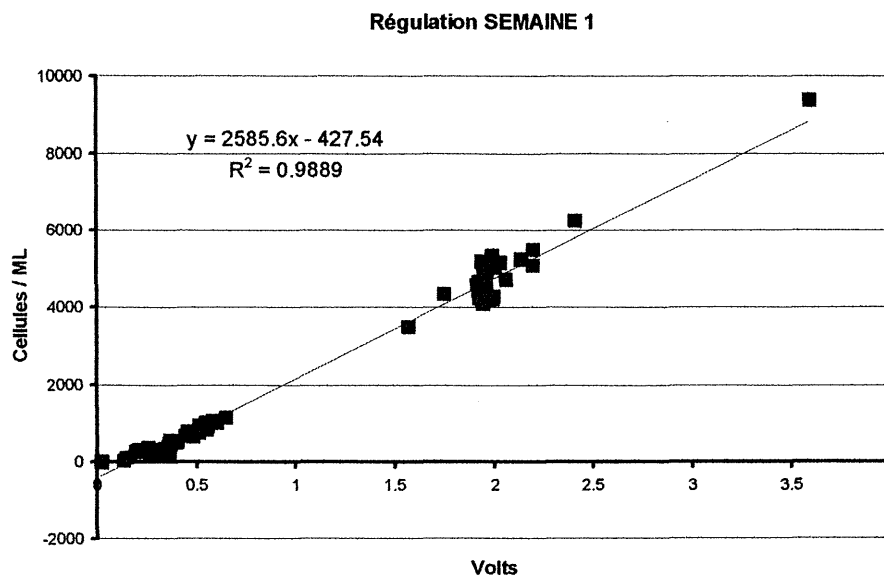


Figure 5 : Relation entre les concentrations cellulaires et les fluorescences (en volts) de la semaine 1 d'avril 2002 (*A. minutum* seul).

Les relations : concentrations cellulaires / fluorescence d'octobre-novembre 2001 seront donc construites sur le même type.

4. Résultats

4.1. Observations en Penzé (suivi 24 h)

Les conditions hydroclimatiques prévalant au moment de l'apparition de l'eau colorée en Penzé (première quinzaine de juin 2001) étaient en adéquation avec celles décrites par Morin *et al.* (2000) pour le développement d'*A. minutum* dans cet estuaire, à savoir : 1) température de l'eau égale ou supérieure à 16 °C (comprises entre 14,6 et 16,4 °C ici), 2) salinités entre 17 et 31 ‰ (comprises entre 18,5 et 32,5 ‰ ici), 3) nappe d'eau rouge étalée à basse mer à partir du pont de la Corde vers la baie (fig. 6).

L'étude qualitative et quantitative des prélèvements phytoplanctoniques a montré que les cinq espèces dominantes (en effectif) étaient : *Heterocapsa triquetra* (50 000 à 6 550 000 cellules / L), *Nitzschia acicularis* (10 000 à 1 500 000 cellules / L), *Alexandrium minutum* (8 000 à 650 000 cellules / L), *Chaetoceros* spp (9 000 à 225 000 cellules / L) et *Scrippsiella* sp (6 000 à 150 000 cellules / L). Les prélèvements réalisés dans la nappe d'eau rouge lors de son passage ont montré qu'elle était presque exclusivement constituée d'*H. triquetra*, *A. minutum* et *Scrippsiella* sp.

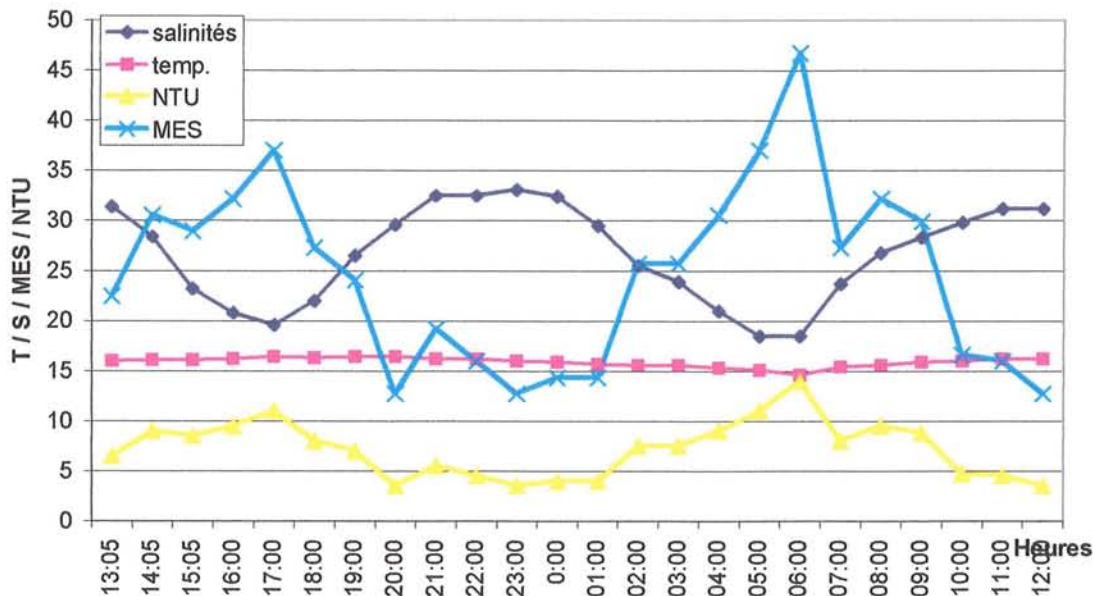


Figure 6 : Paramètres hydrologiques mesurés au cours du cycle de 24 heures (pont de la Corde, rivière de Penzé) les 12 et 13 juin 2001 : turbidités (NTU), salinités (g ‰), température de l'eau (DEG C). Paramètre calculé : MES (mg / L).

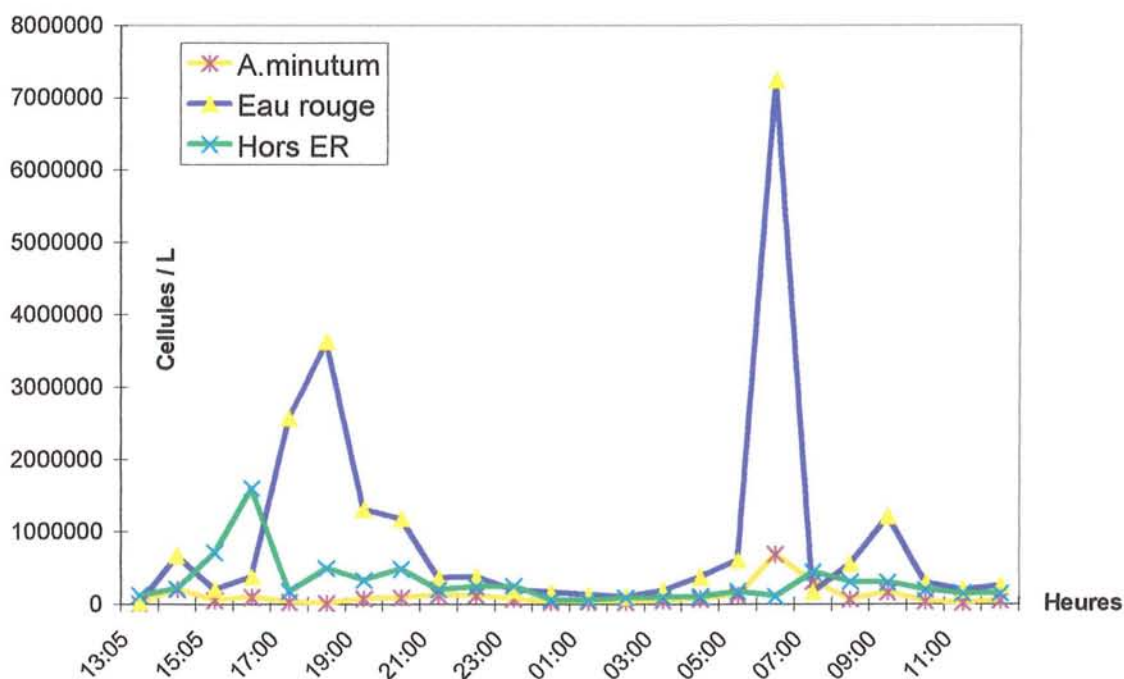


Figure 7 : Evolution des concentrations cellulaires de l'ensemble des espèces constituant l'eau rouge, de l'ensemble des autres espèces du phytoplancton et d'*A. minutum* au cours du cycle de 24 h.

L'examen de l'évolution des espèces constituant l'eau rouge permet de vérifier la présence de deux pics de forte concentration à $3 \cdot 10^6$ cellules / L et $7,2 \cdot 10^6$ cellules/L situés à BM + 1 h et donc au moment du maximum de MES. Parmi les espèces ne constituant pas l'eau rouge, essentiellement des petites diatomées, on note un pic à $1,7 \cdot 10^6$ cellules / L à BM - 1 h lié à la prolifération de *Nitzschia acicularis*, espèce accompagnatrice des blooms d'*A. minutum* déjà notée par E. Erard (com. pers.) (fig.7).

En ce qui concerne *A. minutum*, il est clair que s'il fait partie des espèces constituant l'eau rouge il n'est pas dominant et ses effectifs semblent régulés par ceux d'*Heterocapsa triquetra*. En fait, si lors du premier pic d'*Heterocapsa* il y a bien un affaissement très sensible de l'effectif en *Alexandrium*, ce n'est pas le cas lors du deuxième pic (fig. 8).

Les variations de concentration d'*A. minutum* au cours du cycle de 24 h sont difficilement interprétables : les maxima d'abondance lors du premier cycle de marée semblent concordés avec PM - 2 h alors que le maximum du deuxième cycle de marée correspond à BM + 1 h et au maximum de MES (fig. 9). Les observations réalisées par une autre équipe (DEL/EC/PP) dans l'estuaire externe de Penzé le 13 juin en début d'après-midi dans une nappe d'eau rouge ont révélé une dominance d'*A. minutum* (5 700 000 Cellules /L) contre 840 000 cellules /L d'*H. triquetra* (E. Erard, com. pers.). Ces observations semblent attester d'une certaine hétérogénéité en matière de dominance spécifique de la nappe d'eau rouge.

Ces données nécessitent d'être précisées, en particulier par des observations similaires pratiquées sur des eaux rouges à dominance d'*A. minutum*, comme ce fut le cas en 1994, 1996, 1997 et 1999 (Morin *et al.*, 2000).

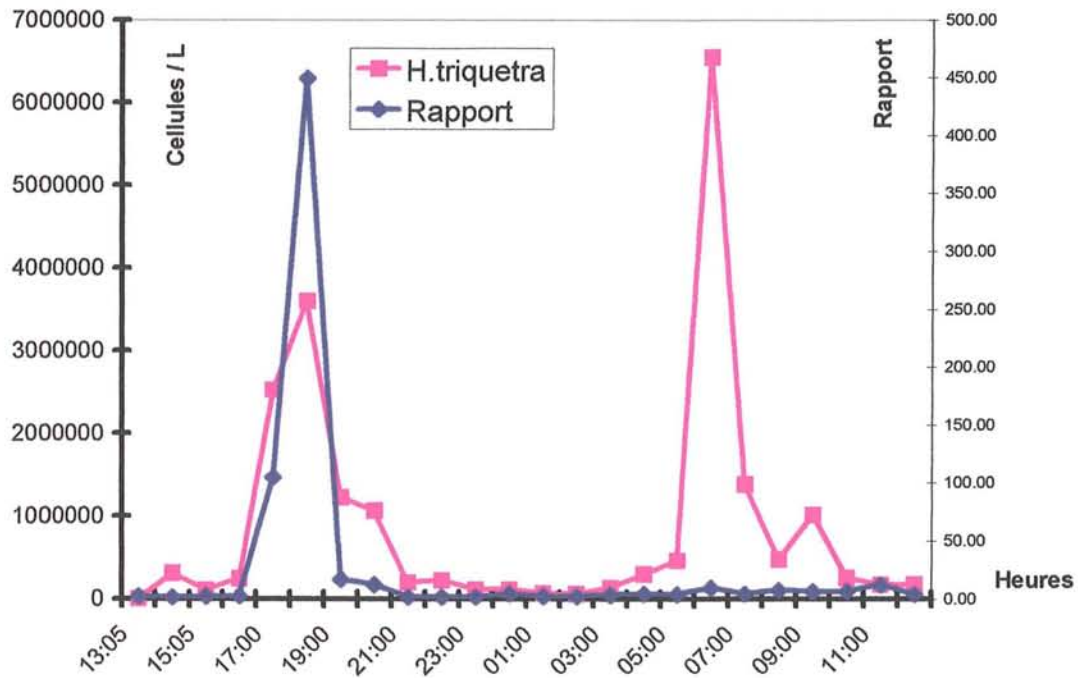


Figure 8 : Evolutions comparées des concentrations d'*H. triquetra* au cours du cycle de 24 h en Penzé et du rapport *H. triquetra* / *A. minutum* (en effectifs).

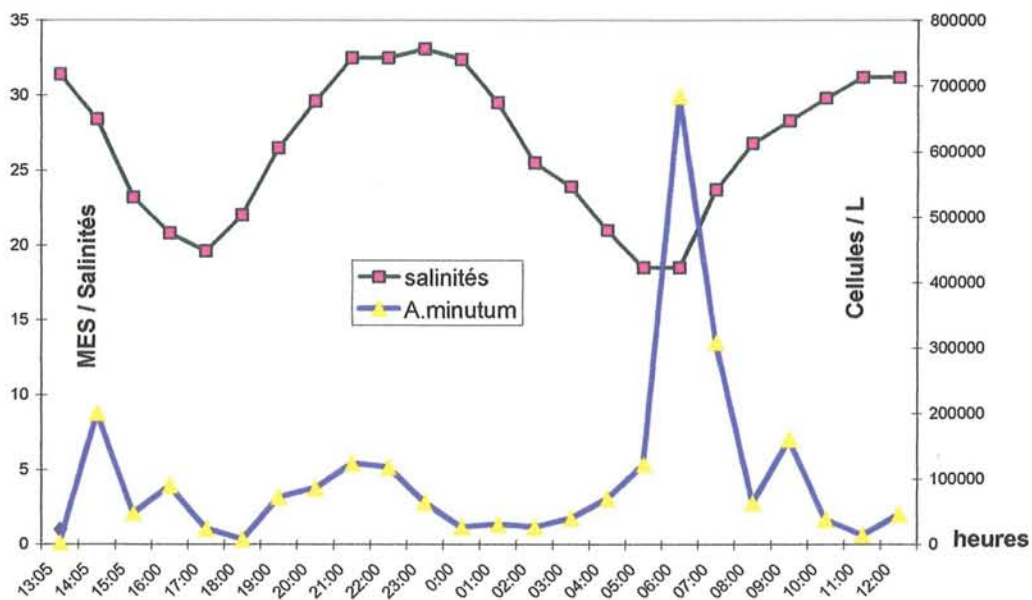


Figure 9 : Evolutions des concentrations en *A. minutum* en fonction de l'heure de marée et de la salinité (Penzé, pont de la Corde).

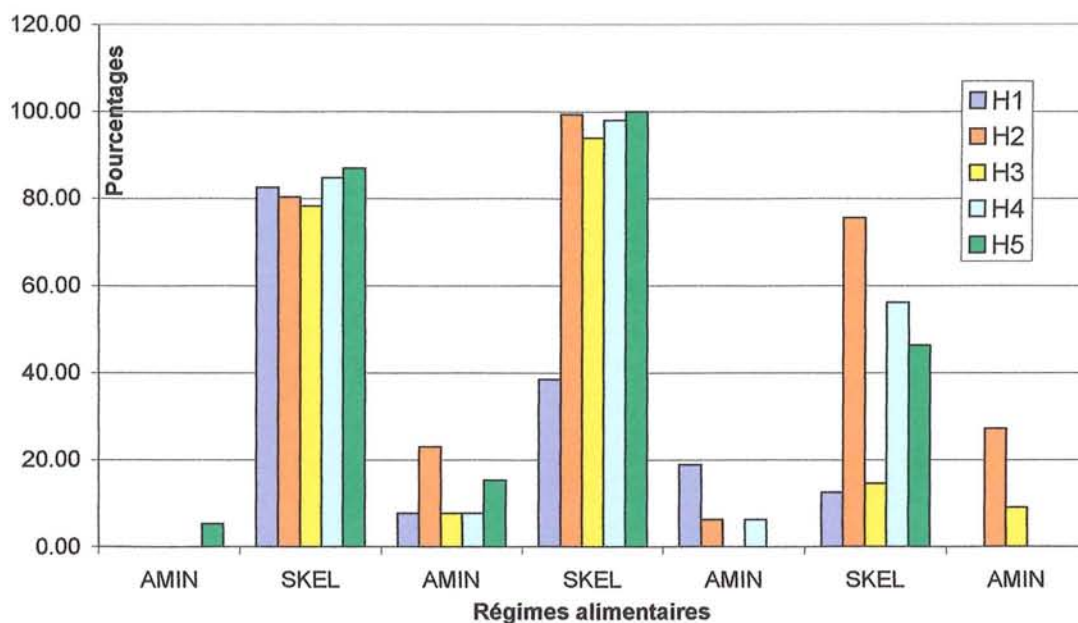
Sur la base de ces premières observations il est donc retenu : 1) de conserver un temps de contact avec l'eau rouge sur un point fixe d'au moins 2 heures, 2) de considérer comme probable deux contacts sur ce point par cycle de marée en fonction des courants de flux et de jusant, 3) de considérer que, quelle que soit la proportion relative des espèces constituant l'eau rouge, l'évolution du total de leur concentration dans le temps peut être assimilée à ce que serait l'évolution d'une eau rouge monospécifique à *A. minutum*, d'essayer de se recalculer, entre les pics d'eau rouge, sur des « résiduels » de 200 à 500 000 cellules / L dont environ 30 % constitués par les espèces constitutives de l'eau rouge.

Des observations antérieures réalisées en Penzé (J. C. Le Saux, com. pers.) semblent confirmer que les eaux rouges sont bien détectées dans la partie externe de l'estuaire (pont de la Corde) à BM + 1, c'est-à-dire au moment de la renverse (accumulation de cellules sur la discontinuité entre eaux douces et eaux salées ?) alors qu'au jusant les « tâches » se diluent dans l'estuaire avec les courants de marée, ce qui ne permet pas de les localiser.

4.2. Simulation de différents cycles de contamination

Les expériences de « faisabilité » sur 48 h réalisées en octobre 2000 avaient pour objectif de tester l'efficacité d'un module expérimental en circuit fermé fonctionnant à volume circulant total de seulement 50 L pour l'ensemble des trois stands (15 huîtres en expérience) de façon à pouvoir changer l'eau et le régime microalgal en un délai le plus court possible. Réalisées sans automatisation, avec des temps de contact de 2 h avec *A. minutum* seulement en périodes diurnes, ces expériences avaient montré : 1) que les FTA étaient faibles en phase « *Alexandrium* » (à des concentrations d'eau rouge = 10 000 cellules / mL), et maximales en phase « *Skeletonema* » (fig. 10), 2) que l'ajout de MES (pélites de diamètre moyen 60 µm prélevées en Penzé, déshydratées puis diluées en eau de mer) ne modifiait pas cette observation, 3) mais que, par contre, la proportion d'huîtres ayant atteint ou dépassé le seuil sanitaire (80 µg.eq.STX.100 g⁻¹) en 48 h était de 60 % sans MES et de 20 % avec MES.

FTA moyen sans MES



FTA avec MES

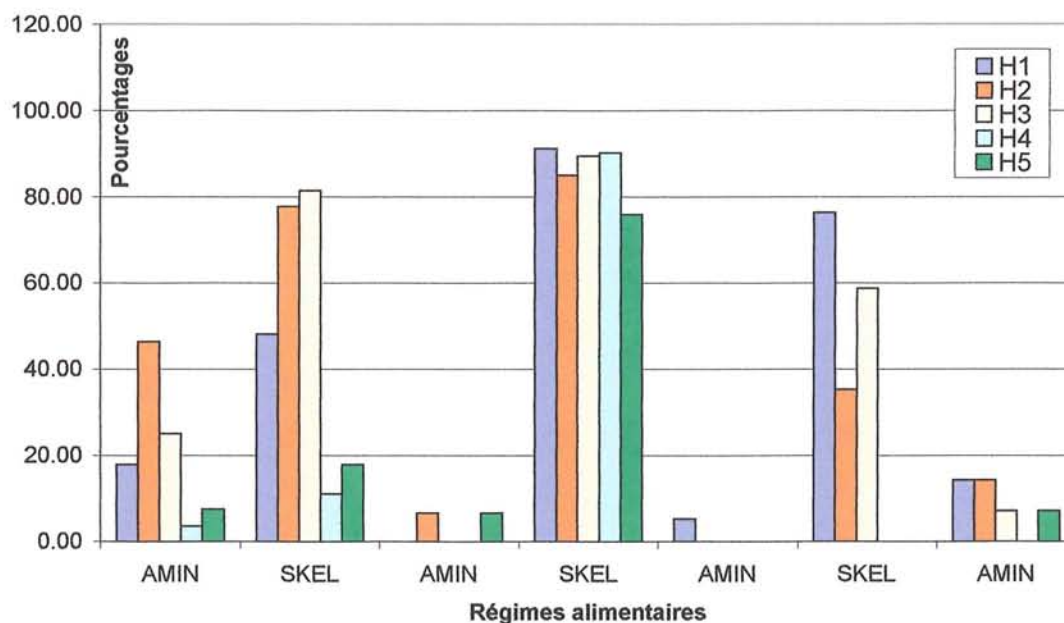


Figure 10 : Résultats préliminaires obtenus avec des expériences de faisabilité limitées à 48 h d'exposition d'huîtres de Penzé à des cycles diurnes de contamination d'*A. minutum* et *S. costatum*, avec (en bas) et sans (en haut) MES. Valeurs individuelles de FTA pour les huîtres H1 à H5.

A la différence d'octobre 2000, les expériences d'octobre-novembre 2001 prévoyaient : 1) une automatisation totale du système, 2) des concentrations différentes, chaque semaine, d'*Alexandrium minutum* pendant les maximums, et sans ajout de MES. Les conditions expérimentales sont résumées dans le tableau 1.

Semaine	Régime	<i>A. minutum</i> (pics)	<i>S. costatum</i> (inter.)
1	<i>A. minutum</i>	200	0
2	<i>A. minutum</i> + <i>S. costatum</i>	200	20 000
3	<i>A. minutum</i> + <i>S. costatum</i>	5 000	20 000
4	<i>A. minutum</i>	10 000	0
5	<i>A. minutum</i> + <i>S. costatum</i>	10 000	20 000

Tableau 1 : Concentrations en nombre de cellules / mL pour chaque régime alimentaire testé en octobre / novembre 2001.

Pour des raisons pratiques, toutes les expériences étaient prévues sur quatre jours, c'est-à-dire une durée nécessaire et suffisante pour observer une contamination au moins supérieure au seuil de salubrité (d'après les résultats des expériences de faisabilité). L'expérience de la semaine 5 n'a pu être réalisée faute de disposer de volumes suffisants de cultures en masse d'*A. minutum*.

En avril 2002, compte tenu des observations réalisées en 2001, une seule concentration d'*Alexandrium* en phase de contact a été retenue : 5 000 cellules / ml, tandis que les apports de *S. costatum* étaient également pratiqués à la concentration de 20 000 cellules / mL.

Semaine	Régime	<i>A. minutum</i> (pics)	<i>S. costatum</i> (inter.)
1	<i>A. minutum</i>	5 000	0
2	<i>A. minutum</i> + <i>S. costatum</i>	5 000	20 000
3	<i>A. minutum</i> + <i>S. costatum</i> + MMA (5 mg/L)	5 000	20 000
4	<i>A. minutum</i> + <i>S. costatum</i> + MMA (15 mg/L)	5 000	20 000

Tableau 2 : Concentrations en nombre de cellules / mL pour chaque régime alimentaire testé en avril 2002.

L'objectif était de comparer le processus de bioaccumulation avec et sans phases intermédiaires à *S. costatum* (semaines 1 et 2) et d'évaluer l'effet de la charge en minéral sur les capacités de filtration (FTA) et de bioaccumulation (semaines 3 et 4).

4.2.1. Concentrations résiduelles

Les concentrations cellulaires en *A. minutum* et en *S. costatum* ont été estimées quotidiennement pendant chaque phase de contact, au multisizer et au microscope inversé. En période de contact avec *Alexandrium*, il a été difficile d'évaluer la proportion - faible - de *Skeletonema*. En revanche, pendant les phases intermédiaires de 4 h (pas de nourriture algale ou *Skeletonema*) il a été réalisé des dénombrements discrets des concentrations résiduelles d'*A. minutum*, ces dernières étant particulièrement importantes pour évaluer : i) l'efficacité du système de rinçage et ii) la contamination « parasite » potentielle des huîtres pendant ces périodes.

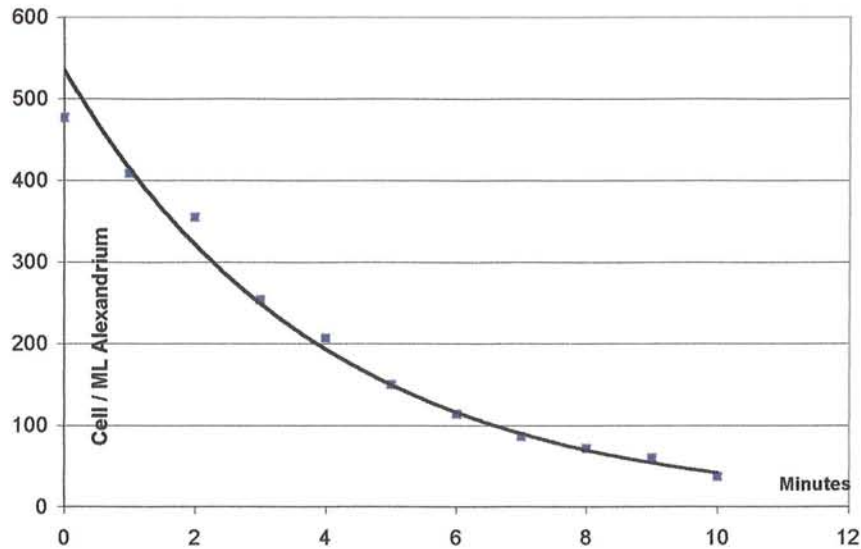


Figure 11 : Evaluation des concentrations résiduelles en *A. minutum* dans le circuit pendant les douze premières minutes de la phase de rinçage.

En fait, même si l'estimation du temps moyen de rinçage du circuit par de l'eau de mer pour ramener la concentration d'*A. minutum* en phase de contact à 1/10 de sa valeur d'origine (fig. 11) est de l'ordre de 12 min, on constate qu'il est presque impossible de descendre en dessous de cette valeur du fait des différents obstacles inhérents à la structure du circuit (tuyauterie, forme des boîtes, coudes, etc..) et surtout du fait du film, composé de kystes et de cellules nageuses à faible déplacement, déposé au fond des boîtes. Ce « biofilm » représente en permanence une source potentielle de cellules pouvant être remises en circulation dans le flux du circuit fermé.

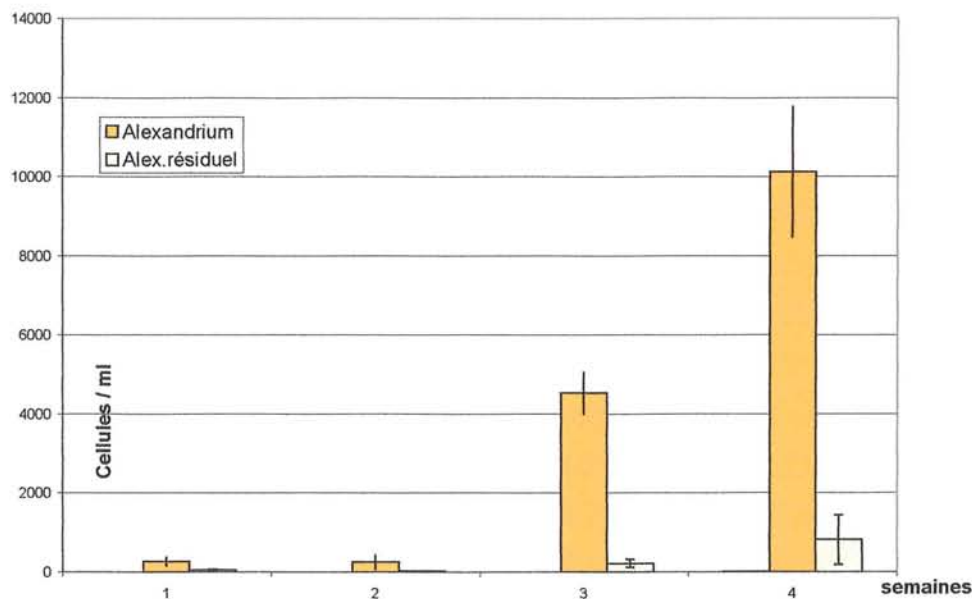


Figure 12 : Concentrations moyennes observées en *A. minutum* pendant les phases de contact et les phases intermédiaires (Alex. résiduel) des quatre semaines d'expérience d'oct./nov. 2001.

De fait, les concentrations moyennes en *A. minutum* résiduel (fig. 12) font état d'une proportion variant entre 1 et 10 % de la concentration en phase de « pic ». D'autre part, les variations autour de la concentration moyenne sont d'autant plus importantes que la concentration nominale est élevée.

Si l'on compare ces observations avec les dénombrements réalisés *in situ* lors du suivi 24 h en Penzé, on constate que les concentrations moyennes précédant le pic d'*A. minutum* à 650 000 cellules / L sont de l'ordre de 55 000 cellules / L, soit environ 1/10^{ème} de cette valeur. D'une certaine façon, il semble donc que le résiduel d'*A. minutum* inhérent aux limites du système expérimental reproduise assez bien les conditions du milieu naturel.

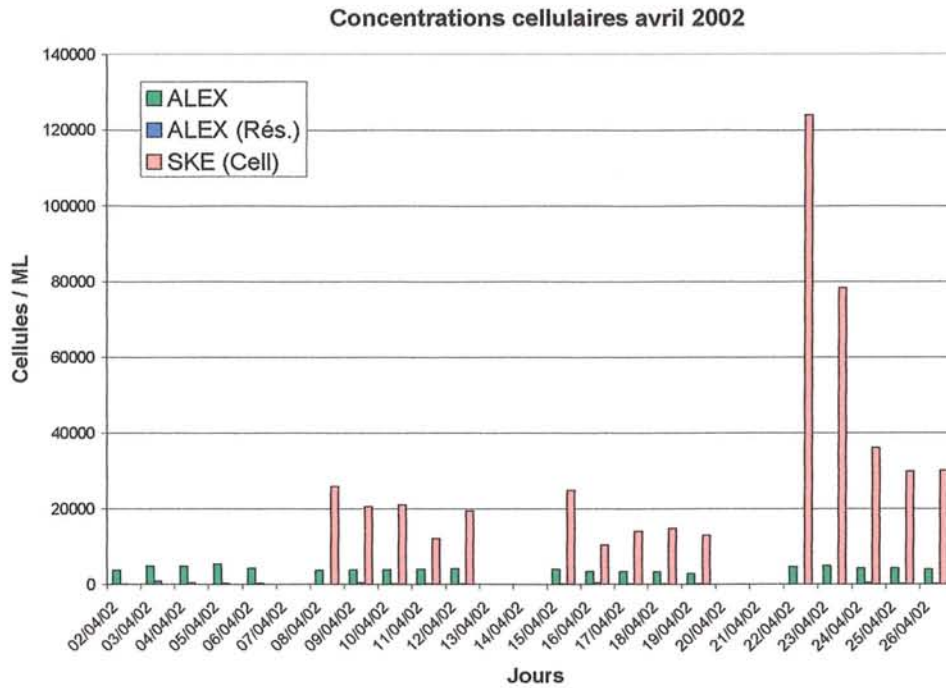


Figure 13 : Suivi des concentrations journalières moyennes en *A. minutum* et *S. costatum* pendant les expériences d'avril 2002.

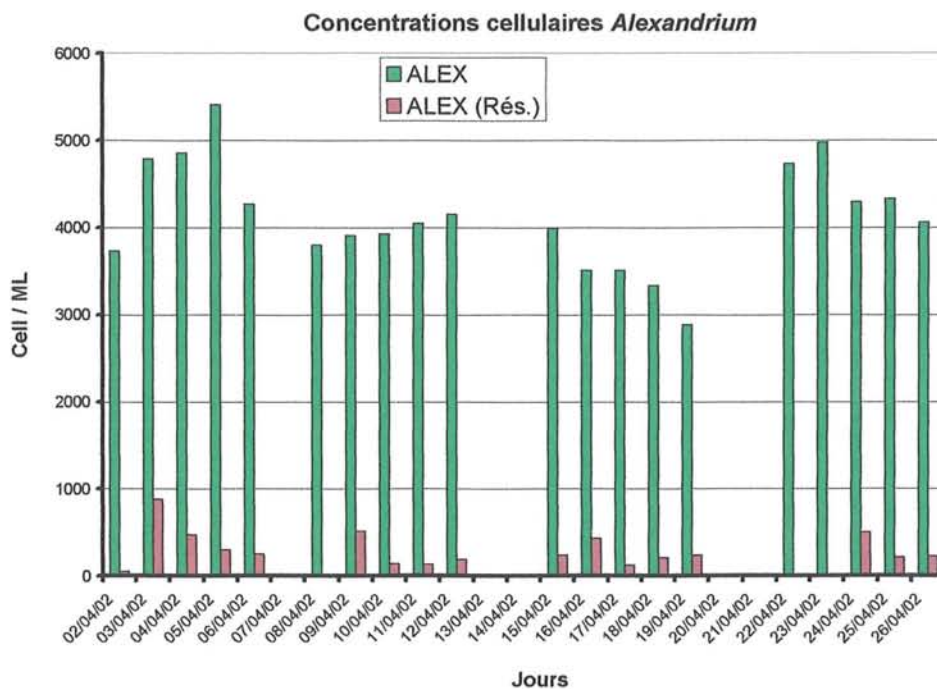


Figure 14 : Suivi des concentrations moyennes journalières en *A. minutum* pendant les cycles *Alexandrium* et *Skeletonema l* eau des expériences d'avril 2002.

Les conditions expérimentales d'avril 2002 (figures 13 et 14) n'ont pas permis d'atteindre la concentration nominale de 5 000 cellules / mL d'*A. minutum* mais plutôt celle de 4 000 cellules / mL tandis que les concentrations de *S. costatum* ont été proches de 20 000 cellules / mL la deuxième semaine, un peu inférieures la troisième et très supérieures la 4^{ème} semaine. Dans ce dernier cas, il ne faut pas écarter un recouvrement probable des dénombrements au Multisizer des particules les plus grosses de MMA et des cellules les plus petites de *S. costatum*.

4.2.2. Salinités

Le suivi par réfractométrie des valeurs rencontrées : i) dans le bac de réserve, ii) dans les différents bacs d'alimentation, iii) dans le circuit, est rendu nécessaire par la reconstitution journalière de la salinité du bac de réserve (26 ‰) et par l'introduction plus ou moins importante de cultures à salinité élevée (38 ‰) dans les bacs d'alimentation. Les résultats d'avril 2002 (fig. 15) montrent que le maintien entre 25 et 30 ‰ de la salinité dans le circuit a pu être obtenu, avec des variations un peu plus élevées la 4^{ème} semaine. On reste cependant à l'intérieur des limites des variations de salinité en Penzé pendant les épisodes toxiques.

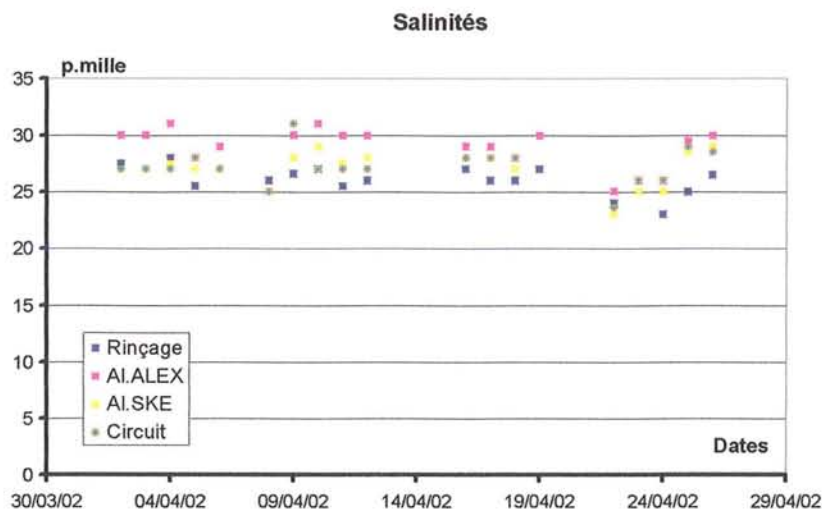


Figure 15 : Suivi des salinités en avril 2002 dans les différents compartiments du système expérimental.

4.2.3. Seston, production de biodépôts, taux d'absorption

Lors des expériences d'octobre / novembre 2001, l'examen de l'évolution des valeurs moyennes en particulaire total, organique et minéral pendant les phases de contact avec *A. minutum* (fig. 16) montre une bonne reproductibilité entre les semaines 1 et 2 (mêmes concentrations nominales à 200 Cellules / mL) mais des valeurs de TPM à 5 000 et 10 000 Cellules / mL qui sont approximativement dans le même rapport que les concentrations cellulaires. Les valeurs de PIM et POM suivent une tendance comparable mais avec POM > PIM, systématiquement.

Les valeurs de TPM et de POM pour 200 cellules / mL sont comparables avec les valeurs des expériences précédentes réalisées avec un apport continu de 120 cellules / mL, soit : une moyenne de 0,57 mg / L.

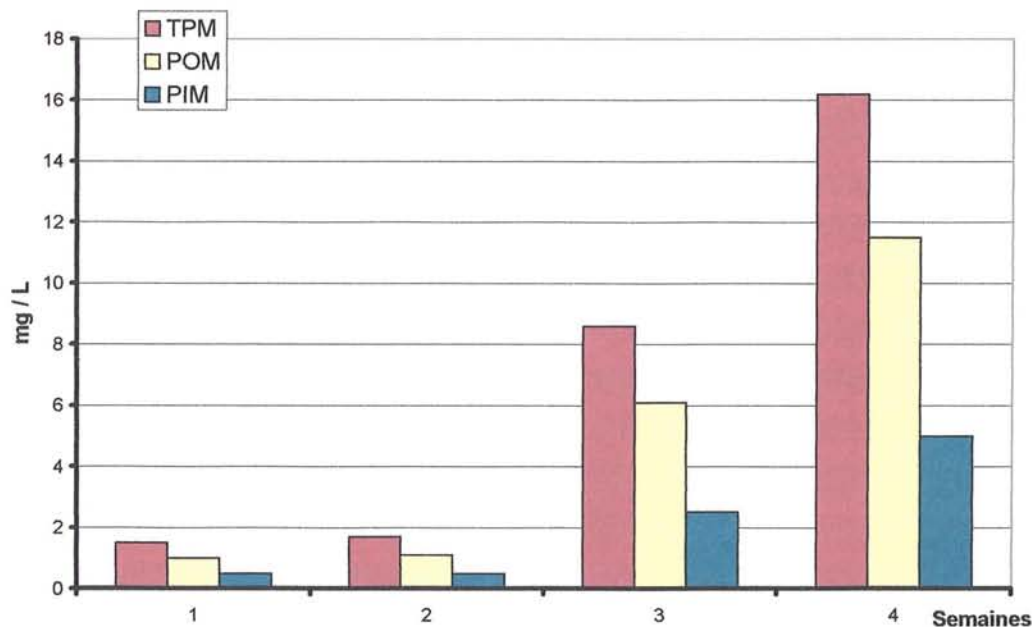


Figure 16 : Evolution des valeurs moyennes en TPM, POM et PIM dans l'eau (seston) au moment des cycles d'*Alexandrium* et sur les quatre semaines des expériences d'octobre/novembre 2001.

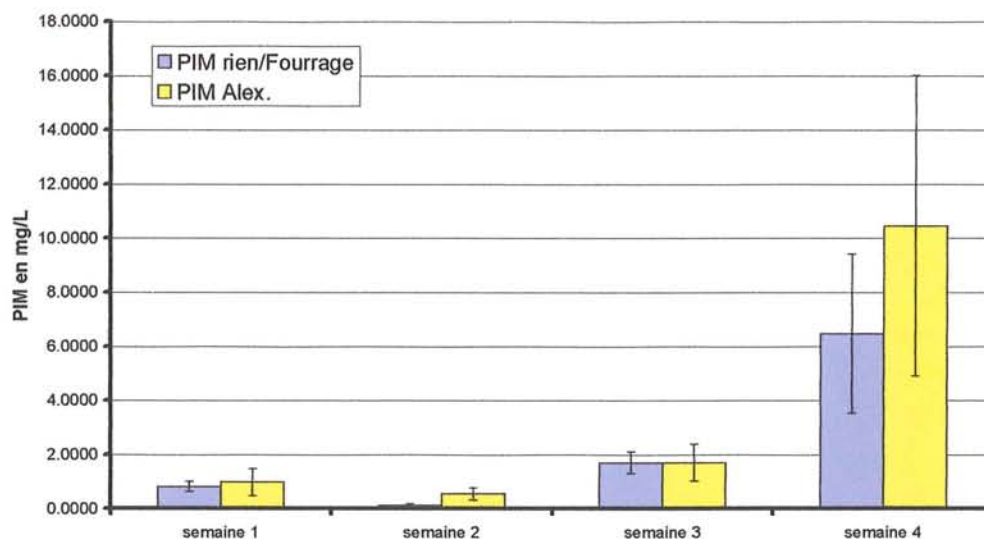


Figure 17 : Moyenne et écart-types des PIM « ajoutés » lors des expériences d'avril 2002.

Les expériences d'avril 2002 visaient à introduire du minéral à des teneurs comparables à ce qui pouvait être rencontré en Penzé par forte turbidité (remises en suspension). Par rapport aux 5 et 15 mg / L de MMA souhaités, des problèmes de régulation du turbidimètre (bruitage du signal électrique) n'ont permis d'atteindre - en moyenne pour chaque semaine - que 1,8 (tous les cycles) et 6,3 (*Skeletonema*) à 10,3 (*Alexandrium*) mg / L, respectivement, de MMA. Ces données sont obtenues après avoir retranché les PIM de l'eau de mer servant à alimenter le circuit. Il s'agit donc bien de ce qui est apporté par les cultures et par les vases déshydratées (fig.17).

Les différences entre les deux premières semaines et les deux dernières sont suffisamment significatives pour que l'on puisse tenir compte des MMA dans les toxicités observées.

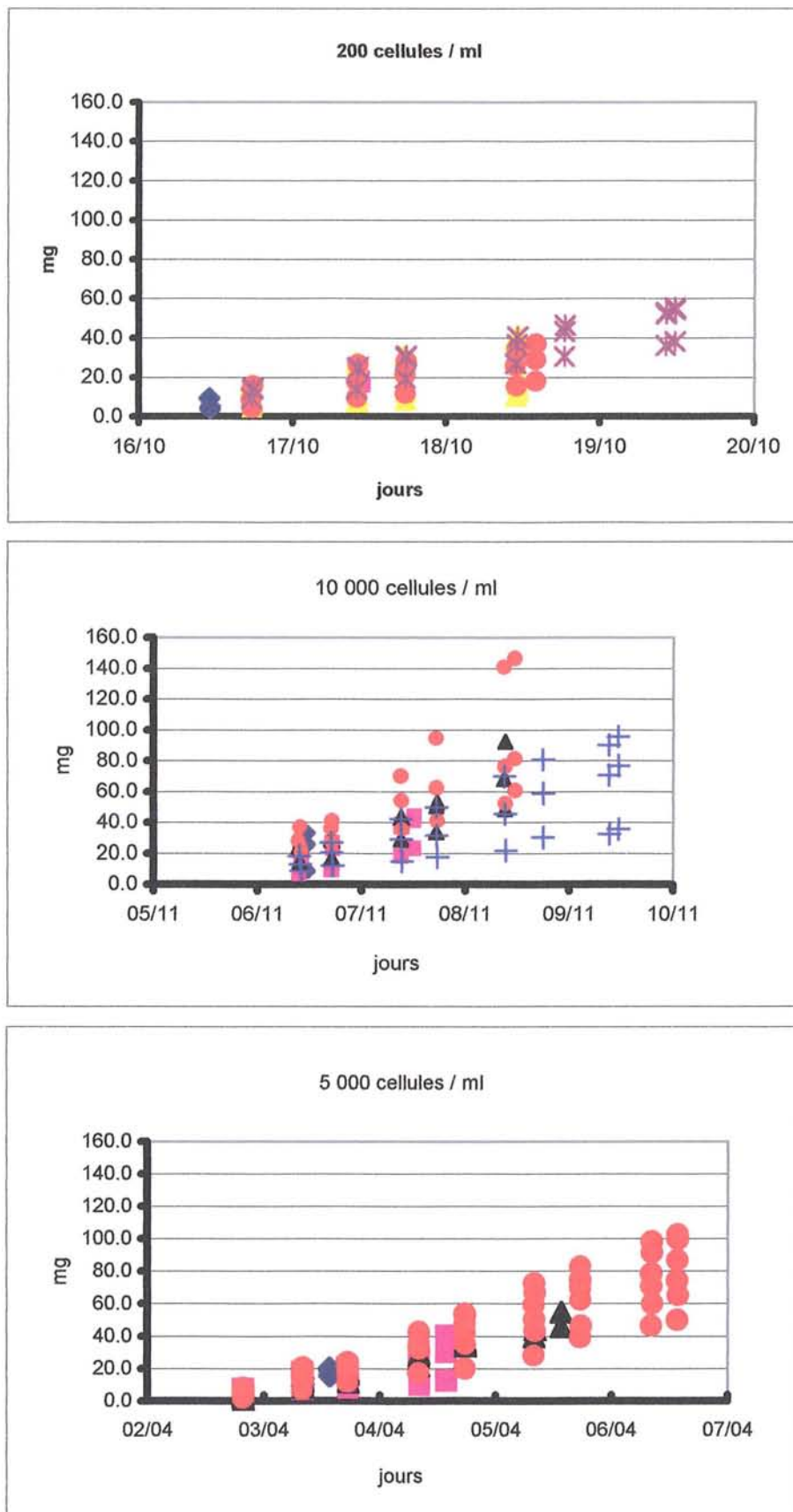


Figure 18 : Evolution de la production cumulée de biodépôts (en mg) de chaque huître au cours des expériences d'octobre / novembre 2001 et avril 2002.

Les productions de biodépôts (fig. 18) ont été enregistrées en cumulé toutes les semaines de régime monospécifique, c'est-à-dire 2 h de contact avec *A. minutum* à la concentration nominale et 4 h de rinçage du circuit avec de l'eau de mer (présence d'un résiduel d'*A. minutum* inférieur à 10 % de la valeur nominale). On entend par biodépôts, dans les conditions expérimentales, essentiellement des fèces, avec quelques pseudofèces à 10 000 cellules / ml. On considère les concentrations de 5 000 et 10 000 cellules / mL comme correspondant aux conditions d'eau rouge en Penzé. On constate des productions en quatre jours de l'ordre de 50 mg pour 200 cellules / ml, de 60 à 100 mg pour 5 000 cellules / mL et pour 10 000 cellules / mL deux sous populations d'huîtres atteignant des productions, soit de 60 à 80 mg (inhibition de l'activité alimentaire ?), soit de 140 mg. Il est intéressant de noter, par ailleurs, qu'au cours de ces différents essais, les kystes contenus dans les fèces prélevées en phase « *Alexandrium* », une fois ces biodépôts filtrés et rincés, ont pu être revivifiés (voir 4.4).

En ce qui concerne les taux d'absorption organique par huître (fig. 19) on observe qu'ils varient - grossièrement - entre 0 et 0,5 mg / h pour 200 cellules / ml, qu'ils diminuent de 0,5 mg / h le premier jour jusqu'à des valeurs négatives dès le deuxième jour pour 5 000 cellules / mL et qu'avec 10 000 cellules / mL l'absorption est très faible à négative selon les individus et dès le premier jour. Les absorptions organiques négatives traduiraient un départ (biodépôts) de matériel organique supérieur aux « entrées » (filtration), mais il faut tenir compte des variations globales liées à la proportion d'inorganique : si l'inorganique des biodépôts diminue ou que l'inorganique du seston (PIM) augmente, l'OAR peut diminuer.

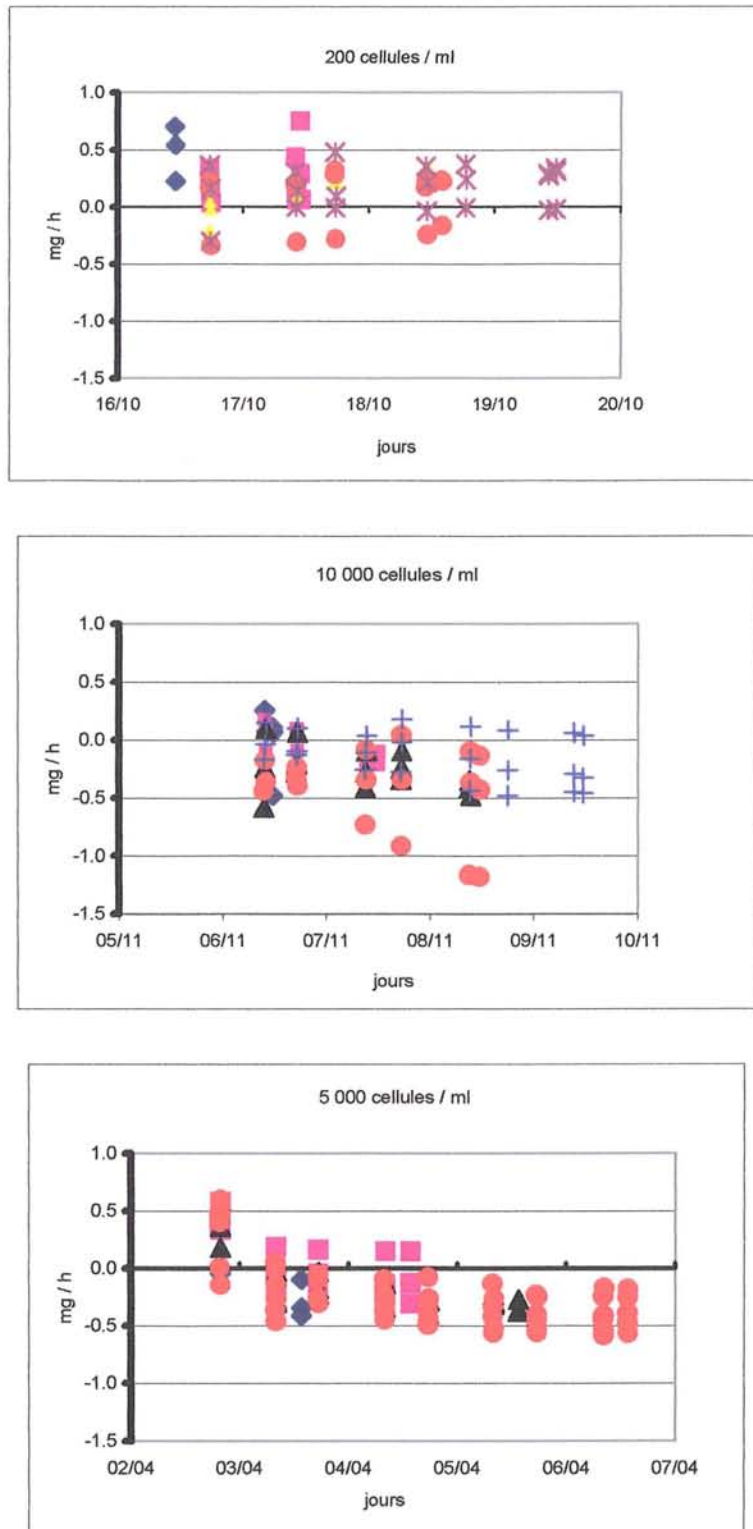


Figure 19 : Taux d'absorption organique par huître (en mg / h) pour les expériences d'octobre - novembre 2001 et avril 2002.

4.2.4. Durées d'activité alimentaire (FTA)

Comme ce fut le cas lors des expériences précédentes de contamination longue (14 jours) d'huîtres avec des cultures d'*A. minutum*, des variations individuelles importantes ont pu être constatées (fig. 20).

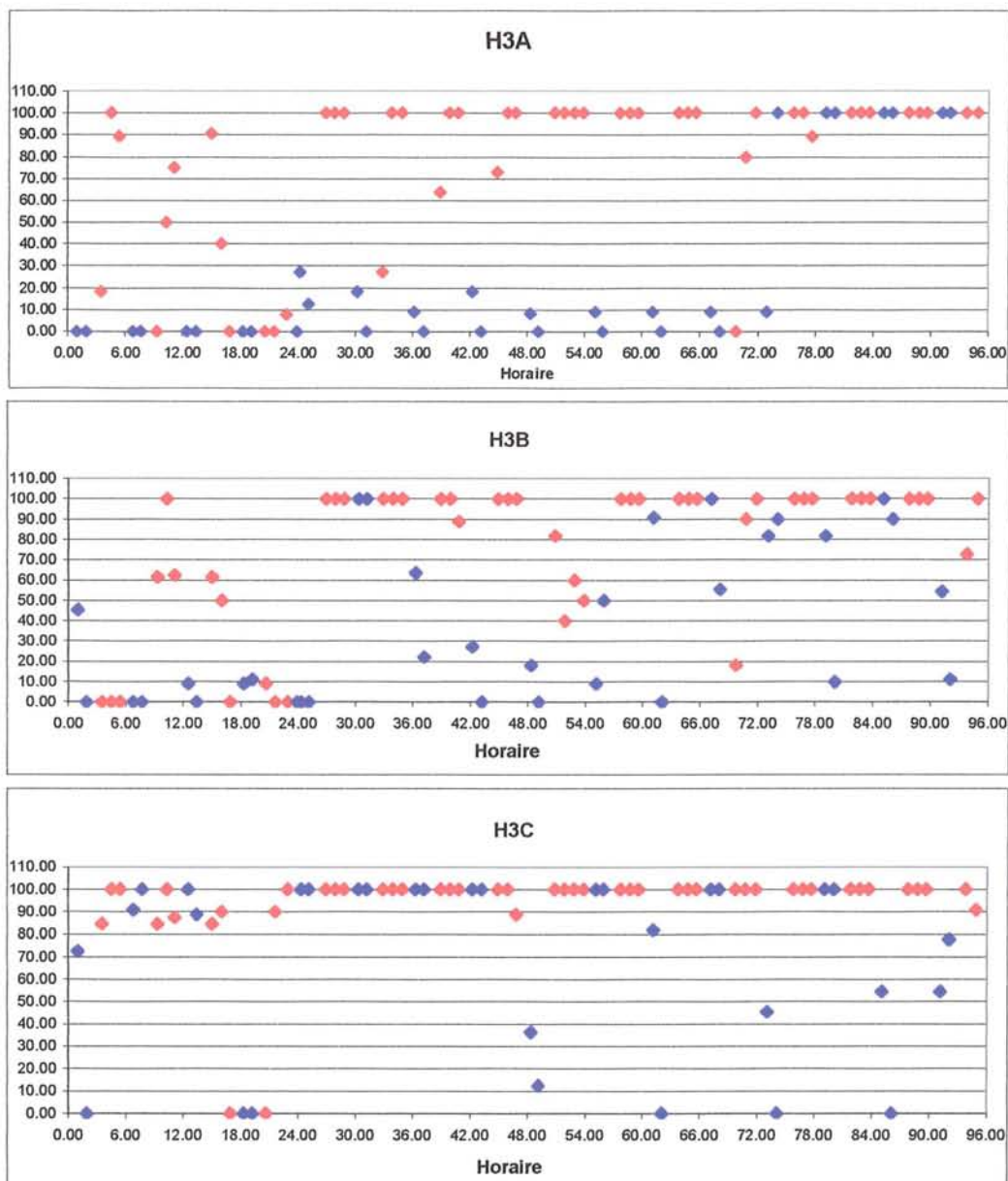


Figure 20 : FTA de trois huîtres (H3A, B, C) nourries alternativement durant quatre jours d'*A. minutum* (en bleu) pendant deux heures, puis de *S. costatum* (en rouge) pendant quatre heures. Semaine 2 des expériences d'octobre / novembre 2001.

L'huître H3A a un comportement alimentaire cyclique selon le type de régime algal et au cours des trois premiers jours, puis ne fait plus la différence entre les deux régimes le 4^{ème} jour. L'individu H3B a un comportement plus fluctuant : la baisse d'activité alimentaire avec *A. minutum* existe mais elle est moins prononcée. Quant à H3C, elle fait peu ou pas de différences entre les deux régimes. On constate donc, comme on pouvait s'y attendre, que les variations individuelles déjà observées en monospécifique peuvent être plus complexes (alternances) avec un régime bi-spécifique.

Ces variations de comportement semblent induire dans la majorité des cas des FTA plus faibles sur l'ensemble des cycles « *Alexandrium* » et plus élevés sur l'ensemble des cycles « *Skeletonema* » (fig. 21). Cependant, la nécessité de considérer également l'activité alimentaire en présence d'*A. minutum* « résiduel » seul (phase de rinçage en eau de mer non additionnée de *Skeletonema*), et de comparer ces

activités aux toxicités mesurées au cours du temps, nous ont amené à comparer des taux journaliers moyens tels que : FTA moyen / jour et $\mu\text{g eq STX}$ par jour et par gramme de coquillage.

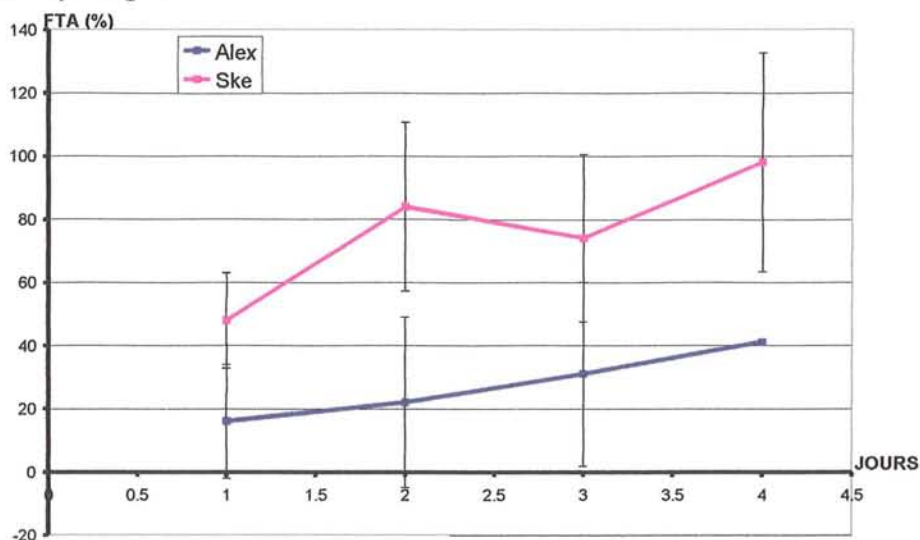


Figure 21 : Evolution des FTA moyens (sur 15 huîtres en J1 et sur 3 en J4) sur quatre jours au cours de la semaine 2 d'octobre 2001 (200 cellules / ml).

4.2.5. Cinétiques de contamination

Pour vérifier que les huîtres n'étaient pas contaminées avant l'expérience, des échantillons d'huîtres « témoin » ont été injectés (fig. 22). La stabilité des conditions chromatographiques est vérifiée tout au long de la séquence d'analyse par injection d'un échantillon standard avant et après les injections de cinq échantillons d'huîtres.

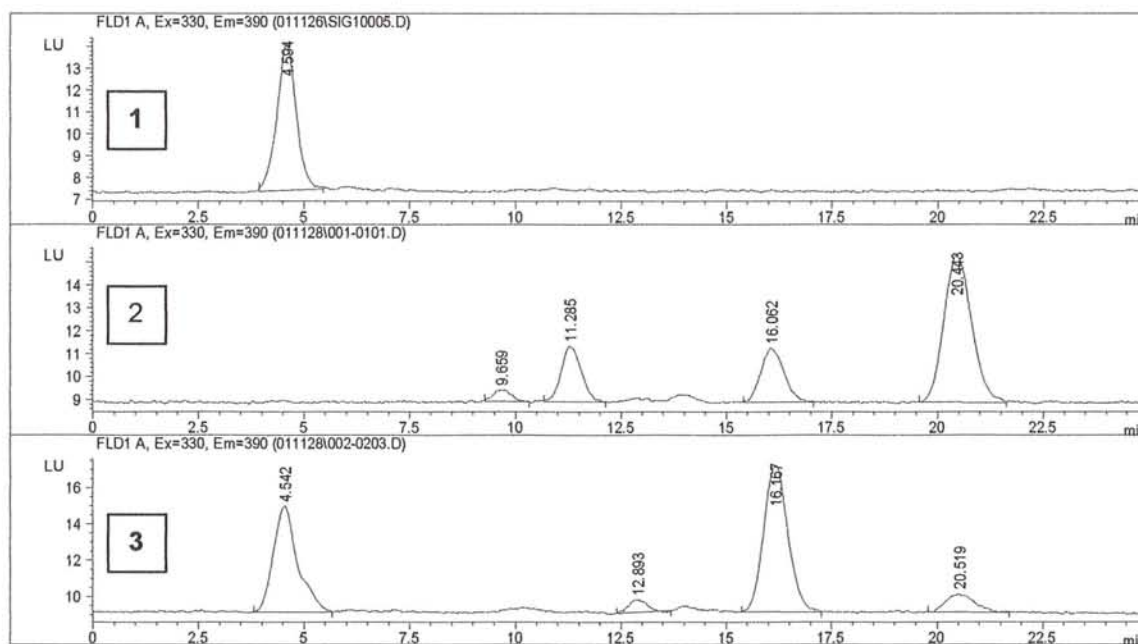


Figure 22 : Chromatogramme d'une huître témoin [1] ; chromatogramme d'un standard (standard NRC, GTX 1 à 4, dil : 1/200) [2] ; chromatogramme d'une huître contaminée [3].

Les chromatogrammes (fig. 22) obtenus suite à l'analyse des échantillons par CLHP, ont permis de calculer la toxicité moyenne des huîtres et de tracer les cinétiques de contamination pour chaque expérience (fig. 23).

La comparaison des cinétiques des semaines 1 et 2 permet de déduire les effets potentiels de la présence de phytoplancton non toxique intercalé entre les phases de contact avec des concentrations faibles d'*Alexandrium*. En effet, alors que pour la semaine 1 (uniquement *A. minutum* pendant 2 h, toutes les 4 h) les huîtres prélevées le dernier jour sont contaminées au-dessus du seuil sanitaire de 80 µg eq. STX.100 g⁻¹, soit 192 µg eq STX (toxines B), la toxicité des huîtres prélevées à la fin de la semaine 2 n'atteint pas ce seuil. Deux explications sont envisageables : 1) les phases « *Skeletonema* » suffisent à induire des détoxifications répétées, 2) malgré la persistance d'un résiduel d'*Alexandrium* en phase « *Skeletonema* » les huîtres auraient la capacité de trier la nourriture algale au détriment des dinoflagellés toxiques et à l'avantage des diatomées non toxiques.

Au cours de la semaine 3 (5 000 cellules / mL d'*A. minutum*), les cinétiques ont montré une forte variation inter-individuelle. Même si la contamination est supérieure au seuil de salubrité entre le deuxième et le troisième jour de contact, on observe ensuite une diminution des toxicités moyennes qui pourrait être le résultat des périodes d'alimentation en phytoplancton non toxique.

Les cinétiques de contamination des huîtres pour la semaine 4 ne sont pas exactement celles que l'on attendait puisque le seuil de salubrité n'a jamais été dépassé au cours des quatre jours, et ce malgré une concentration en *A. minutum* correspondant à une « eau rouge » (10 000 cellules / mL). Une première explication serait que les faibles concentrations cellulaires de la semaine 1 ont permis un FTA plus élevé en fin d'expérience coïncidant avec une bioaccumulation plus marquée et une absence de détoxification pendant les phases intermédiaires. Au contraire, les fortes concentrations de la semaine 4 auraient un effet inhibiteur sur la filtration.

Ces données sont évidemment à considérer en regard des valeurs de FTA (voir 4.3).

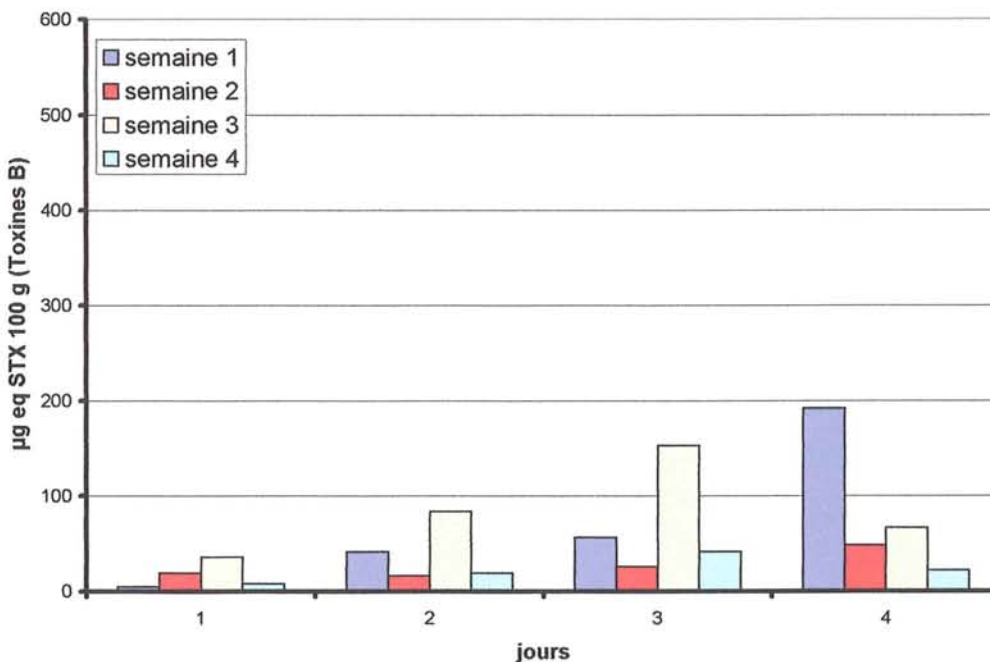


Figure 23 : Cinétiques de contamination (moyennes) des huîtres lors des expériences d'octobre / novembre 2001 et pour les quatre semaines considérées = toxicités cumulées pour chaque jour d'expérience.

Pour l'expérimentation d'avril 2002, la comparaison des cinétiques de contamination moyennées sur six individus (fig. 24), permet, en attendant le dépouillement des données de FTA, d'observer :

- une augmentation constante de la toxicité au fur et à mesure de l'exposition au plancton toxique. A l'opposé de l'expérimentation de l'automne 2001 où les concentrations d'algues testées étaient plus faibles en semaines 1 et 2 ;
- le seuil de toxicité est dépassé au bout de deux jours de contamination dans l'ensemble des scénarios envisagés. Il semble que l'apport conséquent (15 mg / L) de MMA favorise l'absorption des toxines, au vu d'une toxicité de 139 µg éq. STX / 100 g de chair dès le premier jour de contact ;
- un effet favorable à l'accumulation de toxines lorsque *A. minutum* est accompagné, soit d'algue non toxique, soit de matière en suspension. Dans ce dernier cas, l'effet semble plus marqué encore aux fortes concentrations de matière minérale ajoutée.

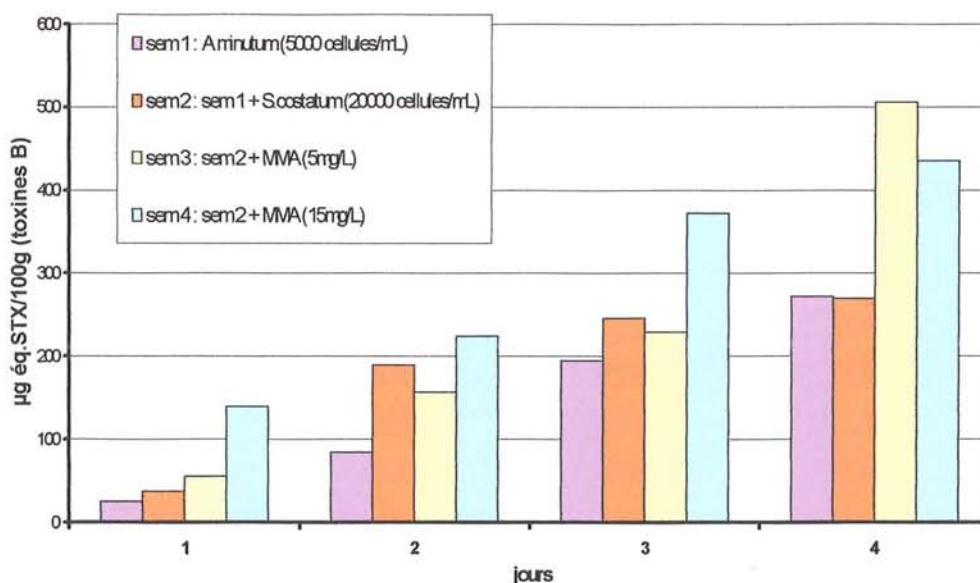


Fig. 24 : Cinétiques de contamination (moyennes) des huîtres lors des expériences d'avril 2002, pour les quatre semaines considérées = toxicités cumulées pour chaque jour d'expérience.

4.3. Comparaison entre FTA et toxicités

Afin de vérifier une éventuelle relation entre activité alimentaire et niveau de toxicité, les données obtenues en octobre-novembre 2001 ont été analysées en ce qui concerne :

- les FTA journaliers moyennés sur l'ensemble des cycles « *Alexandrium* » et des cycles « eau » ou « *Skeletonema* »,
- les taux de bioaccumulation journaliers en µg eq STX par g et par jour.

Les résultats (fig. 25) ne montrent pas de relations directes, au contraire de ce qui avait pu être observé avec des expositions constantes à des concentrations faibles (150 cellules / mL) d'*A. minutum* lors d'expériences précédentes (Lassus *et al.*, 2002). Globalement, on constate néanmoins : 1) des taux de bioaccumulation journaliers faibles avec 200 cellules / mL ou 10 000 cellules / mL d'*A. minutum* (FTA

élevés en phase non toxique dans le premier cas et effet inhibiteur supposé dans le second), 2) malgré des FTA élevés en phase *Skeletonema* et réduits en phase *Alexandrium*, une bioaccumulation journalière pouvant dépasser 0,5 $\mu\text{g} / \text{g} / \text{j}$ avec 5000 cellules d'*A. minutum* / ml.

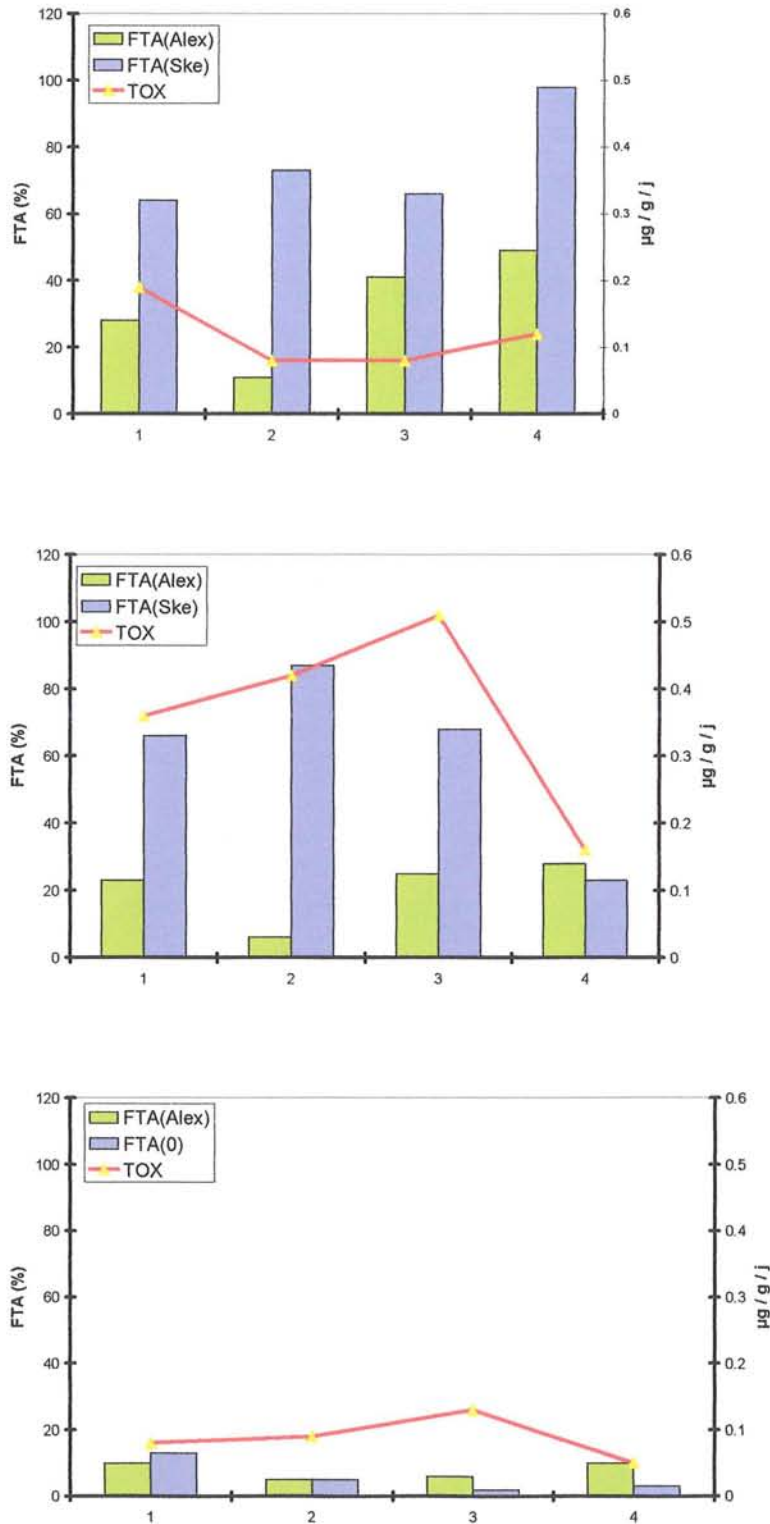


Figure 25 : Comparaison entre FTA et toxicités journalières (taux) des semaines 2 (en haut),3 (au milieu) et 4 (en bas).

4.4. Essais de reviviscence des biodépôts

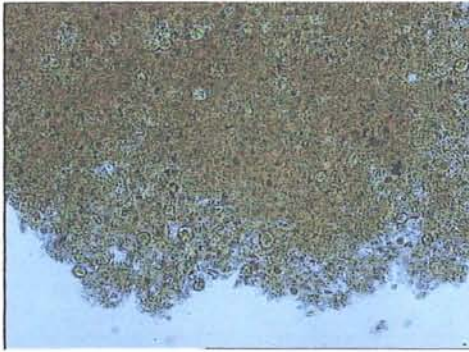
L'expansion croissante des dinoflagellés toxiques le long des côtes pourrait être liée au transfert des coquillages d'une zone contaminée vers une zone vierge. En effet, il a été démontré que certaines espèces d'huîtres ou de moules contenaient dans leur tractus digestif des dinoflagellés intacts et viables. De ce fait, lors d'éjection des fèces dans une zone non contaminée, la libération de cellules sous forme de kystes temporaires (pelliculaires) peut potentiellement aboutir à la prolifération de populations d'algues issues de kystes en reviviscence (Carriker 1992 ; Laabir et Gentien 1999 ; Scarratt *et al.*, 1993). Le transport des eaux contaminées par les ballasts des bateaux et leur décharge dans des eaux saines peut également contribuer à la dispersion des algues toxiques.

L'objectif de cette étude préliminaire était donc de mettre en évidence la viabilité d'*A. minutum* après transit stomacal chez l'huître *Crassostrea gigas* à l'aide d'expériences d'ingestion et de reviviscence.

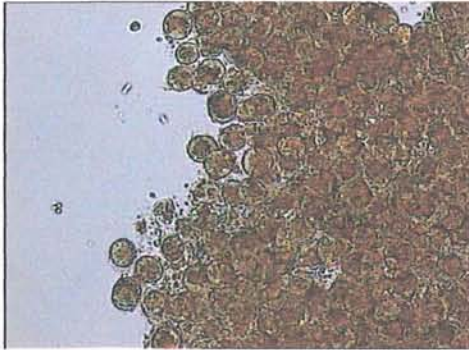
Plusieurs échantillons de biodépôts ont été recueillis, en phase *Alexandrium* ou *Skeletonema*, et rincés à l'eau de mer filtrée sur tamis de 10 μm de maille. La membrane des fèces, contenant les algues ingérées mais non digérées, est rompue par action mécanique. Les microalgues ainsi obtenues sont mises dans quelques mL d'eau de mer filtrée sur 0,2 μm et filtrées par la suite sur une soie de 20 μm afin d'éliminer au maximum les débris et autres organismes pouvant se trouver dans les fèces. Les cellules sont alors transférées dans une flasque contenant 150 mL de milieu ES de Provasoli et mises en culture à 20 °C et sous une intensité lumineuse de 90 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ avec un cycle de lumière : obscurité de 12 : 12.

Le test utilisé pour mettre en évidence l'activité des cellules est la méthode à la fluorescéine di-acétate (Le Floch, 1998). Cette substance est non polaire et non fluorescente. Elle est absorbée par les cellules métaboliquement actives puis hydrolysée en fluorescéine par des estérases non spécifiques. La fluorescéine fluoresce et du fait de sa polarité, s'accumule dans le milieu intracellulaire. Cette accumulation de fluorescence n'est possible que si les cellules sont viables (elles présentent une activité hydrolasique non spécifique et possèdent des membranes intactes), et si les cellules ont des échanges avec leur milieu (les membranes sont actives). La FDA n'est pas absorbée par les membranes des kystes temporaires. Ainsi, par l'observation au microscope à épifluorescence sous lumière bleue (de 450 à 490 nm), on peut distinguer les cellules actives (fluorescence verte) des inactives (fluorescence rouge).

Les premiers résultats montrent que les cellules d'*A. minutum* obtenues dans les biodépôts étaient en majorité intactes et capables de résister au transport (24 h), à un séjour de 3 - 4 jours à 4 °C et qu'elles ont conservé leur capacité de reviviscence dont le taux dépasse souvent 90 % de kystes temporaires revivifiables (fig. 26). Des résultats du même ordre avaient également été cités par Tsujino *et al.* (2002), avec la résistance des kystes d'*Alexandrium* spp aux processus de prédation et de digestion par les organismes macrobenthiques.



Fèces correspondant à l'échantillon **A** contenant en majorité des débris de *Skeletonema* digérée.



Fèces correspondant à l'échantillon **B** contenant en majorité des cellules intactes d'*Alexandrium minutum*, ces cellules correspondent à des kystes pelliculaires qui sont revivifiables à un taux > 90 % après incubation à 20 °C et en présence de lumière.

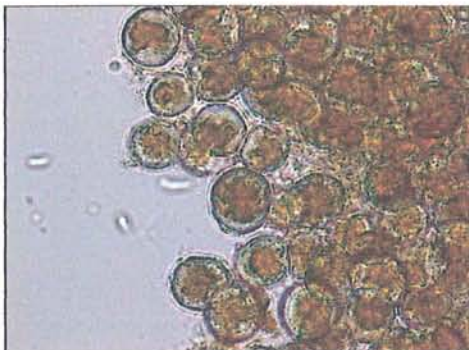
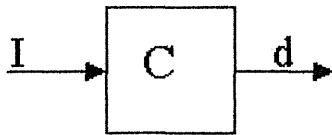


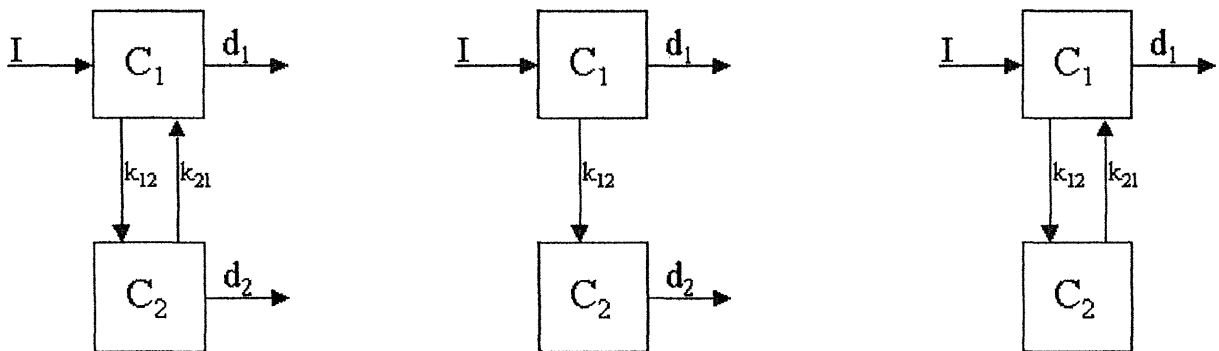
Figure 26 : Aspect de fèces provenant de biodépôts en phase *Skeletonema* (A) et en phase *Alexandrium* (B = deux grossissements).

Après la rupture de la membrane des fèces et libération des cellules d'*A. minutum*, les cellules intactes n'ont pas été colorées positivement à la FDA (couleur rouge) et sont restées immobiles. Cependant, 24 heures après l'incubation de ces mêmes cellules dans les conditions de culture citées ci-dessus, une majorité d'entre elles (> 90 %) ont repris leur activité de nage normale (bonne activité), et ont été colorées positivement (en vert) avec la FDA. Ces cellules revivifiées ont formé de nouvelles thèques et ont retrouvé leur aptitude à se diviser.

4.5. Définition d'un modèle de contamination / détoxification



Les modèles à un compartiment permettent d'obtenir des évolutions de concentration en toxine ayant une seule cinétique de décontamination. En revanche, ils sont simples à identifier (calcul d'un seul coefficient « d »).



Les modèles à deux compartiments permettent d'obtenir deux vitesses de décontamination différentes. Cependant, ils sont difficiles, voire impossible, à identifier (calcul de nombreux coefficients d_1, d_2, k_{12}, k_{21}).

C'est pour cela qu'on utilise des modèles simplifiés qui permettent de décrire les deux vitesses de contamination tout en étant plus facile à identifier.

4.6. Premiers essais de modélisation

En se recalant sur les niveaux journaliers de toxicité observés chaque semaine et pour chaque stand, des essais de simulation ont été opérés avec le logiciel Simulink, en ajustant les coefficients « d » et « k1 » d'un modèle à un compartiment appliqué à l'huître. L'hypothèse de départ est que : i) des séries de contamination/détoxification ont lieu pour chaque ensemble de cycles *Alexandrium / Skeletonema*, ii) les transferts entre tissus sont réduits ou nuls (absorptions organiques faibles en quatre jours) et on n'a qu'une cinétique de détoxification.

A partir des coefficients trouvés, un coefficient moyen sera testé pour estimer l'adéquation du modèle aux observations. Ces calculs sont en cours de traitement et seront complètement exploités dans la deuxième étude (2002 - 2003).

4.7. Production d'*Alexandrium catenella* en bioréacteurs

Un seul bioréacteur a été utilisé pour cette expérience. La souche mise en culture est la souche ATTL01-Ifrémer Brest. L'enceinte est soumise à une photopériode de 16 h de jour et de 8 h d'obscurité. Les conditions environnementales de départ sont précisées dans le tableau ci-dessous et le lancement de système en mode continu se fait au 4^{ème} jour.

Les paramètres de culture au début de l'expérience sont les suivants

Volume (L)	2,3
Température de la salle (° C)	17
Consigne de régulation pH	8,2
Débit d'air (L/min)	0,17
Exposition lumineuse ($\mu\text{mole quanta/m}^2/\text{s}$)	200
Cycle lumineux (de départ)	16 h jour / 8 h obscurité
Souche	<i>A. catenella</i> (Brest)
Taux d'inoculation ($\cdot 10^6 \text{ } \varphi/\text{L}$)	2,2
Milieu nutritif (de départ)	K avec [P] = F/2
Eau de mer	Thau
Salinité (‰)	37
Agitation (tr/min)	90

Calendrier des manipulations

Batch	0-5 j
Passage en mode continu	5 ^{ème} j
Passage en milieu F/2	10 ^{ème} j
Augmentation de la salinité à 40 ‰	10 ^{ème} j
Doublement des concentrations en nutriments (rapport N/P conservé)	31 ^{ème} j

Croissance

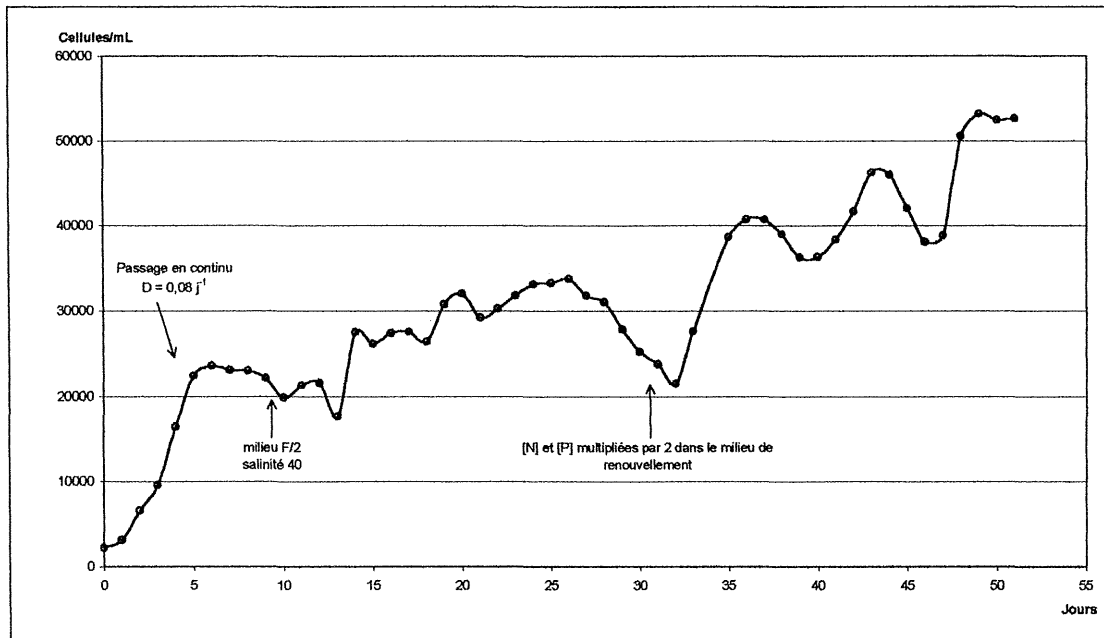


Figure 27 : Suivi quotidien de la population.

Le milieu de culture initial est le milieu K dont le β -glycérophosphate a été remplacé par une source de phosphate inorganique, le dihydrogénophosphate. La concentration en phosphate a été augmentée pour atteindre celle du milieu F/2 car cette formulation a montré des résultats de croissance intéressants sur l'espèce *A. minutum*.

A partir du 9^{ème} jour, une chute de croissance est observée, préfigurant une sénescence de la culture dans les jours suivants (fig. 27).

Il a donc été décidé à partir du 10^{ème} jour : 1) d'utiliser un milieu F/2, moins complet en terme d'apport en nutriments mais qui semble mieux convenir à la culture de cette espèce suivant les observations en mode batch ; 2) d'augmenter la salinité à 40 ‰, déterminée comme optimale (J. B. Bérard, 2000).

Suite à ces modifications, la croissance a repris jusqu'au 25^{ème} jour, où le même problème de limitation par les nitrates que pour *A. minutum* est apparu. On observe donc une diminution importante de la population algale. Cette mortalité importante risquait d'entraîner l'instabilité du système comme observé dans l'expérience précédente.

En effet, suite à un manque d'apport en nutriments, la croissance est limitée et la concentration chute. L'apport en substrat s'effectuant en même temps, la disponibilité en nutriments augmente entraînant ainsi la croissance des algues. Ce phénomène asynchrone déséquilibre le système de culture continue et les rend donc instables dans le temps.

D'après cette constatation et afin d'éviter le déséquilibre de notre culture, les concentrations en macro-éléments dans le milieu de renouvellement ont été doublées à partir du 31^{ème} jour. L'apport en nutriments dans le bioréacteur est donc multiplié par deux dans le but d'éviter une limitation de croissance due aux nutriments mais également de conserver le rapport N/P. Il est à préciser que durant toutes ces modifications que le taux de dilution appliqué lors de la mise en route du système en continu est conservé ($D=0,08 \text{ j}^{-1}$).

On observe à la suite de cette modification une augmentation de la population algale, presque multipliée par deux dans les jours suivants.

Taux de croissance

Le taux de croissance (fig. 28) reflète bien les variations observées sur la courbe de population.

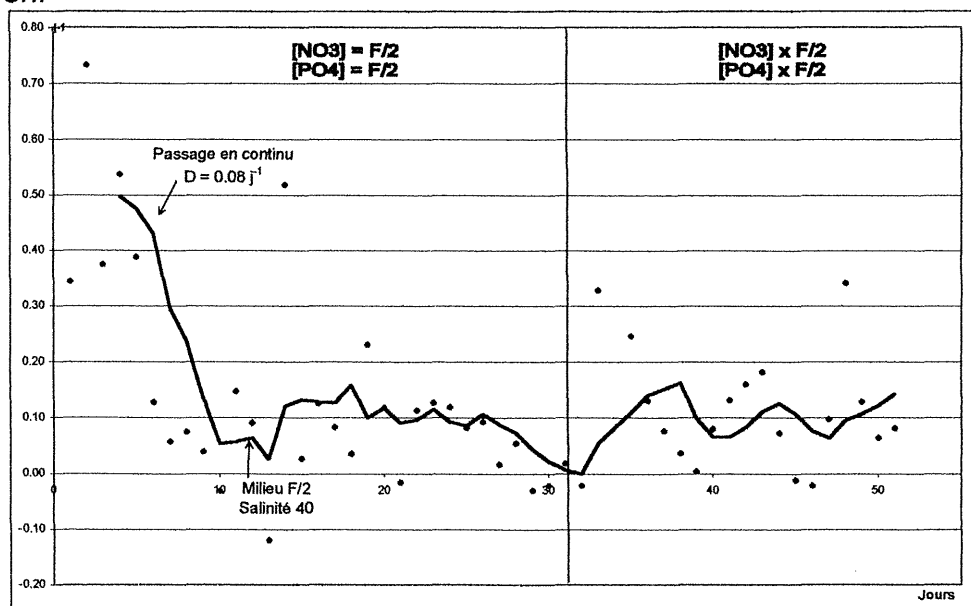


Figure 28 : Variations du taux de croissance lors des modifications des conditions de culture.

L'augmentation de salinité au 10^{ème} jour entraîne une augmentation du taux de croissance qui se stabilise ensuite autour de 0,1 j⁻¹. A partir du 26^{ème} jour, le taux de croissance diminue fortement et tend à devenir négatif, ce qui signifierait une diminution de la population algale dans l'enceinte de culture. Le même phénomène avait été observé pour l'espèce *A. minutum*, lié à une limitation par les nitrates.

La modification des concentrations en nutriments dans le milieu de renouvellement provoque une nette augmentation du taux de croissance qui passe au-dessus de 0,1 j⁻¹. Cependant, cette limitation de la culture a déstabilisé le système continu d'où une légère diminution de la croissance mais qui tend à se stabiliser à nouveau vers 0,1 j⁻¹.

Croissance et toxicité

Le faible nombre d'échantillons analysés à ce jour ne permet pas d'émettre des hypothèses quant à l'influence du taux de croissance sur la toxigenèse (fig. 29).

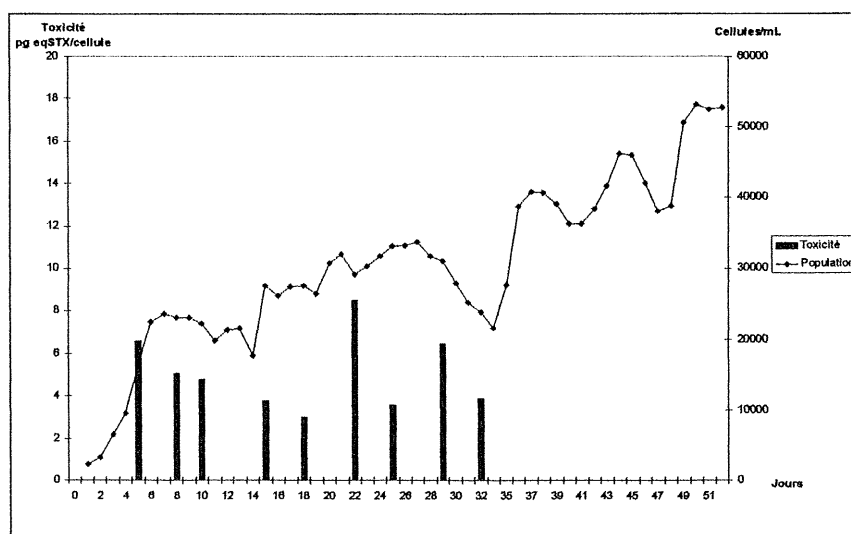


Figure 29 : Toxicité cellulaire et population algale au cours de l'expérience.

De plus, la bibliographie concernant ce sujet est contradictoire : certains auteurs caractérisent la toxicité cellulaire comme corrélée inversement au taux de croissance (Proctor *et al.*, 1975) tandis que d'autres ne trouvent aucune corrélation (Ogata *et al.*, 1987 ; White, 1978).

Après analyse par CLHP-AI, il apparaît que la fraction molaire des toxines B1 reste comprise entre 50 et 60 %, tandis que la GTX4 reste comprise entre 10 et 20 %. Enfin, la fraction molaire de la C2 est toujours supérieure à celle de la C1, ce qui s'explique par le fait que la C2 est synthétisée en première.

Par ailleurs, les fractions molaires restent stables au cours de l'expérience (sauf le 9^{ème} jour). Les facteurs environnementaux agissent sur la toxicité (en pg eqSTX/cellule) mais pas sur la fraction molaire qui est un caractère défini génétiquement.

Des analyses complémentaires ont montré l'influence de la GTX4 sur la toxicité cellulaire par rapport aux trois autres toxines dosées et en particulier la B1.

5. Discussion et perspectives

Bien que tous les résultats des expériences de simulation d'avril 2002 n'aient pas encore été exploités, les premières données acquises en octobre - novembre 2001 et avril 2002 permettent d'établir le rôle modérateur important des phases intermédiaires (entre les pics « d'eau rouge »), constituées majoritairement de phytoplancton non toxique, dans le processus global de contamination. Il semble également que des concentrations très élevées (eaux rouges) d'*A. minutum* pourraient avoir un effet inhibiteur sur la filtration, sur la production de biodépôts et donc sur la bioaccumulation. Cette hypothèse a déjà été faite par Vila *et al.* (2001) en Méditerranée au cours d'observations de contamination PSP de moules par *A. catenella*.

Lors d'expériences précédentes d'exposition en continu d'huîtres avec une concentration constante d'*A. minutum*, une relation entre FTA et toxicité (observée ou calculée) avait été mise en évidence (Lassus *et al.*, 2002). Il est clair qu'une alternance de régimes alimentaires peut modifier cette relation. D'une façon générale, trois comportements alimentaires pouvant modifier la bioaccumulation de toxines sont possibles :

- Hypothèse 1 = si le FTA en régime toxique monospécifique (*A. minutum*) est égal au FTA des cycles « *Alexandrium* » en régime alterné avec une toxicité finale identique dans les deux expériences, on peut considérer que les cycles « non toxiques » n'ont qu'un faible effet sur la détoxification et que la relation $TOX = a \text{ FTA} + b$ (Bougrier *et al.*, 2002) peut s'appliquer dans les deux cas.
- Hypothèse 2 = si le FTA en régime toxique monospécifique est égal à celui observé pour « *Alexandrium* » en régime alterné mais avec une toxicité finale différente, on peut en déduire une influence des FTA des cycles « non toxiques » et on ne peut utiliser la relation précédente, ou alors on lui rajoute une variable de pondération (détoxification).
- Hypothèse 3 = si le FTA en régime toxique monospécifique est différent du FTA des cycles « *Alexandrium* » en régime alterné, il peut y avoir une influence des cycles « *Skeletonema* », ou des variations trop importantes d'un lot d'huîtres à l'autre, ou un effet cumulé de ces deux facteurs.

Dans ce cas, la relation FTA / toxicité est très aléatoire.

En l'état actuel des essais d'octobre - novembre 2001, on pourrait écarter l'hypothèse 1 et s'orienter vers les hypothèses 2 ou 3, c'est-à-dire vers un niveau croissant de complexité au cas où : i) la concentration en phytoplancton non toxique entre les pics d'*Alexandrium* pourrait varier en proportion d'un épisode à l'autre (d'autres vérifications *in situ* en Penzé sont donc nécessaires), ii) la détoxification pendant ces périodes « non toxiques » aurait un effet à la fois sur l'activité de filtration en présence de *S. costatum* mais aussi en présence d'*A. minutum*, en fonction du temps (nombre de cycles *A. minutum* / diatomée non toxique déclenchés par marée). Les observations individuelles montrent des comportements « tolérants » = FTA élevés et identiques des cycles toxiques et non toxiques, ou « sensibles » = FTA élevés en cycle non toxique et faibles en cycles toxiques. Cependant, ces comportements alimentaires, qui montrent une vitesse de réaction rapide des bivalves, peuvent évoluer au cours du temps.

Par ailleurs, les résultats de toxicité d'avril 2002 vont plutôt à l'encontre de ces observations avec des teneurs en toxines cumulées croissantes avec le temps. Pour une concentration nominale en *A. minutum* de 5 000 cellules par mL, la comparaison des résultats 2001 et 2002 (avec cycles intermédiaires *Skeletonema* et sans MMA) montre une toxicité finale supérieure dès le deuxième jour d'expérience en 2002 ce qui laisse supposer une activité alimentaire plus importante des bivalves pendant les cycles « *Alexandrium* ». Les différences de saison et d'état physiologique des huîtres peuvent éventuellement expliquer cet écart. Bien qu'une analyse des résultats FTA / Toxicités d'avril 2002 permettra, seule, de préciser le scénario le plus vraisemblable et de savoir si la relation linéaire avec la toxicité est applicable (peu de différence dans les cinétiques de bioaccumulation avec et sans *Skeletonema*), il semble que l'on puisse retenir l'hypothèse d'une augmentation des efficacités de bioaccumulation en présence de matières minérales ajoutées. Ce résultat pourrait être lié à l'activité alimentaire accrue (fortes productions de pseudofèces et fèces avec un excès de vases) qui a été observée expérimentalement.

Une autre observation importante concerne le taux élevé de reviviscence (supérieur à 90 %) des kystes contenus dans les fèces, en particulier lors des cycles « *Alexandrium* ». Outre l'impact environnemental (recontamination possible d'une zone non contaminée par les biodépôts d'huîtres « déplacées ») ce résultat confirme que l'accumulation de toxines ne peut résulter que de la lyse cellulaire au cours du transit dans le tractus digestif, et que cette dernière est peu importante (l'enkystement temporaire protège le corps cellulaire des enzymes digestifs) ce que confirment les taux d'absorption organiques très faibles en régime monospécifique toxique.

En ce qui concerne la maîtrise des cultures en continu d'*Alexandrium catenella* (première étape d'une simulation future des épisodes de contamination PSP à Thau), des résultats prometteurs ont été obtenus en utilisant un milieu F/2 moins complet, en augmentant la salinité (40 ‰) et en pratiquant des ajouts complémentaires de nutriments lorsque le taux de croissance diminue.

Enfin, sur le plan technique, le programme d'automatisation et d'acquisition de données, développé spécifiquement pour cette étude, est complètement opérationnel, de même que le système de bioréacteurs pour la culture en continu d'*A. catenella*.

6. Références 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 *Crassostrea gigas* Thunberg. *J. Shellfish Research* 12(2), 417-422.
- Bardouil M., Bohec M., Bougrier S., Lassus P., Truquet P., 1996. Feeding responses of *Crassostrea gigas* (Thunberg) to inclusion of different proportions of toxic dinoflagellates in their diet. *Oceanol. Acta.*, 19(2), 177-182.
- Bérard J.B., 2000. Etude de la croissance et de la toxinogénèse d'*Alexandrium catenella* / *tamarense* de Thau en bioréacteurs. Rapport de stage Intechmer / Ifremer, 51 p.
- Bougaran G., 1997. Etude de la physiologie des gamétophytes de Laminariales en bioréacteurs. Rapport Algues et Mer. Ifremer, 23 p.
- Bougrier S., Lassus P., Beliaeff B., Bardouil M., Masselin P., Truquet P., Matignon F., 2001. Feeding behavior of individuals and groups of king scallops (*Pecten maximus*) contaminated experimentally with PSP toxins and detoxified. *In: Harmful algal blooms 2000*. Hallegraeff G.M., Blackburn S.I., Bolch C.J. & Lewis R.J. (eds). JOC of UNESCO Publish., 407-410.
- Bougrier S., Lassus P., Bardouil M., Masselin P., Truquet P., 2002. Comparison of PSP toxin uptake yields and feeding time activity in the Pacific oyster and king scallop. To be published *In: Proceed. Molluscan Shellfish Safety Int. Conf.*, Santiago de Compostella, Spain.
- Carriker M.R., 1992. Introductions and transfers of mollusks: risk considerations and implications. *J. Shellfish Research*, 11, 507-510.
- Keller M.D., Guillard R.R.L., 1985. Factors significant to marine Dinoflagellate culture. *In: Toxic dinoflagellates*. Anderson D.M., White A.W. & Baden D.G., (eds). Elsevier, New York, 113-116.
- Keller M.D., Selvin R.C., Claus W., Guillard R.R.L., 1987. Media for the culture of oceanic ultraphytoplankton. *J. Phycol.*, 23, 633-638.
- Laabir M., Gentien P., 1999. Survival of toxic dinoflagellates after gut passage in the pacific oyster *Crassostrea gigas* Thunburg. *J. Shellfish Research*, 18(1), 217-222.
- Lassus P., Wildish D., Bardouil M., Martin J.L., Bohec M., Bougrier S., 1996. Ecophysiological study of toxic *Alexandrium* spp effects on the oyster *Crassostrea gigas*. *In: Harmful and toxic algal blooms*, Yasumoto T., Oshima Y., & Fukuyo Y. (eds). IOC/Unesco, 409-412.
- Lassus P., Bardouil M., Beliaeff B., Masselin P., Naviner M., Truquet P., 1999. Effect of a continuous supply of the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* Halim on the feeding behavior of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg). *J. Shellfish Research*, 18(1), 211-216.
- Lassus P., Bardouil M., Masselin P., Naviner M., Truquet P., 2000. Comparative efficiencies of different non toxic microalgal diets in detoxification of PSP-contaminated oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg). *J. Nat. Toxins*, 9(1), 1-12.
- Lassus P., Bardouil M., Beliaeff B., Bougrier S., Gubbins M., Masselin P., Mornet F., Thébaud O., Truquet P. *et al*, 2002. Coquillages contaminés par des

phycotoxines paralysantes : vers une procédure de détoxification. Bilans et Perspectives Ifremer, Editions Ifremer, 46 p.

- Le Floch E., 1998. Détermination des constantes écophysiologicals d'*Alexandrium minutum*. Rapport DEA, Université Aix Marseille II, 35 p.
- Masselin P., Amzil Z., Abadie E., Carreras A., Chiantella C., Le Bec C., Nézan E., Truquet P., 2001. Paralytic shellfish poisoning on French Mediterranean coast in the autumn of 1998 : *Alexandrium tamarense* as the causative agent. In: Harmful algal blooms 2000. Hallegraeff G.M., Blackburn S.I., Bolch C.J. & Lewis R.J. (eds). JOC of UNESCO, 26-29.
- Morin P., Erard-Le Denn E., Maguer J.F., Madec C., Videau C., Legrand J., Macé E. 2000. Etude des causes de prolifération de microalgues toxiques en mer : cas d'*Alexandrium*. Rapport final AELB, Convention 7.98.9476, 135 p.
- Ogata T., Kodama M., Ishimaru T., 1987. Toxin production in the dinoflagellate *Protogonyaulax tamarensis*. *Toxicon*, 25, 923-928.
- Oshima Y., 1995. Chemical and enzymatic transformation of paralytic shellfish toxins in marine organisms. In: Harmful marine algal blooms. Lassus P., Arzul G., Erard-Le Denn E., Gentien P. & Marcaillou-Le Baut C. (eds). Lavoisier, Paris, 475-480.
- Proctor N.H., Chan S.L., Trevor A.J., 1975. Production of saxitoxin by cultures of *Gonyaulax catenella*. *Toxicon*, 13, 1-9.
- Scarratt A.M., Scarratt D.J., Scarratt M.G., 1993. Survival of live *Alexandrium tamarense* cells in mussel and scallop spat under simulated transfer conditions. *J. Shellfish. Research*, 12, 383-388.
- Tsujino M., Kamiyama T., Uchida T., Yamaguchi M., Itakura S., 2002. Abundance and germination capability of resting cysts of *Alexandrium* spp. (Dinophyceae) from faecal pellets of macrobenthic organisms. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 271, 1-7.
- Vila M., Delgado M., Camp J., 2001. First detection of widespread toxic events caused by *Alexandrium catenella* in the Mediterranean sea. In: Harmful algal blooms 2000. Hallegraeff G.M., Blackburn S.I., Bolch C.J. & Lewis R.J. (eds). JOC of Unesco, 8-11.
- White A.W., 1978. Salinity effects on growth and toxin content of *Gonyaulax excavata*, a marine dinoflagellate causing paralytic shellfish poisoning. *J. Phycol.*, 14, 475-479.
- Wildish D., Lassus P., Martin J., Saulnier A., Bardouil M., 1998. Effect of the PSP-causing dinoflagellate, *Alexandrium* sp. on the initial feeding response of *Crassostrea gigas*. *Aquat. Living Resour.*, 11(1), 35-43.