

Direction de l'Environnement et de l'Aménagement Littoral

Département Microbiologie et Phycotoxines
Nantes

Ifremer

Modélisation de la contamination des huîtres par les toxines d'*Alexandrium minutum*

Rapport final (2^{ème} année)

PNEC ART3, 2002-2003

Patrick Lassus
(*coordination*)

Michèle Bardouil, Régis Baron, Pierre Garen, Mohamed Laabir,
Didier Leguay, Pierre Masselin, Philippe Truquet

Camille Joret
(*stagiaire*)

Nantes, le 1^{er} juillet 2003

Modélisation de la contamination des huîtres par les toxines d'*Alexandrium minutum*

Patrick Lassus (*coordination*)

Michèle Bardouil, Régis Baron, Pierre Garen, Mohamed Laabir,
Didier Leguay, Pierre Masselin, Philippe Truquet

Camille Joret
(*stagiaire*)

1. Préambule	1
2. Introduction	1
3. Méthodes	3
3.1. Prélèvements <i>in situ</i>	3
3.2. Système expérimental	3
3.3. Matériel biologique	4
3.4. Analyses chimiques	5
3.5. Analyses physiologiques	5
<i>Paramètres relatifs au milieu</i>	5
<i>Paramètres relatifs à l'animal</i>	6
3.6. Modélisation	8
3.6.1. Les modèles à un compartiment	9
3.6.2. Les modèles à deux compartiments	10
4. Résultats	11
4.1. Observations en Penzé (suivi 24 H)	11
4.2. Simulation de différents cycles de contamination	13
4.3. Interactions entre facteurs du milieu et accumulation des toxines dans les huîtres	15
4.4. Relation entre FTA et toxicité	18
4.5. Exploitation du Qtox	27
5. Discussion et perspectives	32
6. Bibliographie	33

Modélisation de la contamination des huîtres par les toxines d'*Alexandrium minutum*

**Rapport final
(2^{ème} année)**

PNEC ART3, 2002-2003

Patrick Lassus (*coordination*)

Michèle Bardouil, Régis Baron, Pierre Garen, Mohamed Laabir, Didier Leguay,
Pierre Masselin, Philippe Truquet,

Camille Joret (*stagiaire*)

1. Préambule

L'objectif de l'étude est de simuler les épisodes de contamination des huîtres par les toxines d'*Alexandrium minutum* à partir d'un module expérimental adapté, et en vue de construire un modèle de contamination applicable à cette espèce. Ce modèle sera ensuite susceptible d'être couplé au modèle biologique local (estuaire de Penzé) de déterminisme des blooms, ainsi qu'aux modèles hydrodynamiques développés par différentes équipes (Ifremer).

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.*, 2002 ; Lassus *et al.*, 1996 et 2000).

Au cours de ces essais 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.

Les résultats présentés dans ce rapport s'inscrivent dans une étape ultérieure (année 2) des travaux proposés en 2001 et qui ont donné lieu à un premier rapport (Lassus *et al.*, 2002 a). Il s'agit, en effet, de concentrer les efforts sur la simulation des épisodes de contamination des huîtres en Penzé par les toxines d'*Alexandrium minutum*, espèce toxique PSP dont les proliférations sont récurrentes en période estivale. La part du programme consacrée à la simulation des contaminations des moules et huîtres de Thau par *A. catenella* est développée dans le cadre du Chantier Lagunes.

Les observations et les premiers essais réalisés en 2001 ont montré la nécessité d'une deuxième série d'observations en Penzé sur une période de 24 H (les épisodes d'eau rouge ne durant guère plus d'une semaine). En effet, si le phénomène affichait cette fois une dominance significative d'*A. minutum* sur les autres espèces constituant l'eau rouge, il serait nécessaire de compléter les observations réalisées en 2001 par : 1) des mesures en temps réel de la fluorescence et de la turbidité, 2) l'évaluation des variations du particulaire inorganique, 3) la quantification (par CLHP-AI) des toxines paralysantes présentes dans le phytoplancton et les coquillages. Ce dernier point est particulièrement important pour « recalibrer » le modèle à développer en fonction des cinétiques obtenues expérimentalement.

En ce qui concerne le montage expérimental, il était nécessaire de valider les relations fluorescence / nombre de cellules et nombre de cellules / POM et de tester l'influence de la salinité (variations en fonction de la marée) sur les cinétiques de bioaccumulation de toxines paralysantes.

Enfin, l'objectif primordial de cette deuxième tranche de travaux devait être la définition d'un modèle descriptif des cinétiques de contamination, sur la base des paramètres environnementaux considérés comme ayant une influence significative sur le processus de bioaccumulation. Le point clé de cette deuxième étape résidait essentiellement dans l'élucidation de l'impact des phases « non toxiques » sur les cinétiques globales de contamination. En fait, les observations 2001 orientaient vers deux hypothèses à tester : 1) les phases intermédiaires (*S. costatum*) n'auraient pas d'effet sur le FTA moyen pendant les phases « *Alexandrium* », ni sur la toxicité finale atteinte : et le modèle $TOX = a FTA_{Alex} + b$ pouvait être appliqué pour chaque concentration en *A. minutum* testée, quel que soit le phytoplancton constituant la phase intermédiaire, et 2) à la fois les FTA en phase « *Alexandrium* » et les FTA en phase « *Skeletonema* » interviendraient dans la toxicité finale ce qui nécessiterait de considérer un modèle de la forme $TOX = a FTA_{Alex} + b FTA_{Ske}$.

3. Méthodes

3.1. Prélèvements *in situ*

Les nouveaux prélèvements en rivière de Penzé (fig. 1) ont été réalisés les 17 et 18 juin 2002 à l'occasion d'une augmentation des concentrations en *Heterocapsa triquetra* et *Alexandrium minutum* observées dans l'estuaire externe de Penzé et en un point amont (Goaz ar Rouz) la semaine précédente. Comme en 2001, à partir 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 17 juin (15 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 par pesée des filtres. Un suivi en continu de la fluorescence (variation de concentration en chlorophylle a) a été réalisé au fluorimètre Turner (Design)

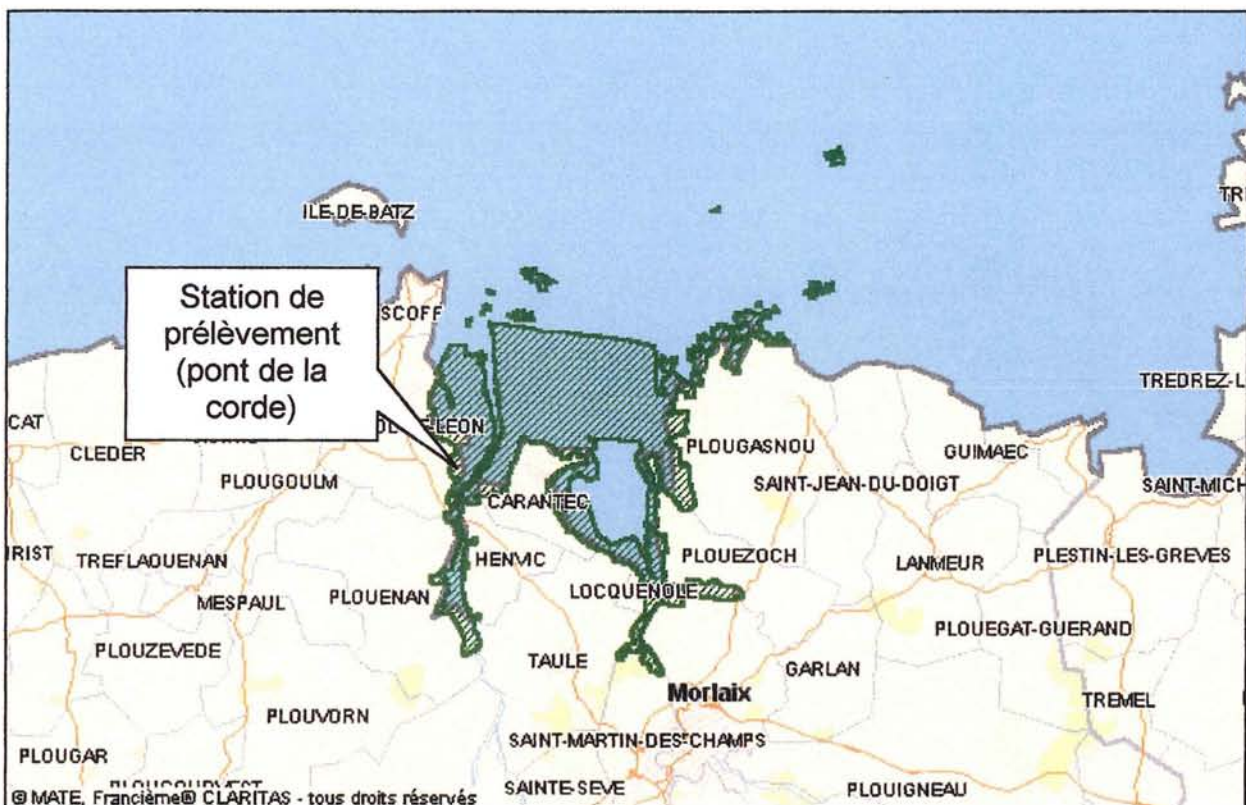


Figure 1 : Localisation de la rivière de Penzé et du point de prélèvement.

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).

Le système de simulation permet de réguler des cycles successifs *Alexandrium* / algue non toxique, selon un rythme 2 heures/ 4 heures comparable aux observations réalisées en estuaire de Penzé. Il repose sur un programme de commande / acquisition et de régulation des flux transitants conçu sur logiciel LAB-VIEW qui permet non seulement de contrôler les phases d'alimentation en *Alexandrium minutum* et *Skeletonema costatum*, mais également d'assurer le rinçage du circuit entre chaque cycle avec les périodes nécessaires de temporisation (Truquet *et al.*, 2002). L'acquisition en continu des signaux de fluorescence est opérée par trois 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 quatrième 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.

Lors des expériences d'octobre 2002 deux salinités ont été expérimentées, correspondant aux valeurs minimales et maximales observées lors des blooms de dinoflagellés de juin 2001 et 2002, soit 25 et 35 ‰. L'objectif était de mettre en évidence un effet de la salinité 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.



Figure 2 : Stand sur lequel sont disposées les six boîtes individuelles contenant chacune une huître. On distingue derrière le stand la chambre d'homogénéisation.

3.3. Matériel biologique

Les huîtres (*Crassostrea gigas*) ont été obtenues, comme en 2001, chez un producteur de la baie de Morlaix (Ile Calloc'h, Finistère Nord). Elles ont été élevées

sur table et ne présentaient pas de précédent en matière de contamination PSP. Les individus en phase de repos sexuel (poids humide total : $51,3 \pm 5,1$ g, poids de chair humide : 3,81 g et poids sec : 0,83 g), 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, avant d'être transférés dans les unités expérimentales. Les cultures en statique d'*A. minutum* ont été réalisées en ballons de 10 L avec une intensité lumineuse de 50 ± 4 $\mu\text{mol.photons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ et un rythme d'éclairement jour / nuit 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 ré-évaluée sur un aliquot de chaque nouveau ballon de culture utilisé au cours des expériences. Lors des expériences d'octobre novembre 2002 la toxicité moyenne était de 1,4 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.

3.4. Analyses chimiques

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 CH_3COOH 0,1 N à 4 °C sur une base V/W. Après centrifugation ($3\ 000 \times g$, 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 supernageants étaient ultra-filtrés (20 000 Da, Sartorius Centrisart) et conservé 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 mn, $3\ 000 g$, 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, NRC-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 $\mu\text{g STX eq.}100\text{ g}^{-1}$ de chair de bivalve en utilisant les facteurs de conversion d'Oshima (1995), c'est-à-dire $297\ \mu\text{g.STX.eq.}\mu\text{M}$ pour la GTX3, et 168 pour la GTX2 (Masselin *et al.*, 1996).

La chaîne d'analyse est composée d'une pompe programmable (qui introduit l'éluant dans le circuit), de deux pompes isocratiques (pour l'oxydant et l'acide), 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 H.P.-CHEM.

3.5. Analyses physiologiques

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 6 minutes sur 4 jours avec un temps de prélèvement d'une minute.

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

$Q_{\text{témoin}}$: 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 pseudo fèces) est l'ensemble de la matière filtrée, rejetée sous forme de pseudo fèces. 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 pseudo fèces. 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.

$$\text{BR} = \text{RR} + \text{ER}$$

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.

$$\text{IR} = \text{FR} - \text{RR}$$

Dans le cas particulier où le coquillage est expérimentalement nourri avec des cultures d'algues à des concentrations insuffisantes pour entraîner la production de pseudo fèces, on peut considérer $\text{RR}\#0$ ET $\text{IR}\#\text{FR}$.

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.

$$\text{AR} = \text{FR} - (\text{RR} + \text{ER})$$

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.

Au cours des expérimentations 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 ou Feeding Time Activity (FTA), soit le pourcentage de temps pendant lequel le coquillage consomme les microalgues,
- le FR (voir plus haut) à partir de la relation : nombre de cellules / fluorescence (fig. 3).

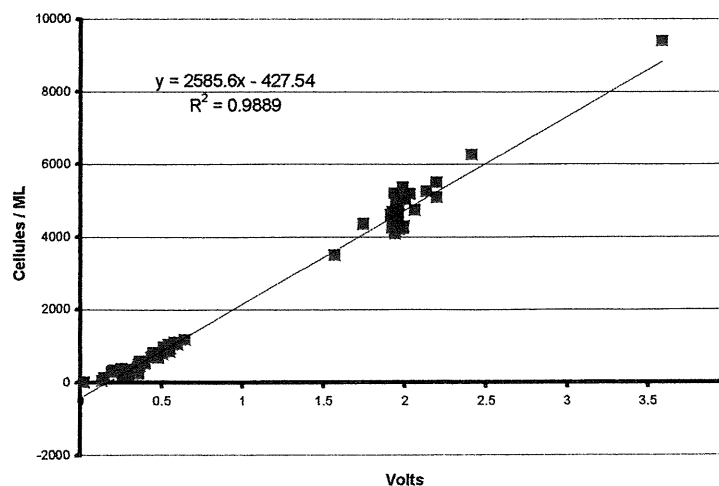


Figure 3 : Relation entre les concentrations cellulaires et les fluorescences (en volts) pendant une expérience d'avril 2002 ne comportant qu'*A. minutum* comme régime alimentaire.

3.6. Modélisation

La contamination et la décontamination des mollusques peuvent être représentées à l'aide de modèles compartimentaux. Ces derniers permettent de représenter les échanges de matière entre différentes parties d'un « système » par décomposition en un certain nombre de sous-systèmes macroscopiques appelés compartiments.

La contamination des huîtres est déterminée par rapport à l'ingestion d'une quantité de toxines, l'assimilation d'une partie de ces dernières dans les tissus des organismes marins et l'évacuation de l'autre par voie naturelle.

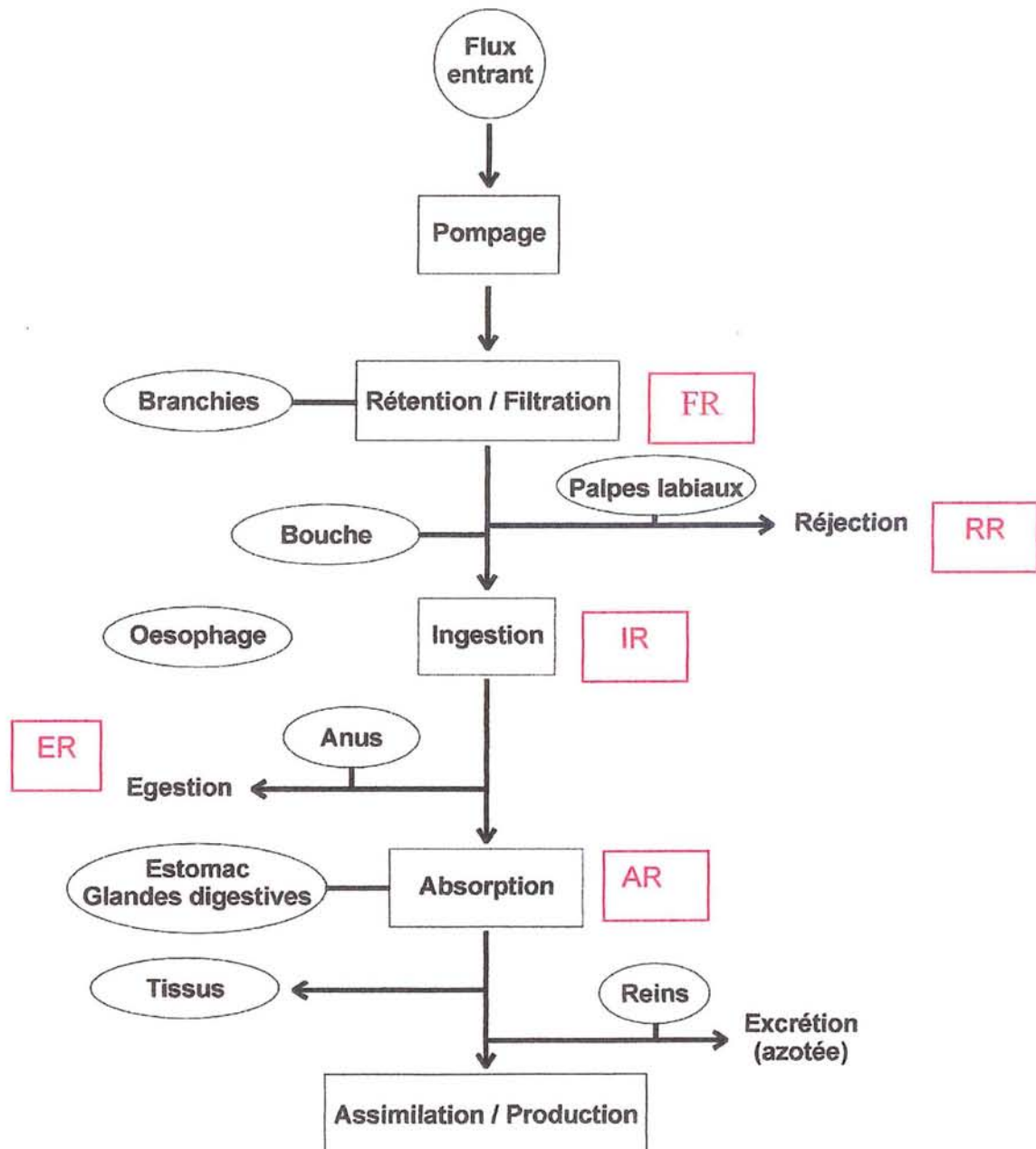
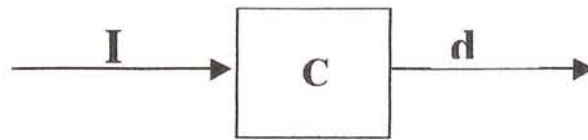


Figure 4 : Diagramme simplifié du processus alimentaire chez l'huître creuse.

L'organigramme classique du processus alimentaire chez l'huître (fig. 4) permettrait de modéliser les différents niveaux d'assimilation. Chaque organe de l'animal représenterait alors un compartiment et les flèches intermédiaires modéliseraient les transferts de matières entre ces différents sous-systèmes. Ce schéma se révèle, cependant, bien trop complexe pour être utilisé. En effet, il ne nous est pas possible de déterminer, à l'heure actuelle, tous les coefficients intervenant dans les mécanismes digestifs de l'huître. Les phénomènes d'assimilation et de transfert des toxines dans les tissus sont encore aujourd'hui peu connus et la part exacte de chaque organe dans la toxicité globale de l'huître est encore à préciser. A la suite des expériences, la seule information utilisable est la toxicité cumulée finale des huîtres le jour de leur prélèvement. Dans le cadre de cette étude seuls des modèles faisant intervenir peu de coefficients pourront donc être étudiés et ajustés.

3.6.1. Les modèles à un compartiment



Ce modèle peut se résumer à une équation différentielle du premier ordre:

$$\frac{dC}{dt} = I - dC$$

où :

- C : concentration en toxines présentes dans l'huître (μg éq STX/100g)
- I : taux d'ingestion en éléments toxiques (μg éq STX/100g/j)
- d : vitesse relative de décontamination

Ce type de modèle permet d'obtenir des évolutions de concentration en toxines n'ayant qu'une seule cinétique de décontamination. Il a l'avantage d'être simple à représenter et possède un nombre de coefficients peu élevé qui rend plus facile son exploitation.

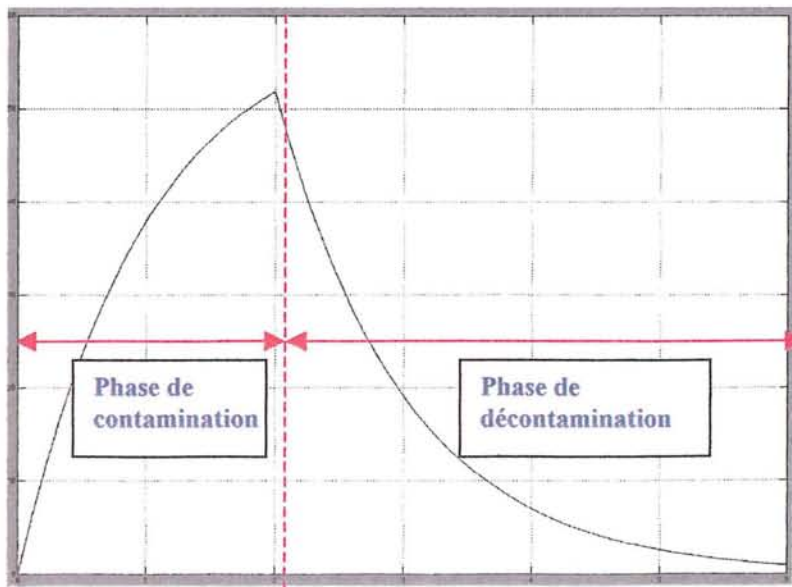
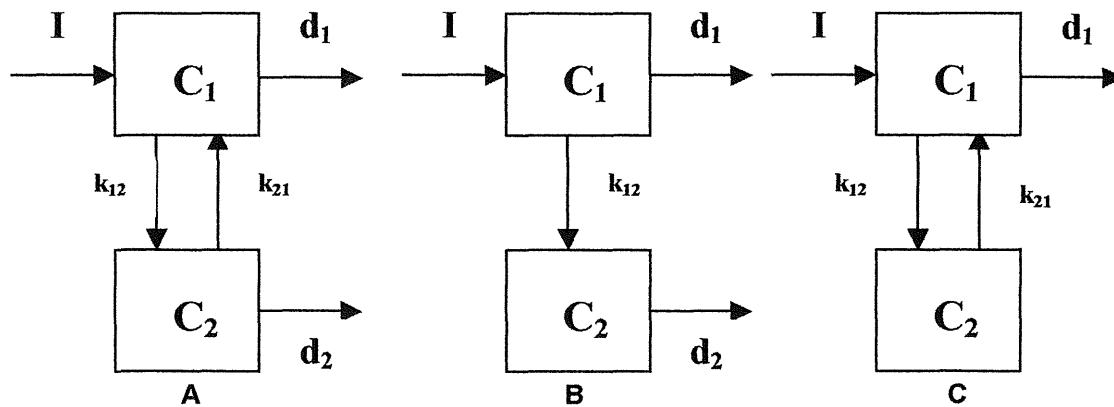


Figure 5 : Réponse globale du modèle à un compartiment.

3.6.2. Les modèle à deux compartiments



Le système d'équations générales associé à ces modèles est le suivant :

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dC_1}{dt} = I - k_{12}C_1 - d_1C_1 + k_{21}C_2 \\ \frac{dC_2}{dt} = k_{12}C_1 - d_2C_2 - k_{21}C_2 \\ C = C_1 + C_2 \end{array} \right.$$

où :

- C_1 : concentration en toxines présentes dans le premier compartiment
- C_2 : concentration en toxines présentes dans le deuxième compartiment
- C : concentration totale en toxines présentes dans l'huître
- k_{21} et k_{12} : taux de transferts entre le premier et le deuxième compartiment
- d_1 et d_2 : respectivement taux de décontamination du premier et deuxième compartiment.

Pour le modèle B, $k_{21} = 0$

Pour le modèle C, $d_2 = 0$

Ce type de modèles fait intervenir un nombre de paramètres plus important que le précédent. Il permet de simuler, suivant les valeurs de coefficients, une cinétique de contamination possédant deux vitesses de contamination/ décontamination :

- une vitesse rapide modélisée par le premier compartiment et correspondant au passage des toxines dans le tube digestif,
- une vitesse lente modélisée par le deuxième compartiment et correspondant au passage des toxines dans les tissus.

Ces modèles traduisent mieux la réalité mais font intervenir un nombre de coefficients qui se révèle difficile à identifier. Pour pouvoir exploiter ces schémas, des informations concernant l'évolution de la toxicité dans les bivalves seraient utiles. Ces données ne sont malheureusement pas en notre possession.

L'utilisation du modèle le plus simple (B) pour lequel l'identification des coefficients est moins lourde et plus abordable peut, cependant, permettre de tracer des cinétiques ayant deux vitesses de contamination/décontamination (fig. 6).

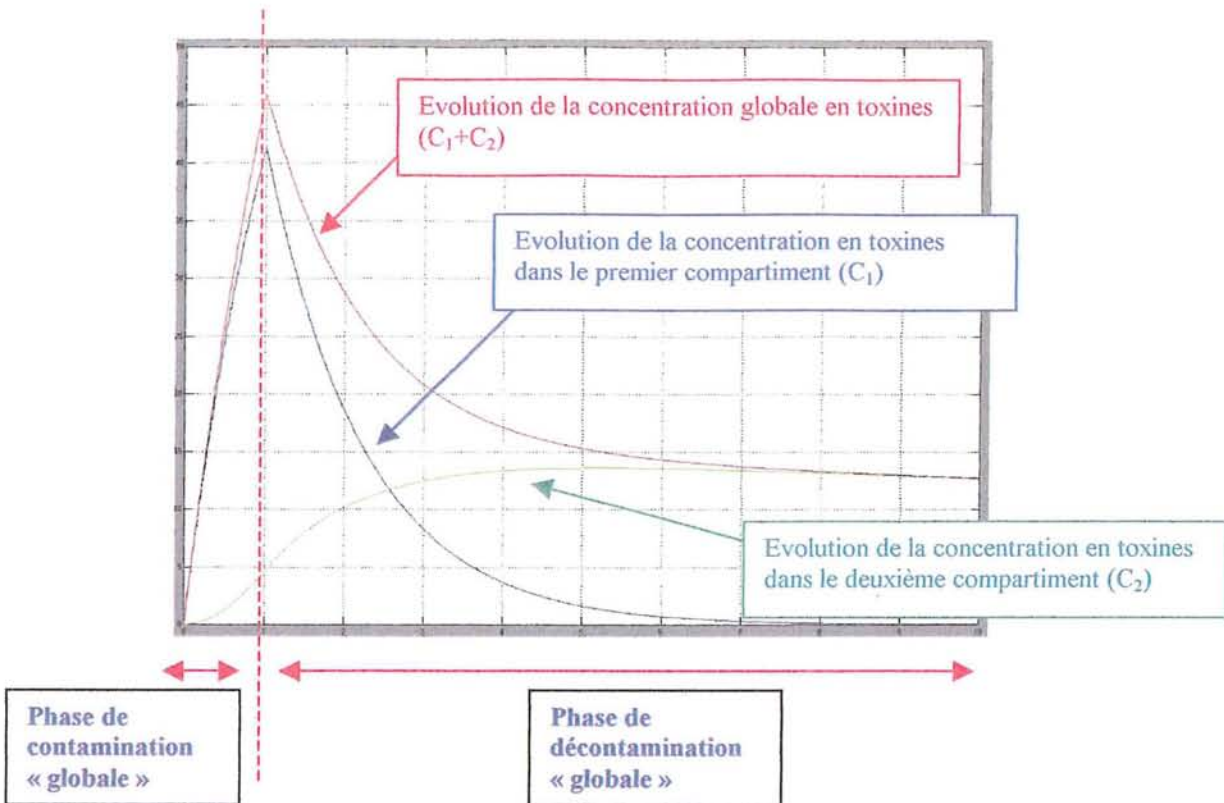


Figure 6 : Réponse globale du modèle à deux compartiments.

Sur cette cinétique, en phase de contamination, la toxicité globale dépend essentiellement de la concentration en toxines dans le premier compartiment, le deuxième compartiment a peu d'influence. En phase de décontamination, le schéma contraire se produit : le deuxième compartiment prend beaucoup plus d'importance sur la toxicité globale, au cours du temps.

4. Résultats

4.1. Observations en Penzé (suivi 24 H)

Les conditions hydroclimatiques prévalant la première quinzaine de juin 2002 correspondaient à des coefficients de marée compris entre 59 et 63, une température des eaux de surface variant entre 16,4 et 19,3 °C et des salinités minimales et maximales respectivement de 22,5 et 33,4 ‰ pendant la période d'observation (17 et 18 juin). Les conditions nécessaires à la formation d'une eau rouge à *A. minutum* (ou *H. triquetra*) selon Morin *et al.* (2000) à savoir : 1) température de l'eau égale ou supérieure à 16 °C, 2) salinités entre 17 et 31 étaient donc réunies mais les effectifs n'ont cependant pas atteint ceux observés en 2001 et aucune eau rouge n'a été observée pendant le suivi 24 H. L'étude qualitative et quantitative des prélèvements phytoplanctoniques a montré que les trois espèces constituant habituellement les

eaux rouges (*H. triquetra*, *S. trochoidea* et *A. minutum*) étaient présentes (seulement le 18 juin et à faibles effectifs pour *A. minutum*) mais avec des effectifs nettement moindres qu'en 2001 : 208 000 à 232 000 cellules / L pour l'ensemble de ces trois d'espèces lors des maxima observés (fig. 7). Elles sont donc sous représentées par rapport aux diatomées (79 000 à 988 000 cellules / L) et aux phytoflagellés (588 000 à 664 000 cellules / L) observés au même moment.

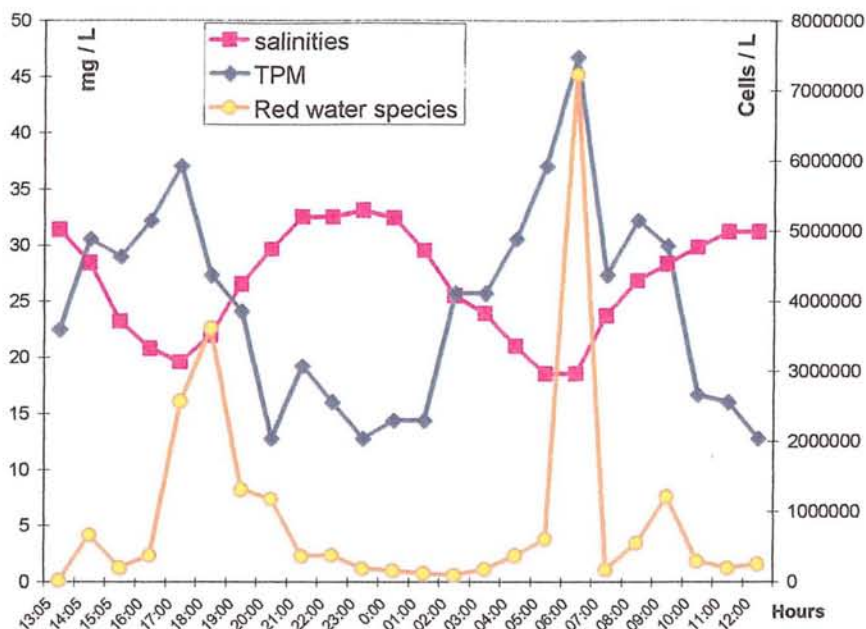


Figure 7 : Paramètres hydrologiques et biologiques mesurés au cours du cycle de 24 heures (Pont de la Corde, rivière de Penzé) les 17 et 18 juin 2002 : TPM (en mg / L), Salinités (‰), et concentrations cellulaires des trois espèces d'eau rouge en cellules / L.

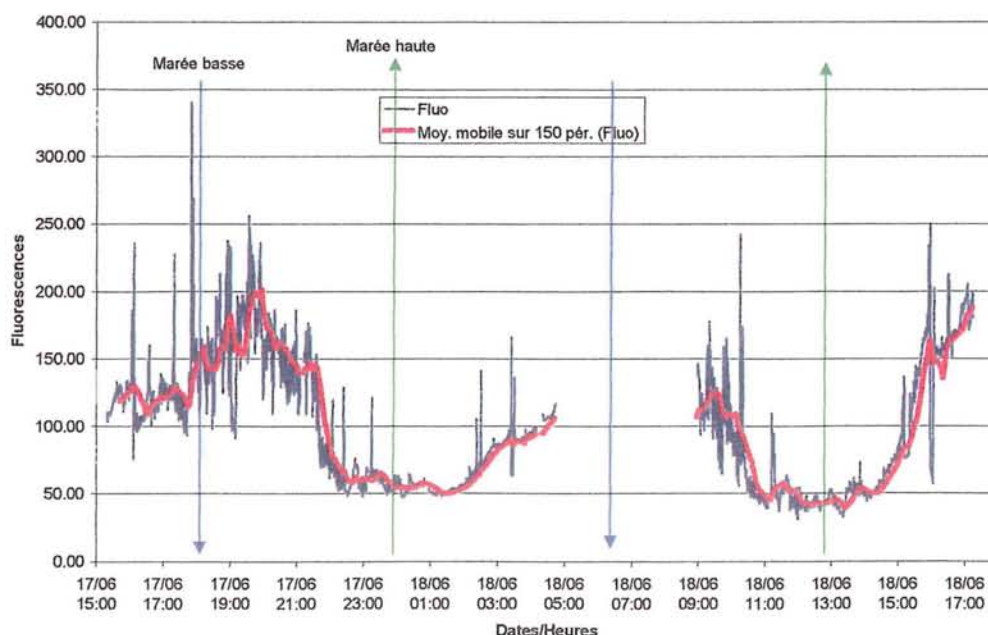


Figure 8 : Evolution des fluorescences au cours des cycles de marée.

L'examen de l'évolution des espèces constituant habituellement l'eau rouge permet néanmoins de vérifier la présence de deux pics toujours situés à BM + 1 H et donc au moment du maximum de MES qui correspond également au maximum de fluorescence (fig. 8) et donc au maximum phytoplanctonique.

Si cette deuxième série d'observations ne donne pas d'information supplémentaire sur la dynamique horaire des eaux rouges à *A. minutum* elle permet néanmoins de confirmer ce qui avait été observé en 2001, à savoir la présence d'un seul pic, en début de flot, et l'absence de deuxième pic en milieu de jusant, très probablement du fait d'un effet dispersif des courants à marée descendante. Il en résulte que le protocole expérimental étudié maximise le risque avec l'hypothèse de deux expositions à un maximum d'*Alexandrium* au cours d'un cycle de marée. 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

En octobre 2002, les expériences ont été menées sur deux semaines. Le facteur variable était la salinité du milieu (tabl. 1).

Semaines	Régimes	Salinités	<i>A. minutum</i> (pics)	<i>S. costatum</i>
Semaine 1	<i>A. minutum</i> + <i>S. costatum</i>	35 ‰	5 000	20 000
Semaine 2	<i>A. minutum</i> + <i>S. costatum</i>	25 ‰	5 000	20 000

Tableau 1 : concentrations en nombre de cellules/ml pour chaque régime alimentaire.

Variations saisonnières sur les MES *Alexandrium* à 5000 cell / ml

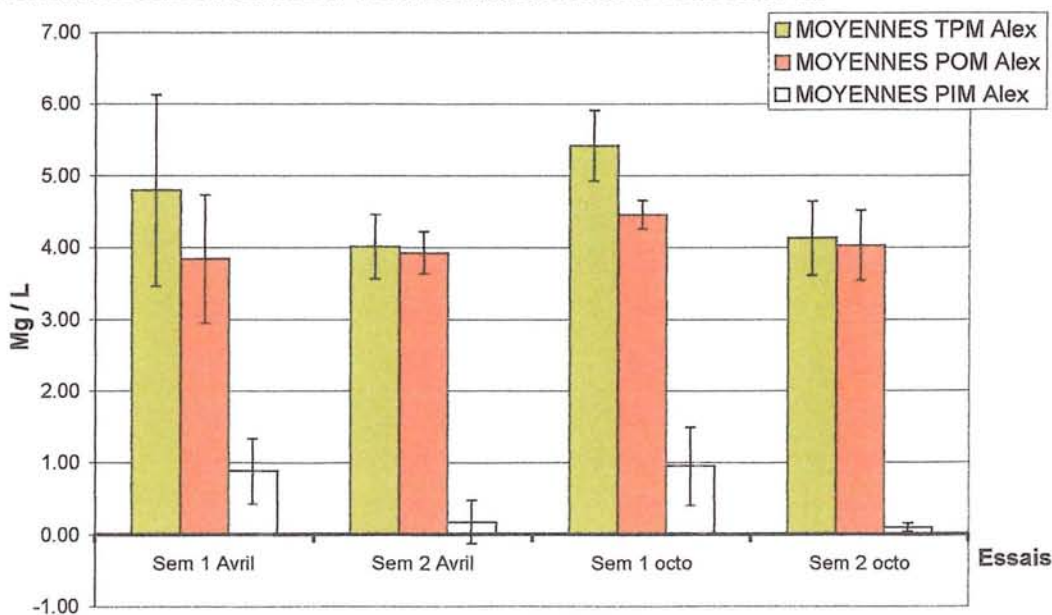


Figure 9 : TPM, POM et PIM moyens en phase « *Alexandrium* » pour une concentration nominale de 5 000 cellules / mL : comparaison des résultats d'avril et octobre 2002.

Les apports en culture d'*A. minutum* ont été pratiqués à la concentration de 5 000 cellules / mL pour comparer les résultats à ceux obtenus en avril 2002, tout au moins à salinité équivalente (35 ‰). Il n'y a pas de variations significatives sur les TPM et les POM et une proportion de PIM qui reste réduite, dans tous les cas de figure (fig. 9). Les enregistrements de salinité ont été très stables, soit 35 ‰ la première semaine et 25 ‰ la deuxième semaine (fig. 10). La température a été maintenue à 16 °C avec quelques variations explicables par les difficultés à réguler l'arrivée de froid (température élevée de la pièce).

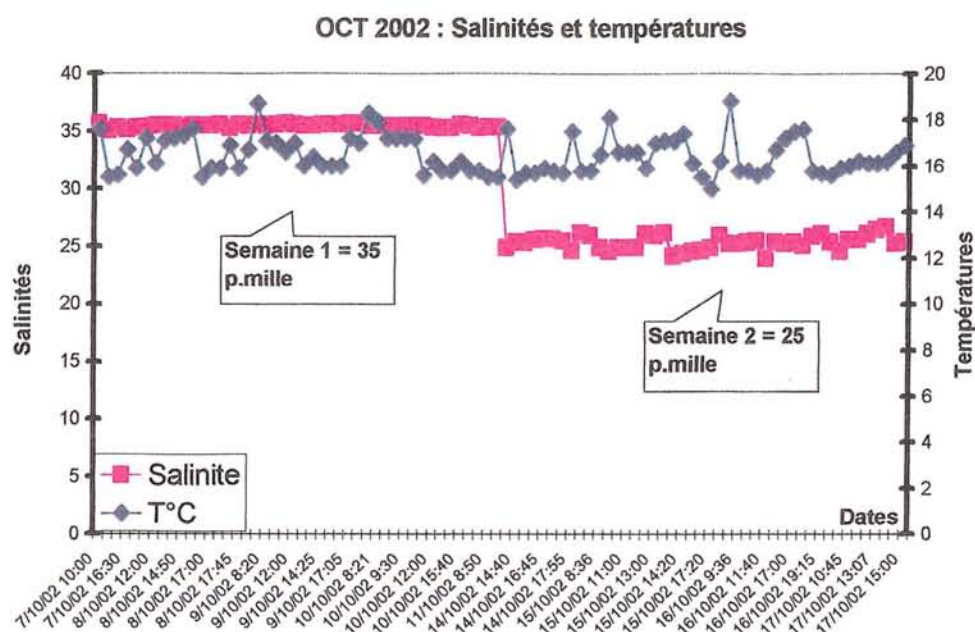


Figure 10 : Suivi des salinités et des températures pendant les deux semaines d'expérience.

Le suivi des concentrations en toxines de la chair des huîtres au cours des quatre jours d'expérience (fig. 11) montre une augmentation graduelle comparable à ce qui avait été observé en novembre 2001 et en avril 2002 pour une même concentration en *A. minutum*. Si l'on tient compte des écarts types élevés, il n'y a pas de différence significative entre les toxicités à 25 et 35 ‰. Ce dernier résultat, ainsi que les résultats de toxicité des expériences d'octobre 2001 et avril 2002 seront examinés statistiquement plus loin.

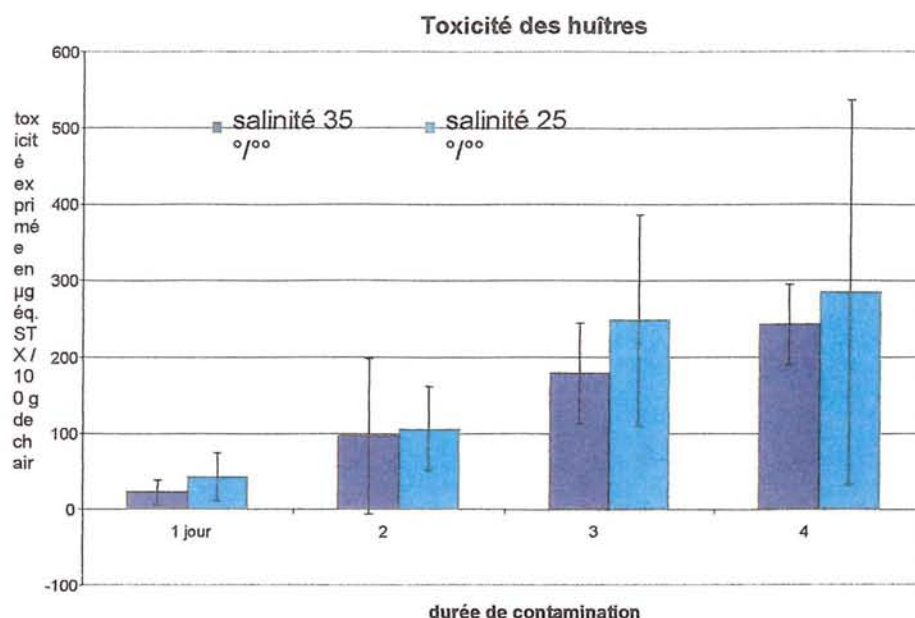


Figure 11 : Toxicités moyennes cumulées et écarts types quantifiés chaque jour par CLHP (valeurs exprimées en équivalent SRX / 100 g de chair).

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. Un taux résiduel d'*A. minutum* pendant les phases « *Skeletonema* » a pu être estimé comme étant de l'ordre de 10 à 35 % de la concentration moyenne en phase « *Alexandrium* », comme lors des expériences précédentes.

4.3. Interactions entre facteurs du milieu et accumulation de toxines dans les huîtres

Les expériences précédentes (Lassus *et al.*, 2002 b) avaient déjà révélé des tendances concernant l'influence des différents paramètres testés (concentration cellulaire en algue toxique, concentration en matière minérale ajoutée) sur le phénomène de bioaccumulation. :

- toxicité plus importante pour un régime à « 5 000 cellules / ml en *A. minutum* + 20 000 cellules / ml en *S. costatum* » que pour des régimes à « 200 cellules / ml en *A. minutum* + rien » ou « 200 cellules / ml en *A. minutum* + 20 000 cellules / ml en *A. costatum* » ;
- toxicité plus faible et phénomène d'inhibition de la filtration pour 10 000 cellules / ml d'*A. minutum* ;
- effet favorable de l'ajout de matière minérale sur l'accumulation des toxines pour l'ensemble des individus soumis à 5 000 cellules / ml d'*A. minutum* et 20 000 cellules / ml de *S. costatum* ;
- en ajoutant les observations sur les salinités : pas de différence significative des toxicités entre une salinité à 25 ‰ et une salinité à 35 ‰.

Pour confirmer ces observations et évaluer plus précisément le rôle de la salinité, de la concentration cellulaire en *Alexandrium minutum* et des matières minérales ajoutées sur la toxicité finale des huîtres, une phase de validation statistique était utile. Pour cela, les données expérimentales ont été analysées à l'aide du logiciel STATGRAPHICS Plus et l'utilisation de régressions linéaires multiples (fig. 12).

Le principe consistait à observer la réponse de la toxicité des huîtres aux différents facteurs du milieu et à estimer les pentes pouvant décrire au mieux le processus de bioaccumulation. Les toxicités finales de chaque huître ont été considérées et les paramètres expérimentaux ainsi que le temps de présence des huîtres dans le système ont été inclus dans des régressions multiples comme étant des variables indépendantes. Plusieurs modèles ont été testés dans le but de comparer leur pente, leur caractère significatif ainsi que le caractère significatif des paramètres intervenants.

A partir des données de toxicités mesurées, des relations ont ainsi été déterminées permettant de prédire la toxicité des huîtres en fonction des paramètres expérimentaux pris en compte.

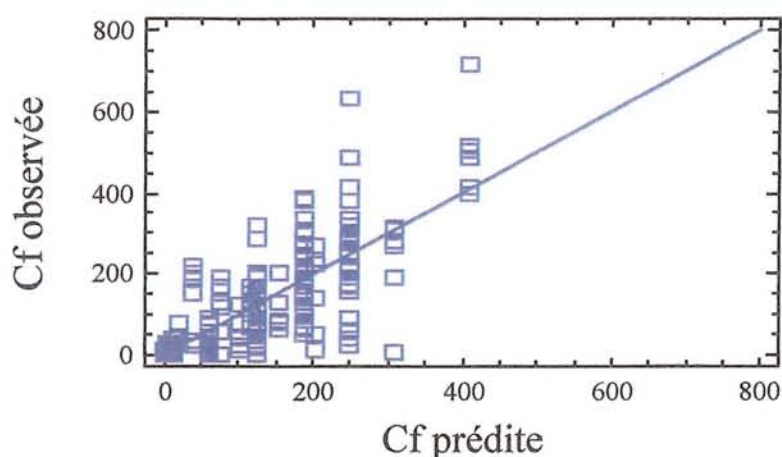


Figure 12 : Droite de régression obtenue avec STATGRAPHICS Plus ($R^2 = 78.69\%$).

Cf : concentration en toxines dans l'huître au moment de son prélèvement (μg éq STX/100g)

Equation : $Cf = 12.8365 * MMA * t + 0.0739345 * N_alex * t - 0.959939 * MMA * MMA * t - 0.0000218846 * N_alex * N_alex * t$

La pente déterminée est la plus proche de l'ensemble des points représentatifs de la distribution.

Des modèles simples puis plus complexes ont été testés (tabl. 2).

Modèle	Paramètres	P-value	Equations	R ²
Modèle 1	N_alex*t	0.5553	Cf = - 0.00272211*N_alex*t + 59.9673*t	63.76 %
	T	0.0000		
Modèle 2	MMA*t	0.9306	Cf= - 0.0530638*MMA*t - 0.0027377*N_alex*t + 60.1036*t	63.57 %
	N_alex*t	0.5562		
	T	0.0000		
Modèle 3	Salinité*t	0.9911	Cf= - 0.0519122*MMA*t - 0.00272359*N_alex*t + 0.0114255*salinite*t+59.7918*t	63.37 %
	MMA*t	0.9333		
	N_alex*t	0.5573		
	T	0.0408		
Modèle 4	Salinité*salinité*t	0.2165	Cf= - 13.2347*MMA*t + 0.0665235*N_alex* - 60.9822*salinité*t - 0.979847*MMA*MMA*t + 0.0000201882* N_alex*N_alex*t + 0.993259*salinité*salinité*t + 2.42525*t*t	78.65 %
	MMA*MMA*t	0.0000		
	N_alex*N_alex*t	0.0000		
	t*t	0.4018		
	Salinité*t	0.2106		
	MMA*t	0.0000		
	N_alex*t	0.0000		
T	0.2075			
Modèle 5	MMA*t	0.0000	Cf= 12.8365*MMA*t + 0.0739345*N_alex*t - 0.959939*MMA*MMA*t - 0.0000218846*N_alex*N_alex*t	78.69 %
	N_alex*t	0.0000		
	MMA*MMA*t	0.0000		
	N_alex*N_alex*t	0.0000		

Tableau 2 : t = temps (jour), N_alex = concentration en *Alexandrium minutum* (cellules/ml), MMA=matière minérale ajoutée (mg/ml), Cf = concentration en toxines dans l'huître au moment de son prélèvement (µg eq STX/100g).

Les coefficients pondérant chaque variable ont été déterminés par le logiciel.

Pour les trois premiers modèles testés, les coefficients affectés à la concentration cellulaire en *Alexandrium minutum* et à la concentration en matières minérales ajoutées sont négatifs. Ces deux variables expérimentales limiteraient ainsi les cinétiques de bioaccumulation.

Ces résultats semblent surprenants, si l'on tient compte de ce qui a été observé jusqu'alors. Ils se révèlent, toutefois, peu fiables, les modèles concernés ne possédant pas de coefficients de corrélation très élevés ($R^2 < 65\%$) et les paramètres intervenants, au vu de leurs coefficients « P-value », n'étant pas statistiquement significatifs à un niveau de confiance élevé.

Le modèle le plus significatif est le modèle 5. Il possède le coefficient de corrélation le plus important et l'ensemble de ces paramètres, liés à la fois aux concentrations en algues toxiques et en matières minérales ajoutées, sont significatifs.

Par rapport à ces résultats, il semble donc que les matières minérales ajoutées et la concentration cellulaire en *Alexandrium minutum* aient une influence sur la bioaccumulation des huîtres. Ce qui n'est apparemment pas le cas de la salinité (P-value > 0.1 pour tous les modèles concernés par ce paramètre). Ces résultats viennent confirmer ce qui avait été pressenti auparavant.

La concentration en *Skeletonema costatum* a également été incorporée à certains modèles, mais ce paramètre ne s'est cependant pas révélé significatif.

Sur le dernier modèle, les coefficients négatifs affectés à deux paramètres caractérisant respectivement la concentration cellulaire en *Alexandrium minutum* et la concentration en matières minérales ajoutées indiquent que pour des valeurs seuils données ils produiraient un effet limitant sur la bioaccumulation.

Pour exemple :

Pour MMA = 0 mg/ml, $Cf = (0.073945.N_{alex} - 0.0000218846.(N_{alex})^2).t$

Si $N_{alex} = 200$ cell/ml, $Cf = 4.83.t$
Si $N_{alex} = 5000$ cell/ml, $Cf = 62.45.t$
Si $N_{alex} = 10000$ cell/ml, $Cf = 3.32.t$

Pour MMA = 5 mg/ml, $Cf = [40 + 0.073945.N_{alex} - 0.0000218846.(N_{alex})^2].t$

Si $N_{alex} = 200$ cell/ml, $Cf = 44.83.t$
Si $N_{alex} = 5000$ cell/ml, $Cf = 102.45.t$
Si $N_{alex} = 10000$ cell/ml, $Cf = 43.32.t$

En ce qui concerne les concentrations en micro algues toxiques, il pourrait y avoir un effet inhibiteur de la filtration de la part des huîtres et donc une diminution directe de l'accumulation des toxines. Ce phénomène a déjà été observé pour un régime alimentaire alterné à 10 000 cellules /ml d'*Alexandrium minutum*. Pour la matière minérale ajoutée, ce facteur pourrait, à partir d'une certaine valeur, favoriser directement le processus d'élimination des toxines en augmentant le mécanisme d'élimination naturelle. Certaines études menées sur les processus de décontamination indiquent que l'ajout dans le milieu de micro algues non toxiques peut augmenter la vitesse d'élimination des toxines. Il pourrait en être de même pour la matière minérale ajoutée.

4.4. Relation entre FTA et toxicité

Le « Feeding Time Activity » (FTA) est une grandeur évaluée en continu sur l'ensemble des expériences. Une huître est considérée active lorsque le différentiel de fluorescence (fig. 13) entre le témoin et le coquillage concerné est au moins supérieur à 5 % de la fluorescence maximale (Bougrier *et al.*, 2001, 2002), soit :

$$\frac{(Fluo.témoin - Fluo.huître)}{Fluo.témoin} \times 100 > 5\%$$

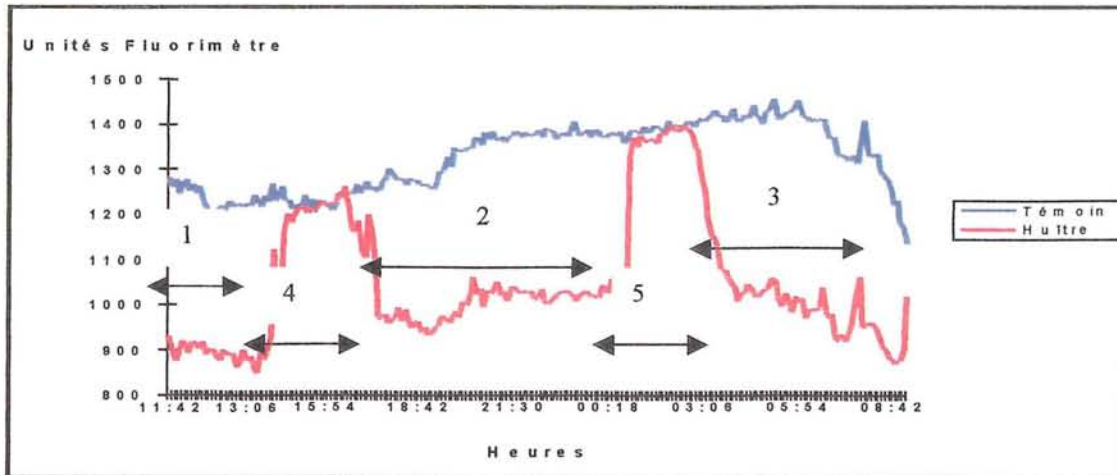


Figure 13 : Exemple d'enregistrement de la fluorescence avec : 1, 2, 3 : périodes d'activité alimentaire et 4, 5 : périodes de non activité alimentaire.

Le FTA étant l'une des rares données pouvant être évaluée en continu par un calcul simple, directement à partir des mesures, il était intéressant de pouvoir établir une corrélation entre cette grandeur et le taux moyen de bioaccumulation journalier en toxines (TOX), afin d'estimer en ligne la toxicité des coquillages (le TOX est obtenu pour chaque huître en divisant la toxicité finale mesurée par le nombre de jours de présence dans le système expérimental).

Pour déterminer et analyser ces relations le logiciel STAGTGRAPHICS Plus et les régressions multiples ont à nouveau été utilisés. Les FTA moyens journaliers en phase *Alexandrium* et *Skeletonema* ont été différenciés afin de pouvoir apprécier l'influence de ces deux cycles sur le taux de bioaccumulation. Pour chaque semaine d'expérience une relation a pu être déterminée caractérisant la réponse du TOX à ces deux variables indépendantes.

Forme de la relation : $TOX = a.FTA_{ske} + b.FTA_{alex}$

Où : TOX : taux moyen de bioaccumulation journalier en toxines des huîtres (en $\mu\text{g}/100\text{g}/\text{j}$),
 FTA_{ske} : temps moyen d'activité alimentaire en cycle *Skeletonema* sur une journée et
 FTA_{alex} : temps moyen d'activité alimentaire en cycle *Alexandrium* sur une journée.

Au cours de cette étude les tracés des régressions ont mis en évidence des individus ayant un comportement aberrant par rapport au reste du lot (valeurs de FTA_{alex} faibles pour une toxicité finale se trouvant parmi les plus élevées des individus). Ces valeurs ayant une influence non négligeable au moment de la détermination des droites de régression, leur suppression a favorisé l'obtention de relations ayant de meilleurs coefficients de corrélation (fig. 14).

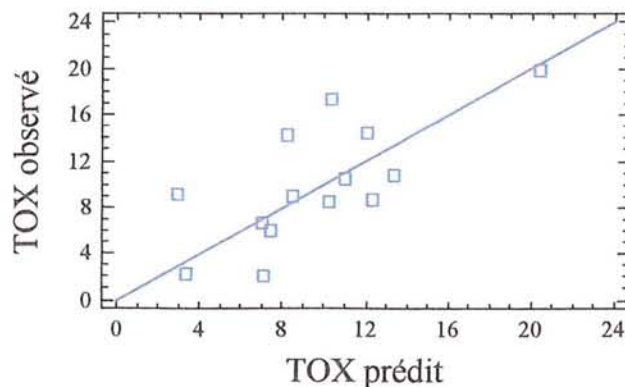


Figure 14 : Droite de régression obtenue après suppression du point aberrant correspondant à *A. minutum* = 200 cellules /ml et *S. costatum* : 20 000 cellules / ml ($R^2 = 88,48\%$)
Equation : $TOX = 0.177307 FTA_{Alex} + 0.0835988 FTA_{Ske}$. TOX en $\mu\text{g}/100\text{g/j}$.

Au vu de ces résultats, on peut envisager une relation linéaire entre FTA et TOX et procéder de la même manière pour les autres expériences (tabl. 3).

Pour l'ensemble des semaines traitées, excepté pour la semaine 4 d'octobre / novembre 2001, les coefficients de corrélation sont élevés, indiquant qu'il pourrait exister une relation linéaire et significative entre FTA et TOX.

Les équations des semaines 3 d'octobre 2001 et 2 d'avril 2002 (régimes alimentaires similaires : 5000 cellules / ml en *A. minutum* et 20 000 cellules / ml en *S. costatum*) ont un coefficient négatif affecté au FTA_{alex} . Ainsi, pour ces deux semaines, les phases toxiques limiteraient le processus de contamination et celui-ci serait au contraire accentué au cours des cycles *Skeletonema*. Ce résultat semble surprenant, mais il faut rappeler qu'au cours de ces phases d'alimentation des résidus en *Alexandrium minutum* supérieurs ou égaux à 10 % des valeurs imposées en phase « *Alexandrium* » sont présents. Ces derniers auraient alors, dans ces deux cas, une influence plus importante sur l'évolution de la toxicité que la présence de concentrations élevées en algues toxiques (5 000 cellules/ml).

Expériences	Semaines	Paramètres	P-value	Equations	R^2	NbP*
Octobre /novembre 2001	Semaine 2	FTA_{alex}	0.0211	$TOX = 0.177507*FTA_{alex} + 0.083588*FTA_{ske}$	88.4 %	1
		FTA_{ske}	0.0092			
	Semaine 3	FTA_{alex}	0.1917	$TOX = - 0.428774*FTA_{alex} + 0.640972*FTA_{ske}$	83.65 %	1
		FTA_{ske}	0.0000			
	Semaine 4	FTA_{alex}	0.3921	$TOX = 0.545805*FTA_{alex} + 0.244411*FTA_{ske}$	14.74 %	0
		FTA_{ske}	0.6399			
Avril 2002	Semaine 2	FTA_{alex}	0.3469	$TOX = - 0.233189*FTA_{alex} + 1.2352*FTA_{ske}$	93.34 %	2
		FTA_{ske}	0.0000			
	Semaine 3	FTA_{alex}	0.3304	$TOX = 1.35456*FTA_{alex} + 0.770295*FTA_{ske}$	81.67 %	5
		FTA_{ske}	0.0066			
	Semaine 4	FTA_{alex}	0.0753	$TOX = 0.70615*FTA_{alex} + 1.14915*FTA_{ske}$	77.72 %	3
		FTA_{ske}	0.0119			
Octobre 2002	Semaine 2	FTA_{alex}	0.3570	$TOX = 0.522449*FTA_{alex} + 1.4475*FTA_{ske}$	94 %	1
		FTA_{ske}	0.0000			

Tableau 3 : FTA_{alex} = FTA moyen par jour en cycle *A. minutum*, FTA_{ske} = FTA moyen par jour en cycle *S. costatum*. *NbP : nombre de points ignorés pour l'analyse.

Les valeurs de FTA n'ont pas pu être exploitées correctement pour la semaine 1, ce qui a rendu impossible l'estimation d'une relation TOX-FTA.

Le FTA n'étant pas une donnée quantitative, il est difficile d'évaluer, à partir de ce résultat, pour quelle raison une huître considérée active en cycle *Alexandrium* n'afficherait pas une augmentation de la concentration en toxines dans son organisme. On peut seulement émettre l'hypothèse que les quantités de toxines consommées par l'huître au cours de ces cycles soient faibles et que la part réellement ingérée et passant par le tube digestif soit insuffisante pour entraîner une accumulation significative de toxines par le coquillage.

Pour les autres semaines, les coefficients affectés au FTA_{ske} et FTA_{alex} sont tous positifs et le poids donné à chacune de ces deux variables se révèle différent d'une semaine à l'autre.

Les valeurs positives pondérant les FTA_{ske} laissent penser que ces phases « non toxiques » joueraient un rôle dans l'accumulation des toxines.

Au regard des coefficients P-value de chaque variable, il apparaît que le FTA_{ske} est statistiquement plus significatif que le FTA_{alex} pour les valeurs de TOX observées. Il y aurait ainsi une corrélation plus importante entre l'activité alimentaire en cycle non toxique et le taux de bioaccumulation journalier qu'entre cette grandeur et l'activité alimentaire en cycle toxique. A partir des données de FTA il est, cependant, difficile d'estimer la part de chaque cycle sur la toxicité finale des huîtres. L'utilisation d'une donnée plus quantitative permettrait d'évaluer un peu plus précisément l'influence de ces deux phases sur le processus de bioaccumulation.

A partir des FTA de tous les cycles *A. minutum* et *S. costatum* pour chaque huître, il est possible d'estimer, en utilisant les relations définies précédemment, les concentrations en toxines accumulées dans le coquillage toutes les six heures (2 heures de cycle *A. minutum* + 4 heures de cycle *Skeletonema*) jusqu'au jour de leur prélèvement. En effectuant des moyennes cumulées de ces valeurs, il est alors intéressant de retracer des cinétiques de contamination pour visualiser les évolutions individuelles de la toxicité dans les huîtres et pouvoir ajuster des modèles prédictifs.

Une méthode simple, basée sur l'utilisation de ces cinétiques de contamination, devait permettre d'identifier les coefficients intervenant dans un modèle à un compartiment.

En effet, en considérant l'ingestion en toxines et la décontamination proportionnelles aux concentrations en micro algues toxiques respectivement dans le milieu et dans l'huître, l'équation d'un modèle à un compartiment se résume à :

$$\frac{dC}{dt} = k_1 N - dC$$

où k_1 représente le coefficient de proportionnalité entre le taux d'ingestion et la concentration en algues toxiques, d le coefficient de décontamination, C la concentration en *A. minutum* dans l'huître et N la concentration en *A. minutum* dans le milieu.

Pour estimer les paramètres k_1 et d , il a été procédé à une discrétisation de l'équation précédente, soit :

$$\frac{C_t - C_{t-1}}{\Delta t} = k_1 N_{t-1} - dC_{t-1}$$

$$C_t - C_{t-1} = \Delta t.(k_1 N_{t-1} - dC_{t-1})$$

d'où

$$C_t = k_1 \Delta t N_{t-1} + (1 - d\Delta t)C_{t-1} = \alpha N_{t-1} + \beta C_{t-1}$$

Avec N_{t-1} et N_t les concentrations moyennes en cellules / ml d'*A. minutum* dans le milieu (pour une même semaine $N_t = N_{t-1}$), C_{t-1} , C_t , les concentrations en toxines dans l'huître aux instants t et $t-1$, directement lues sur les cinétiques « retracées » (μg éq STX/100g) et Δt le pas de temps entre les concentrations en toxines dans l'huître (en heures).

Par régression linéaire multiple (algorithme des moindres carrés), on obtient ainsi α et β et on peut en déduire k_1 et d .

$$\alpha = k_1 \Delta t \text{ et } \beta = 1 - d\Delta t \text{ d'où } k_1 = \frac{\alpha}{\Delta t} \text{ et } d = \frac{1 - \beta}{\Delta t}$$

Avec cette méthode, il était envisageable de déterminer des coefficients proches de ceux évalués lors des études antérieures ($d = 0,25$ pour des expériences de détoxification continue).

A partir des relations TOX / FTA, il était ainsi logique d'obtenir des cinétiques de contamination présentant un début de courbure, caractéristique d'une décontamination, due à l'élimination naturelle et progressive des toxines après leur ingestion par les bivalves.

Les évolutions obtenues sont, pour la majorité des huîtres, linéaires par rapport au temps et ne permettent pas d'observer ce processus de décontamination (fig. 15).

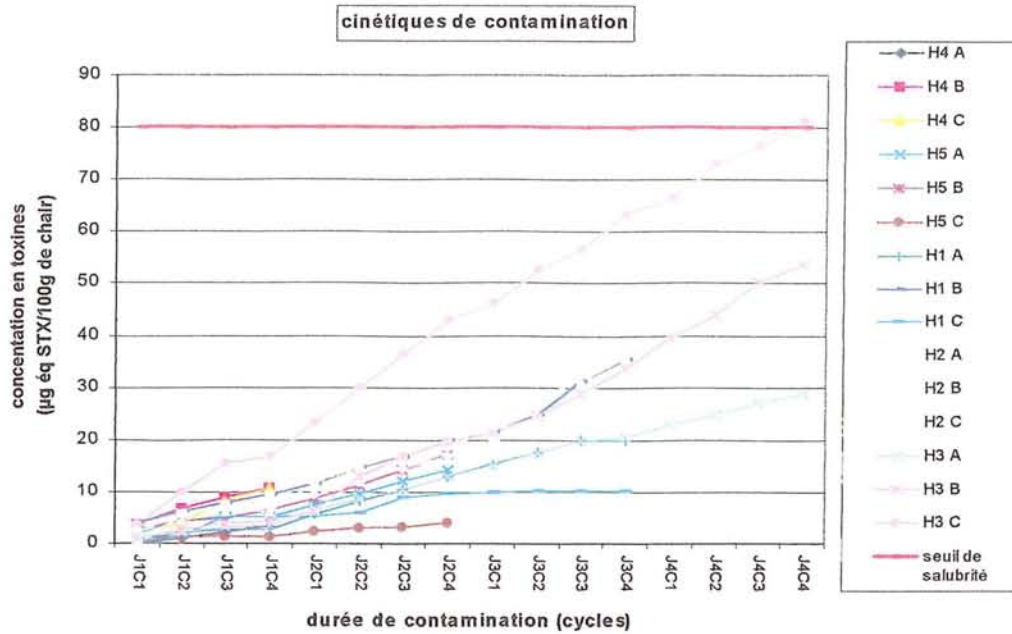


Figure 15 : Cinétiques de contamination pour la semaine 2 d'octobre / novembre 2001 (*A. minutum* = 200 cellules / ml et *S. costatum* = 20 000 cellules / ml)
 Sur l'échelle des temps chaque cycle comprend une phase *Skeletonema* de 4 h 00 et une phase *Alexandrium* de 2 h 00.

Les concentrations en toxines augmentent au cours du temps, mais une seule huître = H3C, atteint le seuil de salubrité (80 µg eq STX / 100 g) le dernier jour. Les coefficients « d » identifiés sur cette semaine sont pratiquement tous nuls.

Dans un autre exemple (fig. 16) la majorité des huîtres dépassent le seuil de salubrité dès le deuxième jour. Les comportements sur cette semaine sont plus groupés et les évolutions linéaires sont nettement visibles.

Dans un troisième exemple (fig. 17), les variations des comportements individuels sont marquées. La toxicité des huîtres varie de 10,3 µg eq. STX/100 g de chair pour H3C à 536,6 µg eq STX/100 g pour H2B. Ces valeurs sont cependant sous-estimées par la relation les toxicités mesurées étant, en effet, de : 58 µg eq. STX pour H3C et 629 µg eq. STX pour H2B.

Sur ce graphique, il est possible d'identifier un coefficient de décontamination pour certaines évolutions. Par exemple pour H1C : $d = 0.085$.

Cependant, la majorité des cinétiques présentent un coefficient de décontamination nul.

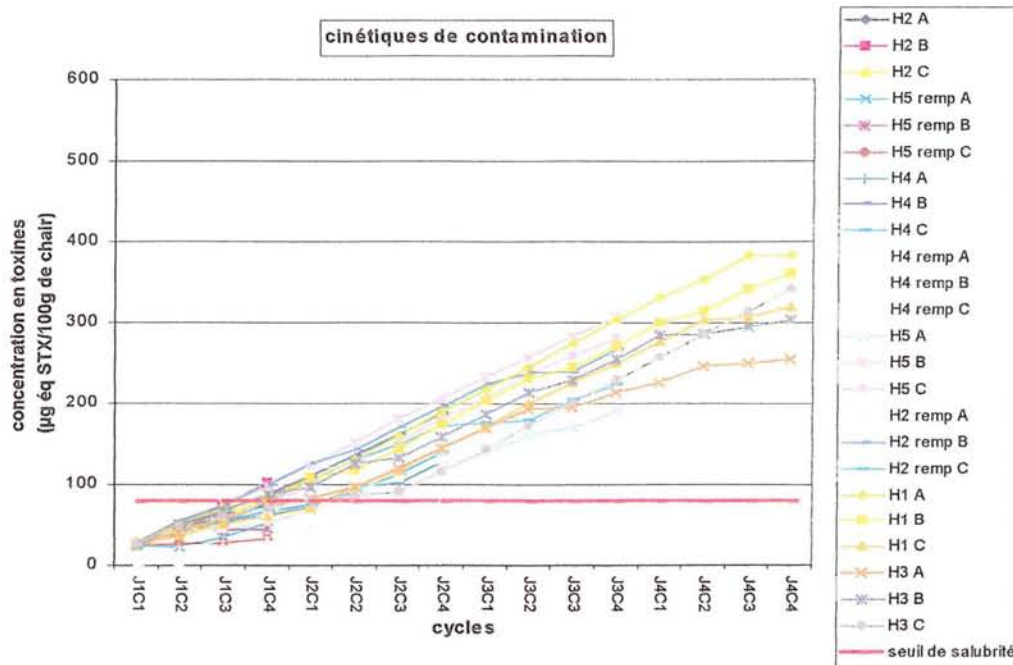


Figure 16 : Cinétiques de contamination en semaine 2 d'avril 2002 (*A. minutum* = 5000 cellules / ml et *S. costatum* = 20 000 cellules / ml).

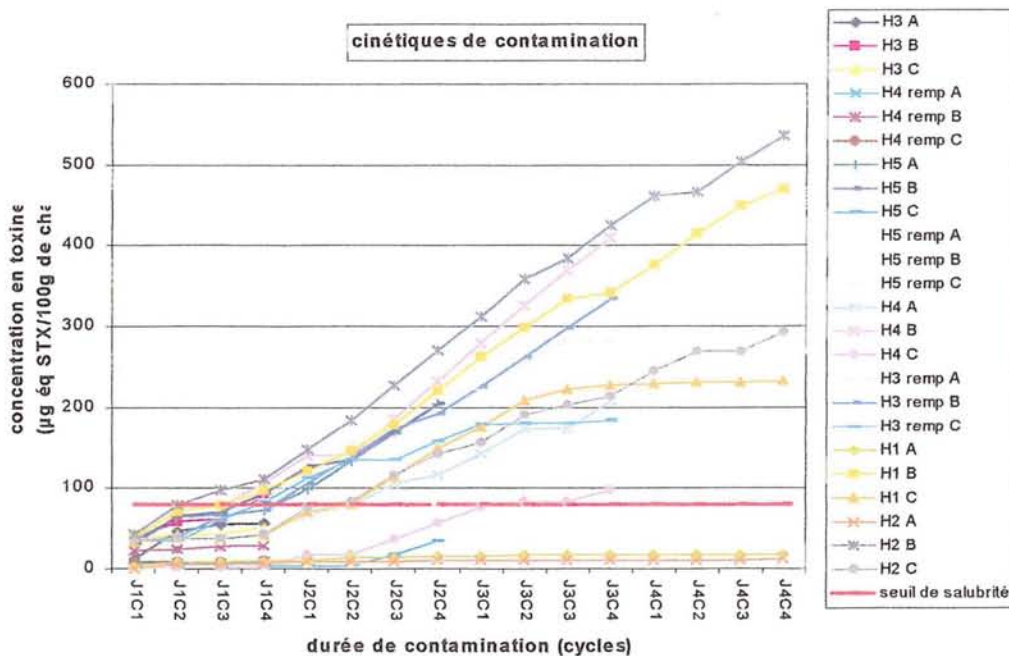


Figure 17 : Cinétiques de contamination en semaine 2 d'octobre 2002 (*A. minutum* = 5000 Cellules / ml et *S. costatum* = 20 000 cellules / ml).

Les évolutions obtenues ainsi que l'absence quasi générale de décontamination sur les quatre jours d'expérience peuvent paraître surprenantes si :

- on part du principe qu'une partie des aliments ingérés est évacuée au cours du temps,
- on s'appuie sur des analyses menées sur les processus de décontamination des huîtres, qui avaient permis d'identifier un coefficient de décontamination lors des études précédentes.

Afin d'essayer de comprendre ce phénomène et de l'expliquer, plusieurs hypothèses ont été émises :

◆ Retard dans l'élimination des toxines

Des simulations ont été lancées sous Matlab Simulink afin d'observer l'influence d'un retard sur le processus de décontamination. Le modèle prédictif à un compartiment a été utilisé en fixant le coefficient de décontamination à 0.2 soit une valeur proche de ce qui avait déterminé au cours des études ultérieures. L'ingestion a été considérée proportionnelle aux concentrations en algues toxiques présentes dans le milieu et le coefficient k_1 a été considéré égal à 0.05 dans le but d'obtenir au final une concentration en toxines similaire à celle observée en semaine 2 d'avril 2002. En entrée, la concentration cellulaire a été fixée à 5 000 cellules / ml d'*Alexandrium minutum* avec des résiduels en phase « *Skeletonema* » atteignant 600 cellules / ml.

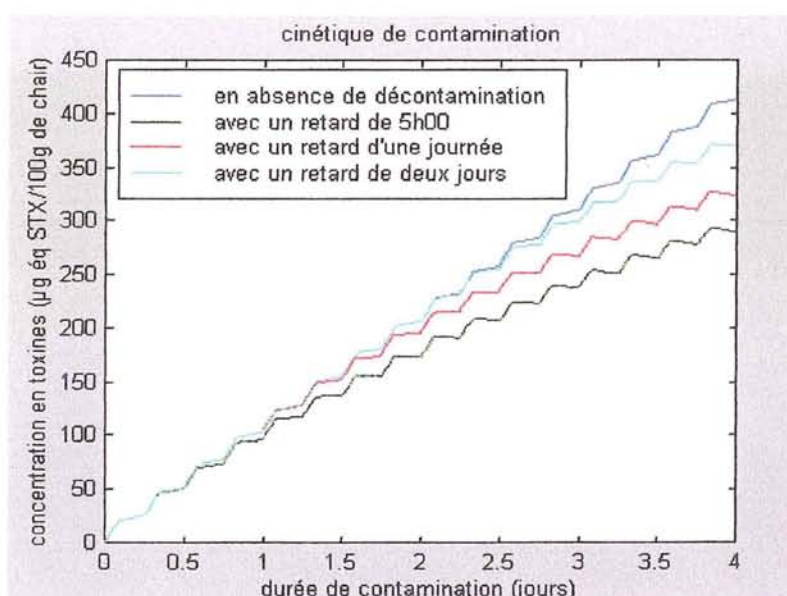


Figure 18 : Cinétiques de contamination obtenues avec un modèle à un compartiment.

D'après ces résultats (fig. 18), un retard de deux jours ou plus dans le processus de décontamination pourrait expliquer les formes d'évolutions obtenues en utilisant les relations TOX / FTA. Cependant des études (Laabir et Gentien, 1999) ont montré que chez l'huître, les aliments sont évacués par voie naturelle dans les cinq heures qui suivent leur ingestion. Ces quelques heures nécessaires à l'élimination d'une partie des toxines ne suffisent pas à se caler, avec un modèle à un compartiment, sur les données déduites de la relation TOX / FTA.

◆ Importance de la répartition des toxines dans les différents organes

La littérature propose l'utilisation de modèles à deux compartiments dans le cas de la contamination / décontamination PSP de la moule. Le type de comportement susceptible d'être observé à partir de tels modèles a été recherché afin de voir si des correspondances pouvaient être obtenues par rapport aux données expérimentales. Les coefficients utilisés pour ces simulations ont été ajustés de façon empirique en raison du manque de données pour réaliser un tel ajustement paramétrique (fig. 19).

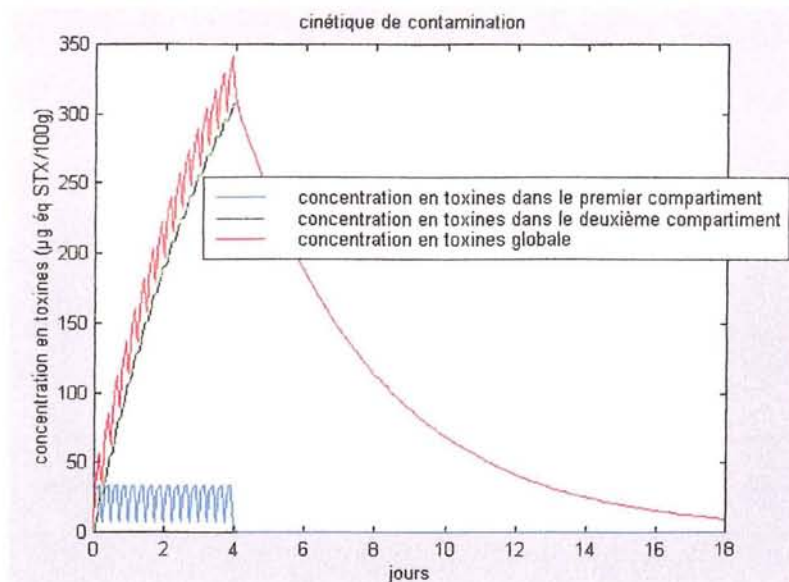


Figure 19 : Cinétique de contamination / décontamination pour un modèle à deux compartiments
 Coefficient de décontamination du premier compartiment : $d_1 = 24$
 Coefficient de décontamination du deuxième compartiment : $d_2 = 0.2$
 Coefficient de transfert entre les deux compartiments : $k_{12} = 0.25$
 Coefficient de proportionnalité entre le taux d'ingestion et la concentration en algues toxiques dans l'huître : $k_1 = 0.2$
 La concentration en algues toxiques a été fixée à 5000 cellules / ml + 600 cellules / ml en phase résiduelle.

On peut remarquer que malgré l'importance donnée au compartiment ayant une décontamination lente, la cinétique globale présente toujours un début de courbure.

◆ Importance du milieu

Les expériences réalisées en 2001 et 2002, étaient caractérisées par des régimes alimentaires alternés toxique/non toxique. Si l'on tient compte des résiduels, les huîtres se sont trouvées en contact permanent avec *A. minutum*. Dans de telles conditions, on peut faire l'hypothèse que le processus de décontamination est sans doute plus complexe que ce qui avait été envisagé.

◆ Validité de la relation FTA / TOX

Si les équations établies dans le cadre de cette étude présentent des coefficients de corrélation élevés, il faut tout de même remarquer que ces dernières ont été déterminées en ignorant certains individus de l'analyse. Cette démarche a pu favoriser l'obtention de R^2 plus important mais a sans doute biaisé le résultat final. Il semble, également, que le caractère significatif du paramètre FTA_{alex} soit discutable pour certains modèles.

Compte tenu des variabilités individuelles du FTA, il peut donc s'avérer délicat d'établir une relation TOX / FTA, caractéristique d'une semaine expérimentale, et de l'exploiter pour retracer des cinétiques individuelles.

Au vu de ces constatations, il a été décidé d'exploiter un autre type de données qui pourrait donner de nouvelles informations.

4.5. Exploitation du Qtox

Le Qtox (quantité de toxines prélevée dans le milieu par le coquillage, par unité de temps) est une donnée quantitative qui pourrait fournir des informations plus précises que le FTA en ce qui concerne les comportements alimentaires et les modes d'ingestion en toxines des huîtres.

Les fluorimètres placés en sortie des stands expérimentaux détectent en continu la chlorophylle a dans le milieu. Ils sont ainsi sensibles à la concentration en biomasse algale.

Les deux populations phytoplanctoniques étant présentes simultanément dans le circuit, pour cause de résiduels d'*Alexandrium* en phase *Skeletonema*, ces signaux dépendent à la fois de l'espèce toxique et de l'espèce non toxique.

A partir des données expérimentales (comptages cellulaires et mesures de fluorescence), une relation de type linéaire et passant par zéro a pu être établie entre fluorescence et concentrations cellulaires.

Forme de la relation : $FLUO = a \cdot Conc_Alex + b \cdot Conc_Ske$

Où FLUO représente la fluorescence en volts, Conc_Alex et Conc_Ske respectivement les concentrations cellulaires en *A.minutum* et *S.costatum* en cellules / ml et a et b les coefficients de pondération affectés par le logiciel STATGRAPHICS plus.

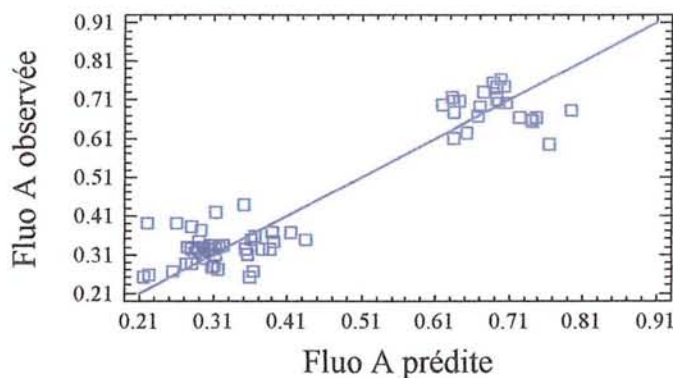


Figure 20 : Corrélation obtenue par régressions linéaires multiples entre concentrations cellulaires et fluorescence pour la semaine 2 d'octobre 2002, (*A. minutum* = 5 000 cellules / ml et *S. costatum* = 20 000 cellules / ml)

équation associée : $FLUO A = 0.000162578 \cdot Conc_Alex + 0.0000180582 \cdot Conc_Ske$
 $R^2 = 98,34 \%$. Avec Fluo A exprimée en volts, Conc_Alex et Conc_Ske en cellules/ml.

Pour chaque semaine expérimentale et pour chaque fluorimètre une relation a été établie (fig. 20 pour le stand A). Les coefficients de corrélation obtenus se sont tous révélés supérieurs à 90 % excepté pour l'appareil du stand C. Des problèmes étant survenus sur ce stand au cours des expériences, l'obtention de R^2 moins élevée n'est pas anormale.

- ♦ L'exploitation de ces relations permet d'estimer les biomasses algales présentes dans le milieu. A partir de ces dernières, on peut également évaluer les concentrations en microalgues consommées par les bivalves.

Soit :

Fluo .témoin = a. Conc_Alex.entrée + b.Conc_Ske.entrée

Fluo.en sortie d'une huître = a. Conc_Alex.sortie + b.Conc_Ske.sortie

Delta.fluo = Fluo.témoin - Fluo.sortie = a.Conc_Alex.conso + b.Conc_Ske.conso

A. minutum consommées en cycle « *Alexandrium* » :

Il faut faire l'hypothèse de négliger la part résiduelle en *Skeletonema*. Le delta.fluo correspond alors uniquement à une variation de la concentration en *Alexandrium*.

$$\text{Conc_Alex.conso} = \frac{\text{Delta.fluo}}{a}$$

A. minutum consommées en cycle *Skeletonema* :

Il faut fixer la valeur résiduelle en *Alexandrium* à partir des données de comptages cellulaires et exprimer ensuite cette part algale en fonction de la concentration en *Skeletonema*.

Soit

$$\text{beta} = \frac{\text{Conc_Alex.résiduelle}}{\text{Conc_Ske}}$$

Nous obtenons alors, sous l'hypothèse que l'huître ne sélectionne pas son alimentation :

$$\text{Conc_Alex.conso} = \frac{\text{Delta.fluo}}{(a + b/\text{beta})}$$

Après avoir obtenu la concentration d'*A. minutum* consommé, il suffit de multiplier cette valeur par le coefficient de toxicité moyen du phytoplancton (en µg éq. STX /cellules) puis par le débit à l'instant donné et de ramener enfin ce nombre en jour et pour 100 g de chair d'huître pour obtenir le Qtox en µg éq. STX/100 g / j.

Les quantités de toxines prélevées dans le milieu par coquillages et par unité de temps pour la semaine 2 d'octobre 2002 (régime alimentaire à 5000 cellules / ml d'*A. minutum* et 20 000 cellules / ml de *S. costatum*) ont été calculées de cette façon.

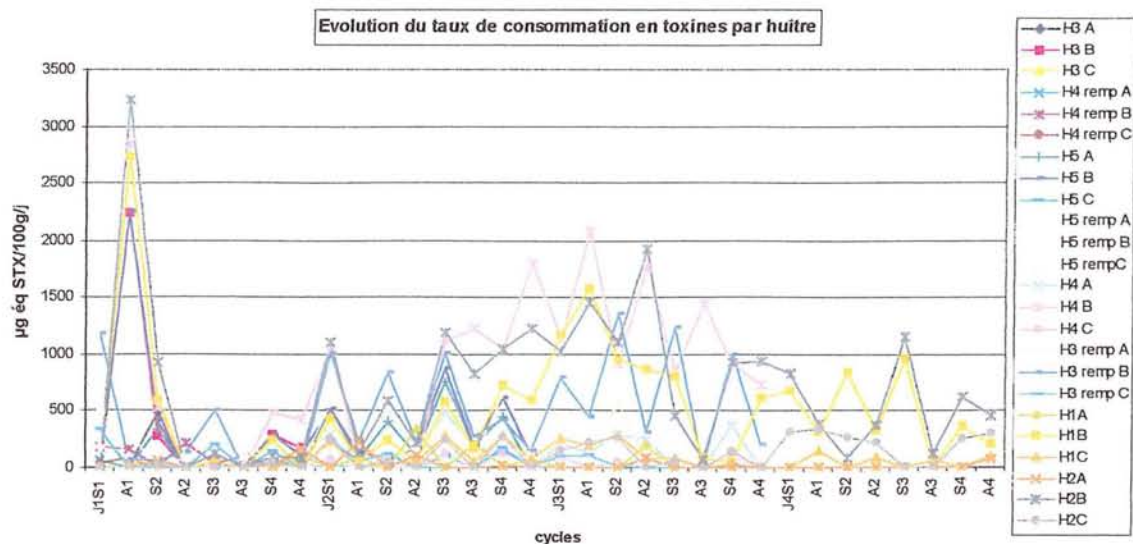


Figure 21 : Evolution du Qtox au cours du temps : pour chaque huître, les taux de consommation correspondent à des moyennes sur les cycles *Alexandrium* et *Skeletonema*.
 J1S1 : Jour 1 de contamination, cycle *Skeletonema* 1 ; A1 : cycle *Alexandrium* 1.

Il semble que la quantité de toxines prélevée par unité de temps dans le milieu ne soit pas constante par rapport au temps (fig. 21) et qu'il existe des variabilités importantes entre individus et entre cycles.

Les valeurs élevées de Qtox le premier jour correspondent au premier cycle *A. minutum* et à cinq huîtres du stand B. Malgré des Qtox élevés, ces individus ont des FTA compris seulement entre 15,7 et 52,6 %. D'autre part, il apparaît que pour deux valeurs de FTA similaires, les quantités de toxines prélevées dans le milieu peuvent être différentes. Ces observations mettent en évidence l'importance de traiter des données plus quantitatives que le FTA pour comprendre les comportements alimentaires et les processus de contamination des bivalves.

Les évolutions moyennes du Qtox confirment qu'il est globalement plus important en cycle *Skeletonema* qu'en cycle *Alexandrium* (fig. 22).

Ces résultats indiquent ainsi que les huîtres prélèveraient en moyenne dans le milieu plus de toxines au moment où les cellules d'*A. minutum* deviendraient minoritaires et seraient en concurrence avec une espèce non toxique.

Les huîtres sont capables de trier leur nourriture. En présence d'une concentration élevée d'*A. minutum* (10 000 cellules / ml), des analyses antérieures ont mis en évidence un début d'inhibition de la filtration. Ce phénomène pourrait commencer à se produire à partir de 5 000 cellules / ml. En cycle *A. minutum* les huîtres pourraient ainsi limiter leur consommation en nourriture, préférant s'alimenter en cycles *Skeletonema*. Des essais pratiqués en laboratoire (Lassus *et al.*, 1996) indiquent que l'huître creuse peut ingérer *A. tamarense* toxique si ce dinoflagellé est mélangé avec des micro algues non toxiques.

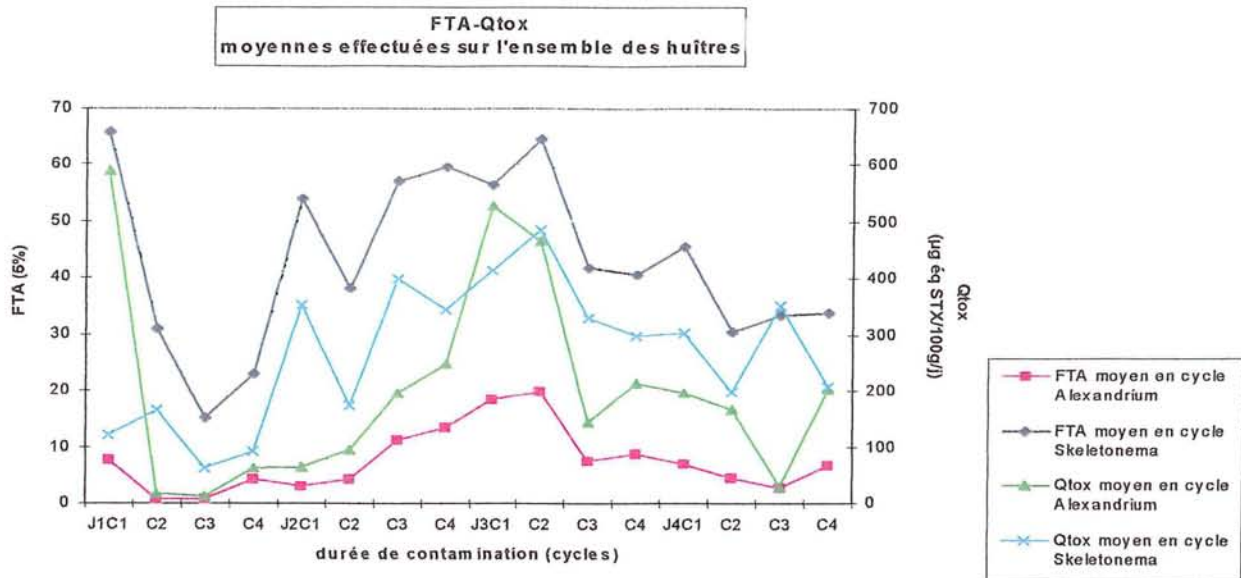


Figure 22 : Evolutions moyennes des FTA et des taux de consommation en toxines sur 4 jours.

Des simulations ont été lancées en utilisant un modèle à un compartiment. Les quantités de toxines prélevées dans le milieu par unité de temps ont été prises comme entrée du système. Il a été ainsi supposé que l'ensemble des toxines prélevées dans l'eau par l'huître était ingéré.

L'objectif de cette analyse était de pouvoir observer, pour chaque coquillage, des cinétiques de contamination et d'identifier des coefficients de décontamination en ajustant la valeur finale du tracé sur la toxicité mesurée (fig. 23).

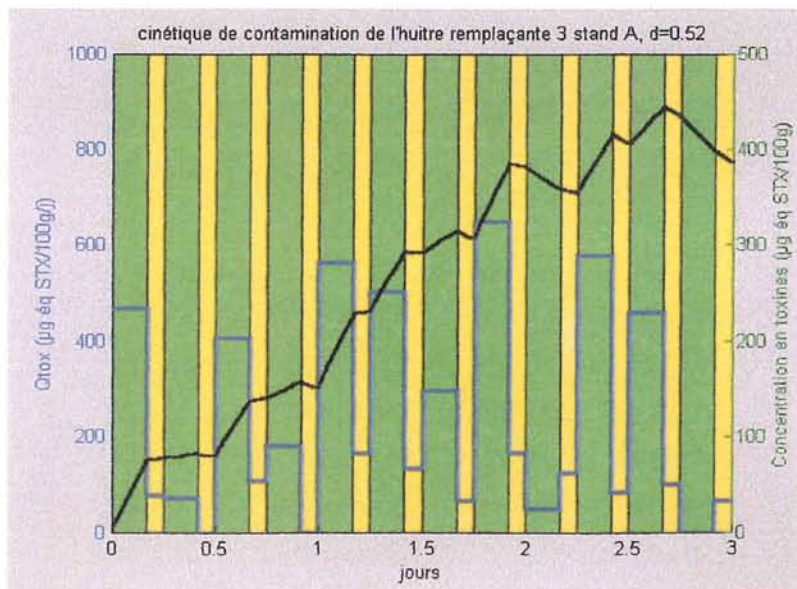


Figure 23 : Cinétique de contamination d'une huître prélevée le troisième jour d'expérience. Les bandes jaunes marquent les cycles *Alexandrium* (2 h 00), les vertes correspondent aux cycles *Skeletonema*. Le tracé noir représente l'évolution de la concentration en toxines dans l'huître, le bleu, l'ingestion en micro algues toxiques.

Contrairement aux résultats obtenus à partir de la relation TOX / FTA, des coefficients de décontamination positifs et non nuls ont pu être identifiés pour la plupart des huîtres (seul cinq individus ne sont pas concernés). Ces derniers varient de 0.15 à 3.5.

L'application du modèle illustré par la figure 23 à plusieurs individus montre que « l'ingestion » et la toxicité n'évoluent pas de manière constante au cours du temps : pour quatorze huîtres la valeur maximale de toxines ingérées correspond à un cycle *Skeletonema*. La majorité d'entre elles prélèvent des toxines dans le milieu durant ces périodes non toxiques. Sur de nombreuses cinétiques, il apparaît également que les bivalves se contaminent au cours des phases *Skeletonema* et qu'elles ont tendance à se décontaminer en cycles *Alexandrium*.

Malgré des différences importantes, certaines huîtres semblent, pourtant, suivre le même processus de contamination. C'est le cas notamment pour les bivalves H1 et H2 du stand B prélevés le quatrième jour (fig. 24). Bien que leur toxicité finale soit différente et que la concentration en toxines dans l'huître 1 soit en général plus basse que celle de l'huître 2, les formes des deux cinétiques de contamination sont assez proches.

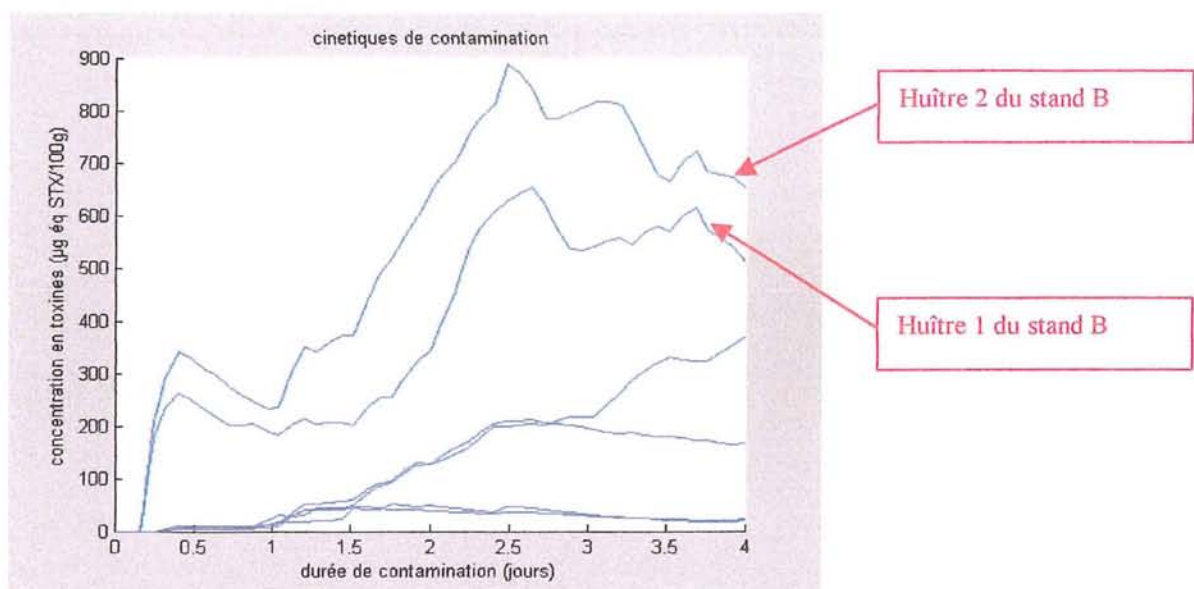


Figure 24 : Cinétiques de contamination des huîtres prélevées le dernier jour d'expérimentation.

L'ensemble des résultats obtenus par l'exploitation du Qtox soulève donc un point important et peu considéré jusqu'alors, à savoir l'importance des résidus *A. minutum* en cycle non toxique dans le processus de contamination. Il semblerait, en effet, que ces quantités aient une influence non négligeable sur la toxicité finale de l'huître.

5. Discussion et perspectives

Les observations sur 24 H réalisées en estuaire de Penzé ont permis de vérifier que les huîtres situées dans la partie externe de l'estuaire pouvaient être au contact d'une eau rouge (résultats de 2001) ou d'un bloom (campagne 2002) à dinoflagellés de petite taille parmi lesquels l'espèce toxique *A. minutum* peut être dominante, et ceci pendant un maximum de deux heures. Le maximum de dinoflagellés susceptibles de produire une eau rouge est détecté généralement à BM+1 c'est-à-dire en tout début de flot. Il semble cependant qu'il y ait une dispersion de l'eau rouge lorsque, après concentration en amont de la rivière à PM, le courant de marée descendante ramène les cellules vers l'aval.

Un système expérimental permettant de simuler des phases de contact alternées entre phytoplancton toxique et non toxique a été développé et utilisé lors des expérimentations de 2001 et 2002 pour évaluer l'impact respectif de différentes caractéristiques du système. Les résultats 2001 montrent que des concentrations plus basses que celles provoquant une eau rouge (200 cellules / mL d'*A. minutum*) peuvent entraîner une contamination des bivalves supérieure au seuil sanitaire en seulement quatre jours s'il n'y a pas d'autre source alimentaire. Avec un régime mixte comprenant une concentration de phytoplancton non toxique comparable à ce qui est observable en Penzé entre les périodes d'eau rouge un processus de détoxification semble prendre l'avantage et réduit le niveau de toxicité finale.

Il semble également que des concentrations très élevées (10 000 cellules / mL) d'*A. minutum* pourraient avoir un effet inhibiteur sur la production de biodépôts (et donc sur la consommation) et par extension sur la bioaccumulation. Cette hypothèse avait déjà été faite par Vila *et al.* (2001) en Méditerranée au cours d'observations de contamination PSP de moules par *A. catenella*. Elle paraît corroborée par le rôle limitant de la concentration cellulaire dans le modèle 5 (régressions multiples intégrant concentrations en *A. minutum* et matières minérales ajoutées).

De même la quantité de matière minérale ajoutée pourrait avoir à la fois un rôle de stimulation ou de limitation de la bioaccumulation de toxines. En revanche, la salinité, (expériences de 2002) très variable dans un estuaire à marée, ne semble pas jouer un rôle quelconque dans le processus de contamination des coquillages.

Il faut cependant rester prudent quant à l'interprétation des coefficients pondérant chaque variable, ces résultats ayant été obtenus en faisant l'hypothèse d'une alimentation moyenne et continue en *Alexandrium minutum*, ce qui n'était pas le cas lors des expérimentations et ce qui ne se présente que très rarement en milieu naturel.

L'approche modélisatrice apporte quelques éléments nouveaux concernant la contamination des *Crassostrea gigas* par l'espèce *A. minutum* et le rôle des différents facteurs du milieu sur ce processus.

Dans un premier temps, les analyses statistiques des données ont permis de confirmer l'influence de certains paramètres testés en expérimentation sur la bioaccumulation comme le rôle des concentrations cellulaires élevées et des MMA.

Pour ce qui est de l'utilisation du FTA comme paramètre de suivi de toxicité, une corrélation a pu être établie entre cette grandeur et le taux de bioaccumulation journalier (TOX). L'exploitation de la relation FTA / TOX a cependant donné des résultats qui restent encore à confirmer, en particulier en précisant l'impact réel de « détoxification » lié au régime non toxique alterné.

Par la suite, l'utilisation de données plus quantitatives a permis d'obtenir de nouvelles informations. Ainsi, les résultats obtenus concernant la quantité de toxines prélevées dans le milieu par l'huître et par unité de temps (Q_{tox}) supposent que l'ingestion en toxines est plus complexe que ce qui était envisagé. Cette analyse suggère, par exemple, l'importance de la part résiduelle en *Alexandrium minutum* au cours des cycles *Skeletonema* dans la contamination des bivalves. Une seule semaine ayant pu être traitée pour le moment, cette tendance sera à vérifier sur d'autres semaines d'expérimentation.

La toxicité des coquillages semble ainsi influencée par de nombreux facteurs. Si la concentration d'*A. minutum* dans le milieu est importante, la présence de matières en suspension et d'espèces algales non toxiques ainsi que leurs abondances relatives paraissent également avoir un impact sur l'accumulation des toxines et ne doivent donc pas être négligées.

6. Bibliographie

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

Bougrier S., Lassus P., Bardouil M., Masselin P., Truquet P., 2002. PSP toxin uptake yields and feeding time activity in the Pacific oyster and king scallop: submitted to Aquatic Living Resources, and Molluscan Shellfish Safety Int.Conf., Santiago de Compostella, Spain : Abstract book.

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.

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., Amzil Z., Bardouil M., Baron R., Bohec M., Bougrier S., Garen P., Laabir M., Leguay D., Masselin P., Truquet P., Séchet V., Bablon C., Bérard J.B., Carré C., Cheignon V., Lecamp S., Mabit M., 2002 a. Modélisation de la contamination des bivalves par les toxines d'*Alexandrium* spp. Rapport final PNEC ART3, 2001-2002, 39 p.

Lassus P., Bardouil M., Beliaeff B., Bougrier S., Gubbins M., Masselin P., Mornet F., Thébaud O., Truquet P. *et al*, 2002 b. Coquillages contaminés par des phycotoxines paralysantes : vers une procédure de détoxification. Bilans et Perspectives Ifremer, Editions Ifremer, 46 p.

- 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., 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 Res.*, 18(1), 211-216.
- 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 Publish. : 409-412.
- 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 rivières de MoraliX et de la Penzé en 1994. Rapport interne IFREMER, DEL/96-04/Nantes, 27 pp.
- 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.
- Oshima Y, 1995. Chemical and enzymatic transformation of paralytic shellfish toxins in marine organisms. *In: Harmful Marine Algal Blooms*, Lassus P., Arzul G., Erard E., Gentien P., Marcaillou C. (Eds), Lavoisier, Paris, 475-480.
- Truquet P., Baron R., Cheignon V., Garen P., Lassus P., 2002. Suivi en continu du signal de fluorescence pour estimer l'impact d'algues toxiques sur le comportement alimentaire de l'huître creuse. *In: Actes du colloque Instrumentation et traitement du signal et des images dans les procédés agroalimentaires et biotechnologiques*, 3-4 juillet 2002, Nantes Ecole Centrale.
- 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 Publish., 8-11.
- 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.