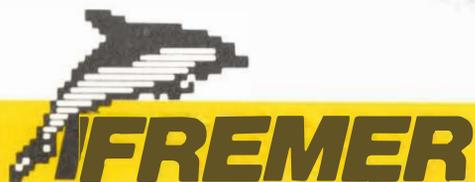


**DIRECTION DES RECHERCHES OCEANIQUES**

**ECOPHYSIOLOGIE DE COQUILLAGES CONTAMINES PAR DES  
MICROALGUES TOXIQUES : PREMIERS ESSAIS**

**Véronique ROHMER**



**DRO-91-05-MR**

IFREMER  
 Centre de Nantes  
 B. P. n° 1049  
 44037 NANTES CEDEX 01

DIRECTION DES RECHERCHES OCEANIQUES  
 Département "Milieu et Ressources"

AUTEUR (S) : <b>Véronique ROHMER</b>	CODE : N° <u>DR0-91-05-MR</u>
TITRE <b>ECOPHYSIOLOGIE DE COQUILLAGES CONTAMINES PAR DES MICROALGUES TOXIQUES : PREMIERS ESSAIS</b>	date : octobre 1991 tirage nb : 20 Nb pages : 23 Nb figures : Nb photos :
CONTRAT Convention de stage IFREMER (intitulé) Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes N° _____	DIFFUSION libre <input checked="" type="checkbox"/> restreinte <input type="checkbox"/> confidentielle <input type="checkbox"/>

RÉSUMÉ

Afin d'évaluer les effets d'une contamination expérimentale par des microalgues toxiques sur la filtration, des bivalves (*Pecten maximus*, *Crassostrea gigas* et *Mytilus edulis*) ont été alimentés pendant quelques heures avec différents régimes : des cultures très toxiques (*Alexandrium tamarense*, souche japonaise), moyennement toxique (*A. minutum*, souche française) et non toxique (*A. tamarense*, souche anglaise) de dinoflagellés, et une culture non toxique témoin d'une chlorophycée : *Tetraselmis suecica*. Les différents essais réalisés montrent que l'utilisation de rouge neutre ne permet pas de comparer les activités valvaires dans les conditions expérimentales. L'enregistrement direct de l'activité valvaire est intéressant mais difficilement reproductible dans la mesure où il est perturbé par l'émission de pseudo fécès qui contiennent un grand nombre d'*Alexandrium* non digérés ; de plus, les coquillages paraissent plus sensibles à la taille des particules qu'à leur toxicité. Ce dernier résultat se confirme avec la mesure de la consommation du phytoplancton par dénombrement cellulaire au Coulter Counter : la chlorophycée est consommée immédiatement, à la différence des dinoflagellés, et parmi les 3 souches d'*Alexandrium*, *A. minutum*, est consommée plus rapidement par les moules que *A. tamarense*. Ces essais préliminaires montrent donc l'intérêt de suivre directement la consommation phytoplanctonique et la production de fécès et pseudo-fécès, en présence de microalgues toxiques, mais en éliminant si possible les variations comportementales liées à la taille des particules.

mots-clés : *Pecten maximus*, *Mytilus edulis*, *Crassostrea gigas*, écophysiologie, microalgues toxiques, Paralytic Shellfish Poison.

key words :

## ABSTRACT

In order to assess the effects of experimental contamination by toxic microalgae on bivalve filtration rates, some edible shellfish (*Pecten maximus*, *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis*) have been fed during a few hours with different algal diets : highly toxic cultures of *Alexandrium tamarense* (japanese strain), moderately toxic *A. minutum* culture (french strain), non toxic *A. tamarense* (english strain), and a non toxic culture of chlorophyceae : *Tetraselmis suecica*, used as a control. From several assays it appears that neutral red stain is not suitable for comparison of shell-valve activities in laboratory conditions. Direct recording of shell-valve activity is interesting but weakly reproducible, mainly because of pseudo-feces production. These pseudo-feces are filled with non digested *Alexandrium* cysts. Moreover, experimented shellfishes seem more sensitive to cell size rather than to cell toxicity. These last results are corroborated by the measurement of phytoplankton consumption through cell counts by Coulter-Counter : shellfish feed immediately on the chlorophyceae but not on dinoflagellates, and - for mussels - more on *A. minutum* than on *A. tamarense*.

This preliminary work demonstrates how feeding rates and feces/pseudo-feces production are necessary data to study the effects of toxic microalgae on feeding behavior ; this kind of work, nevertheless, need to discard interference between particule size and toxicity criteria in the evaluation of feeding rate variations.

## SOMMAIRE

I - PRESENTATION DE L'ETUDE .....	2
II - GENERALITES SUR LE PSP (Paralytic Shellfish Poison) .....	3
III - NUTRITION DES BIVALVES .....	4
IV - ETUDE EXPERIMENTALE .....	5
1. Méthodes .....	5
2. Résultats .....	7
2.1 Rouge neutre .....	7
2.2 Mesure d'activité valvaire .....	9
2.2.1 Coquilles Saint-Jacques .....	13
2.2.2 Huîtres .....	15
2.2.3 Moules .....	17
2.3 Dénombrement des particules en suspension .....	17
2.3.1 Coquilles Saint-Jacques .....	17
2.3.2 Huîtres et moules .....	20
V - DISCUSSION ET CONCLUSIONS .....	20
VI - BIBLIOGRAGHIE .....	22

# ECOPHYSIOLOGIE DE COQUILLAGES CONTAMINES PAR DES MICROALGUES TOXIQUES : PREMIERS ESSAIS

*Véronique ROHMER*

## I - PRESENTATION DE L'ETUDE

Les mers et les océans qui recouvrent les deux tiers de notre planète représentent des ressources économiques importantes pour la plupart des pays du monde. L'exploitation de la mer peut constituer l'essentiel de la production alimentaire dans certains pays en voie de développement tandis qu'elle devient un secteur économique de pointe dans de nombreux pays industrialisés.

Malheureusement, un certain nombre d'obstacles s'oppose trop souvent à l'utilisation des produits marins. En effet, des substances toxiques contenues dans l'eau peuvent être à l'origine d'une dégradation voire d'une destruction de la flore ou de la faune marines mais aussi sont susceptibles de s'accumuler dans les organes d'animaux marins. Ces animaux peuvent alors provoquer de graves intoxications alimentaires chez leurs consommateurs : d'autres animaux ou l'homme. Ces contaminants peuvent provenir de pollutions industrielles (hydrocarbures, pesticides, métaux lourds) mais dans certains cas, ils sont directement synthétisés par des organismes marins : les biotoxines.

Durant la période estivale (de mai à octobre), des conditions favorables au développement d'algues marines unicellulaires (dinoflagellés) peuvent être réunies : ces microalgues prolifèrent alors en masse, pouvant provoquer la coloration de l'eau d'où les termes de "marées rouges" ou "eaux colorées". Lors d'efflorescences d'algues toxiques, des mollusques bivalves filtreurs tels que coquilles Saint-Jacques, moules, huîtres ou palourdes ingèrent un grand nombre de dinoflagellés et accumulent ainsi une quantité plus ou moins importante de toxines.

Notre étude a pour but de considérer le premier niveau de la contamination des bivalves filtreurs, c'est-à-dire les modifications de comportement alimentaire enregistrées dans les premières heures qui suivent l'introduction de microalgues toxiques dans le milieu d'élevage du coquillage étudié. Il est en effet primordial, avant de quantifier l'accumulation sélective des phycotoxines par organe, de savoir si les différentes espèces de bivalves comestibles opèrent ou non une sélection des particules alimentaires sur d'autres critères que la taille ou la valeur nutritive (en l'occurrence, ici, la production de toxines) et si cette sélection varie en fonction des conditions expérimentales. Dans cette optique, plusieurs essais ont été entrepris afin de rechercher la méthode la plus appropriée pour le contrôle de la filtration en présence d'algues toxiques et non toxiques. Les espèces microalgales choisies sont principalement des producteurs de PSP (\*), donc - à priori - susceptibles d'entraîner rapidement une réaction de défense des bivalves du fait de la virulence des toxines synthétisées. Dans la mesure du possible, les résultats ont été comparés à ceux obtenus avec des espèces identiques mais non toxiques (interférence avec la taille des cellules), ainsi qu'avec des souches moins virulentes ou tout à fait inoffensives (algues fourrages utilisées en aquaculture), ces dernières servant alors de "témoins de consommation".

---

(\*) PSP : Paralytic Shellfish Poison

## II - GENERALITES SUR LE PSP (Paralytic Shellfish Poison)

Les toxines paralysantes sont produites par des dinoflagellés du genre *Alexandrium*. Plusieurs espèces toxiques sont connues : *A. tamarense*, *A. minutum*, *A. catenella*, *A. excavata*, *A. cohorticula*,... Elles peuvent produire jusqu'à douze toxines différentes, en quantité variable en fonction de paramètres environnementaux, mais dont la composition reste inchangée pour chaque espèce (elle semble être d'origine génétique) : c'est ce qu'on appelle le profil toxinique de l'algue (GENENAH et SHIMIZU, 1981 ; SHIMIZU et YOSHIOKA, 1981).

*Alexandrium* est une algue unicellulaire flagellée pélagique de quelques micromètres de diamètre et protégée par une thèque. Son cycle biologique comprend une forme de résistance (kyste) benthique tout aussi toxique qui peut également être contaminante pour les bivalves fousseurs.

Les symptômes d'empoisonnement paralytique chez l'homme sont détectés environ 30 minutes après l'ingestion de fruits de mer toxiques et lorsque le décès survient, c'est en général après 12 heures, par paralysie respiratoire suivie d'un collapsus cardiovasculaire. Comme il n'y a pas d'antidote approprié, un traitement symptomatique est alors mis en place : lavement d'estomac ou vomitifs (apomorphine), adsorbants des toxines du tube digestif, respiration artificielle. Les effets humains sont décelables à partir d'une absorption de 1000  $\mu\text{g}$  d'équivalent STX (saxitoxine).

Ces épidémies restent rares en France bien que des efflorescences d'*Alexandrium* aient été rapportées dans de nombreuses régions du globe, autant froides que tempérées ou subtropicales. La mise en place d'importants systèmes de surveillance a considérablement réduit le nombre des intoxications (LASSUS, 1990).

La détection des toxines paralytiques se fait soit par un test normalisé A.O.A.C. (test souris) qui est le seul utilisé en routine, soit par chromatographie liquide (H.P.L.C.). Le seuil de salubrités international est fixé à 80  $\mu\text{g}$  d'équivalent STX /100 g de chair.

On dénombre à ce jour 18 toxines paralytiques qui dérivent toutes d'une même molécule de base : la saxitoxine (STX) et sont constituées par un noyau purine substitué.

Il existe plusieurs façons de classer les phycotoxines selon les laboratoires, principalement nord-américains et japonais. On trouve indifféremment dans la littérature les toxines A, B et C, ou les gonyautoxines (GTX) avec leur numéro d'ordre. Dans le cadre de cette étude, deux souches de profil toxinique différent ont été utilisées (tableau 1).

Les symptômes particuliers de l'intoxication PSP ont été décrits en France dès 1907 et 1911, sans que l'origine en soit connue. En 1976, l'Europe connut une "épidémie" d'intoxication à symptômes paralytiques provoquée par des conserves de moules provenant d'Espagne ; trente trois cas furent dénombrés en France.

Depuis, des épisodes toxiques ont été observés dans la plupart des pays européens à l'exception de la France jusqu'à l'été 1988. En effet, le 25 août, la station côtière IFREMER de Concarneau a été avertie de la présence d'une eau colorée brune en amont de l'un des abers bretons : l'Abers Wrac'h. Des prélèvements d'eau furent réalisés en vue d'analyses qui montrèrent une concentration anormalement élevée d'*Alexandrium minutum* (2,5 millions de cellules par litre d'eau de mer). Des tests biologiques effectués sur des moules et des huîtres creuses locales ont révélé que ces coquillages présentaient un taux de phycotoxines suffisamment élevé pour mettre en péril la santé des consommateurs (FREMY *et al.* 1988). En juillet 1989, *A. minutum* était présent dans l'estuaire de Morlaix puis a été identifié durant l'été dans la baie de Saint-Brieuc et au Croisic.

Toxines (%)	MOG 835	<i>Alexandrium minutum</i> (*)
C	77,2	?
GTX <sub>4</sub>	12,9	
GTX <sub>1</sub>	6,2	
GTX <sub>3</sub>	1,6	62,2
GTX <sub>2</sub>	0,7	37,7
Neo STX	1,4	
SGTX 1,4	Traces	
STX	---	Traces

Tableau 1 : Profils toxiques (en pourcentages) des 2 souches d'*Alexandrium* (\* : souche isolée par Evelyne ERARD, IFREMER Brest) utilisées au cours des essais. in : LEDOUX, 1991.

### III - NUTRITION DES BIVALVES

L'activité valvaire n'est pas seulement liée à la fonction de nutrition, mais aussi à celle de respiration. De ce fait, pour étudier l'alimentation d'un bivalve il faut également tenir compte de la quantité de pseudo-fécès non assimilées (et pas uniquement de l'activité valvaire) (BOGE, 1988 ; CHAPPUIS et LUBET, 1967 ; MOHLENBERG et RIISGARD, 1979 ; RIISGARD, 1977 ; SCHULTE, 1975).

Certaines espèces sont capables de réagir à la présence d'algues toxiques (SHUMWAY, 1989 ; SHUMWAY et CUCCI, 1987) : fermeture des valves, taux de filtration modifié, retraction du siphon (tableau 2).

D'autre part, il existe des réactions propres aux bivalves pour "fuir" ces algues toxiques : nage par claquement des valves chez *Placopecten magellanicus*, enfouissement dans le sédiment pour *Mercenaria mercenaria* (BRICELJ *et al.*, 1990).

Les variations de la consommation d'oxygène et de l'activité cardiaque seraient une conséquence des différentes réactions physiologiques plutôt qu'un effet direct de la présence des dinoflagellés, la fermeture des valves et la baisse d'activité entraînant une baisse de la consommation d'oxygène et un ralentissement cardiaque (parfois avec arythmie).

Des variations dans les réactions d'une même espèce de bivalves sont parfois observées ; il semble en effet que les coquillages soumis périodiquement aux dinoflagellés aient mis au point des mécanismes pour consommer sans risques ce phytoplancton.

De plus, certaines espèces comme *Mya arenaria* semblent pouvoir sélectionner les algues toxiques dans un mélange. En effet, lorsque *Mya arenaria* est mise en présence de différents clones (toxiques et non toxiques) d'*Alexandrium tamarense*, des cellules toxiques sont retrouvées uniquement dans les pseudo-fécès et non dans les fécès : elles n'ont donc pas été ingérées (GAINÉY et SHUMWAY, 1988).

L'activité valvaire semble donc être représentative de la nutrition, mais ceci est peut-être à considérer avec précaution car lorsque le mollusque ferme ses valves en réaction à la présence de microalgues toxiques, il ne se nourrit pas ; mais s'il ouvre ses valves cela ne veut pas dire qu'il consomme des algues.

La réaction des coquillages vis à vis de la toxicité du phytoplancton peut aussi être mise en évidence par d'autres méthodes : analyse des pseudo-fécès et fécès, comptage des microalgues présentes en suspension dans l'eau, etc...

Paramètres physiologiques	<i>Mya arenaria</i>	<i>Mytilus edulis</i>	<i>Geukensia demissa</i>	<i>Ostrea edulis</i>	<i>Placopecten magellanicus</i>	<i>Modiol. modiolus</i>	<i>Spisula solidissima</i>
taux de clearance	diminué	diminué	diminué	augmenté	--	aucun	aucun
fermeture des valves	oui	oui	oui	partielle	oui	aucun	aucun
rétraction du siphon	oui	--	oui	--	--	effet	effet
production de mucus	--	augmentée	augmentée	--	augmentée	effet	effet

Tableau 2 : Effets physiologiques provoqués par *Alexandrium tamarense* chez sept espèces de bivalves (d'après SHUMWAY et CUCCI, 1987, et BRICELJ *et al.*, 1990).

#### IV - ETUDE EXPERIMENTALE

##### 1. Méthodes

Trois espèces de mollusques bivalves (huître, moule, coquille Saint-Jacques) sont mises en présence de différentes microalgues : *Alexandrium tamarense* souche toxique, *Alexandrium tamarense* souche non toxique, *Alexandrium minutum* (toxique) et *Tetraselmis suecica* (non toxique). On étudiera successivement : 1) l'activité valvaire avec un enregistreur mécanique, 2) la filtration avec disparition du rouge neutre dans l'eau, 3) la filtration avec comptage des particules en suspension dans l'eau.

En ce qui concerne les cultures algales, les quatre souches utilisées sont les suivantes :

- *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae), souche "MOG 835" toxique, provenant du Japon. Cette algue unicellulaire est assimilable à une sphère de 25 à 48  $\mu\text{m}$  de diamètre, et produit 6 à 7 toxines associées au PSP (tableau 1) ;
- *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae), souche non toxique "Plymouth", de la même taille que la précédente ;
- *Alexandrium minutum* (Dinophyceae), toxique, provenant des côtes bretonnes (baie de Morlaix, France). Le diamètre de cette algue varie entre 17 et 29  $\mu\text{m}$ , et la culture utilisée produit 3 toxines associées au PSP (tableau 1).
- *Tetraselmis suecica* (Chlorophyceae), non toxique, de taille comprise entre 7 et 17  $\mu\text{m}$ . Cette espèce a été retenue pour son taux de croissance élevé, ce qui permet d'avoir rapidement une grande quantité d'algues pour nourrir les coquilles Saint-Jacques. *Tetraselmis* est couramment utilisé en aquaculture comme "algue fourrage" pour les bivalves.

Ces différentes espèces sont cultivées dans de l'eau de mer filtrée enrichie en milieu E.S. de Provasoli dans des ballons en pyrex de 10 litres remplis aux deux tiers et continuellement brassés par de l'air filtré sur 0,22  $\mu$ . La salle de culture est maintenue à 16°C et subit un rythme lumière/obscurité de 12h/12h.

La croissance est suivie par comptage manuel des cellules sur lame hématimétrique Nageotte et les cultures sont en général utilisées en fin de croissance exponentielle.

Pour ce qui est des mollusques, les trois espèces expérimentées se caractérisent de la façon suivante :

- les coquilles Saint-Jacques (*Pecten maximus*) proviennent des côtes de la Manche : Erquy (Côte d'Armor) ou de Port-en-Bessin (Manche). Leur taille moyenne est de 9,5 cm.
- les huîtres (*Crassostrea gigas*) proviennent de Bouin (Vendée) et elles ont une taille moyenne de 8,3 cm.
- les moules (*Mytilus edulis*) proviennent de Bouin ou de Saint-Brieuc (Côte d'Armor), avec une taille moyenne de 6,0 cm.

Les bivalves sont acclimatés en aquarium à 16° C pendant au moins une semaine avant toute manipulation. L'eau de mer est renouvelée quotidiennement. Un système identique à celui utilisé pour les cultures permet d'aérer l'eau en permanence. Les coquilles sont nourries avec une suspension de *Tetraselmis* et le rythme jour/nuit est de 12 h/12 h.

Bien que la température soit amenée progressivement de celle du prélèvement à 16° C, le stress dû aux variations thermiques et aux manipulations a provoqué occasionnellement une émission des produits génitaux chez certains coquillages, perturbant alors le déroulement des expériences par fatigue voire mort de ceux-ci.

Avant chaque série d'expériences, les coquillages sont soigneusement brossés et lavés à l'eau, et l'expérimentation se déroule dans les mêmes conditions de température et photopériode que l'acclimatation : les coquilles sont placées dans des bacs individuels de 5 litres remplis par 4 litres d'eau de mer, et aérés en continu. Ces bacs sont vidés et nettoyés tous les jours.

## 2. Résultats

### 2.1 Rouge neutre

Le principe consiste à suivre la disparition du rouge neutre dans l'eau, en estimant qu'elle est proportionnelle à la filtration des coquillages.

Le rouge neutre est un colorant biologique des cellules. Son utilisation a fait l'objet d'une étude qui a servi maintes fois de référence (COLE et HEPPER, 1954 ; HIS, 1976).

La première étape est celle de la préparation d'une solution à partir de rouge neutre en poudre. Des essais ont été réalisés directement en eau de mer filtrée : la poudre se dissout partiellement et il se forme un léger précipité. La poudre a donc été dissoute en solution à 4 % (= seuil de solubilité) dans de l'eau distillée, puis diluée en eau de mer filtrée à 4 %. ce qui représente notre solution de base.

L'expérience se déroule à 16° C. Des bacs de 5 litres contenant 4 litres d'eau de mer à 30 ‰ et 100 ml de solution à 4 ‰ sont préparés avec un système d'aération.

Le temps 0 correspond à l'installation des coquillages dans les bacs.

La disparition du rouge neutre de l'eau est suivie par mesure de la densité optique par spectrophotométrie. La longueur d'onde utilisée pour la lecture du rouge neutre est de 540 nm. Cette lecture se fait à travers une hauteur de liquide déterminée correspondant à un trajet optique de 10 mm. Nous avons utilisé des microplaques constituées de 96 puits de 400 µl. Pour obtenir le trajet optique désiré, chaque puit est rempli par 380 µl de solution à mesurer.

Trois séries expérimentales sont réalisées comme suit :

Serie A avec coquille Saint-Jacques :

bac 1 : témoin,

bac 2 : *Alexandrium tamarense* "MOG 835" : 2 000 cell/litre,

bac 3 : *Tetraselmis* : 5 000 cell/litre,

Serie B avec coquille Saint-Jacques :

bac 1 : *Alexandrium tamarense* "MOG 835" : 2 000 cell/litre,

bac 2 : *Alexandrium tamarense* "Plymouth" : 2 000 cell/litre,

bac 3 : *Tetraselmis* : 5 000 cell/litre,

Serie C avec moules.

En ce qui concerne la série A, une étude de 7 heures nous montre une disparition de rouge neutre plus rapide avec *Alexandrium* qu'avec *Tetraselmis* ce qui correspond à une filtration supérieure avec l'algue toxique. Le phénomène est confirmé par l'observation suivante : en présence d'*Alexandrium*, la coquille filtre activement en produisant une quantité très importante de pseudo-fécès. En présence de *Tetraselmis*, la coquille produit très peu de pseudo-fécès. Il semble que les *Alexandrium* soient perçus comme une agression : la coquille les élimine sous forme de pseudo-fécès (fig. 1).

Dans le bac témoin, une décoloration de l'eau a été également observée. Bien que la coquille doive filtrer pour respirer, cette réaction nous a paru surprenante par son intensité. De plus, il s'est avéré que la stabilité des solutions de rouge neutre en eau de mer n'était pas clairement établie.

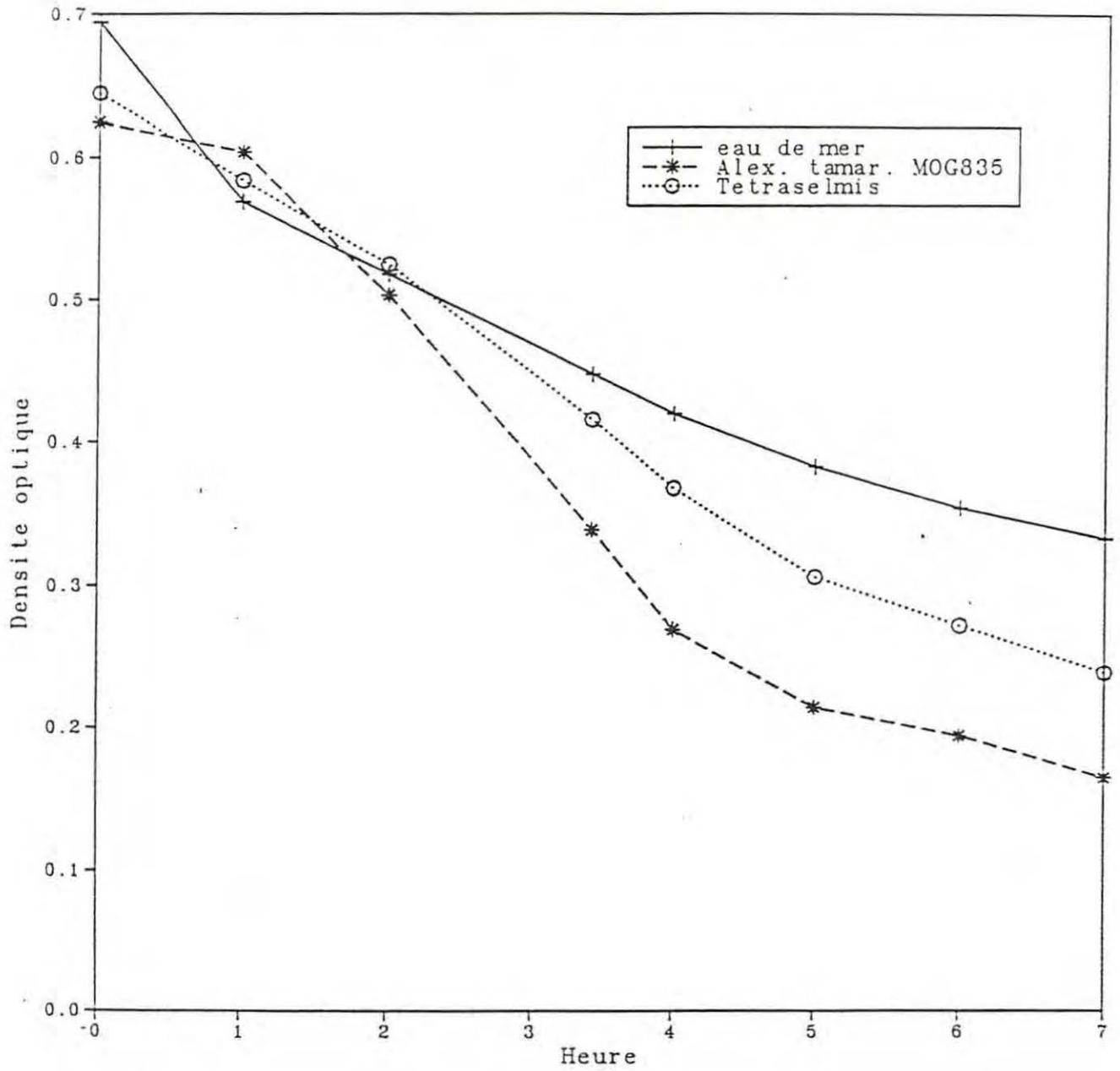


Fig. 1 : Etude de la filtration chez la coquille Saint-Jacques : disparition d'une solution de rouge neutre en présence de trois espèces microalgales toxiques et non toxiques (série A).

Des tests furent alors réalisés, (fig. 2) qui montrèrent une instabilité non pas spécialement en eau de mer mais en présence d'aération, cette dernière étant indispensable à l'oxygénation des coquillages maintenus en système statique.

En conclusion, aucun calcul d'aucune sorte (exemple : taux de filtration) n'a pu être effectué : cette méthode n'est qu'un simple moyen de comparaison entre les différents bacs.

Dans tous les bacs de la série B, on note une augmentation de coloration durant la première demi heure sans ajout de rouge neutre (fig. 3). Dans la série précédente, aucune observation de la sorte n'a été faite car les prélèvements étaient réalisés toutes les heures contre tous les quarts d'heure ici. Il s'agit sans doute d'une augmentation de l'intensité de la coloration suite à une modification du milieu par une nouvelle substance qui ne peut provenir que de la coquille elle-même. Nous n'avons pas trouvé d'explication précise à ce phénomène et il n'est pas à exclure que cette réaction de la coquille soit en relation directe avec la présence du rouge neutre, peut-être ressenti comme un agent stressant.

Avec *Alexandrium tamarense* "MOG 835" et *Tetraselmis*, on obtient les mêmes résultats que dans la première série.

La réaction provoquée par *Alexandrium tamarense* "Plymouth" est identique à celle provoquée par la souche toxique pendant les deux premières heures : filtration importante avec production d'une grande quantité de pseudo-fécès. Pendant les deux heures suivantes, la coloration de l'eau diminue moins vite : la filtration est moins importante. La coquille n'est pas sensible à la toxicité des souches. Il se peut donc que ce soit la taille des cellules qui importe dans la reconnaissance du phytoplancton.

Enfin, les moules de la série C se sont montrées beaucoup plus sensibles à la présence de rouge neutre : en 30 à 45 min, toutes (ou presque) ont émis leurs produits génitaux ce qui nous a conduit à cesser les mesures, l'eau se troublant immédiatement.

En résumé, on peut retenir que : 1) la coquille Saint-Jacques paraît à première vue plus sensible à la taille des cellules qu'à leur toxicité, 2) le rouge neutre semble être stressant pour les coquilles : et de ce fait l'affirmation précédente est à confirmer, et 3) la dégradation du rouge neutre en fonction de l'aération du milieu rend cette méthode assez peu fiable : elle ne peut être utilisée que pour comparer grossièrement des taux de filtration.

## 2.2 Mesure d'activité valvaire

L'enregistreur d'activité valvaire permet de mesurer l'amplitude d'ouverture des valves du coquillage en fonction du temps (ALZIEU, 1972 et HIS, 1976 et 1982). Cet appareil est utilisé ici pour essayer d'avoir une meilleure approche du taux de filtration.

La valve inférieure du coquillage est fixée au fond d'un aquarium avec un ciment à prise rapide. Ce moyen de collage a été retenu car le coquillage ne reste que peu de temps hors de l'eau (20 à 30 min) du fait de la prise rapide. De plus, ce ciment ne dégage aucun produit toxique pour le coquillage. Avec une colle néoprène, un anneau (fine tranche d'un tuyau en caoutchouc de 1 cm de diamètre) est fixé sur la valve supérieure. Un fil souple, fin et inextensible relie l'anneau à un stylet inscripteur dont le rappel est effectué par un système de contrepoids (fig. 4).

Le choix du contre-poids est difficile : il faut qu'il soit assez lourd pour faire monter le stylet lorsque le coquillage s'ouvre mais trop lourd, il gêne le coquillage au point de parfois imposer l'ouverture ou interdire la fermeture des valves.

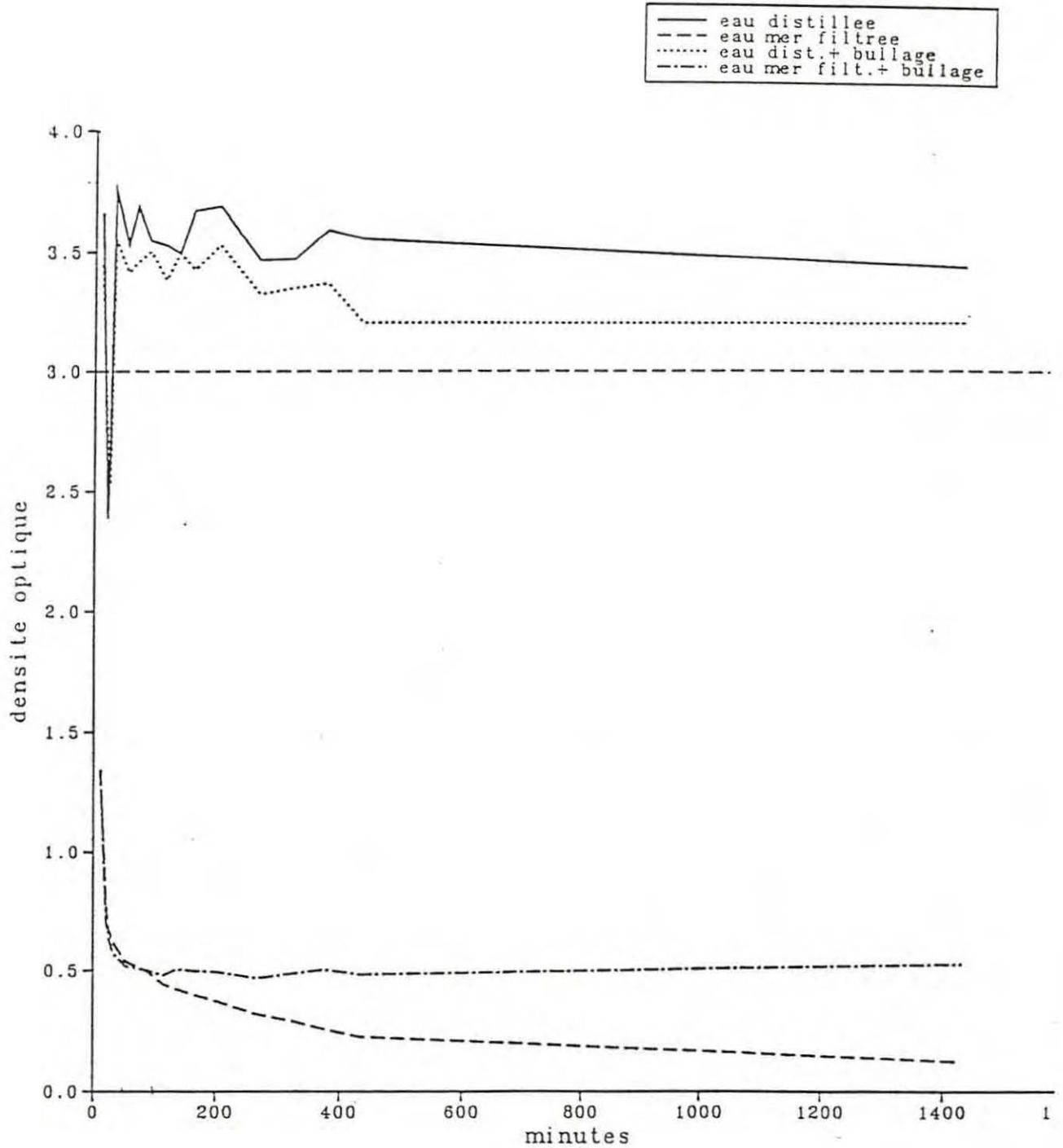


Fig. 2 : Stabilité des solutions de rouge neutre en fonction du milieu (eau distillée/eau de mer) et de l'aération.

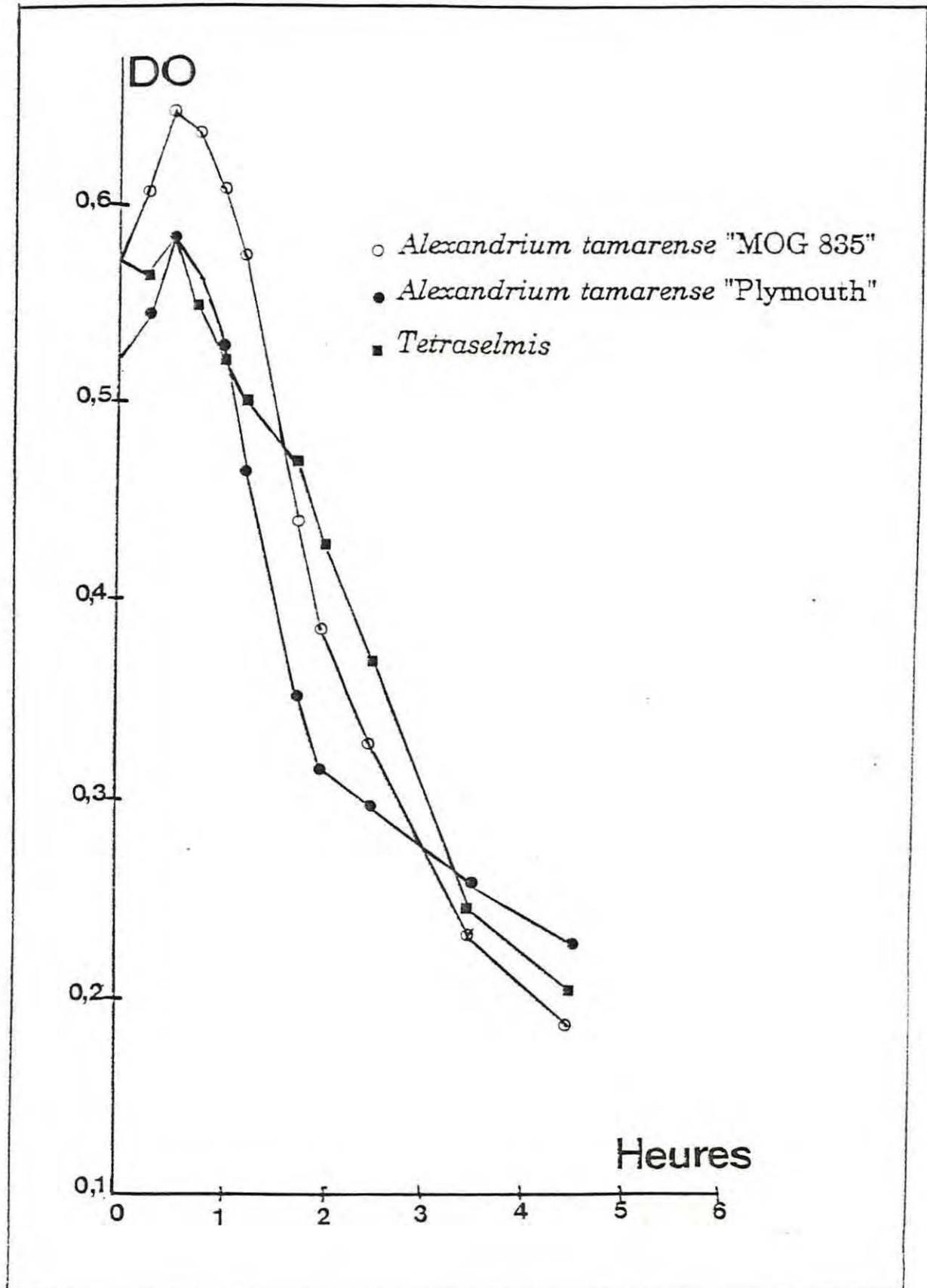


Fig. 3 : Etude de la filtration chez la coquille Saint-Jacques : disparition d'une solution de rouge neutre en présence de trois microalgues toxiques et non toxiques (série B).

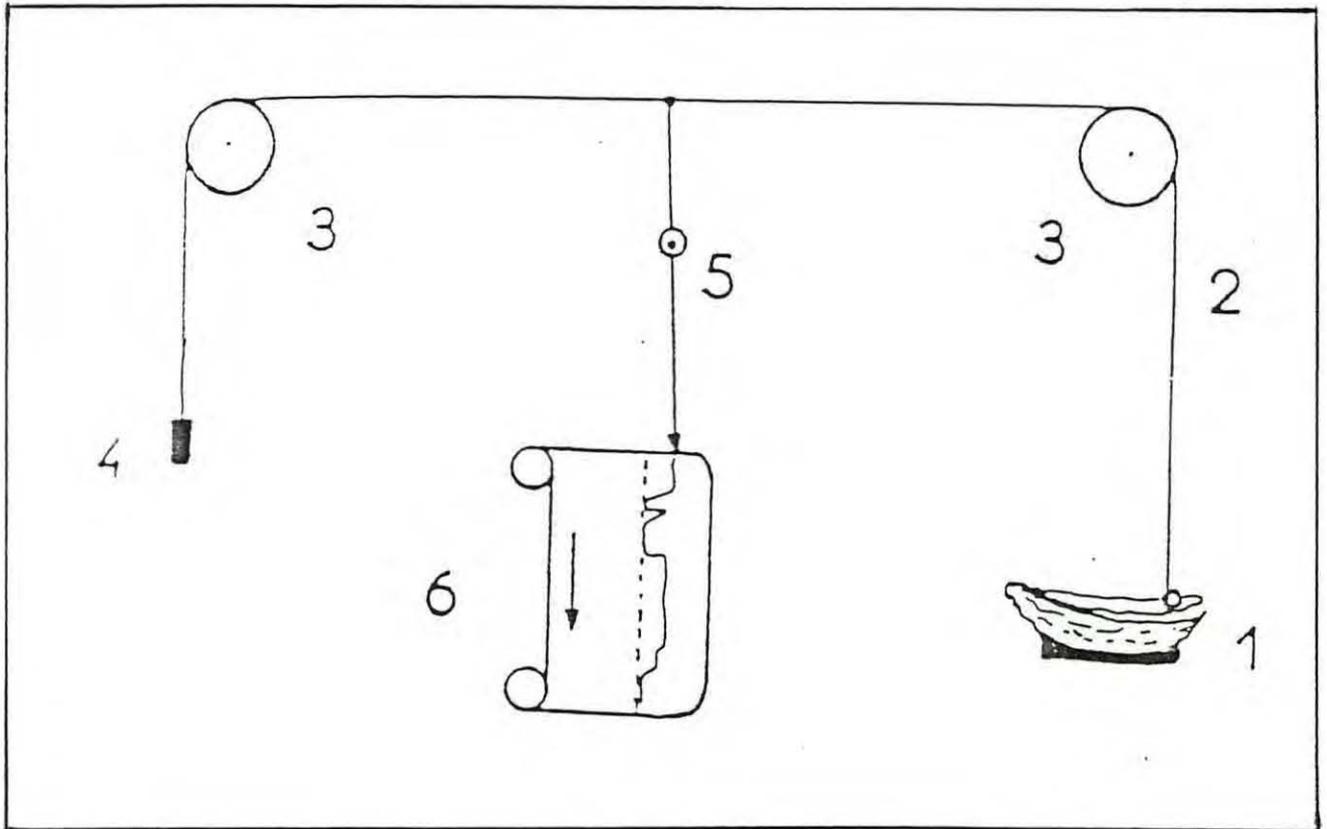


Fig. 4 : Schéma de principe de l'enregistreur d'activité valvaire : 1, bivalve expérimenté ; 2, fil souple, résistant et inextensible ; 3, poulies ; 4, contrepoids ; 5, stylet inscripteur ; 6, table d'enregistrement.

La vitesse de défilement du papier d'enregistrement est de 1 division en 5 minutes.

Les coquillages sont "cimentés" au moins 3 jours avant l'expérience dans des aquariums individuels contenant 4 litres d'eau de mer aérée en continu.

Le système est mis en place : le papier commence à défiler à T 0 h. Après un temps minimum de 50 min., un certain volume de culture est ajouté de manière à obtenir dans les bacs expérimentaux des concentrations équivalentes à 2 000 cell/litre pour MOG 835 et pour la souche de Plymouth, 3 000 cell/litre pour *Alexandrium minutum* et 5 000 cell/litre pour *Tetraselmis suecica*.

Ces concentrations ont été choisies de manière à avoir un volume total de culture constant, en compensant une petite taille de cellule par un plus grand nombre.

Le temps total d'enregistrement est en moyenne de 4 heures.

### 2.2.1 Coquille Saint-Jacques

Les résultats montrent, chez la coquille Saint-Jacques, des résultats sensiblement différents selon les souches et espèces d'*Alexandrium* (fig. 5, a à f). Pour MOG 835, on note qu'après une durée d'1 h 35 min pendant laquelle la coquille est moyennement ouverte, l'ajout de culture provoque une nette fermeture des valves pendant 1 h 45 min. Puis on observe progressivement un retour à l'amplitude d'ouverture du début. De même, l'introduction de culture *Alexandrium tamarense* non toxique (Plymouth) entraîne immédiatement une fermeture de la coquille en réaction aux turbulences de l'eau. Elle se rouvre après 5 min avec une très grande amplitude et se referme aussitôt. De nombreux mouvements se succèdent alors. Ces mouvements semblent correspondre à une réaction de fuite pour se soustraire à un milieu hostile : en effet, la coquille nage par propulsion en claquant des valves. Lors de ces mouvements, de fréquentes émissions de pseudo-fécès sont observées : les *Alexandrium* sont filtrés mais non ingérés par la coquille qui les rejette sous forme de pseudo-fécès.

Avec *Alexandrium minutum*, trois enregistrements sont interprétables. A chaque fois, la coquille réagit simultanément à l'introduction de la culture (turbulences de l'eau).

Ensuite, pour une coquille, nous notons une reprise rapide (5 min) de l'activité valvaire initiale avec une légère augmentation de l'amplitude d'ouverture après 45 min. Aucune pseudo-fécès n'est observée. En fin d'enregistrement, quelques fécès sont remarquées ce qui révèle une activité digestive. Cette coquille a donc ingéré des *Alexandrium*.

Les deux autres coquilles ont le même comportement au moment de l'introduction de la culture (fermeture et réouverture) puis immédiatement réagissent en claquant des valves : l'une modérément pendant 1 heure puis énergiquement, l'autre d'emblée énergiquement. Ces mouvements sont rapidement accompagnés de nombreuses émissions de pseudo-fécès. Ces deux coquilles cherchent à se soustraire à la présence des *Alexandrium*.

Enfin, après l'introduction de culture de *Tetraselmis suecica*, la coquille s'ouvre avec une très grande amplitude qui nécessite un réajustage du stylet. Régulièrement (toutes les demi heures environ), elle émet des pseudo-fécès en fermant ses valves partiellement mais brusquement. Nous observons également la production de fécès deux heures après l'ajout de culture. Cette coquille a filtré activement comme en témoigne les fécès et pseudo-fécès, ceci en bonne corrélation avec la grande amplitude d'ouverture des valves.

## coquille St-Jacques

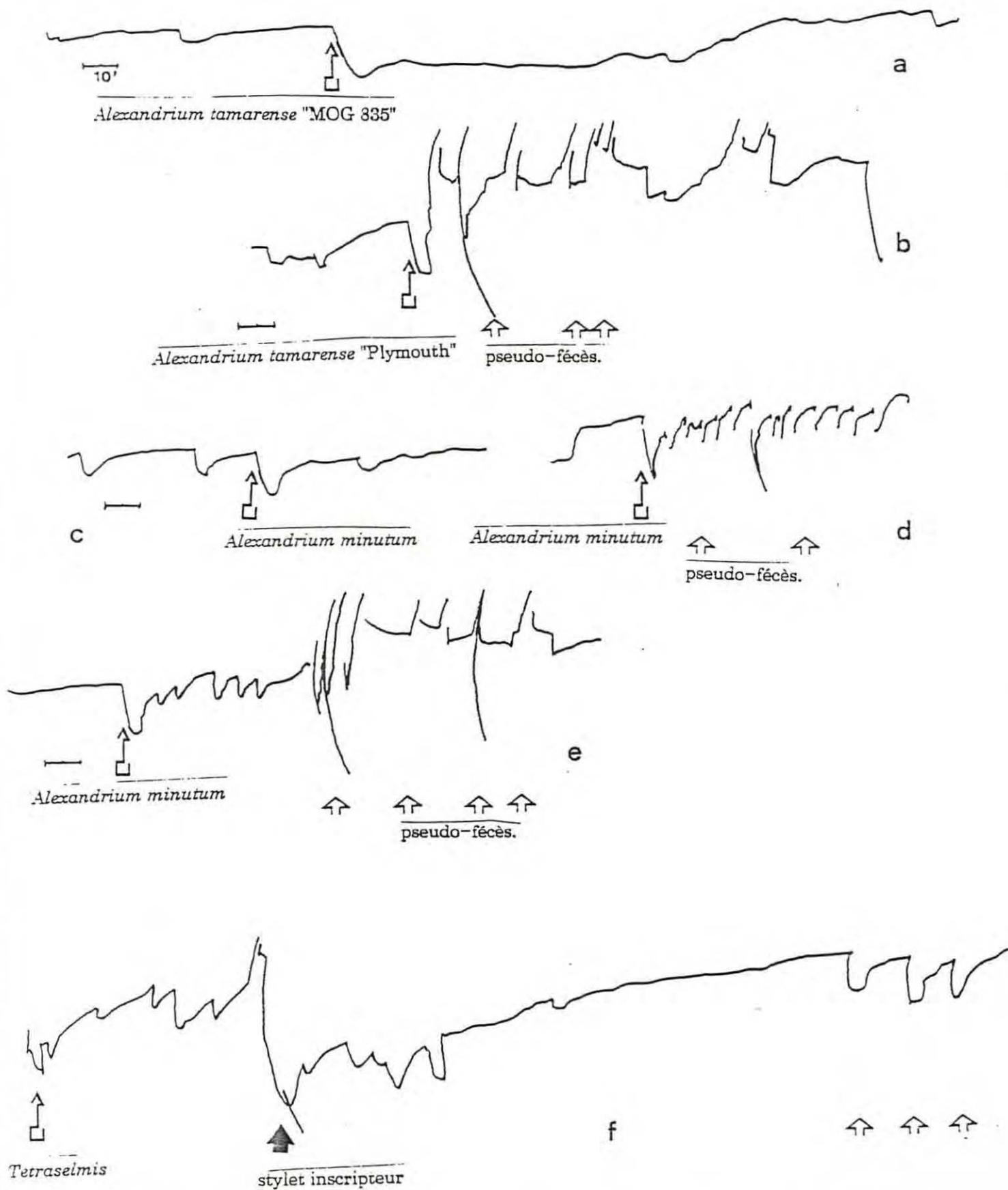


Fig. 5 : Enregistrements d'activité valvaire chez des coquilles Saint-Jacques mises en présence de cultures toxiques et non toxiques de Plymouth : a, avec la souche MOG 835 ; b, avec la souche non toxique de Plymouth ; c, d et e, avec *Alexandrium minutum* (3 essais différents) ; f, avec *Tetraselmis suesica*.

En résumé, et pour ce qui concerne la coquille Saint-Jacques, avec les deux *Alexandrium tamarense*, les réponses sont similaires dans le sens où les coquilles cherchent à se soustraire au milieu imposé : l'une en se fermant, l'autre par la fuite. Par contre, avec la souche non toxique, la coquille montre une activité valvaire certaine mais n'aboutissant qu'à la production de pseudo-fécès. Il semble donc que la coquille reconnaisse cette algue comme mauvaise soit d'emblée pour la souche toxique (sensibilité à la toxine ?), soit après filtration pour la souche non toxique (sensibilité à la taille ?).

Pour *Tetraselmis*, la réaction est manifestement positive : la coquille consomme cette algue non toxique de petite taille.

Avec *Alexandrium minutum*, la réaction paraît se situer entre les deux précédentes : les coquilles ne montrent aucune réaction immédiates de fermeture. L'une filtre et consomme ces algues. Les deux autres filtrent également puis réagissent négativement (fuite, pseudo-fécès uniquement) : la reconnaissance se fait ici soit par la toxicité, soit par la taille.

A chaque enregistrement, l'activité valvaire reflète assez bien la filtration mais n'indique pas s'il y a ou non ingestion d'algues. De plus, de nombreux enregistrements se sont montrés inexploitable du fait de stress troublant les coquilles : allers et retours dans la salle d'expérience, portes ouvertes et fermées, fonctionnement d'un appareil à ultra-sons dans la salle mitoyenne, etc...

### 2.2.2 Huitres

Après l'introduction de MOG 835, l'huître ne se rouvre que partiellement : il y a une réaction immédiate. Cette amplitude d'ouverture décroît ensuite en fonction du temps : réaction négative plus tardive. Aucune production de fécès ou pseudo-fécès n'est notée. L'huître ne filtre pas ou très peu (fig. 6).

Avec la souche non toxique de Plymouth, l'huître s'ouvre très progressivement (30 min à 1 heure) pour reprendre plus ou moins l'amplitude du début selon les cas. Ensuite, une fois toutes les heures environ, une émission de pseudo-fécès est notée. Le coquillage filtre mais n'ingère pas d'algues (pas de fécès donc pas de transit digestif).

Après l'ajout de culture d'*Alexandrium minutum*, on obtient l'ouverture des valves en 15 à 20 min avec la même amplitude qu'avant. Dans un cas sur deux, on observe une faible production de pseudo-fécès (toutes les 1 h 30 à 2 h). Même après 5 heures d'enregistrement, aucune production de fécès n'est notée. L'huître filtre légèrement mais n'ingère pas d'algues.

Enfin, nourrie avec *Tetraselmis*, l'huître augmente nettement son amplitude d'ouverture (réaction positive). Deux émissions de pseudo-fécès sont remarquées en 3 h 30, ainsi qu'une importante production de fécès mettant en évidence une activité digestive.

En résumé, l'huître paraît très sensible au phytoplancton présent. *Tetraselmis* est consommé. En ce qui concerne les *Alexandrium*, toxiques ou non : ils ne sont pas consommés, et la souche toxique "MOG 835" n'est même pas filtrée (pas de pseudo-fécès).

La différence de comportement entre les deux souches d'*Alexandrium tamarense* ne peut s'expliquer que par une détection de la toxicité.

## huître

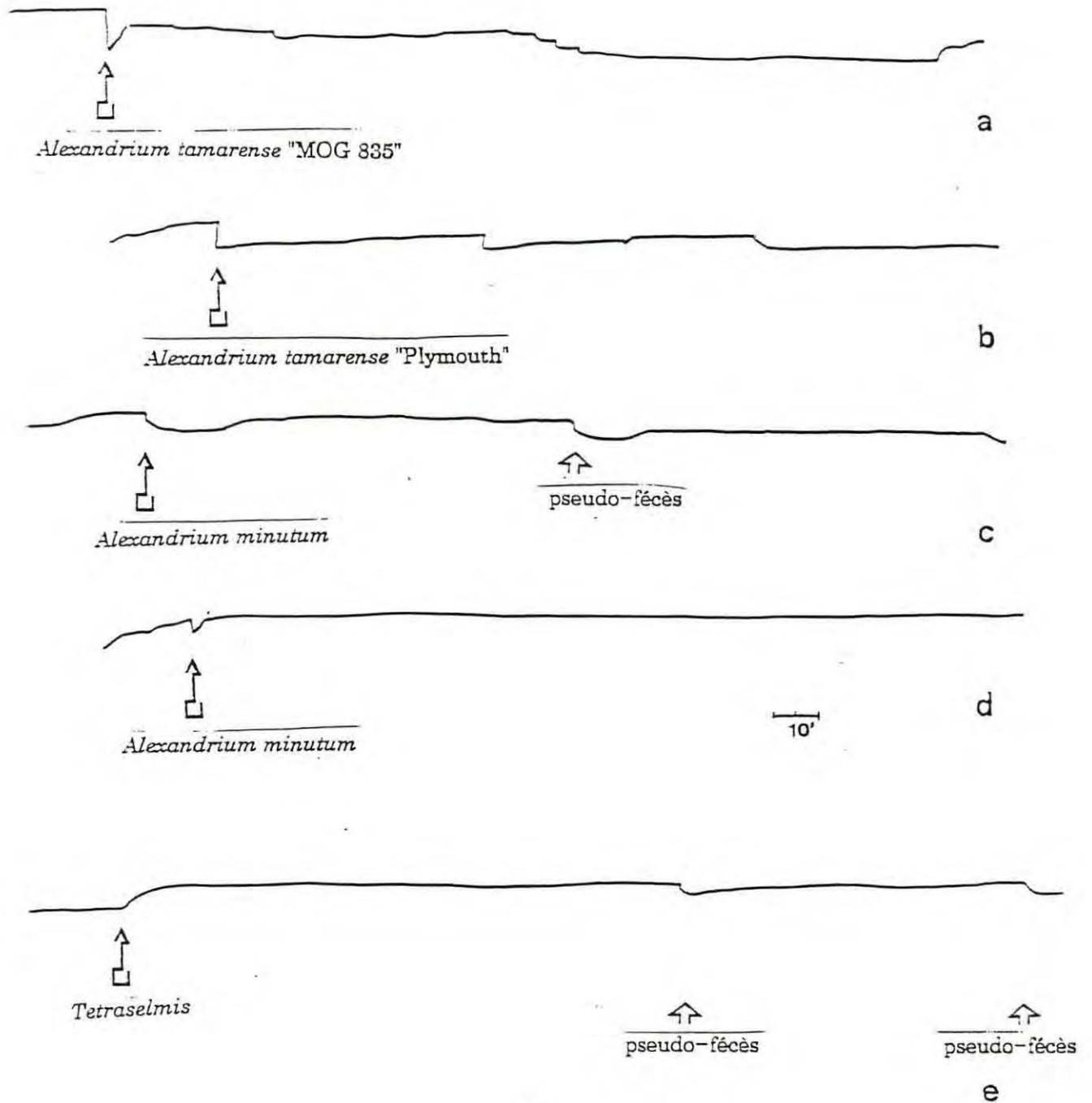


Fig. 6 : Enregistrements d'activité valvaire chez des huîtres mises en présence de cultures toxiques et non toxiques : a ; avec la souche MOG 835 ; b, avec la souche non toxique de Plymouth ; c et d, avec *Alexandrium minutum* (2 essais différents) ; e, avec *Tetraselmis suecica*.

Par contre, la même réaction est constatée pour *Alexandrium tamarense* "Plymouth" et *Alexandrium minutum*. Ici semble intervenir la taille des cellules. *Alexandrium minutum* toxique et de taille moyenne est aussi bien accepté que l'*Alexandrium tamarense* (non toxique mais plus gros).

D'autre part, l'huître semble plus sensible que la coquille Saint-Jacques : en effet, cette dernière ne refuse pas systématiquement *Alexandrium minutum*.

### 2.2.3 Moules

Même avec des spécimens de grande taille, aucun enregistrement n'a pu être réalisé : le stylet inscripteur fournit une trop grande inertie pour être actionné par une moule.

## 2.3 Dénombrement des particules en suspension

Les dénombrements sont réalisés grâce à un compteur de particule Multisizer (Coultronics). Cet appareil est muni d'une sonde à orifice rond de diamètre adapté à la taille des particules à compter. Il prélève automatiquement 0,5 ml de suspension : les particules entrent par l'orifice puis passent entre deux électrodes, en faisant alors varier la différence de potentiel existante. Par l'importance et la fréquence des variations de potentiel, l'appareil calcule le nombre et la taille (diamètre) des particules.

Pour une meilleure fiabilité des résultats, trois prélèvements sont effectués par comptage.

Des comptages de cultures diluées sont réalisés afin de connaître les diamètres moyens des cellules ce qui permet de programmer l'appareil pour qu'il affiche directement le nombre d'algues qui nous intéresse, excluant les comptages de particules plus petites ou plus grosses (fig. 7).

Les bacs expérimentaux, munis comme précédemment d'un système d'aération, reçoivent un volume variable d'eau de mer selon le bivalve étudié : 4 litres pour 4 moules, 4 litres pour 1 huître et 5 litres pour 1 coquille Saint-Jacques. Les quatre souches phytoplanctoniques utilisées sont les mêmes que précédemment, avec les mêmes concentrations de départ.

L'expérience débute au moment de l'introduction des coquillages dans leurs aquariums respectifs. Des prélèvements sont réalisés régulièrement dans chaque aquarium : toutes les 15 à 20 min pendant la première heure puis de façon plus espacée.

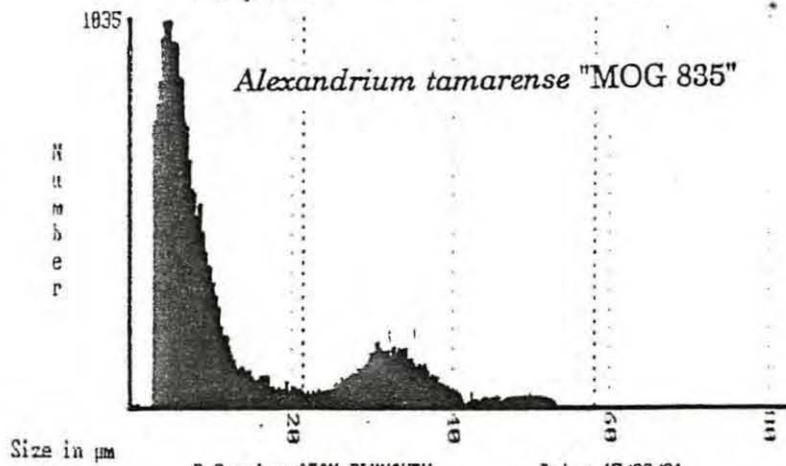
### 2.3.1 Coquilles Saint-Jacques

Les résultats révèlent une très importante disparition de *Tetraselmis*. On constate parallèlement l'apparition rapide de pseudo-fécès et de fécès après une à deux heures. Il y a donc filtration et consommation (fig. 8 a).

Pour les trois autres algues, la légère pente des courbes correspond à une faible sédimentation des cellules. Les cellules n'ont donc pas été filtrées. Ni fécès ni pseudo-fécès ne sont remarquées. Le choix de la coquille semble se faire ici soit par la taille des cellules (seules les petites sont consommées), soit par la toxicité et la taille.

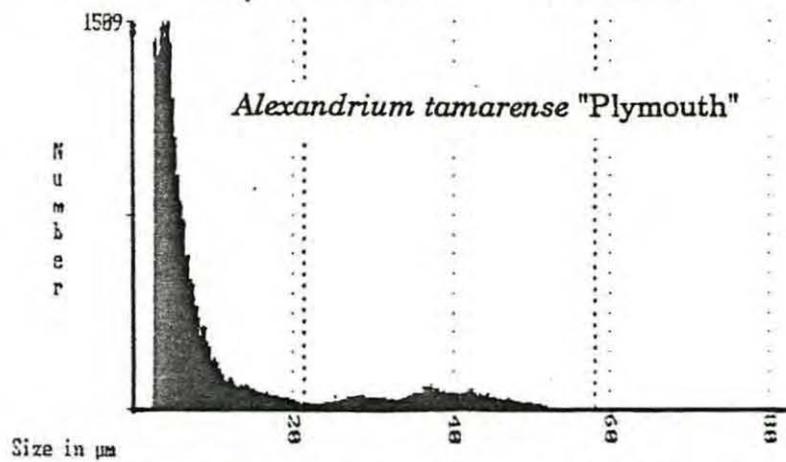
P Sample: MOG

Date: 17/09/91



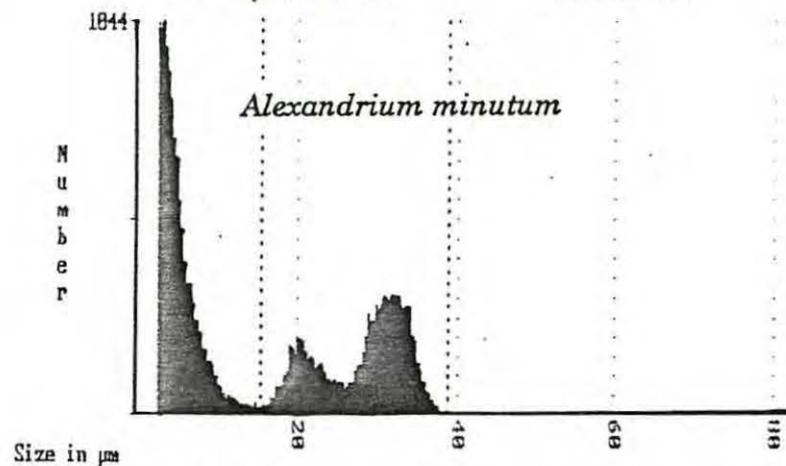
P Sample: ATAM PLYMOUTH

Date: 17/09/91



P Sample: ALEX MIN

Date: 17/09/91



P Sample: TETRASELMIS

Date: 17/09/91

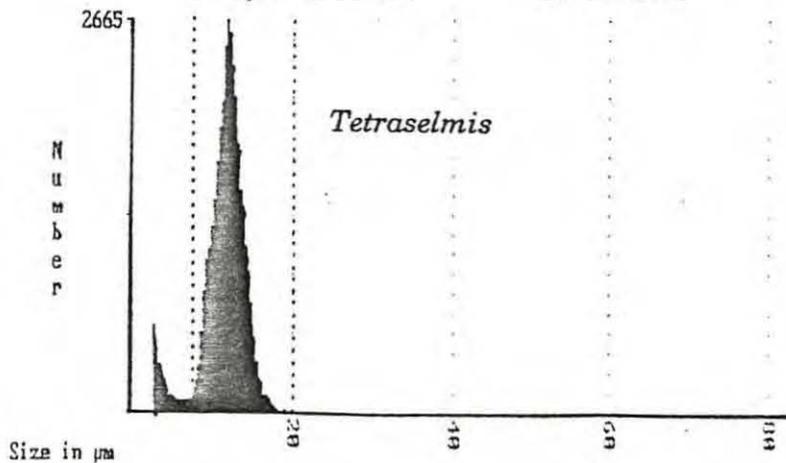


Fig. 7 : Variations de taille des cellules dans des cultures en début de phase exponentielle d'*Alexandrium tamarense*, *Alexandrium minutum* et *Tetraselmis suecica*.

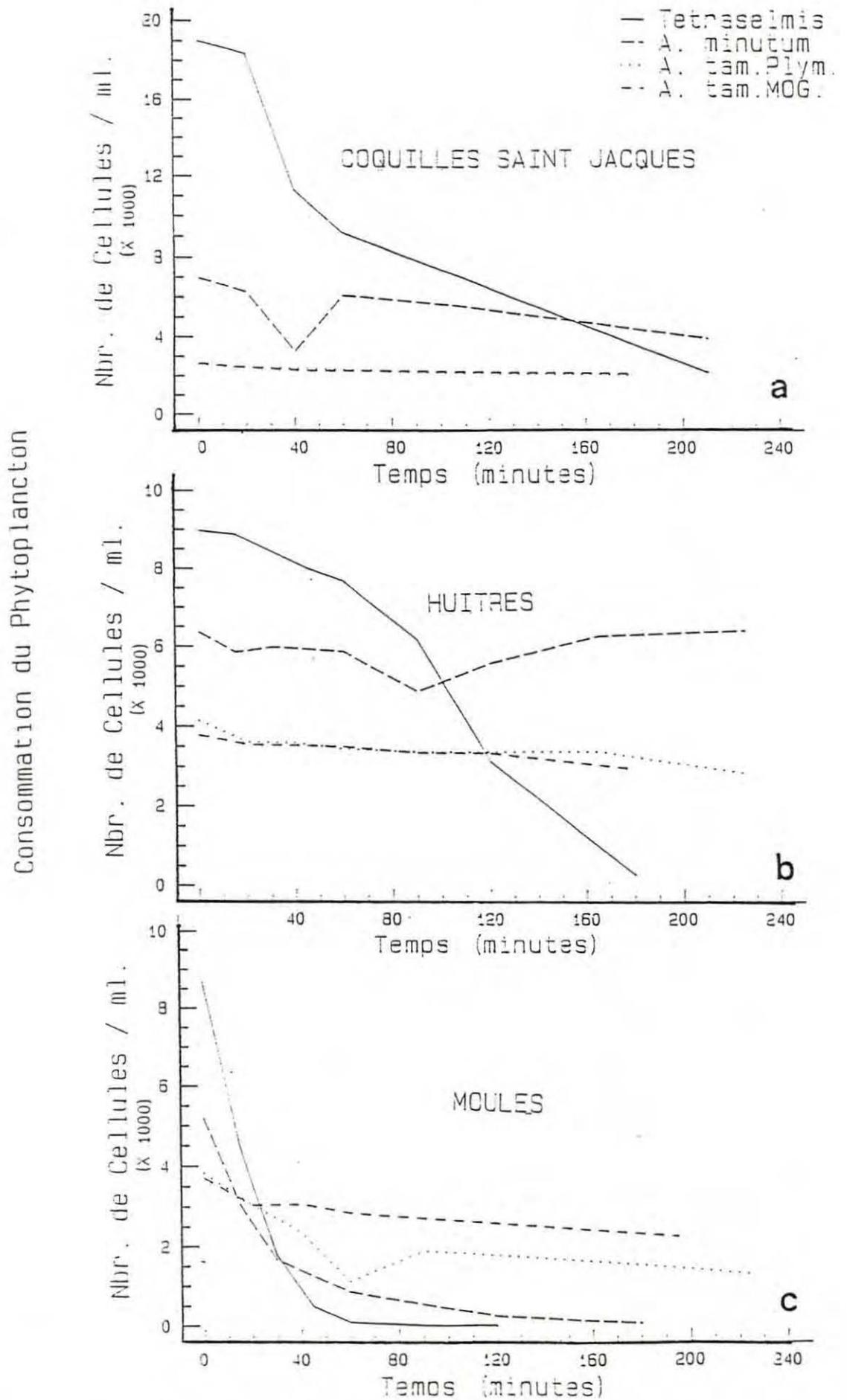


Fig. 8 : Consommation phytoplanctonique au cours du temps chez la coquille Saint-Jacques (a), l'huitre (b) et la moule (c) exposées à différents régimes alimentaires, toxiques et non toxiques.

### 2.3.2 Huîtres et moules

Des résultats semblables à ceux des coquilles Saint-Jacques sont observés chez l'huître. Pour ce qui est des moules, les courbes montrent des pentes plus importantes dans le sens (fig. 8 b et c) :

*A. tam.* "MOG" < *A. tam.* "Plymouth" < *A. minutum* < *Tetraselmis*

*Tetraselmis* est donc intensément filtré. De nombreuses fécès et pseudo-fécès recouvrent le fond des aquariums ce qui confirme l'importance du phénomène et indique que les moules ont consommé ces algues.

La courbe "*Alexandrium minutum*" révèle aussi une importante filtration. En 15 min, des pseudo-fécès sont produites, témoin de cette filtration. Après 1 heure, on constate la présence de fécès, ce qui indique que les moules consomment cet *Alexandrium*.

Avec *Alexandrium tamarense* "Plymouth", la filtration paraît beaucoup plus réduite (pente plus faible). Quelques pseudo-fécès (et fécès ?) sont observées après plus d'une heure. La moule filtre mais ne semble pas consommer cette algue.

Les comptages d'*Alexandrium tamarense* "MOG 835" nous montrent que l'algue est peu ou pas filtrée. Ceci est confirmé par l'observation des aquariums : quelques rares pseudo-fécès sont remarquées seulement après 3 heures.

## V - DISCUSSION ET CONCLUSIONS

De l'ensemble des essais réalisés dans ce travail, il apparaît que l'utilisation du rouge neutre pour mesurer l'activité valvaire est à proscrire du fait du stress qu'il peut introduire chez les coquillages et des fortes interférences entre l'aération des bacs et la disparition de ce colorant.

La mesure directe de l'activité valvaire avec un enregistreur présente à la fois des avantages et des inconvénients :

- l'activité valvaire est représentative de l'activité générale du coquillage car elle est assez bien corrélée avec le taux de filtration. De plus, sur les enregistrements, les émissions de pseudo-fécès sont repérables. On peut également remarquer les réactions de fuite (claquement des coquilles), de troubles (réaction aux ultra-sons) ou autres mouvements de valves anormaux ;
- le système peut être mis en place rapidement si un stock de coquillages cimentés et collés est prévu.
- seuls les coquillages de grande taille peuvent être mis en observation ;
- le taux de filtration, même élevé, n'indique pas le degré d'activité digestive du bivalve. En effet, nous avons vu qu'un coquillage qui filtre et produit des pseudo-fécès peut avoir ou non une activité digestive, donc peut montrer une réaction négative ou positive.

Cette incertitude sur l'activité digestive peut être réduite par l'apparition de fécès et l'estimation du transit digestif.

En ce qui concerne l'utilisation d'un compteur de particules pour mesurer la consommation du phytoplancton, on peut retenir que cette technique est intéressante car elle ne nécessite aucune préparation particulière au niveau des coquillages avec l'expérimentation. Le stress imposé est minime.

Par contre, elle présente un inconvénient : de nombreuses particules macroscopiques (fécès, mucus,...) viennent régulièrement boucher l'orifice de la sonde ce qui oblige à recommencer le comptage après nettoyage. Cet inconvénient peut devenir très gênant si on travaille avec de l'eau prélevée directement en mer et contenant des particules de taille assez variable.

De plus, la diminution du nombre de particules en suspension, si elle est représentative d'un certain taux de filtration, n'indique pas s'il y a consommation d'algues ou simplement formation de pseudo-fécès.

Si l'on considère globalement la filtration et la nutrition, les essais réalisés nous renseignent sur la filtration du coquillage, mais en aucun cas ne nous montrent s'il y a ou non alimentation.

En effet, la filtration intervient dans les fonctions de nutrition et de respiration. Pour avoir plus d'indications sur le comportement alimentaire du coquillage, il convient de rechercher la présence de fécès qui témoigne d'une activité digestive. La présence des pseudo-fécès nous indique seulement qu'il existe une filtration importante mais ne prouve pas que le coquillage se nourrit.

L'activité valvaire et la filtration considérées seules ne sont pas utilisables pour connaître l'activité alimentaire, donc pour savoir si le coquillage refuse une algue. En effet, celui-ci peut filtrer une algue qu'il n'ingèrera pas.

En ce qui concerne les trois espèces de bivalves étudiées, il apparaît que le choix du coquillage se fait plus en fonction de la taille des particules que de leur toxicité.

Ceci semble aller contre l'idée de se servir de coquillages comme détecteurs de phytoplancton toxique.

Cependant, des recherches en ce sens doivent être poursuivies afin de mieux comprendre le comportement alimentaire des coquillages. En effet, plusieurs problèmes restent encore posés :

- d'autres espèces de mollusques peuvent se montrer plus sensibles que les trois étudiées ;
- une gamme d'algues plus vaste doit être utilisée. En particulier, il paraît intéressant de tester des espèces de petite taille mais toxique, et différentes espèces non toxiques de grande taille ;
- nous avons travaillé ici avec des cultures unialgales. Or cette situation est exceptionnellement rencontrée dans les conditions naturelles. Il est donc instructif d'étudier les réactions des coquillages face à un mélange d'algues.

Des travaux de la sorte ont déjà été réalisés en laboratoire par BRICELJ *et al.* (1990) : *Mercenaria mercenaria* est capable de se soustraire totalement à la présence d'*Alexandrium tamarense* toxiques par rétraction de son siphon et fermeture de ses valves. Or ce coquillage consomme cet *Alexandrium* s'il est mélangé avec une algue non toxique.

De plus, notre étude se limite à un temps très court : la reconnaissance immédiate du phytoplancton. Or, dans les conditions naturelles, les coquillages sont exposés pendant un temps beaucoup plus long aux efflorescences toxiques et en général, finissent par le consommer ce qui limite d'autant plus les applications pratiques que l'on peut envisager à partir de ces résultats.

## VI - BIBLIOGRAPHIE

- ALZIEU C. (1972). Toxicité relative de produits antipétrole sur deux organismes marins. Rev. Trav. Inst. Pêches Marit., 36 (1), 103-119.
- BOGE G. (1988). Ecophysiologie de la moule placée à l'intérieur et à l'extérieur du panache de la station d'épuration de Sainte-Marguerite (Toulon est). Rapport scientifique.
- BRICELJ VM., LEE JH., CEMBELLA AD., ANDRESON DM. (1990). Uptake kinetics of paralytic shellfish toxins from the dinoflagellate *Alexandrium fundyense* in the mussel *Mytilus edulis*. Marine Ecology Progress Series, vol. 63, 177-188.
- BRICELJ VM., LEE JH., CEMBELLA AD., ANDRESON DM (1990). Uptake of *Alexandrium fundyense* by *Mytilus edulis* and *Mercenaria mercenaria* under controlled conditions. In : Toxic marine phytoplankton, Elsevier Science Publish (Graneli *et al.*, Eds) : 269-275.
- CHAPPUIS JG., LUBET P. (1967). Etude du débit palléal et de la filtration de l'eau par une méthode directe chez *Mytilus edulis* L. et *M. edulis* LMK. Bulletin de la Société Linéenne de Normandie, 10, 210-216.
- COLE H.A., HEPPER B.T. (1954). The use of Neutral Red solution for the comparative study of filtration rates of Lamellibranchs. J. Cons. Int. Exp. Mer, Copenhagen, 20, 197-203.
- FREMY J.M., LEDOUX M., NEZAN E., PICLET C., BELVEZ H. (1988). Evolution de la présence de toxines paralysantes dans les coquillages lors de l'épisode toxique en Aber Wrac'h. Toxicorama, vol. 1, n° 1, 23-28.
- GAINEY LF., SHUMWAY SE. (1988). A compendium of the reponses of bivalve molluscs to toxic dinoflagellates. Journal of Shellfish Research, vol. 7, n° 4, 623-628.
- GENENAH AA., SHIMIZU Y. (1981). Specific Toxicity of Paralytic Shellfish Poisons. J. Agric. Food Chem., vol. 29, n° 6, 1289-1291.
- HIS E. (1976). Contribution à l'étude biologique de l'huître dans le bassin d'Arcachon. Thèse.
- HIS E. (1982). Un appareil permettant d'étudier le taux de pompage des lamellibranches dans le milieu naturel. Malacologia, 22 (1-2), 667-672.
- LASSUS P. (1990). Les phycotoxines : produits de microalgues marines. Plantes et médecines associées, 15-19.
- LEDOUX M. (1991). Optimisation d'un dosage par CLHP des phycotoxines paralysantes ; application à l'étude de la contamination de fruits de mer. Mémoire CNAM. Cons. nat. des arts et métiers. 23 mai.

- MOHLENBERG F., RIISGARD HU. (1979). Filtration Rate, Using a New Indirect Technique, in Thirteen Species of Suspension-Feeding Bivalves. *Marine Biologie*, 54, 143-147.
- RIISGARD HU. (1977). On measurements of the filtration rates of suspension feeding bivalves in a flow system. *Ophelia*, 16 (2), 167-173, dec.
- SCHULTE EH. (1975). Influence of algal concentration and temperature on the filtration rate of *Mytilus edulis* *Marine Biology*, 30, 331-341.
- SHIMIZU Y, YOSHIOKA M. (1981). Transformation of paralytic shellfish toxins as demonstrated in scallops homogenates. *Science*, vol. 212, 547-549, 1 V.
- SHUMWAY SE, CUCCI TL. The effet of toxic dinoflagellate *Protogonyaulax tamarensis* on the feeding and behaviour of bivalve molluscs.
- SHUMWAY SE. (1989). Toxic algae. *World Aquaculture*, vol. 20, n° 4, 65-74, XII.