

UNIVERSITÉ DE NANTES  
UFR SCIENCES ET TECHNIQUES

---

ÉCOLE DOCTORALE VÉGÉTAL, ENVIRONNEMENT, NUTRITION,  
AGROALIMENTAIRE, MER

Année 2009

# Modélisation de la détoxification de mollusques bivalves contenant des phycotoxines paralysantes ou diarrhéiques

---

THÈSE DE DOCTORAT

Label Européen

Discipline : Océanologie biologique  
Spécialité : Biologie et écologie côtières

*Présentée*

*et soutenue publiquement par*

**Marielle GUÉGUEN**

*Le 26 octobre 2009, devant le jury ci-dessous*

Rapporteurs M. Jorge DIOGENE, *directeur scientifique, IRTA, La Galera*  
M. Denis DOCHAIN, *professeur, Université catholique de Louvain*  
Examineurs M. Arne DUINKER, *chercheur, NIFES, Bergen*  
M. Mohamed LAABIR, *maître de conférence, Université de Montpellier 2*  
M. Patrick LASSUS, *cadre de recherche, IFREMER, Nantes*  
M. Michel MATHIEU, *professeur, Université de Caen*  
M. Régis BARON (invité), *cadre de recherche, IFREMER, Nantes*

*Directeur de thèse : Laurent Barillé, professeur, Université de Nantes*

UNIVERSITÉ DE NANTES  
UFR SCIENCES ET TECHNIQUES

---

ÉCOLE DOCTORALE VÉGÉTAL, ENVIRONNEMENT, NUTRITION,  
AGROALIMENTAIRE, MER

Année 2009

# Detoxification modelling of bivalves containing paralytic and diarrhoeic phycotoxins

---

THÈSE DE DOCTORAT

Label Européen

Discipline : Océanologie biologique

Spécialité : Biologie et écologie côtières

*Présentée*

*et soutenue publiquement par*

**Marielle GUÉGUEN**

*Le 26 octobre 2009, devant le jury ci-dessous*

Rapporteurs M. Jorge DIOGENE, *directeur scientifique, IRTA, La Galera*  
M. Denis DOCHAIN, *professeur, Université catholique de Louvain*  
Examineurs M. Arne DUINKER, *chercheur, NIFES, Bergen*  
M. Mohamed LAABIR, *maître de conférence, Université de Montpellier 2*  
M. Patrick LASSUS, *cadre de recherche, IFREMER, Nantes*  
M. Michel MATHIEU, *professeur, Université de Caen*  
M. Régis BARON (invité), *cadre de recherche, IFREMER, Nantes*

*Directeur de thèse : Laurent Barillé, professeur, Université de Nantes*

## Remerciements,

En premier lieu, je tiens à remercier Michel Mathieu, Jorge Diogène, Denis Dochain, Mohamed Laabir et Arne Duinker d'avoir accepté de participer à mon jury et/ou d'avoir écrit un rapport sur ma thèse.

Laurent Barillé, mon directeur de thèse, m'a permis de devenir critique vis-à-vis de mon travail et m'a aidée dans les périodes de doutes. Je lui suis très reconnaissante pour ses relectures pointilleuses lors de ces derniers mois.

Cette thèse n'aurait jamais vu le jour sans Patrick Lassus, mon responsable Ifremer. Je tiens à remercier Patrick d'avoir toujours trouvée le temps de m'aider alors qu'il préparait la conférence ICMSS 2009 et pour tout le temps passé à relire mes articles, mes présentations orales et plus récemment mon manuscrit.

Ma première approche de la modélisation a eu lieu pendant mon Master 1 à Marseille lors d'un cours donné par J.C. Poggiale. Cette discipline un peu étrange pour les biologistes m'a tout de suite séduite. Ainsi, pendant cinq années (stages de Master 1 et 2, puis thèse), Régis Baron a pu m'initier aux mystères de la modélisation, de Matlab, de l'identification paramétrique... Je tiens également à remercier Régis pour son soutien chaleureux et constant.

J'ai eu la chance de pouvoir effectuer ma thèse au sein du laboratoire Phycotoxines (Ifremer, Nantes) et d'être ainsi entourée de spécialistes des phycotoxines dans une ambiance très agréable. Michèle, Philippe, Véronique et Patrick m'ont largement aidée dans le déroulement des manips de contamination / détoxification des huîtres, ces petits mollusques qui demandent beaucoup de soins... Et merci de m'avoir appris à siphonner tout et n'importe quoi (fèces, cellules toxiques, eau de mer ...). Une fois les manips réalisées, les chimistes (Zouher, Mano, Flo, Véro) étaient toujours présents pour m'aider dans les analyses, en m'apprenant dans un premier temps la méthode d'Oshima, puis la nécessité de savoir démonter entièrement une chaîne HPLC, me permettant de me transformer en Super Mario Bros sur PSP. Claire, avec toute sa gentillesse, m'a permis d'appréhender le monde des toxines diarrhéiques, en réalisant mes premières manips sur des moules avec elle. Un grand merci à tous les membres du laboratoire : Zouher, Patrick, Claire, Florence, Michèle, Véronique, Philippe, Mano, Flo, Véro, Walid, Nolwen, Mélanie, Nathalie, Mado, Guillaume et Audrey.

Pendant ma thèse, j'ai eu l'opportunité d'effectuer un stage de trois mois au sein du Nifes (Bergen, Norvège). Grâce aux nombreuses questions, à la motivation, à l'enthousiasme et aux idées d'Arne Duinker, j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler à Bergen. Il m'a permis de prendre le recul nécessaire sur ma thèse et je lui en suis très reconnaissante. Je ne pourrais pas conclure sur ce séjour norvégien sans évoquer Peter Hoovgard qui m'a beaucoup aidée dans l'observation des dinoflagellés et qui m'a permis de réaliser des expériences de terrain dans le magnifique site de Sogndal.

Un petit mot également à l'équipe du LEMAR avec qui j'ai collaboré dans le cadre d'un projet ANR : merci à Philippe Soudant, Christophe Lambert et Hansy Haberkorn, mais aussi à Hélène Hégaret avec qui j'espère pouvoir travailler dans les prochaines années.

Et pour finir, je tiens à remercier ma famille et Vincent de m'avoir soutenue et bien plus encore...



# SOMMAIRE

<b>Introduction générale</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre 1- Généralités</b>	<b>11</b>
Partie I- Les Pycotoxines.....	11
1 Généralités.....	11
2 Les toxines paralysantes.....	14
2.1 Les producteurs.....	14
2.2 Les propriétés.....	15
2.3 Toxicologie.....	17
2.3.1 Effet chez l'homme.....	17
2.3.2 Mode d'action.....	18
2.4 Répartition.....	18
3 Les toxines diarrhéiques : acide okadaïque.....	21
3.1 Les producteurs.....	21
3.2 Les propriétés physico-chimiques.....	21
3.3 Toxicologies.....	22
3.3.1 Effet chez l'homme.....	22
3.3.2 Mode d'action.....	22
3.4 Répartition.....	23
Partie II- Physiologie alimentaire des mollusques bivalves.....	26
1 Processus alimentaire.....	26
2 Le système digestif.....	32
Partie III- Interaction toxines-mollusques bivalves	33
<b>Chapitre 2- Le devenir des microalgues toxiques et des toxines</b>	<b>37</b>
Partie 1- Le devenir des microalgues.....	37
1. Gut passage times in two bivalve molluscs fed toxic microalgae ( <i>Alexandrium spp.</i> and <i>Pseudo-nitzschia calliantha</i> ).....	39
1.1. Introduction.....	40
1.2. Materials and methods.....	42
1.3. Results.....	46
1.4. Discussion.....	51
2. -Le devenir des cellules de Dinoflagellés producteurs de toxines diarrhéiques.....	54
2.1. Résultats.....	55
2.2. Discussion.....	56
Partie 2- Le devenir des toxines.....	59
2 La répartition tissulaire des toxines paralysantes.....	62
3.1 Matériel et Méthode.....	62
3.2 Résultats.....	63
3.3 Conclusion.....	64
3 First approach to localize lipophilic biotoxins in mussel digestive glands.....	67
4.1 Introduction.....	68
4.2 Material and method.....	69

4.3	Results .....	71
4.4	Discussion .....	73

### **Chapitre 3 - L'élimination des toxines** **85**

Contexte .....	85
1 Influence de la ploïdie sur l'accumulation de toxines paralysantes chez l'huître	
<i>Crassostrea gigas</i> .....	87
1.1 Matériels et Méthodes .....	89
1.2 Résultats .....	90
1.3 Discussion .....	93
2 Influence de la matière en suspension sur la cinétique de détoxification .....	96
2.1 Influence de la matière en suspension sur la cinétique de détoxification des huîtres contenant des toxines paralysantes .....	98
2.2 Influence de la matière organique sur la cinétique de détoxification des moules contenant des toxines diarrhéiques .....	115
2.2.1 Matériel et méthode .....	115
2.2.2 Résultats .....	117
2.3 Conclusion .....	119
3 Discussion .....	125

### **Chapitre 4 - Modélisation** **129**

1 Introduction .....	129
2 Les jeux de données .....	131
2.1 Les limites .....	131
2.2 Présentation des jeux de données expérimentaux .....	132
2.3 Ajustement des modèles et estimation des coefficients .....	134
3 Modèles prenant en compte les transferts des toxines entre les différents tissus .....	135
3.1 Introduction .....	135
3.2 <i>Modélisation</i> .....	136
3.2.1 Modèle à sept compartiments .....	137
3.2.2 Comparaison de modèles à cinq et deux compartiments .....	141
3.2.3 Etudes des modèles à deux compartiments .....	148
3.3 Discussion .....	153
4 Modèle prenant en compte les biotransformations .....	155
4.1 Les toxines paralysantes .....	155
4.1.1 Modélisation .....	157
4.1.2 Discussion .....	170
4.2 Les toxines diarrhéiques .....	171
4.3 Discussion .....	176
5 Influence des variables environnementales .....	178
6 Discussion .....	184

### **Conclusion et perspectives** **183**

### **Bibliographie** **187**

### **Annexes**

# TABLE DES ILLUSTRATIONS

## FIGURES

Fig. 1 French mollusc production in tons between 1996 and 2006: clams and cockles (in blue), mussels (in purple) and oysters (in green). (FAO, 2009).....	3
Fig. 2 Global increase in reported incidence of algal toxins. Encircled areas indicate where outbreaks have occurred or toxins have been detected at level sufficient to impact human or environmental health, adapted from Van Dolah (2000) .....	12
Fig. 3 Chemical structure of paralytic toxins. Only the 16 compounds more frequently found in the phytoplankton and molluscs are represented. ....	16
Fig. 4 Examples of possible different biotransformations of paralytic toxins described by Oshima (1995).....	17
Fig. 5 Localization of molluscs contaminated by paralytic toxins in France in 2007 and exceeding the safety threshold of 800 µg STX equiv. kg <sup>-1</sup> of flesh. 830 and 1270 correspond to the maximal value observed during the toxic episode express in µg STX equiv. kg <sup>-1</sup> of flesh. No toxic episode was noticed in 2006 and 2008.....	19
Fig. 6 Localization of the different toxic episodes in relation with paralytic toxins in Europe from 1991 to 2000.....	20
Fig. 7 Structure of okadaic acid and its derivatives the Dinophysistoxins (DTX). 7-O-acyl OA, 7-O-acyl DTX1 and 7-acyl DTX2 are usually named DTX3. ....	22
Fig. 8 mode of action of okadaic acid (OA) upon protein phosphatase.....	23
Fig. 9 Distribution of toxic episodes due to diarrhetic toxins in France 2008. ....	24
Fig. 10 Localization of the different toxic episodes due to diarrhetic shellfish poisoning toxins in Europe from 1991 to 2000. ....	25
Fig. 11 Hypothetical diagram of microbial food webs in a coastal shellfish ecosystem (Le Gall et al. 1997, Dupuy et al. 1999). ....	27
Fig. 12 Diagram of bivalve gills, from Le Pennec et al. (2003a).....	28
Fig. 13 Diagrammatic comparison of heterorhabdic and homorhabdic gills (a) <i>C. gigas</i> transverse section passing through ostia. (b) Transverse section of homorhabdic filibranch gill, from Beninger et al. (2005) .....	28
Fig. 14 <i>C. virginica</i> labial palps, from Le Pennec (2003b).....	29
Fig. 15 Conceptual schema for <i>Crassostrea gigas</i> feeding process and interferences with endogenous and exogenous variables, from Barillé et al. (1997). ....	31

- Fig. 16 Silicone casting of the isolated right digestive diverticule of *Pecten maximus* digestive gland, from Le Pennec (2003). ..... 32
- Fig. 17 Light microscope photographs (x 250) of faeces produced by *Crassostrea gigas* fed *Pseudo-nitzschia calliantha* (1) and *Alexandrium catenella* (2). Type “a” corresponds to faeces composed only of *Alexandrium* spp. or *P. calliantha* cells. Type “b” corresponds to a mixture of *Tetraselmis suecica* and the toxic algae species, with the toxic species representing less than 50% of the faecal contents. Type “c” corresponds to a definite colour change in the faeces, which pass from brown to green, the % of toxic algae representing less than 5%. Type “d” faeces consist of 99% *T. suecica*. ..... 44
- Fig. 18 Gut passage time distribution as a function of the different environmental parameters tested (Table 1) for oysters (A) and mussels (B) ..... 47
- Fig. 19 Activity of two different oysters consuming 200 cell ml<sup>-1</sup> *Alexandrium minutum* at 16°C. Oyster 1 (◆) presents a lag period of 1.5 hours and oyster 2 (■) displays a high level of activity from the beginning to the end of the experiment. .... 48
- Fig. 20 Oyster gut passage time comparison at two temperatures (16°C and 20°C), with *Alexandrium minutum* fed at concentrations of 200 cell ml<sup>-1</sup> (A) or 5 000 cell ml<sup>-1</sup> (B). Comparison of the faecal types (see Fig. 1) after 6 hours of contact with *Tetraselmis suecica* for oysters previously fed with 200 cell ml<sup>-1</sup> (C) and 5 000 cell ml<sup>-1</sup> (D) *Alexandrium minutum* ..... 49
- Fig. 21 The effect of algal species on gut passage time (A, B) and on the faecal type (C, D; see figure 1) for oysters, following the consumption of 200 cell ml<sup>-1</sup> (A, C) or 5 000 cell ml<sup>-1</sup> (B, D) *Alexandrium minutum* or *A. catenella*. ..... 50
- Fig. 22 Modelling the apparition of faeces in oysters (a) containing *Alexandrium* spp. (- -) and *Tetraselmis suecica* (-) and the faecal composition (b) over time. .... 53
- Fig. 23 (a) Sampling of mussel stomach with a « roved director ». (b –c) *Dinophysis acuta* entire cell and half-valve, c.l.: Cingular list, s.l.: Sulcal list. (d) Stomach content with three half-valves of *Dinophysis spp* D1 presents no cingular nor sulcal list, D2 misses its two sulcal lists as D3. (e) Faeces content with four *Dinophysis spp*.half-valves and a *Prorocentrum micans* entire cell. (f-h) Phytoplankton evolution after 45 minutes (f), 1h30 (g) and 2 h (h) in the stomach content of starved mussels. (f) *Dinophysis spp*. cells are undamaged, (g) all the cells are coated, (h) *Dinophysis spp*. cells are emptying their cellular contents. Scale bar = 30µm. .... 57
- Fig. 24 Evolution of toxicity distribution between the different tissues during the contamination by *A. minutum* with a cell toxicity of  $1.15 \pm 0.07$  pq STX equiv. cell<sup>-1</sup>, as a percentage of the global toxicity (mantle, muscle, digestive gland, gonad and gills) during the contamination period from day 1 to day 4 (from light to dark green). Mean  $\pm$  standard deviation. .... 63
- Fig. 25 Toxin mean distribution in the different tissues during the four contamination days and for the three cell toxicities (Table 5): oysters from the Bay of Bourgneuf contaminated by *A. minutum* (light blue), oysters contaminated by *A. catenella* (blue)

and oysters from La Tremblade contaminated by <i>A. minutum</i> (dark blue). Mean with the standard deviations. * indicates significant ploidy difference; ns not significant.....	64
Fig. 26: Ultracentrifugation method.....	70
Fig. 27: Quantity of toxins in each fraction: pellet, lipid fraction and supernatant from the tube (A) and the tube (B). The light colour represents the acyl-ester and the dark one the free OA. ....	71
Fig. 28 Picture of the different pellets issued from ultracentrifugation (Fig. 26) (A) P700; (B) P28000; (C) P100000.....	72
Fig. 29 (A) Acid phosphatase activities (U) and (B) quantity of toxins in each fraction obtained with the method in the Fig. 26. Lysosome fraction corresponds to P700; mitochondria fraction to P28000; membrane fraction to P100000 and cytosol fraction to the supernatant from the last one centrifugation. ....	73
Fig. 30 Relation between acid phosphatase activities (in U) and quantity of toxins (ng). The regression is done with the tools curve fitting tools from Matlab 6.5 with the algorithm bisquare. ....	73
Fig. 31 Theoretical simplified diagram representing the fate of <i>Alexandrium spp.</i> cells in oyster. The mollusc uptakes <i>Alexandrium spp.</i> cells from external medium. Once in the stomach, a minority of cells is degraded and releases toxins. Part of cell fragments and free toxins is transferred to the digestive gland to undergo intracellular digestion, allowing the incorporation of toxic molecules in digestive gland tissues. Toxins are then transferred from the digestive gland to the other organs. The elimination of entire cells, cellular fragments and free toxin is processed by the intestine.....	78
Fig. 32 Theoretical simplified diagram representing the fate of <i>Dinophysis spp.</i> cells in mussel. The mollusc uptakes <i>Dinophysis spp.</i> cells. Once in the stomach, all the cells are degraded and release toxins. Part of cell fragments and free toxins are transferred to the digestive gland to undergo an intracellular digestion, allowing the incorporation of toxic molecules in cells of the digestive gland. DTXs Molecules in the cell cytosol seem to be free and AO and DTX1 acylation is performed in lysosomes. The elimination of cell fragments and free toxins is processed by the intestine. ....	79
Fig. 33 Evolution of (A) toxin standard concentrations: STX (orange), GTX2 (blue) and GTX3 (green) and GTX2/3 extracted from <i>Alexandrium minutum</i> . All toxins stayed in raw seawater during 15 days. Mean with standard deviation. ....	80
Fig. 34 Contamination of diploid (orange) and triploid (green) oysters during (a) November, (b) March and (c) June. (vertical bars correspond to the standard deviations n=3; * indicates significant ploidy difference; ns not significant) .....	92
Fig. 35 Evolution of toxin content in the different tissues (muscle, mantle gills, gonad, digestive gland) of the diploid (orange) and triploid (green) oysters on June during the four contamination days. (Vertical bars correspond to the standard deviations n= 3; * indicated significant ploidy difference; ns none significant difference between ploidies.) .....	93

Fig. 36 Diagram showing the experimental steps of contamination and detoxication (RC: raceway) .....	103
Fig. 37 Valve activity (%) during the detoxification period with different diets: <i>S. costatum</i> (—); <i>S. costatum</i> + silt (...); control (unfed oysters ---).....	106
Fig. 38 Filtration rates of oysters fed <i>S. costatum</i> (—) ; <i>S. costatum</i> + silt (...)	107
Fig. 39 a) Digestive gland toxin content ( $\mu\text{g STX equiv. } 100\text{g}^{-1}$ ) of oysters fed <i>S. costatum</i> (—) $y=1405 \exp (-0.27t)$ ; oysters fed <i>S. costatum</i> + silt (...) $y= 1405 \exp (-0.38t)$ ; Control (---) $y = 1405 \exp (-0.08t)$ . b) Detoxification kinetics of flesh without digestive gland for oysters fed <i>S. costatum</i> (—) $y = 77 \exp (-0.33t)$ ; <i>S. costatum</i> + silt (...) $y = 77 \exp (-0.35t)$ ; Control (---) $y = 77 \exp (-0.12t)$ . All trends redrawn from the same initial toxin content. ....	107
Fig. 40 Overall detoxification kinetics ( $\mu\text{g STX equiv. } 100\text{g}^{-1}$ flesh) of oysters fed <i>S. costatum</i> (—) $y = 438 \exp (-0.27t)$ ; <i>S. costatum</i> + silt (...) $y = 438 \exp (-0.36t)$ ; Control (---) $y = 438 \exp (-0.12t)$ . ....	108
Fig. 41 a) The prediction bounds with the a 95% confidence level for detoxification kinetics of the digestive gland for <i>S. costatum</i> diet (—) ; <i>S. costatum</i> + silt (...); Control (---).All trends redrawn from the same initial toxin content. b) The prediction bounds with the a 95% confidence level for detoxification kinetics of the total flesh for <i>S. costatum</i> diet (—) ; <i>S. costatum</i> + silt (...); Control (---).All trends redrawn from the same initial toxin content. ....	109
Fig. 42 Phytoplankton toxin profiles (%) and oyster toxin profiles (%) in the digestive gland and remaining flesh at the end of contamination. ....	111
Fig. 43 a) Epimerisation as a result of GTX3/GTX2, C2/C1 and dcGTX3/dcGTX2 ratioevolution during detoxification. b) hydrolysis (C1/GTX2 and C2/GTX3 ratio) and decarbamylation (GTX2/dcGTX2 and GTX3/dcGTX3 ratios) during detoxification. ....	111
Fig. 44 (A) Free and (B) total OA detoxification kinetics of mussels containing OA for diets: $10\text{-}15 \times 10^3$ (orange), $20\text{-}30 \times 10^3$ (red) cells $\text{mL}^{-1}$ of <i>S. costatum</i> in comparison with mussels starved (blue) .....	118
Fig. 45 One- and two-compartment models.....	129
Fig. 46 Distribution of 45 individuals oysters with the same initial contamination according to their mean toxin contents. ....	132
Fig. 47 Simplified representation of the PSP toxin changes in oyster <i>Crassostrea gigas</i> . ....	136
Fig. 48 A- System input according to the $Q_{\text{tox}}$ defined by Baron et al. (2006) in $\mu\text{g STX equiv. per oyster}$ ; B- System measurement according to the digestive gland toxin content in $\mu\text{g STX equiv. per oyster}$ . ....	137
Fig. 49 Simulation of the seven-compartment model corresponding to figure 47 and annexe 3. A1 Stomach toxin content along time, A2 zoom on the end of contamination and the	

beginning of detoxification, we can notice stomach toxin content is equal to 0 after 0.09 days, the green curve show the end of the contamination. B1 Intestine toxin content along time, B2 zoom on the end of contamination and the beginning of the detoxification, we can notice intestine toxin content is equal to 0 after 0.18 days, the green curve show the end of the contamination. C digestive gland toxin content along time. D Relative importance of every compartment in the total toxin contents during four days of contamination. .... 138

Fig. 50 Comparison of digestive gland toxin contents evolution from a one-compartment model  $\frac{dC_{GD}}{dt} = 0,397 \times Q_{tox} - 0,29C_{GD}$  (orange), and from a three-compartment model (stomach, intestine and digestive gland; dark blue). When the three-compartment model is used the digestive gland alone is indicated in light blue. .... 139

Fig. 51 Seven-compartment model coefficients, the digestive tract is 4.2 cm, the speed 30 cm d<sup>-1</sup> and the axial dispersion coefficient is 0.23 cm<sup>2</sup>. .... 140

Fig. 52 Modelling other tissue toxin contents from a two-compartment model  $\frac{dC_{GD}}{dt} = 0,397 \times Q_{tox} - 0,29C_{GD}$  and  $\frac{dC_{AT}}{dt} = 0,29C_{GD} - 0,793C_{AT}$  (orange), and from a seven-compartment model (dark blue). The pink stars represent the toxin content. .... 140

Fig. 53 Five-compartment model proposal ..... 141

Fig. 54 Simplified representation of the two-compartment model and its mathematical transcription with  $Q_a$  : Quantity of toxins in µg STX equiv. In the tissue a ;  $k_a$  : Detoxification coefficient of tissue a in day<sup>-1</sup> ;  $P_a$  : Wet weight of tissue a in g ;  $T_{a \rightarrow b}$  : Transfer from compartment a to compartment b in day<sup>-1</sup> ;  $C_{totale}$  : Total toxin concentration in µg STX equiv. per 100g of wet weight ;  $gd$  digestive gland and  $at$  other tissues. .... 142

Fig. 55 Representation of the two-compartment model, the digestive gland is represented in blue and the other tissues in green. Crosses represent the values of the known toxin contents. DG: digestive gland; OT other tissues. .... 142

Fig. 56 Representation of the five-compartment model. A other tissues: gonad (green), mantle (red), gills (purple) and muscle (blue). B values of model coefficients. C Digestive gland. Crosses represent the values of the known toxin contents. DG. Digestive gland. .... 143

Fig. 57 Comparison of the total toxin quantity in total flesh simulated with the two-compartment model (Fig. 55 ; green ; sse = 2.4697) and with the five-compartment model (Fig. 56, blue, sse = 2.5716). Crosses represent the values of the known toxin contents. .... 143

Fig. 58 Representation of the two-compartment model performed on triploid oyster, the digestive gland is represented in blue and the other tissues in green. Crosses represent the values of the known toxin contents. DG: digestive gland; OT other tissues. .... 144

- Fig. 59 Representation of the five-compartment model. A other tissues: gonad (green), mantle (red), gills (purple) and muscle (blue). B values of model coefficients. C Digestive gland. Crosses represent the values of the known toxin contents. DG. Digestive gland. .... 144
- Fig. 60 Comparison of the total toxin quantity evolution in the total flesh modeled with the two-compartment model ( Fig. 58; green ; sse = 12.0647) and from the five-compartment model (Fig. 59, blue, sse = 10.370). Crosses represent the values of the known toxin contents..... 145
- Fig. 61 Validation assay of the five-compartment model (Fig. 59B). A other tissues: gonad (blue), mantle (red), gills (purple) and muscle (green). B Digestive gland. C total toxin quantity (sse : 74.9331) Crosses represent the values of the known toxin contents. .... 146
- Fig. 62 First validation assay of the model of triploid contamination when using detoxification data. A Variation of toxin quantity in function of the time. B kinetics of the different tissues: muscle (green), mantle (red), gills (purple) and gonad (in blue). Crosses represent the values of the known toxin contents. .... 147
- Fig. 63 Second validation assay of the model of triploid contamination data when using detoxification data. A Variation of toxin quantity in function of the time. B kinetics of the different tissues: muscle (green), mantle (red), gills (purple) and gonad (in blue). Crosses represent the values of the known toxin contents. .... 147
- Fig. 64 Different two-compartment models with their solutions. .... 150
- Fig. 65 Contamination and detoxification kinetics of *Perna viridis* by PSP toxins from Silvert et al. (1995) data. Kinetics of total toxin content (dark blue), free toxins (red) and bound toxins (bleu clair) (A)  $k_1=0.3267$  ;  $T_{1-2} = 0.3482$  ;  $T_{2-1} =0.2539$  et sse= 27,932 (B)  $k_1=0.2432$  ;  $T_{1-2} = 0.1296$   $T_{2-1}=0.1989$  et sse= 27,982. Crosses represent the values of the known toxin contents. .... 151
- Fig. 66 (A)Contamination and detoxification kinetics of *Perna viridis* by PSP toxins from Silvert et al. (1995) data. Kinetics of total toxin content (dark blue), free toxins (red) and bound toxins (bleu clair)  $k_1=0.3267$  ;  $T_{1-2} = 0.5020$  ;  $k_2=0.1001$  (B) Comparison between the last model (green) and the model in the figure 65 A (bleu) Crosses represent the values of the known toxin contents. .... 152
- Fig. 67 Conversion coefficient of the different saxitoxin analogues. STX : saxitoxin, GTX : gonyautoxin, Neo : neosaxitoxin, dc decarbamoyl, C toxin C..... 155
- Fig. 68 Diagram taking back biotransformations described by Oshima. GTX: gonyautoxins, dc: décarbamoyle, STX: saxitoxin, C: toxin C..... 156
- Fig. 69 Simplified diagram of biotransformations according to the presence of toxins in the microalgae *Alexandrium minutum* and in the oyster *Crassostrea gigas*..... 158
- Fig. 70 First adjustment assay of the simplified model taking into account the biotransformations in the digestive gland. A-Detoxification kinetics of the compounds C1 (blue), C2 (green), GTX2 (red) and GTX3 (black). B- Detoxification kinetics of the compounds dcGTX2 (in blue) and dcGTX3 (in green). C- Detoxification kinetics

comparison of the total toxin contents in digestive gland between the model taking into account the biotransformations (sse = 16 995) and the model not taking into account them (sse= 16 024) . D Relative importance of the different compound (C1 blue, C2 green, GTX2 red, GTX3 black, dcGTX2 yellow and dcGTX3 cyan) with regard to the toxin contents expressed in  $\mu\text{g STX equiv. per } 100 \text{ g}$  of digestive gland. D- Coefficient values of the model taking into account the biotransformations. E - Coefficient values of the model not taking into account the biotransformations. Crosses represent the values of the known toxin contents..... 160

Fig. 71 Second adjustment assay of the simplified model taking into account the biotransformations in the digestive gland. A-Detoxification kinetics of the compounds C1 (blue), C2 (green), GTX2 (red) and GTX3 (black). B- Detoxification kinetics of the compounds dcGTX2 (in blue) and dcGTX3 (in green). C- Detoxification kinetics comparison of the total toxin contents in digestive gland between the model taking into account the biotransformations (sse =  $4.0624 \times 10^3$ ) and the model not taking into account them (sse =  $6.1080 \times 10^3$ ) . D Relative importance of the different compound (C1 blue, C2 green, GTX2 red, GTX3 black, dcGTX2 yellow and dcGTX3 cyan) with regard to the toxin contents expressed in  $\mu\text{g STX equiv. per } 100 \text{ g}$  of digestive gland. D- Coefficient values of the model taking into account the biotransformations. E - Coefficient values of the model not taking into account the biotransformations. Crosses represent the values of the known toxin contents..... 161

Fig. 72 Third adjustment assay of the simplified model taking into account the biotransformations in the digestive gland. A-Detoxification kinetics of the compounds C1 (blue), C2 (green), GTX2 (red) and GTX3 (black). B- Detoxification kinetics of the compounds dcGTX2 (in blue) and dcGTX3 (in green). C- Detoxification kinetics comparison of the total toxin contents in digestive gland between the model taking into account the biotransformations (sse =  $6.7316 \times 10^4$ ) and the model not taking into account them (sse =  $7.8780 \times 10^4$ ) . D Relative importance of the different compound (C1 blue, C2 green, GTX2 red, GTX3 black, dcGTX2 yellow and dcGTX3 cyan) with regard to the toxin contents expressed in  $\mu\text{g STX equiv. per } 100 \text{ g}$  of digestive gland. D- Coefficient values of the model taking into account the biotransformations. E - Coefficient values of the model not taking into account the biotransformations. Crosses represent the values of the known toxin contents..... 162

Fig. 73 Adjustment assay of the model taking into account the biotransformations from the dataset established with the three datasets (Fig. 70,71 and 72). A- Kinetics of the different compounds (C1 blue, C2 green, GTX2 red, GTX3 black, dcGTX2 magenta and dcGTX3 cyan). B- Global kinetics of the digestive gland. C- Model coefficient values. Crosses represent the values of the known toxin contents..... 163

Fig. 74 Detoxification kinetics simulations in function of the GTX3/(GTX2+GTX3) ratio: 100% GTX3 (dark blue), 66% GTX3 and 33 % GTX2 (green), 33% GTX3 and 66% GTX2 (red), 100% GTX2 (light blue). Dotted line represent the kinetics using the coefficient  $k = 0,1872 \times \frac{[GTX3]}{[GTX3]+[GTX2]} + 0,1447$  ..... 165

Fig. 75 Adjustment assay of the models taking into account the biotransformations on the dataset established from the three datasets. A- Kinetics of the various compounds realized with the model taking into account toxin resulting from the digestive gland (C1

blue, C2 green, GTX2 red, GTX3 black, dcGTX2 magenta, dcGTX3 cyan). B- Kinetics of the various compounds realized with the model not taking into account toxin resulting from the digestive gland (C1 blue, C2 green, GTX2 red, GTX3 black, dcGTX2 magenta, dcGTX3 cyan). C- Comparison between both models: model taking into account input resulting from the digestive gland (red) and model which have it input equal to zero (blue). Crosses represent the toxin content values. Values of Models coefficients are indicated in Table 10. .... 167

Fig. 76 Comparison between the different total flesh models with the same dataset : model taking into account the different toxic compounds (blue), two compartment model (digestive gland and other tissues, red), Crosses represent the toxin content values. .... 169

Fig. 77 Possible biotransformations of okadaic acid (OA) and dinophysistoxins (DTX). .... 172

Fig. 78 Detoxification kinetics of free OA (blue) and acyl-OA (green) for (A) unfed mussel, (B) mussel fed on the first food level and (C) mussels fed on the second food level. Crosses represent the toxin content values. .... 173

Fig. 79 Detoxification rate of mussels containing diarrhetic toxins in function of the food level. .... 175

Fig. 80 (A) Temperature (blue) and concentration of total algal cell carbon (green) during the detoxification. (B) Detoxification kinetics of 1 year old mussels (green) and of 2 years old mussels (orange). These two kinetics followed the equations:  $y = y_0 \times \exp(-0.0243t)$  for 1 year old mussels and  $y = y_0 \times \exp(-0.035t)$  for two years animals. The same equation was applied but with a detoxification rate depending on the environmental data. As a result, the detoxification rate (data are not standardized) became  $k = 0.0139 \times \text{temperature } (^{\circ}\text{C}) + 9.2899 \times 10^{-5} \times \text{Carbon } (\mu\text{g L}^{-1}) - 0.0342$  for the 1 year old mussels (dark blue) and  $k = 0.006 \times \text{temperature } (^{\circ}\text{C}) + 2.5011 \times 10^{-5} \times \text{Carbon } (\mu\text{g L}^{-1}) - 0.0342$  for 2 year old mussels (light blue). (C) Detoxification rate evolution corresponding to the different equations of the last graphic. .... 179

Fig. 81 Detoxification kinetics of mussels containing DSP toxins with detoxification coefficient depending on environmental variables. (A) with the detoxification coefficient constant (red) and depending on chlorophyll and temperature (blue). (B) Detoxification coefficient constant (red) and depending on chlorophyll (green) and temperature (blue). Crosses represent the toxin content values. Coefficient values are in the table 14. .... 180

Fig. 82 A Detoxification kinetics of mussels containing diarrhetic toxins according to an one-compartment model) B- Variation of the two detoxification coefficients during the detoxification kinetics. ( $k=0.0278$  in red and  $k= 0.019 + 8.962 \times 10^{-4} \times \text{Temperature} + 0.0026 \times \text{Chlorophyll}$  in blue) .... 181

## TABLEAUX

Table 1 Relative toxicity to mice of some algal toxins compared with cyanide taken in reference and cobra toxins according to Zingone & Enevoldsen (2000). .....	4
Table 2 Summary of the various identified phycotoxins, their effects on man, the phytoplankton producters and their distribution. ....	13
Table 3 Summary table showing the results for the different experiments, with gut passage time and faecal type after 6 hours of contact with <i>Tetraselmis suecica</i> . ....	46
Table 4: Concentration of <i>Dinophysis spp.</i> (in cells L <sup>-1</sup> ) at different depths. ....	54
Table 5 : Summary of the three experiments performed in individual tanks during four days. ....	62
Table 6 Summary of the oyster characteristics. ....	89
Table 7 Theoretical calculation of time needed to detoxify <i>Crassostrea gigas</i> when the initial toxicity level is: 200 STX eq. 100 g <sup>-1</sup> wet flesh. Minimal and maximal times correspond to prediction bounds with 95% confidence level. ....	109
Table 8 Detoxification rate (day <sup>-1</sup> ) and half life (day) of the mussel fed on 10-15,000 cell mL <sup>-1</sup> , 20-30,000 cell mL <sup>-1</sup> of <i>Skeletonema costatum</i> and of starved mussel .....	118
Table 9: Quantity of palmitic acid (16:0) in <i>Skeletonema costatum</i> and in <i>Isochrysis galbana</i> grown in exponential phase (Robert et al. 2004). ....	122
Table 10 Coefficient values obtained during the adjustment of the two models on the other tissues. ....	168
Table 11 Detoxification coefficient values for the model 1 taking into account the different toxic compounds, the model 2 is a two-compartment model (Digestive gland and the other tissues). ....	170
Table 12 Values of the coefficient obtained for the best adjustments in three conditions of food. ....	174
Table 13 Values of sum square errors function of the different model and the food level. ....	175
Table 14 Detoxification rate values obtained and the sum square of errors. ....	181



# **Introduction générale**



Les dernières décennies ont vu une augmentation des efflorescences de microalgues en milieu marin (Cordier et al. 2000), produisant ainsi des eaux colorées se déclinant du brun au rouge dans le monde entier (Hallegraeff 1995, Bricelj & Shumway 1998a). Ces eaux colorées sont la résultante d'une concentration pouvant aller jusqu'à plusieurs millions de cellules microalgales par litre. Les microalgues sont préférentiellement consommées par des organismes filtreurs et notamment des mollusques bivalves. Certaines d'entre elles sont capables de synthétiser des métabolites secondaires toxiques qui sont alors libérés et accumulés chez le consommateur primaire. Ce consommateur primaire va lui-même servir de proie à un consommateur secondaire et ainsi de suite, permettant aux métabolites de s'accumuler dans les différents maillons de la chaîne alimentaire (Jiang et al. 2006, 2007). Ainsi, des mollusques bivalves ou des poissons phytophages peuvent se révéler toxiques en cas de consommation par l'homme. Parmi ces métabolites secondaires d'origine phytoplanctonique, on trouve des phycotoxines, classées en cinq grandes familles selon les symptômes apparents chez l'homme (Garthwaite 2000, Frémy & Lassus 2001) : (i) les toxines amnésiantes (ASP : Amnesic Shellfish Poisoning) sont produites par des diatomées du genre *Pseudo-nitzschia*. La première mise en évidence de ces toxines remonte à 1987 au Canada, lorsque 145 personnes ont été intoxiquées après avoir consommé des moules provenant de l'île du Prince Edouard (Smith 1993) ; (ii) les toxines diarrhéiques (DSP : Diarrhetic Shellfish Poisoning) sont produites par des dinoflagellés du genre *Dinophysis* ou *Prorocentrum*. Les premières intoxications humaines ont été mises en évidence en 1976 au Nord du Japon après la consommation de moules et de pectinidés (Yasumoto et al. 1978, 1980) ; (iii) les neurotoxines (NSP : Neurotoxic Shellfish Poisoning) sont produites par le dinoflagellé *Karenia brevis*. Les premiers cas d'intoxication datent de 1844 dans le Golfe du Mexique (Amzil et al. 2001) ; (iv) les toxines paralysantes (PSP : Paralytic Shellfish Poisoning) sont produites par des dinoflagellés du genre *Alexandrium*. Les premiers cas d'intoxication humaine ont été relatés dans le carnet de bord de l'expédition « Vancouver » en 1793 où une partie de l'équipage a été intoxiqué (Amzil et al. 2001); (v) la ciguatera (CFP : Ciguatera Fish Poisoning) a pour origine la microalgue *Gambierdiscus toxicus*. Les premiers cas d'intoxication par consommation de poissons contaminés sont décrits en 1511, d'abord dans les Antilles puis dans différentes îles de l'océan Indien (1601) puis dans des archipels de l'océan Pacifique (1606) (FAO, 2004). C'est une intoxication provoquant des troubles gastro-intestinaux et neurologiques.

Les mollusques bivalves, consommateurs primaires, peu mobiles, sont capables de concentrer de larges volumes d'eau par unité de temps, et sont relativement insensibles vis-à-

vis des phycotoxines (Bricelj & Shumway 1998a). Ce sont de bons vecteurs de transmission des toxines aux autres maillons de la chaîne alimentaire, dont l'homme (Choi et al. 2006, Kvitek et al. 2008). Par mesure de précaution, des seuils sanitaires spécifiques à chaque toxine ont été mis en place (directive européenne 91/492/EEC). Lorsque ces seuils sont atteints ou dépassés dans la chair des mollusques, les zones conchylicoles sont fermées avec l'interdiction de la vente des mollusques. Ceci peut entraîner des pertes économiques et une méfiance du consommateur vis-à-vis des producteurs et de la grande distribution (Bricelj & Shumway 1998a, Lassus et al. 2005, Gueguen et al. 2008). Ainsi en Nouvelle Angleterre, en 2005, des fermetures de zones conchylicoles ont entraîné un préjudice financier chiffré à 23 millions de dollars (Jin et al. 2008).

La production de l'industrie aquacole française s'élevait à 243 907 tonnes en 2004, ce qui la place au deuxième rang européen (FAO, 2009). Cette production est dominée par les mollusques avec notamment 105 250 tonnes d'huîtres creuses (*Crassostrea gigas*) et 74 100 tonnes de moules (*Mytilus edulis*). La conchyliculture compte 55 000 concessions recensées dans le domaine public maritime, représentant 3 700 entreprises réparties sur six secteurs géographiques : la Basse Normandie, la Bretagne, les Pays de la Loire, le Poitou-Charentes, l'Aquitaine et le Languedoc-Roussillon. Le secteur conchylicole est principalement orienté vers la consommation nationale traditionnelle avec quelques exportations d'huîtres creuses en Italie, Belgique et en Allemagne. La balance commerciale positive pour les mollusques et les crustacés correspond à environ 12 millions d'euros en France. **Les huîtres et les moules sont les deux principales espèces produites en tonnages (Fig. 1) et seront, de ce fait, retenues comme modèles dans ce travail de thèse.**

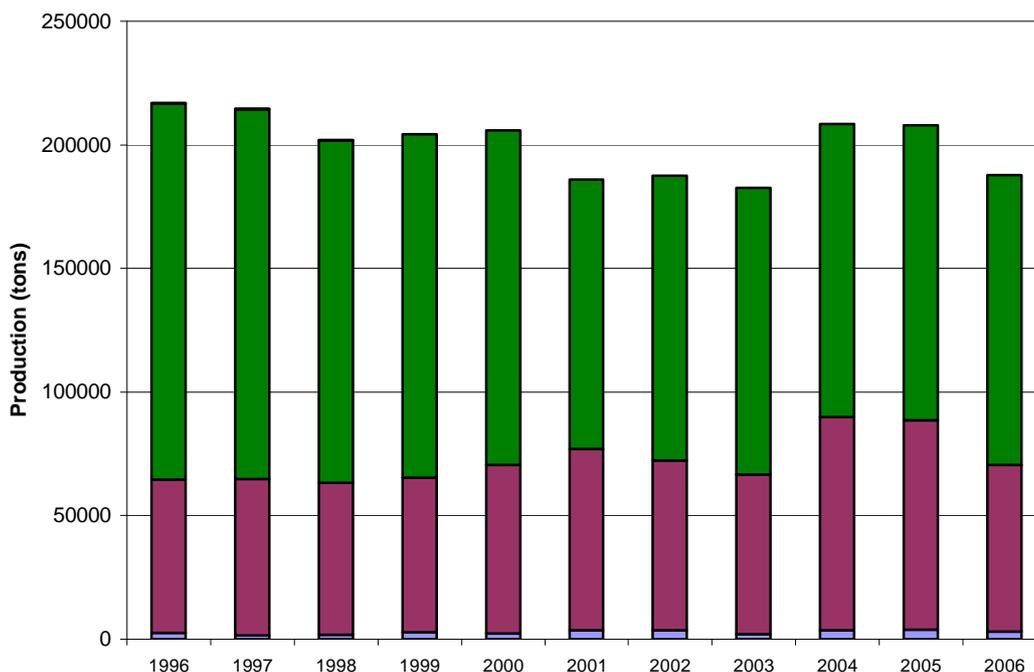


Fig. 1 French mollusc production in tons between 1996 and 2006: clams and cockles (in blue), mussels (in purple) and oysters (in green). (FAO, 2009).

Figure 1 Production française en tonnes de 1996 à 2006 : palourdes et coques (en bleu), moules (en violet) et huîtres (en vert). (FAO, 2009)

En France, les trois types de toxines présentes le long des côtes sont les toxines diarrhéiques, les toxines paralysantes et les toxines amnésiantes. Les toxines diarrhéiques sont apparues en 1983 (Lassus et al. 1988, Marcaillou et al. 2000) suivies des toxines paralysantes en 1988 (Ledoux et al. 1991, Masselin et al. 2000, Sechet et al. 2003); les toxines amnésiantes ne sont quant à elles détectées sur les côtes françaises que depuis dix ans (Amzil et al. 2001). Ces apparitions ne concernent pas uniquement la France mais l'ensemble des côtes mondiales (Van Egmond et al. 1993, Bricelj & Shumway 1998). Les neurotoxines et les ciguatoxines ne sont pas présentes le long des côtes de la métropole ; mais il faut rappeler la présence de ciguatera dans les Antilles et en Polynésie française.

En 2008, plus de trois fermetures de zones aquacoles sur quatre sont liées à la présence de toxines lipophiles (toxines diarrhéiques et associées lors de l'extraction) tandis que les toxines amnésiantes provoquent des fermetures pouvant durer plusieurs mois, comme en baie de Seine en 2004-2005 (Amzil, comm. pers.). Deux cas de mollusques contaminés par des toxines paralysantes ont été observés au cours de ces trois dernières années mais sans conséquences en terme de santé humaine. Malgré ces observations, les toxines paralysantes restent pour la métropole, les toxines les plus dangereuses en cas d'ingestion par l'homme

(Tableau 1). Les **toxines diarrhéiques et les toxines paralysantes** ont donc été retenues pour cette étude, dans la mesure où les premières se placent en tête des contaminations les plus fréquemment rencontrées sur le littoral français, et que les secondes présentent le risque sanitaire majeur en cas d'intoxication.

Table 1 Relative toxicity to mice of some algal toxins compared with cyanide and cobra venom taken as reference according to Zingone & Enevoldsen (2000).

Tableau 1 Toxicité relative sur souris de certaines phycotoxines en comparaison avec le cyanure pris comme référence et le venin de cobra d'après Zingone & Enevoldsen (2000).

Toxins	Toxins family	Productor	Toxicity
Cyanide			1
okadaic acid	Diarrheic toxins	<i>Dinophysis spp.</i>	50
Domoic acid	Amnesic toxins	<i>Pseudo-nitzschia spp.</i>	80
Cobra toxins		Cobra (snake)	500
Saxitoxin	Paralytic toxins	<i>Alexandrium spp.</i>	1,100
Ciguatoxin	Ciguatera	<i>Gambierdiscus toxicus</i>	22,000

La perte économique engendrée par la fermeture des zones est inquiétante pour les professionnels. Il est donc important de pouvoir trouver des solutions afin de limiter les périodes d'arrêt de vente. Plusieurs pistes sont envisageables. La première consiste à limiter la contamination des mollusques bivalves d'intérêt. Pour cela, il est possible de déplacer les mollusques bivalves dans des bassins à terres dès l'apparition des premières cellules phytoplanctoniques toxiques ; dans les zones bien stratifiées, les mollusques sur filières peuvent aussi être descendus sous la pycnocline qui correspond généralement au maximum des cellules de *Dinophysis spp.*, notamment dans les fjords norvégiens (Hovgaard, comm. pers.). La seconde piste consiste à **détoxifier** plus rapidement que dans la nature des mollusques déjà contaminés. C'est cette seconde piste qui a été choisie comme objectif appliqué pour cette étude. L'influence des stress thermique et osmotique, des chocs électriques, de la chute du pH et de l'ajout de chlore a déjà été testée par plusieurs auteurs (Bricelj & Shumway 1998, Fernandez et al. 2003). Aucune de ces méthodes n'a permis d'accélérer la vitesse de détoxication de mollusques bivalves contenant des phycotoxines. L'influence des paramètres environnementaux et intrinsèques a été mise en évidence par Blanco et al. (1997) et par Morono et al. (2001). Ces auteurs ont souligné que la prise en compte de la température, de la salinité et de la présence de matière en suspension sur des moules contenant des toxines paralysantes permettait d'améliorer la modélisation des

cinétiques de contamination / détoxification. Cependant, l'impact de la nourriture et de la température reste très controversé (Madenwald 1985, Marcaillou-Le Baut et al. 1993, Blanco et al. 1997, Bricelj & Shumway 1998, Blanco et al. 1999, Lassus & Marcaillou-Le Baut 2001, Svensson 2003, Duinker et al. 2007, Marcaillou et al. Submit). **Notre travail portera donc sur l'influence de quelques variables intrinsèques et extrinsèques intervenant dans la détoxification des mollusques.**

L'influence de ces variables n'est pas le seul paramètre à prendre en compte pour pouvoir optimiser la cinétique de détoxification. **Il est important de bien comprendre les mécanismes intervenant dans le devenir des toxines dans les mollusques bivalves.** Peu d'études se sont attachées à comprendre et à décrire ces mécanismes (Blanco et al. 2008).

Les **modèles mathématiques** permettant de prédire la cinétique de détoxification des mollusques bivalves contenant des phycotoxines représentent des outils importants dans l'aide à la gestion des zones conchylicoles contaminées. D'une part, de tels modèles aideraient à comprendre les mécanismes biologiques et les paramètres environnementaux pouvant modifier la cinétique de détoxification ; d'autre part, ils permettraient de prédire le temps nécessaire à la détoxification et fourniraient les informations préalables à l'établissement de modes opératoires convenant à des pilotes de détoxification. A l'heure actuelle, les modèles développés sont des modèles dits à compartiments. Ils sont généralement constitués d'une ou deux « boîtes noires » -systèmes dont on ne connaît que les entrées et les sorties (Silvert & Cembella 1995, Blanco et al. 1999, Lassus et al. 2007). Ces modèles permettent de bien décrire les cinétiques de détoxification observées, mais ils demandent le plus souvent à être ajustés pour chaque nouveau jeu de données. La prise en compte de la physiologie des mollusques, des propriétés physico-chimiques des toxines et des variables intrinsèques et extrinsèques pourrait permettre une meilleure prédiction des cinétiques de détoxification. **Ce travail vise à mettre en place un modèle décrivant la cinétique de détoxification, toute en étant doté de propriétés prédictives et de généralités** (Levins 1966). Ce point constituera le fil conducteur de la démarche de ce travail. Il permettra ainsi de formaliser au mieux l'ensemble des informations et des connaissances disponibles tout en développant un outil de simulation aisément exploitable.

Les objectifs de cette thèse sont donc de comprendre les mécanismes intervenant dans le devenir des toxines paralysantes et diarrhéiques respectivement dans les huîtres *Crassostrea gigas* et les moules *Mytilus edulis*, ainsi que l'influence des variables

environnementales et intrinsèques sur le processus de détoxification. Une fois ces mécanismes appréhendés, la mise en place de modèles de détoxification sera possible.

**Le premier chapitre** est consacré à **l'analyse des contaminations** de bivalves par des phycotoxines au niveau mondial. Puis, les **toxines paralysantes** et **diarrhéiques** seront étudiées plus en détails (les producteurs, les propriétés physico-chimiques des composés, leur impact et leur mode d'action sur les mollusques bivalves et sur l'homme et leur répartition géographique). La contamination des mollusques bivalves s'effectue lors de leur alimentation à partir de microalgues, leur **physiologie alimentaire** sera donc détaillée. Puis une dernière partie est consacrée à l'état actuel des connaissances sur l'interaction phycotoxines-mollusques.

**Le deuxième chapitre** s'intéresse au **devenir de la toxine dans le mollusque**, de son arrivée dans le système digestif sous forme particulière jusqu'à son excrétion via les fèces. Deux aspects sont développés dans cette partie. Le premier concerne le site de dégradation des cellules phytoplanctoniques toxiques dans le mollusque. Pour répondre à cette question, des prélèvements de contenus stomacaux et de fèces sont réalisés et observés par microscopie optique. Le second aspect correspond au transfert de la toxine une fois libérée dans le mollusque. Une première étude a été menée au niveau tissulaire et une seconde étude au niveau sub-cellulaire, à l'aide de la technique d'ultracentrifugation, en cherchant à établir un lien entre les toxines lipophiles et les lysosomes, organites qui pourraient séquestrer les toxines.

**Le troisième chapitre** est consacré à l'influence des **facteurs intrinsèques et extrinsèques** sur la cinétique de détoxification des huîtres et des moules contenant respectivement des toxines paralysantes et diarrhéiques. Les expériences menées en laboratoire se sont concentrées sur l'influence de la matière en suspension lors de la détoxification. L'influence de la ploïdie chez les huîtres lors de la contamination par des toxines paralysantes a également été étudiée.

**Le quatrième chapitre** s'appuie sur les trois chapitres précédents pour **mettre en place des modèles de détoxification** prenant en compte la physiologie des mollusques bivalves ainsi que les propriétés physico-chimiques des toxines. L'estimation paramétrique de ces modèles est discutée et les propriétés de ces derniers sont analysées.

The last decades saw an increase of microalgal blooms in marine environment (Ropemaker et al. 2000). They can produce colored waters ranging from brown to red all over the world (Hallegraeff 1995, Bricelj and Shumway 1998). These discolored waters are due to a concentration of microalgae that can reach several millions of cells per liter. Microalgae are consumed by filter-feeders, in particular bivalves. Some of them are able to synthesize toxic secondary metabolites which are then released and later on accumulated by primary consumers. Primary consumers can be used as preys for secondary consumers and so on, allowing metabolites to accumulate in the various steps of the food chain (Jiang and al. 2006, 2007). So, bivalves or fishes can themselves turn out to be toxic for man consumption. Among these secondary phytoplankton metabolites, we find phycotoxines, classified in five large families according to symptoms visible on man (Garthwaite 2000, Frémy & Lassus 2001): i) Amnesic Shellfish Poisoning toxins (ASP) are produced by diatoms of the genus *Pseudo-nitzschia*. The first occurrence of these toxins dates back to 1987 in Canada, when 145 persons got poisoned by the consumption of mussels from Prince Edouard Island (Smith 1993); ii) Diarrhetic Shellfish Poisoning toxins (DSP) are produced by dinoflagellates of the genus *Dinophysis* or *Prorocentrum*. The first human poisoning by DSP happened in 1976 in the North of Japan after the consumption of mussels and scallops (Yasumoto et al. 1978, 1980); iii) Neurotoxic Shellfish Poisoning toxins (NSP) are produced by the dinoflagellate *Karenia brevis*. The first case of poisoning occurred in 1844 in the Gulf of Mexico (Amzil and al. 2001); iv) Paralytic Shellfish Poisoning toxins (PSP) are produced by dinoflagellates of the genus *Alexandrium*. The first case of human poisoning was reported during the "Vancouver" cruise in 1793, when part of the crew was poisoned (Amzil and al. 2001); v) the ciguatera (CFP: Ciguatera Fish Poisoning) is produced by the microalga *Gambierdiscus toxicus*. The first cases of poisoning were described in 1511, at first in the West Indies then in various islands of the Indian Ocean (in 1601) and finally in archipelagos of the Pacific Ocean (in 1606) (FAO, 2004). This poisoning provokes gastrointestinal and neurological disorders.

The molluscs, as primary consumers with little mobility, capable of concentrating large volumes of water by unit of time and essentially insensitive towards phycotoxines (Bricelj and Shumway on 1998), are good vectors for toxin transmission to other steps of the food chain, including man (Choi and al. 2006, Kvitek and al. 2008). As a safety measure, specific sanitary thresholds were set up for every toxin (European directive 91 / 492 / EEC). When these thresholds are met in the mollusc flesh, shellfish areas are closed and mollusc sales banned, causing economic losses and the distrust of consumers towards producers and hypermarkets (Bricelj and Shumway 1998a, Lassus et al. 2005, Gueguen et al. 2008). For instance, in New England, in 2005, closures of shellfish areas induced a financial damage estimated at 23 million dollars (Jin and al. 2008).

French aquaculture production amounted to 243,907 tons in 2004, which corresponds to the second European rank (FAO, 2009). This production is dominated by molluscs with in particular 105,250 tons of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) and 74,100 tons of mussels (*Mytilus edulis*). Shellfish farming involves 55,000 concessions listed in the coastal public domain, representing 3,700

companies located in six geographical sectors: Basse-Normandie, Bretagne, Pays de la Loire, Poitou-Charentes, Aquitaine and Languedoc-Roussillon. Shellfish production is mainly aimed at the traditional national consumption, with some exports of Pacific oysters to Italy, Belgium and Germany. The trade balance for molluscs and shellfish is positive, with a surplus of approximately 12 million euros in France. Oysters and mussels are the two main species produced in tonnage (figure 1) and this is the reason why they will be more thoroughly studied in this thesis.

In France, the three types of toxins present along the coast are diarrheic, paralytic and amnesic toxins. Diarrheic toxins appeared in 1983 (Lassus et al. 1988, Marcaillou et al. 2000), followed by paralytic toxins in 1988 (Ledoux et al. 1991, Masselin et al. 2000, Sechet et al. 2003); as for amnesic toxins, they have been detected on the French coasts only for ten years (Amzil and al. 2001). These occurrences do not only concern France, but also coasts from all around the world (Van Egmond et al. 1993, Bricelj and Shumway 1998). On the other hand, neurotoxin and ciguatera are not present along metropolitan coasts, despite ciguatera is frequently observed in West Indies and French Polynesia.

In 2008, more than three closures of shellfish areas out of four were related to the presence of lipophilic toxins (diarrheic toxins and associated during extraction) whereas amnesic toxins induce closures that can last several months, as in the bay of Seine in 2004-2005 (Amzil, pers. com.). Two cases of molluscs contaminated by paralytic toxin were observed during the last three years but without consequences in terms of human health. In spite of these observations, paralytic toxins remain the most dangerous toxins in case of ingestion by man (Table 1). Diarrheic and paralytic toxins were thus chosen for this study: diarrheic toxins are involved in most contaminations along the French coast, while paralytic toxins present severe sanitary risks in case of poisoning.

The economic loss induced by production areas closures is a major concern for professionals. It is thus important to be able to find solutions to shorten the length of ban periods. Several approaches are possible. The first one consists in limiting bivalve contamination. For that purpose, it is possible to move bivalve in land-based relaying plants as soon as the first toxic phytoplankton cells are observed in surrounding waters; in well stratified zones, molluscs can also be dropped under the pycnocline where most of *Dinophysis spp.* cells are generally concentrated, in particular in the Norwegian fjords (Hovgaard, pers. com.). The second approach consists in detoxifying more quickly than in the nature the contaminated molluscs. This second approach was chosen as an objective for this study. The influence of thermal and osmotic stress, electric shocks, fall of pH and the addition of chlorine were already tested by several investigators (Bricelj et Shumway 1998a, Fernandez et al. 2003). None of these methods allowed to accelerate the detoxification kinetics of bivalves containing phycotoxins. The influence of the environmental and intrinsic parameters was revealed by Blanco et al. (1997) and by Morono et al. (2001). These authors emphasized that considering the effects of temperature, salinity and suspended material on PSP-contaminated mussels allowed an improvement of the contamination/detoxification kinetics modelling. However, the impact of food and temperature remains very

controversial (Madenwald 1985, Marcaillou-Le Baut et al. 1993, Blanco et al. 1997, Bricelj & Shumway 1998, Blanco et al. 1999, Lassus & Marcaillou-Le Baut 2001, Svensson 2003, Duinker et al. 2007, Marcaillou et al. Submit). As a result, our work will deal with the influence of some intrinsic and extrinsic variables on mollusc detoxification.

The influence of these variables is not the only parameter to be taken into account when trying to optimize detoxification kinetics. Indeed, It is important to understand mechanisms affecting toxin gradual change in bivalves. Few studies attempted to understand and to describe these mechanisms (Blanco and al. 2008). The mathematical models allowing detoxification prediction in bivalves containing phycotoxins represent an important tool for the management of contaminated shellfish area. On the one hand, such models would help to understand biological mechanisms and environmental parameters that can modify the detoxification kinetics; on the other hand, they would allow to predict the time needed for detoxification and would supply the preliminary information in the establishment of operating modes convenient for detoxification pilots. At the moment, ready-to-use models are “compartments” models. They are generally made of one or two "black boxes" – systems for which we only know inputs and outputs (Silvert & Cembella 1995, Blanco et al. 1999, Lassus et al. 2007). These models provide a good description of the observed detoxification kinetics, but they basically require an adjustment for every new data set. The consideration of mollusc physiology, toxin physico-chemical properties and intrinsic extrinsic variables could allow a better prediction of detoxification kinetics. This work will try to set up a model describing the detoxification kinetics also endowed with predictive properties (Levins 1966). This will be the connecting thread of the present work, formalizing all the information and the available knowledge and developing a tool for easily operating simulation.

The thesis objectives are to understand mechanisms interfering with paralytic and diarrheic toxin gradual changes, respectively in oysters *Crassostrea gigas* and mussels *Mytilus edulis*, as well as the environmental and intrinsic variable impacting the detoxification process. Once these mechanisms sufficiently understood, the implementation of detoxification models will be possible.

The first chapter is dedicated to the analysis of bivalve contamination by phycotoxins worldwide. Then, paralytic and diarrheic toxin will be studied in more detail (the producers, the physico-chemical properties of compounds, their impact and their mode of action on bivalves and man and their geographical distribution). Contamination of bivalves occurs through microalgae ingestion and consequently, feeding physiology will be described. Then a last part is dedicated to the current state of the knowledge on the interaction between phycotoxins and molluscs.

The second chapter deals with all kinds of changes in toxins, from their arrival in the digestive system as food particles, until their excretion via faeces. Two aspects are developed in this section.

The first one is the localization of toxic phytoplankton cell degradation in the mollusc. To answer this question, stomach contents and faeces are observed with light microscope. The second aspect corresponds to the transfer of the toxin once released in the mollusc. A first study was performed at tissue level and a second at subcellular level, by means of ultracentrifugation techniques, so as to establish a link between lipophilic toxin and lysosomes, organelles which could sequester toxin.

The third chapter is dedicated to the influence of intrinsic and extrinsic factors on detoxification kinetics of oysters and mussels containing respectively paralytic and diarrhetic toxins. The experiments carried out in laboratory focused on the influence of suspended matter during the detoxification. The influence of oyster ploidy during PSP-contamination was also studied.

The fourth chapter relies on the previous three chapters to set up detoxification models, taking into account bivalve physiology as well as toxin physico-chemical properties. The parametric estimation of these models is discussed and their properties are analyzed.

# **Chapitre 1 - Généralités**



## **Partie I - Les phycotoxines**

### **1 Généralités**

Depuis les années soixante-dix, on observe une augmentation globale du nombre d'épisodes toxiques liés aux phycotoxines (Fig. 2) (Hallegraeff 1995, Bricelj & Shumway 1998a, 1998b). Ce phénomène peut être la résultante de quatre processus. Tout d'abord, l'eutrophisation des eaux côtières, provenant des déchets domestiques, industriels ou agricoles, peut augmenter la production primaire et donc, indirectement la prolifération de microalgues toxiques. Ensuite, la prise de conscience scientifique, la mise en place de réseaux de surveillance et l'amélioration des techniques de détection ont sans doute contribué à amplifier le nombre d'épisodes toxiques détectés. On peut également relier ce phénomène à l'augmentation des zones côtières exploitées pour l'aquaculture. Enfin, l'introduction accidentelle de kystes temporaires ou de résistance via les eaux de ballasts ou le transfert de mollusques d'une zone à une autre peut induire une prolifération de microalgues toxiques ou nuisibles dans une nouvelle zone (Hallegraeff 1995).

A ce jour, plus d'une douzaine de toxines synthétisées par des microalgues marines ont été mises en évidence (Tableau 2). La transmission de ces molécules toxiques du phytoplancton à l'homme s'effectue toujours à l'aide d'un vecteur — mollusques bivalves, crustacés ou poissons phytophages et carnivores.

Cette présente étude a été réalisée en priorité sur deux familles de phycotoxines : les toxines paralysantes et les toxines diarrhéiques. Ce sont en effet ces composés qui posent actuellement les problèmes les plus aigus en matière de surveillance de la qualité sanitaire des mollusques bivalves en France ; les toxines paralysantes pour leur haut niveau de dangerosité et les toxines diarrhéiques pour leur large distribution en zone côtière (Belin 1998).

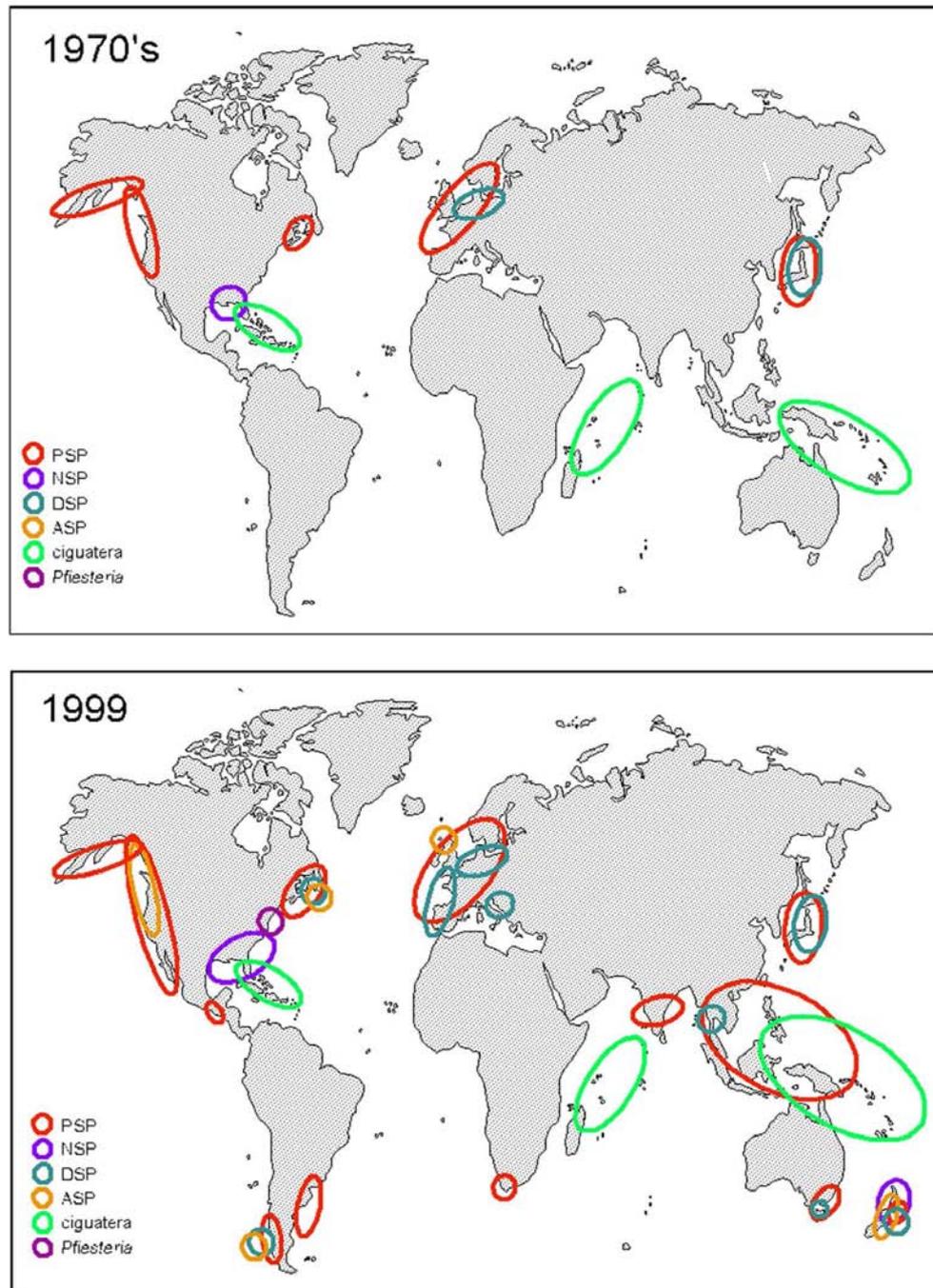


Fig. 2 Global increase in reported incidence of algal toxins. Encircled areas indicate where outbreaks have occurred or toxins have been detected at level sufficient to impact human or environmental health, adapted from Van Dolah (2000)

Figure 2 Augmentation mondiale du nombre d'épisodes toxiques liés aux phycotoxines. Les secteurs encadrés indiquent les zones où les toxines ont été détectées à des niveaux suffisant pour observer un impact sur la santé humaine ou sur l'environnement. Adapté de Van Dolah (2000)

PSP: Paralytic shellfish poisoning, NSP: Neurotoxic Shellfish Poisoning, DSP: diarrhetic Shellfish poisoning, ASP: Amnesic Shellfish Poisoning.

Table 2 A summary of the various identified phycotoxins, their effects on man, the related harmful their distribution species and their distribution.

Tableau 2 Récapitulatif des différentes phycotoxines identifiées, leurs symptômes chez l'homme, les espèces phytoplanctonique productrices et leur répartition.

DSP : diarrheic shellfish poisoning, PTX: pectenotoxins, YTX: yessotoxins, AZP: azaspiracids, FAT: fast acting toxins, PLT : palytoxine, PSP: paralytic shellfish poisoning, ASP: amnesic shellfish poisoning, NSP : neurotoxic shellfish poisoning, CFP : ciguatera Fish poisoning

	Phycotoxins	Caracteristic Symptom	Harmful algal species	Distribution
	<u>Lipophilic toxins</u>			
DSP	Diarrheic Phycotoxins	<u>Gastrointestinal</u>	<i>Dinophysis sp.</i>	Japan, Europe, Gulf of Mexico, Asia, Australia and North America
DSP	Okadaic Acid,	Diarrheas, nausea,	<i>Prorocentrum lima</i>	
DSP	Dinophysistoxins	vomiting, abdominal pains		
PTX	Pectenotoxins		<i>Dinophysis spp.</i>	
YTX	Yessotoxins		<i>Protoceratium reticulatum</i>	
AZP	Azaspiracids	Gastrointestinal nausea, vomiting, diarrheas, epigastrics pains, headaches, moderate fever	<i>Azadinium spinosum</i>	Pacific Ocean, Carribbean, Autralia
FAT	Gymnodimines Spirolides Pinnatoxines	Unknown	<i>Karenia selliformis</i> <i>Alexandrium ostenfeldii</i>	New Zealand, Australia, North Africa.
PLT	Palytoxins Ostreocins	skin and eyes irritation, fevers, dizzinesses, gastric and respiratory disorders, metal taste in the mouth, heart rhythm increases.	<i>Ostreopsis spp.</i>	
PSP	Saxitoxin	Digestive <b>Neurologic:</b> paresthesia in arms and legs, muscular and respiratory paralysis.	<i>Alexandrium spp.</i> <i>Gymnodinium catenatum</i> <i>Pyrodinium bahamense var. compressum</i>	Temperate to tropical areas
ASP	Domoic acid	Gastrointestinal <b>Neurologic:</b> Confusion, amnesic disorders	<i>Pseudo-nitzschia spp.</i>	Canada United States
NSP	Brevetoxins	Gastrointestinal <b>Neurologic:</b> Face, members paresthesia, inversion of thermal sensibility. Cardiovascular: bradycardy	<i>Karenia brevis</i>	Florida, Gulf of Mexico, New Zealand
CFP	Ciguatoxins Maitotoxins Gambierol?	Gastrointestinal <b>Neurologic:</b> face and member paresthesia, inversion of thermal sensibility, lower member ataxy, cardiovascular limbs: collapse and bradycardy	<i>Gambierdiscus toxicus</i>	Pacific Ocean, Carribbean, Autralia

## 2 Les toxines paralysantes

La première description d'une intoxication par consommation de mollusques bivalves contenant des toxines paralysantes date de 1793. Elle a été relatée dans le carnet de bord d'un des navires commandés par le capitaine Vancouver, lors d'une escale sur la côte Ouest du Canada. Ce premier cas a été réellement associé aux toxines paralysantes en 1927 (Kao 1993). Puis dans les années trente, un test aigu sur les souris a été mis en place pour éviter toute intoxication due à la consommation de mollusques bivalves. En 1957, une équipe japonaise a découvert l'origine des intoxications et a isolé le principe actif à partir de la praire *Saxidomus giganteus*, qui a donné son nom à la molécule de saxitoxine (STX) (Amzil et al. 2001).

### 2.1 Les producteurs

Cette famille de toxines est produite par des microalgues marines mais également par des cyanobactéries d'eau douce.

Les microalgues marines productrices de toxines paralysantes appartiennent toutes à la classe des Dinoflagellés. Les Dinoflagellés peuplent toutes les eaux, marines ou douces, mais seuls les Dinoflagellés marins peuvent synthétiser des toxines. Malgré une grande variabilité morphologique dans cette classe, quelques particularités peuvent être retenues. Les Dinoflagellés possèdent deux flagelles : l'un, dirigé latéralement, permet de faire tourner la cellule sur elle-même et contribue à la propulsion vers l'avant ; l'autre, dirigé postérieurement, exerce l'essentiel de l'effort de propulsion. En outre, la thèque, de nature cellulosique, est constituée de nombreuses plaques. Enfin, au niveau du noyau, les chromosomes sont condensés et présentent une mitose particulière, sans fuseau ni centromère.

A ce jour, environ vingt espèces de Dinoflagellés capables de produire des toxines paralysantes ont été répertoriées. Elles sont réparties dans deux ordres différents. L'ordre des Gymnodiniales sont la seule espèce toxique connue est *Gymnodinium catenatum* présente le long des côtes d'Amérique du Nord, d'Afrique du Nord et d'Europe du Sud (Estrada et al. 2007, Vale 2008). L'ordre des Péridiniales est caractérisé par une thèque épaisse aux plaques apparentes et présente deux groupes de producteurs de toxines : le genre *Pyrodinium*, avec *P. bahamense* var. *compressum* (Landsberg et al. 2006, Siringan et al. 2008), et le genre *Alexandrium* (refonte des genres *Gonyaulax*, *Protogonyaulax* et *Gessnerium*), dont les principales espèces d'eau tempérée sont *A. minutum* (Abouabdellah et al. 2008), *A.*

*tamarense* (Choi et al. 2006), *A. fundyense* (Bricelj et al. 1993) et *A. catenella* (Twarog et al. 1972).

Au cours de leur cycle vital les Dinoflagellés peuvent se présenter sous forme de cellules immobiles, appelées kystes de résistance, qui sédimentent au fond de l'eau et s'y accumulent. Lorsque les conditions de croissance sont favorables, ces kystes peuvent germer, repeupler la colonne d'eau sous forme de cellules végétatives et ainsi former des efflorescences (Ichimi et al. 2001b, Tsujino et al. 2002, Figueroa et al. 2005). Ces kystes issus des formes végétatives des espèces précédemment citées contiennent des toxines, ce qui implique que les mollusques peuvent aussi se contaminer en consommant ces formes de résistance (Persson et al. 2006).

Les cyanobactéries d'eau douce productrices de toxines paralysantes appartiennent principalement au genre *Anabaena* (van Apeldoorn et al. 2007), comprenant notamment les espèces *A. circinalis*, *A. perturbata* var. *tumida*, *A. spiroides*, toutes les trois présentes en Australie, *A. lemmeronii*, présente dans les lacs danois, et *A. flos-aquae*, présente en Amérique du Nord et au Portugal. Les autres espèces de cyanobactéries toxiques sont *Cylindrospermopsis raciborskii*, au Brésil (Saker et al. 2003), et *Planktothrix spp.* en Italie (Pomati et al. 2000). A ce jour, aucun rapport d'intoxication de l'homme par la STX présente dans l'eau douce n'a été mentionné (van Apeldoorn et al. 2007).

## **2.2 Les propriétés**

Les toxines responsables d'intoxication paralysante par la consommation de fruits de mer forment une famille composée de 21 molécules chimiquement proches, dérivées de la saxitoxine (Figure 3). Ces composés sont des tétrahydropurines polaires de faible poids moléculaire, thermostables, stables en milieu acide et instables en milieu alcalin (car susceptibles de s'oxyder). Elles sont classées en quatre grands groupes : les carbamates (la saxitoxine STX; les gonyautoxines GTX2, GTX3, GTX1, GTX4 ; la néo-saxitoxine NéoSTX), les N-sulfocarbamoyles (les toxines B : B1 ou GTX5, B2 ou GTX6 selon que l'on suit les terminologies japonaises ou nord-américaines; les toxines C : C1, C2, C3, C4), les décarbamoyles (dcSTX, dcGTX2, dcGTX3, dcGTX1, dcGTX6 et dcNEO) et les deoxydecarbamoyles (doSTx, doGTX2, doGTX3), qui possèdent un atome d'hydrogène en position R4.

Les différentes biotransformations possibles sont l'épimérisation, l'hydrolyse et la réduction (Oshima 1995). L'épimérisation correspond à l'inter-conversion des groupements

OSO<sub>3</sub><sup>-</sup> et H sur le carbone 11 (Fig 3 et 4). Cette réaction s'effectue préférentiellement à des fortes températures ainsi qu'à des pH élevés. Le groupe des N-sulfocarbamoyles (R4 = OONHSO<sub>3</sub><sup>-</sup>) présente un équilibre des formes épimères plus rapide que celui du groupe des carbamates (R4 = OONH<sub>2</sub>). Chez les Dinoflagellés, le groupement OSO<sub>3</sub><sup>-</sup> est principalement sous forme β (groupement en position 2 sur le carbone 11), alors que chez les bivalves, il se forme un équilibre entre les formes β et α pour obtenir un ratio de 1:3 (β:α). L'hydrolyse permet de convertir le groupement OOSO<sub>3</sub><sup>-</sup> en OONH<sub>2</sub> en position R4. Cette réaction s'effectue en chauffant à pH bas (Fig 3). Elle peut être catalysée par des enzymes telles que la carboymalase I (Lin et al. 2004). Un second type d'hydrolyse (Fig 4) peut s'effectuer facilement à pH neutre, permettant d'obtenir des formes décarbamoylées (OH en groupement R4) lorsque la température n'est pas trop faible. Cette hydrolyse se déroule dans le mollusque bivalve vivant. Les réductions peuvent résulter de la perte du groupement OH en position R1 (Fig 4) ou de la perte des groupements OSO<sub>3</sub><sup>-</sup> en position R2 ou R3. Des réducteurs naturels sont communément présents dans les mollusques, comme la glutathione, la cystéine ou le 2-mercaptoéthanol (Sakamoto et al. 2000). Ces réductions peuvent aussi être effectuées par des bactéries naturellement présentes dans les mollusques bivalves.

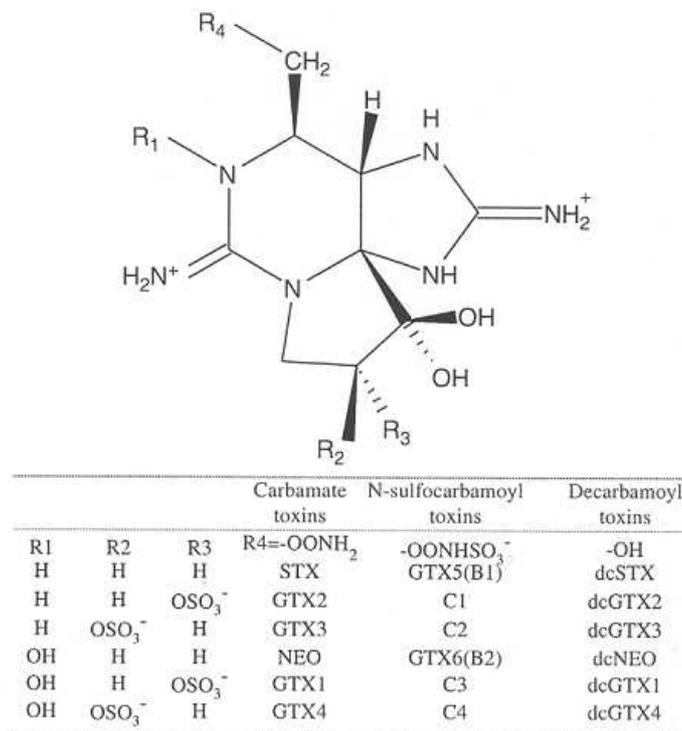


Fig. 3 Chemical structure of paralytic toxins. Only the 16 compounds more frequently found in the phytoplankton and molluscs are represented (Oshima, 1995).

Figure 3 Structure chimique des toxines paralysantes. Seulement 16 des composés les plus fréquemment observés dans les cellules de phytoplancton et dans les mollusques ont été représentés (Oshima, 1995).

STX : saxitoxine (saxitoxin) ; GTX : gonyautoxine (gonyautoxin) ; NEO : neosaxitoxine (neosaxitoxin) ; dc : décarbamoyle (decarbamoyle).

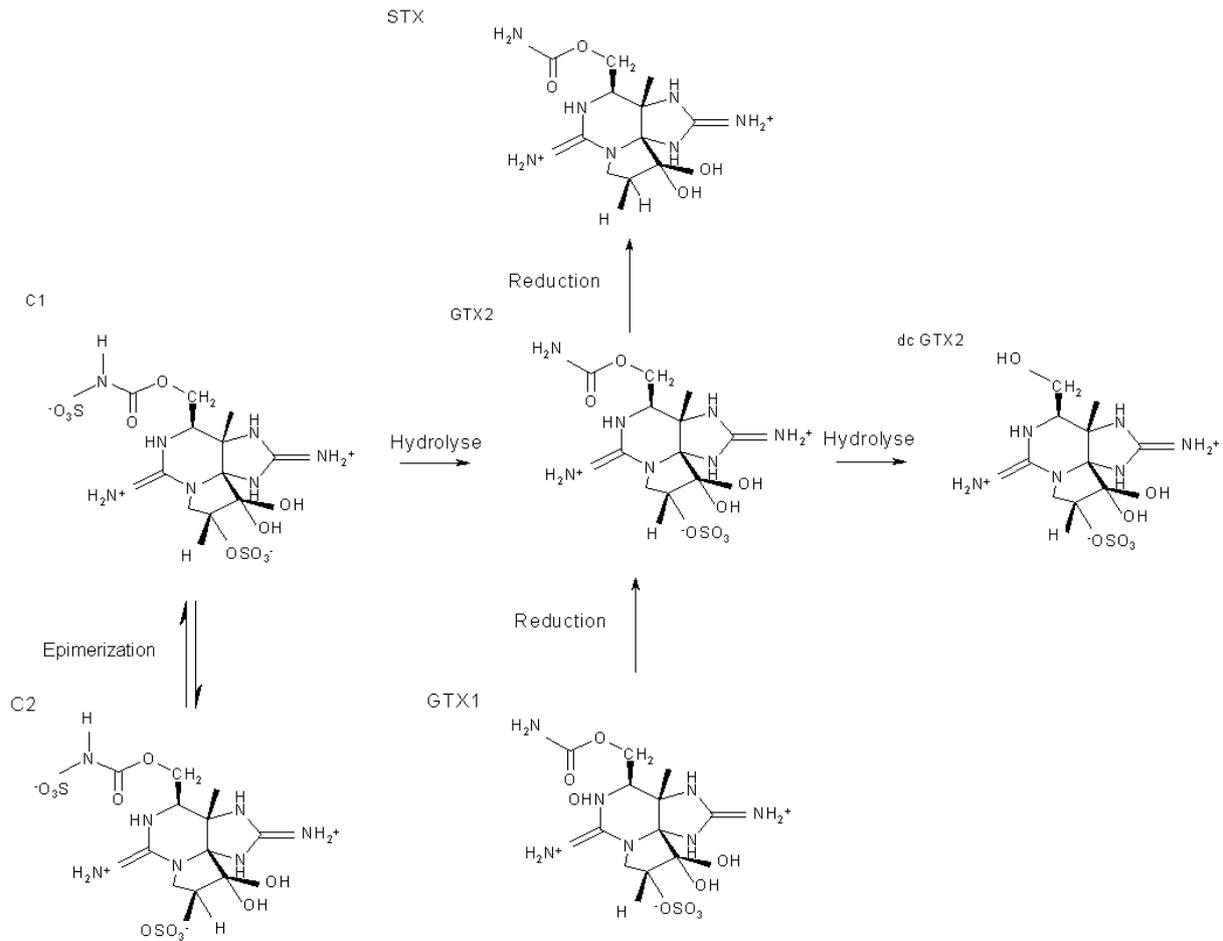


Fig. 4 Exemples de possibles différentes biotransformations de paralytiques toxines décrites par Oshima (1995).

Figure 4 Exemples des différentes biotransformations possibles des toxines paralysantes décrites par Oshima (1995).

STX : saxitoxine (saxitoxin) ; GTX : gonyautoxine (gonyautoxin) ; dc : décarbamoyle (decarbamoyle).

## 2.3 Toxicologie

### 2.3.1 Effet chez l'homme

Les molécules de la famille de la STX ont un fort pouvoir neuromusculaire, si bien qu'en cas d'intoxication extrême, il est possible d'observer des paralysies musculaires et des difficultés respiratoires, pouvant entraîner la mort. Les premiers signes cliniques apparaissent dans les 30 à 60 minutes après ingestion, ils sont d'abord de nature gastro-intestinale, puis d'ordre neurologique. On distingue trois degrés d'intoxication en fonction de la gravité des symptômes observés. Le niveau bénin correspond à une paresthésie buccale, pouvant s'étendre au visage et au cou, puis aux extrémités des doigts et aux orteils ; des nausées et parfois des vomissements sont observés. Les symptômes de niveau sévère recouvrent des paresthésies s'étendant aux bras et aux jambes, une incohérence de la parole, des sensations

d'engourdissement et d'ataxie, l'apparition de difficultés respiratoires et des sensations d'étouffement. Le niveau extrême présente des sensations de choc, des paralysies motrices et en particulier respiratoires pouvant conduire à la mort en l'absence d'assistance respiratoire.

Chaque année, il est recensé environ 2 000 cas d'intoxications (Van Dolah 2000) dont le taux de mortalité varie entre 8 et 10 % (Sierra-Beltran et al. 1997). La dose létale pour l'homme est comprise, selon la sensibilité de chacun, entre 1 et 4 mg équivalent STX. A ce jour, aucun antidote des STX n'est disponible, seuls des systèmes d'aide à la respiration ainsi que des techniques pour limiter l'assimilation des toxines (vidange du contenu gastrique, inactivation des phycotoxines par du charbon actif ou des boissons alcalines, administration de diurétiques) sont mis en place. C'est pourquoi la prévention de ce type d'intoxication est importante.

### 2.3.2 Mode d'action

Les toxines paralysantes agissent en bloquant l'activité des canaux sodiques membranaires des cellules neurales. Ces canaux interviennent largement dans la communication électrique cellulaire, leurs ouvertures et fermetures étant responsables de l'activation et de l'inactivation du potentiel d'action. Les toxines se fixent sur les canaux sodiques avec une réponse de type tout ou rien. Cette action est réversible.

## **2.4 Répartition**

Les toxines paralysantes ont été détectées la première en fois en France en 1988 (Masselin et al. 2000, Sechet et al. 2003) dans les Abers (Bretagne nord), la microalgue identifiée comme responsable étant *Alexandrium minutum*. Ces toxines, initialement localisées en Bretagne Nord (zone des Abers, baie de Morlaix, estuaire de la Rance), se retrouvent dans l'étang de Thau à partir de 1998. La zone de prolifération, bien qu'il ne s'agisse pas des mêmes espèces d'*Alexandrium*, s'étend ensuite à la rade de Toulon en 2000, puis au bassin d'Arcachon (Banc d'Arguin) en 2002. Seuls deux cas de contamination PSP de moules *Mytilus spp.* ont été référencés en France en 2007 (Fig. 5).



Fig. 5 Localization of molluscs contaminated by paralytic toxins in France in 2007 and exceeding the safety threshold of 800  $\mu\text{g}$  STX equiv.  $\text{kg}^{-1}$  of flesh. 830 and 1270 correspond to the maximal value observed during the toxic episode express in  $\mu\text{g}$  STX equiv.  $\text{kg}^{-1}$  of flesh. No toxic episode was noticed in 2006 and 2008 from RePHY data.

Figure 5 Localisation des mollusques contaminés par des toxines paralysantes en France en 2007, et dépassant le seuil sanitaire de 800  $\mu\text{g}$  équiv. STX  $\text{kg}^{-1}$  de chair. 830 et 1270 correspondent à la valeur maximale de toxicité observée pendant l'épisode toxique exprimé en  $\mu\text{g}$  équiv. STX  $\text{kg}^{-1}$  de chair. Aucun cas n'a été référencé en 2006 et 2008 d'après les données du RePHY.

Des épisodes toxiques liés à la présence de toxines paralysantes ont été mis en évidence en Ecosse (Collins et al. 2009), en Espagne (Blanco et al. 2006), en France (Lassus et al. 2004, 2006), en Grèce (Ignatiades et al. 2007), en Irlande (Stobo et al. 2008, Touzet et al. 2008), en Norvège (Sayfritz et al. 2008) et au Portugal (Artigas et al. 2007). La répartition des différents épisodes toxiques en Europe est représentée sur la figure 6.

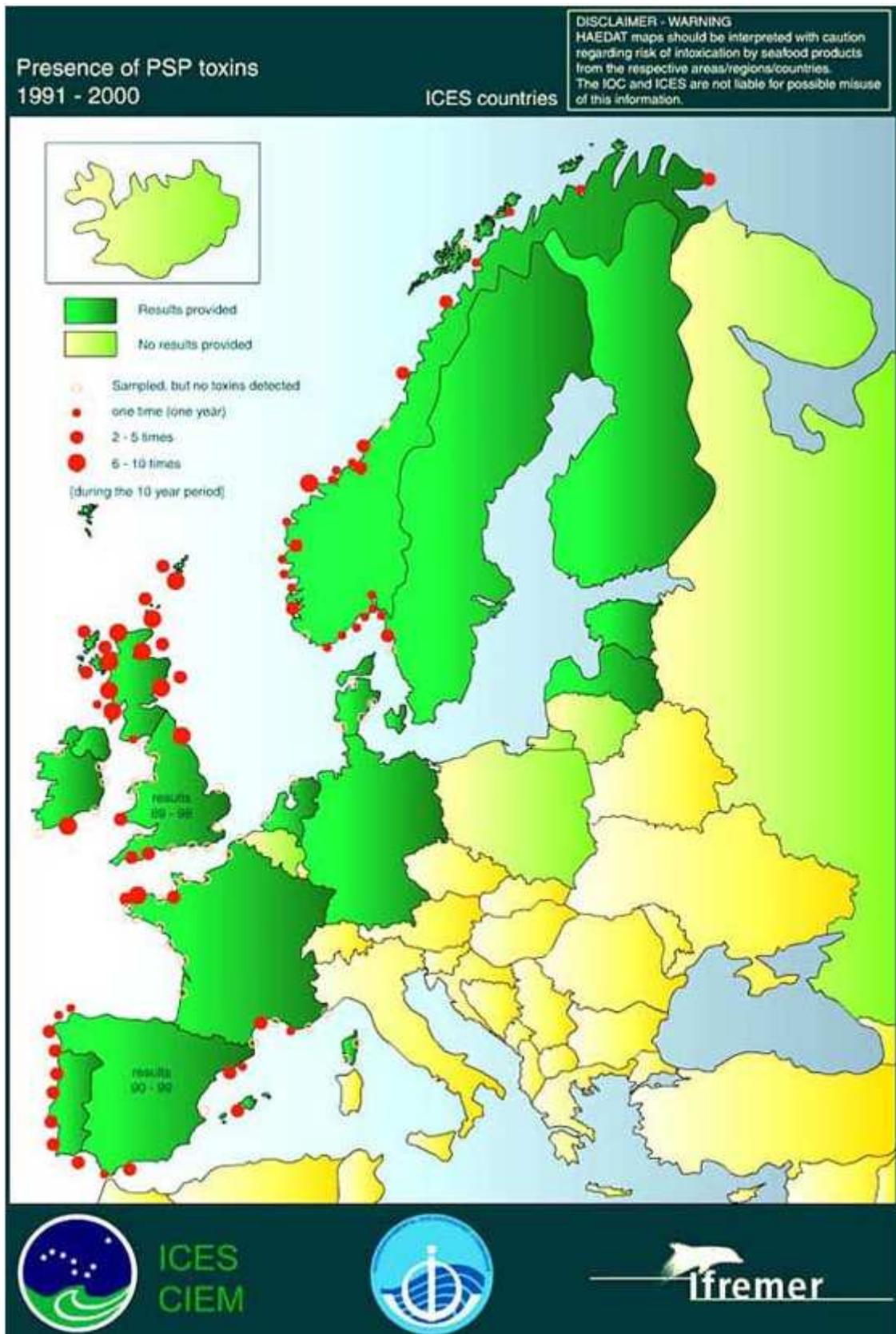


Fig. 6 Localization of the different toxic episodes in relation with paralytic toxins in Europe from 1991 to 2000 (IOC/UNESCO).

Figure 6 Localisation des différents épisodes toxiques liés aux toxines paralysantes en Europe de 1991 à 2000 (IOC/UNESCO).

### 3 Les toxines diarrhéiques : acide okadaïque

Dans les années soixante, un premier cas d'intoxication gastro-intestinale d'origine non bactérienne, à la suite de la consommation de mollusques bivalves a eu lieu au Pays Bas (Kat 1979). Ce phénomène s'est reproduit en 1971, 1976 1979 et 1981 avec, à chaque fois, présence de *Dinophysis acuminata* dans le tractus digestifs des moules contaminées. Cependant, ce n'est que dans les années soixante-dix qu'un lien a été établi entre la toxicité des mollusques bivalves et la présence de *Dinophysis fortii*, suite à l'intoxication de 150 personnes (Yasumoto et al. 1978, Yasumoto et al. 1980). L'élucidation de la structure de l'agent actif : la dinophysistoxine (DTX-1) a été effectuée à la suite de l'isolement et de l'identification de la molécule active d'acide okadaïque (AO), extraite et purifiée à partir des éponges *Halichondria okadai* (côtes japonnaises) et *H. melanodocia* (côtes de Floride) (Tachibana et al. 1981).

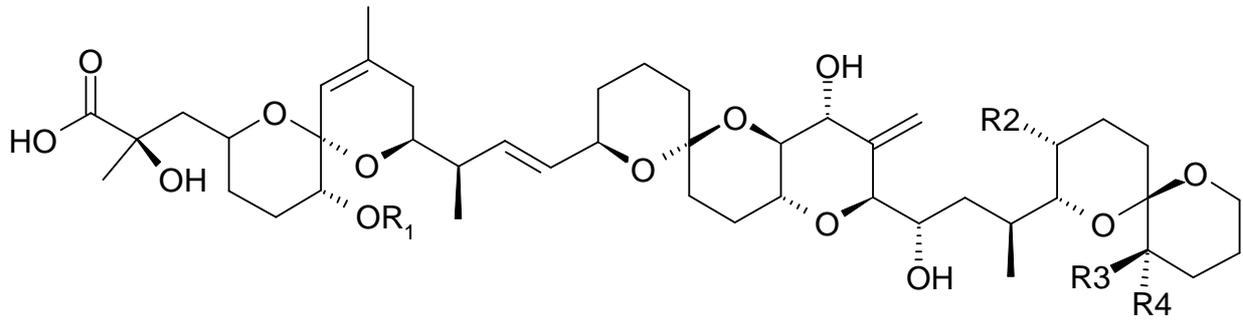
#### 3.1 Les producteurs

Les producteurs de toxines diarrhéiques sont répartis dans deux ordres : l'ordre des Dinophysales et l'ordre des Prorocentrales. Les Dinoflagellés de l'ordre des Dinophysales comprennent de nombreux genres, dont le genre *Dinophysis* qui comprend lui-même plusieurs espèces reconnues toxiques : *D. fortii*, *D. mitra*, *D. rotundata*, *D. tripos*, *D. acuta*, *D. norvegica*, *D. acuminata* ; ce sont toutes des espèces pélagiques. Les Dinoflagellés de l'ordre des Prorocentrales comprennent les genres *Mesoporos* et *Prorocentrum*. Le genre *Prorocentrum* comprend à la fois des espèces pélagiques et benthiques / épiphytes, et ce sont ces dernières (*P. lima*, *P. maculosum*, *P. reticulatum* et *P. concavum*) qui produisent des toxines diarrhéiques.

#### 3.2 Les propriétés physico-chimiques

L'acide okadaïque et les Dinophysistoxines (Fig. 7) sont des polyéthers lipophiliques solubles dans l'acétone, le dichlorométhane, le chloroforme et le méthanol. L'AO, les DTX1, et les DTX2 peuvent subir une acylation au niveau de l'hydroxyle du carbone 7, qui se traduit par la fixation de chaînes d'acide gras plus ou moins saturées, conduisant à la formation d'acyles esters (7-O-acyl/DTXs). Ces molécules sont uniquement observées dans les mollusques bivalves ou dans les crustacés. La toxicité des acyles esters dépend de leur saturation. La chaîne d'acide gras est une chaîne de 12 à 22 carbones avec des degrés

différents de saturation. Par exemple, chez la moule bleue, l'acide palmitique (16 :0) est l'acide gras le plus présent sur les molécules d'AO et de DTX1 et 2 (Torgersen et al. 2008).



<u>Toxin</u>	R1	R2	R3	R4
OA	H	CH <sub>3</sub>	H	H
DTX1	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H
DTX2	H	H	H	CH <sub>3</sub>
7-O-acyl OA	Fatty acid	CH <sub>3</sub>	H	H
7-O-acyl DTX1	Fatty acid	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H
7-O-acyl DTX2	Fatty acid	H	H	CH <sub>3</sub>

Fig. 7 Structure of okadaic acid and its derivatives the Dinophysistoxins (DTX). 7-O-acyl OA, 7-O-acyl DTX1 and 7-acyl DTX2 are usually named DTX3.

Figure 7 Structure de l'acide okadaïque et de ses dérivés les dinophysistoxines (DTX). 7-O-acyl OA, 7-O-acyl DTX1 and 7-acyl DTX2 sont généralement nommés DTX3.

### 3.3 Toxicologie

#### 3.3.1 Effet chez l'homme

Ces toxines agissent sur les muscles lisses en modifiant les protéines phosphorylées qui induisent la contraction musculaire par inhibition des protéines phosphatases. Ce sont les moins dangereuses des toxines identifiées, même si elles ont été reconnues comme promoteurs potentiels de tumeurs cancéreuses (Cordier et al. 2000).

Les premiers symptômes (troubles gastro-intestinaux chez l'humain) apparaissent après 30 à 180 minutes. Les effets prédominants sont les diarrhées, les nausées, les vomissements et les maux de ventre. Le rétablissement des individus s'effectue dans les 2 ou 3 jours. A ce jour, aucun décès n'a été rapporté.

#### 3.3.2 Mode d'action

Les DTX et AO sont des inhibiteurs des protéines phosphatases à sérine et thréonine et plus spécifiquement des protéines PP1 et PP2A (Puisseux-Dao et al. 2001), qui sont les deux

principales protéines phosphatases du cytosol des cellules des mammifères. Elles permettent la déphosphorylation des résidus de serine et thréonine (Fig. 8). La concentration en inhibiteur (OA) nécessaire pour inactiver 50 % des protéines phosphatases est de ~0.5 nM d'OA pour les PP2A, ~50 nM d'OA pour les PP1, plus de 10 µM d'OA pour les PP2B ; PP2C est insensible à l'AO.

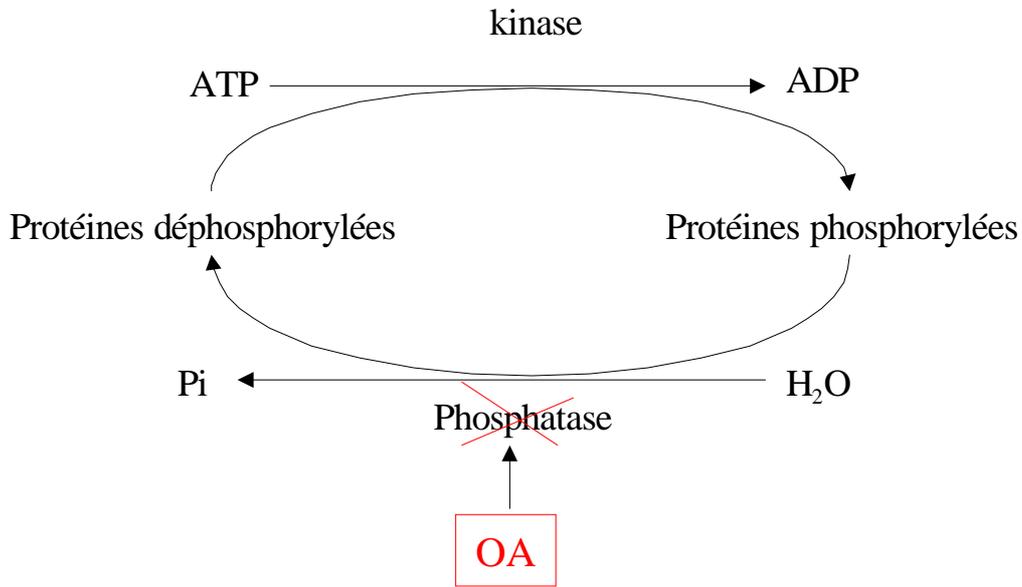


Fig. 8 mode of action of okadaic acid (OA) upon protein phosphatase.

Figure 8 Mode d'action de l'acide okadaïque (AO) sur les protéines phosphatases.

### 3.4 Répartition

En France, les *Dinophysis spp.* (principalement *D. acuminata*) ont été identifiés dès le début des investigations en 1983 en baie de Vilaine et en baie de Douarnenez. Dès 1985, on observe une extension de la répartition des cellules de *Dinophysis spp.* vers le Nord (Normandie) puis vers le Sud (Arcachon). La Méditerranée est ensuite touchée en 1987, avec une apparition de *Dinophysis spp.* dans le golfe du Lion (Amzil et al. 2001). Ces apparitions de *Dinophysis spp.*, accompagnées de présence de toxines diarrhéiques dans les bivalves (Fig. 9), ont lieu de manière récurrente entre les mois de mai et d'août et persistent pendant plusieurs semaines. L'espèce présente le long des côtes françaises est majoritairement *Dinophysis acuminata* mais on rencontre aussi *D. caudata*, *D. rotundata*, *D. tripos*, *D. acuta*, à de plus faibles concentrations. La répartition des épisodes toxiques liés aux toxines diarrhéiques en Europe est représentée sur la figure 10.



Fig. 9 Distribution of toxic episodes due to diarrheic toxins in France 2008 from RePHY data.

Figure 9 Répartitions des épisodes toxiques liées aux toxines diarrhéiques en France en 2008 d'après les données du RePHY.

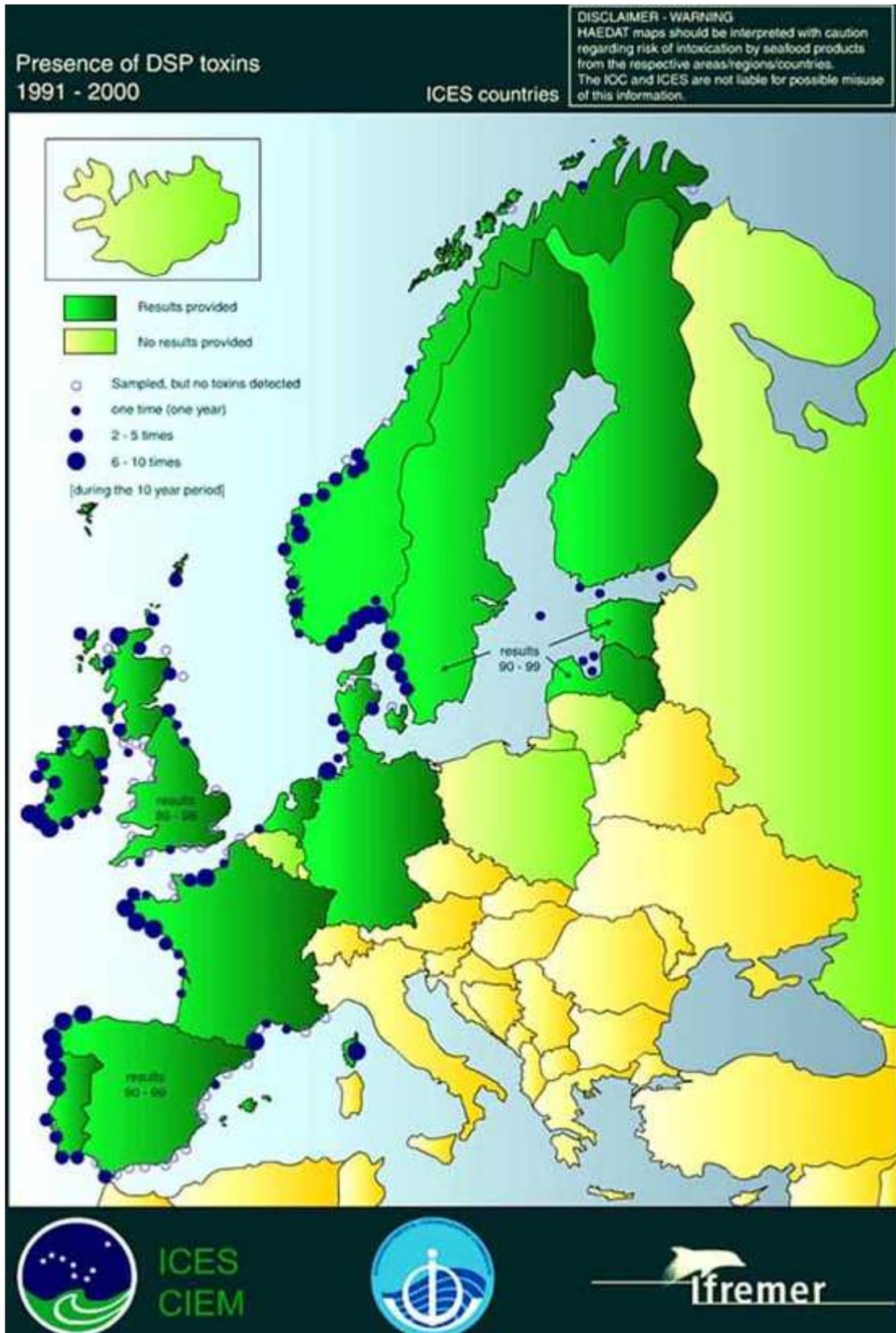


Fig. 10 Localization of the different toxic episodes due to diarrhetic shellfish poisoning toxins in Europe from 1991 to 2000 (IOC/UNESCO).

Figure 10 Localisation des différents épisodes toxiques liées aux toxines diarrhéiques en Europe de 1991 à 2000 (IOC/UNESCO).

## **Partie II- Physiologie alimentaire des mollusques bivalves**

Les bivalves jouent un rôle clé dans de nombreux écosystèmes côtiers, en raison de leur forte capacité de filtration et de la densité des élevages (Smaal et al. 2001, Mao et al. 2006). Les habitats naturels des huîtres se rencontrent dans les écosystèmes côtiers ouverts, des rivages rocheux et des marais vaseux (Dupuy et al. 1999). Les moules occupent différents types d'habitats, des eaux côtières peu profondes jusqu'aux estuaires (Rouillon & Navarro 2001). L'huître creuse *Crassostrea gigas* a été introduite le long des côtes européennes dans les années soixante-dix pour restaurer l'ostréiculture à la suite d'une épizootie décimant l'huître creuse portugaise présente. Cette espèce est présente le long des côtes atlantiques, de l'Allemagne au Portugal (Cardoso et al. 2007).

Le processus de contamination des mollusques bivalves s'effectuant par voie trophique, il est donc important de connaître leur physiologie alimentaire.

### **1 Processus alimentaire**

Les mollusques bivalves sont des suspensivores capables de s'alimenter à partir de cellules phytoplanctoniques (protophytes), ou de même de ciliés (protozoaires ; Fig. 11) (Le Gall et al. 1997, Dupuy et al. 1999) ou de détritits de macroalgues (Levinton et al. 2002). Le processus alimentaire est essentiellement le même chez toutes les espèces ; il se décompose en différentes phases comme l'interception des particules, leur transport, leur sélection et leur ingestion (Beninger et al. 1995, Silverman et al. 2000).

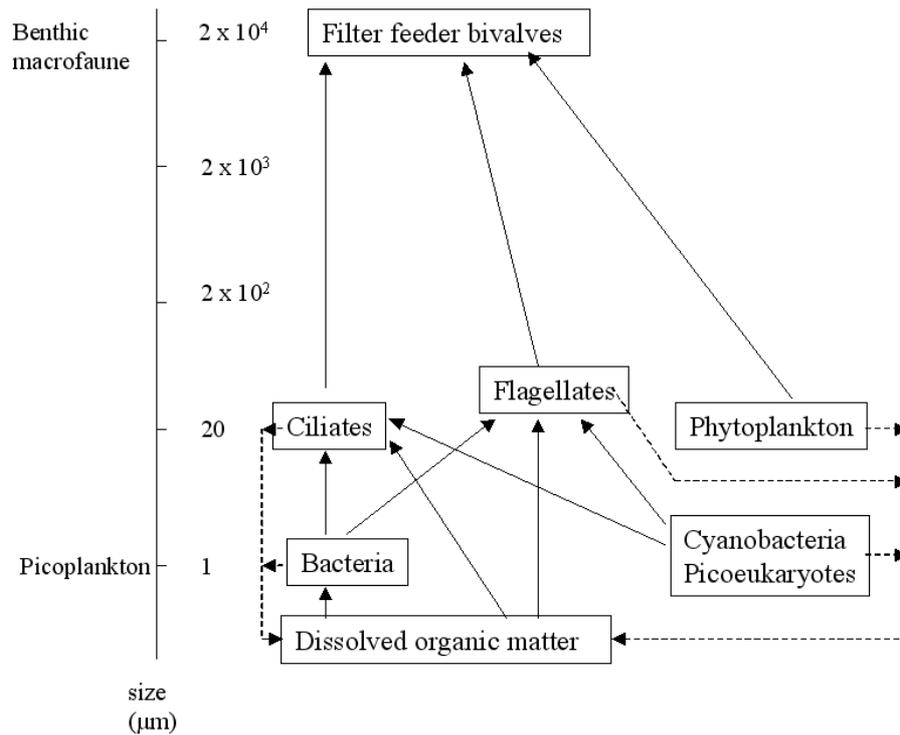


Fig. 11 Hypothetical diagram of microbial food webs in a coastal shellfish ecosystem (Le Gall et al. 1997, Dupuy et al. 1999).

Figure 11 Diagramme hypothétique de la chaîne alimentaire microbienne aboutissant aux filtreurs dans un environnement côtier (Le Gall et al. 1997, Dupuy et al. 1999)

Les branchies ont deux rôles importants dans le fonctionnement des mollusques. Elles permettent d'assurer la capture et le transport de la nourriture, ainsi que la fonction respiratoire (Le Pennec et al. 2003a, Le Moullac et al. 2009). Les branchies des lamellibranches ou ctenidies sont constituées de deux paires d'hémibranchies (une interne et l'autre externe), qui divisent la cavité palléale en une chambre inhalante et une chambre exhalante. Chaque hémibranchie comprend deux lamelles (une ascendante et l'autre descendante) reliées par les jonctions de tissu connectif, formées par des filaments ciliés dans lesquels passent les vaisseaux sanguins (Fig. 12). Les branchies des huîtres et des moules sont très différentes (Fig. 13). Chez les huîtres, la structure des branchies est dite hétérorhabdique ; c'est-à-dire que les filaments ciliés sont de deux types : les filaments principaux et ordinaires (Beninger et al. 2005). Les moules possèdent quant à elles des branchies homorhabdiques, c'est-à-dire uniquement constituées de filaments ordinaires (Silverman et al. 1999).

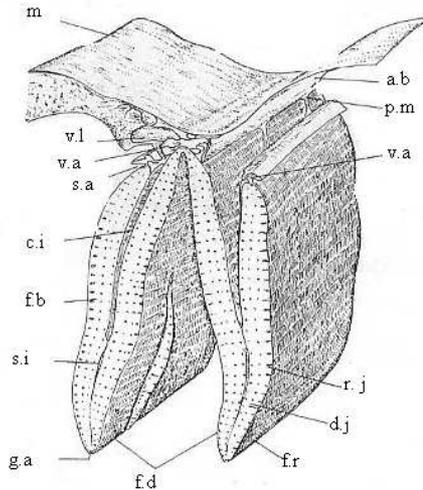


Fig. 12 Diagram of bivalve gills, from Le Pennec et al. (2003a).

Figure 12 Schéma représentant une branchie de bivalve, d'après Le Pennec et al. (2003a).

a.b Axe branchial (branchial axis); p.m: pont membraneux; v.a. vaisseau afférent ; r.j : raquette de jonction ; f.r : feuillet réfléchi = ascendant ; f.d : feuillets directs = descendant ; g.a : gouttière alimentaire ; s.i : septum interfoliaire ; f.b : filament branchial ; c.i : cavité interfoliaire ; s.a : sillon alimentaire ; v.l : veine longitudinale ; m : manteau.

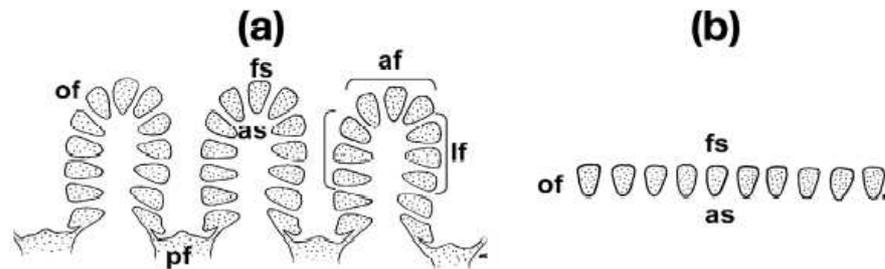


Fig. 13 Diagrammatic comparison of heterorhabdic and homorhabdic gills (a) *C. gigas* transverse section passing through ostia. (b) Transverse section of homorhabdic filibranch gill, from Beninger et al. (2005)

Figure 13 Comparaison des branchies de type hétérorhabdique (*C. gigas*) et homorhabdiques (*Mytilus spp.*). (a) Section transversale des branchies de *C. gigas* passant à travers les ostia. (B) section transversale des branchies filibranches homorhabdiques, d'après Beninger et al. (2005)

of: filament ordinaire (ordinary filament), pf: filament principal (principal filament), fs: surface frontale (frontal surface), as: surface abfrontale (abfrontal surface), af: filament apical (apical filament), lf: filament latéral (lateral filament).

Les palpes labiaux sont situés dans la région antéro-ventrale du corps, autour de la bouche. Ils sont constitués de deux paires de forme triangulaire. Chaque paire est constituée par un palpe interne et un palpe externe (Fig. 14), présentant une surface lisse et une surface

plissée inclinée vers la bouche (Beninger et al. 1990, Beninger et al. 1995, Beninger & StJean 1997, Le Penneec et al. 2003b).

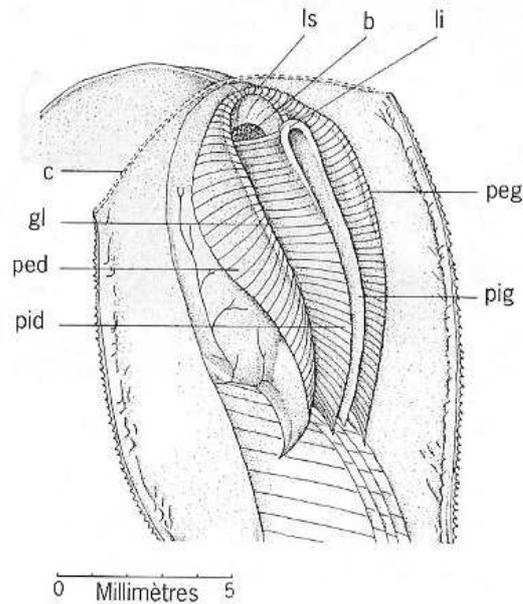


Fig. 14 *C. virginica* labial palps, from Le Penneec (2003b).

Figure 14 Palpes labiaux de *Crassostrea virginica*, d'après Le Penneec (2003b)

b: bouche (mouth); c: capuchon céphalique (cephalic hood); gl: gouttière latérale (lateral groove); li: lèvre inférieur (lower lip); lèvre supérieur (upper lip); ped: partie externe droite (right outer palp); pid: partie interne droite (right inner palp); peg: partie externe gauche (left outer palp); pig: partie interne gauche (left inner palp).

La consommation de particules est déterminée par la filtration et par l'efficacité de rétention (Palmer & Williams 1980). La filtration correspond au volume traversant les branchies par unité de temps (Hawkins et al. 1998a). Elle est effectuée grâce aux battements des cils latéraux des filaments ordinaires. Le taux de filtration des mollusques bivalves dépend des conditions environnementales (température, salinité, quantité et qualité des matières en suspension) et du poids sec de l'animal (Barille et al. 1997, Morono et al. 2001) et, dans le cas particulier des phycotoxines, de la nature de la toxine et de sa concentration (Bricelj & Shumway 1998a). Les particules circulant dans le flux inhalant vont être retenues par les cirres latéro-frontaux puis transférées vers les surfaces frontales. L'efficacité de capture des particules varie entre les différentes espèces de mollusques bivalves en fonction de la taille de ces cirres latéro-frontaux (Kiørboe & Møhlenberg 1981). De ce fait, les Mytilidés qui possèdent des cirres de grandes tailles sont plus à même de capturer des

particules de petites tailles que les huîtres. La quantité de particules retenues sur les branchies par unité de temps correspond à la consommation (Hawkins et al. 1998a).

La sélection pré-ingestive est une fonction essentielle permettant de rejeter les particules indésirables sous forme de pseudo fèces. Elle s'effectue en fonction de la taille, de la qualité (Baker et al. 2000, Levinton et al. 2002), et de la composition biochimique des particules alimentaires, permettant ainsi d'améliorer la qualité de la prise de nourriture et également de détecter la présence ou non de microalgues toxiques (Bougrier et al. 1997). Chez les Ostréidés, la première étape de sélection s'effectue au niveau des branchies. Cette sélection est basée sur la taille des particules. Les particules initialement acceptées sont dirigées vers la partie dorsale de la branchie via les filaments principaux et les particules initialement rejetées ou trop grosses pour entrer par l'ouverture des filaments principaux sont dirigées ventralement dans le sillon ventral cilié (Beninger et al. 2005). Dans les deux cas, les particules sont acheminées jusqu'aux palpes labiaux entourant la bouche à l'aide de processus mucociliaires et hydrodynamiques. Les Mytilidés ne possèdent pas de filaments principaux, les particules retenues sont donc toutes acheminées jusqu'aux palpes labiaux par la gouttière ventrale. Les palpes labiaux permettent également de trier les particules à ingérer. Pour les huîtres, ce second tri permet de traiter les grosses particules ; pour les moules, l'ensemble du tri est réalisé à partir de cet organe palléal (Beninger et al. 1995). Les particules sélectionnées pour l'ingestion vont être acheminées vers la bouche tandis que les particules rejetées seront éliminées sous forme de pseudo-fèces. Les palpes labiaux permettent la discrimination entre les différents types de particules, avec un rejet préférentiel des particules de faible niveau nutritionnel. L'efficacité de sélection est corrélée avec la taille des palpes labiaux (Barillé et al. 2000). De plus, ils permettent de réguler les quantités ingérées avec un processus de rejet sous forme de pseudofèces qui débute à partir d'une concentration de matières en suspension (MES) égale à  $4,6 \text{ mg L}^{-1}$  pour l'huître *C. gigas* (Deslous-Paoli et al. 1992), ce seuil correspond au remplissage du système digestif. Tous les processus alimentaires décrits précédemment sont schématisés dans la figure 15.

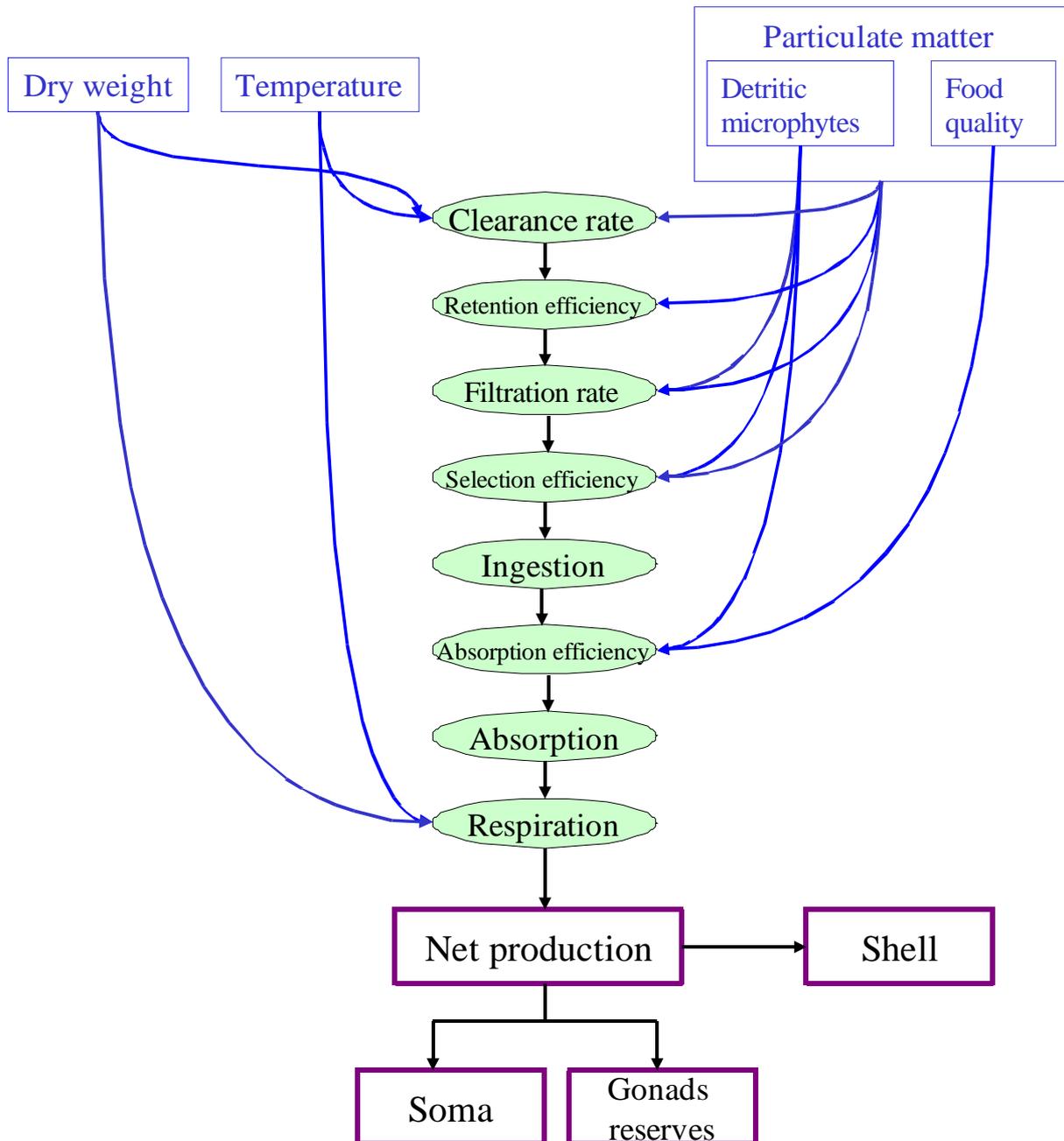


Fig. 15 Conceptual schema for *Crassostrea gigas* feeding process and interferences with endogenous and exogenous variables, from Barillé et al. (1997).

Figure 15 Schéma conceptuel du processus alimentaire de *Crassostrea gigas* et interférence avec les variables endogènes et exogènes, d'après Barillé et al. (1997). De droite à gauche et de haut en bas : matière particulaire, taux de filtration, efficacité de rétention, taux de consommation, pseudofèces, efficacité de sélection, ingestion, fèces, efficacité d'absorption, absorption, respiration, production nette, coquille, soma, réserve gonadique.

## 2 Le système digestif

Les particules entrent par la bouche puis se déplacent dans l'œsophage sous l'action d'un épithélium cilié. Ensuite, enrobées de mucus chez les Ostreidés (Beninger et al. 1991) et chez les Mytilidés, elles débouchent antérieurement dans l'estomac qui est constitué de deux poches d'où partent des conduits digestifs de tailles très différentes tant en diamètre qu'en longueur (Le Pennec 2003). La poche située dans la partie gauche, présente deux renflements qui correspondent aux conduits en direction de la bouche et de l'intestin. La poche du côté droit possède un renflement correspondant à plusieurs ramifications digestives de plus en plus étroites, suivies de courtes jonctions tubuleuses qui s'achèvent par des renflements ovoïdes (Fig. 16). Les particules arrivant dans l'estomac ont deux voies alternatives pour en sortir. La première est le canal de la glande digestive, dans lequel elles vont subir une digestion intracellulaire et la seconde est l'intestin (Rouillon & Navarro 2001). Cependant, les particules entrant dans le canal de la glande digestive doivent être fragmentées (Rouillon & Navarro 2001). La dégradation des particules est possible grâce à la présence du stylet cristallin, composé de mucoprotéines, qui se projette à travers l'estomac et vient frotter contre le bouclier gastrique. Les particules sont brassées par les rotations du stylet, et subissent un début de lyse grâce à l'action des enzymes libérées par le stylet. Le temps de résidence des microalgues dans l'estomac est différent suivant les espèces algales (Rouillon & Navarro 2001).

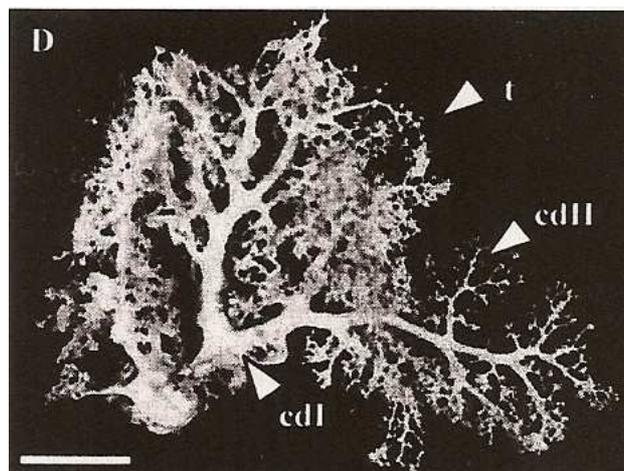


Fig. 16 Silicone casting of the isolated right digestive diverticulum of *Pecten maximus* digestive gland, from Le Pennec (2003).

Figure 16 Moulage en silicone du diverticule digestif antérieur droit isolé de la glande digestive de *Pecten maximus*, d'après Le Pennec (2003).

cdI : conduit digestif principal ou primaire (Main or primary digestive duct) ; cdII : conduit digestif secondaire (Secondary digestive duct); t : tubule (tubule).

## **Partie III- Interaction toxines- Mollusques bivalves**

La cinétique d'accumulation et d'élimination des phycotoxines dans le mollusque bivalve implique un équilibre entre différents processus: l'ingestion de l'algue toxique, sa digestion et son assimilation, le transfert des toxines au sein des organes, les biotransformation vers d'autres dérivés toxiques et la détoxification au travers de divers processus (Silvert & Cembella 1995).

L'acide okadaïque et la saxitoxine présentent des structures chimiques et des modes d'action très différents, ce qui va avoir un impact sur la réponse physiologique des mollusques bivalves que ce soit en terme d'altération des processus alimentaires ou de mise en œuvre des mécanismes de défense.

### *Interaction mollusques bivalves et toxines paralysantes*

Les mollusques bivalves présentent différentes réponses vis-à-vis des microalgues productrices de toxines paralysantes : l'augmentation de la production de mucus et de pseudofèces ; la modification de l'activité valvaire et de la filtration (Gainey & Shumway 1988, Lassus et al. 2006, Connell et al. 2007); la diminution de la prise alimentaire (Connell et al. 2007), l'enfouissement de certaines espèces (Bricelj & Shumway 1998a), une altération de la production du byssus ; un changement dans l'activité cardiaque (Gainey & Shumway 1988) et la consommation d'oxygène. A long terme, tous ces facteurs vont induire une diminution de la croissance (Bricelj et al. 1993) associée au faible niveau nutritionnel des espèces de Dinoflagellés productrices de toxines paralysantes.

Le devenir et la distribution des toxines paralysantes dans les bivalves varient en fonction (i) des caractéristiques du bloom phytoplanktonique (concentration en algues toxiques, toxicité cellulaire et ratio algues toxiques sur non toxiques) ; (ii) des variations individuelles au sein d'une même espèce et des variations inter-espèces ;(iii) de la dynamique de la prise alimentaire ; (iv) de la localisation anatomique et de la rétention différentielle ; (v) des biotransformations et (vi) des mécanismes de détoxification.

L'accumulation des toxines paralysantes apparaît fréquemment après une phase de latence entre le pic maximal de microalgues toxiques et le contenu toxinique maximal observé dans les mollusques. De plus, la capacité d'accumulation des toxines paralysantes est corrélée avec la sensibilité des nerfs des mollusques mis en contact *in vitro* avec de la STX (Twarog et al. 1972, Connell et al. 2007). Une exposition préalable et répétée aux toxines paralysantes,

confère aux mollusques bivalves un caractère de résistance entraînant des accumulations plus élevées (Chedid et al. 1993). Ce phénomène semble s'amplifier par une adaptation génétique qui affecte la sous-unité  $\alpha$  des pompes à sodium, empêchant ainsi la fixation de la STX. Cette mutation a été observée chez la mye *Mya arenaria* (Bricelj et al. 2005, Connell et al. 2007).

La répartition tissulaire des toxines est globalement toujours la même selon les différentes espèces de mollusques bivalves. La glande digestive représente 65 à 95 % du contenu toxinique total (Silvert & Cembella 1995, Bricelj & Shumway 1998b, Gueguen et al. 2008) alors que les tissus locomoteurs représentent moins de 3%.

Les biotransformations dans les mollusques sont liées aux conditions physico-chimiques, aux enzymes digestives ainsi qu'aux bactéries naturellement présentes dans le mollusque (Sato et al. 2000, Smith et al. 2001). Le siège privilégié des biotransformations est l'estomac et la glande digestive (Lin et al. 2004, Fast et al. 2006). Il existe de grandes différences dans les capacités de biotransformations entre les mollusques (Lin et al. 2004). En effet, alors que les ormeaux *Haliotis midae* ont un fort pouvoir de biotransformation (Pitcher et al. 2001), *Mytilus edulis* et *Crassostrea gigas* sont connues comme des espèces ayant peu de capacités de biotransformations (Jaime et al. 2007). Par contre chez tous les mollusques, il se crée un équilibre, plus ou moins rapide selon les espèces, entre les formes  $\beta$  :  $\alpha$  (1 : 3) des gonyautoxines.

En ce qui concerne la détoxification, on peut classer les bivalves selon deux catégories : des espèces à détoxification rapide (de quelques jours à quelques semaines) et des espèces à détoxification lente (quelques mois à quelques années) (Bricelj & Shumway 1998b). Peu de choses sont connues sur les facteurs influençant la cinétique de détoxification. En effet, l'effet de la température est controversé. Shumway et Cembella (1993) observent un ralentissement de la détoxification des mollusques à basse température tandis qu'aucun effet de la température n'est observé chez *Saxidomus giganteus* (Madenwald 1985) ou chez *Mytilus galloprovincialis* (Blanco et al. 1997). De la même façon, la présence de nourriture pourrait avoir un rôle dans la détoxification or aucune étude n'a clairement mis en évidence l'impact de cette variable (Blanco et al. 1997, Bricelj & Shumway 1998b). A l'heure actuelle, aucune méthode efficace n'a été mise en place pour réduire la quantité de phycotoxines accumulées dans les mollusques vivants (Fernandez et al. 2003). Toutes les méthodes proposées sont soit dangereuses, soit trop longues, soit économiquement infaisables ou modifiant de manière trop importante l'apparence et le goût du produit. Il est donc important de développer des moyens efficaces de détoxification des mollusques contaminés par des phytoxines.

La détoxification est usuellement décrite comme une suite de deux cinétiques : une première rapide qui correspond à l'élimination des toxines libres dans le tractus digestif, suivie d'une seconde beaucoup plus lente qui résulte de l'élimination des toxines des différents tissus (Silvert & Cembella 1995). Les modèles mis en place pour décrire cette détoxification sont constitués de un ou deux compartiments quel que soit le mollusque bivalve concerné (Silvert & Cembella 1995, Blanco et al. 1997, Blanco et al. 2003, Yamamoto et al. 2003, Yu et al. 2005, Baron et al. 2006, Lassus et al. 2006, Yu et al. 2007). Or la cinétique d'accumulation et de détoxification implique l'intervention d'un grand nombre de processus. Quelques auteurs ont essayé de prendre en compte les variables environnementales (Blanco et al. 1997, Morono et al. 1998), les biotransformations (Silvert et al. 1998, Blanco et al. 2003) et les transferts entre organes (Li et al. 2005). Ces modèles décrivent bien les cinétiques observées mais ne permettent pas d'être prédictif ni de comprendre les processus mis en jeu.

#### *Interaction mollusques bivalves et toxines diarrhéiques*

La moule est considérée comme le mollusque filtreur qui accumule le plus de toxines diarrhéiques sur une même zone d'étude. Cette espèce est très souvent utilisée comme espèce sentinelle par les réseaux de surveillance. Les huîtres sont en général beaucoup moins contaminées (Lassus & Marcaillou-Le Baut 2001).

Les efflorescences de *Dinophysis spp.* sont très hétérogènes pour ce qui concerne la répartition géographique et la toxicité des microalgues (Sechet et al. 1990, Dahl & Johannessen 2000), ainsi que les conditions hydrodynamiques qui prévalent lors des blooms. Ces facteurs vont donc intervenir dans l'accumulation de toxines diarrhéiques dans le mollusque mais peuvent être difficiles à prendre en compte dans un modèle de contamination (Blanco et al. 1995).

Il est connu que les phycotoxines diarrhéiques sont principalement localisées dans la glande digestive (Yasumoto et al., 1978 ; Murata et al., 1982) aussi bien chez *Mytilus edulis* (Pillet et al., 1995), que chez *M. galloprovincialis* (Blanco et al., 2007), *Argopecten irradians* (Bauder et al., 2001), ou *Pecten maximus* (Hess et al., 2003).

Il est important de pouvoir individualiser les différents dérivés de l'acide okadaïque (DTXs) \* dans la cinétique de contamination/ décontamination car ils ne se détoxifient pas à la même vitesse (Blanco et al. 2005). De plus, la réaction d'estérification n'a été observée que chez les mollusques et les crustacés ce qui permet d'envisager que la formation de ces acyl-

esters (DTX3) qui pourraient représenter une forme de protection pour les mollusques bivalves, va également modifier les paramètres de la détoxification des toxines DSP.

La détoxification a généralement été réalisée sur des mollusques contaminés naturellement et déplacés en bassin afin de faire varier différents paramètres environnementaux. Mais le rôle de la température et de l'apport en matière en suspension est controversé (Marcaillou-Le Baut et al. 1993, Blanco et al. 1999, Lassus & Marcaillou-Le Baut 2001, Svensson 2003, Duinker et al. 2007, Marcaillou et al. soumis). En effet, la présence de nourriture, en quantité suffisante, semble jouer un rôle dans la détoxification des moules contenant des toxines DTXs (Marcaillou-Le Baut et al. 1993). De la même façon, Blanco et al. (1999) indiquent que la fluorescence et la transmission – deux paramètres permettant de quantifier la matière en suspension – permettent de montrer l'impact du seston sur la détoxification. Cependant, Svensson (2003) n'observe pas de différence dans la cinétique de détoxification entre des moules nourries et non nourries pendant 32 jours. De la même façon, des observations dans le milieu naturel n'ont pas permis de mettre en évidence l'effet de la matière organique en suspension (Duinker et al. 2007). A ce jour, l'impact de la matière en suspension sur la cinétique de détoxification des moules contenant des toxines DTXs reste non élucidé.

Le modèle préconisé dans ce cas est également un modèle à deux compartiments correspondant à deux cinétiques – une rapide et l'autre lente (Blanco et al. 1999). Ces deux compartiments représentent généralement l'ensemble des toxines libres et l'ensemble des toxines « liées » de la glande digestive. Des essais ont été réalisés en prenant en compte les biotransformations (Fernandez et al. 1998, Morono et al. 2003) et les paramètres environnementaux (Morono et al. 1998, Blanco et al. 1999). De la même façon que pour les modèles concernant les toxines PSP, les modèles relatifs au comportement des toxines DSP dans les mollusques bivalves permettent de décrire les cinétiques observées mais ne sont pas prédictifs.

## **Chapitre 2 – Le devenir des microalgues toxiques et des toxines**



## Partie 1- Le devenir des microalgues

### Contexte

De nombreux auteurs se sont intéressés au devenir des cellules microalgales (Scarratt et al. 1993, Barillé & Cognie 2000, Laabir et al. 2006) et plus particulièrement au devenir des Dinoflagellés après leur entrée dans le système digestif des consommateurs primaires (Laabir & Gentien 1999, Montresor et al. 2003). Comme décrit dans le chapitre 1, les microalgues vont arriver dans l'estomac où elles subissent une dégradation mécanique et enzymatique sous l'action du stylet cristallin. Cependant, un grand nombre de cellules de Dinoflagellés sont retrouvées entières, intactes et viables dans les fèces (Laabir & Gentien 1999, Tsujino et al. 2002, Laabir et al. 2006). Ces cellules peuvent prendre la forme de kystes temporaires, capables de germer si les conditions environnementales sont favorables et repeupler ainsi la colonne d'eau (Ichimi et al. 2001, Tsujino et al. 2002, Figueroa et al. 2005), ou contaminer directement des organismes par l'ingestion de fèces (Montresor et al. 2003, Tsujino & Uchida 2004, Persson et al. 2006). Il est important de souligner que le devenir des Dinoflagellés n'est pas toujours le même. Les Dinoflagellés à thèque fragile comme *Gymnodinium mikimotoi* (= *Karenia mikimotoi*) sont retrouvés généralement dégradés contrairement aux dinoflagellés à thèque épaisse qui traversent le tube digestif, sans être dégradés, pour une majorité d'entre eux (Laabir & Gentien 1999) ou qui forment instantanément un kyste « temporaire ». La survie des kystes dans le tube digestif dépend de leur morphologie mais également des processus digestifs (Montresor et al. 2003). De plus, la non dégradation des cellules de Dinoflagellés à thèque résistante est la même pour les cellules toxiques ou non toxiques (Laabir & Gentien 1999). Peu d'études se sont attachées à déterminer le temps de passage des cellules de Dinoflagellés dans le tube digestif des mollusques bivalves (Scarratt et al. 1993). Or ce temps est important à connaître aussi bien pour déterminer le délai nécessaire pour vider le tube digestif et donc limiter les risques de contamination d'une zone vierge de cellules toxiques, que pour pouvoir intégrer cette donnée dans un modèle.

La première étude s'attachera (i) à mesurer les temps de passage d'*A. minutum* et *A. catenella* dans le système digestif d'huîtres et de moules à des concentrations et températures différentes, et (ii) à établir un modèle décrivant la cinétique de transit des cellules d'*A. minutum* dans le système digestif de *Crassostrea gigas*.

La deuxième étude, consistera à observer le devenir d'un dinoflagellé « fragile » *Dinophysis spp.* dans le tube digestif de la moule *Mytilus edulis*. A ce jour, aucune étude n'a

été réalisée dans ce but. Jusqu'à présent, des cellules entières de *Prorocentrum lima*, producteur de toxines diarrhéiques à thèque épaisse, ont été retrouvées dans les fèces d'*Argopecten irradians* (Bauder & Cembella 2000). Par contre, Laabir et Gentien (1999) ont mis en évidence que les Dinoflagellés à thèque fragile étaient dégradés au cours de leur passage dans le tube digestif d'huîtres *Crassostrea gigas*.

Many authors have been interested in the fate of toxic cells (Scarratt et al. 1993, Barillé and Cognie 2000, Laabir et al. 2006) and particularly Dinoflagellates, after their entry into the digestive system of primary consumers (Laabir & Gentien 1999, Montresor et al. 2003). As described in chapter 1, microalgae arrive in the stomach where they undergo a mechanical and enzymatic degradation under the effect of crystalline stylet. However, a large number of Dinoflagellate cells are found entire, intact and viable in faeces (Laabir & Gentien 1999, Tsujino et al. 2002, Laabir et al. 2006).

These cells can take the shape of temporary cysts, able to germinate if the environmental conditions are favourable and to colonize the water column (Ichimi et al. 2001, Tsujino et al. 2002, Figueroa et al. 2005), or to directly contaminate marine organisms by ingestion of faeces (Montresor et al. 2003, Tsujino & Uchida on 2004, Persson et al. 2006). It is important to underline that transformations of Dinoflagellates are not always following the same pathway: Dinoflagellates with delicate theca, such as *Gymnodinium mikimotoi* (= *Karenia mikimotoi*), are generally found damaged. At the opposite Dinoflagellates with thick theca go through the digestive tract without being damaged, for a majority of them (Laabir & Gentien 1999) or produce a temporary cyst. Cyst survival in the digestive tract depends on its morphology but also on the digestive processes (Montresor et al. 2003). Furthermore, the non-deterioration of resistant Dinoflagellates is comparable for either toxic or non toxic cells (Laabir & Gentien 1999). Few studies attempted to determine the duration of Dinoflagellate cell passage in the digestive tract of bivalve (Scarratt et al. 1993). This time is important to know in order to determine the period necessary for the digestive tract to empty and thus to limit the risk of contaminating safe area with toxic cells, but also in view of integrating these data into a model.

The first study will aim i) at measuring the gut passage time of *A. minutum* and *A. catenella* in the digestive system of oysters and mussels in different concentrations and temperatures, and ii) at setting up a model describing the kinetics of *A. minutum* cells inside the digestive system of *Crassostrea gigas*.

The second study will consist in observing the fate of *Dinophysis spp.* Weak cells, while progressing in the digestive tract of the mussel *Mytilus edulis*. This is the first study realized for this purpose. So far, whole cells of *Prorocentrum lima*, a diarrheic toxin producer, have been found in *Argopecten irradians* faeces (Bauder and Cembella on 2000). On the other hand, Laabir & Gentien (1999) showed that Dinoflagellates with fragile theca were damaged during their passage in the digestive tract of oyster *Crassostrea gigas*.

## 1. Gut passage times in two bivalve molluscs fed toxic microalgae (*Alexandrium* spp. and *Pseudo-nitzschia calliantha*)

D'après un article soumis le 13 décembre 2007, accepté le 19 février 2008

**Aquatic Living Resources 21, 21-29 (2008)**

Marielle Guéguen<sup>1</sup>, Patrick Lassus<sup>1</sup>, Mohamed Laabir<sup>2</sup>, Michèle Bardouil<sup>1</sup>, Régis Baron<sup>3</sup>,  
Véronique Séchet<sup>1</sup>, Philippe Truquet<sup>1</sup>, Zouher Amzil<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ifremer, Laboratoire Phycotoxines, BP 21105, 44311 Nantes, France

<sup>2</sup> Laboratoire Ecosystèmes lagunaires, UMR CNRS-UM2 5119 case 093, Université Montpellier 2, place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier, France

<sup>3</sup> Ifremer, Département STAM, BP 21105, 44311 Nantes, France

### **Abstract –**

The occurrence of new phytoplankton species in a coastal area may be explained by the import of shellfish containing whole live algal cells in their digestive tracts. Indeed, shellfish containing toxic algal cells can induce both primary contaminations in safe areas (initially free from toxic microalgae), and secondary contaminations of other shellfish growing in the same area via the faeces of the imported animals. To mitigate this problem, shellfish need to be placed in a separate holding tank and their intestinal content purged. For a deeper understanding of the risks associated with transferring contaminated shellfish, oysters (*Crassostrea gigas*) and mussels (*Mytilus edulis*) were purposely fed either *Alexandrium* spp. or *Pseudo-nitzschia calliantha* toxic algae for 2 hours. They were then transferred into individual tanks where they were continuously fed with a non-toxic alga, *Tetraselmis suecica*. Biodeposit production, faeces composition, and filtration rates were monitored for the shellfish over a 6-hour period. The effect of temperature differences and different initial toxic algae concentrations were compared. This study revealed a relationship between temperature and cell lysis in the oyster digestive tract. It also indicated that toxic algae concentration did not seem to influence gut passage time in oysters, while a significant effect was observed in mussels, and confirmed the existence of a difference between oyster and mussel feeding patterns.

Keywords: *Alexandrium minutum*, *Alexandrium catenella* , *Pseudo-nitzschia calliantha*, *Crassostrea gigas*, *Mytilus edulis*, gut passage, risk assessment.

### **Résumé –**

L'apparition de nouvelles espèces phytoplanctoniques dans des zones côtières peut être expliquée par le transfert de coquillages contenant des cellules entières vivantes dans leur tractus digestif. En effet, des coquillages contenant des cellules algales toxiques peuvent entraîner une contamination primaire d'une zone exempte de ce phytoplancton, ainsi qu'une contamination secondaire via les fèces des autres coquillages cultivés dans cette zone. Pour pallier à ce problème, il faudrait mettre en bassin les coquillages afin de vider leur contenu intestinal. Pour une évaluation plus précise du risque lié au transfert de coquillages contaminés, des huîtres *Crassostrea gigas* et des moules *Mytilus edulis* sont placées en contact avec des algues toxiques (*Alexandrium* spp. et *Pseudo-nitzschia calliantha*), durant 2 heures, puis transférées dans des bacs individuels, dans lesquels elles sont nourries avec un apport en continu de *Tetraselmis suecica*, une algue non toxique. Leur production de biodépôts, la composition de leurs fèces ainsi que leur taux de filtration sont suivis pendant 6 heures selon différents paramètres. Cette étude permet de mettre en évidence une relation entre l'augmentation de la température et la lyse des cellules dans le tube digestif. De plus, la concentration en algues toxiques ne semble pas influencer le temps de transit. Cette étude confirme qu'une différence de comportement alimentaire entre huîtres et moules existe bien.

### **1.1. Introduction**

Any given marine phytoplankton community is generally made up of both indigenous and exotic species. Exotic species (i.e. from other areas) can be accidentally introduced into a community by a number of different means: transport by coastal currents, faeces of migratory birds (Nehring 1998) or water ballast discharges (Burkholder et al. 2007). The toxic dinoflagellate species *Alexandrium catenella* (West Pacific) was probably introduced to the Thau Lagoon in France in this last way (Lilly et al. 2002). New species may also be introduced as a result of shellfish importation (van den Bergh et al. 2002). The diatom species *Coscinodiscus wailesii* and *Thalassiosira punctigera*, both native to the Indo-Pacific area, were introduced to the North Sea in this way with importation of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Nehring 1998). Local increases in phytoplankton diversity have thus been seen to result from ballast water discharges or shellfish farming activities. When invading

phytoplankton species are also toxic or harmful, they may damage the marine ecosystem, and have consequent adverse effects on aquaculture, fisheries and public health.

French coasts have been affected by seasonal blooms of toxic microalgae for many years. The first recorded incidence of diarrhetic toxins was in 1983 (Lassus et al. 1988, Marcaillou et al. 2000), that of paralytic toxins in 1988 (Masselin et al. 2000, Sechet et al. 2003) and that of amnesic toxins (ASP) in 1999 (Amzil et al. 2001). When shellfish are contaminated by these toxic microalgae to a level exceeding the sanitary threshold, they are no longer harvested and marketed. Such market closures can have serious economic consequences. Diarrhetic, paralytic and amnesic toxins are produced by the dinoflagellate genera *Dinophysis*, *Alexandrium* and *Pseudo-nitzschia* respectively. In France, *Alexandrium minutum* is found along the north Brittany coasts, while *Alexandrium catenella* occasionally blooms in the Thau lagoon. *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* (renamed *Pseudo-nitzschia calliantha*) and *Pseudo-nitzschia multiseriata* have been responsible for episodes of ASP shellfish contamination in western Brittany (Amzil et al. 2001).

To minimise economic losses during the periods when shellfish sales are prohibited in a particular area, one solution is to transfer shellfish considered to be 'safe' to areas free of toxic phytoplankton as soon as a toxic bloom is detected. However, as soon as the faeces of contaminated shellfish are released into a safe zone, all surviving cells trapped in the mucus as pellicular cysts or hypnozooids (although it should be noted that such structures have not yet been described for *Pseudo-nitzschia* spp.; (Mann 2002) may be subsequently revived from this vegetative state and thus initiate a secondary bloom (Carriker 1992, Scarratt et al. 1993, Laabir & Gentien 1999, Laabir et al. 2006). Moreover, these cysts can be transferred into the biodeposit layers on the sea bottom, and thus give rise to a toxic cell seed stock that may later be re-suspended in the water column and result in further episodes of seeding when environmental conditions become favourable. In mussel *Mytilus edulis* faeces, Scarratt et al. (1993) demonstrated the presence of intact *Alexandrium tamarense* and Bricelj et al. (1993) found intact vegetative *Alexandrium fundyense* cells. Laabir and Gentien (1999) observed that *Alexandrium minutum*, *Alexandrium tamarense* and *Gymnodinium mikimotoi* dinoflagellate cells were revived after they had passed through the digestive tract of *Crassostrea gigas*. Similarly, *Prorocentrum lima*, a benthic dinoflagellate, has been shown to be able to survive in the digestive tube of *Argopecten irradians* seastar and subsequently to divide (Bauder & Cembella 2000).

To reduce risks arising from the transfer of contaminated shellfish, the recommended procedure is to store them in quarantine tanks over the period of time needed to empty their

digestive tract of undamaged toxic cells before transferring them to non-contaminated areas. However, to limit the extra cost incurred by this kind of procedure, it is vital to keep the quarantine period as short as possible. We therefore need to be able to predict how long the algae will remain in the bivalve digestive system. The objective of the present study was (i) to determine the presence or absence of intact *A. minutum*, *A. catenella* and *P. calliantha* cells in the faeces of *Mytilus galloprovincialis* and *Crassostrea gigas*, (ii) to predict the influence of environmental parameters (temperature and algal concentration) on the gut passage time for algae, and (iii) to predict the time required by a bivalve to eliminate all toxic cells from its digestive tube.

## **1.2. Materials and methods**

### Biological material

*Alexandrium minutum*, *Alexandrium catenella* and *Tetraselmis suecica* were cultivated in 10L tanks containing filtered autoclaved seawater (121°C; 15 min) enriched with either Guillard F/2 medium for dinoflagellates, or Provasoli's ES medium for *T. suecica*. The prasinophyceae *T. suecica* is frequently used as a feed in aquaculture and its deep colour makes it easy to detect in faeces, indicating any change in content. Fernbachs tanks containing 1.5 L of filtered sea water enriched with L1 silica medium were inoculated with *Pseudo-nitzschia calliantha* and later grown on in 10 L tanks until cellular concentrations reached 250 000 or 300 000 cells ml<sup>-1</sup>. The cultures were kept at 16 ± 1 °C under 50 ± 4 µmoles photons ml<sup>-1</sup> light, with a 12:12 (light:dark) photoperiod.

Pacific oysters *Crassostrea gigas* with a mean total individual weight of 50 g were used in the experiments, and Mediterranean mussels *Mytilus galloprovincialis* with a mean length of 45 mm. All bivalves were sexually immature.

### Experimentation

The experiments were performed at 16 or 20°C, a summary of the treatments is given in Table 1. Oysters or mussels were put in 35L recirculating raceways filled with natural sea water that had been decanted but not filtered. At this stage the bivalves were fed *Alexandrium* spp. (*A. minutum* or *A. catenella*) at 200 or 5 000 cells ml<sup>-1</sup>, or *P. calliantha* at 2 000 or 20 000 cells ml<sup>-1</sup>

As soon as the first faeces appeared, the bivalves were transferred into individual tanks in a second circulating flume. During this second stage of the experiment the bivalves were

continuously fed *Tetraselmis suecica* and the behaviour of each individual was monitored, in particular the retention rate. This parameter, expressed as a percentage of activity, was obtained from continuous fluorescence recording made at the outlets of a control tank (Fluo<sub>control</sub>) and assay (Fluo<sub>assay</sub>) tanks, as defined by the formula (1) below. Control tanks contained only empty oyster or mussel shells. Assay tanks contained a live bivalve.

$$\% \text{ Activity} = \frac{Fluo_{control} - Fluo_{assay}}{Fluo_{control}} \times 100$$

According to Soletchnik et al. (1996), gut passage time can be determined by the colour change of the faeces according to the following procedure: oysters are fed *Tetraselmis suecica* for 15 minutes and this alga acts as a tracer, labelling the faeces with a green colour. The oysters are then fed with natural algae. The time until the appearance of the brown faeces is considered as the gut passage time.

In the present study, the oysters were first fed *Alexandrium* spp. or *P. calliantha*, diets corresponding to brown faeces. They were then given *Tetraselmis suecica*, a green prasinophyceae, so as to produce green faeces. The gut passage time was determined by macroscopic observations. According to Cognie et al. (2001), faeces can be of different types: intestinal faeces, which appear at first; and glandular faeces, which occur afterwards. The time needed to pass from the first type of faeces to the second is approximately 6 hours. As the present study only concerned intestinal faeces, composition could be observed and classified after 6 hours. Faeces examinations were made under a microscope and classified into four types according to their state (Fig. 17): type 'a' corresponded to faeces made up of only *Alexandrium* spp. cells or *P. calliantha* cells; type 'b' represented a mix of *T. suecica* and the toxic algae, where toxic algae represented less than 50 % of the faeces content; type 'c' corresponded to a significant change in faeces colour, passing from brown to green, with less than 5 % toxic algae; and in the last type, 'd', 99% of the faeces consisted of *T. suecica*. The time needed to observe faeces corresponding to type 'c' was noted, as was the general appearance of the cells. Final observations were made after 6 hours feeding with *T. suecica*, and were then subjected to microscopic analysis. The gut passage time corresponded to faeces of the 'b' or 'c' type.

The gut passage time data were represented by Tukey box plots which allowed different time distributions to be displayed. Following the assumption that the data followed a normal distribution with equal variances, ANOVAs were performed to test for significant differences.

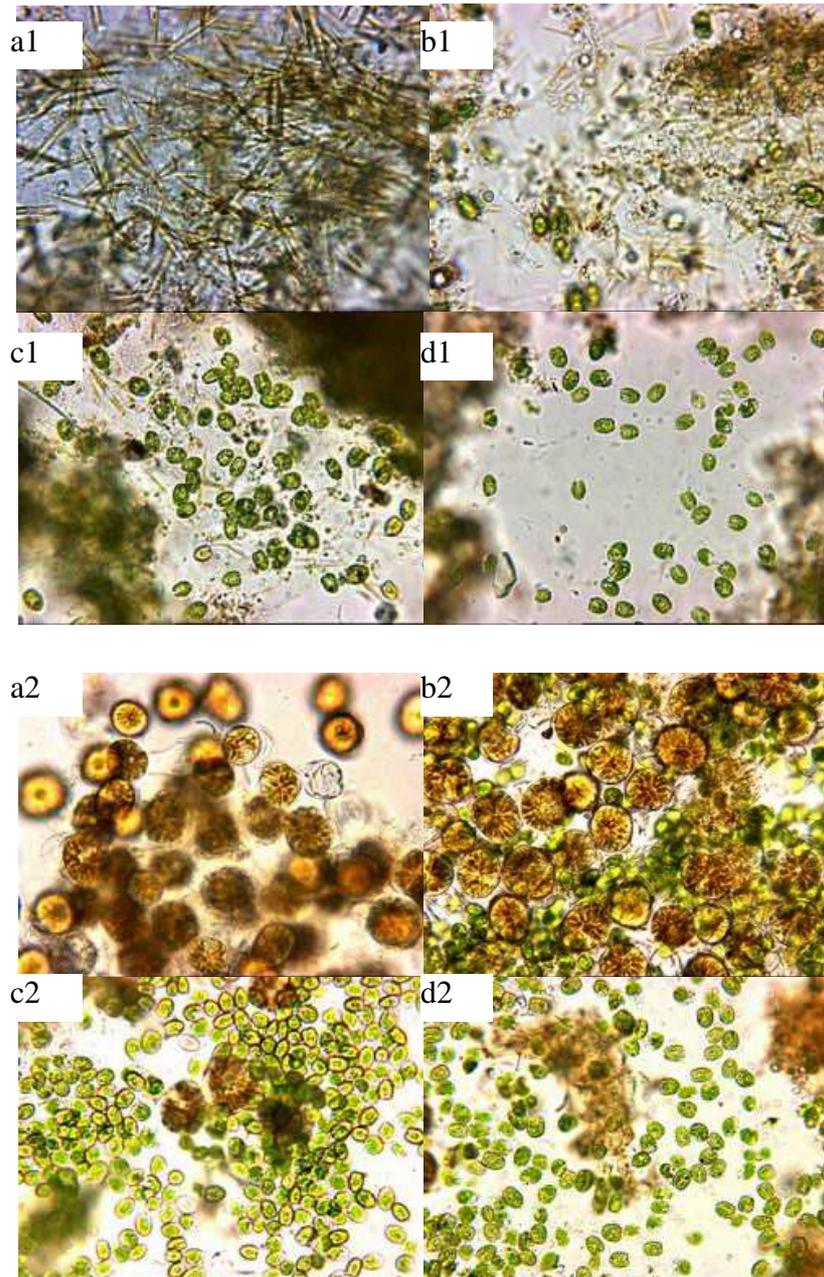


Fig. 17 Light microscope photographs (x 250) of faeces produced by *Crassostrea gigas* fed *Pseudo-nitzschia calliantha* (1) and *Alexandrium catenella* (2). Type “a” corresponds to faeces composed only of *Alexandrium* spp. or *P. calliantha* cells. Type “b” corresponds to a mixture of *Tetraselmis suecica* and the toxic algae species, with the toxic species representing less than 50% of the faecal contents. Type “c” corresponds to a definite colour change in the faeces, which pass from brown to green, the % of toxic algae representing less than 5%. Type “d” faeces consist of 99% *T. suecica*.

Even if normal distributions with equal variances were not systematically observed in our datasets, we chose to use ANOVA as this test is generally recognized to be robust. The ANOVA test was conducted using the “anovan1” and “multcompare” functions in Matlab 6.5

to obtain p-values and graphs with means and 95% confidence intervals. All values mentioned in the table of results (Table 3) are means  $\pm$  standard deviations.

### *Modelling*

Digestive tract transit is generally modelled by a linear or exponential function. Some complex multifactorial models are also available. This is the case for fish, where the influence of environmental and intrinsic parameters is well-known and documented. These parameters generally include temperature, species, fish weight, food quality and quantity, or feeding history (Boyce et al. 2000). Penry and Jumars (1987) concluded that the model most frequently encountered in nature (across the whole spectrum of animal species) is one in which the energy gain produced by ingested food is maximized, and combined with this simple tubular intestine featuring a piston-like operation causing axial dispersion of the contents. The model is characterized by a continuous flow of matter through the tube, and gives the following equation:

$$\frac{\delta C(z)}{\delta t} = -U \times \frac{\delta C(z)}{\delta z} + D_a \times \frac{\delta C^2}{\delta z^2} - kC(z)$$

where C is the toxic algal cell concentration,

t is the time (hours),

z is the axis ,

U is the speed in the digestive tube (cm h<sup>-1</sup>),

Da is the axial dispersion (cm<sup>2</sup>),

K is the cellular digestion coefficient,

L is the gut length (cm)

The first term  $-U \times \frac{\delta C(z)}{\delta z}$  is the transport term, corresponding to the particle progression speed in the digestive tube.

The second term  $D_a \times \frac{\delta C^2(z)}{\delta z^2}$  is the axial diffusion term.

The last term  $-kC(z)$  corresponds to cell digestion along the digestive tube.

Limiting conditions are:

$$C(z, t = 0) = 0$$

$$\frac{\delta C(z=L,t)}{\delta z} = 0$$

$$C(z=0,t) = C_{init}$$

Table 3 Summary table showing the results for the different experiments, with gut passage time and faecal type after 6 hours of contact with *Tetraselmis suecica*.

Bivalves	Algal species	Concentration (cell ml <sup>-1</sup> )	Temperature (°C)	Code on Fig. 2 Graphs	Number of bivalves	Gut passage time	% of bivalves with faeces of each type after 6h			
							a	b	c	d
Oyster	<i>A. minutum</i>	200	16 °C	a1	18	172 ± 92	0	78	22	0
	<i>A. minutum</i>	5000	16°C	b1	16	213 ± 70	5	40	55	0
	<i>A. minutum</i>	200	20°C	c1	17	164 ± 93	0	0	41	59
	<i>A. minutum</i>	5000	20°C	d1	20	205 ± 69	0	25	70	5
	<i>P. calliantha</i>	2000	16 °C	e1	17	158 ± 50	0	0	6	94
	<i>P. calliantha</i>	20000	16 °C	f1	6	136 ± 40	0	0	0	100
	<i>A. catenella</i>	200	16 °C	g1	20	231 ± 84	0	5	68	26
	<i>A. catenella</i>	5000	16 °C	h1	16	263 ± 65	5	0	69	25
Mussel	<i>A. minutum</i>	200	16 °C	a2	20	358± 45	10	50	0	40
	<i>A. minutum</i>	5000	16 °C	b2	20	284 ±68	10	20	5	65
	<i>P. calliantha</i>	2000	16 °C	c2	20	130 ± 48	0	0	10	90
	<i>P. calliantha</i>	20000	16 °C	d2	20	203 ± 52	0	0	0	100

### 1.3. Results

During the contamination process, the first faeces usually appeared 102 ± 27 minutes following feeding with toxic algae.

#### Gut passage times and population response homogeneity

The representation of each bivalve group with Tukey box plots allowed a better understanding of population response homogeneity (Fig. 18). Thus it can be noted that the gut passage times for oysters fed *P. calliantha* (Fig. 18, e1, f1) were more homogeneous than all the other oysters, which had been fed *Alexandrium* spp. (Fig. 18). The extreme values recorded for gut passage times (when the crosses on the Tukey graphs are above or below the first or third

quartile, respectively) for two oysters fed 200 cell ml<sup>-1</sup> *A. minutum* at 16°C (Fig. 18, a1) may be explained by a lag period that occurred if the molluscs did not filter the phytoplankton immediately (Fig. 19). Oysters with a lag period produced ‘c’ type faeces after more than 5 hours, but had a lag period greater than 2 h 30 minutes (Fig. 19). When this lag period was removed, these oysters had similar gut passage times as the others. This was also true for other oysters behaving in the same way, which had been fed 2 000 cell ml<sup>-1</sup> *P. calliantha* (Fig. 18, e1). With the mussels, an opposite tendency was observed: three mussels (Fig. 18, a2) had gut passage times shorter than the others, an observation which was probably due to greater feeding activity in these three individuals.

### The effect of temperature

The effect of temperature on gut passage time in *Crassostrea gigas* was investigated at two concentrations of *A. minutum* toxic diet: 200 and 5 000 cell ml<sup>-1</sup>. The temperatures tested were 16 and 20°C. For 200 cell ml<sup>-1</sup>, the gut passage times (Table 3) were 172 ± 92 min at 16°C, and 164 ± 93 min at 20°C. For 5 000 cell ml<sup>-1</sup> the gut passage times were 213 ± 70 min at 16°C and 205 ± 69 min at 20°C. Temperature therefore showed no significant effect on gut passage times (ANOVA: p = 0.81 for 200 cell ml<sup>-1</sup>; p = 0.75 for 5 000 cell ml<sup>-1</sup>). However, after 6 hours contact with *T. suecica*, only oysters in the 20°C group presented faeces of the ‘d’ type (consisting of 99% *T. suecica*). In fact, at 200 cell ml<sup>-1</sup> and 20°C, 59% of faeces were of the ‘d’ type compared with 0% at 16°C (Fig. 20c).

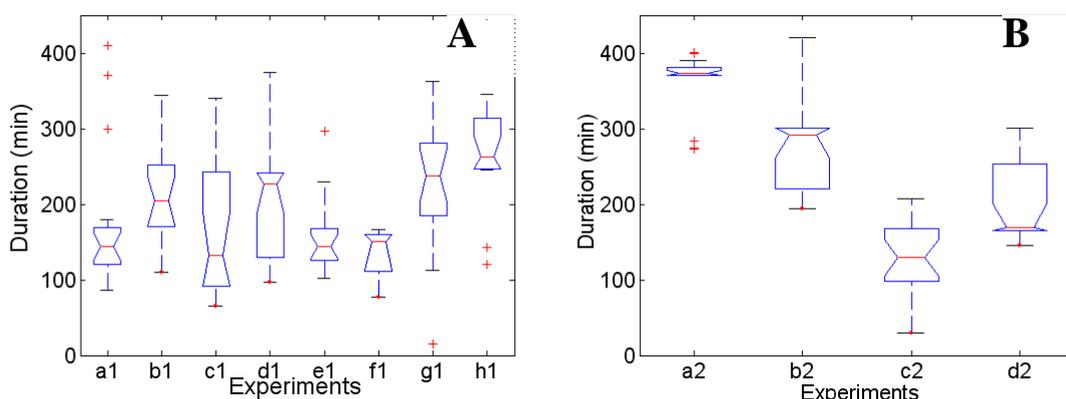


Fig. 18 Gut passage time distribution as a function of the different environmental parameters tested (Table 1) for oysters (A) and mussels (B)

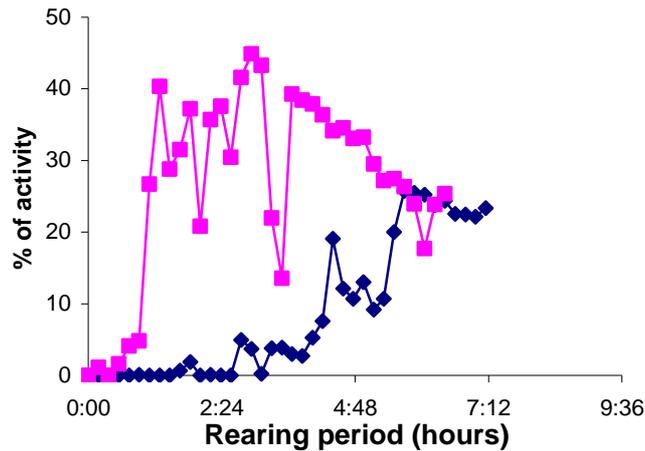


Fig. 19 Activity of two different oysters consuming 200 cell ml<sup>-1</sup> *Alexandrium minutum* at 16°C. Oyster 1 (◆) presents a lag period of 1.5 hours and oyster 2 (■) displays a high level of activity from the beginning to the end of the experiment.

### The effect of algal concentration

#### Oysters

Gut passage times, for 200 and 5 000 cell ml<sup>-1</sup> *A. minutum* at 16°C, were 172 ± 92 min and 213 ± 70 min respectively. Toxic algae concentrations therefore appeared to have no significant effect on gut passage time, which was confirmed by the ANOVA test ( $p = 0.1561$ ). However, the faeces were in a more advanced state for *A. minutum* at the 5 000 cell ml<sup>-1</sup> concentration: 55% of the oysters presented ‘c’ type faeces with 5 000 cell ml<sup>-1</sup>, compared with 22% for 200 cell ml<sup>-1</sup>. The same result was observed at 20°C.

The observed gut passage times, for *A. catenella* at 200 and 5 000 cell ml<sup>-1</sup>, were 253 ± 81 min and 268 ± 70 min respectively. The percentages of oysters producing ‘d’ type faeces were also similar between these treatments (26% for 200 cells ml<sup>-1</sup> and 25% for 5 000 cells ml<sup>-1</sup>), as were percentages of ‘c’ type faeces (68% at both concentrations).

In the experiment using 20 000 cells ml<sup>-1</sup> of *P. calliantha*, oyster filtration rates were probably inhibited, since only 6 out of 40 oysters produced faeces in the ‘contamination’ raceway. Therefore only these 6 individual oysters were transferred to separate tanks for subsequent study.

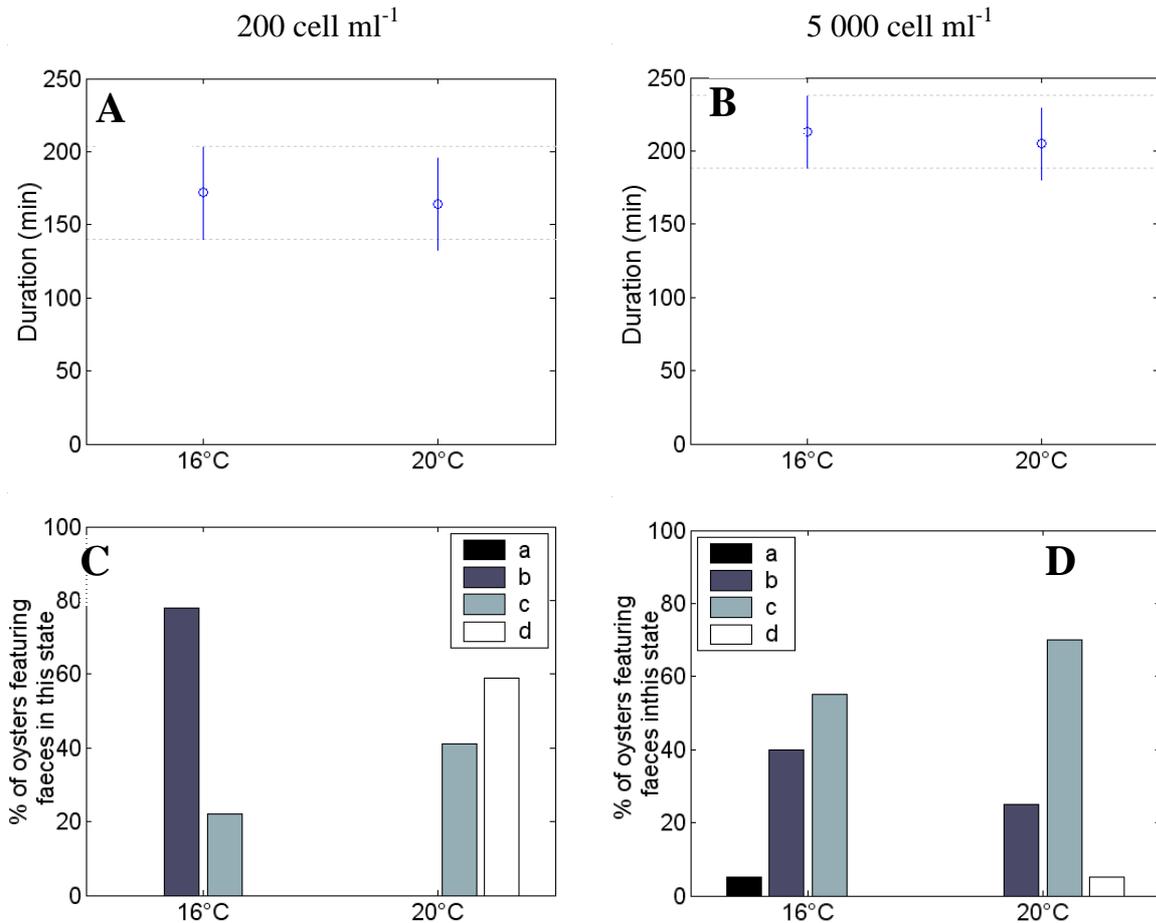


Fig. 20 Oyster gut passage time comparison at two temperatures (16°C and 20°C), with *Alexandrium minutum* fed at concentrations of 200 cell ml<sup>-1</sup> (A) or 5 000 cell ml<sup>-1</sup> (B). Comparison of the faecal types (see Fig. 1) after 6 hours of contact with *Tetraselmis suecica* for oysters previously fed with 200 cell ml<sup>-1</sup> (C) and 5 000 cell ml<sup>-1</sup> (D) *Alexandrium minutum*

### Mussels

The gut passage times were  $358 \pm 45$  min for 200 cell ml<sup>-1</sup> and  $284 \pm 64$  min for 5 000 cell ml<sup>-1</sup> *A. minutum*. For *P. calliantha*, gut passage times were  $130 \pm 48$  min (2,000 cell ml<sup>-1</sup>) and  $203 \pm 52$  min (20 000 cell ml<sup>-1</sup>). The ANOVA test confirmed that the algal concentrations induced significant differences in gut passage time ( $p = 0.003$  for *A. minutum* and  $p = 0.00005$  for *P. calliantha*). The increase in *P. calliantha* concentration resulted in longer gut transit times, whereas the increase in *A. minutum* concentration led to shorter gut transit times. The percentage of mussels producing ‘d’ type faeces at 6 h was greater for the highest cell concentrations (65% versus 40% for *A. minutum* and 100% versus 90% for *P. calliantha*).

### The effect of algal species

Gut passage times for the same algal concentrations were significantly greater for oysters fed on *A. catenella* cells than for those fed on *A. minutum* cells ( $p = 0.04$  for 200 cell ml<sup>-1</sup> and 0.04 for 5 000 cell ml<sup>-1</sup>; Fig. 21, A and B). Moreover, the oysters fed *A. catenella* produced

faeces in a more advanced state (Fig. 21, C and D). Indeed, only oysters fed with *A. catenella* had 'd' type faeces after 6 hours.

*C. gigas* and *M. edulis* presented a shorter gut passage time when fed *P. calliantha* than when fed *Alexandrium* spp., and *P. calliantha* cell degradation was faster in both cases (Table 3).

Results for different bivalve species

For the same concentrations of *Alexandrium minutum*, the mussel gut passage times were longer than those recorded for oysters:  $358 \pm 45$  versus  $172 \pm 92$  min for  $200 \text{ cell ml}^{-1}$  and  $284 \pm 68$  min versus  $213 \pm 70$  min for  $5\,000 \text{ cell l}^{-1}$  (Table 3) These times are significantly different, with p-values of  $2.65 \times 10^{-9}$  and 0.004 respectively. The gut passage times following contact with  $2\,000 \text{ cell ml}^{-1}$  *P. calliantha* were similar for the two ( $158 \pm 50$  min for oysters and  $130 \pm 48$  min for mussels;  $p = 0.090$ ).

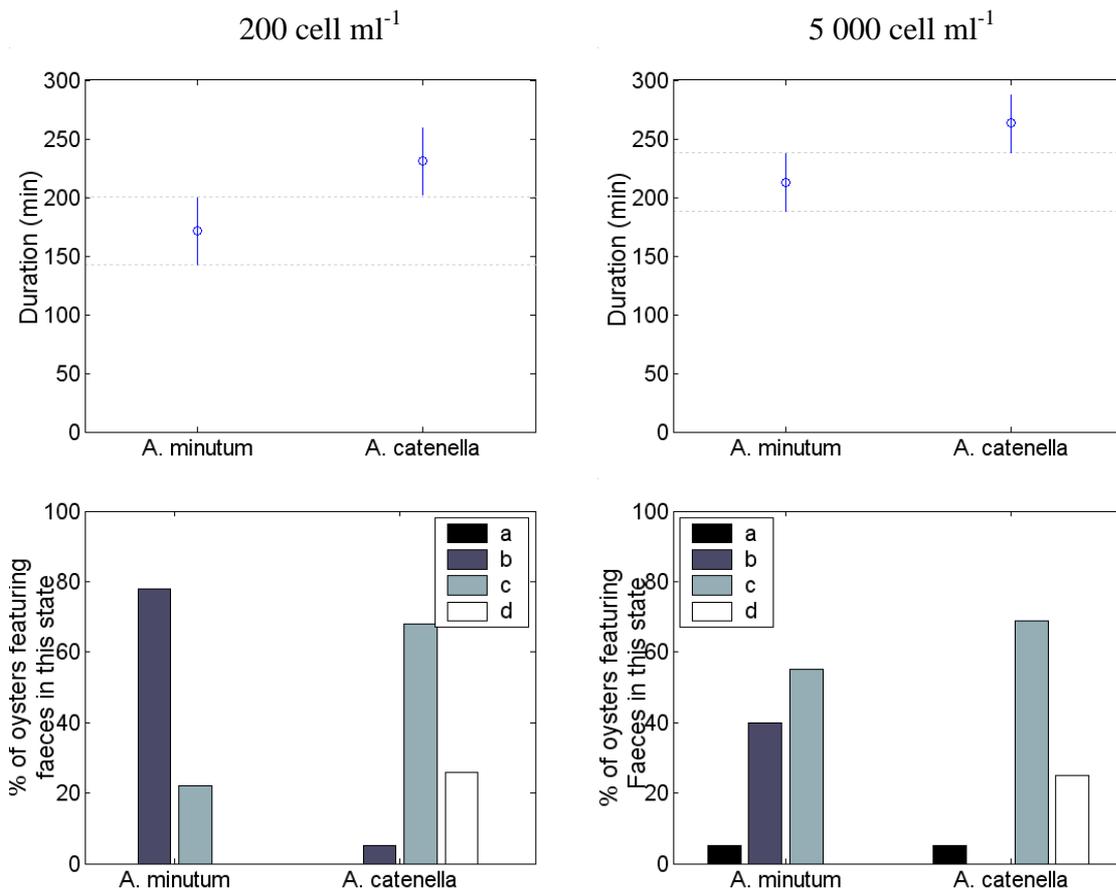


Fig. 21 The effect of algal species on gut passage time (A, B) and on the faecal type (C, D; see figure 1) for oysters, following the consumption of  $200 \text{ cell ml}^{-1}$  (A, C) or  $5\,000 \text{ cell ml}^{-1}$  (B, D) *Alexandrium minutum* or *A. catenella*.

### Residence time distribution modelling

When considering the ability of bivalves to maintain toxic phytoplankton cells in a well-preserved state for long periods in their digestive tract, such that the toxic cells can potentially be revived, the risk of contaminating a safe area following transfer is definitely lower for *P. calliantha* than for *Alexandrium sp.* It appears vital to set up a model to determine the time needed to empty the digestive tract of temporary cysts or revived cells. We chose to model the digestive tube as an axial dispersion piston, as recommended by Penry and Jumars (1987). When, for example, the oysters that had consumed *Alexandrium sp.* were tested using this gut passage time model (Fig 22), and the coefficients were as follows:  $L = 4.6$  cm,  $C_{\text{mean}} = 1$  unit,  $U = 1.2$  cm h<sup>-1</sup>,  $D_a = 0.23$  cm<sup>2</sup> and  $k = 0$ . The  $k$  term corresponds to cell digestion, although the actual dataset did not allow a correct evaluation of this term. The model was based on three observed parameters. The first was mean appearance time of brown faeces after the oysters were fed *Alexandrium spp.* *Alexandrium*-based faeces generally appeared within the first 2 hours. The second parameter corresponded to the change in the colour of the faeces due to the change in algae diet (to *Tetraselmis suecica*), previously defined as the mean gut passage time. The observed mean observed gut passage time was around 3.5 hours. The final parameter was cyst presence after 6 hours feeding with *Tetraselmis suecica*.

The model shows that faeces containing 100% *Alexandrium sp.* would be produced within less than two hours (Fig. 6a). Within three hours following the *T. suecica* contact, this non toxic alga would then become the dominant species in the faeces (Fig. 6b), which agrees with our observations (data not shown). After 6 hours, *Alexandrium sp.* cells would only be present at a low level (lower than 10%). This model represents the observed data, but needs to be refined so it can be integrated into an overall shellfish contamination/decontamination model that can be applied to phycotoxins.

#### **1.4. Discussion**

Whole dinoflagellates and diatoms cells can be found in oyster or mussel faeces. Bardouil et al. (1993) and Laabir and Gentien (1999) observed the presence of intact cells of *Alexandrium minutum* and *Alexandrium tamarense* in oyster faeces. Bricelj et al. (1993) also found dinoflagellate cells in mussel faeces. Finally, Bauder and Cembella (2000) noted the presence of *Prorocentrum lima* in *Argopecten irradians* faeces. *Alexandrium spp* cysts have also been found in the faeces of other marine invertebrates, such as *Theole fragilis* (Tsuji no et al. 2002), polychaetes *Paraprionospio spp.* (Tsuji no et al. 2002) and copepods (Reid & Boalch 1987, Montresor et al. 2003).

The presence of intact and viable cells in bivalve faeces does not seem to be related to toxin presence in the phytoplankton cells. This was confirmed by the findings of Bardouil et al. (1993) who found undamaged toxic and non toxic dinoflagellate cells in oyster faeces. Similarly, Barillé and Cognie (2000) observed the presence of intact revived diatoms cells in oyster faeces. Undigested cells may result from the resistance of the cell walls to shellfish gastric juices. Oysters ingesting 'naked' dinoflagellates usually produce faeces made up of split cells, whereas oysters consuming dinoflagellates with thick thecae produce faeces containing intact or encysted cells in proportions ranging from 50 to 90% (Laabir & Gentien 1999).

Several problems may arise from the presence of toxic phytoplankton cells in the faeces: a possible secondary contamination of other bivalves via re-suspension in the water column (Kikuchi et al. 1996) and, in the event of shellfish transfer, the contamination of another area, previously free of toxic cells. Before any transfer of molluscs to a new area, quarantine storage in recirculating tanks, as suggested by Dukema (1992), therefore seems necessary. To avoid unnecessary expenditure, predictions should first be made on how long the bivalves will take to reject all the whole phytoplankton cells. For this calculation, it is crucial to know the influence of different environmental parameters.

Temperature seems to have an effect on the phytoplankton cells contained in the faeces. Following 6 hours feeding with *T. suecica* cells, faeces from oysters at 20°C presented a lower percentage of whole toxic cells than faeces from oysters at 16°C. This result does not reveal any convincing evidence that temperature affects phytoplankton cell degradation. However, other studies have highlighted the role that temperature plays in the digestion process. These show that the higher the temperature, the greater the cilia activity along the digestive tube (Boucaud-Camou et al. 1983). In the same way, digestive enzymes are more active at 20°C than at 16°C. The toxic algae concentration does not seem to have any effect on gut passage time in oysters, but does in mussels. Moreover, *A. minutum* cells are smaller than *A. catenella* cells, and the gut passage time is longer for *A. catenella* than for *A. minutum* cells. In addition, gut passage time was different according to the type of bivalve used for the experiment. However, for both mussels and oysters, gut passage time is longer with diatoms than with dinoflagellates.

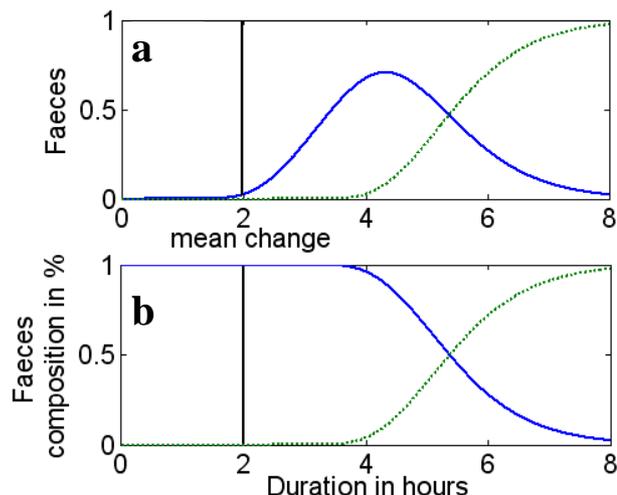


Fig. 22 Modelling the apparition of faeces in oysters (a) containing *Alexandrium* spp. (- -) and *Tetraselmis suecica* (-) and the faecal composition (b) over time.

The model agrees with data on first faeces appearance time, gut passage time (colour change) and cyst presence after 6 hours feeding with *T. suecica*. Moreover, it gives a good representation of the potential risk of transferring oysters to the natural environment: 6 hours was not enough time to empty the oyster gut (Fig 22).

To sum up, temperature, cell concentration, cell size and bivalve species seem to be the key-parameters that should be taken into account when trying to set up a model to predict the time required to free the digestive tube of revived and whole toxic algal cells. To improve the model, it would be interesting to integrate different environmental factors (temperature, cell concentration, cell size and bivalve type) into the initial model, based upon the ‘intestinal transit’ parameters (U: velocity, Da: axial dispersion, and k: cell digestion).

Acknowledgements: This study was carried out with the financial support of the National Programme on Coastal Environment (PNEC), Survitox project AT 2004-2006.

## 2 Le devenir des cellules de Dinoflagellés producteurs de toxines diarrhéiques

Il n'existe pas de données sur l'état des cellules de *Dinophysis spp.* dans les fèces car la contamination des mollusques par des cultures de *Dinophysis spp.* n'est pas encore réalisable. L'étude *in situ* qui suit va donc s'intéresser au devenir des cellules de *Dinophysis spp.* dans l'estomac et dans les fèces des moules prélevées à Sogndal dans le Sognefjord en Norvège, dans un site connu pour le développement de dinoflagellés toxiques. La contamination des bivalves résulte, dans cette expérience, de la consommation de cellules de microalgues productrices d'acide okadaïque et ses dérivés. Ce site a l'avantage d'être situé loin de l'embouchure du fjord. De ce fait, les mouvements des masses d'eau y sont moins importants et le temps de résidence des *Dinophysis spp.* est plus long. Des prélèvements d'eau de mer ont été réalisés par pompage à différentes profondeurs : 2,5 , 3, 4, 5, 6, 7 et 8 m à un même instant t. Les échantillons sont ensuite fixés au lugol acétique. Le comptage des cellules de *Dinophysis spp.* est réalisé dans des cuves de 25 mL après 1 heure de sédimentation. Trois espèces de *Dinophysis* ont été identifiées : *D. acuta*, *D. acuminata* et *D. skagii* (Table 4).

Table 4: Concentrations of three *Dinophysis* species (in cells L<sup>-1</sup>) according to the different depths in Sognefjord

Tableau 4 : Concentration de trois espèces de *Dinophysis* selon la profondeur (en cellules L<sup>-1</sup>) à Sognefjord.

	2.5 m	3 m	4 m	5 m	6 m	7 m	8 m
<i>D. acuta</i>	160	0	80	2000	2640	1840	1760
<i>D. acuminata</i>	240	320	80	0	0	0	0
<i>D. skagii</i>	1760	320	160	0	0	0	0

Nous nous sommes davantage intéressés à *Dinophysis acuta* car cette microalgue est plus toxique que les deux autres espèces présentes dans la colonne d'eau. Les cellules de *D. acuta* utilisées lors des expériences ont été pompées à six mètres (Table 4), filtrées puis concentrées.

Les moules *Mytilus edulis* ayant servi aux expérimentations ont été collectées directement sur le même site que les prélèvements d'eau de mer, à 6 mètres de profondeurs. Un second lot de moules a été utilisé, en provenance du même site que précédemment. Cependant elles ont été stockées pendant plusieurs mois dans un bassin alimenté en continu par de l'eau de mer prélevée à 100 m de profondeur sans apport supplémentaire de nourriture.

Expérimentation sur la survie de *Dinophysis spp.*

Les contenus stomacaux de moules ont été prélevés à l'aide d'une sonde cannelée (Fig. 23a) puis fixés au lugol acétique avant d'être observés par microscopie optique. Le prélèvement des contenus stomacaux a été réalisé (i) directement sur des moules prélevées au niveau de la concentration maximale en *Dinophysis acuta*, (ii) sur des moules, provenant du bassin alimenté avec de l'eau de mer prélevée à 100 mètres de profondeur et mises en contact pendant 1 heure avec  $2\,640\text{ cellules L}^{-1}$  de *D. acuta* ; (iii) des moules alimentées toute une nuit avec une culture de *Skeletonema costatum* puis mises en contact pendant 2,5 heures avec un mélange de *S. costatum* ( $21,7\ \mu\text{g L}^{-1}$  de chlorophylle a) et  $800 \pm 220\text{ cellules L}^{-1}$  de *Dinophysis acuta*. Des prélèvements de contenus stomacaux ont été effectués au bout de 45, 90 et 150 minutes. Les fèces ont été collectés au bout d'une heure et observés au microscope optique.

Expérimentation sur l'impact des enzymes présentes dans l'estomac

Trois contenus stomacaux de moules provenant du bassin alimenté en eau de mer et prélevées à 100 mètres de profondeur, ont été placés en contact avec 0,5 mL de concentrat de *D. acuta* provenant du milieu naturel. L'évolution morphologique des cellules microalgales a été observée au microscope au bout de 45 minutes, 1h 30 et 2h.

## **2.1 Résultats**

Les cellules de *Dinophysis spp.* se fracturent en premier lieu au niveau des ailettes sulcales puis au niveau de la colerette cingulaire. Cette cassure provoque la séparation des deux demi-valves qui se différencient donc facilement des cellules entières par l'absence d'ailettes sulcales et / ou de la collerette cingulaire (Fig. 23b-c).

Lors des expériences sur la dégradation des cellules de *Dinophysis spp.*, les observations microscopiques des contenus stomacaux ont permis de mettre en évidence principalement des demi-valves aussi bien pour les moules directement issues du milieu naturel que pour les moules exposées artificiellement à des cellules de *D. acuta* (Fig. 23d). De même, les fèces récoltées ne contenaient pas de cellule entière de *Dinophysis spp.* (Fig. 23e).

L'expérience sur l'impact des enzymes présentes dans l'estomac des moules a permis d'obtenir les résultats suivants (Fig. 23f-h): après 45 minutes d'incubation du contenu stomacal de moules avec un concentrat naturel de microalgues contenant des cellules de *Dinophysis spp.*, aucune dégradation n'est observée. Par contre après 1h30, toutes les

microalgues sont enrobées de mucus (Fig. 23g). Après 2 heures le contenu cellulaire des cellules de *Dinophysis spp.* se vide progressivement. La dégradation des cellules de *Dinophysis spp.* est rapide (2 heures) alors que ces moules étaient placées dans de l'eau de mer prélevée à 100 m de profondeur sans ajout de nourriture depuis plusieurs mois.

## **2.2 Discussion**

La dégradation de *Dinophysis acuta* est très rapide dans l'estomac des moules *Mytilus edulis* contrairement à d'autres cellules de Dinoflagellés (Laabir & Gentien 1999, Bauder & Cembella 2000, Laabir et al. 2006, Gueguen et al. 2008b). Ce résultat est en accord avec Paulmier & Joly (1985) et Sidari et al. (1998) qui n'observent que des demi valves de *Dinophysis spp.* dans les estomacs de moules. Pratiquement toutes les cellules entrantes vont être lysées et vont libérer rapidement leur contenu toxinique dans l'estomac. Ces toxines libérées vont soit transiter vers la glande digestive, soit être directement éliminées par l'intestin.

Les fèces observées ne contenaient pas de cellules entières de *Dinophysis spp.*. La dégradation de *Dinophysis spp.* dans le système digestif des moules permet de déplacer les mollusques bivalves d'une zone contaminée vers une zone exempte de ces cellules phytolantoniques sans risque de contamination de la nouvelle zone.

Ces résultats ne semblent pas s'appliquer aux cellules des *Prorocentrum* benthiques qui synthétisent également de l'AO et des DTXs. Ainsi, des cellules entières de *Prorocentrum lima* ont été retrouvées dans les fèces d'*Argopecten irradians* (Bauder & Cembella 2000). La dégradation des cellules de Dinoflagellés dans le système digestif des mollusques bivalves semble davantage liée à la présence d'une thèque pecto-cellulosique résistante, qu'à la présence de toxines.

Degradation of *Dinophysis acuta* cells in mussel stomach occurs rapidly unlike to the other Dinoflagellate cells (Laabir & Gentien on 1999, Bauder & Cembella on 2000, Laabir et al. 2006, Gueguen et al. 2008b). This result is in agreement with Paulmier & Joly (1985) and Sidari et al. (1998) who observed only half-valves of *Dinophysis spp.* in mussel stomach. Nearly all the cells will get lysed and then quickly release their toxic contents in the stomach. These released toxins will either pass through the digestive gland, or are directly eliminated by the intestine.

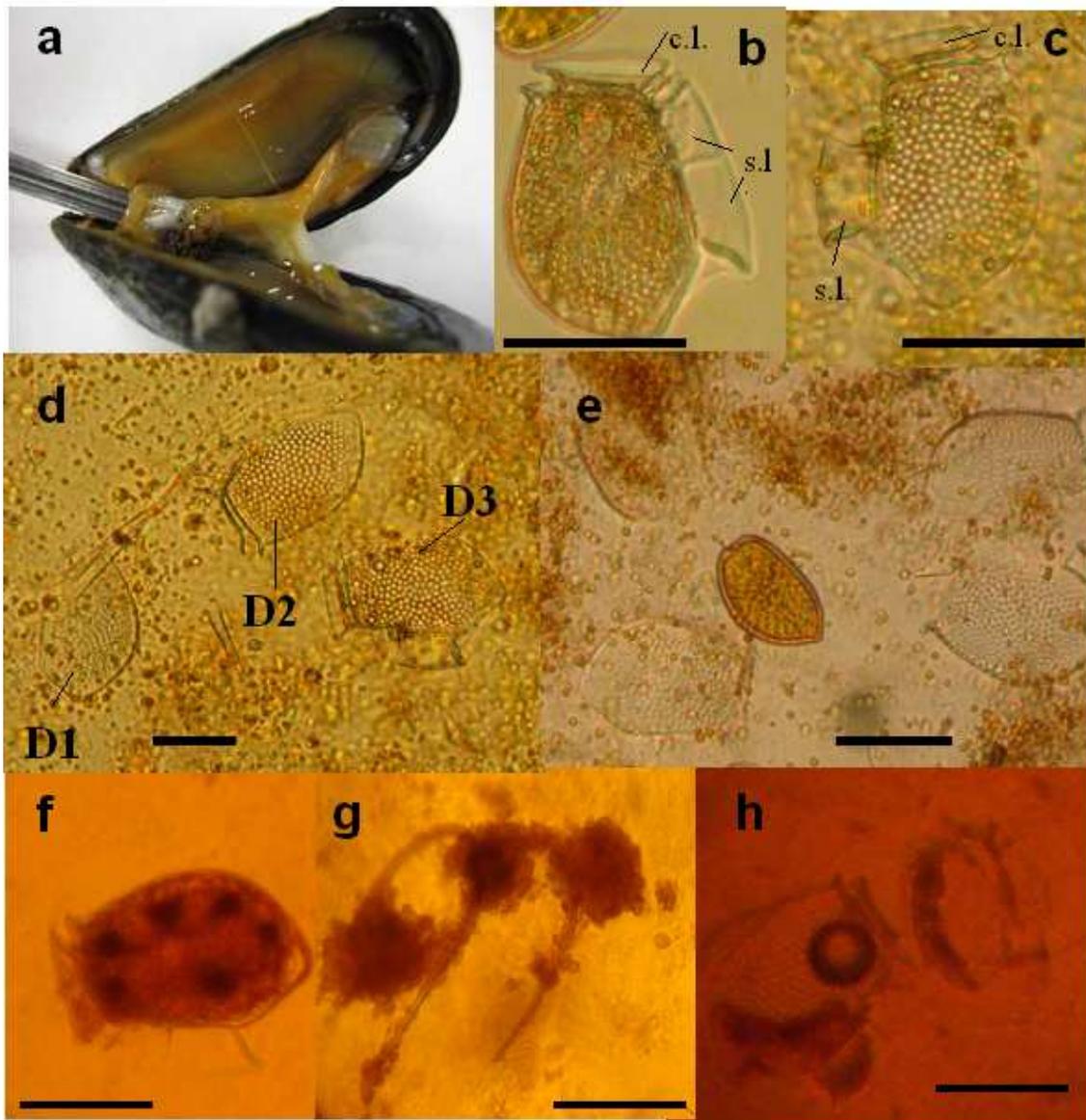


Fig. 23 (a) Sampling of mussel stomach with a « roved director ». (b –c) *Dinophysis acuta* entire cell and half-valve, c.l.: Cingular list, s.l.: Sulcal list. (d) Stomach content with three half-valves of *Dinophysis spp*. D1 presents no cingular nor sulcal list, D2 misses its two sulcal lists as D3. (e) Faeces content with four *Dinophysis spp.* half-valves and a *Prorocentrum micans* entire cell. (f-h) Phytoplankton evolution after 45 minutes (f), 1h30 (g) and 2 h (h) in the stomach content of starved mussels. (f) *Dinophysis spp.* cells are undamaged, (g) all the cells are coated, (h) *Dinophysis spp.* cells are emptying their cellular contents. Scale bar = 30µm.

Figure 23 (a) Echantillonnage de l'estomac d'une moule à l'aide d'une sonde cannelée. (b-c) Une cellule entière et une demi-valve de *Dinophysis acuta*, c.l. : collerette cingulaire, s.l. : ailette sulcale. (d) Contenu stomacal avec trois demi-valves de *Dinophysis spp.* D1 ne possède ni de collerette cingulaire ni d'ailette sulcale D2 et D3 ne possèdent plus leurs deux ailettes sulcales. (e) Contenu de fèces avec quatre demi-valves de *Dinophysis spp.* et une cellule entière de *Prorocentrum micans*. (f-g) Evolution du phytoplancton mis en contact avec le contenu stomacal de moules au repos après 45 minutes (f), 1h30 (g) et 2h (h). (f) Les cellules de *Dinophysis spp.* sont entières, (g) toutes les cellules sont enrobées de mucus, (h) les cellules de *Dinophysis spp.* se vident de leur contenu cellulaire. La barre d'échelle = 30µm.

The observed faeces did not contain entire cells of *Dinophysis spp.*. Degradation of *Dinophysis spp.* cells in mussel digestive system makes it possible to move the bivalves from a contaminated area to an area free of these phytoplanktonic cells, without any risk of contamination of the new area.

These results do not seem to apply to benthic *Prorocentrum* cells which also synthesize OA and DTXs. Thus, entire cells of *P. lima* were found in faeces of *Argopecten irradians* (Bauder and Cembella on 2000). Dinoflagellate cells degradation in bivalve digestive system seems to be more connected to the presence of a resistant pectocellulosic theca than to the presence of toxins.

## **Partie 2- Le devenir des toxines**

Les deux expériences réalisées ont permis de renforcer les observations de Laabir et Gentien (1999) sur le devenir des dinoflagellés fragiles ou résistants. Les Dinoflagellés résistant peuvent ainsi se protéger des sucs digestifs présents dans l'estomac des bivalves contrairement aux autres dinoflagellés qui vont rapidement être dégradés. Cependant, pour ces deux formes, les cellules dégradées dans l'estomac vont libérer leurs toxines qui sont alors dirigées soit directement vers l'intestin soit d'abord vers la glande digestive. Les toxines arrivées dans la glande digestive vont, d'après Blanco et al. (1997), se fixer aux cellules constituant la paroi du tubule digestif. Une infime partie va pouvoir transiter vers les cellules plus éloignées de la lumière du tubule et vers les cellules des autres tissus.

Les toxines sont présentes dans les différents tissus des bivalves, mais elles sont toujours majoritairement localisées dans la glande digestive et ce quelle que soit la famille de toxines et l'espèce de bivalves concernée (Silvert & Cembella 1995, Bricelj & Shumway 1998a, Blanco et al. 2007, Gueguen et al. 2008a). La proportion de toxine dans les différents tissus est variable d'une espèce de bivalve à l'autre (Bricelj & Shumway 1998b, Sagou et al. 2005). De plus, la détoxification ne s'effectue pas à la même vitesse pour les différents tissus (Chen & Chou 2002, Yu et al. 2005). Afin de pouvoir modéliser les transferts et la répartition des toxines au cours de la détoxification, il est important de comprendre comment s'effectuent ces transferts. Deux approches différentes ont été choisies : (i) au niveau subcellulaire, afin de savoir quels organites participent au stockage et à la dégradation des toxines, (ii) au niveau des tissus, en suivant l'incorporation des toxines dans les différents organes. Dans le premier cas, la localisation de l'AO dans la glande digestive de moule a été recherchée car les toxines sont principalement localisées dans cet organe (Yasumoto et al. 1978) aussi bien chez *Mytilus edulis* (Pillet et al. 1995), que chez *M. galloprovincialis* (Blanco et al. 2007), *Argopecten irradians* (Bauder et al. 2001) et *Pecten maximus* (Hess et al. 2003). Les autres tissus peuvent cependant représenter plus de 20 % de la toxicité totale (Bauder et al. 2001). Cependant, le test officiel de toxicité s'effectue exclusivement sur la glande digestive des bivalves. De plus, leur contamination par des toxines de type diarrhéiques peut être très rapide contrairement à la détoxification qui peut durer de plusieurs semaines en France (Marcaillou-Le Baut et al. 1994) à plusieurs mois en Norvège (Duinker et al. 2007).

Svensson et al. (2003) ont observé une augmentation du volume du compartiment lysosomal dans les cellules sanguines des moules mises en contact avec de l'AO. De plus, les

lysosomes sont connus pour avoir un rôle important dans la digestion intracellulaire et dans la détoxification des cellules. Enfin, les lysosomes sont capables de séquestrer des composés lipophiles (Einsporn & Koehler 2008) et des métaux lourds (Domouhtsidou & Dimitriadis 2000, Einsporn et al. 2009).

L'approche tissulaire a été expérimentée sur des huîtres contaminées par des toxines paralysantes car les transferts des toxines paralysantes vers les autres tissus jouent un rôle plus important que dans le cas des toxines diarrhéiques chez la moule.

La première étude de cette seconde partie, portera sur l'incorporation des toxines dans les différents tissus.

La seconde étude s'attachera à observer s'il existe un lien entre les lysosomes et l'AO.

Two experiments were realized. They allowed to strengthen Laabir & Gentien (1999) observations regarding the fate of weak and resistant Dinoflagellates. "Resistant" Dinoflagellates can protect themselves from the gastric juices present in bivalve stomach unlike to the "weak" Dinoflagellates which are quickly damaged, forming two half-valves. However, for both forms of Dinoflagellates, damaged cells at the stomach level are going to release their toxin which either goes directly towards the intestine or first towards the digestive gland and then to the intestine. According to Blanco et al. (1997), the toxin reaching the digestive gland fixes onto the digestive cells forming the wall of the digestive tubule. A tiny part is nonetheless able to reach cells that are more remote from the light of the tubule and even cells of the other tissues.

Toxins are present in various bivalve tissues, but they are always mainly localized in the digestive gland, whatever the toxin family or the bivalve is (Silvert & Cembella 1995, Bricelj & Shumway 1998a, Blanco et al. 2007, Gueguen et al. 2008a). The toxin proportion in the various tissues is variable and species-dependent (Bricelj & Shumway 1998b, Sagou et al. 2005). Furthermore, the detoxification speeds are different for the various tissues (Chen & Cabbage 2002, Yu et al. 2005). To be able to model the toxin transfer and distribution during detoxification, it is important to understand how these transfers are performed. Two different approaches were chosen: i) at the subcellular level, to know which organelles take part in the toxin storage and degradation; ii) at the tissues level by following the toxin incorporation in the various organs. In the first case, the localization of OA in mussel digestive gland was experimented because toxin is mainly localized in the digestive gland (Yasumoto et al. 1978) in the same way that *Mytilus edulis* (Pillet et al. 1995), *M. galloprovincialis* (Blanco et al. 2007) and *Argopecten irradians* (Bauder et al. 2001) *Pecten maximus* (Hess et al. 2003). Other tissues can however represent more than 20 % of the overall toxicity (Bauder et al. 2001). However, the official toxicity test focuses exclusively on the digestive gland of bivalves. Furthermore, their contamination by diarrhetic toxins can be very fast, unlike the detoxification that

can last several weeks in France (Marcaillou-Le Baut and al. 1994) to several months in Norway (Duinker and al. 2007).

Svensson et al. (2003) observed an increase of the lysosomal compartment volume in the mussel blood cells put in contact with OA. Furthermore, lysosomes are known to have an important role in the intracellular digestion and in the detoxification of cells and they are able to sequester lipophilic compounds (Einsporn and Koehler on 2008) and heavy metals (Domouhtsidou & Dimitriadis 2000, Einsporn et al. 2009).

The tissue approach was experimented on oysters contaminated by paralytic toxins because the transfer of paralytic toxins towards other tissues play a more important role than in the case of diarrhetic toxin in mussels.

The first study of this second part will concern the incorporation of toxin in various tissues.

The second study will attempt to observe if there is a link between lysosomes and OA.

## 1 La répartition tissulaire des toxines paralysantes

La grande majorité des toxines paralysantes est située dans les tissus viscéraux de nombreuses espèces de bivalves (Bricelj & Shumway 1998a) : *Mytilus edulis* (Silvert & Cembella 1995), *Hiatula rostrata* (Chen & Chou 2002), *Callista chione* (Sagou et al. 2005) et *Crassostrea gigas* (Gueguen et al. 2008a). Cependant, il est important de noter que les toxines se répartissent dans tous les tissus et que la vitesse de détoxification est tissus-spécifique (Blanco 2004, Li et al. 2005). Aucune donnée dans la littérature ne détaille la répartition des toxines PSP dans les tissus de *Crassostrea gigas*. L'objectif de cette expérience est donc de déterminer la répartition des toxines paralysantes dans les différents tissus de l'huître (manteau, muscle, branchies, gonade et glande digestive) tout au long de la contamination.

### 1.1 Matériels et méthode

#### Matériel biologique

La culture d'*Alexandrium minutum* a été réalisée en milieu L1 soit en ballon de 10L, soit en bioréacteur de 2 × 100 L, mais dans ce dernier cas, avec des productions toxiques plus faibles. *A. catenella* a été cultivées dans des ballons de 10 L contenant du milieu de culture L1. Les cultures ont lieu dans une salle thermorégulée à  $16,0 \pm 0,4$  °C avec un éclairage nyctéméral de 12h / 12h ( $50 \mu\text{mol}$  de photons  $\text{m}^{-2} \text{h}^{-1}$ ).

Les huîtres *Crassostrea gigas* provenaient de la Baie de Bourgneuf dans la première expérience et de la station expérimentale de La Tremblade (Ifremer, France) dans les deux autres expériences (Tableau 5).

Table 5 Experimental conditions for the follow-up of the PSP toxin incorporation in the different tissues.

Tableau 5 Conditions expérimentales pour le suivi de l'incorporation de toxines PSP, dans les différents tissus de l'huître.

Oysters		Toxic phytoplankton		
Origin	Wet weight (g)	Algal food	Culture	Cells toxicity pg STX equiv. cell <sup>-1</sup>
Bourgneuf	$5.6 \pm 0.5$	<i>A. minutum</i>	10L-tank	$1.15 \pm 0.07$
La Tremblade	$10.8 \pm 0.7$	<i>A. catenella</i>	10L-tank	$1.72 \pm 0.27$
La Tremblade	$10.9 \pm 1.7$	<i>A. minutum</i>	Bioreactor	$0.38 \pm 0.06$

Expérimentations

Lors de la première semaine d'expérience, des huîtres diploïdes sont contaminées pendant 4 jours avec un flux continu d'*Alexandrium minutum* de  $290 \pm 80$  cellules  $\text{mL}^{-1}$ . Lors de la deuxième semaine, les huîtres sont contaminées avec un apport en continu de  $180 \pm 35$  cellules  $\text{mL}^{-1}$  d'*Alexandrium catenella* pendant la même durée d'exposition. La contamination des huîtres de la troisième semaine a été réalisée avec  $520 \pm 140$  cellules  $\text{mL}^{-1}$  d'*A. minutum*. Les trois expériences ont été réalisées en banc écophysiological (Cf Chapitre 3). Tous les jours, quatre huîtres sont prélevées, congelées à  $-80^{\circ}\text{C}$  puis disséquées par organes (glandes digestives, gonades, muscle, manteau et branchies). Pour chaque organe des regroupements de quatre individus sont réalisés pour l'analyse du contenu toxinique (Annexe I).

**1.2 Résultats**

Aucune variation dans la répartition des toxines dans les différents tissus n'est observée pendant les quatre jours de contamination avec de l'*A. minutum* dont la toxicité cellulaire est de  $1.15 \pm 0.07$  pg éq STX cellule $^{-1}$  (Fig. 24; test anova : manteau  $p = 0.87$  ; muscle  $p = 0.13$  ; glande digestive  $p = 0.99$  ; gonade  $p = 0.85$  ; branchies  $p = 0.70$ ).

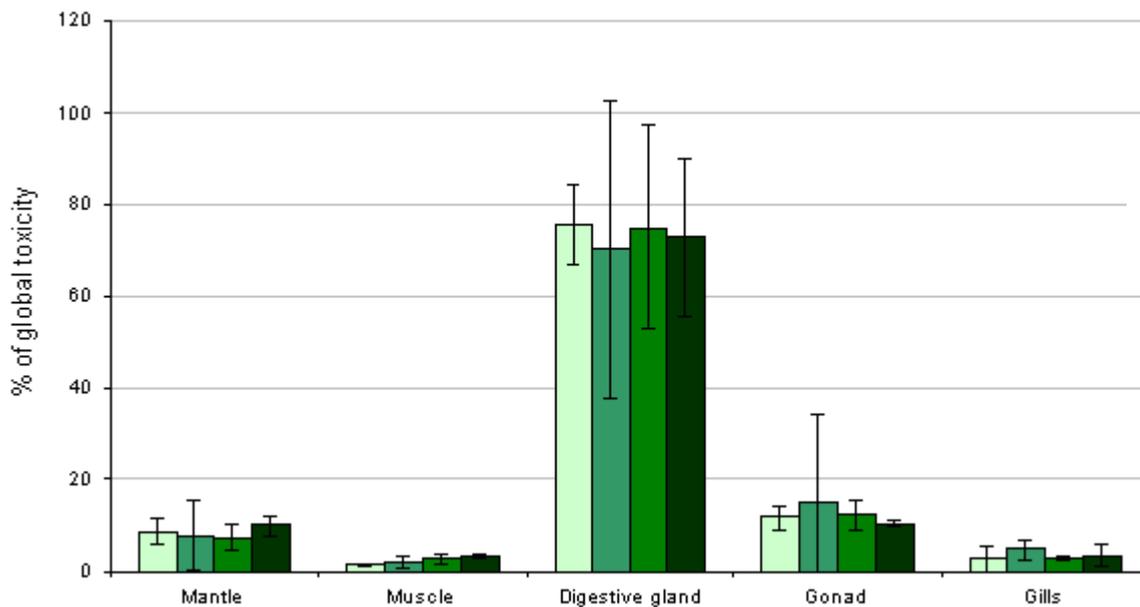


Fig. 24 Evolution of toxicity distribution between the different tissues during the contamination by *A. minutum* with a cell toxicity of  $1.15 \pm 0.07$  pg STX equiv. cell $^{-1}$ , as a percentage of the global toxicity (manteau, muscle, digestive gland, gonad and gills) during the contamination period from day 1 to day 4 (from light to dark green). Mean  $\pm$  standard deviation.

Figure 24 Evolution de la répartition de la toxicité dans chaque tissu lors de la contamination avec de l'*A. minutum* dont la toxicité cellulaire était de  $1,15 \pm 0,07$  pg éq. STX cellule $^{-1}$ , en pourcentage de la toxicité globale (manteau, muscle, glande digestive, gonade et branchies) pendant la période de contamination du jour un au jour quatre (du vert le plus clair au plus foncé). Moyenne  $\pm$  écart type.

De plus, l'importance relative dans le contenu toxinique est similaire pour les trois expériences en ce qui concerne le manteau (anova ;  $p = 0,14$ ), le muscle (anova ;  $p=0,37$ ) et la gonade (anova ;  $p=0,27$ ). Par contre, le pourcentage de la toxicité globale dans la glande digestive est inférieur lors de l'expérience de contamination des huîtres par de l'*Alexandrium catenella* ce qui induit une différence significative entre les trois expériences (anova ;  $p<0,05$ ). De la même façon, une différence significative dans la répartition des toxines dans les branchies est observable (anova ;  $p < 0,03$ ). Cependant, l'importance de chaque organe dans la toxicité globale reste toujours la même, à savoir : la glande digestive ( $64,10 \pm 9,87$  %) > le manteau ( $11,02 \pm 4,2$  %) et la gonade ( $16,00 \pm 10,15$  %) > les branchies ( $6,36 \pm 2,35$  %) > le muscle ( $2,25 \pm 0,89$  % ; Fig. 25).

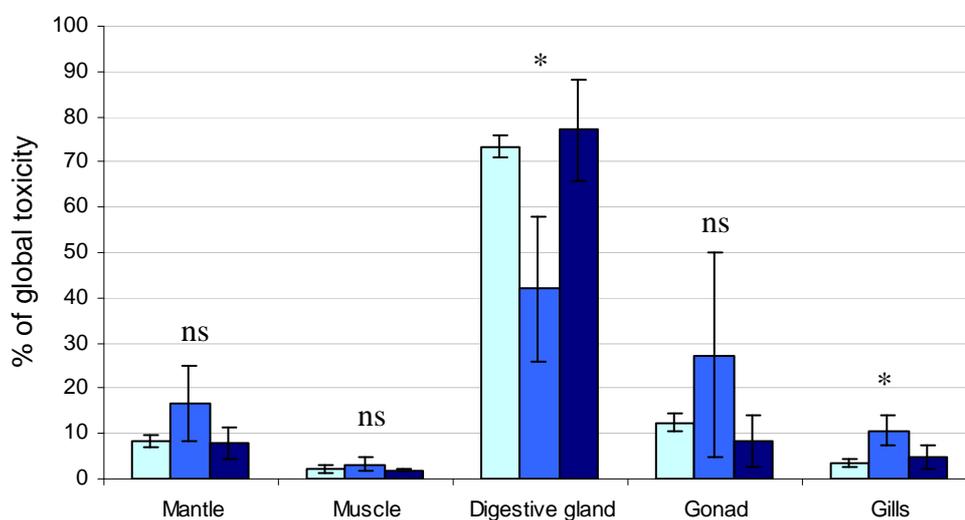


Fig. 25 Toxin mean distribution in the different tissues during the four contamination days and for the three experiment (Table 5): oysters from the Bay of Bourgneuf contaminated by *A. minutum* (light blue), oysters contaminated by *A. catenella* (blue) and oysters from La Tremblade contaminated by *A. minutum* (dark blue). Mean with the standard deviations. \* indicates significant ploidy difference; ns not significant.

Figure 25 Distribution moyenne de la toxine dans les différents organes pendant les quatre jours de contamination pour les trois expériences (Tableau 5) : les huîtres de la Baie de Bourgneuf contaminées avec de l'*A. minutum* (bleu clair), les huîtres contaminées avec de l'*A. catenella* (bleu) et les huîtres de La Tremblade contaminées par *A. minutum* (bleu foncé). Les moyennes sont données avec les écarts types. \* indique les différences significatives; ns indique l'absence de différence significative.

### 1.3 Conclusion

Ces trois expériences permettent de mettre en évidence que les toxines paralysantes se répartissent dans les différents tissus de l'huître dès le premier jour de contamination. De plus, l'importance de chaque tissu dans la contribution à la toxicité globale ne varie pas pendant les

quatre jours de contamination. L'équilibre établi permet donc de déterminer l'importance de chaque tissu dans la contribution à la toxicité globale, soit: glande digestive > manteau et gonade > branchies > muscle. Ce résultat est en accord avec la répartition tissulaire chez la coque : pied > glande digestive > manteau > branchies > muscle (Sagou et al. 2005).

Cependant, à l'heure actuelle, les voies de transfert des toxines paralysantes dans les tissus des bivalves ne sont pas connues. Une première approche a été tentée en considérant que la toxine PSP suivait la même voie que le carbone ou l'azote (cf annexe II). Cette étude n'a pas permis de déterminer la voie de transfert des toxines PSP. Une deuxième approche semble se développer dans la littérature internationale. Elle considère que les hémocytes pourraient jouer un rôle dans l'assimilation des toxines paralysantes. En effet, il est connu que les hémocytes interviennent dans le transport de nutriments d'un tissu vers un autre tissu. Les hémocytes sont des cellules présentes dans le système circulatoire ouvert des mollusques. Ils sont impliqués dans des fonctions vitales telles que la réparation des blessures des tissus mous et de la coquille, la digestion des nutriments et leur transport, l'excrétion, et les défenses internes. Les hémocytes et les cellules digestives sont les seules cellules capables de digestion intracellulaire. De plus, les hémocytes ne sont pas exclusivement cloisonnés dans le cœur, les vaisseaux de l'hémolymphe ou le sinus mais ils peuvent pénétrer au cœur des tissus pour y transférer les nutriments. En effet, il est connu que les produits finaux de la digestion des cellules des diverticules de la glande digestive sont transférés dans le serum et les hémocytes qui les transportent vers les différents tissus. Les hémocytes jouent également un rôle dans l'excrétion. Ainsi Orton (1923) rapporte que l'élimination des métaux est le résultat d'une endocytose par les hémocytes suivie d'une élimination sous-jacente de ces hémocytes. Galimany et al. (2008b) ont mis en contact des moules *Mytilus edulis* avec le Dinoflagellé *Prorocentrum minimum*. Des coupes histologiques ont révélé une réponse immunitaire de la part des moules avec une migration massive des hémocytes dans l'estomac et l'intestin (Galimany et al. 2008b). Ce même phénomène est observé chez *Ruditapes philippinarum* mis en contact avec *Prorocentrum minimum* (Hegaret et al. 2009). Le phénomène de diapédèse, c'est à dire de migration des hémocytes hors du système circulatoire par infiltration à travers les tissus épithéliaux est également observé chez les moules exposées à *Alexandrium fundyense* (Galimany et al. 2008a) et chez des huîtres *Crassostrea gigas* en contact avec *Alexandrium minutum* (Haberkorn, comm. pers.).

These three experiments show that paralytic toxins divide up between the various oyster tissues oyster as soon as the first day of contamination. Furthermore, the importance of each tissue in the contribution to the global toxicity does not vary during the four contamination days. The established balance makes it possible to determine the importance of each tissue in the contribution to the global toxicity: digestive gland > mantle and gonad > gills > muscle. This result is in agreement with toxin distribution in the tissues of the clam: foot > digestive gland > mantle > gills > muscle (Sagou et al. 2005).

However, the details of the transfer of paralytic toxins in bivalve tissues are currently not known. A first approach was tempted, considering that the PSP toxins followed the same way as carbon or nitrogen did (cf annex III). This study did not make it possible to determine how PSP toxins transferred. The second approach, which seems to be increasingly developed in the literature, considers that haemocytes could play a role in paralytic toxin assimilation. Actually, it is known that haemocytes interfere with the transport of nutrients from one tissue to another tissue. Haemocytes are present in the open circulatory system of molluscs. They are involved in vital functions such as wounds and shell repair, nutrition digestion and transport, excretion, and internal defences. Haemocytes and digestive cells are the only cells capable of intracellular digestion. Furthermore, haemocytes are not exclusively located in the heart, the vessels of the haemolymph or the sinus: they can penetrate into the tissues to transfer nutrients. Indeed, the final products of cell digestion in the digestive gland diverticules are known to be transferred in haemocytes and serum that carry them towards various tissues. Haemocytes also play a role in the excretion. Orton (1923) asserts that the elimination of metals is the result of an endocytose by haemocytes, followed by the elimination of these haemocytes. Galimany et al. (2008b) put mussels *Mytilus edulis* in contact with the Dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. Histological cuts revealed an immune answer of mussels with a massive migration of haemocytes toward stomach and intestine (Galimany and al. 2008b). The same phenomenon is observed with *Ruditapes philippinarum* put in contact with *Proreocentrum minimum* (Hegaret et al. 2009). The diapedes phenomenon, that is haemocyte migration outside the circulatory system, is also observed with mussels exposed to *Alexandrium fundyense* (Galimany and al. 2008a) and with *Crassostrea gigas* in contact with *Alexandrium minutum* (Haberkorn, pers. com.).

## **2 First approach to localize lipophilic biotoxins in mussel digestive glands.**

D'après un article soumis à : Proceedings of 7th International conference on molluscan shellfish safety, 14-19 June in Nantes, France

**Marielle Guéguen<sup>1</sup>, Arne Duinker<sup>2</sup>, Claire Marcaillou<sup>1</sup>, John A. B. Aasen<sup>3</sup>, Laurent Barillé<sup>4</sup>**

<sup>1-</sup> Ifremer, 44 311 Nantes Cedex, France

<sup>2-</sup> Nifes, 5817 Bertgen, Norway

<sup>3-</sup> Norwegian School of Veterinary Science, P.O.Box 8146 Dep.,0033 Oslo, Norway

<sup>4-</sup> MMS, 44 322 Nantes Cedex 3, France

### **Résumé:**

### **Abstract :**

A better understanding of the retention mechanisms of okadaic acid (OA) group toxins is necessary to improve detoxification rates in a cost effective process. These dinophysistoxins are mainly concentrated in bivalve digestive gland but little is known about cellular and subcellular localization of OA and its analogues in this tissue. Nevertheless, this knowledge would be very useful to the understanding of the physiological processes by which mussels eliminate these toxins. This study is a preliminary attempt to localize the OA group toxins in intracellular compartments using stepwise ultra-centrifugation. The toxins could actually be located in three main compartments. The toxins could be found in the cytosol, for example bound to target proteins. They could also be sequestered in two principal organelles: the mitochondria, involved in fatty acid oxidation and the lysosomes, involved in the digestion. According to the literature, lysosomes are known to contain heavy metal and organic xenobiotics. This first approach is therefore focusing on the possible concentration of OA group toxins in lysosomes of the digestive gland tissue.

The different fractions obtained after stepwise centrifugation were submitted to different analyses. Their content in lysosomes was checked by microscopic examination. Specific enzymatic activities were measured in the different fractions to assess the degree of purity in

organelle targeted and assess leakage of organelle content in other fractions. Chemical analyses were performed for toxin content.

Preliminary results are reported here. Lysosomes were mainly collected in the first pellet (700g) as seen by microscopic observation and confirmed by the acid phosphatase activity, which was maximal in this fraction. The highest toxin amount was also detected in this same first pellet. We therefore suggest that the lysosomes are the main site of okadaic acid group toxins in the digestive gland tissue of mussels. However, possible roles of other compartments will also be discussed.

## **2.1 Introduction**

In France, diarrhetic toxins of the okadaic acid family are the main cause of toxic episodes due to phytoplankton. Bivalve mollusc contamination by this toxin can occur very rapidly, while the detoxification can last several weeks or several months according to the geographical situation. To decrease the economic cost engendered by the area closures, it is important to set up a process of detoxification of mussels, contaminated with okadaic acid and/or its by-products (OA and DTX3). A few studies allowed to underline the impact of food (Blanco et al. 1999, Marcaillou et al. Submit) in the kinetics of mollusc decontamination. However, the understanding of mechanisms involved in the sequestration of toxic molecules is essential to improve detoxification processes. Lipophilic toxins, such as the OA and its acyl-esters, are mainly located in the digestive gland of bivalves *Mytilus edulis* (Pillet et al. 1995), *M. galloprovincialis* (Blanco et al. 2007), *Argopecten irradians* (Bauder et al. 2001) and *Pecten maximus* (Hess et al. 2003).

The present study represents the first approach to try to underline intracellular localization of dinophysistoxins. Among the different cellular compartments identified, lysosomes, known to play an important role in intracellular digestion and in cell detoxification, could be a site of toxin retention. Indeed, several studies demonstrated that they are capable of holding lipophilic compounds (Einsporn & Koehler 2008) and heavy metals, such as silver and mercury (Domouhtsidou & Dimitriadis 2000) or lead (Einsporn et al. 2009). Besides, Svensson (2003) observed an increase of the volume of the lysosomal compartment in blood cells of mussels in contact with OA.

The method used to reach the objective is the cellular division by ultracentrifugation, based on differential sedimentation of molecules or particles according to their density. This method is generally used on mammal tissues: rat liver ((Wilson & Hoagland 1965) or human cells. So far, only one reference using this technique exists on gland digestive of mussels (Cajaraville

et al. 1992). In our experiment, two assays were set up: a first one to verify the presence of toxin in organelle taken in their group rather than in the cellular cytosol; the second assay, to encircle more exactly the quantity of toxin in every cellular fraction. The lysosomal fraction will be characterized by measuring its enzymatic marker activity.

## **2.2 Material and method**

### Homogenization of the digestive gland

Mussels naturally exposed to *Dinophysis* occurrences were collected from submerged longlines in the Sogndal fjord in Western Norway and kept in toxin free water prior to the experiments.

Digestive glands were dissected and homogenised in a thermo-regulated room at 5°C. Fresh digestive glands of mussels were dissected and cut in small fragments and homogenised in a Dounce potter on ice with 10 volumes of buffer, executing 5 up and down. The obtained homogenate was then filtered sequentially on 100, 40 and 20 µm mesh to remove uncrushed tissue fragments.

The homogenated medium was different from those usually used (0.02M tris HCl Buffer + 0,25 M sucrose). The sucrose concentration was decreased to avoid its precipitation with methanol during toxin extraction. To protect organelle integrity, the osmolarity of the homogenate has to be close to the osmolarity of haemolymph of mussels. The addition of protease inhibitors allows a limitation of organelle degradation by enzymes released during the cellular degradation. Considering these three constraints, the digestive glands were placed in contact with the homogenate medium: (1g:10mL) (7 mL of PBS and 3 mL of solution of Ringer according to the protocol of Karnovsky (1985), of osmolarity equal to 860 mOsm in pH 7,0) and a cocktail of protease inhibitor (1g: 10µL) (Protease Inhibitor Cocktail Set V, EDTA-Free, CALBIOCHEM). Four tablets of PBS (phosphate buffer solution) were dissolved in 200mL of water

### Ultracentrifugation

**First assay.** Filtrate issued from the homogenization was distributed into two tubes (n°1 and 2) then ultracentrifuged (Beckman optima XL-100K ultracentrifuge with the rotor 41Ti in 12.5 mL tubes) at 100,000 g during 3 hours at 4°C. Both tubes were then frozen at -80°C to be able to separate the three visible phases, namely: the lipid fraction (situated at the top of the tube), the pellet (supposedly containing all the organelles or organelle fragments) and supernatant (supposedly corresponding to the cytosol and any lighter particles).

**Second assay.** The filtered homogenate was distributed into three different tubes then ultracentrifuged as indicated by the protocol in the figure 26. Pellets were resuspended in 300  $\mu$ L of homogenate medium for enzymatic analyses. Pellets and supernatant were preserved at 80°C until analysis. All the pellets were observed under optical microscope.

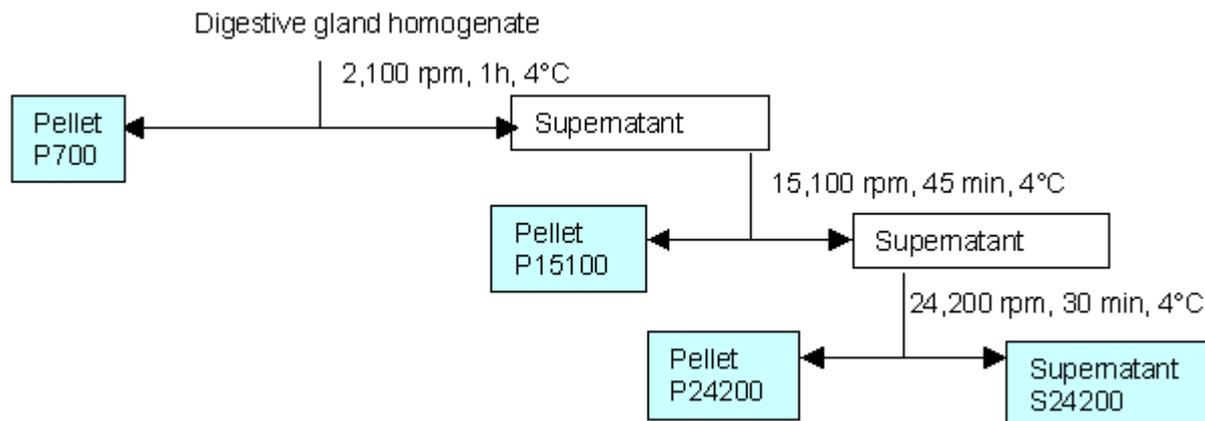


Fig. 26: Ultracentrifugation method

### Chemical analyses

All the pellets were resuspended in 500  $\mu$ L MeOH (100%). The supernatant extractions were performed with MeOH (100%) (v:v).

Hydrolysis of extract was performed on an aliquot of the extract. 200 $\mu$ l were hydrolysed with 25 $\mu$ l 2.5M NaOH, whirl mixed, and placed in water bath at 76° C for 40 min. Then after cooling to room temperature 26 $\mu$ l 2.5M HCl was added to stop the reaction. A cleanup step was then performed; hexane washing and partitioning with DCM. The DCM phase containing the toxins were dried down and the sample resolved in 80%MeOH, then filtered through 0.45 $\mu$ m centrifuge filters (Spin-X, Costar).

The non hydrolysed extracts was diluted with water to 80% MeOH, and then filtered through 0.45 $\mu$ m centrifuge filters (Spin-X, Costar).

The filtered extracts were then analysis on an Agilent 1200 LC system with an Agilent 6410 MS/MS detector. 10 $\mu$ l of extract was injected on the system. The column used was a Termo Hypersil ODS (150x2,1mm, 5 $\mu$ m), run isocratic with a mobile phase of 80% MeOH containing 50mM ammonium acetate (adjusted to pH 5,80). Run time was 8 min. The analysis was performed on one quantifier and one qualifier mass transfer. For quantitation of OA 803.5>255.1 m/z was used and for qualifier 803,5>113,5 m/z. For quantitation of DTX-1 817.5>255.1 m/z was used and for qualifier 817,5>113,5 m/z. Quantitation was performed

against external standard curve with certified standard of okadaic acid obtained from IMB-NRC, Halifax, Canada.

### Enzymatic analyses

Acid phosphatase (Ref: 17304, Sentinel) is the specific marker of lysosomes; it catalyses the hydrolysis of the 1-naphtylphosphatase in acid medium. The 1-naphtol reacts with diazo-2-chloro-5-toluene to form a colored nitrogenous compound, which has an absorbance  $\lambda$  nm, and is proportional to the total activity of the acid phosphatase.

## 2.3 Results

**First assay.** The three phases were analyzed: the pellet at 100,000g, the supernatant and the lipid fraction show that 51 and 74 % of the total quantity of toxin (free OA and DTX3) are localized in the pellet, respectively for the tube 1 and 2 (Fig. 27). The supernatant represents only 23 and 20 % of the quantity of toxin, respectively for the tube 1 and 2 but does not contain any acyl-ester. The percentage of the lipid fraction differs strongly: 26 % in the tube 1 and only 6 % in the tube 2 where no acyl esters were found.

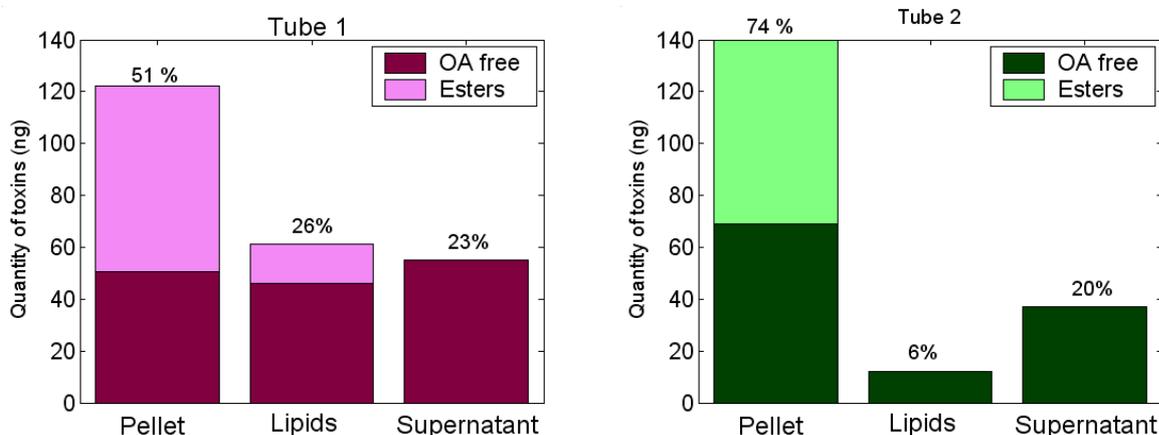


Fig. 27: Quantity of toxins in each fraction: pellet, lipid fraction and supernatant from the tube (A) and the tube (B). The light colour represents the acyl-ester and the dark one the free OA.

**Second assay.** Three pellets (P700, P28000, P100 000) and the final supernatant were analyzed. The majority of toxins are measured in the final supernatant, but only present in their free OA form. The pellet P700, supposed to concentrate lysosomes, contains 35.4 % of the total quantity of toxin, mainly under the form of ester, while two others contain only 4.1

and 0.4 % (Fig 27). The microscopic observation of the obtained fractions reveals considerable differences among them. The pellet P700 presents colored vacuoles which could be the lysosomes (Fig. 28A). The pellet P28000 does not show any colored vacuoles but seems very granular (Fig. 28B). The pellet P100000 is only constituted by some colorless vacuoles, the granular aspect of the pellet P28000 does not appear any more.

The measure of acid phosphatase activity, the specific marker of lysosomes, in the various fractions, varies similarly to the quantity of toxin (Fig. 30). The relationship between enzymatic activities and quantities of toxins appears as shelf space, in spite of the weak number of data (Fig 30,  $r = 0.89$ ).

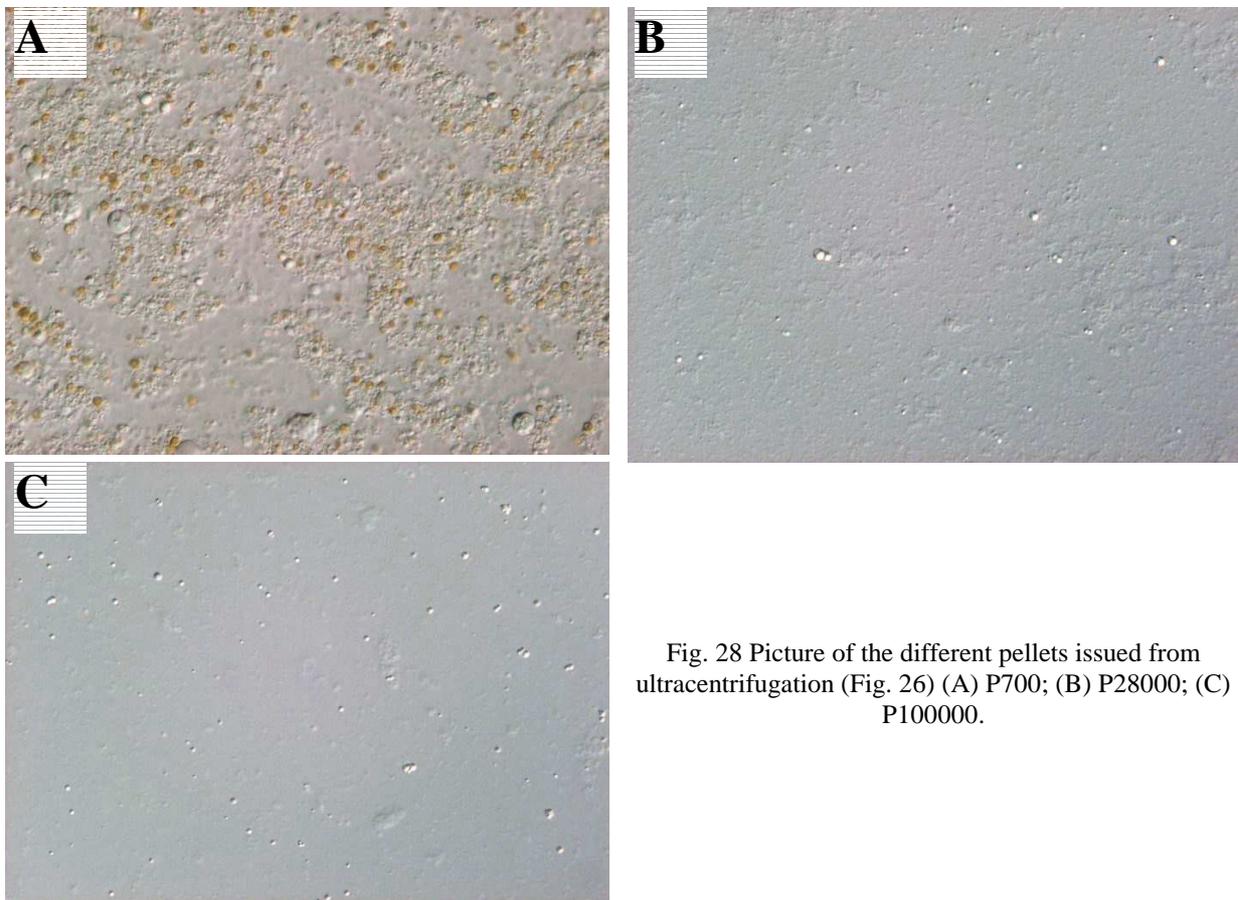


Fig. 28 Picture of the different pellets issued from ultracentrifugation (Fig. 26) (A) P700; (B) P28000; (C) P100000.

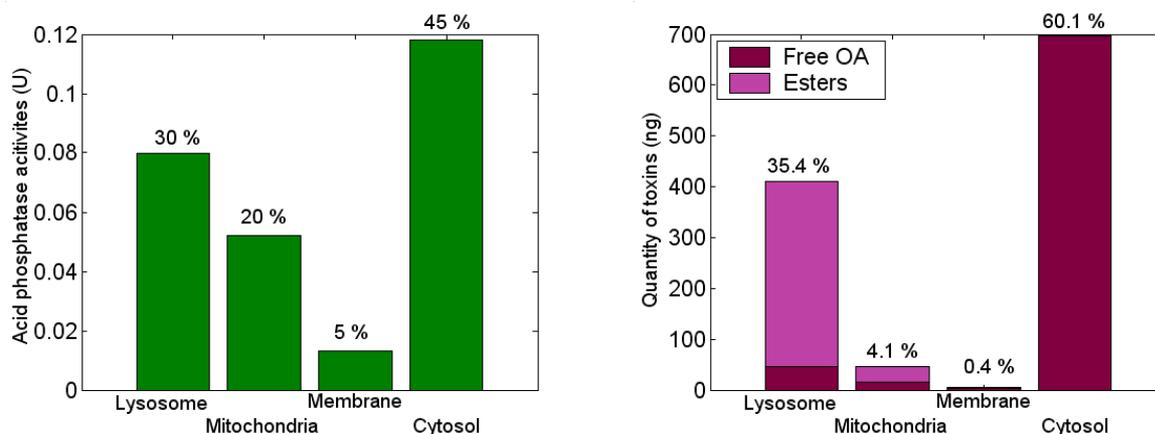


Fig. 29 (A) Acid phosphatase activities (U) and (B) quantity of toxins in each fraction obtained with the method in the Fig. 26. Lysosome fraction corresponds to P700; mitochondria fraction to P28000; membrane fraction to P100000 and cytosol fraction to the supernatant from the last one centrifugation.

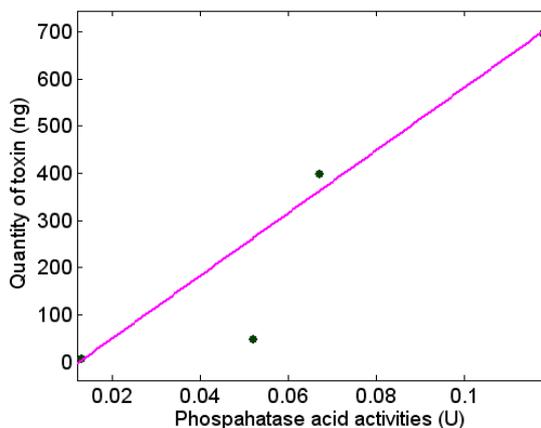


Fig. 30 Relation between acid phosphatase activities (in U) and quantity of toxins (ng). The regression is done with the tools curve fitting tools from Matlab 6.5 with the algorithm bisquare.

## 2.4 Discussion

The first assay allowed underlining that the majority of toxins are held in organelles. The presence of okadaic acid and these by-products in supernatant can be explained by two hypotheses: i) although precautions are taken to maintain the integrity of organelles, some organelles could have been degraded and their contents go to the supernatant, ii) the toxin

could be divided up between organelles and cytosol. It is noticeable that the esterified forms of okadaic acid are exclusively present in pellets.

The second assay allowed underlining a relationship between the acid phosphatase, specific activity of the lysosomes, and the quantity of toxin present in the various fractions. The comparison of the results obtained on three pellets shows that the maximal activity of the lysosomal marker is in the pellet containing the highest percentage of toxin. This observation supports the hypothesis that lysosomes are holding some of the AO and its byproducts. However, during this assay, the majority of toxins (45 %) and of enzymatic activities (89 %) are located in the fraction corresponding to the cytosol. This strong enzymatic activity, characteristic of the lysosomes, could be explained by the degradation of lysosomes during the homogenization in the first assay and in the various stages of ultracentrifugation.

The hypothesis that toxin can also be present in free state in the cytosol can not be excluded and the analysis of toxins in the final supernatant would be necessary.

This study highlights the necessity of taking into account other various cellular compartments, such as mitochondria, membranes and cytosol, which can play also a role in sequestration of lipophilic phycotoxins. Indeed, mitochondria, because the by-products of the AO synthesized by bivalves include chain of fatty acids, membranes, because the AO and its by-products have a character more or less lipophilic and the cytosol, because it is the target of the reactions implying phosphatase proteins and because some of them are the target of the OA. The knowledge of the sequestration site of okadaic acid is an important data for the implementation of the detoxification process which could specifically act on a cellular process.

Furthermore, this data would allow to progress in the definition of a model of contamination / decontamination of the digestive gland in a more predictive way. Indeed, several studies proposed a model of the behaviour of the digestive gland - bringing in lysosomes - of mussels following a contaminating stress (Moore & Willows 1997, Moore & Allen 2001, McVeigh et al. 2006). The same model structure could be used to translate behaviour of lysosomes of mussels exposed to okadaic acid and by-products. Moore and Allen (2001) propose a model based on three differential, simple equations corresponding to three subcellular compartments taking into account endosomes, lysosomes and cytosol. This model is only based on carbon flux. Equivalent models also exist for nitrogen flux (McVeigh et al. 2004). These authors highlight the modifications of carbon and nitrogen fluxes in digestive cells of mussels during pollutant exposure. It would be interesting to compare the behaviour of mussels in contact with a toxin with the observations of McVeigh et al. (2004). This study is a first approach on

subcellular localization of the okadaic acid and dinophysistoxins in the cells of mussel digestive gland. Further studies need to be undertaken to better understand and characterize the role of lysosomes and cytosol in the retention of toxin.

## **Discussion**

Les expériences sur le devenir des microalgues dans les mollusques bivalves ont permis de mettre en évidence la présence de cellules entières d' *A. minutum* et d' *A. catenella* dans les fèces de moules et d'huîtres contrairement aux cellules de *Dinophysis spp.* qui sont sous forme de demi-valves dans les fèces des moules. De plus, les cellules de *Dinophysis spp.* sont rapidement dégradées dans l'estomac des moules sous l'action notamment des enzymes digestives. Ces résultats sont en accord avec ceux de Paulmier & Joly (1985), Scarrat et al. (1993), Sidari et al. (1998), Laabir & Gentien (1999), Tsujino et al. (2002), Laabir et al. (2006). Ils renforcent l'idée que la dégradation des microalgues dans le système digestif s'effectue suivant la nature de la thèque et non suivant la présence ou non de toxines (Laabir & Gentien 1999).

De plus, les expériences menées sur le devenir des cellules d' *A. minutum* ont permis de décrire un modèle simulant le temps de passage de ces Dinoflagellés dans le système digestif de l'huître. Le modèle utilisé est du type piston à dispersion axiale ce qui correspond aux cas les plus fréquemment rencontrés dans la nature (Penry & Jumars 1987). Cette description de la dynamique du transit intestinal pourra être utilisée dans un modèle plus large de cinétique de détoxification qui sera approfondi dans le chapitre 4.

Dans le cas des Dinoflagellés à thèque épaisse ou mince, la dégradation des cellules phytoplanctoniques commence au niveau de l'estomac dans des proportions plus ou moins importantes. En se dégradant, les cellules vont libérer leur contenu cellulaire et donc leurs métabolites secondaires toxiques. Les fragments cellulaires et les toxines vont être soit dirigés vers la glande digestive, soit ils vont rejoindre les cellules non dégradées et être évacués via l'intestin.

Comme il a été montré expérimentalement et en accord avec la littérature, la glande digestive est le tissu qui accumule le plus les toxines. Ainsi, dans l'expérience de contamination des huîtres par des toxines PSP, la glande digestive représente plus de la moitié de la toxicité totale malgré la faible importance pondérale de cet organe (10 à 25 %). Cependant, on ne peut pas négliger la part de toxines qui est détectée dans les autres tissus (Bricelj & Shumway 1998b). En effet, chez l'huître le manteau contient environ 10 % de la toxicité globale et de même pour la gonade. Les branchies contiennent environ 5% et les muscles 2% de cette toxicité. Des auteurs (Blanco 2004, Li et al. 2005) s'accordent pour affirmer que les transferts de toxines s'effectuent de la glande digestive vers les autres tissus.

En ce qui concerne les DTXs chez la moule, plusieurs études ont mis en évidence que la toxine était largement localisée dans la glande digestive et que la proportion dans les autres tissus était négligeable (Blanco et al. 2007). De plus, la contamination de mollusques bivalves par ces toxines peut être très rapide alors que la détoxification peut durer plusieurs semaines à plusieurs mois selon la zone géographique. Les lysosomes pourraient jouer un rôle dans la séquestration de ces toxines puisqu'une relation linéaire a pu être mise en évidence entre l'activité des phosphatases acides (enzyme spécifique des lysosomes) et la quantité de toxines dans les différentes fractions obtenues par ultracentrifugation de la glande digestive de moule. Ce résultat confirme l'hypothèse émise par Svensson (2003) sur le rôle potentiel de cet organe dans l'assimilation et le devenir de l'AO. Il est également important de noter que la totalité des acyl-esters (DTX3) a été retrouvée exclusivement dans les culots qui correspondent aux différents organites. Par contre, les formes libres (AO et DTX1) ont été localisées aussi bien dans les culots que dans le surnageant final.

Les résultats obtenus sur le devenir des cellules d'*Alexandrium spp.* dans les huîtres et des cellules de *Dinophysis spp.* dans les moules sont synthétisés dans les figures 31 et 32 respectivement.

Il est important de souligner que ces schémas théoriques ne prennent pas en compte (i) l'accumulation des toxines sous forme dissoute, (ii) la digestion secondaire qui s'effectue au niveau de l'intestin et (iii) le rôle hypothétique des hémocytes dans les transferts.

La prise en compte de l'accumulation de toxines sous la forme dissoute a déjà été évoquée dans la littérature (Silvert & Cembella 1995). En effet, les mollusques bivalves sont capables d'absorber des molécules sous forme dissoute comme les métaux lourds (Lekhi et al. 2008) et les acides aminés (Wright & Secomb, 1986). De plus, l'absorption de la matière dissoute et colloïdale semble s'effectuer au niveau des cellules épithéliales des palpes labiaux chez des pectenidés comme *Placopecten magellanicus* et *Chlamys varia* (Beninger et al. 1990). Afin de connaître le risque potentiel de contamination des mollusques bivalves par les toxines sous forme dissoute, il faut savoir si ces toxines sont stables dans l'eau de mer. Or à notre connaissance, aucune étude n'a été publiée à ce jour permettant d'apprécier la stabilité des toxines paralysantes dans l'eau de mer. Afin de palier à cette lacune, une expérimentation, en milieu contrôlé, a été réalisée sur des standards de toxines (STX, GTX2 et GTX3) et des toxines issues de cellules d'*Alexandrium minutum* lysées dans l'eau de mer brute pendant 15 jours (Fig. 33).

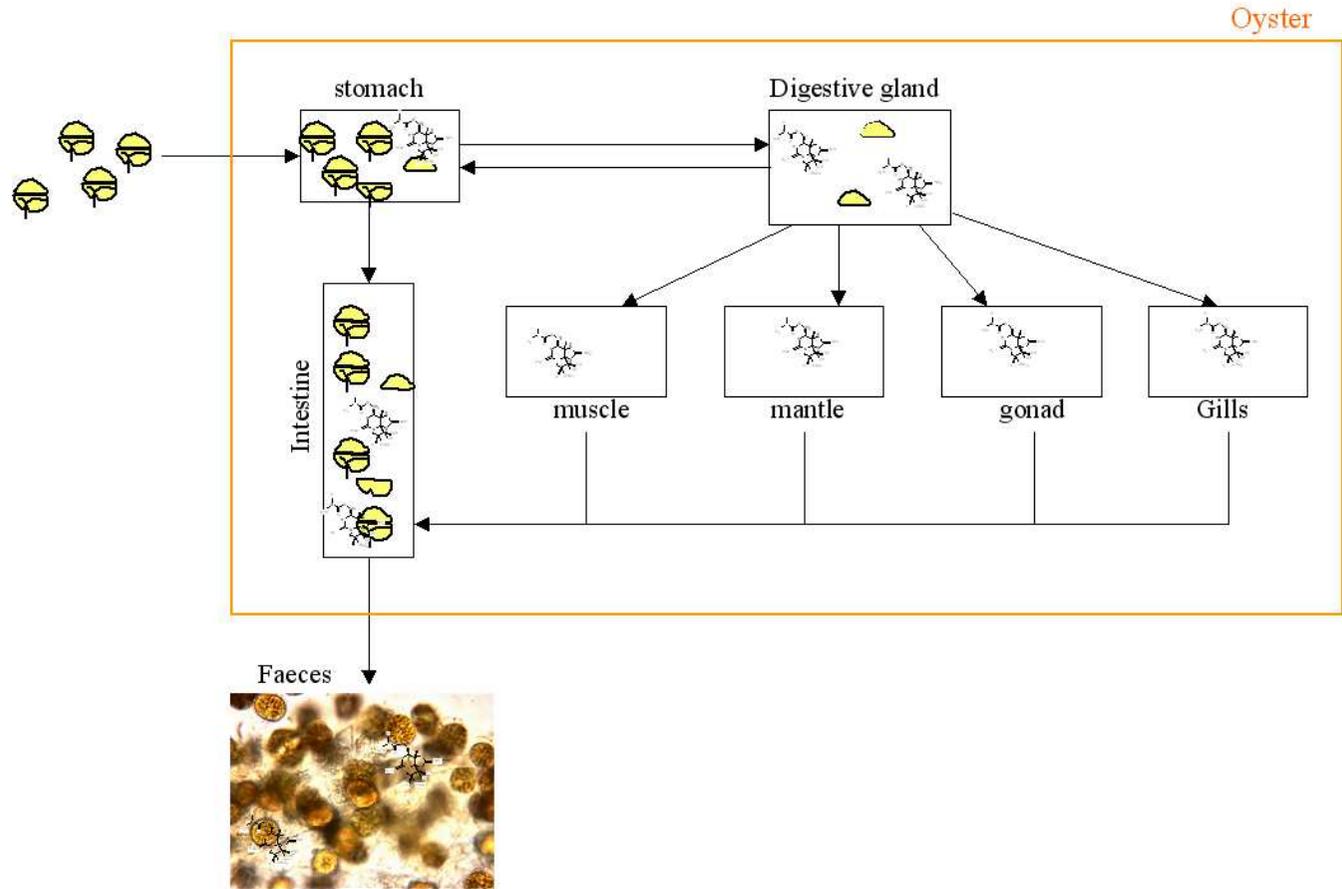


Fig. 31 Theoretical simplified diagram representing the fate of *Alexandrium spp.* cells in oyster. The mollusc uptakes *Alexandrium spp.* cells from external medium. Once in the stomach, a minority of cells is degraded and releases toxins. Part of cell fragments and free toxins is transferred to the digestive gland to undergo intracellular digestion, allowing the incorporation of toxic molecules in digestive gland tissues. Toxins are then transferred from the digestive gland to the other organs. The elimination of entire cells, cellular fragments and free toxin is processed by the intestine.

Figure 31 Schéma simplifié théorique représentant le devenir des cellules d'*Alexandrium spp.* dans l'huître. Le mollusque prélève des cellules d'*Alexandrium spp.*. Une fois dans l'estomac les cellules vont, pour une minorité, être dégradées et ainsi libérer les toxines. Une partie des fragments cellulaires et des toxines libres vont être acheminés vers la glande digestive pour subir une digestion intracellulaire, permettant l'incorporation des molécules toxiques dans les tissus de la glande digestive. Les toxines vont ensuite être transférées de la glande digestive vers les autres organes. L'élimination des cellules entières, des fragments cellulaires et des toxines libres va s'effectuer par l'intestin.

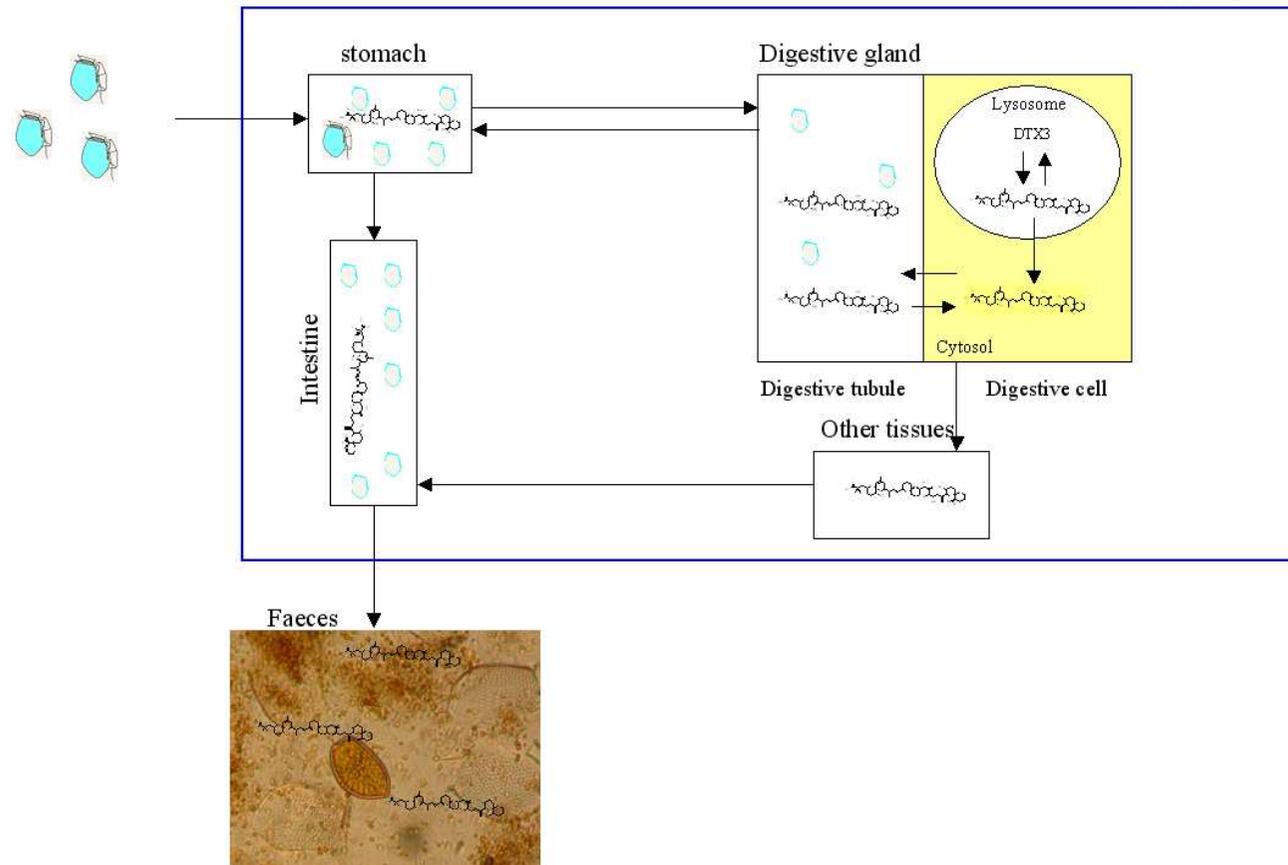


Fig. 32 Theoretical simplified diagram representing the fate of *Dinophysis spp.* cells in mussel. The mollusc uptakes *Dinophysis spp.* cells. Once in the stomach, all the cells are degraded and release toxins. Part of cell fragments and free toxins are transferred to the digestive gland to undergo an intracellular digestion, allowing the incorporation of toxic molecules in cells of the digestive gland. DTXs Molecules in the cell cytosol seem to be free and AO and DTX1 acylation is performed in lysosomes. The elimination of cell fragments and free toxins is processed by the intestine.

Figure 32 Schéma simplifié théorique représentant le devenir des cellules de *Dinophysis spp.* dans la moule. Le mollusque prélève des cellules de *Dinophysis spp.*. Une fois dans l'estomac les cellules vont toutes être dégradées et ainsi libérer les toxines. Une partie des fragments cellulaires et des toxines libres va être acheminée vers la glande digestive pour subir une digestion intracellulaire, permettant l'incorporation des molécules toxiques dans les cellules de la glande digestive. Les molécule de DTXs dans le cytosol des cellules semblent être sous forme libre et l'acylation de l'AO et de la DTX1 s'effectuent dans les lysosomes. L'élimination des fragments cellulaires et des toxines libres va s'effectuer par l'intestin.

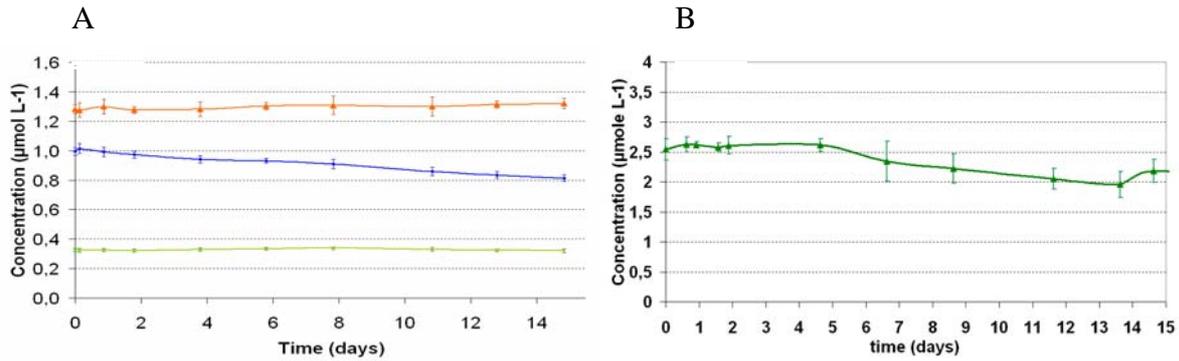


Fig. 33 Evolution of (A) toxin standard concentrations: STX (orange), GTX2 (blue) and GTX3 (green) and GTX2/3 extracted from *Alexandrium minutum*. All toxins stayed in raw seawater during 15 days. Mean with standard deviation.

Fig. 33 Evolution des concentrations (A) des standards de toxines : STX (en orange), GTX2 (en bleu), et GTX3 (en vert) et (B) des GTX2 et GTX3 extraits de culture d'*Alexandrium minutum*. Les toxines ont séjourné dans de l'eau de mer brute pendant 15 jours. Les moyennes sont représentées avec leurs écarts types.

Le standard de saxitoxine est stable dans l'eau de mer brute pendant les 15 jours d'expérimentation (anova  $p=0,75$ ). La stabilité des gonyautoxines est moins importante. En effet, les GTX2 sont stables pendant six jours (anova  $p=0,34$ ) et les GTX3 uniquement pendant un jour (anova  $p=0,07$ ). Cependant au bout de 15 jours, la concentration en GTX3 a seulement diminué de 2% et celle de GTX2 de 20%. En ce qui concerne la concentration en GTX2 et GTX3 provenant d'extraits de culture d'*Alexandrium minutum*, elle ne diminue pas de façon significative (anova  $p=0,12$ ). Les toxines paralysantes représentent donc une source potentielle de contamination pour les mollusques bivalves.

A l'heure actuelle, seulement deux études de biodisponibilité ont été menées, la première sur *Mytilus edulis* (Andrasi 1985) et la seconde sur des coquilles Saint Jacques (Kikuchi et al. 1996). L'évaluation du contenu toxinique des mollusques a été effectuée par le test souris dans les deux cas. Les moules de la première étude, après 36 heures de contact avec un filtrat de culture de *Gonyaulax catenella* (= *Alexandrium catenella*), présentaient un contenu toxinique d'environ 40 μg éq. STX par 100g de chair humide. Cependant, la seconde étude a révélé un test souris négatif après 8 jours de mise en contact de toxines paralysantes dissoutes avec des coquilles Saint-Jacques. Dans l'état actuel des connaissances, on ne peut donc pas conclure sur la biodisponibilité des toxines paralysantes dissoutes. En ce qui concerne les DTXs, des études ont été réalisées afin d'utiliser des résines spécifiques (SPATT : solid phase adsorption toxin tracking), dans l'aide à la surveillance des phycotoxines dans les mollusques. Ces résines permettraient d'obtenir directement le profil des toxines dissoutes présentes dans l'eau de mer (MacKenzie et al. 2004, Fux et al. 2008, 2009). En effet, les SPATT ont permis de détecter *in situ* la présence d'AO alors qu'aucune

cellule de dinoflagellé n'était présente dans la colonne d'eau (MacKenzie et al. 2004, Fux et al. 2009) ce qui laisse penser que ce composé est relativement stable dans l'eau de mer.

Le risque de contamination ou non de mollusques bivalves par l'absorption de toxines dissoutes reste à élucider. En effet, cette information est importante à prendre en compte aussi bien dans un modèle de contamination/ détoxification que dans la mise en place de procédés de détoxification.

Une digestion secondaire semble avoir lieu au niveau de l'intestin, permettant d'absorber des nutriments. Le transfert de la toxine, de la glande digestive vers les autres tissus, n'est peut être pas l'unique voie permettant l'accumulation des toxines dans les différents tissus.

Enfin, les hémocytes pourraient avoir un rôle dans le transfert des toxines. En effet, Suzuki et al. (2005) ont injecté de l'AO et des DTX1 dans le muscle de *Patinopecten yessoensis* et ces toxines ont été retrouvées uniquement dans la glande digestive, laissant ainsi supposer un transfert par l'hémolymphe. De plus, une migration des hémocytes dans l'intestin de moules et d'huîtres a été mise en évidence lors d'une consommation d'*Alexandrium spp.* (Galimany et al. 2008a, Haberkorn comm. pers.). Les hémocytes pourraient donc permettre le transfert des toxines d'un tissu vers un autre et également avoir un rôle dans la détoxification. Des recherches complémentaires sur le rôle des hémocytes pendant la contamination et détoxification des mollusques bivalves semblent donc nécessaires.

Les mécanismes entrant en jeu dans le devenir des toxines dans les mollusques bivalves demandent encore à être approfondis. Cependant, les observations réalisées pendant ces études vont nous permettre de déterminer un modèle qui sera basé sur les diagrammes théoriques des figures 31 et 32, lesquels seront détaillées et étudiées dans le chapitre 4.

The experiments on the fate of microalgae in bivalves made it possible to underline the presence of *A. minutum* and *A. catenella* cysts in mussel and oyster faeces contrary to *Dinophysis spp.* cells which are in the form of half-valves in mussel faeces. Furthermore, *Dinophysis spp.* cells are quickly degraded in mussel stomach in particular under the action of digestive enzymes. These results are in agreement with those of Paulmier & Joly (1985), Scarrat et al. (1993), Sidari et al. (1998), Laabir & Gentien (1999), Tsujino et al. (2002), Laabir et al. (2006). They strengthen the idea that the microalgae degradation in the digestive system is performed according to the thecae nature and not to the presence or absence of toxins (Laabir & Gentien on 1999).

Furthermore, the experiments reporting on *A. minutum* cell fates allowed to describe a model giving the duration of Dinoflagellate passage in the oyster digestive system. The model used is of the

“piston with axial scattering” type which corresponds to the cases most frequently met in nature (Penry & Jumars on 1987). This description of digestion dynamics can be used in a broader model of detoxification kinetics which will be examined more thoroughly in chapter 4.

In the case of weak and resistant Dinoflagellates, the degradation of phytoplankton cells begins at the stomach level in more or less important proportions. Following their degradation, cells will release their cellular contents and thus their toxic secondary metabolites. Cellular fragments and toxins will be either driven towards digestive gland, or will join the non-damaged cells to be evacuated by the intestine.

As it was experimentally shown and in agreement with the literature, the digestive gland is the tissue that accumulates most toxins. So in the experiment of oyster contamination by PSP toxins, digestive gland represents more than half of the total toxicity in spite of the small proportion of the total weight corresponding to this organ (10 to 25 %). However, we cannot neglect the part of toxins which is detected in the other tissues (Bricelj & Shumway 1998b). Indeed, oyster mantle contains approximately 10 % of the global toxicity, whereas gonad and gills contain approximately 5 % and muscle 2 %. Some authors (Blanco 2004, Li et al. 2005) agree that toxin transfers are made from digestive gland to other tissues.

As regards DTXs in mussel, several studies show that toxins are mainly localized in the digestive gland and that other tissues are not playing an important role (Blanco et al. 2007). Furthermore, mollusc contamination by this toxin can be very fast while detoxification can last several weeks to several months according to the geographical area. Lysosomes could play a role in DTXs sequestration because a linear relation was found between acid phosphatase activity (specific enzyme of lysosomes) and toxin amount found in the different fractions. This result confirms the hypothesis of Svensson (2003) on the potential role of this organelle in OA assimilation and transformations. It is also important to note that the totality of acyl-esters (DTX3) was exclusively found in the pellets corresponding to the various organelles. On the other hand, the free forms (OA and DTX1) were localized in the pellets as well as in the final supernatant.

The results obtained regarding fate of *Alexandrium spp.* cells in oysters and *Dinophysis spp.* cells in mussels are synthesized in figures 31 and 32 respectively.

It is important to underline that these theoretical diagrams do not take into account i) the accumulation of toxin under dissolved state, ii) the secondary digestion which takes place at the intestine and iii) the hypothetical role of haemocytes in transfers.

Toxin accumulation under dissolved state was already reported in the literature (Silvert & Cembella on 1995). Indeed, bivalves are capable of absorbing molecules under dissolved state such as heavy metals (Lekhi et al. 2008) and amino acids (Wright & Secomb, 1986). Furthermore, the absorption of dissolved and colloidal materials seems to take place epithelial cells level, as long as *Placopecten magellanicus* and *Chlamys varia* labial palps are considered (Beninger et al. 1990). To know the potential risk of bivalve contamination by dissolved toxin, it is necessary to know if toxin is

stable in seawater. To our knowledge, no study allowing to estimate paralytic toxins stability in seawater has been published so far. To fill this gap, an experiment, in controlled environment, was realized with toxin standards (STX, GTX2 and GTX3) and toxins stemming from *Alexandrium minutum* lysed cells in raw seawater during 15 days (Fig. 33). In the current state of the knowledge, we cannot conclude about the paralytic toxin bioavailability. With regard to the DTXs, studies realized with specific resins (SPATT: solid phase toxin tracking adsorption), were aimed at assisting phycotoxins monitoring in molluscs. These resins would allow to obtain directly toxin profile in sea water (MacKenzie and al. 2004, Fux and al. 2008, Fux and al. 2009). Actually, SPATT allowed *in situ* detection of OA although Dinoflagellate cells were present in the water column (MacKenzie and al. 2004, Fux and al. On 2009). This observation seems to indicate that this compound is relatively stable in seawater.

A secondary digestion might take place in the intestine, allowing nutrient absorption. Maybe toxin transfer, from the digestive gland to other tissues, is not the only way toxin in the different tissues.

Saxitoxin standard is stable in seawater during the 15 days experiment (anova  $p = 0,75$ ). Gonyautoxin stability is less important, however. Indeed, GTX2 is stable during six days (anova  $p=0,34$ ) and GTX3 only during one day (anova  $p=0,07$ ). However at the end of the 15th days, GTX3 concentration only decreased by 2 % and that of GTX2 by 20 %. With regard to GTX2 and GTX3 concentrations from extracts of *Alexandrium minutum* culture, it does not decrease in a significant way (anova  $p = 0.12$ ). Paralytic toxin thus represents a potential source of contamination for the bivalve.

Currently, only two bioavailability studies have been undertaken, the first one on *Mytilus edulis* (Andrasi 1985) and the second one on scallops (Kikuchi et al. 1996). Toxin content evaluation was carried out through the mouse test in both cases. Mussels of the first study, after 36 hours of contact with a *Gonyaulax catenella* (= *Alexandrium catenella*) culture filtrate, presented a toxic content of about 40 µg éq. STX by 100g of wet flesh. However, the second study revealed a negative mouse test after 8 days of contact between scallops and dissolved paralytic toxin.

The risk of bivalve contamination by the absorption of dissolved toxin remains to be clarified. Indeed, this information is important to take into account in a model of contamination / detoxification as well as in the implementation of detoxification processes.

Finally, haemocytes could have a role in the toxin transfer. Indeed, Suzuki et al. (2005) injected AO and DTX1 in *Patinopecten yessoensis* muscle and this toxin was only found in the digestive gland, which might indicate a transfer by the hemolymph. Furthermore, haemocyte migration in mussel and oyster intestine was revealed during *Alexandrium spp.* consumption (Galimany and al. 2008a, Haberkorn comm. Pers.). Haemocytes could thus allow the transfer of toxin between different tissues and also have a role in the detoxification. Additional researches on the haemocyte role during bivalve contamination and detoxification seem necessary.

Mechanisms interfering with toxin fates in bivalves still need to be more thoroughly. However, observations realized during these studies will allow us to outline a model based on theoretical diagrams of figures 31 and 32. These diagrams will be detailed and studied in more details in chapter 4.

## Chapitre 3 – Élimination des toxines



## Contexte

La détoxification des mollusques est souvent décrite comme la résultante d'une suite de deux cinétiques, une première rapide et une autre plus lente (Silvert & Cembella 1995, Blanco et al. 1997, Bricelj & Shumway 1998, Blanco et al. 1999). Le premier mécanisme, rapide, est lié à l'élimination des cellules et des fragments cellulaires phytoplanctoniques toxiques. Blanco et al. (1997) associent également, dans ce processus, la perte fécale du métabolisme des vieilles cellules, situées autour de la lumière des tubules de la glande digestive, et qui ont accumulé une grande quantité de toxines paralysantes de par leur grande affinité pour les membranes. Le second mécanisme, plus lent, correspond à l'élimination des toxines incorporées dans les différents tissus et notamment à la dégradation des cellules tubulaires de la glande digestive. Le métabolisme des mollusques bivalves semble influencer de façon importante la détoxification. Leur état physiologique est donc un paramètre important à prendre en compte pour pouvoir prédire leur réponse. De plus, en agissant sur des variables environnementales, il pourrait être envisagé de modifier le métabolisme des mollusques afin de diminuer le temps nécessaire à la détoxification.

Dans un premier temps, nous étudierons l'influence de la ploïdie chez *Crassostrea gigas* lors de la contamination par des toxines PSP.

Dans un second temps, les études s'attacheront à évaluer l'influence de la matière en suspension sur la cinétique de détoxification.

Mollusc detoxification is often described as the result of a two-kinetics pattern ; the first one is fast and the second one slower (Silvert & Cembella 1995, Blanco et al. 1997, Bricelj & Shumway 1998, Blanco et al. 1999). The first mechanism is rapid and connected to toxic cells and cellular fragments elimination. Blanco et al. (1997) also associate, in this process, the faecal loss of old cells metabolism. These cells are located around the light of the digestive gland tubules, and they accumulate a large amount of paralytic toxin quantity due to their great affinity for membranes. The second mechanism, slower, corresponds to the elimination of toxins incorporated into various tissues in particular through the tubule cell degradation. Bivalves metabolism seems to importantly influence detoxification. Thus, mollusc physiological status is a parameter to be taken into account to predict their answer. Furthermore, by acting on environmental variables, modifying mollusc metabolism to decrease the time to detoxify could be considered.

Firstly, we will study the influence of *Crassostrea gigas* ploidy during PSP toxins contamination process.

Secondly, the influence of particulate matter on detoxification kinetics will be evaluated.

## 1 Influence de la ploïdie sur l'accumulation de toxines paralysantes chez l'huître *Crassostrea gigas*

La production d'huîtres triploïdes (à 3N chromosomes) représente aujourd'hui une part importante de la production conchylicole. Des estimations différentes situent la proportion de triploïdes entre 30 et 50 % de la production d'huîtres en France. Les huîtres triploïdes présentent une gamétogenèse très faible voire inexistante permettant d'éviter l'aspect dit « laiteux » des huîtres lorsqu'elles sont en période de reproduction. Les triploïdes peuvent donc être vendues tout au long de l'année. De plus, ces huîtres ont une mortalité estivale plus faible de fait de leurs dépenses énergétiques réduites (Kesarcodi-Watson et al. 2001, Garnier-Géré et al. 2002), de la limitation de la métabolisation des protéines (Hawkins & Day 2003) et d'un système immunitaire plus performant (Nell 2002, Duchemin et al. 2007). Ces deux derniers facteurs leur confèrent un pouvoir de résistance accru en conditions de stress et notamment vis-à-vis de pathogènes et des contaminants. Il est donc important d'étudier l'effet de la ploïdie sur les cinétiques d'accumulation des toxines paralysantes chez l'huître creuse.

De plus, l'AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments), dans un avis publié en 2001 (n° : 2001-SA-0080), recommandait d'étudier de manière comparative et dans le cadre d'un programme de recherche adapté, les capacités de bioaccumulation et de dépuración des huîtres triploïdes et diploïdes vis-à-vis des métaux lourds, des bactéries et des phycotoxines. Une seule étude a été réalisée sur l'influence de la ploïdie sur la contamination de métaux lourds (Amiard et al. 2005). Elle indique que les diploïdes juvéniles accumuleraient plus de cadmium et d'argent lors d'une seconde exposition que les huîtres triploïdes ; par contre, si elles n'ont jamais été exposées à l'argent, les huîtres triploïdes accumuleraient plus de ce métal lourd que les diploïdes. Nous nous sommes donc intéressés à la comparaison de la bioaccumulation des toxines paralysantes chez les huîtres diploïdes et triploïdes.

Triploid oyster production (3N chromosomes) represents an important part of shellfish market today. Different estimations feature a proportion of triploids between 30 and 50 % of the overall oyster production in France. An advantage of triploids is that they can be sold all year long. Furthermore, these oysters have a weaker summer mortality than diploids thanks to reduced energy expenditure (Kesarcodi-Watson et al. 2001, Garnier-Géré et al. 2002), limitation of protein metabolism (Hawkins and Day on 2003) and to a more efficient immune system (Nell 2002, Duchemin et al.

2007). These last two factors confer them an increased resistance in stress conditions, in particular towards pathogens and contaminants. Thus, it is thus important to study the effect of ploidy on the kinetics of paralytic toxin accumulation in the Pacific oyster.

Furthermore, the AFSSA (French Agency of Food Sanitary Safety), in a notice published in 2001 (N: 2001-SA-0080), recommended to study in a comparative way and within the framework of an adapted research program, the bioaccumulation and depuration capacities of triploid and diploid oysters regarding heavy metals, bacteria and phycotoxins. A single study on the influence of ploidy on heavy metals contamination was performed by Amiard et al. (2005). It indicated that young diploid oysters would accumulate more cadmium and silver during a second exposure than triploid would do; on the other hand, if never exposed to silver, triploid oysters would accumulate more this metal than diploid. We were therefore interested in comparing paralytic toxins bioaccumulation in diploid and triploid oysters.

## 1.1 Matériels et Méthodes

### Le matériel biologique

Les cultures de dinoflagellés producteurs de toxines paralysantes ont été réalisées en laboratoire. Les microalgues *Alexandrium minutum* (AM89BM) et *Alexandrium catenella* (ACATV676) ont été cultivées dans le milieu de culture L1. Ces deux cultures sont réalisées dans une pièce thermorégulée à  $16 \pm 1^\circ\text{C}$ , avec un éclairage de  $50 \pm 4 \mu\text{mol}$  de photons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  et une photopériode de 12/12 heures.

La ploïdie, l'origine et le poids moyen humide des huîtres sont résumés dans le Table 6. Les huîtres utilisées sont vierges de toute contamination toxinique d'origine microalgale. Leurs épibiontes sont retirés, et elles sont ensuite acclimatées pendant 4 jours à  $16,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ .

Table 6 A summary of the oyster characteristics during the three performed experiments.

Tableau 6 Résumé des caractéristiques des huîtres lors des trois expériences réalisées.

Month of the year	Ploidy	Origin	Wet weight (g)
November	Diploid	Bourgneuf	$5.6 \pm 0.5$
November	Triploid	Assérac	$5.1 \pm 0.6$
March	Diploid	La Tremblade	$10.8 \pm 0.7$
March	Triploid	La Tremblade	$11.2 \pm 1.3$
June	Diploid	La Tremblade	$10.9 \pm 1.7$
June	Triploid	La Tremblade	$9.0 \pm 1.3$

### La contamination en banc écophysiological - (Lassus et al. 2007).

Les huîtres sont placées dans 20 boîtes individuelles d'une contenance de 850 mL environ et disposées en 2 stands. Chaque stand est composé d'une boîte "témoin" contenant une coquille d'huître vide et de 10 boîtes contenant chacune une huître vivante. La présence d'une boîte « témoin » permet d'obtenir une mesure de la concentration algale en entrée du système qui tient compte de la sédimentation. Un flux circulant d'eau de mer est maintenu constant dans le circuit semi-fermé (renouvellement de l'eau de mer tous les jours) grâce à des pompes péristaltiques permettant d'obtenir un débit régulier ( $150 \text{ mL min}^{-1}$ ) dans les boîtes d'expérimentation. La température de l'eau de mer est de  $16,0 \pm 0,4^\circ\text{C}$ . La fluorescence en sortie de boîte est mesurée pour chaque boîte pendant 1 minute (avec un temps d'échantillonnage d'une seconde) toutes les 11 minutes. La mesure appliquée correspond à la moyenne des dix derniers prélèvements. Le même fluorimètre est utilisé pour les mesures en sortie de la boîte témoin et des 10 boîtes individuelles. La même loi de

calibration est donc employée pour les calculs de variation de la fluorescence, ce qui permet d'accroître la fiabilité de cette mesure.

Lors de l'expérience réalisée en novembre, les huîtres ont été contaminées avec un flux continu de  $290 \pm 80$  cellules  $\text{mL}^{-1}$  d'*A. minutum* ayant une toxicité moyenne de  $1,15 \pm 0,07$  pg éq. STX cellule<sup>-1</sup>. Les huîtres de l'expérience de mars ont été contaminées avec  $180 \pm 35$  cellules  $\text{mL}^{-1}$  d'*A. catenella* présentant une toxicité de  $1,72 \pm 0,27$  pg éq. STX cellule<sup>-1</sup>. La dernière contamination d'huîtres a été réalisée avec un apport en continu de  $520 \pm 140$  cellules  $\text{mL}^{-1}$  d'*A. minutum* de toxicité  $0,38 \pm 0,06$  pg éq. STX cellule<sup>-1</sup>.

### Les analyses du contenu toxinique

A la fin de la première journée de contamination deux huîtres diploïdes et deux huîtres triploïdes sont prélevées et remplacées par quatre nouvelles huîtres (deux diploïdes et deux triploïdes) qui seront prélevées à la fin des quatre jours d'expériences et constitueront ainsi la moitié du groupe des huîtres prélevées au bout de 3 jours de contamination. Le même procédé est employé au bout de 2 jours (avec quatre remplaçantes qui seront contaminées pendant deux jours) et au bout de 3 jours (avec quatre remplaçantes qui seront un seul jour en contact avec la microalgue toxique). Ce système de remplaçantes permet d'obtenir pour chaque jour de contamination (jour 1, 2, 3 et 4) quatre huîtres diploïdes et quatre huîtres triploïdes. Une fois prélevées, les huîtres sont congelées à  $-80^{\circ}\text{C}$  puis disséquées par organes (muscle, manteau, branchies, gonade et glande digestive). Les groupes d'organes sont ensuite analysés comme indiqué en annexe I.

## **1.2 Résultats**

Les analyses du contenu toxinique ont été réalisées par organes. En connaissant la masse relative de chaque organe, il est possible d'en déduire la concentration en toxines pour 100 g de chair humide totale. Le contenu toxinique entre les expériences diffère de manière importante (Fig. 34). En effet, au bout de 4 jours de contamination, les huîtres diploïdes ont un contenu toxinique de  $255,6 \pm 26,7$   $\mu\text{g}$  éq. STX par 100 g de chair humide au mois de novembre, de  $40,3 \pm 10,3$   $\mu\text{g}$  éq. STX par 100 g de chair humide en mars et de  $72,3 \pm 9,9$   $\mu\text{g}$  éq. STX par 100 g de chair humide en juin. Ces différences peuvent être expliquées par le contenu toxinique des microalgues toxiques. Ils sont en effet de  $1,15 \pm 0,05$  et  $0,38 \pm 0,06$  pg éq. STX par cellule pour *Alexandrium minutum*, et de  $1,72 \pm 0,27$  pg éq. STX par cellule pour

*Alexandrium catenella*. La différence entre niveaux de contamination des deux expériences utilisant de l'*Alexandrium minutum* (novembre et juin) peut donc s'expliquer par la différence de contenu toxinique de la souche microalgale qui est trois fois plus importante pendant l'expérience de novembre que pendant celle de juin. Cette différence peut aussi s'expliquer par le mode de culture : en novembre, *A. minutum* était cultivée en ballons de 10 L et en juin expérience en bio-réacteur de  $2 \times 100$  L. En ce qui concerne l'expérience du mois de mars, la microalgue utilisée (*A. catenella*) était plus toxique et possédait un profil toxinique plus riche, ce qui peut expliquer une inhibition de la filtration et de la consommation des huîtres. La même différence de toxicité est observée chez les huîtres triploïdes pendant les trois expériences.

Les concentrations toxiques ont été comparées entre les huîtres diploïdes et triploïdes d'une même expérience (Fig. 34). Lors de l'expérience du mois de novembre, aucune différence significative entre les contenus toxiques des diploïdes et des triploïdes n'a été observée (Anova,  $p > 0,05$  ; Fig. 34A). La même observation a été réalisée lors de l'expérience du mois de mars (Anova,  $p > 0,05$  ; Fig. 34B). Par contre lors de la contamination réalisée au mois de juin, les huîtres triploïdes se sont significativement plus contaminées que les huîtres diploïdes (Fig. 34C) aux jours 2 (Anova,  $p < 0.05$ ), 3 (Anova,  $p < 0.05$ ) et 4 (Anova,  $p < 0.01$ ). Aucune différence significative n'est observée après un jour de contamination (Anova,  $p=0.08$ ).

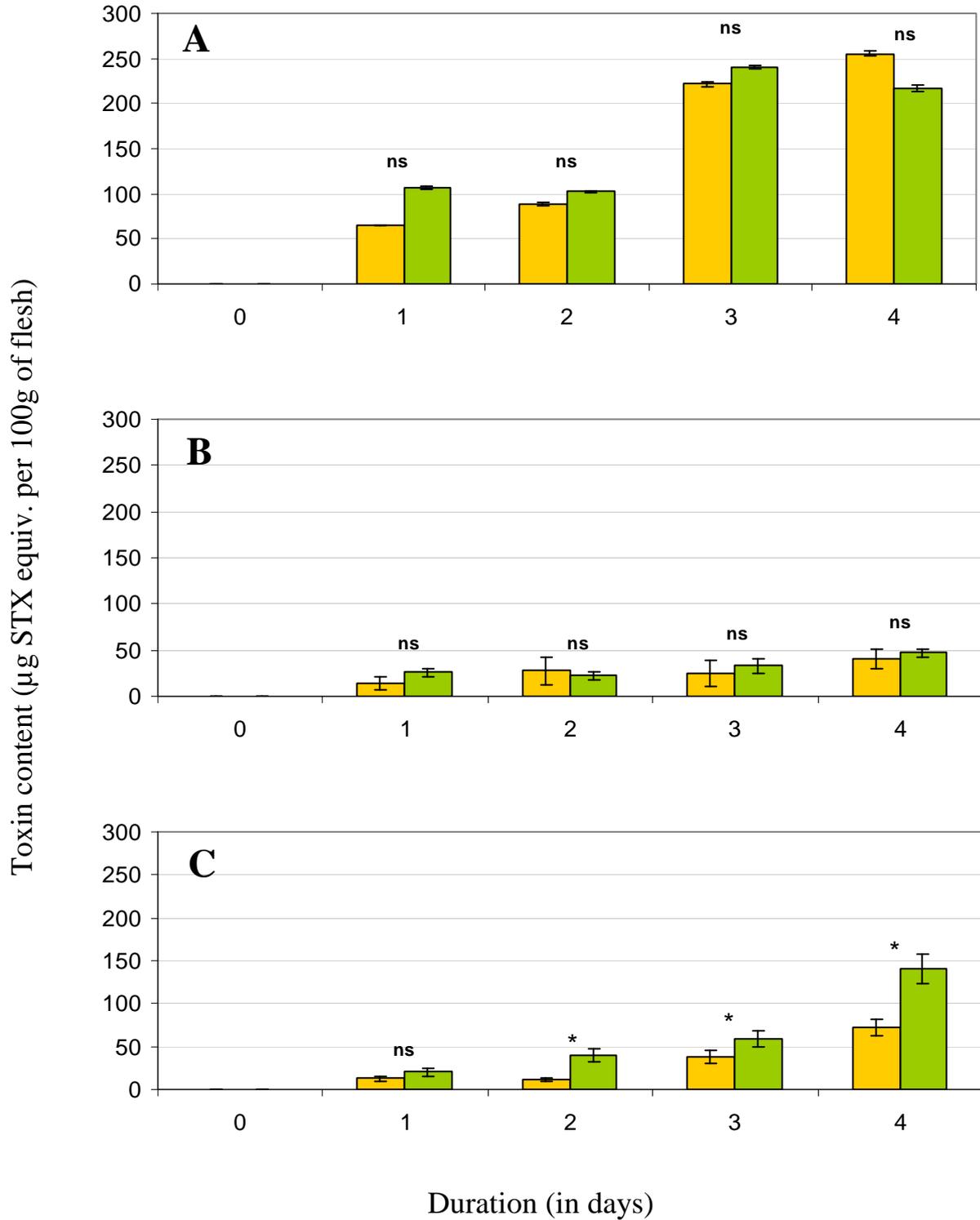


Fig. 34 Contamination of diploid (orange) and triploid (green) oysters during (a) November, (b) March and (c) June. (vertical bars correspond to the standard deviations n=3; \* indicates significant ploidy difference; ns not significant)

Figure 34 Contamination des huîtres diploïdes (en orange) et triploïdes (en vert) au mois de novembre (A), mars (B) et juin (C). (Les barres d'erreurs correspondent aux écart types n=3 ; \* indique les différences significatives entre niveau de ploïdie; ns indique l'absence de différence significative entre niveau de ploïdie)

La différence de contenu toxinique entre les huîtres diploïdes et triploïdes lors du mois de juin n'est pas la résultante d'une consommation plus importante chez les triploïdes par rapport aux diploïdes. En effet, il n'y a pas de différence significative dans la filtration, ni dans la consommation, ni dans la quantité de toxines ingérées, ni dans les biotransformations (données non présentées ici). De plus, tous les tissus à l'exception du manteau présentent un contenu toxinique plus important chez les triploïdes que chez les diploïdes (Fig. 35).

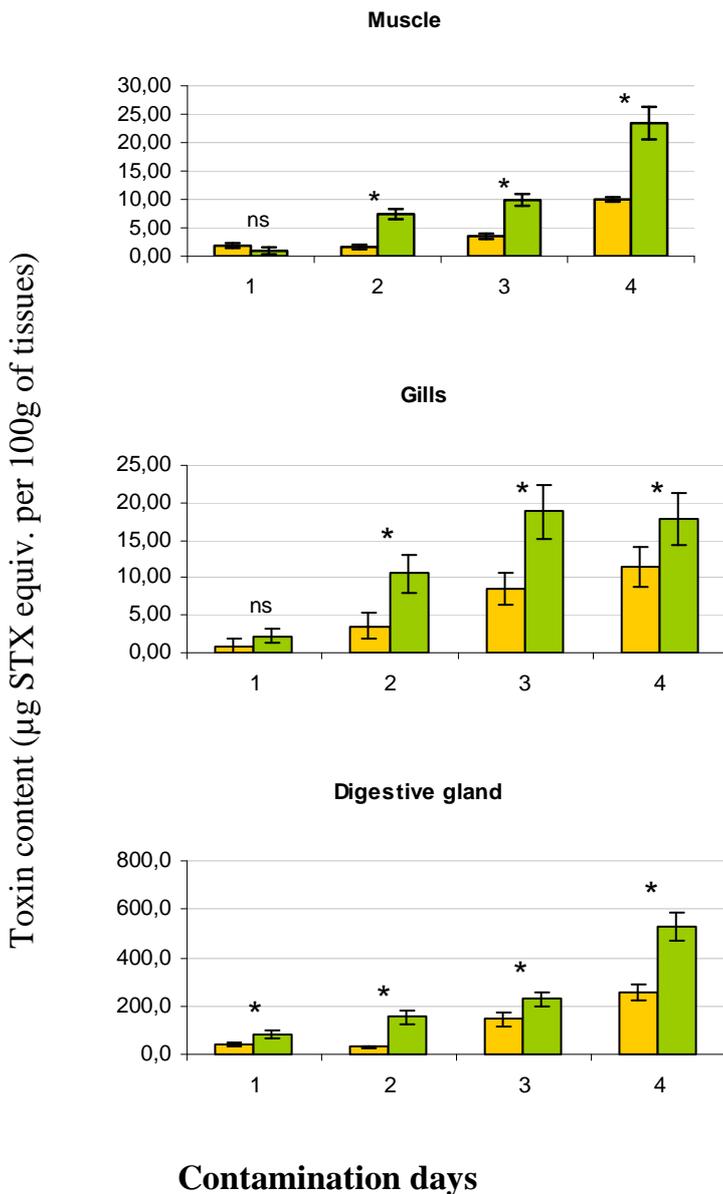


Fig. 35 Evolution of toxin content in the different tissues (muscle, mantle gills, gonad, digestive gland) of the diploid (orange) and triploid (green) oysters on June during the four contamination days. (Vertical bars correspond to the standard deviations n= 3; \* indicated significant ploidy difference; ns none significant difference between ploidies.)

Figure 35 Evolution du contenu toxinique dans les différents tissus (muscle, manteau, branchies, gonades et glande digestive) des huîtres diploïdes (en vert) et des triploïdes (en bleu) au mois de juin au cours des quatre jours de contamination. (Les barres d'erreurs correspondent aux écart types n=3 ; \* indique les différences significatives entre ploïdie ; ns indique l'absence de différence significative entre niveau de ploïdie).

### 1.3 Discussion

Aucune différence dans le contenu toxinique des huîtres diploïdes et triploïdes n'a été observée au mois de novembre et mars contrairement à juin. Cette différence ne provient pas

de la filtration, ni de la consommation, ni de la quantité de toxines prélevées, ni des biotransformations. La différence observée sur le contenu toxinique total lors de l'expérience du mois de juin se retrouve dans tous les différents tissus à l'exception du manteau.

La présence de différences significatives uniquement pendant l'expérience de juin peut s'expliquer par un état physiologique différent chez les diploïdes pendant les trois expériences. Ainsi l'expérience réalisée en novembre correspondrait à un stade de repos sexuel, le mois de mars à un stade de maturation sexuelle et le mois de juin à la fin de la maturation sexuelle. Il est important de noter que les réponses métabolique et alimentaire de *Crassostrea gigas* varient en fonction des différents stades de maturation sexuelle (Soletchnik et al. 1996). Aucune différence significative de la filtration ne peut être observée en lien avec le stade sexuel. En effet, lors de la croissance de la gonade, la taille des branchies n'évolue pas, il n'y a donc pas de variation possible dans la filtration. Cependant, le bilan énergétique des huîtres en phase de fin de maturation est négatif ( $-15 \text{ J h}^{-1}$ ) alors qu'il est compris entre 110 et  $170 \text{ J h}^{-1}$  pour les huîtres en stade immature ou post ponte. Ce déficit énergétique observé lors de la fin de la maturation sexuelle serait dû à la diminution de la fonction d'absorption. Les huîtres diploïdes auraient donc une absorption moins élevée en phase de fin de maturation sexuelle que les triploïdes. De même Berthollet-Marolle (2007) observe une meilleure absorption chez les huîtres triploïdes que chez les huîtres diploïdes à partir du mois d'avril. De plus, Haberkorn et al. (2009) ont mis en évidence qu'en fin de maturité sexuelle les huîtres triploïdes présentent une activité alimentaire et immunitaire plus importantes que les huîtres diploïdes. L'activité de l'amylase (enzyme digestive) est notamment plus importante chez les triploïdes à cette période de l'année ce qui pourrait expliquer les différences observées dans le contenu toxinique.

Les huîtres diploïdes se contamineraient moins en période de fin de maturation sexuelle car leur fonction d'absorption est diminuée à ce moment. Par contre l'absorption des huîtres triploïdes ne varie pas au cours de l'année ce qui induit une différence de contenu toxinique entre les huîtres diploïdes et les huîtres triploïdes pendant la saison estivale.

Il serait intéressant de poursuivre des recherches sur l'influence de la ploïdie sur la détoxification comme le préconise l'AFSSA. De plus, cette étude a soulevé l'hypothèse d'un possible effet du stade de reproduction sur l'accumulation des toxines PSP dans les huîtres diploïdes. Il serait donc intéressant de tester l'influence de l'état physiologique des huîtres sur l'accumulation des toxines en réitérant la même expérience, dans les mêmes conditions, à chaque stade du cycle de reproduction.

No difference in diploid and triploid oyster toxin contents was observed in November and March, contrary to June. The difference in June does not result from the clearance, or from the filtration rate, or from the amount of toxin, nor from biotransformations. The difference observed on the total toxin contents during the experiment of June is present in all tissues, except in the mantle.

The presence of significant differences only during the June experiment can be explained by a different physiological state of diploids during the three experiments. The experiment performed in November would correspond to oyster in sexual rest, March experiment would correspond to sexual maturation and June to the end of sexual maturation. It is important to note that the metabolic and food answer of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* varies according to the various states of sexual maturation (Soletchnik et al. 1996). No significant difference is observed in the clearance rate as far as the sexual state is considered. Indeed, during gonad growth, gill size does not change and therefore, there is no possible variation of the clearance rate. However oyster energy balance at the end of maturation is negative ( $-15 \text{ J h}^{-1}$ ) while it remains between 110 and  $170 \text{ J h}^{-1}$  for oysters at immature state or post laying. This energy deficit observed at the end of sexual maturation could be due to the absorption function decrease. Diploid oysters would thus have a weaker absorption than triploids at the end of sexual maturation. In a similar way Berthollet-Marolle (2007) observes a better absorption rate for triploid than for diploid oysters after April. Furthermore, Haberkorn et al. (2009) show that at the end of sexual maturation, triploid oysters present a food and immune activity more important than diploid oysters. The amylase activity (digestive enzyme) is more important in particular for triploids at this period of the year, which could explain the differences observed in the toxin contents.

Diploid oysters would get less contaminated at the end of sexual maturation because their absorption function is decreasing at this moment. On the other hand the absorption rates of triploid oysters do not vary during the year, which leads to a difference of toxin contents between diploid and triploid oysters during summer season.

It would be interesting to carry on researches on the influence of ploidy on detoxification as recommended by AFSSA. Furthermore, this study raised a possible effect of the reproduction status on the accumulation of PSP toxins in diploid oysters. It would thus be interesting to test the influence of oyster physiological state on the toxin accumulation by repeating the same experiments, in the same conditions, at every reproduction state.

## 2 Influence de la matière en suspension sur la cinétique de détoxication

La matière en suspension dans l'eau de mer comprend la matière organique et la matière inorganique. La matière organique provenant de microalgues fourrage serait susceptible d'accélérer la cinétique de détoxication de mollusques contenant des toxines paralysantes par rapport à des mollusques placés dans de l'eau de mer sans aucune particule en suspension (Bricelj & Shumway 1998). L'ingestion de ces microalgues permettrait d'accélérer l'évacuation du contenu intestinal et de solliciter le métabolisme du bivalve. De plus, l'apport alimentaire dans les bacs de détoxication éviterait l'amaigrissement des mollusques et donc la diminution de la valeur commerciale du produit. La présence de matière organique semble donc un facteur important à prendre en compte.

D'une façon générale, la concentration en nourriture ainsi que le régime algal sont considérés comme les facteurs principaux influençant la croissance et la reproduction des bivalves filtreurs (Yukihira et al. 1998). De plus, la relation entre la filtration et la concentration en particules alimentaires est dépendante des espèces considérées, que ce soit la microalgue ou le bivalve (Yukihira et al. 1998). Ainsi, *Pinctada margaritifera* et *Pinctada maxima* nourries avec *Isochrysis spp.* ont une croissance respectivement 2,1 et 1,5 fois supérieure par rapport à une alimentation à base de *Dunalliella primolecta* (Yukihira et al. 1998). De même, chez *Crassostrea gigas*, le bilan énergétique diffère significativement suivant l'espèce de microalgue, allant de  $282 \text{ J h}^{-1} \text{ g}^{-1}$  avec *Skeletonema costatum* à  $27 \text{ J h}^{-1} \text{ g}^{-1}$  avec *Nitzschia closterium* (Barillé et al. 2003).

En ce qui concerne la matière inorganique, Yu et al. (1994) ont testé l'ajout de kaolinite et de montmorillonite à de l'eau de mer contaminée par des blooms phytoplanctoniques. Le phytoplancton floccule et coagule avec ces matériaux inorganiques et précipite, la kaolinite présente une affinité plus importante avec les microalgues que la montmorillonite (Yu et al. 1995). De plus, la kaolinite favorise l'ingestion de certains composés organiques et présente un bon taux de rétention (Sornin et al. 1988, Urban & Kirchman 1992) contrairement à la montmorillonite qui est principalement rejetée par l'huître sans être ingérée (Sornin et al. 1988).

Dans un premier temps l'influence de la matière organite et de la matière inorganique sur la cinétique de détoxication des huîtres contenant des toxines PSP sera testée.

Dans un second temps, l'influence de la matière organique sera étudiée à deux concentrations différentes vis-à-vis de la cinétique de détoxification des moules contenant des toxines diarrhéiques.

Total particle matter in seawater includes organic and the inorganic matters. Organic matter resulting from microalgae may accelerate detoxification kinetics of molluscs containing paralysing toxin with regard to molluscs placed in seawater without any particulate matter (Bricelj & Shumway 1998). The ingestion of these microalgae would allow to accelerate the evacuation of the intestinal contents and to activate bivalve metabolism. Furthermore, food inputs in detoxification tanks would avoid weight loss and thus the decrease of the commercial value of molluscs. As a result, the presence of organic matter seems to be an important factor to be taken into account.

Generally, food concentration and algal diet are considered as the main factors influencing bivalve growth and reproduction (Yukihira and al. 1998). Furthermore, the relation between the clearance rates and food particles concentration is dependent on each considered species, microalga as well as bivalve (Yukihira and al. 1998). So, *Pinctada margaritifera* and *Pinctada maximum* fed on *Isochrysis spp.* have a growth respectively 2,1 and 1,5 times faster than with a *Dunalliella primolecta*-based food (Yukihira and al. 1998). Also, for *Crassostrea gigas*, the energy balance differs significantly according to the microalga species, from 282 J h<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> with *Skeletonema costatum* to 27 J h<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> with *Nitzschia closterium* (Barillé et al. 2003).

With regard to the inorganic matter, Yu et al. (1994) tested the addition of kaolinite and monmorillonite in the seawater contaminated by phytoplankton blooms. Phytoplankton cells coagulate with these inorganic matter and precipitate, the kaolinite presenting more affinity with the microalgae than montmorillonite (Yu and al. 1995). Furthermore, the kaolinite facilitates the ingestion of some organic compounds and presents a good retention rate (Sornin and al. On 1988, Urban and Kirchman on 1992), contrary to the montmorillonite which is mainly rejected by the oyster without being ingested (Sornin and al. 1988).

Firstly the influence of organic and inorganic matter on the detoxification kinetics of oysters containing toxin PSP will be tested.

Secondly, the influence of the organic matter on the detoxification kinetics of mussels containing diarrheic toxin will be studied at two different concentrations.

## 2.1 Influence de la matière en suspension sur la cinétique de détoxification des huîtres contenant des toxines paralysantes

### Detoxification of Pacific oyster *Crassostrea gigas* fed on diets of *Skeletonema costatum* with and without silt, following PSP contamination by *Alexandrium minutum*

D'après un article soumis le 10 septembre 2007 et accepté le 23 novembre 2007

Aquatic Living resources 21, 13-20 (2008)

Marielle Guéguen, Michèle Bardouil, Régis Baron, Patrick Lassus, Philippe Truquet, Julie Massardier, Zouher Amzil

Ifremer, BP 21105, 44311 Nantes, France

#### Abstract

Contamination of shellfish by paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins poses an economic threat to harvesters. As contaminated shellfish may be kept unharvested and unexploited over long periods of time, it would seem appropriate to develop and optimise detoxification processes. Pacific oysters *Crassostrea gigas* were first experimentally contaminated over a period of 13 days with a continuous flow of toxic *Alexandrium minutum* cultures at concentrations ranging from 150 to 200 cells mL<sup>-1</sup>. Three different methods were then used to obtain detoxification rates greater than those observed in coastal environments. The first method involved placing contaminated oysters in seawater with no algal food added. The second method consisted of feeding oysters on *Skeletonema costatum* at a concentration of 2000 cells.mL<sup>-1</sup> to speed up detoxification rates. The latter detoxification process used the same *Skeletonema costatum* diet, but supplemented it with silt particles at a concentration of 20 mg L<sup>-1</sup>. The *Skeletonema costatum* diet significantly reduced the time needed for oysters to reach the regulatory threshold (80µg STX eq. 100g<sup>-1</sup> of flesh), whereas the effect of supplementing with silt could not be conclusively demonstrated. These different detoxification methods do not influence toxin biotransformations as observed in oyster tissues, i.e epimerisation and decarbamoylation of gonyautoxins 2 and 3.

Keywords: Paralytic shellfish poisoning / *Crassostrea gigas* / *Alexandrium minutum* / organic matter / inorganic matter / detoxification.

**Résumé: Effets comparés de l'apport en matière organique et inorganique dans l'alimentation des huîtres du Pacifique (*Crassostrea gigas* Thunberg) contaminées par des toxines paralysantes pendant la détoxification** – La contamination des coquillages par des toxines paralysantes pose des problèmes économiques pour les producteurs. Les coquillages contaminés peuvent rester insalubres et inexploités pendant une longue période, il est ainsi important de développer et d'optimiser le processus de détoxification. Les huîtres du pacifique *Crassostrea gigas* sont dans un premier temps contaminées expérimentalement pendant 13 jours avec un flux continu d'*Alexandrium minutum* à la concentration de 150 – 200 cellules mL<sup>-1</sup>. Trois méthodes différentes sont utilisées pour obtenir des taux de détoxification supérieurs à ceux obtenus dans l'environnement côtier. La première méthode consiste à placer des huîtres contaminées dans de l'eau sans apport en alimentation. La deuxième méthode consiste à nourrir les huîtres avec la même concentration en *Skeletonema costatum* mais en ajoutant des particules d'argile (20mg L<sup>-1</sup>). L'alimentation en *S. costatum* réduit significativement le temps nécessaire pour atteindre le seuil sanitaire (80 µg éq. STX 10g<sup>-1</sup> de chair), tandis que l'ajout d'argile ne peut pas être démontré de façon décisive. Ces différentes méthodes de détoxification n'influent pas sur les biotransformations observées dans les tissus de l'huître, c'est à dire sur l'épimérisation et la décarbomoylation des gonyautoxines 2 et 3.

Mots clés : Toxines paralysantes / *Crassostrea gigas* / *Alexandrium minutum* / matière organique / matière inorganique / détoxification.

## Introduction

France is the first oyster producer in Europe with 115,250 tons produced annually (Food and Agriculture Organization technical papers, 2004). Like other filter feeders, oysters can retain particles in suspension, ingesting particle size ranges from 2 to 4  $\mu\text{m}$  (Langdon & Newell 1996). As a result, they can consume algal toxins, when these are present in some phytoplankton species, and these toxins may concentrate in the shellfish tissues. In European coastal waters there are essentially three kinds of phycotoxins: diarrhetic shellfish poisons (DSP), amnesic shellfish poisons (ASP) and paralytic shellfish poisons (PSP). All three of these are known to be present in France.

High levels of paralytic toxins in shellfish tissues can be lethal for human consumers due to the lack of specific antidotes. PSP toxins comprise a series of approximately 20 naturally occurring derivatives that vary widely in specific toxicity. The basic molecular structure is that of saxitoxine or STX.

Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) contamination by PSP toxins in Europe usually ranges from 150 to 250  $\mu\text{g}$  STX eq.  $100\text{ g}^{-1}$  of flesh. As the regulatory threshold is 80  $\mu\text{g}$  STX eq.  $100\text{g}^{-1}$ , such toxic levels generally lead to the closure of affected oyster farming areas (with market ban), bringing about significant economic losses.

Bivalves can detoxify themselves in the sea, but this process can take a long time. For example, detoxification might take one or two years for some “slow detoxifiers” (Bricelj and Shumways, 1998), depending on bivalve species and environmental factors like toxic / non-toxic phytoplankton ratios. According to a recent survey (unpublished data) oyster farmers are looking for a detoxification process which could make shellfish safe for the market in less than 6 days. So far, various methods designed to increase detoxification kinetics have been tested: thermal and osmotic stress, electric shocks, pH decrease, and chlorination (Fernandez et al., 2003). None of these methods produced any meaningful results. Environmental parameters have also been tested, as well as the intrinsic feeding behaviour of bivalves that is assumed to consistently influence PSP toxin contamination and detoxification pathways (Blanco et al., 1997; Moroño et al., 2001).

To accelerate the decontamination process, two decontamination steps could be considered as potential targets for investigation: the defecation process, and detoxification within oyster tissues. Defecation is related to the digestive process. Consequently, the presence of organic matter may accelerate this process, and suspended inorganic matter may potentially dilute particulate organic matter and decrease the amount of filtered organic matter

---

as a result (Kiørboe and Møhlenberg, 1981). However, silt in combination with an artificial algal diet can increase the growth of the bivalve molluscs because organic matter is absorbed better due to a higher clearance rate and a higher level of absorption efficiency (Griffiths, 1980; Hawkins et al., 1998).

Another way to accelerate the detoxification process would be to take tissue detoxification as well as biotransformation processes into account, i.e: epimerisation, hydrolysis and reduction (Oshima, 1995; Blanco et al., 2003; Suzuki et al., 2003). These biotransformations can affect net toxicity by transforming molecules into less toxic analogues, and therefore modifying the detoxification kinetics (Silvert and Cembella, 1995).

The amount of toxin in the other tissues must also be considered since, while this amount is generally (Lassus et al., 1997; Li et al., 2005) lower than that of digestive gland tissue, it is by no means negligible.

This study focuses on the comparative analysis of three different diets applied to PSP-contaminated oysters (*Alexandrium minutum* fed) as far as detoxification kinetics are concerned: i) starvation, ii) *Skeletonema costatum* and iii) *Skeletonema costatum* and silt. The effects of these different diets on either digestive gland or remaining flesh were observed, as well as their effects on toxin biotransformation.

## Methods

### *Biological material*

Oysters - Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) were obtained from a producer in the Bourgneuf Bay (Atlantic coast, France), where they grew safely, with no history of paralytic toxin contamination. Once in the laboratory, epibionts were removed from their shells and each animal was placed in a sea water tank for a period of 4 days acclimatisation at  $16 \pm 0.5$  °C. The oysters, with a mean flesh weight of  $4.9 \pm 0.1$  g (dry weight of  $1.02 \pm 0.04$ g), were sexually inactive

Microalgae - *Alexandrium minutum* (AM89BM strain) and *Skeletonema costatum* (PBA855 strain), and were cultivated in thermoregulated rooms ( $16 \pm 1$  °C) with a diurnal photon density flux of  $50 \pm 4$   $\mu\text{moles photons.m}^{-2}$  and a 12 h: 12h light: dark. *A. minutum* was grown in Guillard's F/2 medium, and had a mean toxin content per cell of  $1.47 \pm 0.17$  pg STX equiv. cells<sup>-1</sup>. The non-toxic strain of *Skeletonema costatum* was cultivated in Provasoli's ES medium under the same conditions. Silt particles (Kaolinite) with a particle diameter ranging from 2 to 4  $\mu\text{m}$  were added with *S. costatum* to the appropriate treatment raceway in the experimental circuit.

### *Experimental system*

Two 100 L-raceways were used (Fig. 36) during the contamination of the oysters by *A. minutum*, with 65 oysters being placed in each raceway. Seawater was recirculated (flow rate of 800 L h<sup>-1</sup>) in each raceway and buffer tank (40 L), and kept at a constant temperature:  $16 \pm 0.4$  °C. A pump placed in the buffer tank continuously supplied the detection cell of a Turner Design fluorometer equipped with 340-500 nm excitation and 665 nm emission filters for continuous measurement of Chlorophyll a fluorescence.

The oysters were fed *Alexandrium minutum* at concentrations ranging from 150 to 200 cell mL<sup>-1</sup> for 13 days.

At the end of the contamination phase, 126 oysters were subsequently distributed between three raceways, each containing 42 bivalves, while the remaining 4 oysters were collected for chemical analysis. The first tank contained unfiltered seawater only. In the second tank, oysters were fed *Skeletonema costatum* at a concentration of 2000 cells mL<sup>-1</sup> (equivalent total particulate matter or TPM: 1.60 mg L<sup>-1</sup>). The last tank contained both

*Skeletonema costatum* at a concentration of 2000 cells mL<sup>-1</sup> and silt particles at a concentration of 20 mg L<sup>-1</sup>. The detoxification time was 8 days.

For chemical analysis during the detoxification, 8 oysters were then collected from each raceway on the first, second and third day, and only 6 oysters per day were selected on the fourth, fifth and sixth days of detoxification for chemical analysis, with tests conducted each time on a pooled quantity of digestive gland and a pooled quantity of remaining flesh.

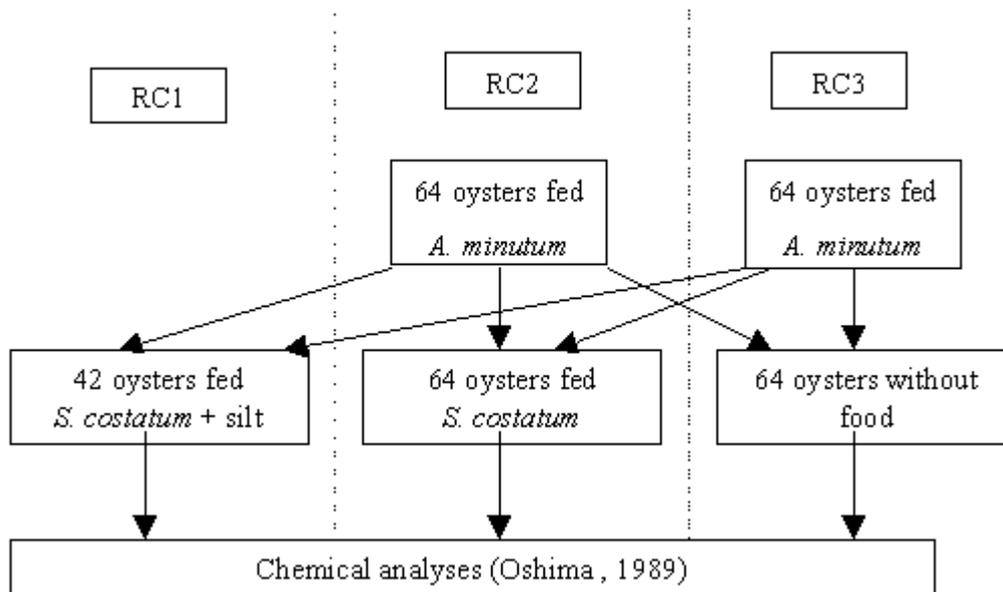


Fig. 36 Diagram showing the experimental steps of contamination and detoxification (RC: raceway)

#### *Chemical analysis using liquid chromatography / fluorescence detection (LC/FD)*

Digestive gland and remaining tissues were dissected and placed in a Büchner funnel for 1 hour to drain off the excess water. At the end of this process both parts were weighed. Drained minced flesh was then ground in 0.1 N HCl (2 v/w) at 4 °C. Homogenized flesh was centrifuged for 15 minutes at 3000 g and 4°C, and pH adjusted to 3.0-3.5 with 12 N HCl. Supernatants were then prepared by ultrafiltration (with a molecular weight cut-off of 20 kDa) using a Sartorius Centrafiltration device, and stored at 4 °C until analysis.

To quantify the toxicity of phytoplankton cells, 10 mL of toxic culture were sampled at the end of the exponential phase (14 days). Tubes were placed in the centrifuge for 15 minutes at 3000 g and 4°C. The supernatant was kept frozen subsequently at -20°C. Sedimented pellets were collected with 250 µL of acetic acid (0.1 N) following homogenisation with a vortex. The tubes were then placed in the freezer at -80°C and were allowed to thaw naturally in the ambient air for at least 1 hour. They were then sonicated for

15 min in the presence of ice. Finally, the tubes were centrifuged for 15 mins at 17000 g and 4°C.

Analysis of PSP toxins was performed using Oshima's method (Oshima et al., 1995) with slight adaptations. Toxins were separated using reversed phase chromatography and a C8 column (5 µm Develosil, 4.6 mm i.d. x 250 mm) with a flow rate of 0.8 ml min<sup>-1</sup>. Elution pH and/or column temperature were calibrated to optimise the separation of some gonyautoxins (dc-GTX3/B1/dc-GTX-2). Toxins were quantified using certified standards provided by CNRC-Halifax-Canada. B2 and C-toxins were detected and quantified indirectly following acid hydrolysis (HCl 0.4 N at 97°C for a period of 5 mins) (Masselin *et al.*, 2001).

Toxin concentrations in either *A. minutum* cultures or in contaminated oysters were converted into µg saxitoxine (STX) equiv. 100 g<sup>-1</sup> of flesh using the conversion factors determined by Oshima (1995).

The analysis was performed three times for each sample.

### *Physiological parameters*

Physiological parameters were used to compare the behaviour of oysters in the different raceways.

Discrete analyses of dissolved ammonia concentrations were conducted every morning in each raceway using the Koroleff method (1969).

Biodeposits (faeces and pseudofaeces) were collected twice a day, making it possible to calculate both the clearance rate and the filtration rate using Hawkins et al. formula (1996):

$$CR = \frac{IFR}{PIM}$$

$$FR = CR \times TPM$$

where CR is the clearance rate (L.h<sup>-1</sup>), IFR (Inorganic Filtration Rate) the amount of inorganic matter taken up from the same volume of seawater (mg L<sup>-1</sup>), PIM the amount of inorganic matter in the seston fraction contained in one litre of seawater (mg L<sup>-1</sup>), water, FR the filtration rate (mg L<sup>-1</sup>) and MES (matter in suspension) for the amount of matter in one litre.

Diurnal shell valve activity was recorded every hour and expressed as the ratio of the number of oysters that opened their valves to the number of oysters used in the experiment.

*Statistical analysis*

Detoxification kinetics were constructed as a one-compartment model as recommended by Bricelj and Shumway, 1998 and Silvert et al., 1998. The equation for this model can be expressed as follows:

$$\frac{dC}{dt} = \alpha I - \beta C$$

where C is the toxin concentration expressed as  $\mu\text{g STX eq. } 100 \text{ g}^{-1}$  of flesh, I is the toxic algal cells-related ingestion rate ( $\text{cells d}^{-1}$ ),  $\alpha$  the cell toxicity ( $\mu\text{g STX eq cells}^{-1}$ ), and  $\beta$  the detoxification factor ( $\text{d}^{-1}$ ). During detoxification, the ingestion rate of toxic cells was equal to zero which simplifies the previous equation as follows:

$$\frac{dC}{dt} = -\beta C$$

The solution for this equation is:

$$C_t = C_0 \exp(-\beta t)$$

where C (0) is the initial toxin concentration.

The coefficient  $\beta$  was determined with the Matlab 6.5 “curve fitting” tool. Prediction bounds of 95% were computed for the “preding” function. The time required to detoxify PSP-contaminated oysters from 200 (mean value in Europe) down to  $80 \mu\text{g STX eq. } 100 \text{ g}^{-1}$  of flesh, could therefore be deduced from the following equation:

$$C = 200 \exp(-\beta t)$$

$$t = \frac{\ln(80/200)}{\beta} = \frac{0.91}{\beta}$$

with t expressed in days.

**Results***Contamination*

Oysters in both raceways behaved the same way during the contamination phase: shell valve activity was similar, with the overall trend roughly following the ammonia concentration trends. These variations were cyclic and correlated directly with seawater renewals. The ANOVA test allowed us to confirm that oysters had the same clearance rate in the two tanks of  $0.17 \pm 0.16 \text{ L h}^{-1}$ .

All saxitoxine analogs were analysed through three successive runs, and only GTX3-2, C2-1 and dcGTX3-2 were detected. The toxin content of digestive gland after 13 days of

contamination was  $1405.2 \pm 128.1 \mu\text{g STX equiv. } 100 \text{ g}^{-1}$  whereas the toxin content of the remaining flesh was much lower ( $76.6 \pm 3.3 \mu\text{g STX equiv. } 100\text{g}^{-1}$ ). The highest toxin content values, equal to 95% of the total toxin body burden was found in the digestive gland.

## Detoxification

### Physiological parameters

Individually, oysters displayed different behaviour profiles during detoxification. Shell valve activity was high for oysters fed on *S.costatum*, with or without silt:  $90.4 \pm 17.5 \%$  and  $91.9 \pm 11.4 \%$ . On the other hand, oysters in the raceway containing seawater only exhibited much lower levels of activity ( $15.5 \pm 14.8 \%$ , Fig. 37). The ANOVA test confirmed these results. In the control raceway, the amount of biodeposit detected was very low, thus making it quite difficult to calculate the filtration rate. The filtration rate was fairly steady in the oysters fed *S. costatum*, except for three slightly higher values (fig. 3). The filtration rate for oysters fed *S. costatum* and silt increased through the detoxification phase (Fig. 38).

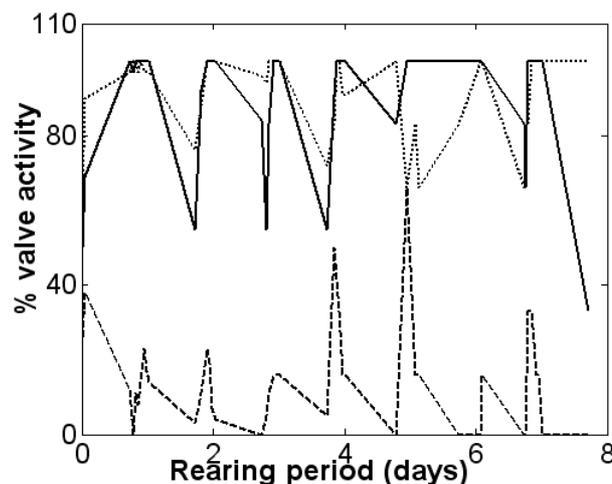


Fig. 37 Valve activity (%) during the detoxification period with different diets: *S. costatum* (—); *S. costatum* + silt (...); control (unfed oysters ---)

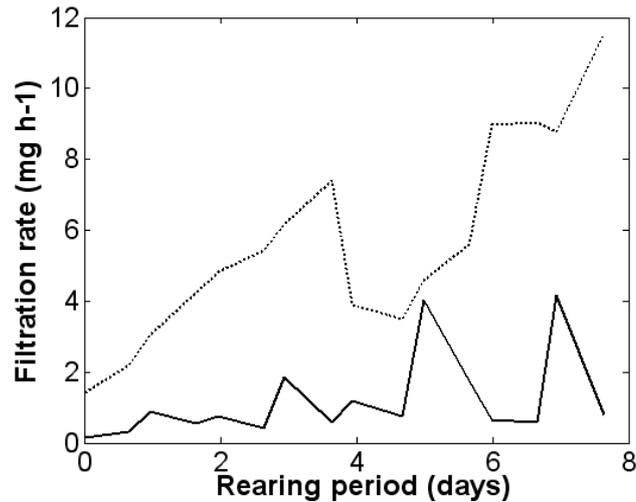


Fig. 38 Filtration rates of oysters fed *S. costatum* (—) ; *S. costatum* + silt (···)

### Toxin content

When fed non-toxic microalgae (*S. costatum* and *S. costatum* + silt), oysters displayed faster detoxification rates in both their digestive glands (Fig. 39a) and in the remaining flesh (Fig. 39b) compared with unfed oysters. Oysters fed non-toxic microalgae thus had a detoxification factor at least 3.25 times higher for digestive gland, and 2.75 times higher for the remaining flesh. Considering the two *S. costatum* diets, the presence of silt did not affect the detoxification kinetics. In digestive gland, the detoxification factor observed with *S. costatum* + silt was 1.5 times higher than the detoxification factor obtained with *S. costatum* alone, despite the fact that the curves representing 95% confidence levels overlap slightly.

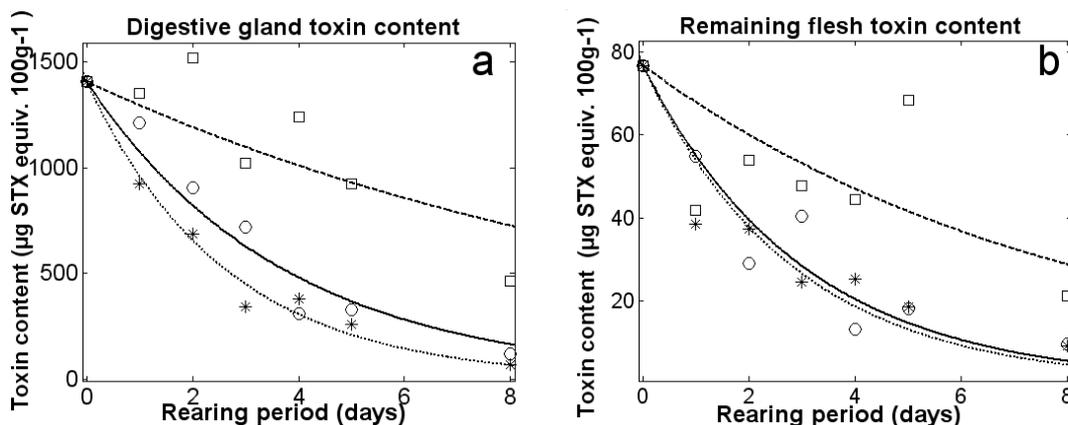


Fig. 39 a) Digestive gland toxin content ( $\mu\text{g STX equiv. } 100\text{g}^{-1}$ ) of oysters fed *S. costatum* (—)  $y=1405 \exp(-0.27t)$ ; oysters fed *S. costatum* + silt (···)  $y=1405 \exp(-0.38t)$ ; Control (---)  $y=1405 \exp(-0.08t)$ . b) Detoxification kinetics of flesh without digestive gland for oysters fed *S. costatum* (—)  $y=77 \exp(-0.33t)$ ; *S. costatum* + silt (···)  $y=77 \exp(-0.35t)$ ; Control (---)  $y=77 \exp(-0.12t)$ . All trends redrawn from the same initial toxin content.

The AOAC official method measures the amount of toxin contained within 100 g of shellfish flesh. From the relative percentage of digestive gland and remaining flesh in the oysters' soft parts, it was therefore possible to calculate and express toxicity for 100 g wet flesh. The toxin content of the experimental oysters at the end of the contamination process was therefore 438.4  $\mu\text{g}$  STX equiv.  $100\text{ g}^{-1}$  of wet weight. Overall detoxification rates were faster for oysters fed *S. costatum* and silt, than for oysters fed *S. costatum* alone, and slower for unfed control oysters (Fig. 40). Detoxification factors for oysters fed *S. costatum* and silt or only *S. costatum* were respectively 3.3 and 2.5 times higher than for unfed oysters. Feeding accelerates detoxification significantly, but silt does not significantly affect the detoxification factor for the total flesh, contrary to the observations obtained for the digestive gland (Fig. 41). These different effects upon digestive gland and total flesh can be explained by the smaller body weight of the digestive gland, and differences in toxin body burden.

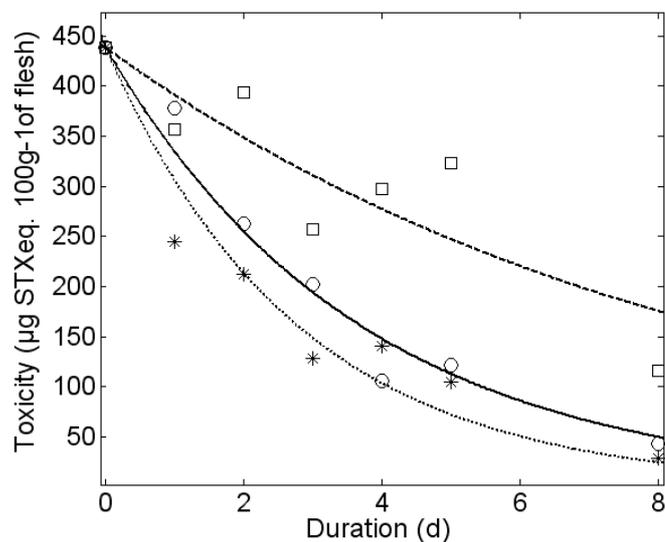


Fig. 40 Overall detoxification kinetics ( $\mu\text{g}$  STX equiv.  $100\text{g}^{-1}$  flesh) of oysters fed *S. costatum* (—)  $y = 438 \exp(-0.27t)$ ; *S. costatum* + silt (...)  $y = 438 \exp(-0.36t)$ ; Control (---)  $y = 438 \exp(-0.12t)$ .

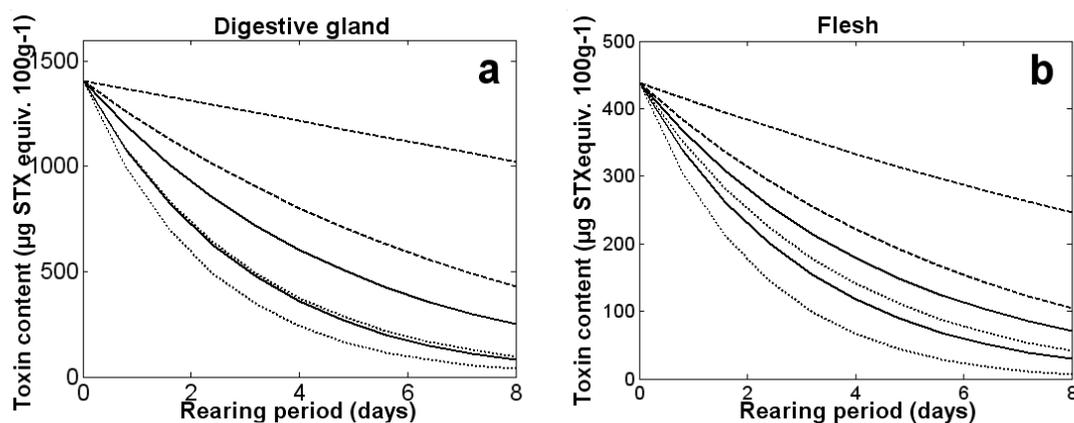


Fig. 41 a) The prediction bounds with the a 95% confidence level for detoxification kinetics of the digestive gland for *S. costatum* diet (—) ; *S. costatum* + silt (...); Control (---). All trends redrawn from the same initial toxin content. b) The prediction bounds with the a 95% confidence level for detoxification kinetics of the total flesh for *S. costatum* diet (—) ; *S. costatum* + silt (...); Control (---). All trends redrawn from the same initial toxin content.

However, when initial toxicity was equivalent to, or adjusted to 200 µg STX equiv. 100 g<sup>-1</sup> wet weight, the calculated time ( $C=C_0 \exp(-\beta t)$ ) required to reduce toxin content below the sanitary threshold was not negligible (Table 7). The mean time needed to detoxify unfed oysters was more than twice the length of time needed for oysters fed microalgae and / or silt. Adding silt improved the detoxification by reducing the time needed to reach the regulatory threshold by half a day. The time needed to detoxify oysters ranged from 2.1 to 4.3 d for oysters fed *S.costatum* and silt, 2.5 to 4.3 for oysters fed *S.costatum*, and 5.1 to 18.2 d for unfed oysters (prediction bounds with a 95% confidence level).

Table 7 Theoretical calculation of time needed to detoxify *Crassostrea gigas* when the initial toxicity level is: 200 STX eq. 100 g<sup>-1</sup> wet flesh. Minimal and maximal times correspond to prediction bounds with 95% confidence level.

	equation	Mean time (d)	Minimal time (d)	Maximal time (d)
<i>S. costatum</i> + Silt	$C = 200 e^{-0.33t}$	2.8	2.1	4.3
<i>S. costatum</i>	$C = 200 e^{-0.29t}$	3.3	2.5	4.3
Seawater	$C = 200 e^{-0.12t}$	7.6	5.1	18.2

Changes in the toxin profile of shellfish tissues may result from selective retention, elimination of individual toxins, epimerisation or biotransformation, such as reduction, hydrolysis at low pH and enzymatic conversion. The appearance of toxins in the bivalve tissues that were not detected in toxic dinoflagellates highlights the metabolic interconversion of toxins (Bricelj & Shumway 1998). In the present study, the toxin profile of *Alexandrium minutum* was: GTX3 (68%), C2 (15%), C1 (9%), GTX2 (5%), dcGTX3 (2%) and dcGTX2 (1%; Fig 42). Toxin profiles in contaminated oysters were different: GTX3 was the major

compound but in lesser proportions than for the *A. minutum* profile. GTX2 and C1 were present at higher proportions (20% and 16% in digestive gland; 12.5 % and 12% in remaining flesh). C2 was present in lesser quantities in oysters than in *A. minutum* cells. This would mean that biotransformation occurred during accumulation with at least two epimerisation processes (GTX3 converted into GTX2, C2 converted into C1). The behaviour of the C2/C1, GTX3/GTX2 and dcGTX3/dcGTX2 ratios enabled us to observe the epimerisation process. The behaviour of toxins in oysters during the detoxification process was the same in the three raceways: ratios of C2/C1 and of dcGTX3/dcGTX2 were constant; however, the GTX3/GTX2 ratio decreased over time. The proportion of GTX2 increased in comparison with the proportion of GTX3 (Fig. 43). C1/GTX2 and C2/GTX3 (hydrolysis) remained constant. GTX2/ dcGTX2 and GTX3/dcGTX3 (decarbamylation) increased, indicating that decarbamylation had occurred.

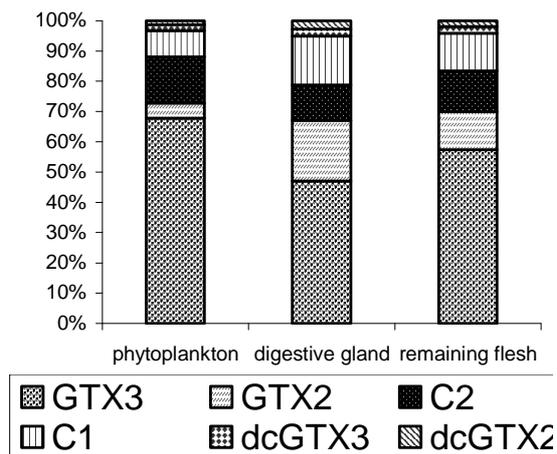


Fig. 42 Phytoplankton toxin profiles (%) and oyster toxin profiles (%) in the digestive gland and remaining flesh at the end of contamination.

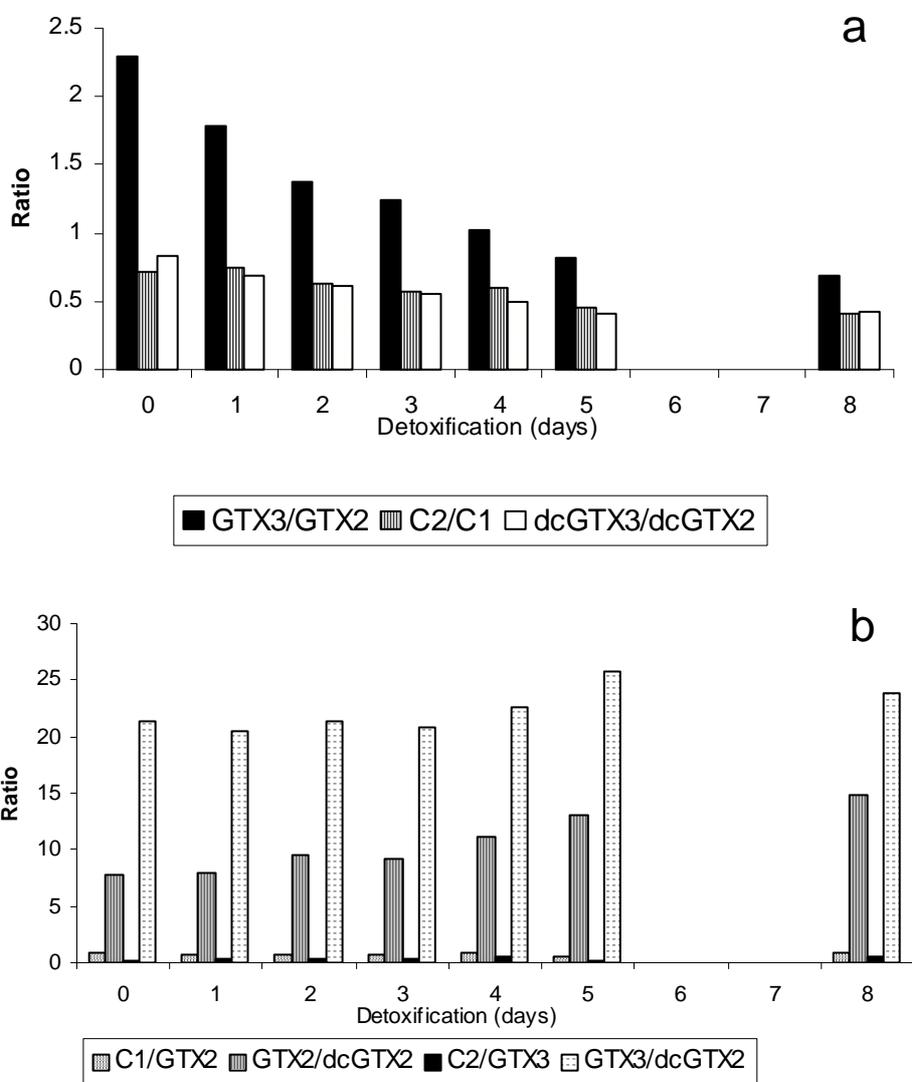


Fig. 43 a) Epimerisation as a result of GTX3/GTX2, C2/C1 and dcGTX3/dcGTX2 ratioevolution during detoxification. b) hydrolysis (C1/GTX2 and C2/GTX3 ratio) and decarbamylation (GTX2/dcGTX2 and GTX3/dcGTX3 ratios) during déttoxification.

## Discussion

This study complements the information already available regarding detoxification process of paralytic toxin-contaminated-oysters (Lassus et al. 2000, Yamamoto et al. 2003, Lassus et al. 2005). The first important result concerns the role of organic matter in the detoxification process. The second result concerns the effect of the inorganic matter which is not clearly demonstrated but it seemingly associated with faster detoxification rate. Adding, silt particles enhanced pseudofaeces production by oysters, which is not surprising since this behaviour is usually observed as soon as TPM exceeds  $4.6 \text{ mg L}^{-1}$  (Deslous-Paoli et al. 1992). Increased pseudofaeces production generally indicates pre-ingestive selection, thus allowing maintenance of high organic fraction and maximum absorption efficiency (Méléder et al. 2001). Finally, there was little biotransformation in the oysters which means that the toxin content decrease observed was most probably due to toxin elimination instead.

Detoxification factors obtained in this study ranged from 0.33 to  $0.12 \text{ d}^{-1}$  (Table 7). These values were in agreement with the findings of Lassus et al., (2005) who calculated a detoxification factor of  $0.22 \text{ d}^{-1}$ , and Yamamoto et al., (2003) who calculated a detoxification factor of  $0.31 \text{ d}^{-1}$  for the same oyster species.

The contamination phase conditions were adapted to produce the expected toxicity level, i.e. a level of contamination higher than the regulatory threshold ( $80 \mu\text{g eqSTX} \cdot 100\text{g}^{-1}$  of flesh) and therefore corresponded to the range of values observed in European coastal areas (Van Egmond et al. 1993). Feeding behaviour profiles for oysters in the two raceways were similar as far as shell valve activities and biodeposition rates were concerned. The clearance rate was  $0.17 \pm 0.16 \text{ L h}^{-1}$ . Laabir and Gentien (1999), observed a clearance rate ranging between  $0.02$  and  $0.13 \text{ L h}^{-1}$  for the toxic strains *Alexandrium minutum*, *A. tamarense* and *Gymnodinium mikimotoi*. Bardouil et al. (1993), found a clearance rate equal to  $0.32 \text{ L h}^{-1}$  for oysters feeding on *A. minutum*. The clearance rate values observed fell within the range of values found in the literature for oysters fed on *A. minutum*.

The *S. costatum* diet doubled the detoxification rates (Table 7). This confirmed the assertions made by Bricelj and Shumway (1998) that “molluscs fed non-toxic algae during the detoxification phase may be able to detoxify PSP-toxins faster than those held in filtered, particle-free seawater: active feeding is likely to accelerate gut evacuation rates and overall metabolism (degradation, excretion) of toxins”. In the same way, Blanco et al. (1997) showed that detoxification rates depended in particular on transmittance and fluorescence during mussel detoxification. The presence of food during detoxification seems important for the detoxification kinetic although Chen and Chou (2001) have found that the detoxification

kinetics for the digestive glands of fed or unfed clams were similar. They also highlighted that the toxicity of tissues other than digestive gland tissue decreased faster (36 days) in fed than in unfed (42 days) clams which is in contrast to this study, since the presence of *S. costatum* optimises oyster detoxification kinetics for both digestive gland and remaining flesh. The digestive gland was the tissue group that contained the major proportion of toxins (95% in our study). These results are in agreement with the results obtained by Chen and Chou (2001) for various bivalve species: both the purple clam *Hiatula rostrata* and the sweet clam *Callista chione* (Sagou et al. 2005). Digestive gland, on the other hand, was the organ which had the higher rate of detoxification (three times higher than other tissues in the clam), followed by the gills, then the mantle, foot, siphon and finally the adductor muscle (Bricelj & Shumway 1998). In this study on oysters, the detoxification rates for the digestive gland ( $0.38 \text{ d}^{-1}$ ) and for the remaining flesh ( $0.34 \text{ d}^{-1}$ ) were similar.

Similar toxin profiles were found in both toxic phytoplankton and in contaminated oysters. These data corroborate previous findings of Samsur et al. data (2006) on PSP-contaminated *Tapes japonica*. However, along the Moroccan coast, *Achanthocardia tuberculatum* presents a very different profile (there are 6 to 10 times more dcSTX) from the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*, and even from other shellfish profiles (*Callistachione chione*, *Venus gallina* and *Donax trunculus*; Taleb et al. 1996).

Toxin epimerisation ( $\text{GTX3} \leftrightarrow \text{GTX2}$ ) and decarbomoylisation ( $\text{GTX2} \rightarrow \text{dcGTX2}$  and  $\text{GTX3} \rightarrow \text{dcGTX3}$ ) were observed during detoxification. This result is in agreement with those found by Ichili et al. (2001) on mussels and by Silvert et al. (1998) on surfclam *Spisula solidissima*. Reduction was not observed during the experiments, unlike in the purple clam *Hiatula rostrata* (Chen and Chou, 2001), and the oysters did not transform the toxin, in contrast to *Spisula solida* (Artigas et al. 2007).

Silt seems to have an effect on feeding physiology, causing a higher filtration rate; (Kiørboe and Møhlenberg, 1981) and, might also increase toxin detoxification rates. The difference in detoxification time between oysters fed with silt (2.8 days) and without it (3.3 days) was only one day, though this could have an economic significance. The role of silt has not yet been clearly established. It would probably be necessary to test different silt concentrations, and to compare detoxification kinetics between oysters kept in particle-free seawater with silt but no algae. It would be worth finding out whether the effect of *S. costatum* on detoxification rates could be improved by using other microalgal species as complementary food sources. Lassus et al. (2000) used *Isochrysis galbana*, *S. costatum*, *Thalassiosira weissflogii* and *Tetraselmis suecica* as candidate algal diets to ensure

accelerated detoxification rates in PSP-contaminated Pacific oysters. Apart from a slightly significant difference with the *I. galbana* diet, no real differences were observed on detoxification kinetics. The question therefore remains as to whether mixed diets could be used to further accelerate detoxification.

### **Acknowledgements**

The authors would like to thank L. Barillé and Y.F. Pouchus (Nantes University, Isomer) for their helpful advice and careful reading.

## 2.2 Influence de la matière organique sur la cinétique de détoxification des moules contenant des toxines diarrhéiques

La culture de *Dinophysis spp.* en laboratoire a récemment été mise en place par une équipe coréenne (Park et al. 2006) puis par des équipes espagnole (Jaen et al. 2009) et portugaise (Veloso & Amorin 2009). Afin de cultiver *Dinophysis acuminata*, il faut dans un premier temps cultiver le cryptophyte *Teleaulax sp.* qui sert de source de nourriture à un cilié *Myrionecta rubra* qui est lui même ingéré par *D. acuminata* (Park et al. 2006, Kamiyama & Suzuki 2009). Ces cultures ont uniquement été réalisées en petit volume : 250 mL (Kamiyama & Suzuki 2009) et 300 mL (Park et al. 2006). Cependant, l'état actuel des connaissances ne permet pas de réaliser des cultures en masse de *D. acuminata*, ce qui implique que l'on ne peut pas réaliser d'expérience de contamination à partir de cultures algales de *Dinophysis spp.* Une première alternative à ce problème est de concentrer des cellules de *Dinophysis spp.* lors de prolifération côtière. Une seconde alternative est de cultiver des cellules de *P. lima* (Pillet et al. 1995, Bauder et al. 2001). La culture de cette microalgue ne pose pas de problème, mais c'est une espèce benthique qui sécrète du mucus. Lors de contamination expérimentale de mollusques par *Prorocentrum lima*, les cellules algales se collent aux parois des bacs. Il est donc difficile d'estimer correctement la biodisponibilité de ces cultures pour les mollusques filtreurs.

Les expériences de détoxification se sont donc effectuées à partir de bivalves naturellement contaminés, ce qui rend les expérimentations dépendantes de l'apparition saisonnière de blooms phytoplanctoniques de *Dinophysis spp.* sur les côtes françaises.

### 2.2.1 Matériel et méthode

#### Matériels biologiques

Les moules *Mytilus edulis* ont été collectées à Kervoyal (Bretagne Sud, France) au mois de juin après un épisode de développement de *Dinophysis acuminata* producteur de toxines diarrhéiques. Le poids sec était de 1,2 g (écart-type = 0,1g).

#### Détoxification

La détoxification est effectuée dans des bacs de 0,8 m<sup>3</sup>. Les bacs sont en circuits ouverts avec un flux de 2,5 m<sup>3</sup> h<sup>-1</sup> d'eau de mer provenant d'une nappe d'eau salée souterraine caractérisée par une salinité de 33-34, une température de 14-15°C et un pH de 7. Cette eau souterraine est exempte de tout microorganisme. Cependant, elle est très riche en fer et en

ammonium, ce qui demande un traitement préalable (oxygénation et filtre biologique). Les moules sont disposées sur deux piles de plateaux superposés les uns sur les autres. Chaque bac contient environ 100 kg de moules avec en moyenne 12-15 kg par plateau. Afin de pouvoir prélever les biodépôts, les bacs sont vidés de leur eau à chaque prélèvement de mollusques.

Les moules *Mytilus edulis* ont été détoxifiées selon deux apports de nourriture différents ( $10\text{-}15 \times 10^3$  et  $20\text{-}30 \times 10^3$  cellules  $\text{mL}^{-1}$  de *S. costatum*) en comparaison d'un bac ne contenant pas de nourriture. Environ 1,5 à 2 kg de moules sont prélevées dans les trois bacs aux jours 0, 3, 6, 10, 14 et 21. Les moules sont disséquées pour séparer la glande digestive des autres tissus.

#### Extraction et analyses des toxines

Après dissection, les glandes digestives sont conservées à  $-80^\circ\text{C}$  et les autres tissus à  $-30^\circ\text{C}$  jusqu'à l'extraction et l'analyse chimique.

Les toxines sont extraites des tissus en accord avec le protocole établi par Mondeguer et al. (2004) et validé avec des standards certifiés (extraits contaminés de référence AOCS-1 et MUS-2, CNRC, Canada). L'extraction est effectuée sur 4 g d'homogénat de glande digestive en utilisant 10,8 et 6 mL d'acétone pure. Les deux volumes d'acétone sont combinés et ajustés à 25 mL puis séparés en deux fractions de volume égal puis évaporés. La première fraction est utilisée pour l'hydrolyse alcaline permettant la détection des dérivées de l'AO (DTX3). Le résidu séché est re-suspendu dans 1 mL d'acétone pure et 125  $\mu\text{L}$  de NaOH (2.5N). Après une nuit à température ambiante, la réaction est neutralisée avec 125  $\mu\text{L}$  d'HCl (2.5N) puis le solvant est évaporé. Les première et seconde fractions sont dissoutes dans 10 mL d'un mélange hexane/ chloroforme (50/50).

La détection et la quantification sont effectuées par chromatographie liquide haute performance couplée à un spectromètre de masse à piège d'ions (Finnigan LCQ ion trap) sous les conditions suivantes : colonne et pré-colonne Kromasil C18 (250 mm  $\times$  2,0 mm, ID 0,5  $\mu\text{m}$ ) ; température  $40^\circ\text{C}$  ; phase mobile acétonitrile/ eau + 0,1 % de TFA (75/25 v/v) ; débit 0,2  $\text{mL min}^{-1}$ . La limite de quantification est de 0.2 ng d'AO. La moyenne des valeurs obtenues sur le matériel de référence (NRC/ CMR-DSP-MUS-b) est de  $9,47 \pm 2,28 \mu\text{g OA g}^{-1}$  (n=8) pour une valeur certifiée de  $10,1 \pm 0,8 \mu\text{g OA g}^{-1}$ .

### Outils statistiques

La cinétique de décontamination des bivalves contenant des phycotoxines est souvent décrite par une équation différentielle ordinaire linéaire du 1<sup>er</sup> ordre (Bricelj & Shumway 1998) dont la résolution s'exprime par une loi exponentielle négative de la forme :

$$C=C_0 \times \exp(-kt)$$

avec C la concentration en toxines, C<sub>0</sub> la concentration en toxine à t=0, l'une et l'autre exprimées en µg d'AO par g de glande digestive, k le coefficient de détoxification (exprimé en jour<sup>-1</sup>) et t le temps (en jour).

Le coefficient de détoxification k a été calculé par la bibliothèque « curve fitting tool » de Matlab version 6.5 (régression des moindres carrées). Les différences entre les cinétiques de détoxification sont déduites des intervalles de confiance à 95% du coefficient de détoxification comme le propose Potvin et al. (1990) lors de la comparaison de cinétiques dont la solution temporelle est régie par des équations non linéaires.

D'après l'équation précédente, on peut en déduire le temps de demi-vie de la toxine (t<sub>1/2</sub>) c'est-à-dire le temps nécessaire pour que 50% de la concentration initiale en toxine soit éliminée, ou encore que C soit égale à la moitié de la concentration initiale C<sub>0</sub>. On a donc:

$$t_{1/2} = \ln \frac{2}{k}$$

Par la suite, le temps de demi-vie sera calculé à partir du coefficient de détoxification moyen compte tenu de la variabilité individuelle de la toxicité propre aux huîtres contaminées.

### 2.2.2 Résultats

Le premier niveau de nourriture (10 –15 ×10<sup>3</sup> cellules mL<sup>-1</sup> de *S. costatum*) permet d'accélérer la vitesse de détoxification d'un facteur 1,7 (Fig. 44) pour l'acide okadaïque libre et 1,8 pour l'acide okadaïque total ramenant ainsi le temps moyen de demi-vie de la toxine totale à 7,9 jours contre 14,2 jours en absence de nourriture (Table 8). De plus, les intervalles de confiance à 95% des coefficients de détoxification (Table 8) ne se chevauchent pas ([0,047 ;0,069] pour les moules non nourries et [0,085 ;0,114] pour les moules nourries), de même pour l'acide okadaïque libre ou total ([0,041 ;0,057], pour les moules nourries [0,075 ;0,100] ou non); les analyses de variances confirment que les cinétiques de détoxification sont significativement différentes (p < 0.01). La cinétique de détoxification des moules contenant de l'acide okadaïque est 1,4 fois plus rapide en présence de 20-30 ×10<sup>3</sup>

cellules mL<sup>-1</sup> qu'en présence de 10-15 ×10<sup>3</sup> cellules mL<sup>-1</sup> de *S. costatum* aussi bien pour l'acide okadaïque libre que total (Fig. 44). Les intervalles de confiance à 95% du coefficient de détoxification ne se chevauchent pas dans le cas de l'acide okadaïque libre et l'analyse de variance confirme une différence significative (p < 0,01). Par contre, pour l'acide okadaïque total la borne inférieure des moules nourries avec 20-30 ×10<sup>3</sup> cellules mL<sup>-1</sup> est confondue avec la borne supérieure des moules nourries avec 10-15 ×10<sup>3</sup> cellules mL<sup>-1</sup> de *S. costatum* (Table 8).

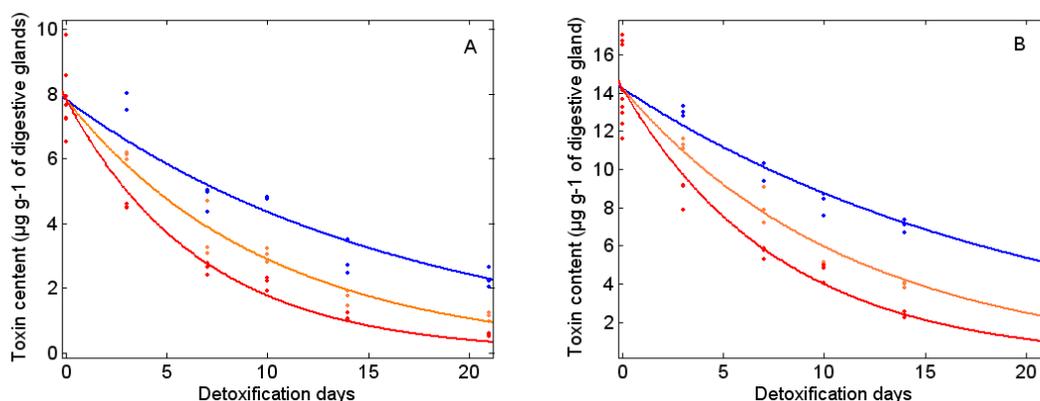


Fig. 44 (A) Free and (B) total OA detoxification kinetics of mussels containing OA for diets: 10-15 ×10<sup>3</sup> (orange), 20-30 ×10<sup>3</sup> (red) cells mL<sup>-1</sup> of *S. costatum* in comparison with mussels starved (blue)

Figure 44 Cinétique de détoxification de l'AO libre (A) et totale (B) dans moules contenant des toxines diarrhéiques nourries avec 10-15 ×10<sup>3</sup> (en orange), 20-30 ×10<sup>3</sup> (en rouge) cellules mL<sup>-1</sup> de *S. costatum* et des moules non nourries (en bleu)

Table 8 Detoxification rate (day<sup>-1</sup>) and half life (day) of mussel fed on 10-15 ×10<sup>3</sup> cell mL<sup>-1</sup>, 20-30 ×10<sup>3</sup> cell mL<sup>-1</sup> *Skeletonema costatum* and of starved mussel

Tableau 8 Taux de détoxification (jour<sup>-1</sup>) et temps demi-vie (jour) des moules contaminées par des DSP, nourries avec 10-15 ×10<sup>3</sup> et 20-30 ×10<sup>3</sup> cellules mL<sup>-1</sup> de *Skeletonema costatum* ou des moules non nourries.

	Free okadaic acid				Total okadaic acid			
	Half life (days)	Detoxification rate (days <sup>-1</sup> ) mean	min	max	Half life (days)	Detoxification rate (days <sup>-1</sup> ) mean	min	max
Seawater	11.9	0.058	0.048	0.069	14.2	0.049	0.041	0.057
10-15,000 cells mL <sup>-1</sup>	6.9	0.100	0.084	0.116	7.9	0.087	0.072	0.103
20-30,000 cells mL <sup>-1</sup>	4.7	0.147	0.123	0.171	5.5	0.126	0.103	0.148

### 2.3 Conclusion

La présence de matière organique en suspension dans le milieu permet d'accélérer la cinétique de détoxification de manière significative aussi bien pour les huîtres contenant des toxines paralysantes que pour les moules contenant de l'acide okadaïque. Ces résultats vont à l'encontre de ceux de Svensson (2003a) et de Duinker (2007) qui n'observent aucune influence significative de la présence de matière organique sur la détoxification de moules contenant de l'acide okadaïque et ses dérivés. Par ailleurs, l'effet de la matière organique sur les mollusques contenant des toxines est suggéré par Blanco et al. (1997). Ces auteurs proposent un modèle de détoxification à deux compartiments pour des moules contenant des toxines paralysantes. Ce modèle prend en compte des variables environnementales (salinité, température, seston et fluorescence *in vivo*), ce qui permet un meilleur ajustement par rapport aux données disponibles. De même Medhioub et al. (sous presse) ont mis en évidence que la présence d'algues fourrage non toxiques permettait de réduire le temps de détoxification de palourdes *Ruditapes decussatus* contenant de la gymnodimine.

En ce qui concerne les huîtres contenant des toxines paralysantes, des études antérieures ont été menées sur l'influence de l'alimentation pendant la détoxification (Lassus et al. 1999, 2000, 2004). La nature de la microalgue, sa concentration ainsi que l'utilisation de pâte d'algue ont été testées. Aucune différence significative n'a été observée lors de l'augmentation de la concentration en microalgue fourrage (12 000, 24 000 et 36 000 cellules mL<sup>-1</sup> d'*Isochrysis galbana*) sur la détoxification des huîtres contenant des toxines paralysantes (Bailey 2006). Différentes microalgues usuellement utilisées en éclosion (Robert et al. 2004) ont également été testées (Lassus et al. 2000): *Isochrysis aff. galbana* (ou *T. iso*), *Skeletonema costatum*, *Tetraselmis suecica* et *Thalassiosira weissflogii*. Ces quatre espèces appartiennent à trois classes différentes : les Haptophycées (*T.iso*), les Prasinophycées (*T. suecica*) et les Bacillariophycées (*S. costatum* et *T. weissflogii*). *T. iso* est une espèce isolée à Tahiti, de petite taille (2 à 5 µm), de couleur brune, et de forme ovoïde. *Tetraselmis suecica* est de taille plus grande (9 à 11 µm), également de forme ovoïde, et possède 4 flagelles. Les deux autres espèces sont toutes les deux des diatomées mais *S. costatum* est capable de former des chaînes de plusieurs individus contrairement à *T. weissflogii*. Ces quatre espèces de microalgues ne permettent pas de détoxifier des huîtres de manière significativement différente (Lassus et al. 2000). Cependant, l'absence de différence peut être le résultat d'une grande variabilité individuelle (Lassus et al. 2000). L'utilisation de microalgues vivantes peut cependant être une contrainte importante dans la mise en place d'un procédé de détoxification par les producteurs de mollusques. Une alternative plus économique consisterait à utiliser des pâtes

d'algue conservées congelées et produites par des aquaculteurs spécialisés dans la culture en masse. Ainsi les cinétiques de détoxification des huîtres nourries avec de la culture ou de la pâte fraîche de *Skeletonema costatum* sont très similaires (Bailey 2006). Cette donnée est importante dans la mise en place d'un procédé de détoxification.

De plus, il est important de tester si l'alimentation des huîtres avec un régime mono-spécifique de *Skeletonema costatum* pendant une semaine est susceptible de changer le goût de l'huître avant d'être commercialisée. Des études sur l'affinage de *Crassostrea gigas* avec du *S. costatum* permettent de conclure que la détoxification des huîtres avec cette microalgue ne va pas influencer le goût de la chair en une semaine (Piveteau et al. 1999, 2000). L'utilisation de *S. costatum* dans la mise en place d'un procédé de détoxification est donc une voie envisageable pour diminuer le temps nécessaire à la détoxification.

En ce qui concerne les moules contenant des toxines DSP, l'apport de nourriture permet d'accélérer la cinétique de détoxification par rapport à un témoin d'eau de mer. Cependant, les résultats expérimentaux de Svensson (2003) et de Svensson & Förilin (2004) vont à l'encontre de ces observations. Svensson (2003) décontamine des moules contenant des toxines diarrhéiques en bassin selon trois conditions : pas d'ajout d'aliment, un ajout journalier égal à 0,5 et 1,5 % de la masse sèche des moules et constitué de pâte d'algue (mélange de *Isochrysis galbana* et *Thalassiosira pseudonana*). L'analyse du contenu toxinique est effectuée sur cinq moules de façon individuelle pour chaque traitement et jour de prélèvement. Au bout de 32 jours de détoxification en bassin, l'apport de nourriture ne permet pas de réduire le temps de détoxification de manière plus importante qu'en absence de nourriture. De la même façon, Svensson & Förilin (2004) détoxifient en bassin des moules contenant des toxines diarrhéiques selon deux températures différentes (18°C et 24°C) avec ou sans apport de nourriture. L'apport de nourriture consiste en  $4,8 \times 10^9$  cellules mL<sup>-1</sup> par jour et par gramme de poids sec de moules, sous forme d'une pâte d'algue constituée de : *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros gracilis*, *Tetraselmis spp.* et *Thalassiosira pseudonana* en quantités identiques. Les quatre expériences sont effectuées en duplicat. Les analyses chimiques du contenu toxinique sont réalisées sur deux lots de trois moules. Les taux de détoxification sont très similaires entre les quatre expériences (environ 0.08 jour<sup>-1</sup>).

La différence de résultats entre ces deux expériences et celle réalisée dans le cadre de cette étude peut s'expliquer par différents facteurs. Premièrement, les microalgues fourrage proviennent de pâte d'algue et non de cultures fraîches comme lors notre expérience. De plus, dans notre expérience la culture de microalgues fourrage est apportée en continu alors que dans les deux autres expériences, la culture est apportée aux mollusques cinq fois par jour

avec une dose calculée par rapport au poids sec des moules. Deuxièmement, le nombre d'individus prélevés lors des deux expériences de Svensson est de 5 puis 2 fois 3 moules contrairement à notre expérience où l'analyse est effectuée sur des échantillons de 1,5 à 2 kg. Compte tenu de la variabilité individuelle importante inhérente aux bivalves, il peut être risqué de travailler sur un si petit nombre d'individus.

Duinker et al. (2007) s'intéressent à la détoxification en milieu naturel de moules contenant des toxines diarrhéiques entre mars et fin mai en Norvège. Ils observent deux blooms de microalgues pendant cette période : un premier en mars correspond à *Phaeocystis spp.* et un second en mai à *Skeletonema spp.*. Aucun effet de ces deux efflorescences sur la cinétique de détoxification n'est observé. Les auteurs expliquent que l'absence d'influence du bloom de *Phaeocystis spp.* serait la résultante du colmatage des branchies des moules par cette microalgue mais aucune explication n'est apportée sur l'absence d'influence du bloom de *Skeletonema spp.* sur la détoxification. Ce résultat va à l'encontre de nos observations en milieu expérimental.

En outre, on observe une différence significative entre les deux niveaux de nourriture pour les moules contenant des toxines diarrhéiques. Dans ce cas, plus la concentration en microalgues non toxiques est importante plus la détoxification s'effectue rapidement. En doublant les concentrations en microalgues fourrage, la vitesse de détoxification est multipliée par 1,4. Il serait intéressant de tester d'autres valeurs de concentration afin de mettre en évidence une relation entre la concentration en algues fourrage et l'augmentation de la vitesse de détoxification des moules contenant de l'acide okadaïque.

L'effet de différentes espèces microalgales n'a pas été testé chez les moules contenant des toxines diarrhéiques. Un facteur a priori important serait pourtant la composition en acides gras des microalgues fourrage, composition qui peut varier significativement d'une espèce à l'autre. Rappelons en effet que les acides gras se fixent sur les molécules d'acide okadaïque et de ses dérivées pour former les acyles esters (DTX3). De plus, la cinétique de détoxification des DTX3 est plus rapide que celle de l'acide okadaïque ou des dinophysistoxines 1 et 2 (Torgersen et al. 2008). Enfin, chez les moules l'acide gras qui se fixe préférentiellement sur la molécule toxique est l'acide palmitique (16:0). Cet acide gras est en quantité 2,5 fois supérieure chez *I. galbana* par rapport *S. costatum* (Table 9). Une expérience comparant les vitesses de détoxification de moules contenant de l'acide okadaïque nourries dans un cas avec *S. costatum* et dans un second cas avec *I. galbana* serait intéressante afin d'apprécier l'influence des lipides sur les cinétiques de détoxification.

Table 9: Quantity of palmitic acid (16:0) in neutral, polar and total lipids, in *Skeletonema costatum* and in *Isochrysis galbana* grown in exponential phase (Robert et al. 2004). s.d.: standard deviation.

Table 9: Quantité d'acide palmitique (16 :0) dans les lipides neutres, polaires et totaux, dans *Skeletonema costatum* et *Isochrysis galbana* cultivés en phase exponentielle (Robert et al. 2004). s.d. : écart-type.

Species	Neutral lipids		Polar lipids		total lipids	
	Mean	s.d.	Mean	s.d.	Mean	s.d.
<i>S. costatum</i>	4.63	2.71	19.04	6.19	8.42	2.00
<i>I. galbana</i>	15.73	1.62	45.70	22.71	21.08	3.28

La piste de l'apport de microalgue fourrage dans la mise en place d'un procédé de détoxification semble une bonne piste mais demande encore à être approfondie afin d'optimiser les conditions de détoxification (nature et concentration des microalgues).

The presence of suspended organic matter in the environment allows to accelerate the detoxification kinetics in a significant way for PSP-contaminated oysters or for DSP-contaminated mussels as well. These results are in opposition to those of Svensson (2003a) or Duinker et al. (2007) who observe no significant influence of the organic matter on detoxification of mussels containing okadaic acid and its derivatives. Besides, organic matter effect on molluscs containing toxins is suggested by Blanco et al. (1997). These authors propose a two-compartment detoxification model for PSP-contaminated mussels. This model takes into account environmental variables (salinity, temperature, seston and *in vivo* fluorescence), and therefore allows a better adjustment with available data. Medhioub et al. (in press) also put in evidence that the presence of non toxic microalgae improve detoxification time of gymnodimine-contaminated clams *Ruditapes decussatus*.

As regards PSP-contaminated oysters, some works have been undertaken on feed influence during detoxification process (Lassus et al. 1999, 2000, 2004). Microalgal composition and cell concentrations were tested as well as the use of microalgae pasta. No significant difference in PSP-contaminated oyster detoxification rates was observed during the increase of cellular concentrations (12,000, 24,000 and 36,000 cells mL<sup>-1</sup> of *Isochrysis galbana*) (Lassus on 2006). Various microalgae usually used in hatchery (Robert et al. 2004) were also tested (Lassus et al. 2000): *Isochrysis aff. galbana* (or *T. iso*), *Skeletonema costatum*, *Tetraselmis suecica* and *Thalassiosira weissflogii*. These four species belong to three different classes: *Haptophyceae* (*T.iso*), *Prasinophyceae* (*T. suecica*) and *Bacillariophyceae* (*S. costatum* and *T. Weissflogii*).

*T. Iso* was isolated in Tahiti. It is a small-sized (2 - 5 µm) species, brown colored, and egg-shaped. *Tetraselmis suecica* is of bigger size (cutting) (9 - 11 µm), also egg-shaped, and bearing four flagella. The two other species are diatoms but *S. costatum* is capable of forming chains of several individuals

contrary to *T. weissflogii*. These four microalgae species do not allow to detoxify oysters in a significantly different way (Lassus and al. 2000). However, the absence of difference can be the result of an important individual variability (Lassus and al. 2000). Using live microalgae can however be an important constraint in the implementation of a detoxification process by molluscs producers. A more economic alternative would consist in using frozen microalgae pastas produced by fish farmers. These farmers should be trained in mass culture engineering. So detoxification kinetics of oysters fed *Skeletonema costatum* culture or pasta are very similar (Lassus on 2006). This data is important in the implementation of a detoxification process.

Furthermore, it is crucial to test if a one week feeding with mono-specific food may change oyster taste before being marketed. Studies on the refining of *Crassostrea gigas* with *S. costatum* allowed to conclude that oyster detoxication using this algal species should not influence the taste of the flesh after one week feeding (Piveteau et al. 1999, 2000). Using *S. costatum* in a detoxification process is thus a possible way to decrease the time needed for detoxication.

Regarding DSP-contaminated mussels, food inputs allow to accelerate detoxification kinetics when compared with t seawater control. However, Svensson (2003) and Svensson and Förlin (2004) experimental results go against these observations. Svensson (2003) detoxified mussels containing diarrhetic toxins according to three conditions: no food addition, daily food addition equal to 0,5 and 1,5 % of mussels dry mass and made of microalgal paste (*Isochrysis galbana* and *Thalassiosira pseudonana* mixture). Toxin content analysis is made on five mussels individually for each treatment and each sampling day. After 32 days detoxification, food contribution does not allow to reduce detoxification time in a more important way than starving. Similarly, Svensson and Förlin ( 2004 ) detoxified, DSP-contaminated mussels reared in tanks according to two different temperatures (18°C and 24°C) and with or without food. Food contribution consisted of  $4,8 \times 10^9$  cells mL<sup>-1</sup> by day and by gramme of mussel dry weight, supplied asa paste made of: *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros gracilis*, *Tetraselmis spp.* and *Thalassiosira pseudonana* in identical quantities. Four experiments are undertaken in duplicates. Toxin contents analysis are realized on two groups of three mussels. The detoxification rates are very similar for any of the four experiments (approximately 0.08 days<sup>-1</sup>).

The difference between these two experiments and our study can be explained by various factors. Firstly, microalgal food added as a paste and not as fresh cultures like in our experiment. Furthermore, in our experiment there is is a continuous supply of microalgal culture, while in the two other experiments the paste is delivered to molluscs five times a day with a dose calculated from mussel dry weight. Secondly, the number of individual mussels removed during both Svensson experiments is 5 and then twice 3 animalscontrary to our experiment where the analysis is performed on samples ranging from 1,5 to 2 kg. Considering the important individual variability inherent to bivalves, it can be risked to work on so small a number of mussels.

Duinker et al. (2007) are interested in detoxification of DSP-contaminated mussels in their natural environment, in Norway, ad for a period lying between March and the end of May. They

observe two blooms during this period: the first one in March corresponds to *Phaeocystis spp.* and the second in May to *Skeletonema spp.*. No effect of these two blooms on detoxification kinetics were observed. The authors explain that the lack of effect of *Phaeocystis* blooms would be the result of mussel gills clogging by these microalgae but no explanation is brought on the lack of influence of *Skeletonema* bloom on the detoxification. This result goes against our experimental observations in

Besides, we observe a significant difference between both food levels for mussels containing diarrhetic toxin. In that case, the more important the concentration in no toxic microalgae is the faster the detoxification. By doubling concentrations of fodder microalgae, detoxification kinetics is multiplied by x 1.4. It would be worth testing other concentration values to clarify a possible relation between microalgal concentration and decrease in detoxification time for mussels containing okadaic acid.

The effect of various microalgal species was not tested on DSP-contaminated mussels. An important factor would nevertheless be the fatty acids composition of microalgae feed, composition which can vary significantly from a species to another one. Indeed let us remind that fatty acids can be fixed on okadaic acid and derivatives molecules to form acyl esters (DTX3). Furthermore, DTX3 detoxification kinetics are faster than okadaic acid and dinophysistoxines 1 and 2 (Torgersen and al. 2008). Finally, in mussels, the fatty acid which is fixed preferentially on the toxic molecule is palmitic acid (16:0). Palmitic acid content in *I. galbana* is x 2.5 the content found in *S. costatum* (Table 9). It would be worth comparing detoxification time of OA-contaminated mussel when fed either on *S. costatum* or on *I. galbana*.

Contribution of non toxic microalgae on detoxification process seem a promising way but still need further clarification to optimize detoxification conditions (nature and concentration of microalgae).

### 3 Discussion

Les expériences complémentaires réalisées ou traitées dans cette étude ont permis de mettre en évidence que la physiologie des bivalves influence la rétention des phycotoxines. En effet, les huîtres diploïdes semblent accumuler moins de toxines en période de reproduction par rapport à des huîtres non matures ce qui est en accord avec les résultats de Haberkorn et al. (soumis). Ces auteurs notent une toxicité deux fois plus faible chez les diploïdes matures que chez les triploïdes immatures aux mois d'avril et de mai. Les paramètres « âge – taille » peuvent également jouer un rôle dans la cinétique d'accumulation des phycotoxines. En effet, pour les toxines diarrhéiques, les moules âgées d'un an se contaminent plus que les moules de deux ans, mais leurs cinétiques de détoxification sont semblables (Duinker et al. 2007). Or la détoxification dépend de la perte fécale et Hawkins et al. (1990) notent une perte fécale plus importante chez les grosses moules. Pour Blanco et al. (1997), la détoxification des moules contenant des DTXs est plus rapide chez les individus de petites tailles. Ces résultats sont contradictoires, ce qui est étonnant, sachant que la croissance ou l'amaigrissement des mollusques bivalves va induire une dilution ou une concentration de la toxine dans la chair (Bricelj et al. 1990). En résumé, l'état physiologique des mollusques bivalves apparaît comme une donnée importante à prendre en compte que ce soit dans l'établissement d'un modèle prédictif de contamination / détoxification ou pour la mise au point d'un procédé de détoxification. Cependant pour pouvoir intégrer valablement la variable « état physiologique » des investigations plus complètes sont nécessaires.

La présence de la matière en suspension (matière organique et inorganique) permet d'accélérer la cinétique de détoxification des mollusques bivalves contenant des phycotoxines (Gueguen et al. 2008a, Marcaillou et al. soumis). Des études plus approfondies sur la concentration, la nature et la qualité des MES demanderaient aussi à être investiguées.

Une autre variable environnementale fréquemment testée est la température, dont l'efficacité a été étudiée sur la cinétique de détoxification, aussi bien pour les toxines PSP que DSP. En ce qui concerne les toxines PSP, la température, dans une gamme 7,5 à 16°C, n'influence pas la détoxification de *Saxidomus giganteus* (Madenwald 1985), ni les huîtres *Crassostrea gigas* pour une gamme de température allant de 12 à 20°C (Lassus et al. 2005). De la même façon, la température ne semble pas influencer la cinétique de détoxification des moules contenant des toxines DSP (Svensson 2003b, Duinker et al. 2007). Ces résultats sont surprenants car la température est une variable clé dans la physiologie des bivalves. Elle permet de modifier la filtration (Barille et al. 1997, Haure et al. 1998), le temps de transit des

particules dans le système digestif (Boucaud-Camou et al. 1983, Gueguen et al. 2008b) et modifie la composition lipidique des membranes cellulaires (Pernet et al. 2007, 2008).

Actuellement, aucun procédé n'existe pour détoxifier industriellement des mollusques bivalves contenant des phycotoxines (Fernandez et al. 2003). En ce qui concerne les toxines paralysantes, l'influence de stress thermiques et osmotiques, de chocs électriques, l'abaissement du pH et l'ajout de chlore ont déjà été testés (Bricelj & Shumway 1998, Fernandez et al. 2003) sans avoir d'effet sur la vitesse de détoxication. Un autre procédé physico-chimique qui a été étudié est l'injection d'ozone. L'ozone est un oxydant connu pour éliminer les pesticides, pour améliorer les caractères organoleptiques des eaux traitées et pour augmenter la biodégradation des matières organiques (Koudjonou et al. 1996). Il est très utilisé dans le traitement de l'eau potable et permet également de purifier l'eau dans laquelle les mollusques sont placés en station de traitement microbiologique. L'ozone est également connu pour dégrader des cellules phytoplanctoniques comme par exemple *Karenia brevis* (Schneider & Rodrick 1992), et pour dénaturer les brévéttoxines (Schneider et al. 2003). Cependant, l'effet de l'ozone sur la détoxication de mollusques bivalves contenant des toxines paralysantes est controversé. Blogoslawski & Stewart (1978) et Blogoslawski et al (1979) ont conclu à une bonne efficacité de l'ozone sur la détoxication de myes et de palourdes contenant des toxines paralysantes. White et al (1985) ne trouvent, au contraire, aucune influence de l'ozone sur des myes contenant des toxines paralysantes. Injecté dans l'eau de mer, l'ozone réagit avec les ions bromure libres formant ainsi de l'acide hypobromeux et des ions hypobromites (Lassus et al. 2002). L'acide hypobromeux en conjugaison avec l'ozone serait responsable de l'inactivation de la saxitoxine et de ses dérivés (Lassus et al. 2002). Cependant, aucun effet significatif n'a été démontré sur la cinétique de détoxication des huîtres contenant des toxines PSP (Lassus et al. 2002).

D'une façon générale, les expériences menées en laboratoire ont permis de mettre en évidence que la présence de matière en suspension permettait de diminuer le temps nécessaire à la détoxication par rapport à l'utilisation d'eau de mer uniquement, et ceci aussi bien pour les huîtres contaminées par des PSP que pour les moules contenant des DTXs. Il serait donc intéressant de continuer à prospecter dans cette voie pour mettre en place un procédé de détoxication. Des essais complémentaires permettant de choisir la nature de la microalgue, la concentration et la présence ou non de matière inorganique demanderaient à être réalisés en bassin sur des quantités industrielles de mollusques bivalves (supérieures à 100kg). De plus, dans le cas des toxines paralysantes il serait nécessaire de décontaminer en bassin des huîtres contaminées naturellement afin de voir s'il y a un temps d'adaptation dû aux changements de

milieu (transport, acclimatation). A l'heure actuelle, l'apport de nourriture en bassin pour les moules contaminées par des DTXs demande un temps de détoxification proche de celui du milieu naturel, il faudrait donc pouvoir amplifier l'effet de la nourriture pour réduire le temps de détoxification à moins de 6 jours.

The additional experiments performed or treated in this study evidenced that bivalve physiology influences phycotoxins retention. Indeed, diploid oysters seem to accumulate fewer toxin during reproduction period when compared to immature oysters, which is in agreement with the results of Haberkorn et al. (submitted). These authors note a toxin content in mature diploids twice lower than in immature triploids in April and May. The "age - size" parameters can also play a role in phycotoxin accumulation kinetics. Indeed, for diarrhetic toxin, the one-year-old mussels are more contaminated more the two-year-old mussels, but their detoxification kinetics are similar (Duinker et al. 2007). Besides, detoxification depends on the faecal loss and Hawkins et al. (1990) note a more important faecal loss in big mussels. According to Blanco et al. (1997), the detoxification of mussels containing DTXs is faster for small sized individuals. These results are contradictory, which is surprising, when knowing that bivalve molluscs growth or slimming will produce a dilution or a concentration of the toxin in the flesh (Bricelj and al. 1990). In summary, the physiological state of bivalve molluscs appears as an important data to take into account whether it is for the establishment of a predictive model of contamination / detoxification or for the development of a detoxification process. However to rightly integrate the "physiological state" parameter, more complete investigations are still needed.

The presence of total particulate matter (organic and inorganic) allows to accelerate detoxification kinetics in bivalve containing phycotoxins (Gueguen et al. 2008a, Marcaillou et al. submitted). Further studies are nevertheless needed to explore more thoroughly the role of TPM concentration, nature and quality.

Another frequently tested environmental parameter is the temperature namely its effect upon PSP or DSP detoxification kinetics. Regarding PSP toxins, temperature, in a range 7,5 to 16°C, does not influence of *Saxidomus giganteus* detoxification (Madenwald 1985), nor oysters *Crassostrea gigas* for temperatures ranging from 12 to 20°C (Lassus et al. 2005). In the same way, temperature does not seem to influence detoxification kinetics of DSP-contaminated mussels (Svensson 2003b, Duinker et al. 2007). These results are surprising because temperature is a key variable for bivalve physiology. It allows to modify the clearance rate (Barille and al. 1997, Haure and al. 1998), particles gut passage time in (Boucaud-Camou and al. 1983, Gueguen and al. 2008b) and it is assumed to modify lipid composition of cellular membranes (Pernet and al. 2007, 2008).

At present, no process does exist to industrially detoxify bivalve containing phycotoxins (Fernandez et al. 2003). As far as paralytic toxins are concerned, the influence of thermal and osmotic stress, electric shocks, pH reduction and chlorine addition were already tested (Bricelj and Shumway

on 1998, Fernandez et al. 2003) without having any effect on detoxication time. Another physico-chemical process which was studied is ozone injection . Ozone is an oxidizer known to eliminate pesticides, to improve the organoleptic properties of treated waters and to increase biodegradation of organic matter (Koudjonou et al. 1996). It is commonly used for drinking water treatment and also for shellfish depuration and water cleansing in microbiological treatment plants. Ozone is also known to degrade phytoplanktonic cells like, for example, *Karenia brevis* (Schneider and Rodrick 1992), and to denature brevetoxins (Schneider et al. 2003). However, ozone effect on detoxification of PSP-contaminated bivalve is debated. Blogoslawski and Stewart (1978) and Blogoslawski et al ( 1979 ) concluded that ozone was efficient for the detoxication PSP-contaminated soft-shells and grooved carpet-shells. Conversely, White et al ( 1985 ) do not find any effect of ozone on PSP-contaminated soft-shells. Injected in sea water, ozone reacts with bromide free ions to form hypobromous acid and hypobromites ions (Lassus and al. 2002).

Hypobromous acid in conjugation with ozone would be responsible for inactivation of saxitoxin and derivatives (Lassus et al. 2002). However, no significant effect was demonstrated on the detoxification kinetics of oysters containing toxin PSP (Lassus and al. 2002).

Generally speaking, laboratory experiments clearly indicated that the presence of suspended matter favoured a reduction of the detoxification time when compared to sea water alone. This observation is valid for PSP-contaminated oysters as well as for mussels containing DTXs. It would thus be interesting to keep on investigating this way to set up a detoxification process. Additional assays allowing to choose microalgae nature and concentration as well as the presence or absence of inorganic matter should be performed with bivalve mollusk reared in tanks at industrial scale unit size (more than 100kg).

Furthermore, in the case of paralytic toxins it would be necessary to detoxify naturally-contaminated oyster in tanks to check if shellfish need acclimation period to balance environmental changes effect. At the moment, the contribution of food inputs to detoxication of DSP-contaminated mussels reared in tanks is not significantly different from the contribution of the natural environment. It would thus be needed to amplify the effect of the food to reduce the detoxification time down to less than 6 days.

# Chapitre 4 - Modélisation



# 1 Introduction

Les objectifs de la mise en place de modèles décrivant la cinétique de détoxification des bivalves contenant des phycotoxines sont : (i) l'aide à la compréhension des mécanismes biologiques et des paramètres environnementaux pouvant modifier cette cinétique; (ii) la prédiction du temps nécessaire à la détoxification et (iii) la fourniture des informations nécessaires à l'établissement des modes opératoires convenant à des pilotes de détoxification.

Les modèles généralement utilisées sont à un ou deux compartiments comme décrit dans la figure 45 (Blanco et al. 1995, Silvert & Cembella 1995, Blanco et al. 1997, Silvert et al. 1998, Blanco et al. 1999, Yamamoto et al. 2003, Blanco 2004, Yu et al. 2005, Baron et al. 2006, Lassus et al. 2006, Rossignoli & Blanco 2008). Dans le modèle à deux compartiments, les compartiments 1 et 2 peuvent ne pas correspondre aux mêmes processus selon les auteurs considérés. Parfois, il s'agit des toxines libres et des toxines fixées (Silvert et al. 1998) alors que dans d'autres études il est question des toxines présentes dans les organes viscéraux et non-viscéraux (Lassus et al. 2006).

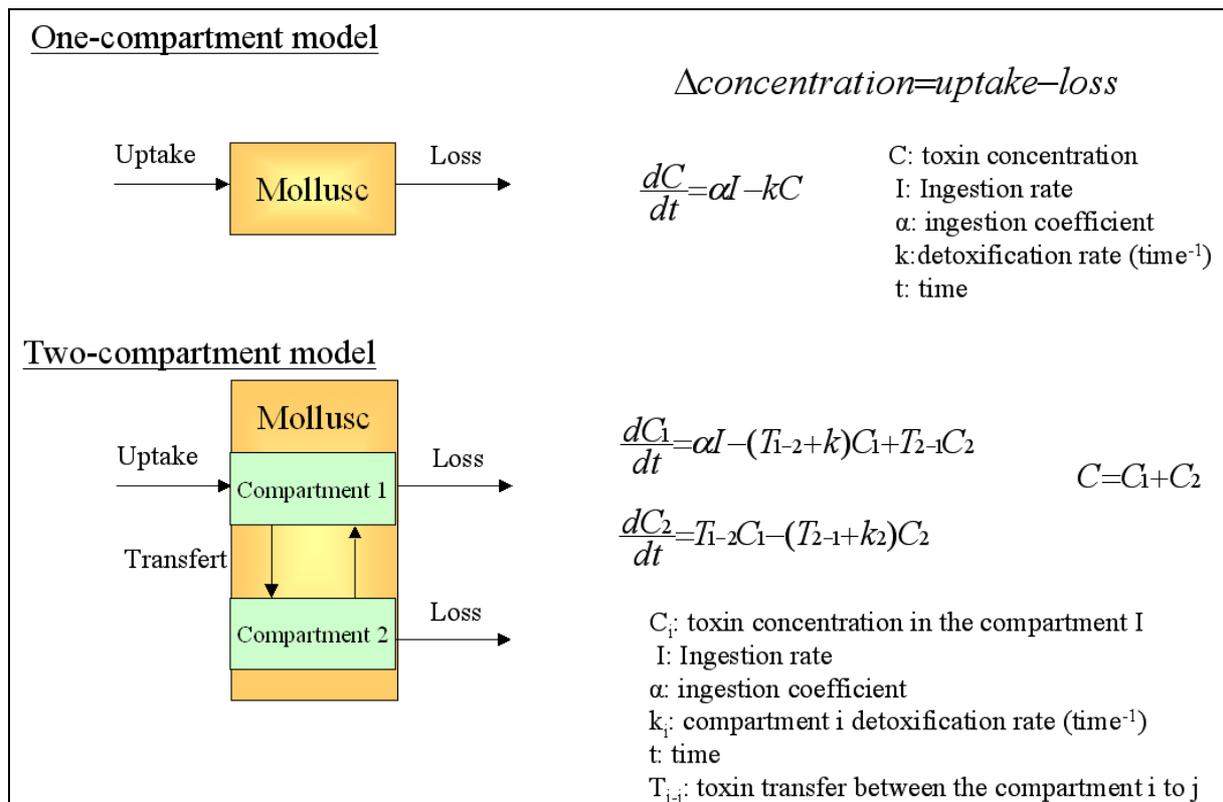


Fig. 45 One- and two-compartment models

Figure 45 Modèles à un et deux compartiments

Il existe d'autres modèles prenant en compte les biotransformations des toxines DSP (Morono et al. 2003) ou des toxines PSP (Blanco et al. 2003), les transferts de toxines vers les différents tissus (Silvert et al. 1998, Blanco 2004, Li et al. 2005) ou encore l'influence des variables environnementales sur la contamination / détoxification (Blanco et al. 1997, Morono et al. 1998, Blanco et al. 1999, Morono et al. 2001).

Grâce aux connaissances extraites de la littérature internationale sur les cinétiques de contamination / détoxification (Chapitre 1) et aux résultats complémentaires obtenus dans le cadre de ce travail (Chapitre 2 et 3), nous allons nous attacher à étudier différents modèles de contamination et de détoxification. Ces modèles s'appliqueront au cas des huîtres contenant des toxines PSP et à celui des moules contenant des toxines DSP.

The objectives of the implementation of models describing detoxification kinetics of PSP-contaminated bivalves are: i) to help to understand biological mechanisms and environmental parameters which can modify these kinetics; ii) to predict the time needed for detoxification and iii) to supply all information needed for the establishment of convenient operating modes as far as detoxification pilots are concerned.

The models generally used are one- or two- compartment models as described in figure 45 (Blanco et al. 1995, Silvert and Cembella on 1995, Blanco et al. 1997, Silvert et al. 1998, Blanco et al. 1999, Yamamoto et al. 2003, Blanco 2004, Yu et al. 2005, Baron et al. 2006, Lassus et al. 2006, Rossignoli and Blanco 2008). In two-compartment model, compartments 1 and 2 can correspond to different processes according to each considered authors. Sometimes, they are related to free- and bound toxins (Silvert and al. 1998); in other studies they deal with the presence of toxins in visceral and non-visceral organs (Lassus and al. 2006).

There are some other models taking into account DSP (Morono et al. 2003) or PSP toxin biotransformations (Blanco et al. 2003), toxin transfers towards the different tissues (Silvert and al. 1998, Blanco 2004, Li and al. 2005) or environmental variables effect on contamination / detoxification (Blanco and al. 1997, Morono and al. 1998, Blanco and al. 1999, Morono and al. 2001).

Thanks to the knowledge on contamination / detoxification kinetics (Chapter 1) coming from the international literature and to the complementary results obtained in this work (Chapter 2 and 3), we will study several contamination and detoxification models. These models will apply to PSP-contaminated oysters and to DSP-contaminated mussels.

## 2 Les jeux de données

### 2.1 Les limites

Les essais de modélisation vont être réalisés avec les jeux de données disponibles. Il est cependant important d'être conscient de la limite de ceux-ci. Premièrement, la mesure du contenu toxinique est une méthode destructive qui ne nous permet pas de suivre la contamination et la détoxification d'un même individu tout au long des expériences. Deuxièmement, les contenus toxiniques observés chez plusieurs individus ayant subi le même historique de contamination peuvent être très différents. En effet, la répartition de 45 individus (Fig. 46), ayant été contaminés de la même façon pendant la même expérience, en fonction de leur contenu toxinique, ne permet pas de déterminer une loi décrivant cette répartition. Vingt individus présentent un contenu toxinique inférieur à 80  $\mu\text{g}$  éq STX par 100g de chair humide et dix-huit individus ont une toxicité comprise entre 200 et 800  $\mu\text{g}$  éq STX par 100g de chair. Afin de pallier à ce problème de forte variation individuelle, il faudrait travailler sur un plus grand nombre d'individus. Malheureusement, cela n'a pas été possible pour des raisons pratiques. Il a donc été choisi de retenir des jeux de données correspondant aux résultats d'expériences où l'analyse du contenu toxinique a été réalisée sur des lots de plusieurs individus. Cependant ces jeux de données à partir de lots sont également à relativiser car ils sont sous-échantillonnés. De plus, les écarts types observés, correspondant à l'erreur sur la mesure chimique, présentent une grande variabilité lorsque l'on se situe dans les limites de détection de la méthode.

Troisièmement, dans le meilleur des cas, une valeur de contenu toxinique est disponible chaque jour, or d'après le théorème de Shannon la fréquence d'échantillonnage d'un signal (dans notre cas la valeur de la toxicité) doit être égale ou supérieure au double de la fréquence maximale contenu dans ce signal. Une perte d'information se produit si le pas d'échantillonnage est trop grand par comparaison aux fréquences considérées. Il sera donc irréaliste de chercher à modéliser des phénomènes dont l'échelle de temps est de quelques heures.

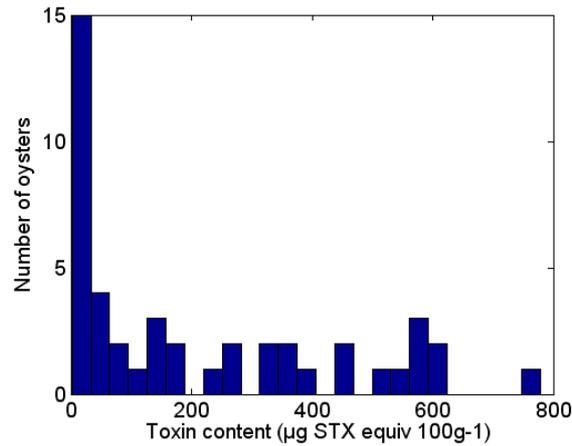


Fig. 46 Distribution of 45 individuals oysters with the same initial contamination according to their mean toxin contents.

Fig. 46 Répartition des 45 huîtres ayant subi la même contamination initiale en fonction de leur contenu toxinique moyen.

Les jeux de données disponibles présentent à la fois un sous-échantillonnage de la mesure et un sous-échantillonnage temporel. Des ajustements ont donc été réalisés afin d’obtenir des données susceptibles d’être modélisées. Cette démarche a obéi à deux critères : la dérivé des moyennes doit vivre dans un domaine borné et le domaine des données de l’analyse chimique doit être cohérent.

## 2.2 Présentation des jeux de données expérimentaux

### Les données de contamination

Quatre jeux de données sont disponibles en phase de contamination. Ils correspondent aux expériences menées sur les huîtres diploïdes et triploïdes au mois de novembre et de juin (Chapitre 3 -2). Ces huîtres ont été contaminées à l’aide de banc écophysio-logique pendant 4 jours avec de l’*Alexandrium minutum*. L’utilisation de fluorimètres permet d’estimer la valeur de l’entrée du modèle qui correspond à la quantité de toxines prélevée par l’huître (Baron et al. 2006). Cette quantité appelée  $Q_{tox}$  exprimé en  $\mu g$  équiv. STX  $h^{-1} 100g^{-1}$ , peut se calculer de la façon suivante :

$$Q_{tox} = 100 \frac{TQ}{\alpha P} (y_i - y)$$

avec : T contenu toxinique moyen par cellule (pq éq STX cellule<sup>-1</sup>)

Q le débit (mL h<sup>-1</sup>)

P le poids humide de l’huître (g)

$\alpha$  le coefficient de régression des équations :  $y_i = \alpha N_{ai}$  et  $y = \alpha N_a$  avec  $y$  et  $y_i$  représentant les signaux de fluorescence,  $i$  l'entrée dans les bacs et  $N_a$  le nombre de cellules mL<sup>-1</sup>.

La sortie du modèle correspond au contenu toxinique des différents organes (glande digestive, gonade, manteau, muscle et branchies). Les analyses chimiques ont été réalisées sur des regroupements d'organes issus de quatre individus. Deux jeux de données concernant les huîtres diploïdes (novembre et juin) et deux jeux de données concernant les huîtres triploïdes (novembre et juin) sont disponibles.

### Les données de détoxification

Pour les données de détoxification, deux expériences menées en raceway vont être utilisées. La première expérience a été décrite dans le chapitre 3-2.1 qui traitait de l'influence de la matière en suspension sur la cinétique de détoxification des huîtres contaminées par des toxines PSP. Nous disposons des données sur le contenu toxinique de la glande digestive et des autres tissus. Pour la seconde expérience, deux jeux de données sont disponibles dans les mêmes conditions de détoxification (*S. costatum*). Les analyses chimiques ont été réalisées sur des regroupements de glandes digestives ou des autres tissus à partir de six individus.

Dans ces jeux de données, la masse de la glande digestive est considéré comme représentant 23 % du poids total. Cette valeur sera systématiquement appliquée pour estimer la quantité de toxines totales.

Pour les jeux de données relatifs à la détoxification des moules contenant des toxines DSP, nous disposons de résultats acquis dans l'expérience sur l'influence de la matière organique développée dans le chapitre 3 -2.2, ainsi que des données issues de Duinker et al. (2007) et des données du réseau de surveillance norvégien.

### **2.3 Ajustement des modèles et estimation des coefficients**

Les modèles ont été mis en place en utilisant la bibliothèque Simulink de Matlab 6.5. La fonction permettant l'ajustement est *fminsearchbnd* qui a été développée sur la base de la fonction *fminsearch* par John D'Errico. L'estimation des coefficients a été réalisée selon les cas soit par la méthode des moindres carrés qui consiste à minimiser la somme quadratique des erreurs entre les prédictions du modèle et les données expérimentales (sse : sum square errors) soit par la méthode des moindres écarts en valeurs absolues qui cherche à minimiser la somme des valeurs absolues des erreurs de prédiction du modèle et des données expérimentales.

### 3 Modèles prenant en compte les transferts des toxines entre les différents tissus

#### 3.1 Introduction

La mise en place de modèles prenant en compte les transferts des toxines entre les différents tissus a pour but de mieux comprendre le devenir des toxines dans le bivalve, en particulier les voies d'assimilation des toxines. Il est également important de tenir compte individuellement des différents tissus même si la glande digestive reste l'organe contenant le plus de toxines, car les autres tissus ne sont pas toujours négligeables, surtout dans le cas des toxines paralysantes. De plus, les vitesses de détoxification des différents tissus sont différentes (Chen & Chou 2002, Yu et al. 2005) et leur considération pourrait permettre une meilleure description de la cinétique de détoxification.

Actuellement, des essais sur la mise en place de modèle intégrant les transferts des toxines PSP entre les différents tissus ont été réalisés chez *Pecten maximus* (Blanco 2004) et *Perna viridis* (Li et al. 2005). Ces modèles diffèrent légèrement : Li et al. (2005) proposent que le phytoplancton toxique pénètre dans la moule par les viscères où il est dégradé, puis la toxine est transférée vers les autres tissus (branchies, hépatopancréas, muscle adducteur et pied) qui sont capables de se détoxifier au même titre que les viscères. Quant à Blanco (2004), il propose deux modèles différents. Dans le premier, le phytoplancton toxique pénètre dans la glande digestive, est dégradé, puis la toxine est transférée vers les branchies et le manteau, le muscle adducteur, le pied, la gonade et les reins. Chaque organe est capable de se détoxifier indépendamment des autres. Dans le second modèle, l'entrée s'effectue toujours par la glande digestive qui transfère les toxines vers les différents organes, mais dans ce cas la détoxification des toxines contenues dans les tissus transite d'abord vers le rein qui procède à l'élimination des toxines.

A notre connaissance, aucun modèle n'a déjà été mis en place en prenant en compte les transferts des toxines paralysantes entre les différents tissus de l'huître. A partir des modèles établis par Blanco (2004) et Li et al. (2005) et des observations réalisées dans le chapitre 2 (temps de transit des microalgues toxiques dans le système digestif et répartition des toxines PSP dans les différents tissus de l'huître), le schéma suivant est proposé (Fig. 47) :

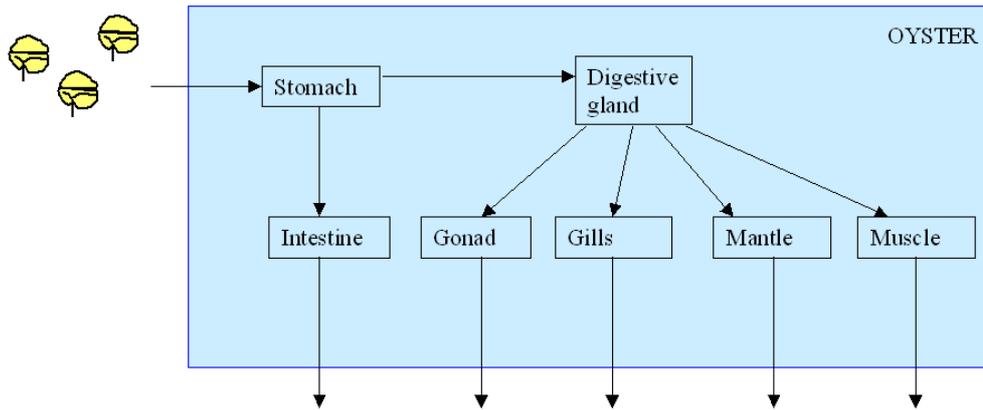


Fig. 47 Simplified representation of the PSP toxin changes in oyster *Crassostrea gigas*.

Fig. 47 Représentation schématique du devenir des toxines PSP dans l'huître *Crassostrea gigas*.

### 3.2 Modélisation

Aucune donnée de contenus toxiques par tissu pendant la période de détoxification n'est disponible aussi les modèles ont été testés dans un premier temps sur des jeux de données obtenus lors de la contamination. Une fois le modèle obtenu, celui-ci a été testé sur des données de détoxification pour être validé ou réfuté.

Plusieurs hypothèses initiales ont été posées de façon générale pour tous les essais réalisés dans le cadre de la modélisation des transferts de toxines PSP d'un tissu à un autre :

- les coefficients lors de la contamination et de la décontamination sont les mêmes ;
- en l'absence de microalgues toxiques, le contenu toxique au bout de deux jours doit diminuer ;
- le contenu toxique est considéré comme nul après 16 jours de détoxification afin d'imposer une vitesse minimale de détoxification ;
- l'entrée de la toxine correspond à la quantité de toxines prélevées ( $Q_{tox}$ ) dans le milieu telle que décrite par Baron et al. (2006). Cette grandeur est estimée à partir d'un système expérimental particulier. Elle est donc rarement accessible dans les jeux de données de la littérature.

### 3.2.1 Modèle à sept compartiments

Le schéma proposé dans la figure 47 peut être traduit en équations mathématiques comme proposées dans l'annexe 3. Ce modèle prend en compte la modélisation du temps de transit des microalgues dans le tube digestif des huîtres comme établi dans le chapitre 2 - partie 1. Le jeu de données utilisé correspond à la contamination des huîtres diploïdes au mois de novembre (Chapitre 3- 1).

En plus des **hypothèses** émises précédemment, il a été considéré que le temps de transit des toxines était équivalent au temps de transit des cellules d'*Alexandrium minutum* et que le contenu toxinique mesuré dans la glande digestive était égal à la somme des contenus toxiques de la glande digestive, de l'estomac et de l'intestin car la dissection de ces deux derniers organes sur des huîtres est complexe à mettre en œuvre et nécessiterait un grand nombre d'individus pour obtenir un poids minimal suffisant pour effectuer les analyses chimiques. L'entrée et la mesure du système sont représentées dans la figure 48.

L'**identification** des paramètres a été réalisée en deux temps. Tout d'abord, les coefficients de transfert des toxines PSP de l'estomac vers la glande digestive et vers l'intestin ont été identifiés, puis dans un second temps, les transferts des toxines PSP de la glande digestive vers les autres tissus ont également été identifiés ainsi que le taux de détoxification de chaque tissu.

Dans un premier temps, l'**impact** de la prise en compte de **l'estomac et de l'intestin** dans le modèle est étudié.

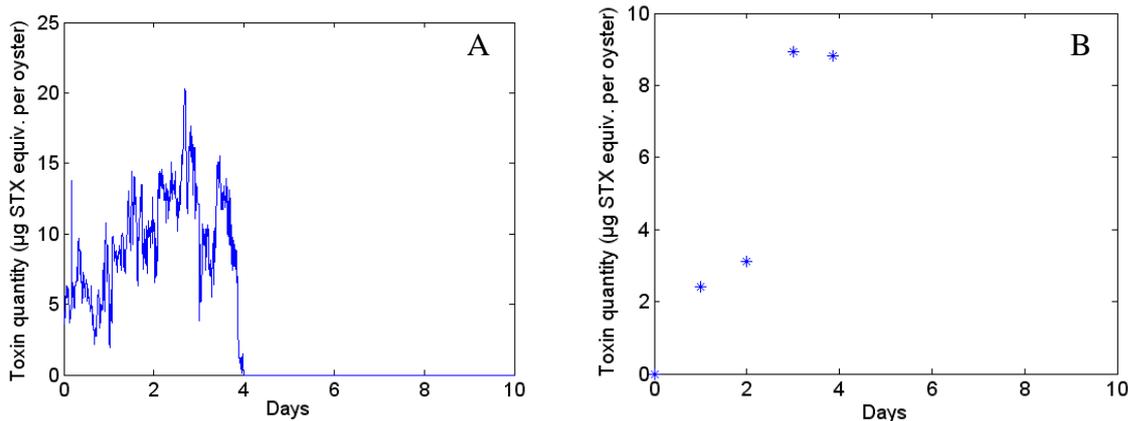


Fig. 48 A- System input according to the  $Q_{tox}$  defined by Baron et al. (2006) in  $\mu\text{g STX equiv. per oyster}$  ; B- System measurement according to the digestive gland toxin content in  $\mu\text{g STX equiv. per oyster}$ .

Figure 48 A – Entrée du système correspondant au  $Q_{tox}$  obtenus d'après Baron et (2006) en  $\mu\text{g éq. STX par huître}$  ; B – mesure du système correspondant au contenu toxinique de la glande digestive en  $\mu\text{g éq STX par huître}$ .

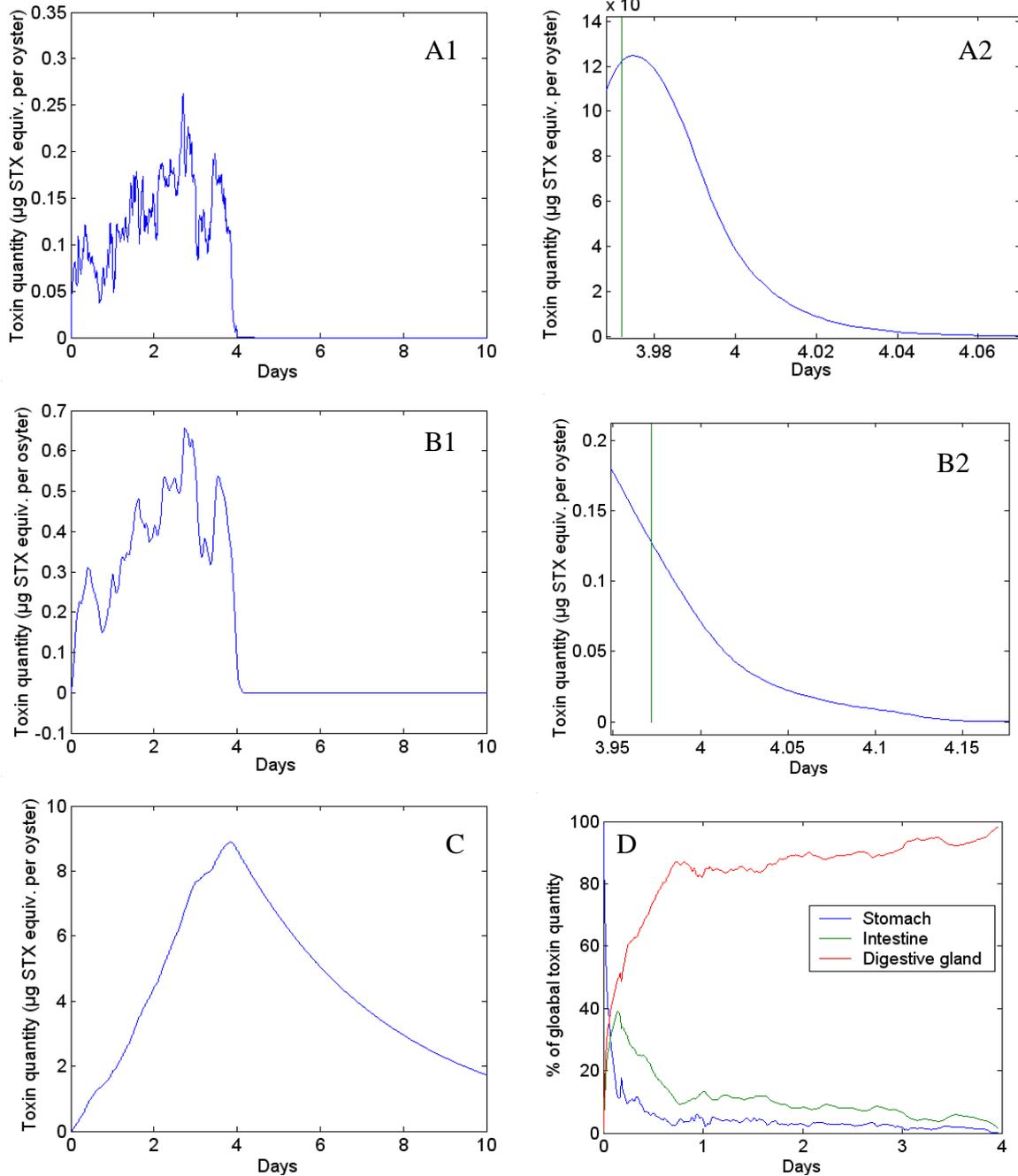


Fig. 49 Simulation of the seven-compartment model corresponding to figure 47 and annexe 3. A1 Stomach toxin content along time, A2 zoom on the end of contamination and the beginning of detoxification, we can notice stomach toxin content is equal to 0 after 0.09 days, the green curve show the end of the contamination. B1 Intestine toxin content along time, B2 zoom on the end of contamination and the beginning of the detoxification, we can notice intestine toxin content is equal to 0 after 0.18 days, the green curve show the end of the contamination. C digestive gland toxin content along time. D Relative importance of every compartment in the total toxin contents during four days of contamination.

Figure 49 Simulation du modèle à 7 compartiments correspondant à la figure 47 et à l'annexe 3. A1 contenu toxinique au cours du temps de l'estomac, A2 détail de la fin de la contamination et début de la détoxification, on peut noter que le contenu toxinique de l'estomac est égal à 0 au bout de 0,09 jours, la courbe verte indiquant la fin de la contamination. B1 contenu toxinique au cours du temps de l'intestin, B2 détail de la fin de la contamination et le début de la détoxification, l'intestin met 0,18 jours à se vider complètement des toxines, la courbe verte indiquant la fin de la contamination. C contenu toxinique au cours du temps de la glande digestive. D importance relative de chaque compartiment dans le contenu toxinique global au cours des quatre jours de contamination.

Il est important de souligner que la cinétique de l'estomac et de l'intestin sont très proches de celle de l'entrée (Fig 48 et Fig 49 A1, B1). La cinétique de la glande digestive diffère de manière plus importante, et présente une accumulation moins chaotique ainsi qu'une élimination des toxines beaucoup plus lente que celle de l'estomac ou de l'intestin. En effet, l'estomac se vide de son contenu toxinique en 2,2 h (Fig. 49 A2) et l'intestin en 4,3 h (Fig. 49 B2). Ces deux cinétiques sont très rapides par rapport à la cinétique globale de détoxification qui nécessite plus d'une semaine. De plus l'importance relative moyenne de l'estomac et de l'intestin dans la toxicité globale de la glande digestive (qui comprend en fait l'estomac, intestin et la glande digestive : hypothèse initiale) est d'environ 5% et 10% respectivement. La prise en compte de ces deux compartiments (estomac et intestin) ne semble pas influencer de manière importante la cinétique d'accumulation et de détoxification des toxines PSP dans l'huître. Ce résultat est confirmé par la comparaison de l'évolution du contenu toxinique de la glande digestive à partir d'un modèle à un compartiment (de la forme  $\frac{dC}{dt} = a \times Q_{tox} - kC$ ) et le modèle prenant en compte l'estomac, l'intestin et la glande digestive ( Fig. 50).

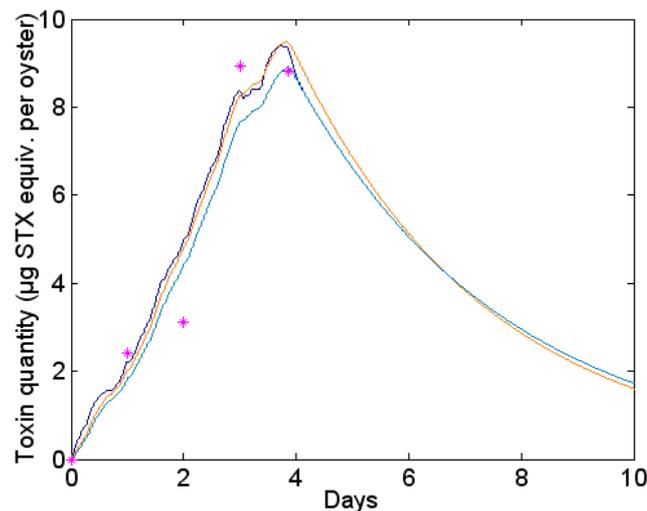


Fig. 50 Comparison of digestive gland toxin contents evolution from a one-compartment model  $\frac{dC_{GD}}{dt} = 0,397 \times Q_{tox} - 0,29C_{GD}$  (orange), and from a three-compartment model (stomach, intestine and digestive gland; dark blue). When the three-compartment model is used the digestive gland alone is indicated in light blue.

Figure 50 Comparaison de l'évolution du contenu toxinique de la glande digestive à partir d'un modèle à un compartiment  $\frac{dC_{GD}}{dt} = 0,397 \times Q_{tox} - 0,29C_{GD}$  (en orange) et avec ce que décrit le modèle à trois compartiments (estomac, intestin et glande digestive ; en bleu foncé). La cinétique de la glande digestive seule lors de l'utilisation du modèle à 3 compartiments est indiquée en bleu clair.

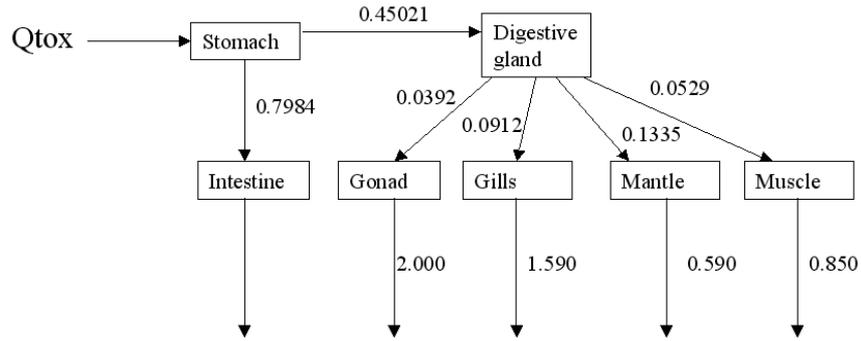


Fig. 51 Seven-compartment model coefficients, the digestive tract is 4.2 cm long, the speed 30 cm d<sup>-1</sup> and the axial dispersion coefficient 0.23 cm<sup>2</sup>.

Figure 51 Coefficient du modèle à 7 compartiments, la longueur du tube digestif est de 4, 2 cm, la vitesse de 30 cm j<sup>-1</sup> et le coefficient de dispersion axiale est de 0,23 cm<sup>2</sup>.

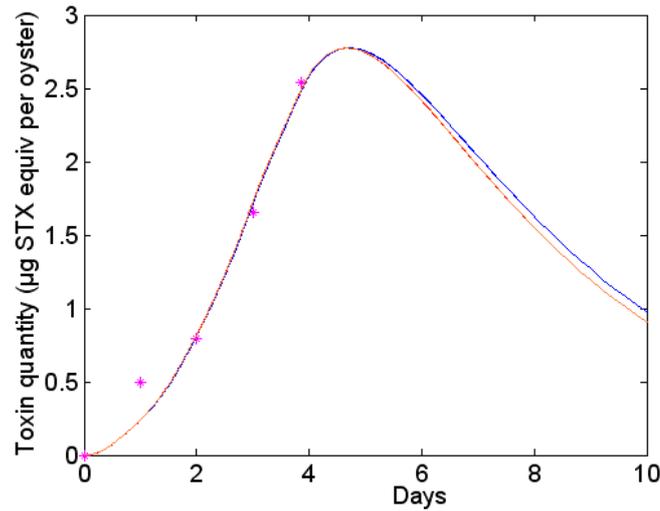


Fig. 52 Modelling other tissue toxin contents from a two-compartment model  $\frac{dC_{GD}}{dt} = 0.397 \times Q_{tox} - 0.29C_{GD}$  and

$\frac{dC_{AT}}{dt} = 0.29C_{GD} - 0.793C_{AT}$  (orange), and from a seven-compartment model (dark blue). The pink stars represent the toxin content.

Figure 52 Modélisation du contenu toxinique des autres tissus à partir d'un modèle à deux compartiments

$\frac{dC_{GD}}{dt} = 0,397 \times Q_{tox} - 0,29C_{GD}$  et  $\frac{dC_{AT}}{dt} = 0,29C_{GD} - 0,793C_{AT}$  (en orange) et du modèle à sept compartiments (en bleu foncé). Les étoiles roses représentent les valeurs du contenu toxinique moyen obtenu.

Les valeurs obtenues lors de l'identification des paramètres sont données dans la figure 51. De manière globale, la prise en compte des transferts des toxines PSP de la glande digestive vers les autres organes est comparable avec les résultats obtenus lors de l'utilisation d'un modèle à deux compartiments, prenant en compte uniquement la glande digestive et les autres tissus (Fig. 52). Cette première modélisation des transferts des toxines paralysantes d'un tissu à un autre a permis de mettre en évidence la cinétique très rapide de l'estomac et de l'intestin. La prise en compte de ces deux compartiments ne semble pas améliorer la cinétique de contamination et de détoxification des huîtres. En conséquence, un modèle à cinq compartiments pourrait s'avérer suffisant (Fig. 53).

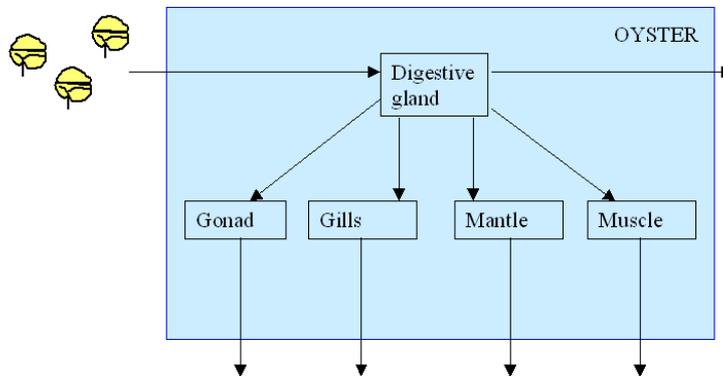


Fig. 53 Five-compartment model proposal

Figure 53 Proposition d'un modèle à cinq compartiments

### 3.2.2 Comparaison de modèles à cinq et deux compartiments

Dans cette partie, la prise en compte des transferts des toxines dans les différents tissus sera traitée en comparaison avec un modèle à deux compartiments prenant en compte la glande digestive et les autres tissus de manière globale.

Le modèle prenant en compte les transferts de toxines d'un tissu à un autre est constitué de cinq compartiments distincts tels qu'illustrés dans la figure 53 tandis que le modèle mathématique est indiqué en annexe 3. Le modèle à deux compartiments est décrit dans la figure 54.

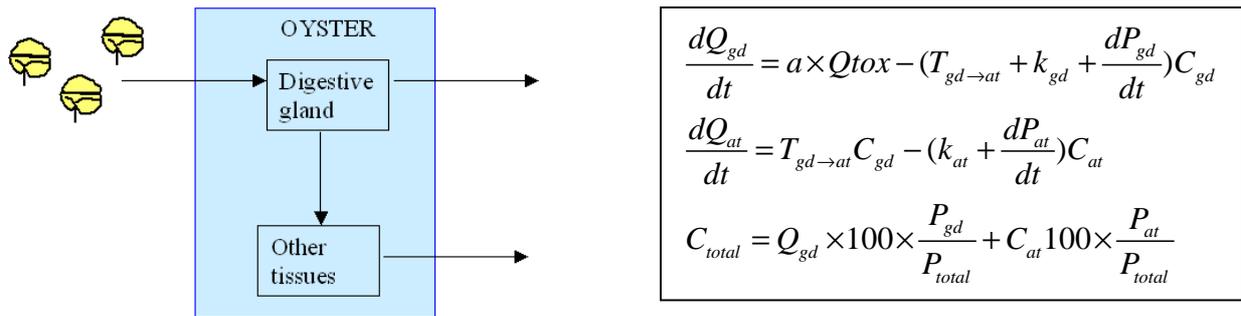


Fig. 54 Simplified representation of the two-compartment model and its mathematical transcription with  $Q_a$  : Quantity of toxins in  $\mu\text{g}$  STX equiv. In the tissue a ;  $k_a$  : Detoxification coefficient of tissue a in  $\text{day}^{-1}$  ;  $P_a$  : Wet weight of tissue a in g ;  $T_{a \rightarrow b}$  : Transfer from compartment a to compartment b in  $\text{day}^{-1}$  ;  $C_{totale}$  : Total toxin concentration in  $\mu\text{g}$  STX equiv. per 100g of wet weight ;  $gd$  digestive gland and  $at$  other tissues.

Figure 54 Représentation schématique du modèle à deux compartiments et sa transcription mathématique avec  $Q_a$  : Quantité de toxines en  $\mu\text{g}$  éq. STX dans le tissu a ;  $k_a$  : Coefficient de détoxification du tissu a en  $\text{jour}^{-1}$  ;  $P_a$  : Poids humide du tissu a en g ;  $T_{a \rightarrow b}$  : Transfert du compartiment a vers le compartiment b en  $\text{jour}^{-1}$  ;  $C_{totale}$  : Concentration en toxine totale en  $\mu\text{g}$  éq. STX par 100g de chair humide ;  $gd$  : glande digestive et  $at$  autres tissus.

1<sup>er</sup> ajustement sur les données de contamination des huîtres diploïdes du mois de juin (expériences réalisés dans le chapitre 3-1; figures 55, 56 et 57)

Le coefficient a, correspondant au coefficient de rétention des toxines dans le mollusque, est ajusté lors de l'identification des paramètres du modèle à deux compartiments puis imposé dans le modèle à cinq compartiments.

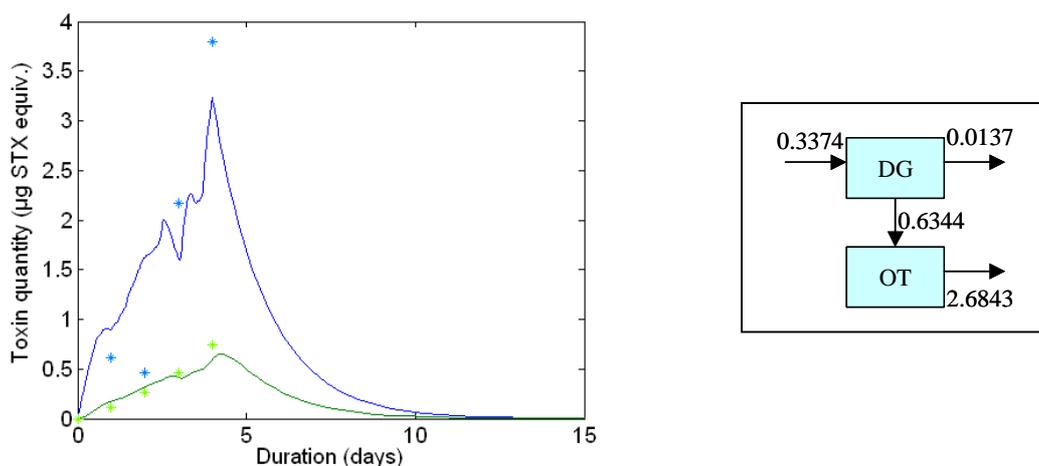


Fig. 55 Representation of the two-compartment model, the digestive gland is represented in blue and the other tissues in green. Crosses represent the values of the known toxin contents. DG: digestive gland; OT other tissues.

Figure 55 Représentation graphique du modèle à deux compartiments, la glande digestive est représentée en bleu et les autres tissus en vert. Les croix représentent les mesures des contenus toxiques. DG : glande digestive, OT autres tissus.

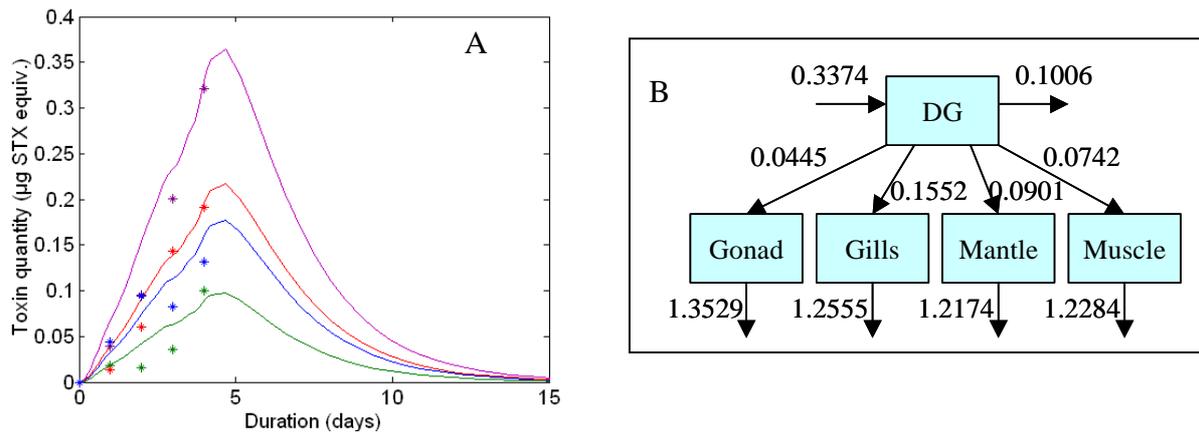


Fig. 56 Representation of the five-compartment model. A other tissues: gonad (green), mantle (red), gills (purple) and muscle (blue). B values of model coefficients. C Digestive gland. Crosses represent the values of the known toxin contents. DG. Digestive gland.

Figure 56 Représentation graphique du modèle à 5 compartiments. A les autres tissus : gonade (en vert), manteau (en rouge), branchies (en violet), et muscle (en bleu). B valeurs des coefficients du modèle. C glande digestive. Les croix représentent les valeurs des contenus toxiques connus. DG : glande digestive.

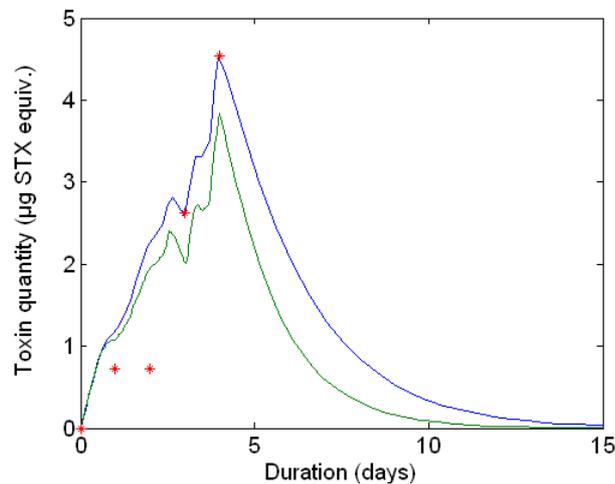


Fig. 57 Comparison of the total toxin quantity in total flesh simulated with the two-compartment model (Fig. 55 ; green ; sse = 2,4697) and with the five-compartment model (Fig. 56, blue, sse = 2,5716). Crosses represent the values of the known toxin contents

Figure 57 Comparaison de la quantité totale de toxine dans la chair totale simulée avec le modèle à deux compartiments (Fig. 55 ; en vert ; sse = 2,4697) et avec le modèle à cinq compartiments (Fig. 56, en bleu, sse = 2,5716) Les croix représentent les valeurs des contenus toxiques connus.

2<sup>ème</sup> ajustement sur les données de contamination des huîtres triploïdes du mois de juin (expériences réalisées dans le chapitre 3 -1 ; Figures 58, 59 et 60)

Comme dans l'ajustement des paramètres des modèles sur les données de contamination des huîtres diploïdes, l'ajustement du coefficient « a » de rétention des toxines est réalisé dans le modèle à deux compartiments puis imposé dans le modèle à cinq compartiments.

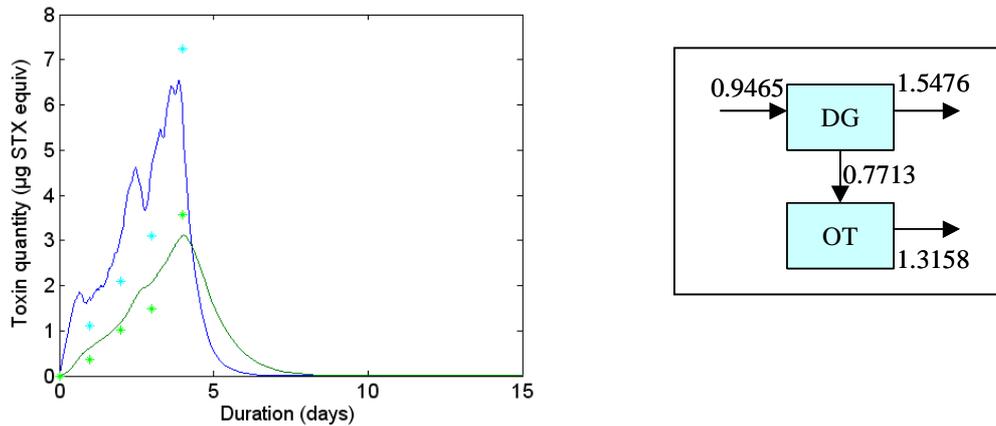


Fig. 58 Representation of the two-compartment model performed on triploid oyster, the digestive gland is represented in blue and the other tissues in green. Crosses represent the values of the known toxin contents. DG: digestive gland; OT other tissues.

Figure 58 Représentation graphique du modèle à deux compartiments réalisée à partir des les données relatives aux huîtres triploïdes, la glande digestive est représentée en bleu et les autres tissus en vert. Les croix représentent les valeurs des contenus toxiques connus. DG : glande digestive, OT autre tissus.

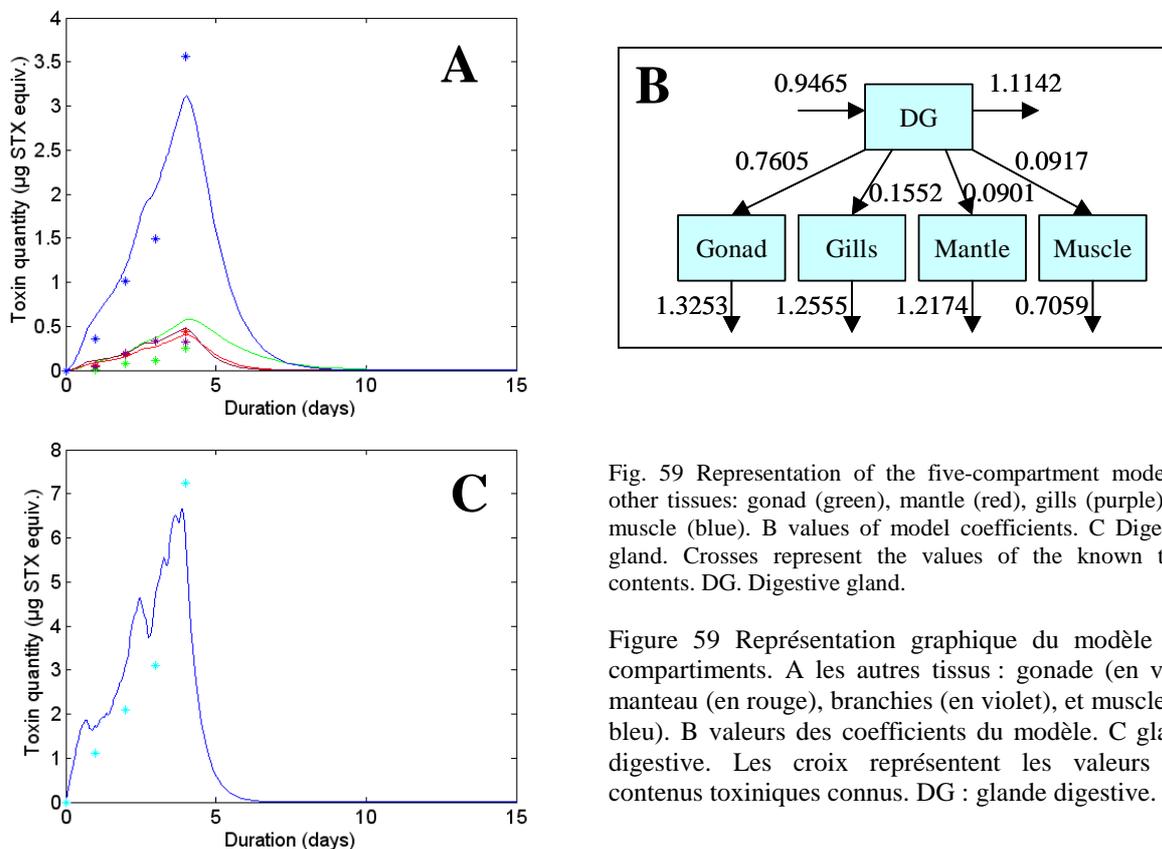


Fig. 59 Representation of the five-compartment model. A other tissues: gonad (green), mantle (red), gills (purple) and muscle (blue). B values of model coefficients. C Digestive gland. Crosses represent the values of the known toxin contents. DG. Digestive gland.

Figure 59 Représentation graphique du modèle à 5 compartiments. A les autres tissus : gonade (en vert), manteau (en rouge), branchies (en violet), et muscle (en bleu). B valeurs des coefficients du modèle. C glande digestive. Les croix représentent les valeurs des contenus toxiques connus. DG : glande digestive.

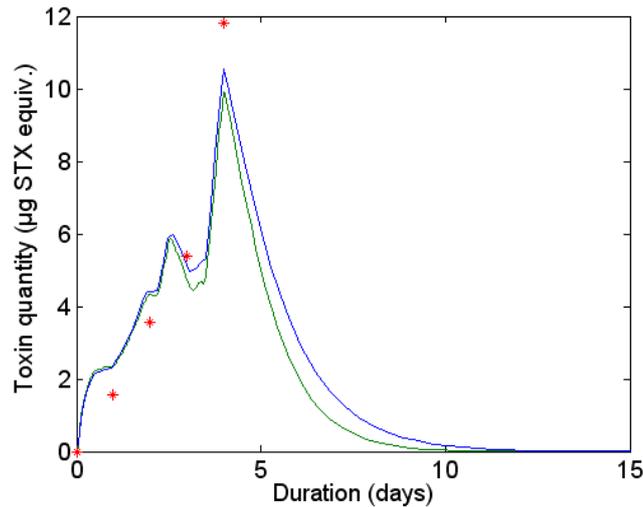


Fig. 60 Comparison of the total toxin quantity evolution in the total flesh modeled with the two-compartment model ( Fig. 58; green ; sse = 12.0647) and from the five-compartment model (Fig. 59, blue, sse = 10.370). Crosses represent the values of the known toxin contents.

Figure 60 Comparaison de l'évolution de la quantité totale de toxine dans la chair totale simulé avec le modèle à deux compartiments (Fig. 58; en vert ; sse = 12,0647) et avec le modèle à cinq compartiments (Fig. 59, en bleu, sse = 10,370). Les croix représentent les valeurs des contenus toxiniques connus.

### 1<sup>er</sup> essai de validation sur les données de contamination des huîtres triploïdes du mois de novembre à partir du modèle du mois de juin (expériences réalisées dans le chapitre 3-1)

Le modèle à cinq compartiments défini à partir des données obtenues sur les triploïdes du mois de juin est testé sur les données des triploïdes du mois de novembre (Fig. 61). Ce modèle permet de bien modéliser la cinétique de contamination de la glande digestive (Fig. 61 B). Cependant, la quantité de toxines dans le muscle et les branchies est légèrement surestimée contrairement à la quantité de toxines dans le manteau (Fig. 61 A). Pour ce qui concerne la gonade, le modèle surestime de façon très importante les valeurs observées de contenu toxinique (Fig. 61 A). Le modèle semble donc modéliser correctement la glande digestive mais présente plus de difficultés à simuler les quantités de toxines dans les autres tissus. Cependant, la toxicité globale suit relativement bien les valeurs de quantité de toxines analysées (sse = 74,93). Le modèle s'écarte principalement des valeurs observées aux jours 2 (sse=44,37) et 3 (sse=26,16). L'écart observé au jour trois est principalement dû à la quantité de toxines dans la gonade qui est très largement surestimée.

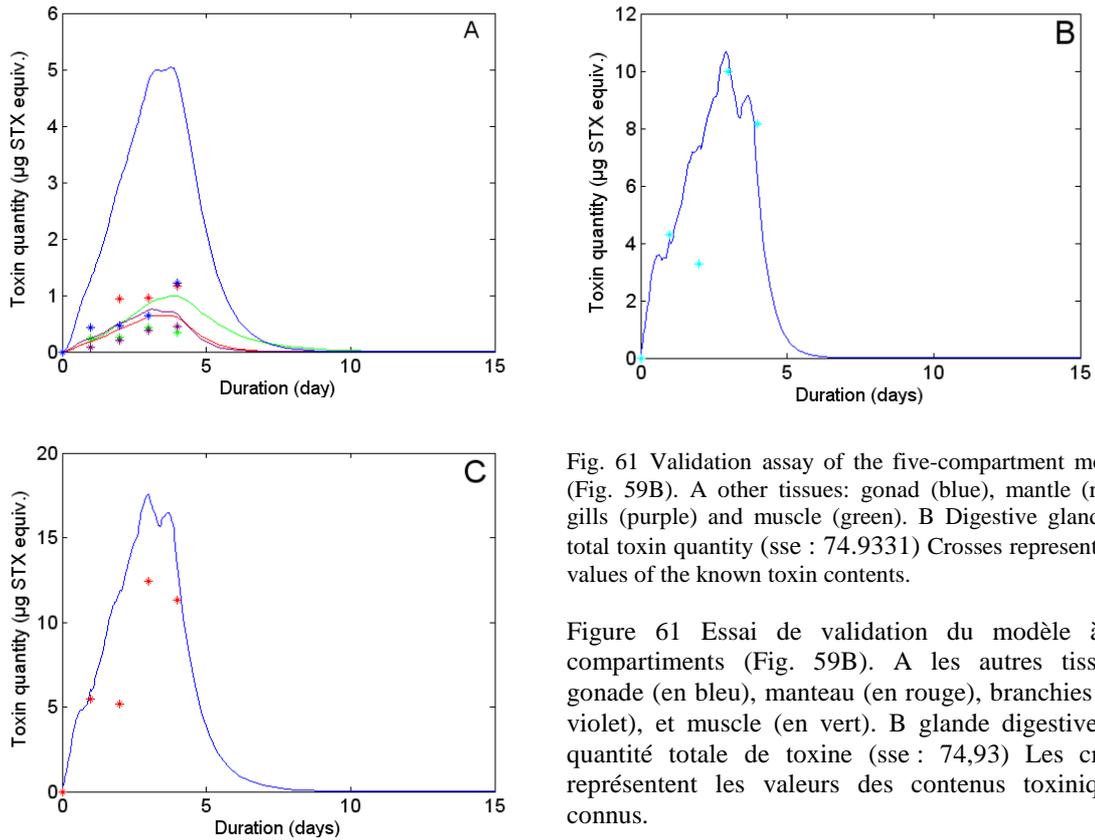


Fig. 61 Validation assay of the five-compartment model (Fig. 59B). A other tissues: gonad (blue), mantle (red), gills (purple) and muscle (green). B Digestive gland. C total toxin quantity (sse : 74.9331) Crosses represent the values of the known toxin contents.

Figure 61 Essai de validation du modèle à 5 compartiments (Fig. 59B). A les autres tissus : gonade (en bleu), manteau (en rouge), branchies (en violet), et muscle (en vert). B glande digestive. C quantité totale de toxine (sse : 74,93) Les croix représentent les valeurs des contenus toxiques connus.

Essai de validation sur les données de détoxification des huîtres triploïdes

Le modèle mis en place avec les données de contamination des triploïdes du mois de juin (expériences réalisées dans le chapitre 3-1 ; Fig. 59) a été appliqué aux deux jeux de données de détoxification d’huîtres triploïdes nourries avec 2 000 cellules mL<sup>-1</sup> de *Skeletonema costatum*. Nous ne disposons que des contenus toxiques et des masses de glande digestive et des autres tissus pour ces deux jeux de données. Les valeurs moyennes d’importance relative de la toxicité de chaque tissu par rapport au contenu toxique global ont été établies dans le chapitre 2-partie 2 –I et ont donc été choisies pour déterminer la valeur initiale de la quantité de toxines dans les différents tissus. Muscle, manteau, branchies et gonade correspondent respectivement à 5,7%, 31,4%, 17,1% et 45,7% de la toxicité des autres tissus.

Les simulations réalisées sur les données de détoxifications ne suivent pas la détoxification réelle observée. La détoxification de la glande digestive est beaucoup trop rapide lors de la simulation par rapport aux valeurs observées (Figure 62A et 63A) sur les deux jeux de données. En ce qui concerne l’évolution de la quantité globale de toxines dans les autres tissus, on constate une augmentation le premier jour puis une détoxification très rapidement (Figure 62A et 63A). Pour tous les tissus autres que la glande digestive, la quantité de toxines est, au minimum, doublée lors du premier jour de détoxification (Figures 62B et 63B).

Le modèle à cinq compartiments mis en place à partir des données de contamination ne semble pas applicable (avec ce jeu de paramètres) aux données de détoxification. Ceci laisse donc penser qu'il est nécessaire de posséder un jeu de données couvrant la contamination et la détoxification pour pouvoir vérifier que les jeux de paramètres et les processus associés sont les mêmes qu'en détoxification.

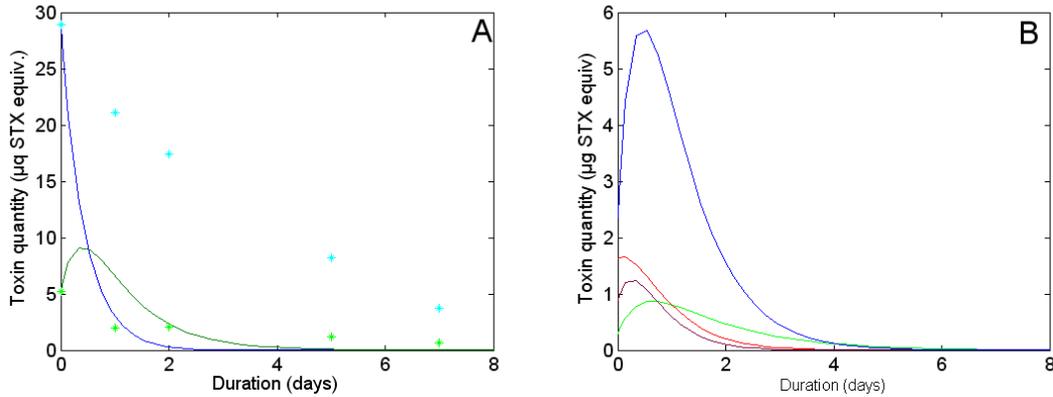


Fig. 62 First validation assay of the model of triploid contamination when using detoxification data. A Variation of toxin quantity in function of the time. B kinetics of the different tissues: muscle (green), mantle (red), gills (purple) and gonad (in blue). Crosses represent the values of the known toxin contents.

Figure 62 Premier essai de validation du modèle mis en place sur les données de contamination d'huîtres triploïdes sur les données de détoxification. A Variation de la quantité de toxines en fonction du temps dans la glande digestive (en bleu) et dans les autres tissus (en vert). B cinétiques des différents tissus : muscle (en vert), manteau (en rouge), branchies (en mauve) et gonade (en bleu). Les croix représentent les valeurs des contenus toxiniques connus.

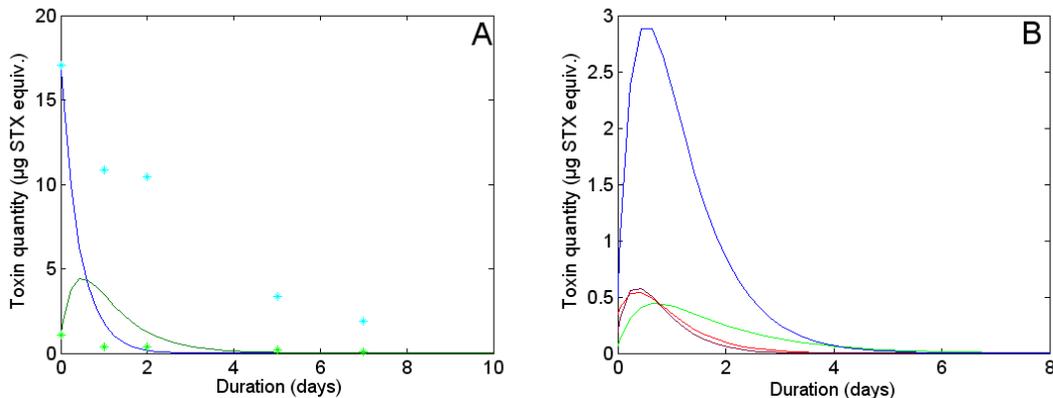


Fig. 63 Second validation assay of the model of triploid contamination data when using detoxification data. A Variation of toxin quantity in function of the time. B kinetics of the different tissues: muscle (green), mantle (red), gills (purple) and gonad (in blue). Crosses represent the values of the known toxin contents.

Figure 63 Second essai de validation avec le second jeu de données du modèle mis en place sur les données de contamination d'huîtres triploïdes sur des données de détoxification. A Variation de la quantité de toxines en fonction du temps dans la glande digestive (en bleu) et dans les autres tissus (en vert). B cinétiques des différents tissus : muscle (en vert), manteau (en rouge), branchies (en mauve) et gonade (en bleu).

Globalement, le modèle à deux compartiments est très proche des résultats obtenus avec un modèle à cinq compartiments. Au vu des incertitudes dans les mesures des quantités

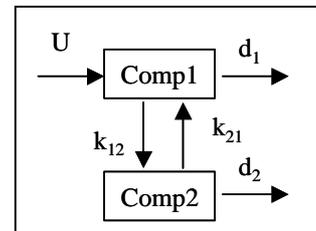
de toxines et du  $Q_{tox}$ , on peut donc en déduire que la mise en place d'un modèle à deux compartiments est suffisante pour traduire les cinétiques de contamination et détoxification des huîtres contenant des toxines PSP.

### 3.2.3 Etudes des modèles à deux compartiments

Dans les simulations des modèles à deux compartiments précédents, le premier compartiment a été déterminé comme représentant la glande digestive et le second compartiment les autres tissus. Dans la littérature ces deux compartiments sont fréquemment déterminés comme représentant les toxines libres pour le premier compartiment et comme les toxines dites « liées » pour le second (Bricelj & Shumway 1998a, Silvert et al. 1998). Il n'est pas possible de différencier les toxines libres des toxines dites « liées » lors des analyses chimiques, l'unique donnée mesurable est donc le contenu toxinique global (toxines libres + toxines fixées). Plusieurs structures de modèles à deux compartiments sont proposées, nous allons étudier ce qu'on appelle l'identifiabilité en analyse des systèmes (Walter 1982), de ces modèles dans le cadre des modèles prenant en compte les toxines libres et liées.

❖ Soit le modèle générique à deux compartiments suivants :

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dC_1}{dt} = U - (d_1 + k_{1-2})C_1 + k_{2-1}d_2 \\ \frac{dC_2}{dt} = k_{1-2}C_1 - (d_2 + k_{2-1})C_2 \\ y = C_1 + C_2 \end{array} \right.$$



On cherche à connaître l'**identifiabilité** de ce modèle. Donnée qui va nous permettre de choisir une structure de modèle adaptée aux données disponibles et de réfléchir sur le sens à donner aux deux compartiments notamment si les paramètres de ces modèles sont ensuite associés à des moyens d'action sur les cinétiques. On va donc chercher à savoir si  $d_1$ ,  $d_2$ ,  $k_{1-2}$  et  $k_{2-1}$  possèdent une solution mathématique unique.

On cherche à écrire notre système sous la forme :  $\ddot{y} + \alpha\dot{y} + \beta y = \gamma\dot{U} + \delta U$

avec  $U$  l'entrée de notre système et  $y = C_1 + C_2$  la sortie.  $\dot{y}$  désigne  $\frac{\delta y}{\delta t}$ ,  $\ddot{y} = \frac{\partial^2 y}{\partial t^2}$  ...

On obtient alors :

$$\frac{\partial^2 y}{\partial t^2} + (d_1 + d_2 + k_{12} + k_{21}) \frac{\partial y}{\partial t} + [d_1(d_2 + k_{21}) + d_2 k_{12}] y = \frac{\partial U}{\partial t} + U(d_2 + k_{12} + k_{21})$$

On cherche donc à résoudre :

$$\begin{cases} \tilde{d}_2 + \tilde{k}_{12} + \tilde{k}_{21} = \hat{d}_2 + \hat{k}_{12} + \hat{k}_{21} \\ \tilde{d}_1 + \tilde{d}_2 + \tilde{k}_{12} + \tilde{k}_{21} = \hat{d}_1 + \hat{d}_2 + \hat{k}_{12} + \hat{k}_{21} \\ \tilde{d}_1(\tilde{d}_2 + \tilde{k}_{21}) + \tilde{d}_2 \tilde{k}_{12} = \hat{d}_1(\hat{d}_2 + \hat{k}_{21}) + \hat{d}_2 \hat{k}_{12} \end{cases}$$

$\tilde{d}_1, \tilde{d}_2, \tilde{k}_{12}, \tilde{k}_{21}$  et  $\hat{d}_1, \hat{d}_2, \hat{k}_{12}, \hat{k}_{21}$  désigne deux jeux de paramètres.

Dans ce cas on ne dispose que de trois équations pour quatre inconnues, il est donc impossible de déterminer de façon unique les coefficients  $d_1, d_2, k_{1-2}$  et  $k_{2-1}$ . Les coefficients de ce modèle ne sont donc pas identifiables. Le modèle générique précédent peut être simplifié de plusieurs façons afin de réduire le nombre de coefficients à rechercher à trois ou deux. Les différents modèles définissables sont donnés dans la figure 64.

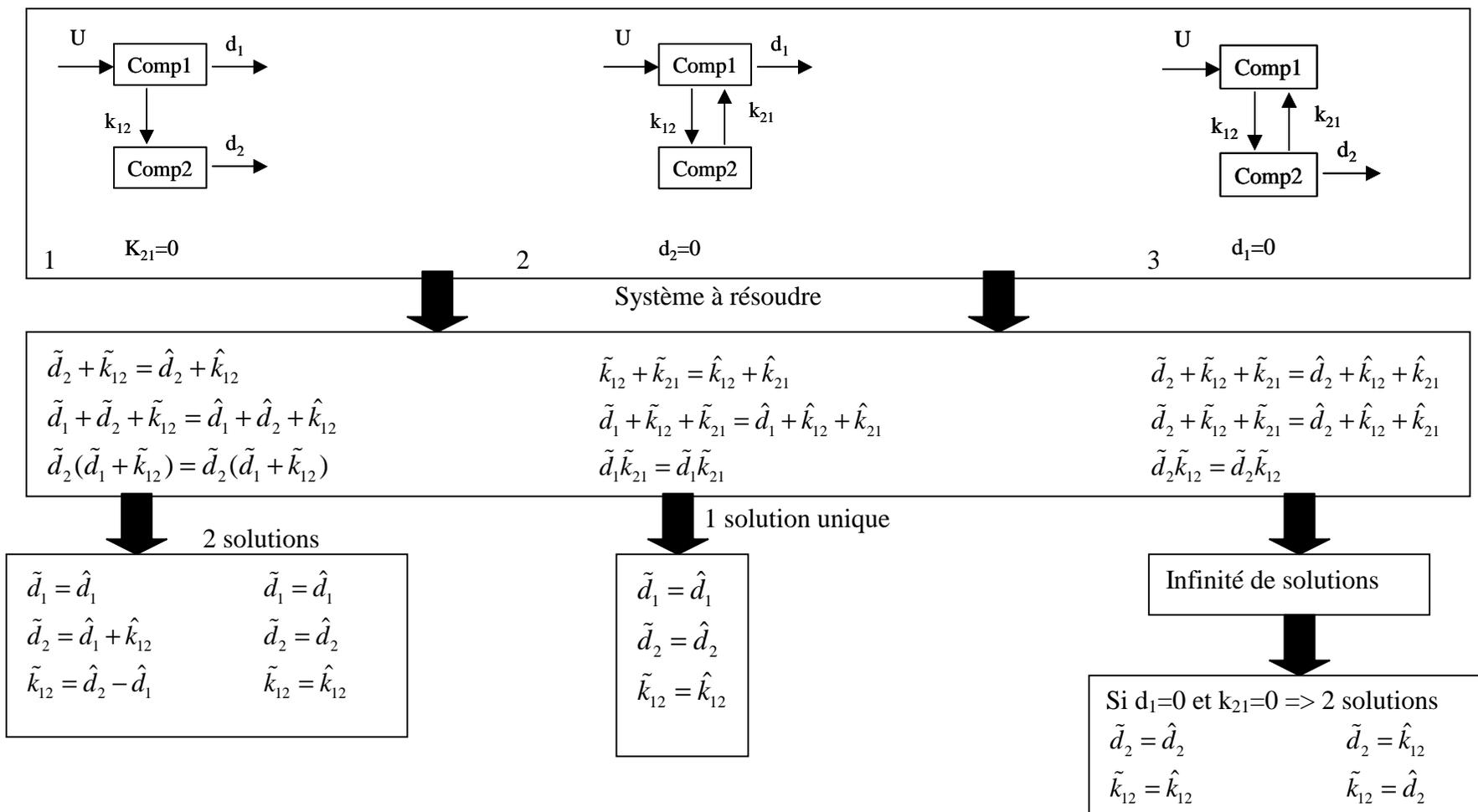


Fig. 64 Different two-compartment models with their solutions.

Figure 64 Différents modèles à deux compartiments avec leurs solutions

Le modèle deux (Fig. 63) semble donc le modèle le mieux adapté pour identifier les coefficients  $d_1$ ,  $k_{1-2}$  et  $k_{2-1}$  d'un point de vu mathématique. Cependant, lorsqu'on cherche à estimer les coefficients, très souvent de nombreux jeux de données peuvent convenir. En effet, si l'on observe les données publiées par Silvert et al. (1995), il est remarquable que pour un même jeu de données (Fig. 65), on puisse obtenir des jeux de coefficients différents qui donnent globalement une toxicité totale très proche. Cependant, les cinétiques des toxines libres et liées peuvent sous certaines conditions de simulation s'avérer différentes. Or nous ne pouvons pas mesurer la quantité de toxines libres et totales, il est donc difficile de réellement trancher pour un jeu de paramètre plutôt qu'un autre car nous ne connaissons pas le devenir des toxines libres par rapport aux toxines liées.

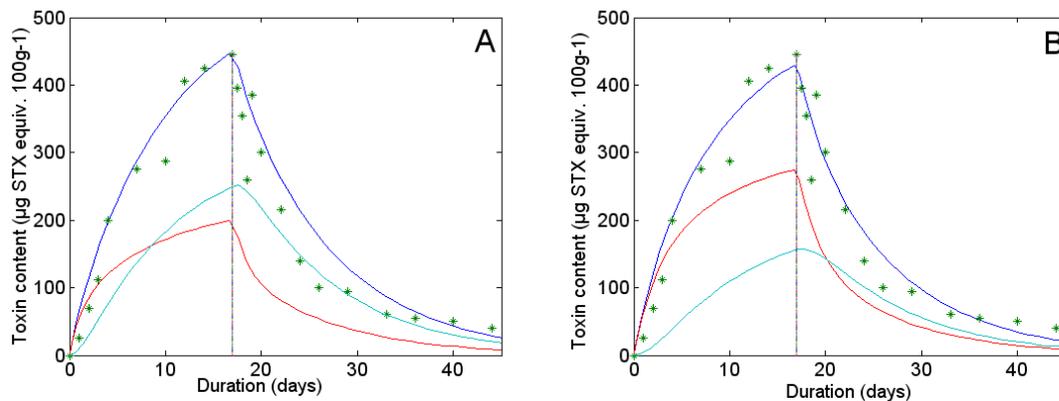


Fig. 65 Contamination and detoxification kinetics of *Perna viridis* by PSP toxins from Silvert et al. (1995) data. Kinetics of total toxin content (dark blue), free toxins (red) and bound toxins (bleu clair) (A)  $k_1=0.3267$  ;  $T_{1-2} = 0.3482$  ;  $T_{2-1}=0.2539$  et  $sse= 27,932$  (B)  $k_1=0.2432$  ;  $T_{1-2} = 0.1296$   $T_{2-1} =0.1989$  et  $sse= 27,982$ . Crosses represent the values of the known toxin contents.

Figure 65 Cinétiques de contamination et détoxification de *Perna viridis* par des toxines PSP d'après les données de Silvert et al. (1995). Cinétique du contenu toxinique total (bleu foncé), des toxines libres (en rouge) et des toxines liées (en bleu clair) (A)  $k_1=0.3267$  ;  $T_{1-2} = 0.3482$  ;  $T_{2-1}=0.2539$  et  $sse= 27 932$  (B)  $k_1=0.2432$  ;  $T_{1-2} = 0.1296$   $T_{2-1}=0.1989$  et  $sse= 27 982$ . Les croix représentent les valeurs des contenus toxiques connus.

De plus le modèle apparaît structurellement globalement indiscernable du modèle 1.

En effet, il existe une solution du système d'équations suivant :

$$\begin{cases} \tilde{d}_1 + \tilde{k}_{12} + \tilde{k}_{21} = \hat{k}_{12} + \hat{d}_2 + \hat{d}_1 \\ \tilde{d}_1 \tilde{k}_{12} = \hat{d}_2 (\hat{k}_{12} + \hat{d}_1) \\ \tilde{k}_{21} + \tilde{k}_{12} = \hat{d}_2 + \hat{k}_{12} \end{cases} \Rightarrow \begin{cases} \tilde{d}_1 = \hat{d}_1 \\ \tilde{k}_{12} = \frac{\hat{d}_2}{\hat{d}_1} (\hat{k}_{12} + \hat{d}_1) \\ \tilde{k}_{21} = \hat{d}_2 + \hat{k}_{12} - \frac{\hat{d}_2}{\hat{d}_1} (\hat{k}_{12} + \hat{d}_1) \end{cases}$$

Et deux solutions au système suivant :

$$\begin{cases} \tilde{k}_{12} + \tilde{d}_2 + \tilde{d}_1 = \hat{d}_1 + \hat{k}_{12} + \hat{k}_{21} \\ \tilde{d}_2(\tilde{k}_{12} + \tilde{d}_1) = \hat{d}_1 \hat{k}_{12} \\ \tilde{d}_2 + \tilde{k}_{12} = \hat{k}_{21} + \hat{k}_{12} \end{cases}$$

Les solutions analytiques obtenues avec la fonction « solve » de Matlab 6.5 sont fournies en annexe 3. A partir du jeu de paramètres :  $k_1=0,3267$  ;  $T_{1-2} = 0,3482$  ;  $T_{2-1}=0,2539$  estimé à partir des données de Silvert et al. (1995), on obtient donc deux jeux de paramètres qui fournissent le même comportement entrée/sortie. L'un des deux jeux de paramètres présent des coefficients négatifs ce qui n'est pas biologiquement plausible. On va donc s'intéresser uniquement au second jeu de paramètres ( $k_1=0,3267$  ;  $T_{1-2} = 0,5020$  ;  $T_{2-1} = 0,1001$ ) et le comparer avec le modèle précédemment établi (Fig. 66).

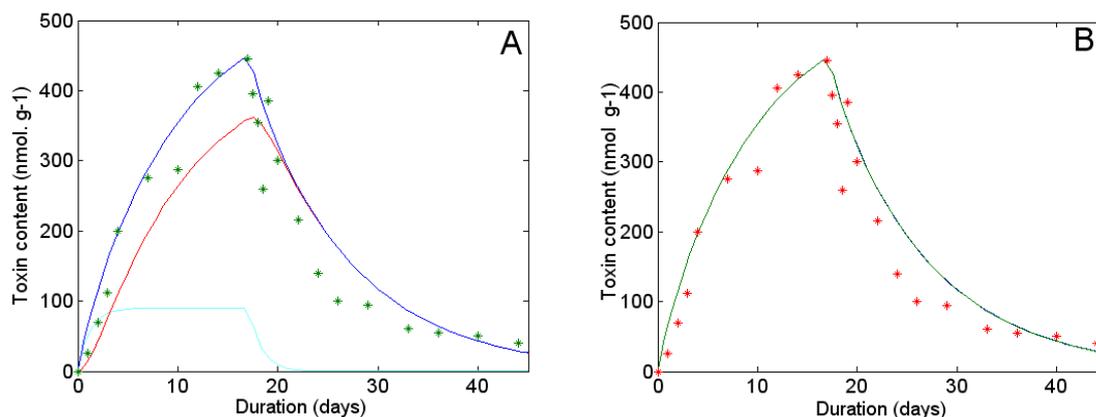


Fig. 66 (A) Contamination and detoxification kinetics of *Perna viridis* by PSP toxins from Silvert et al. (1995) data. Kinetics of total toxin content (dark blue), free toxins (red) and bound toxins (bleu clair)  $k_1=0.3267$  ;  $T_{1-2} = 0.5020$  ;  $k_2=0.1001$  (B) Comparison between the last model (green) and the model in the figure 65 A (bleu) Crosses represent the values of the known toxin contents.

Figure 66 (A) Cinétique de contamination et de détoxification de *Perna viridis* par des toxines PSP. Cinétiques du contenu toxinique global (bleu foncé), des toxines libres (en rouge) et des toxines liées (en bleu clair)  $k_1=0.3267$  ;  $T_{1-2} = 0.5020$  ;  $k_2=0.1001$ . (B) comparaison du modèle précédemment décrit (en vert) et du modèle de la figure 65 A (en bleu). Les croix représentent les valeurs des contenus toxiques connus.

Il est donc compliqué de discriminer la structure ainsi que les paramètres du modèle lorsque l'on assimile les deux compartiments à des toxines sous forme libre et liée. Lorsque l'on considère les deux compartiments comme représentant la glande digestive et les autres tissus le problème ne se pose pas dès lors que l'on dispose d'au moins une valeur de la quantité de toxine dans la glande digestive et des autres tissus, en plus de la toxicité globale.

### 3.3 Discussion

Les observations sur les modèles mis en place permettent de mettre en évidence que la prise en compte de l'influence de l'estomac et de l'intestin n'est pas nécessaire dans le cas des toxines PSP dans l'huître. Les vitesses de transfert des toxines dans ces deux organes sont beaucoup plus rapides que la cinétique globale de la toxine dans l'organisme entier. L'estomac et l'intestin ne sont pas pour autant des modèles inutiles en bioaccumulation / dépuration, car ils pourraient être utilisés notamment dans la modélisation de la cinétique d'accumulation et d'élimination des bactéries dans les huîtres, qui ne font que transiter de la bouche vers l'anus, sans entrer dans les autres organes.

De plus, la prise en compte des différents tissus dans la cinétique de contamination / détoxification des PSP dans l'huître ne permet pas d'améliorer nettement le modèle comparé à un modèle à 2 compartiments (du type glande digestive et autres tissus). Ceci peut s'expliquer par l'importance de la toxicité de la glande digestive par rapport aux autres tissus. Un modèle à deux compartiments semble donc à privilégier dans le cas des toxines PSP dans les huîtres. Par ailleurs, il est utile de noter que la prise en compte d'un modèle à deux compartiments du type forme libre et liée des toxines présente des limites dans l'identification paramétrique. Il est donc important d'identifier ces deux compartiments comme des entités mesurables, ce qui rendra plus facile, l'identification de la structure et des paramètres du modèle.

Le modèle à cinq compartiments établi avec des données de contamination uniquement n'a pas été validé avec les données de détoxification. Ce résultat permet d'envisager que les cinétiques de contamination et détoxification sont peut être différentes. La réponse à cette question ne pourra être apportée qu'avec des jeux de données complets en contamination et en détoxification. Ces observations concourent à indiquer que l'hypothèse initiale (les coefficients lors de la contamination et de la décontamination sont les mêmes) est probablement fausse. De fait, certains auteurs considèrent que les coefficients sont les mêmes en condition de contamination comme de détoxification (Blanco et al. 2003), alors que d'autres considèrent l'inverse (Li et al. 2005, Yu et al. 2007).

En ce qui concerne l'entrée imposée ( $Q_{tox}$ ), un début de travail a été mené par Baron et al. (2008) sur la formalisation non linéaire du  $Q_{tox}$ . Ce travail doit être poursuivi pour s'affranchir de la mesure du  $Q_{tox}$  et aboutir à la mise en place d'un modèle prédictif de la dynamique de la contamination/ détoxification des toxines PSP dans les huîtres.

En conclusion, le modèle à deux compartiments (glande digestive et autres tissus) semble à ce stade, le mieux adapté pour décrire la cinétique d'accumulation et de détoxification des mollusques contenant des phycotoxines.

Observations on implemented models underline the fact that considering stomach and intestine influence is not necessary in the case of PSP-contaminated oyster. Toxins transfer speeds in these two organs are much faster than global toxin kinetics in the whole body. However, stomach and intestine are not useless models when studying bioaccumulation / depuration pathways: they could be used, for instance, to model bacteria accumulation and elimination by oysters, since bacteria are only passing from the mouth towards the anus, without penetrating in the other organs.

Furthermore, the consideration of the different tissues in PSP toxins contamination / detoxification kinetics in the oyster does not allow to sharply improve the model when compared with a two-compartment model (of the “digestive gland and the other tissues” type). Very high toxicity levels in the digestive gland in comparison with other tissues can be a possible explanation. A two-compartment model therefore seems to be favoured in the case of PSP toxins in oysters. Besides, it is useful to note that a two-compartment model considering free and bound toxins is somewhat risky due to limited parametric identification. Thus it is important to identify these two compartments as measurable entities, what will make easier identification of the structure parameters of the model.

Five-compartment model established only with contamination data was not validated with the detoxification data. This result drives us to consider that contamination and detoxification kinetics might be different. The answer to this question can be brought only with complete contamination and detoxification datasets. These observations would indicate that the initial hypothesis (coefficients during contamination and detoxification are the same) is probably wrong. By the way, some authors consider these coefficients are the same (Blanco et al. 2003), while some others not (Li et al. 2005, Yu et al. 2007).

Regarding the imposed input ( $Q_{tox}$ ), a preliminary work on the non linear formalization of  $Q_{tox}$  has been undertaken by Baron et al. (2008). This work should be carried on in such a way that  $Q_{tox}$  measure will no longer be needed and that a predictive model of PSP toxins contamination / detoxification will be set up for oysters.

To conclude, up to now the two-compartment model (digestive gland and other tissues) seems to be quite appropriate adapted, or even the best one, to describe phycotoxins accumulation and detoxification kinetics in molluscs.

## 4 Modèle prenant en compte les biotransformations

### 4.1 Les toxines paralysantes

Les biotransformations des toxines PSP dans les mollusques sont dues aux conditions physico-chimiques, aux enzymes et aux bactéries naturellement présentes dans le mollusque (Sato et al. 2000, Smith et al. 2001). Par exemple, *Placopecten magellanicus* va transformer les gonyautoxines en saxitoxines ou néo-saxitoxines sous l'action d'enzymes et grâce à la participation de certaines bactéries (Sato et al. 2000).

Ce phénomène est observé aussi bien pendant les phases de contamination que de détoxification (Oshima 1995, Smith et al. 2001). La toxicité relative des toxines paralysantes doit intégrer tous les composés présents car ceux-ci possèdent des toxicités différentes (Fig. 67). Le contenu toxinique des mollusques bivalves est exprimé en équivalent saxitoxine grâce à un coefficient de conversion propre à chaque composé, déterminé par Oshima (1995). Les biotransformations vers des composés moins toxiques, lors de la détoxification, vont accélérer cette cinétique ; au contraire, les biotransformations qui vont donner des composés plus toxiques vont ralentir la cinétique de détoxification. Il semble donc nécessaire de tenir compte de l'évolution relative entre ces composés dans le cadre de l'étude de la cinétique d'accumulation et d'élimination du contenu toxinique des mollusques bivalves.

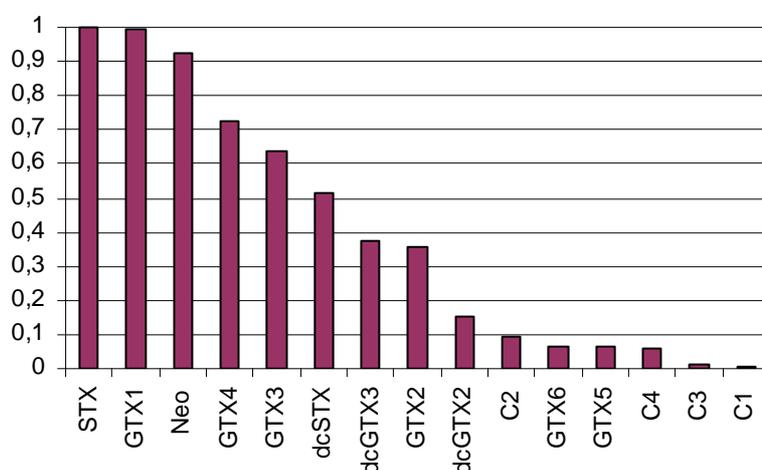


Fig. 67 Conversion coefficient of the different saxitoxin analogues. STX : saxitoxin, GTX : gonyautoxin, Neo : neosaxitoxin, dc decarbamoyl, C toxin C.

Figure 67 Coefficients de conversion des différents analogues de la saxitoxine. STX : saxitoxine, GTX : gonyautoxine, Neo : neosaxitoxine, dc décarbamoyle, C toxine C.

Le siège privilégié des biotransformations est l'estomac et la glande digestive (Lin et al. 2004, Fast et al. 2006). Chez *Protothaca staminea* les biotransformations *in vitro* ont principalement lieu dans les tissus de la glande digestive, puis des branchies, et enfin du manteau et du muscle adducteur, très peu de biotransformations ayant lieu dans le siphon (Fast et al. 2006). De même, les carbomyolases de *Macra chinensis* sont principalement situées dans le stylet cristallin et dans la glande digestive (Lin et al. 2004).

Il existe de grandes différences dans les capacités de biotransformations entre les mollusques (Lin et al. 2004). En effet, les ormeaux *Haliotis midae* possèdent une forte capacité de biotransformation (Pitcher et al. 2001) contrairement à *Mytilus edulis* et *Crassostrea gigas* (Jaime et al. 2007). D'après les biotransformations décrites dans le chapitre 1, un schéma global résumant les différentes transformations a été mis en place (Fig. 68).

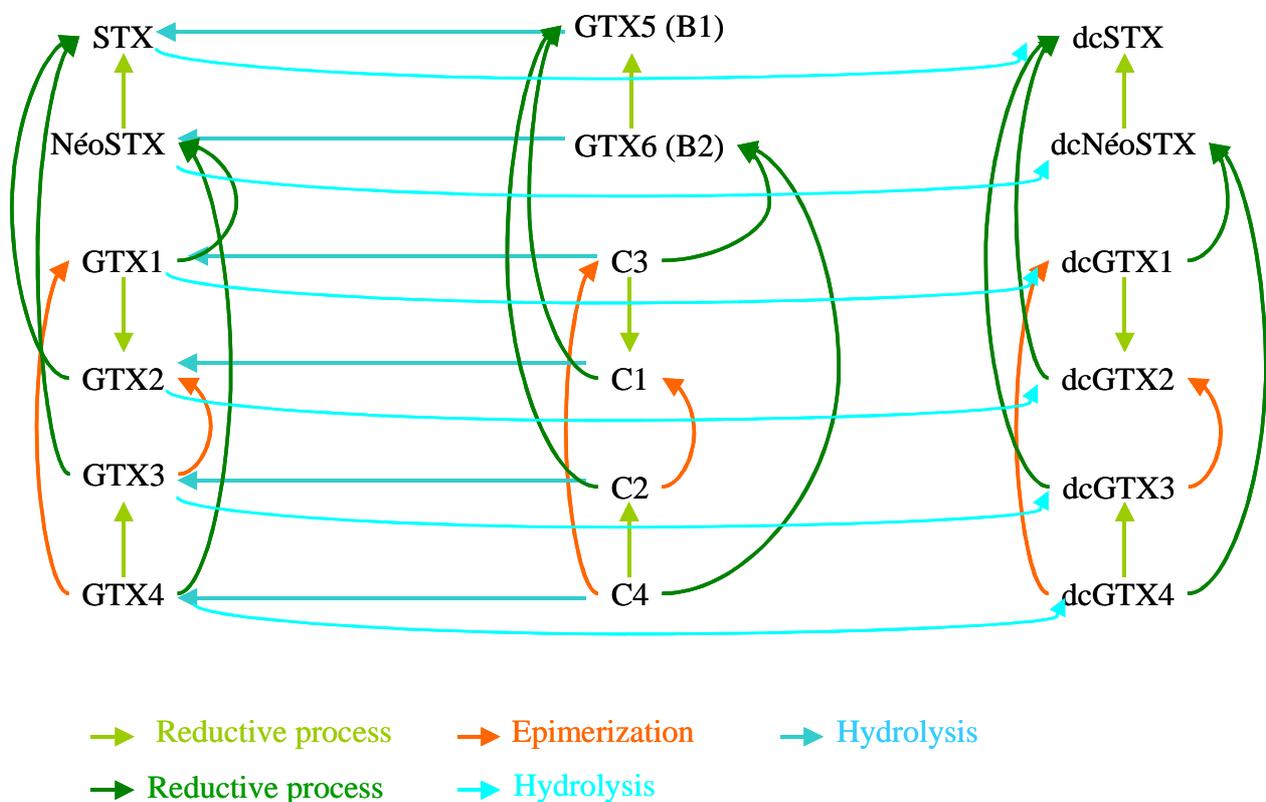


Fig. 68 Diagram taking back biotransformations described by Oshima. GTX: gonyautoxins, dc: décarbamoyle, STX: saxitoxin, C: toxine C.

Figure 68 Diagramme reprenant les biotransformations possibles décrites par Oshima (1995). GTX : gonyautoxines, dc : décarbamoyle, STX : saxitoxine, C : toxine C.

Les vitesses d'épimérisation sont fonction de la température et du pH. Ces vitesses dépendent également du ratio entre les épimères  $\beta$  et  $\alpha$ . Il se forme un équilibre entre ces deux formes correspondant à 1:3 ( $\beta$ : $\alpha$ ) chez tous les mollusques. L'une des expressions mathématiques la plus simple pour décrire ces observations est de la forme :

$$E_{\max a \rightarrow b} = E_{\max a \rightarrow b}(pH, temp)^* \times \left(1 - \frac{1/3}{b/a}\right)$$

Avec : -  $E_{\max a \rightarrow b}(pH, temp)^*$  la vitesse d'épimérisation maximale qui varie en fonction du pH et de la température ;

- b la concentration en composé b ;
- a la concentration en composé a.

De même, les vitesses de réduction et d'hydrolyse sont dépendantes de la température et du pH, on peut donc en déduire le modèle générique présenté en annexe 4.

A l'heure actuelle, peu d'études ont été réalisées sur les huîtres *Crassostrea gigas* et les toxines paralysantes. L'une d'entre elle a consisté à incuber de la glande digestive de *Crassostrea gigas* avec de la STX pendant 24h. A l'issue de cette opération, il n'y a pas eu de formation de dc-STX (Artigas et al. 2007). L'huître ne présenterait donc pas d'activité carbamoyle contrairement à certains bivalves comme *Protothaca staminea* et *Spisula solidissima* en Amérique du Nord et *Macra chinensis* ou *Peronidia venulosa* au Japon (Artigas et al. 2007). De plus, les huîtres *Crassostra gigas* incubées avec de la GTX1, 4, 2, 3 et des C1, 2 présentent une diminution de chaque composé d'environ 10% (Lin et al. 2004).

L'étude de l'importance des biotransformations des toxines paralysantes par le biais de la modélisation sera étudiée lors de la détoxification de la glande digestive dans un premier temps, puis dans les autres tissus de l'huître *Crassostrea gigas* dans un second temps.

#### 4.1.1 Modélisation

Les jeux de données de détoxification, correspondent dans un premier temps, à des huîtres contaminées avec de l'*Alexandrium minutum* (AM89BM). Les composés toxiques suivant : C1, C2, GTX2, GTX3, dcGTX3 et dcGTX2 ont été identifiés chez cette microalgue par chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur de fluorescence d'après la méthode d'Oshima (1995). Le même profil a été observé pour chaque expérience dans les tissus des huîtres. Le diagramme prenant en compte les principaux composés et les biotransformations (Fig. 68) peut être simplifié par rapport aux données observées (Fig. 69).

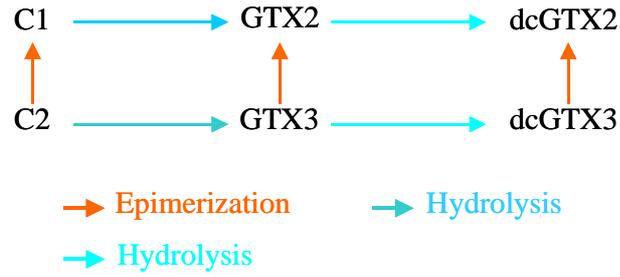


Fig. 69 Simplified diagram of biotransformations according to the presence of toxins in the microalgae *Alexandrium minutum* and in the oyster *Crassostrea gigas*.

Figure 69 Diagramme simplifié des biotransformations en fonction des toxines présentes dans la microalgue *Alexandrium minutum* et dans les huîtres *Crassostrea gigas*.

A partir de la figure 69, il est possible d'en déduire un modèle mathématique correspondant aux biotransformations se déroulant dans la glande digestive:

$$\frac{d[C1]}{dt} = a \times I \times [C1]_m + E_{C2 \rightarrow C1} [C2] - \left( H_{C1 \rightarrow GTX2} + k_{C1} + \frac{dP}{dt} \right) [C1]$$

$$\frac{d[C2]}{dt} = a \times I \times [C2]_m - \left( E_{C2 \rightarrow C1} + H_{C2 \rightarrow GTX3} + k_{C2} + \frac{dP}{dt} \right) [C2]$$

$$\frac{d[GTX2]}{dt} = a \times I \times [GTX2]_m + H_{C1 \rightarrow GTX2} [C1] + E_{GTX3 \rightarrow GTX2} [GTX3] - \left( H_{GTX2 \rightarrow dcGTX2} + k_{GTX2} + \frac{dP}{dt} \right) [GTX2]$$

$$\frac{d[GTX3]}{dt} = a \times I \times [GTX3]_m + H_{C2 \rightarrow GTX3} [C2] - \left( E_{GTX3 \rightarrow GTX2} + H_{GTX3 \rightarrow dcGTX3} + k_{GTX3} + \frac{dP}{dt} \right) [GTX3]$$

$$\frac{d[dcGTX2]}{dt} = a \times I \times [dcGTX2]_m + H_{GTX2 \rightarrow dcGTX2} [GTX2] + E_{dcGTX3 \rightarrow dcGTX2} [dcGTX3] - \left( k_{dcGTX2} + \frac{dP}{dt} \right) [dcGTX2]$$

$$\frac{d[dcGTX3]}{dt} = a \times I \times [dcGTX3]_m + H_{GTX3 \rightarrow dcGTX3} [GTX3] - \left( E_{dcGTX3 \rightarrow dcGTX2} + k_{dcGTX3} + \frac{dP}{dt} \right) [dcGTX3]$$

$$Tox = 0.3592 \times [GTX2] + 0.6379 \times [GTX3] + 0.0060 \times [C1] + 0.0963 \times [C2] + 0.1538 \times [dcGTX2] + 0.3766 \times [dcGTX3]$$

Avec :

- [A] : concentration en toxine A dans le mollusque en  $\mu\text{g}$  par 100g de chair humide
- $[A]_m$  : concentration en toxine A dans le milieu en  $\mu\text{g L}^{-1}$
- I : taux de filtration du mollusque en  $\text{L j}^{-1}$  par 100g de chair humide
- a : coefficient de rétention de la toxine dans le mollusque.

- $H_{a \rightarrow b}$  : hydrolyse du composé a vers b en  $d^{-1}$
- $E_{a \rightarrow b}$  : épimérisation du composé a vers b en  $d^{-1}$
- $k_a$  : coefficient de détoxification du composé a en  $d^{-1}$

$\frac{dP}{dt}$  : correspond à la variation du poids du mollusque ou de l'organe considéré au cours du temps.

#### 4.1.1.1 Modélisation des biotransformations dans la glande digestive

Le modèle précédemment décrit a été appliqué aux tissus de la glande digestive. Il est comparé à un modèle ne prenant pas en compte les biotransformations. Dans les jeux de données disponibles, seules les données de détoxification sont disponibles et par conséquent les entrées du modèle précédant sont nulles ( $a \times I \times [X]_m = 0$ ).

Les ajustements des modèles sont présentés dans les figures 70, 71 et 72. Les biotransformations entrant en jeu dans l'ajustement des coefficients (coefficient différent de zéro) ne sont pas toujours les mêmes dans les trois jeux de coefficients obtenus avec le modèle prenant en compte les biotransformations. Le premier essai prend en compte la réduction de C2 en GTX3 et l'épimérisation de GTX3 en GTX2 (Fig. 70E). Le deuxième essai prend en compte les trois épimérisations possibles (C2 en C1, GTX3 en GTX2 et dcGTX3 en dcGTX2 ; Fig. 71E). Le dernier essai fait apparaître l'épimérisation de GTX3 en GTX2 et de dcGTX3 en dcGTX2 ainsi que la réduction de GTX3 en dcGTX3.

La prise en compte des biotransformations des composés a permis d'améliorer le modèle par rapport à un modèle basé uniquement sur la détoxification des différents composés lors du deuxième ( $sse = 4,0624 \times 10^3$  contre  $sse = 6,1080 \times 10^3$ ; Fig. 71C) et troisième ajustement ( $sse = 6,7314 \times 10^4$  contre  $sse = 7,2780 \times 10^4$ ; Fig. 72C).

Les trois essais ont été réalisés sur des jeux de données correspondant à des expériences de détoxification qui ont été réalisées dans les mêmes conditions, c'est à dire des huîtres contaminées avec la même microalgue toxique *Alexandrium minutum* (donc avec les mêmes composés toxiques) puis détoxifiées avec un apport de 2 000 cellules  $mL^{-1}$  de *Skeletonema costatum*. Il semblerait donc normal de retrouver les mêmes biotransformations. Afin de confirmer le rôle des biotransformations pendant la cinétique de détoxification des différents composés, il a été mis en place un nouveau jeu de données rassemblant à la suite les

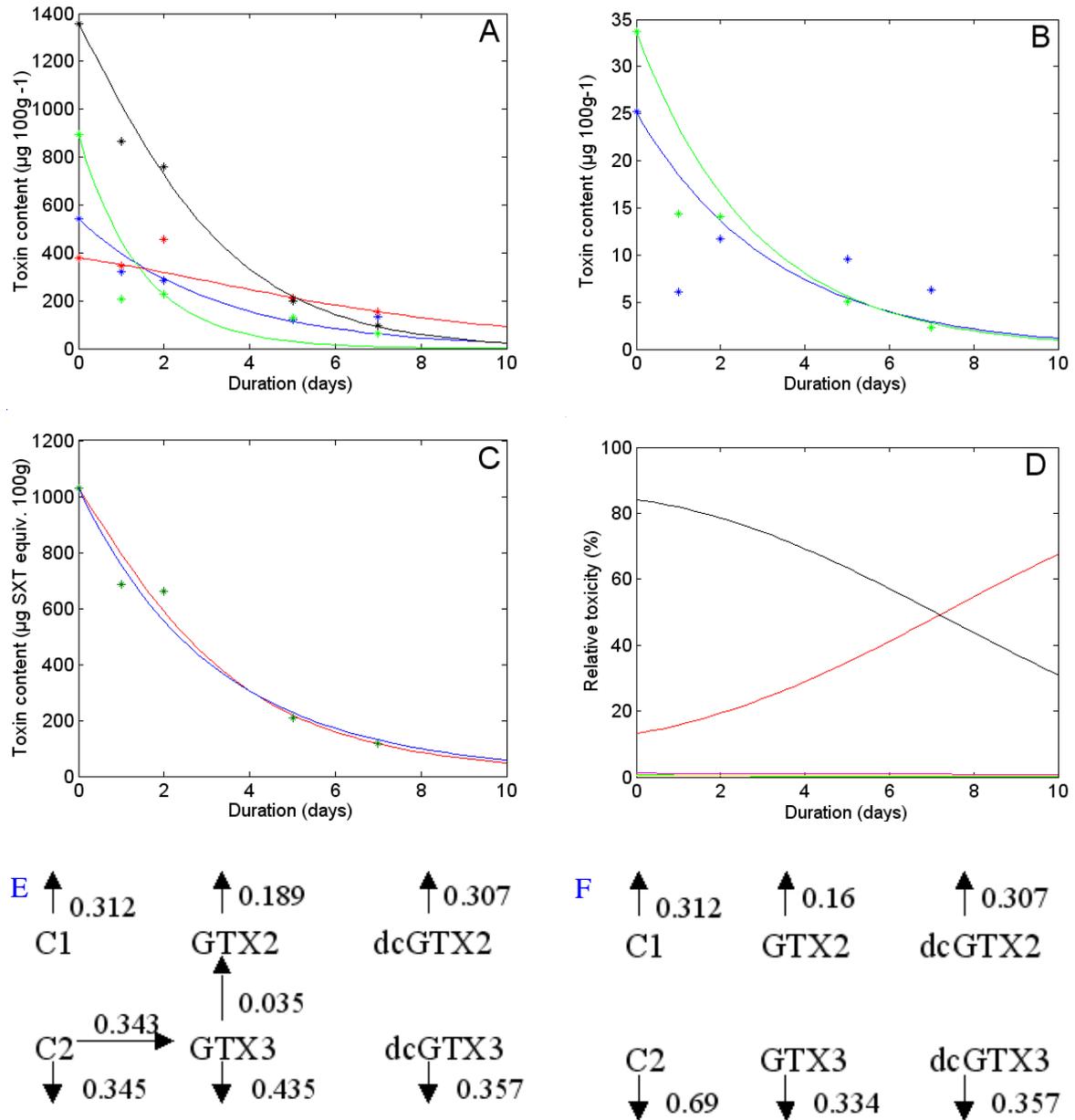


Fig. 70 First adjustment assay of the simplified model taking into account the biotransformations in the digestive gland. A- Detoxification kinetics of the compounds C1 (blue), C2 (green), GTX2 (red) and GTX3 (black). B- Detoxification kinetics of the compounds dcGTX2 (in blue) and dcGTX3 (in green). C- Detoxification kinetics comparison of the total toxin contents in digestive gland between the model taking into account the biotransformations (sse = 16 995) and the model not taking into account them (sse= 16 024) . D Relative importance of the different compound (C1 blue, C2 green, GTX2 red, GTX3 black, dcGTX2 yellow and dcGTX3 cyan) with regard to the toxin contents expressed in  $\mu\text{g STX equiv. per } 100 \text{ g}$  of digestive gland. D- Coefficient values of the model taking into account the biotransformations. E - Coefficient values of the model not taking into account the biotransformations. Crosses represent the values of the known toxin contents.

Figure 70 Premier essai d'ajustement du modèle simplifié prenant en compte les biotransformations dans la glande digestive. A- cinétique de détoxification de composés C1 (en bleu), C2 (en vert), GTX2 (en rouge) et GTX3 (en noir). B- cinétique de détoxification de composés dcGTX2 (en bleu) et dcGTX3 (en vert). C- comparaison de la cinétique de détoxification du contenu toxinique total dans la glande digestive entre le modèle prenant en compte les biotransformations (sse= 16 995) et le modèle ne les prenant pas en compte (sse=16 024). D- Importance relative des différents composés (C1 en bleu ; C2 en vert ; GTX2 en rouge ; GTX3 en noir ; dcGTX2 en jaune et dcGTX3 en cyan) par rapport au contenu toxinique exprimé en  $\mu\text{g } \text{éq. STX}$  par 100g de glande digestive. E- valeur des coefficients du modèle prenant en compte les biotransformations. F- valeur des coefficients du modèle ne prenant pas en compte les biotransformations. Les croix représentent les valeurs des contenus toxiques.

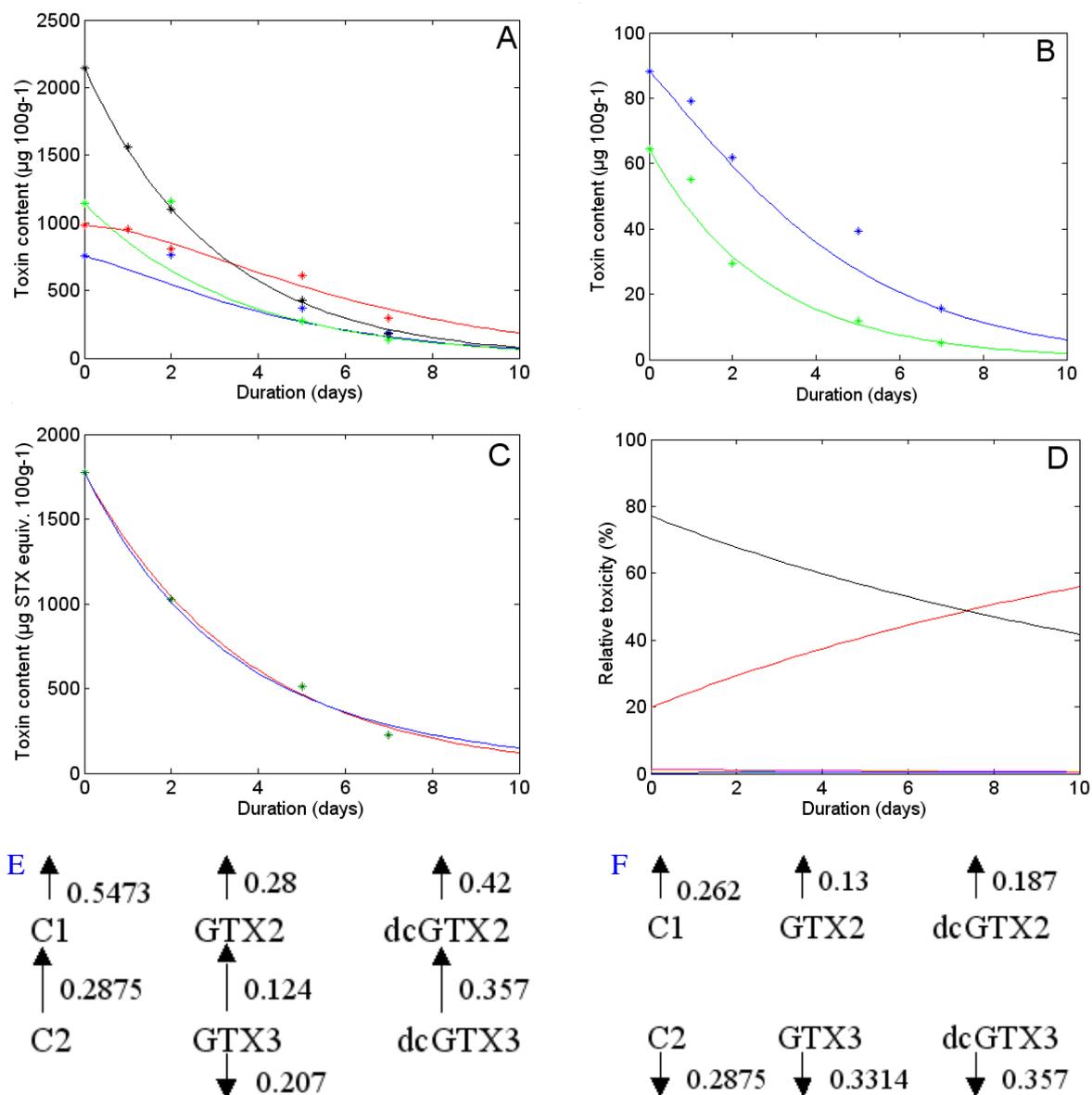


Fig. 71 Second adjustment assay of the simplified model taking into account the biotransformations in the digestive gland. A- Detoxification kinetics of the compounds C1 (blue), C2 (green), GTX2 (red) and GTX3 (black). B- Detoxification kinetics of the compounds dcGTX2 (in blue) and dcGTX3 (in green). C- Detoxification kinetics comparison of the total toxin contents in digestive gland between the model taking into account the biotransformations ( $sse = 4.0624 \times 10^3$ ) and the model not taking into account them ( $sse = 6.1080 \times 10^3$ ). D Relative importance of the different compound (C1 blue, C2 green, GTX2 red, GTX3 black, dcGTX2 yellow and dcGTX3 cyan) with regard to the toxin contents expressed in  $\mu\text{g STX equiv. per } 100\text{ g}$  of digestive gland. D- Coefficient values of the model taking into account the biotransformations. E - Coefficient values of the model not taking into account the biotransformations. Crosses represent the values of the known toxin contents.

Figure 71 Deuxième essai d'ajustement du modèle simplifié prenant en compte les biotransformations dans la glande digestive. A- cinétique de détoxification de composés C1 (en bleu), C2 (en vert), GTX2 (en rouge) et GTX3 (en noir). B- cinétique de détoxification de composés dcGTX2 (en bleu) et dcGTX3 (en vert). C- comparaison de la cinétique de détoxification du contenu toxinique total dans la glande digestive entre le modèle prenant en compte les biotransformations ( $sse = 4,0624 \times 10^3$ ) et le modèle ne les prenant pas en compte ( $sse = 6,1080 \times 10^3$ ). D- Importance relative des différents composés (C1 en bleu ; C2 en vert ; GTX2 en rouge ; GTX3 en noir ; dcGTX2 en jaune et dcGTX3 en cyan) par rapport au contenu toxinique exprimé en  $\mu\text{g } \text{STX } \text{éq.}$  par 100g de glande digestive. E- valeur des coefficients du modèle prenant en compte les biotransformations. F- valeur des coefficients du modèle ne prenant pas en compte les biotransformations. Les croix représentent les valeurs des contenus toxiques

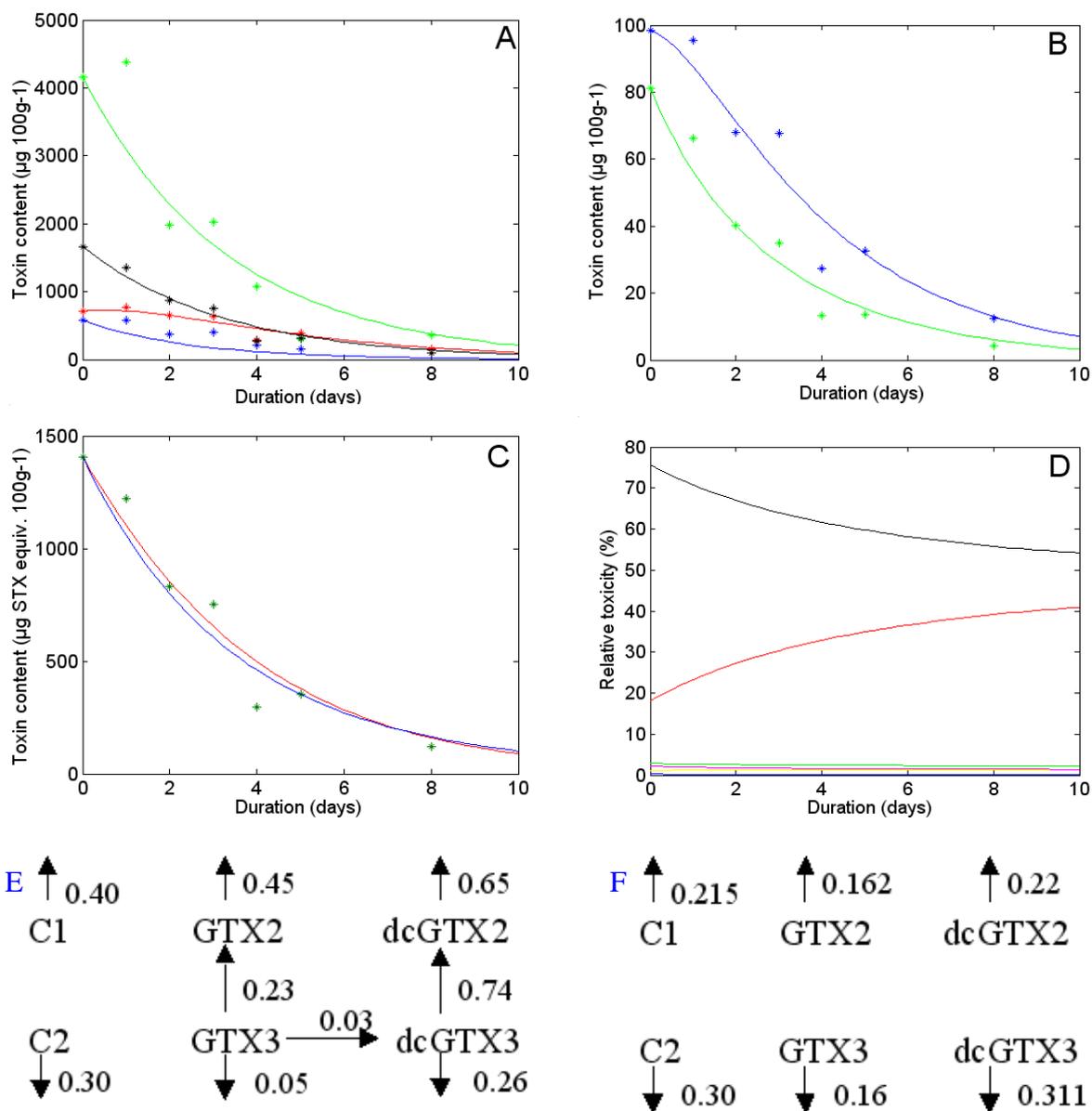


Fig. 72 Third adjustment assay of the simplified model taking into account the biotransformations in the digestive gland. A- Detoxification kinetics of the compounds C1 (blue), C2 (green), GTX2 (red) and GTX3 (black). B- Detoxification kinetics of the compounds dcGTX2 (in blue) and dcGTX3 (in green). C- Detoxification kinetics comparison of the total toxin contents in digestive gland between the model taking into account the biotransformations ( $sse = 6.7316 \times 10^4$ ) and the model not taking into account them ( $sse = 7.8780 \times 10^4$ ). D- Relative importance of the different compound (C1 blue, C2 green, GTX2 red, GTX3 black, dcGTX2 yellow and dcGTX3 cyan) with regard to the toxin contents expressed in  $\mu\text{g}$  STX equiv. per 100 g of digestive gland. D- Coefficient values of the model taking into account the biotransformations. E - Coefficient values of the model not taking into account the biotransformations. Crosses represent the values of the known toxin contents.

Figure 72 Troisième essai d'ajustement du modèle simplifié prenant en compte les biotransformations dans la glande digestive. A- cinétique de détoxification de composés C1 (en bleu), C2 (en vert), GTX2 (en rouge) et GTX3 (en noir). B- cinétique de détoxification de composés dcGTX2 (en bleu) et dcGTX3 (en vert). C- comparaison de la cinétique de détoxification du contenu toxique total dans la glande digestive entre le modèle prenant en compte les biotransformations ( $sse = 6,7314 \times 10^4$ ) et le modèle ne les prenant pas en compte ( $sse = 7,2780 \times 10^4$ ). D- Importance relative des différents composés (C1 en bleu ; C2 en vert ; GTX2 en rouge ; GTX3 en noir ; dcGTX2 en jaune et dcGTX3 en cyan) par rapport au contenu toxique exprimé en  $\mu\text{g}$  éq. STX par 100g de glande digestive. E- valeur des coefficients du modèle prenant en compte les biotransformations. F- valeur des coefficients du modèle ne prenant pas en compte les biotransformations. Les croix représentent les valeurs des contenus toxiques.

trois jeux de données précédents, ce qui rend le jeu de données plus robuste. L'ajustement du modèle prenant en compte les biotransformations a été réalisé sur ce jeu de données composé des trois jeux précédents. Le meilleur ajustement obtenu (Fig. 73) ne prend pas en compte les biotransformations d'un composé vers un autre composé (toutes les valeurs des coefficients de réduction et d'épimérisation sont égales à zéro).

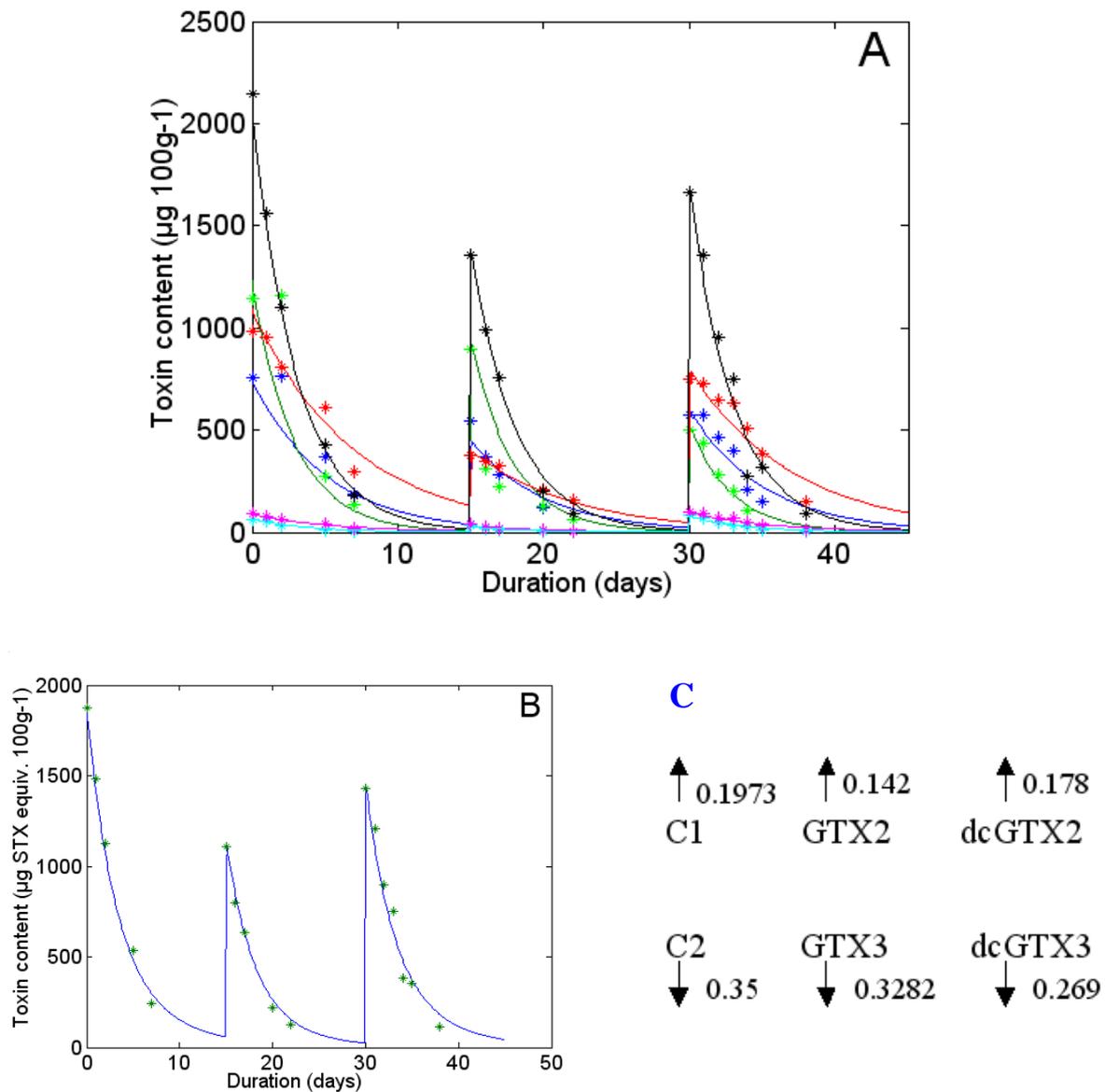


Fig. 73 Adjustment assay of the model taking into account the biotransformations from the dataset established with the three datasets (Fig. 70,71 and 72). A- Kinetics of the different compounds (C1 blue, C2 green, GTX2 red, GTX3 black, dcGTX2 magenta and dcGTX3 cyan). B- Global kinetics of the digestive gland. C- Model coefficient values. Crosses represent the values of the known toxin contents

Figure 73 Essai d'ajustement du modèle prenant en compte les biotransformations à partir du jeu de données constitué des trois jeux de données correspondant aux figures 70, 71 et 72. A- cinétique des différents composés (C1 en bleu ; C2 en vert ; GTX2 en rouge ; GTX3 en noir ; dcGTX2 en magenta et dcGTX3 en cyan). B- cinétique globale de la glande digestive C- valeurs des coefficients du modèle. Les croix représentent les valeurs des contenus toxiques.

Il est important de noter que 90 % du contenu toxinique (en  $\mu\text{g}$   $\text{eq. STX}$ ) dans la glande digestive des huîtres *Crassostrea gigas* contaminées par de l'*Alexandrium minutum* (AM89BM), est lié à la présence de GTX3 et GTX2. Au début de la détoxification (jour 0), GTX3 représente plus de 70 % du contenu toxinique alors que GTX2 contribue pour moins de 20 % (Fig. 70D, 71D et 72D). Au cours de la détoxification, GTX3 va se détoxifier beaucoup plus rapidement que GTX2, ce qui induit que GTX2 va progressivement contribuer de façon plus importante au contenu toxinique global.

La détoxification globale de l'huître est souvent décrite comme la résultante d'une détoxification rapide suivie d'une détoxification plus lente. Dans notre cas, les cinétiques rapide et lente ne sont pas clairement observées mais il est intéressant de rappeler que la cinétique obtenue s'écarte un peu d'une cinétique du premier ordre du fait de la différence de comportement de GTX3 et de GTX2. La détoxification des huîtres contaminées par *A. minutum* (AM89BM) est relativement rapide car la cinétique globale est gouvernée, au début, par la cinétique de GTX3. En considérant GTX2 et 3 comme les deux composés prépondérants entrant dans la composition du contenu toxinique, et en appliquant les coefficients de détoxification obtenus avec le jeu de données composé de l'enchaînement des trois jeux de données, on observe que plus GTX3 est en proportion importante par rapport à GTX2, plus le temps de détoxification est rapide (Fig. 74). D'après ces données, il est possible d'agréger le modèle incluant les différents dérivés de la saxitoxines en un modèle à un compartiment, centré sur l'évolution de la toxicité globale, dont le coefficient de détoxification serait de la

$$\text{forme : } k = 0,1872 \times \frac{[GTX3]_i}{[GTX3]_i + [GTX2]_i} + 0.1447$$

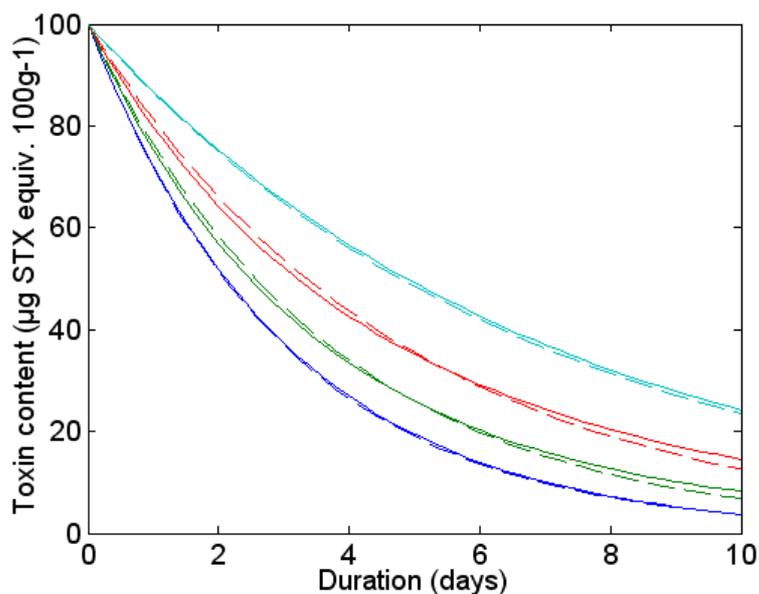


Fig. 74 Detoxification kinetics simulations in function of the GTX3/(GTX2+GTX3) ratio: 100% GTX3 (dark blue), 66% GTX3 and 33 % GTX2 (green), 33% GTX3 and 66% GTX2 (red), 100% GTX2 (light blue). Dotted line represent the kinetics using the coefficient  $k = 0,1872 \times \frac{[GTX3]}{[GTX3]+[GTX2]} + 0,1447$

Figure 74 Simulation de la cinétique de détoxification en fonction du rapport GTX3/GTX2 : 100% GTX3 (en bleu foncé), 66% GTX3 et 33 % GTX2 (en vert), 33% GTX3 et 66% GTX2 (en rouge), et 100% GTX2 (en bleu clair). Les pointillés représentent la cinétique utilisant le coefficient  $k = 0,1872 \times \frac{[GTX3]}{[GTX3]+[GTX2]} + 0,1447$

En conclusion sur les simulations des biotransformations se déroulant dans la glande digestive d'huîtres contaminées par *A. minutum* (AM89BM), la prise en compte des biotransformations dans la cinétique de détoxification permet un meilleur ajustement par rapport à la non prise en compte. Cependant, les biotransformations identifiées comme jouant un rôle dans cette cinétique ne sont pas toujours les mêmes dans les trois premiers essais réalisés à l'exception de l'épimérisation de GTX3 en GTX2. Cette biotransformation semble donc nécessiter à terme une étude spécifique sur sa réalité ou non et sur les moyens de la vérifier, et ce d'autant plus que ces deux composés représentent plus de 90% du contenu toxique. Ces deux composés semblent en effet gouverner la cinétique de détoxification de la glande digestive, avec une première cinétique plus rapide correspondant à GTX3 et une seconde cinétique un peu plus lente correspondant à GTX2. La vitesse de détoxification plus lente pourrait être la résultante de l'épimérisation de GTX3 en GTX2. Cependant, lors de l'ajustement du modèle à l'aide du jeu de données le plus robuste, cette biotransformation n'apparaît plus. Quel est le sens réel de cette biotransformation ? Est ce que l'apparente cinétique plus lente de GTX2 est due à une vitesse de détoxification plus lente ou à

l'épimérisation de GTX3 en GTX2, ou à un couplage de ces deux phénomènes. Les ajustements réalisés ne permettent pas de trancher dans le cas de l'huître. Afin de déterminer sa vraisemblance, une injection de standard de GTX3 directement dans la glande digestive d'huître vivante serait intéressante à réaliser afin d'observer s'il y a des transformations ou non en GTX2. La glande digestive est théoriquement le siège principal des biotransformations, or après modélisation, il s'avère que la glande digestive d'huître ne semble pas biotransformer de manière importante les composés C1, C2, GTX2, GTX3, dcGTX3 et dcGTX2. Cependant, nous allons quand même nous intéresser aux biotransformations dans les autres tissus.

#### **4.1.1.2 Modélisation des biotransformations dans les autres tissus**

Deux modèles différents ont été testés vis à vis des biotransformations se déroulant dans les autres tissus de l'huître. Les deux modèles sont les mêmes que celui décrit au début de la partie 3.1.1, seule l'entrée de la toxine est modifiée. Dans le premier modèle, l'entrée des composés toxiques correspond à l'élimination de ces mêmes composés de la glande digestive (entrée =  $k_{XGD} \times [X]_{GD}$ ). Dans le second modèle, l'entrée est nulle, l'accumulation des toxines en phase de contamination pourrait ainsi provenir d'une assimilation de la toxine par une autre voie que le transfert à partir de la glande digestive et doit donc être nulle en phase de détoxification. Ces deux modèles ont été testés sur les quatre jeux de données précédemment utilisés (trois jeux de données individuels plus le jeu de données reprenant ces trois jeux de données). Seul l'ajustement des deux modèles par rapport au dernier jeu de données est représenté ci-dessous (Fig. 75).

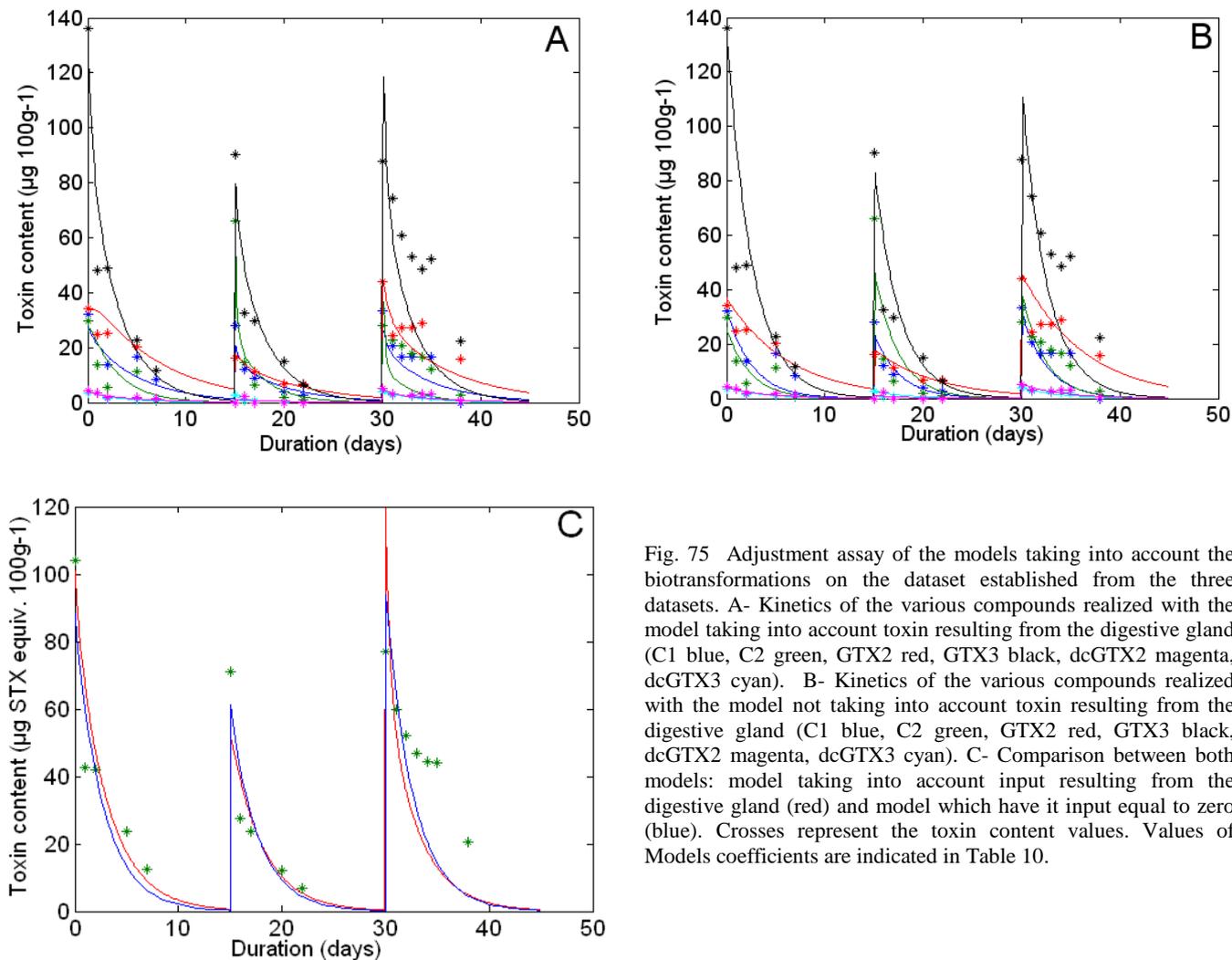


Fig. 75 Adjustment assay of the models taking into account the biotransformations on the dataset established from the three datasets. A- Kinetics of the various compounds realized with the model taking into account toxin resulting from the digestive gland (C1 blue, C2 green, GTX2 red, GTX3 black, dcGTX2 magenta, dcGTX3 cyan). B- Kinetics of the various compounds realized with the model not taking into account toxin resulting from the digestive gland (C1 blue, C2 green, GTX2 red, GTX3 black, dcGTX2 magenta, dcGTX3 cyan). C- Comparison between both models: model taking into account input resulting from the digestive gland (red) and model which have it input equal to zero (blue). Crosses represent the toxin content values. Values of Models coefficients are indicated in Table 10.

Figure 75 Essai d'ajustement des modèles prenant en compte les biotransformations sur le jeu de données constitué des trois jeux de données. A- cinétique de l'évolution des différents composés réalisé avec le modèle prenant en compte les toxines provenant de la glande digestive (C1 en bleu ; C2 en vert ; GTX2 en rouge ; GTX3 en noir ; dcGTX2 en magenta et dcGTX3 en cyan). B- Cinétique de l'évolution des différents composés réalisé avec le modèle prenant en compte les toxines provenant de la glande digestive (C1 en bleu ; C2 en vert ; GTX2 en rouge ; GTX3 en noir ; dcGTX2 en magenta et dcGTX3 en cyan). C- comparaison entre les deux modèles (en rouge modèle prenant en compte les entrées provenant de la glande digestive et en bleu modèle dont l'entrée est nulle) ; Les croix représentent les valeurs des contenus toxiques. Les valeurs des coefficients des modèles sont indiquées dans le Tableau 10.

Table 10 Coefficient values obtained during the adjustment of the two models on the other tissues.

Tableau 10 Valeurs des coefficients obtenues lors de l'ajustement des deux modèles sur les autres tissus.

	Model with input	Model without input
<u>Hydrolyse</u>		
H <sub>C1→GTX2</sub>	0	0
H <sub>C2→GTX3</sub>	0	0
H <sub>GTX2→dcGTX2</sub>	0	0
H <sub>GTX3→dcGTX3</sub>	0	0
<u>Epimerization</u>		
E <sub>C1→C2</sub>	0	0
E <sub>GTX3→GTX2</sub>	0	0
E <sub>dcGTX3→dcGTX2</sub>	0	0
<u>Detoxification coefficient (d<sup>-1</sup>)</u>		
k <sub>C1</sub>	1.96	0.30
k <sub>C2</sub>	4.5	0.42
K <sub>GTX2</sub>	1.276	0.158
K <sub>GTX3</sub>	2.87	0.389
K <sub>dcGTX2</sub>	1.6	0.25
K <sub>dcGTX3</sub>	1.73	0.27
sse	5,315.3	3,287.8

Les coefficients permettant d'obtenir le meilleur ajustement sont nuls pour les coefficients liés aux biotransformations (hydrolyse et épimérisation) pour les deux modèles testés (Tableau 10). Ce même résultat est observé également sur les trois jeux de données étudiés séparément (données non présentées). La prise en compte des biotransformations ne permet pas de mieux décrire la cinétique de détoxification des différents composés. GTX2 et GTX3 sont les deux composés jouant un rôle important dans la cinétique de détoxification des autres tissus de la même façon que dans la glande digestive. Dans les autres tissus, GTX2 est toujours le composé qui semble s'éliminer le plus lentement (Tableau 10).

Par ailleurs, la prise en compte du transfert des composés toxiques de la glande digestive vers les autres tissus n'améliore pas le modèle (sse = 5 315,3 contre sse=3 287,8 ; Tableau 10). D'après cette simulation, il semble apparaître que lors de la détoxification, les toxines situées dans la glande digestive ne sont pas transférées en totalité vers les autres tissus.

Lors de la détoxification des huîtres *Crassostrea gigas* contaminées par *A. minutum* (AM89BM), il apparaît que peu de biotransformations semblent intervenir au sein de la glande digestive et des autres tissus. Les biotransformations ne semblent donc pas des informations essentielles pour décrire la détoxification. Cependant, une question subsiste, est-il important de considérer les différents composés séparément ou suffit-il d'une considération globale de

toxicité exprimée en équivalent saxitoxine ? Le prochain paragraphe va essayer de répondre à cette question.

#### 4.1.1.3 Comparaison des modèles prenant en compte les différents composés toxiques et les modèles à un ou deux compartiments

Pour obtenir plus de fiabilité dans la comparaison des modèles, le jeu de données utilisé est celui constitué du regroupement des trois jeux de données. La prise en compte des différentes cinétiques de chaque composé dans la glande digestive et dans les autres tissus (sse = 5 893) permet d'améliorer l'ajustement du modèle par rapport à une prise globale des toxines dans la glande digestive et dans les autres tissus (sse = 16 900) ou vis-à-vis d'un modèle prenant la toxicité dans sa globalité (sse = 15 856 ; Fig. 76 ; Table 11).

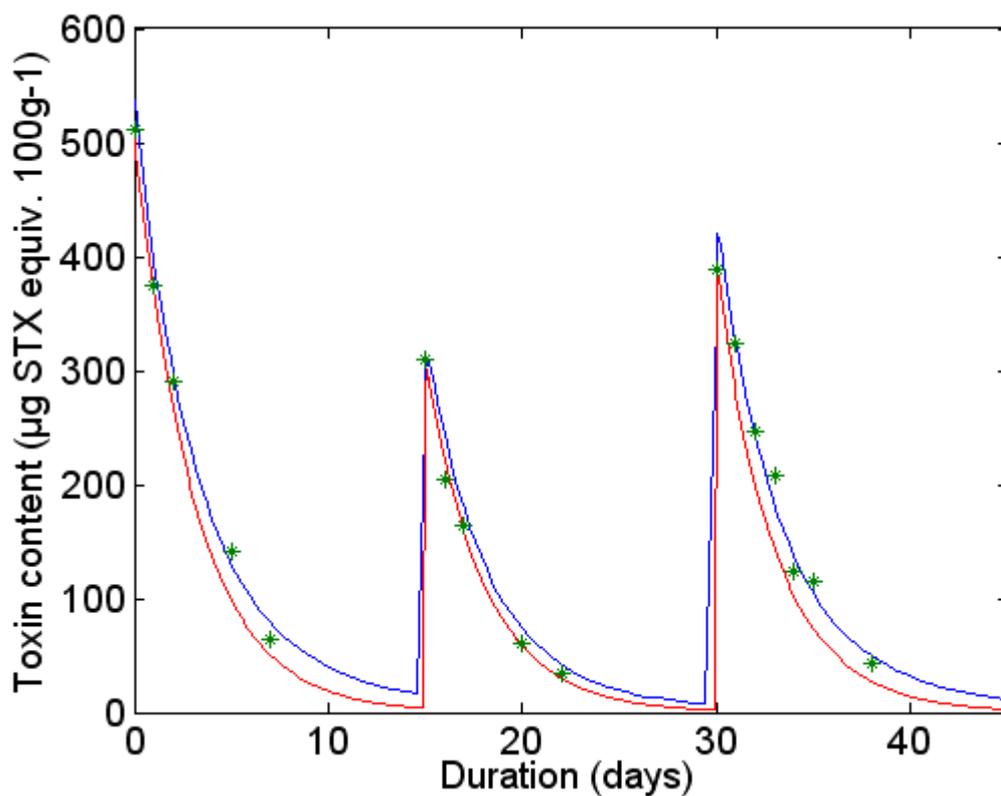


Fig. 76 Comparison between the different total flesh models with the same dataset : model taking into account the different toxic compounds (blue), two compartment model (digestive gland and other tissues, red), Crosses represent the toxin content values.

Figure 76 Comparaison des différents modèles sur la chair totale avec le même jeu de données : modèle prenant en compte les différents composés toxiques (en bleu), modèle à deux compartiments (glande digestive et autres tissus, en rouge). Les croix vertes représentent les valeurs des contenus toxiques.

Table 11 Detoxification coefficients values for model 1 taking into account the different toxic compounds, the model 2 is a two-compartment model (Digestive gland and the other tissues).

Tableau 11 Valeurs de coefficients de détoxification pour le modèle 1 prenant en compte les différents composés toxiques, le modèle 2 est un modèle à deux compartiments (glande digestives et autres tissus)

	Model 1	Model 2
Detoxification rate (d-1)		
Digestive gland		0.3328
C2	0.1973	
C1	0.35	
GTX2	0.142	
GTX3	0.3282	
dcGTX2	0.178	
dcGTX3	0.259	
Other tissues		0.379
C2	0.3	
C1	0.42	
GTX2	0.158	
GTX3	0.389	
dcGTX2	0.25	
dcGTX3	0.273	
sse	5,893	16,900

#### 4.1.2 Discussion

La mise en place de modèles prenant en compte la cinétique des différents composés a permis de mettre en évidence le rôle des GTX2 et GTX3 dans la cinétique de détoxification des huîtres contenant des phycotoxines provenant de la microalgue *Alexandrium minutum* (AM89BM). GTX2 présente une cinétique d'élimination plus lente que les autres composés cependant les données disponibles ne permettent pas de définir si ce phénomène est le résultat d'une biotransformation des autres composés en GTX2 ou si l'huître retient préférentiellement GTX2 dans ses tissus. Ce résultat a également été observé chez *Spisula solidissima* (Silvert et al. 1998) mais en contradiction avec des observations sur la détoxification chez *Mytilus galloprovincialis* (Blanco et al. 2003) après intoxication avec *Alexandrium tamarense*.

Blanco et al. (2003) proposent un modèle prenant en compte les composés suivant chez la moule *Mytilus galloprovincialis* après contamination avec *Alexandrium tamarense* : GTX1, GTX2, GTX3 et GTX4. Ils observent que la différenciation des différents composés ne joue pas un rôle significatif dans la contribution relative des GTX. Cependant, dans notre cas, une amélioration est observable lors de la prise en compte séparément des composés dans la glande digestive et dans les autres tissus. Ce modèle nécessite 12 états et 12 coefficients alors

que le modèle à deux compartiments n'est constitué que de deux coefficients pour une faible perte en qualité de prédictions. L'inclusion des variables environnementales agissant sur la cinétique de détoxification semble plus accessible sur un modèle d'ordre plus faible et comportant moins de paramètres.

Il est important de noter également que peu, voire pas, de biotransformations ont lieu dans les tissus de l'huître. On peut donc penser que la prise en compte des biotransformations dans le cas de ce mollusque n'est pas utile. Cependant, elle doit pouvoir s'avérer utile dans le cas de mollusques capables d'effectuer de nombreuses biotransformations.

## 4.2 Les toxines diarrhéiques

La toxicité des mollusques contenant des toxines lipophiles et plus particulièrement de l'acide okadaïque s'exprime en quantité de toxine par kg de chair totale à partir de l'estimation sur la glande digestive. En conséquence, contrairement aux toxines paralysantes, la présence de biotransformations ne va pas affecter directement la toxicité de la glande digestive. Cependant, les différents composants ne se détoxifient pas à la même vitesse (Morono et al. 2003, Torgersen et al. 2008b). Il est donc important de discerner les différents analogues dans la cinétique de contamination/ décontamination. Les toxines présentes dans le phytoplancton producteur d'acide okadaïque et de ses dérivés (*Dinophysis spp.* et *Prorocentrum spp.*) et dans l'eau de mer diffèrent des toxines présentes dans le mollusque bivalve. Ainsi les acyles présents dans les mollusques n'ont jamais été observés dans les microalgues. L'acide okadaïque (AO), les dinophysistoxines 1 et 2 (DTX1 et 2) sont acylés avec une chaîne d'acide gras de 12 à 22 carbones avec des degrés différents de saturation, uniquement dans les mollusques et les crustacés. L'ensemble des molécules acylées forme un groupe appelé dinophysistoxines 3 (DTX3).

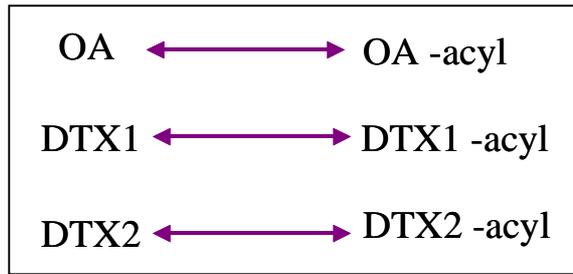


Fig. 77 Possible biotransformations of okadaic acid (OA) and dinophysistoxins (DTX).

Figure 77 Biotransformations possibles de l'acide okadaïque (OA) et des dinophysistoxines (DTX).

Comme nous l'avons vu, les toxines diarrhéiques sont majoritairement situées dans la glande digestive et c'est donc exclusivement dans ce tissu que seront étudiées les biotransformations. Trois jeux de données sont disponibles qui correspondent à l'expérience réalisée sur l'influence de la matière organique sur la détoxication de moules contenant des toxines DSP (Chapitre 3 – II-2). A partir du graphique proposé en figure 77, il est possible d'établir un modèle mathématique.

$$\frac{d[OA]}{dt} = a \times I \times [OA]_m + T_{OAacyl \rightarrow OA} [OAacyl] - \left( T_{OA \rightarrow OAacyl} + k_{OA} + \frac{dP}{dt} \right) [OA]$$

$$\frac{d[OAacyl]}{dt} = T_{OA \rightarrow OAacyl} [OA] - \left( T_{OAacyl \rightarrow OA} + k_{OAacyl} + \frac{dP}{dt} \right) [OAacyl]$$

$$\frac{d[DTX1]}{dt} = a \times I \times [DTX1]_m + T_{DTX1acyl \rightarrow DTX1} [DTX1acyl] - \left( T_{DTX1 \rightarrow DTX1acyl} + k_{DTX1} + \frac{dP}{dt} \right) [DTX1]$$

$$\frac{d[DTX1acyl]}{dt} = T_{DTX1 \rightarrow DTX1acyl} [DTX1] - \left( T_{DTX1acyl \rightarrow DTX1} + k_{DTX1acyl} + \frac{dP}{dt} \right) [DTX1acyl]$$

$$\frac{d[DTX2]}{dt} = a \times I \times [DTX2]_m + T_{DTX2acyl \rightarrow DTX2} [DTX2acyl] - \left( T_{DTX2 \rightarrow DTX2acyl} + k_{DTX2} + \frac{dP}{dt} \right) [DTX2]$$

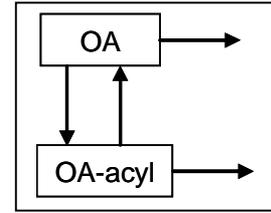
$$\frac{d[DTX2acyl]}{dt} = T_{DTX2 \rightarrow DTX2acyl} [DTX2] - \left( T_{DTX2acyl \rightarrow DTX2} + k_{DTX2acyl} + \frac{dP}{dt} \right) [DTX2acyl]$$

$$Tox = [OA] + [DTX1] + [DTX2] + [OAacyl] + [DTX1acyl] + [DTX2acyl]$$

Les données disponibles sont uniquement constituées d'acide okadaïque libre et de sa forme acylée. Le modèle précédent (Fig. 77) peut donc être simplifié afin de se ramener à un modèle à deux compartiments.

$$\frac{d[OA]}{dt} = T_{OAacyl \rightarrow OA} [OAacyl] - \left( T_{OA \rightarrow OAacyl} + k_{OA} + \frac{dP}{dt} \right) [OA]$$

$$\frac{d[OAacyl]}{dt} = T_{OA \rightarrow OAacyl} [OA] - \left( T_{OAacyl \rightarrow OA} + k_{OAacyl} + \frac{dP}{dt} \right) [OAacyl]$$



$$Tox = [OA] + [OAacyl]$$

Ce modèle est ajusté par rapport aux trois jeux de données disponibles (témoin, niveau de nourriture 1 :  $10-15 \times 10^3$  cellules  $mL^{-1}$  et niveau de nourriture 2 :  $20-30 \times 10^3$  cellules  $mL^{-1}$  de *Skeletonema costatum* ; Fig. 78) correspondant à l'expérience menée dans le chapitre 3 – 2.2.

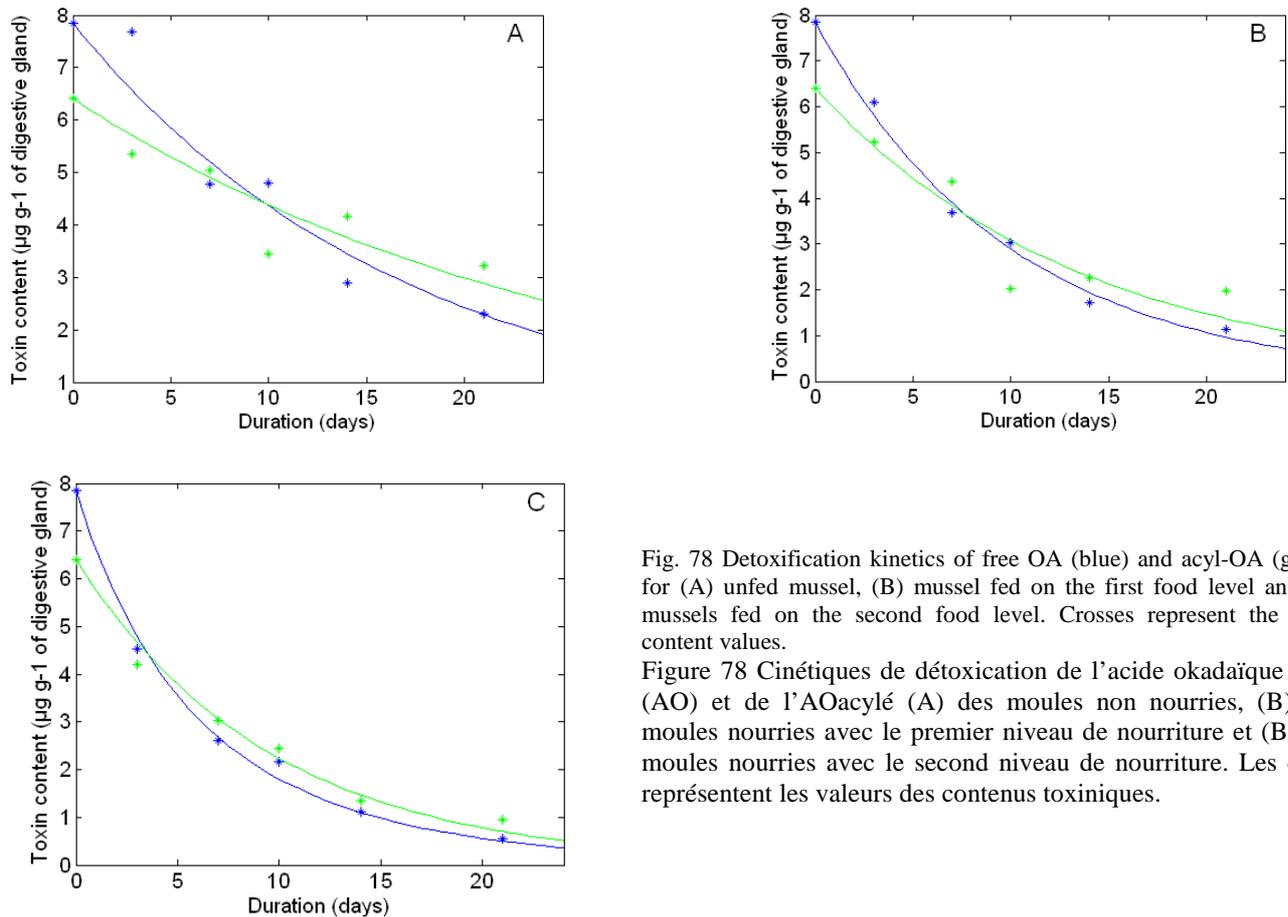


Fig. 78 Detoxification kinetics of free OA (blue) and acyl-OA (green) for (A) unfed mussel, (B) mussel fed on the first food level and (C) mussels fed on the second food level. Crosses represent the toxin content values.

Figure 78 Cinétiques de détoxification de l'acide okadaïque libre (AO) et de l'AOacylé (A) des moules non nourries, (B) des moules nourries avec le premier niveau de nourriture et (B) des moules nourries avec le second niveau de nourriture. Les croix représentent les valeurs des contenus toxiques.

Table 12 Values of the coefficient obtained for the best adjustments in three feeding conditions.

Tableau 12 Valeurs des coefficients obtenues pour le meilleur ajustement dans les trois conditions de nourriture

	Seawater	10-15×10 <sup>3</sup> cells mL <sup>-1</sup>	20-30×10 <sup>3</sup> cells mL <sup>-1</sup>	20-30×10 <sup>3</sup> cells mL <sup>-1</sup>
Detoxification rate (d <sup>-1</sup> )				
OA	0.0587	0.09997	0.1487	0.2581
OA acyl	0.0381	0.0735	0.1062	0
Transfer (d <sup>-1</sup> )				
OA → OA acyl	0	0	0	0
OAacyl → OA	0	0	0	0.1053
sse	3.1966	1.9877	0.8132	0.5473

$$sse = \sum_{i=1}^n \left[ (AO_o - AO_m)^2 + (AOacyl_o - AOacyl_m)^2 \right]$$

L'ajustement des coefficients du modèle permet d'obtenir des schémas différents en ce qui concerne le devenir des toxines. Dans le cas des moules non nourries et des moules nourries avec le premier niveau de nourriture, l'AO et l'AO-acyl possèdent leur propre cinétique de détoxification indépendante l'une de l'autre. Dans des moules nourries avec le second niveau de nourriture, l'AO-acyl est biotransformé en AO. C'est uniquement sous cette forme que la toxine pourrait être éliminée. Ce résultat est en accord avec les résultats obtenus lors des expériences réalisées sur la localisation sub-cellulaire des toxines (Chapitre 2 – Partie 2- 2). En effet, il a été observé que les formes acylées sont uniquement présentes dans les fractions contenant les organites alors que la forme libre est retrouvée dans les organites et dans le cytosol. On peut donc penser que la toxine entre dans la cellule sous forme d'AO libre, et qu'elle est acheminée jusqu'aux lysosomes où a lieu la conversion de l'AO en AO acyl lors de la contamination. Puis pendant la détoxification, les formes acylées redonnent de l'AO libre, et sont relâchées dans le cytosol. Cependant, il est possible d'imposer une structure de biotransformations ne présentant pas de transferts entre AO et AO-acyle ( $T_{OA \rightarrow OA \text{ acyl}} = 0$  et  $T_{OAacyl \rightarrow OA} = 0$ ) pour le jeu de données relatif aux moules nourries avec le second niveau de nourriture. L'ajustement est moins bon ( $sse=0,5473$ ) mais reste correct ( $sse=0.8132$ ). L'absence de transfert entre les deux formes peut s'expliquer par le fait que ce transfert de AO vers la forme acylée a lieu très rapidement lors de la contamination, il est donc impossible de l'observer pendant la détoxification.

Il est également intéressant de noter que l'AO libre se détoxifie plus rapidement que les formes acylées ce qui est en accord avec les résultats obtenus par Torgersen et al. (2008a). De plus, le coefficient de détoxification augmente en fonction de la quantité de nourriture dans les bacs (Tableau 12). Ainsi le temps de demi-vie de l'acide okadaïque est de 3,5 jours pour les moules non nourries, de 2,9 jours pour les moules nourries avec le premier niveau de

nourriture et enfin 2,05 jours pour les moules nourries avec le second niveau de nourriture. Ce résultat laisse apparaître qu'il est important de prendre en compte les variables environnementales comme facteurs influençant les cinétiques.

De plus on peut noter, que la différenciation des composés lors de la détoxification ne permet pas d'améliorer réellement la description de la cinétique (Table 13). Si on considère un modèle à un compartiment, on peut s'apercevoir que le coefficient de détoxification est linéairement dépendant du niveau de nourriture (Fig. 79).

Table 13 Values of sum square errors as a function of the different model and of the food level.

Tableau 13 Valeurs de la somme des écarts quadratiques en fonction des modèles et du niveau de nourriture

	One compartment	Two compartments
No food	1.07	1.04
10-15 × 10 <sup>3</sup> cells mL <sup>-1</sup>	1.80	1.76
20-30 × 10 <sup>3</sup> cells mL <sup>-1</sup>	1.67	1.52

$$sse = \sum_{i=1}^n \left[ (AO_o + AOacyl_o) - (AO_m - AOacyl_m) \right]^2$$

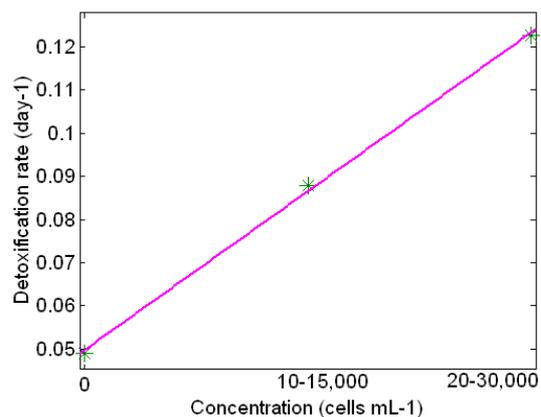


Fig. 79 Detoxification rate of mussels containing diarrheic toxins in function of the food level.

Figure 79 Coefficient de détoxification des moules contenant des toxines diarrhéiques par rapport au niveau de nourriture.

### 4.3 Discussion

La mise en place de modèles prenant en compte les biotransformations des composés toxiques a permis de mettre en évidence, que très peu de biotransformations avaient lieu dans la glande digestive des huîtres et des moules contenant respectivement des toxines PSP et des toxines DSP pendant la cinétique de détoxication.

La différenciation des composés liés aux toxines paralysantes permet de mieux prédire la cinétique de détoxication par rapport à une prise en compte globale des toxines exprimées en équivalent saxitoxine. Cependant, la différenciation de chaque toxine dans les deux compartiments demande une investigation plus importante car ce modèle nécessite douze ajustements de coefficients. L'effort d'ajustement semble un peu élevé par rapport à l'amélioration apportée au modèle qui est basée sur des jeux de données sous-échantillonnées et présentant des erreurs analytiques.

GTX3 et GTX2 représentent 90% du contenu toxique de l'huître contaminée par *A. minutum* (AM89BM) et les cinétiques différentes de ces deux composés semblent être à l'origine de la cinétique de détoxication. Des études complémentaires demanderaient à être mises en place afin de connaître l'origine de la cinétique plus lente chez GTX2. Serait-ce dû à une rétention préférentielle de ce composé par l'huître ou aux biotransformations des autres composés en GTX2 et notamment l'épimérisation de GTX3 en GTX2 ou l'hydrolyse de C1 en GTX2 ?

L'ajustement du modèle prenant en compte les biotransformations de l'AO a permis de mettre en évidence que les coefficients de détoxication de l'acide okadaïque varient en fonction du niveau de nourriture. Plus la quantité de nourriture est importante plus le temps de détoxication est rapide. Nous allons donc dans le prochain paragraphe nous intéresser à l'influence des variables environnementales sur la détoxication des moules contenant des toxines diarrhéiques.

Implementing models taking into account toxic compounds biotransformations allowed to outline, that very few biotransformations occurred during detoxification kinetics in digestive gland of oysters and mussels containing respectively PSP and DSP toxins.

Considering paralytic compounds differentiation enables a better prediction of detoxification kinetics when compared to the one obtained with a global estimation of toxin expressed in equivalent saxitoxin. However, differentiation of each toxin in both compartments requires more important investigation since this model needs twelve coefficient adjustments. The adjustment effort seems

rather high if we consider the improvement brought to the model. Besides, the model is based on sub-samples dataset which are presenting analytical errors.

GTX3 and GTX2 represent 90 % of the toxin content of oysters contaminated by *A. minutum* (AM89BM) and the different kinetics issued from these two compounds seem to be at the origin of the overall detoxification kinetic. Follow-up studies would need to be carried out to know the origin of GTX2 slower kinetics. Would it be due to preferential retention of this compound by oysters, or to biotransformations of other compounds in GTX2 in particular the epimerization of GTX3 to GTX2 or C1 hydrolysis in GTX2?

Adjustment of the model taking into account OA biotransformations revealed that okadaic acid detoxification coefficients can vary according to the level of food. The more important the food quantity the faster the detoxification time is  $t$ . As a result, in the next paragraph we will examine the influence of the environmental variables on the detoxication of DSP-contaminated mussels.

## 5 Influence des variables environnementales

Dans le chapitre 3, il a été mis en évidence que l'accumulation et la détoxification des phycotoxines dans les bivalves dépendaient des variables intrinsèque et extrinsèque. Ces deux types de variables ont déjà été inclus dans des modèles de détoxification de moules *Mytilus galloprovincialis* contenant de l'acide okadaïque (Blanco et al. 1997) ou des toxines paralysantes (Blanco et al. 1997). La prise en compte dans l'établissement du coefficient de détoxification de la température, de la salinité, de la fluorescence (indice de l'abondance du phytoplancton), de la transmission de la lumière (indice de la matière en suspension) et du poids du bivalve, permet de mieux décrire la cinétique d'élimination des phycotoxines (Blanco et al. 1999). Généralement, le coefficient usuellement utilisé comme une constante est remplacé par une équation linéaire dépendante des variables internes et externes (Silvert et Subba Rao 1992, Blanco et al. 1997, 1999).

Dans le chapitre précédent, il a été souligné l'influence de la matière en suspension et plus particulièrement de la matière organique sur la vitesse de détoxification. Il serait intéressant d'étudier l'influence de ce paramètre en milieu naturel. De même l'influence de la température sur la détoxification est très controversée (Madenwald 1985, Svensson 2003, Lassus et al. 2005, Duinker et al. 2007). La prise en compte de ce paramètre permettra peut-être de mettre en évidence son influence ou non sur les cinétique de détoxification dans le milieu naturel.

L'influence des variables environnementales sera testé sur des moules *Mytilus edulis* contenant de l'AO et des DTXs en Norvège.

Le premier essai provient des données issues de la publication de Duinker et al. (2007). Ces auteurs ont suivi pendant 73 jours la détoxification dans le milieu naturel de deux groupes de moules contenant des toxines DSP, respectivement âgées de 1 et 2 ans. Les analyses toxiques ont été réalisées aux jours 0, 3, 7, 12, 20, 26, 40, 54 et 73 sur des triplicats de 50 individus. La température et la quantité de carbone sont mesurées tous les 2 à 5 jours (Fig. 80A).

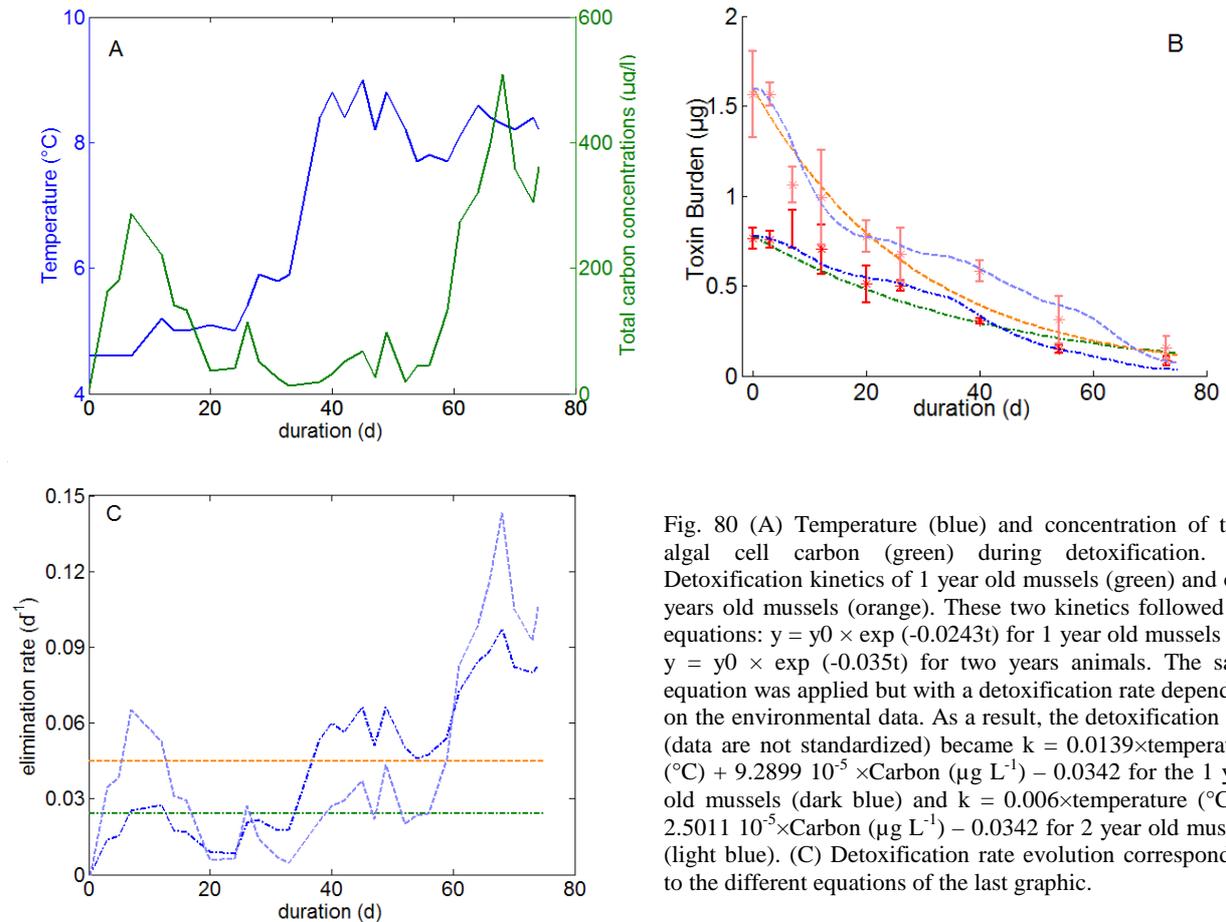


Fig. 80 (A) Temperature (blue) and concentration of total algal cell carbon (green) during detoxification. (B) Detoxification kinetics of 1 year old mussels (green) and of 2 years old mussels (orange). These two kinetics followed the equations:  $y = y_0 \times \exp(-0.0243t)$  for 1 year old mussels and  $y = y_0 \times \exp(-0.035t)$  for two years animals. The same equation was applied but with a detoxification rate depending on the environmental data. As a result, the detoxification rate (data are not standardized) became  $k = 0.0139 \times \text{temperature } (^\circ\text{C}) + 9.2899 \times 10^{-5} \times \text{Carbon } (\mu\text{g L}^{-1}) - 0.0342$  for the 1 year old mussels (dark blue) and  $k = 0.006 \times \text{temperature } (^\circ\text{C}) + 2.5011 \times 10^{-5} \times \text{Carbon } (\mu\text{g L}^{-1}) - 0.0342$  for 2 year old mussels (light blue). (C) Detoxification rate evolution corresponding to the different equations of the last graphic.

Figure 80 A Température (en bleu) et concentration cellulaire algale en carbone (en vert) pendant la détoxification. (B) cinétique de détoxification des moules de 1 an (en vert) et de moules de 2 ans (en orange). Ces deux cinétiques ont suivi les équations :  $y = y_0 \times \exp(-0.0243t)$  pour moules de un an et  $y = y_0 \times \exp(-0.035t)$  pour les animaux de deux ans. La même équation a été appliquée, mais avec un coefficient de détoxification en fonction des données environnementales. En conséquence, le taux de détoxification (des données non standardisées) est devenu  $k = 0,0139 \times \text{température } (^\circ\text{C}) + 9,2899 \times 10^{-5} \times \text{Carbone } (\mu\text{g L}^{-1}) - 0,0342$  pour les moules de 1 an (en bleu foncé) et  $k = 0,006 \times \text{température } (^\circ\text{C}) + 2,5011 \times 10^{-5} \times \text{Carbone } (\mu\text{g L}^{-1}) - 0,0342$  pour des moules de 2 ans (en bleu clair). (C) Evolution des coefficients de détoxification correspondant aux différentes équations du dernier graphique.

La prise en compte de l'influence des variables environnementales, température et concentration en carbone (indice de la quantité de microalgues) permet d'améliorer l'estimation de la cinétique de détoxification des moules de un an et de deux ans (Fig. 80B). La standardisation des données permet d'apprécier l'influence de la température par rapport à la concentration en carbone ( $k = 0,023 \times \text{température } (^\circ\text{C}) + 0,013 \times \text{Carbone } (\mu\text{g L}^{-1}) + 0,045$  pour les moules de un an et  $k = 0,001 \times \text{température } (^\circ\text{C}) + 0,035 \times \text{Carbone } (\mu\text{g L}^{-1}) + 0,045$  pour les moules de deux ans). La température semble donc influencer de façon plus importante les moules de un an que les moules de deux ans (Fig. 80C), contrairement à la concentration en carbone qui régit principalement le coefficient de détoxification des moules de deux ans et dont l'importance est moindre pour les moules de un an.

Le deuxième essai est réalisé à partir des données du réseau de surveillance norvégien correspondant au site de Flodevigen. Des analyses quantitatives des toxines diarrhéiques sont réalisées de façon systématique par chromatographie liquide haute performance couplée à un spectromètre de masse en tandem (CLPH-SM/SM) tous les quinze jours sur des moules, tandis que les concentrations en microalgues toxiques sont suivies tous les deux à trois jours dans la colonne d'eau. Ce site a la particularité de présenter toute l'année une contamination des eaux par *Dinophysis spp.*. De ce fait, il a fallu fixer des seuils de concentrations cellulaires en dessous desquels les moules ne présentaient pas de risque de contamination. D'après les données du réseau de surveillance norvégien, ces seuils sont de 40 cellules L<sup>-1</sup> pour *D. acuta* et de 500 cellules L<sup>-1</sup> pour *D. acuminata* ou *D. norvegica*. Les valeurs seuil choisies correspondent en effet aux valeurs d'alerte mises en place en Norvège avant de procéder à des analyses de toxines lipophiles chez les moules des autres sites.

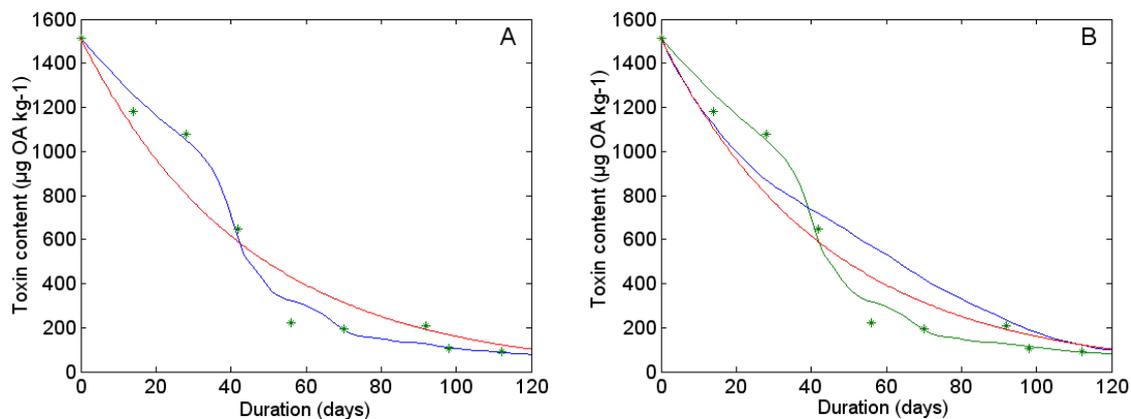


Fig. 81 Detoxification kinetics of mussels containing DSP toxins with detoxification coefficient depending on environmental variables. (A) with the detoxification coefficient constant (red) and depending on chlorophyll and temperature (blue). (B) Detoxification coefficient constant (red) and depending on chlorophyll (green) and temperature (blue). Crosses represent the toxin content values. Coefficient values are in the table 14.

Figure 81 Cinétiques de détoxification des moules contenant des toxines DSP avec le coefficient de détoxification dépendant des variables environnementales. (A) Avec le coefficient de détoxification constant (en rouge) et dépendant de la chlorophylle et de la température (en bleu) (B) coefficient de détoxification constant (rouge), dépendant de la chlorophylle (en vert) et dépendant de la température (en bleu). Les croix représentent les valeurs des contenus toxiques. Les valeurs des coefficients sont indiquées dans le tableau 14.

Table 14 Detoxification coefficient values and the sum of square errors.

Tableau 14 Valeurs des coefficients de détoxification obtenues et la somme des erreurs au carré.

Detoxification coefficient (d <sup>-1</sup> )	Sum square of errors
$k = 0.2247$	146,023
$k = 0.0103 + 0.0040 \times [\text{Chloro}] + 0.0003 \times \text{temperature}$	25,640
$k = 0.0112 + 0.0040 \times [\text{Chloro}]$	25,684
$k = 0.0307 - 0.0029 \times \text{temperature}$	133,160

La prise en compte d'un coefficient de détoxification dépendant linéairement de la température et de la chlorophylle permet de mieux décrire la cinétique de détoxification des moules contenant des toxines DSP (Fig 81 ;Tableau 14). La température ne semble pas jouer un rôle très important dans cette détoxification.

Si on étudie l'influence de la température et de la chlorophylle sur un jeu de données plus robuste prenant en compte quatre cinétiques de détoxification échelonnées sur plusieurs années, on peut noter que la dépendance linéaire du coefficient de détoxification aux variables environnementales permet de mieux décrire les cinétiques observées ( $sse = 6,8 \cdot 10^5$ ) que lors de l'utilisation d'un coefficient de détoxification constant ( $sse = 8,74 \cdot 10^5$ ).

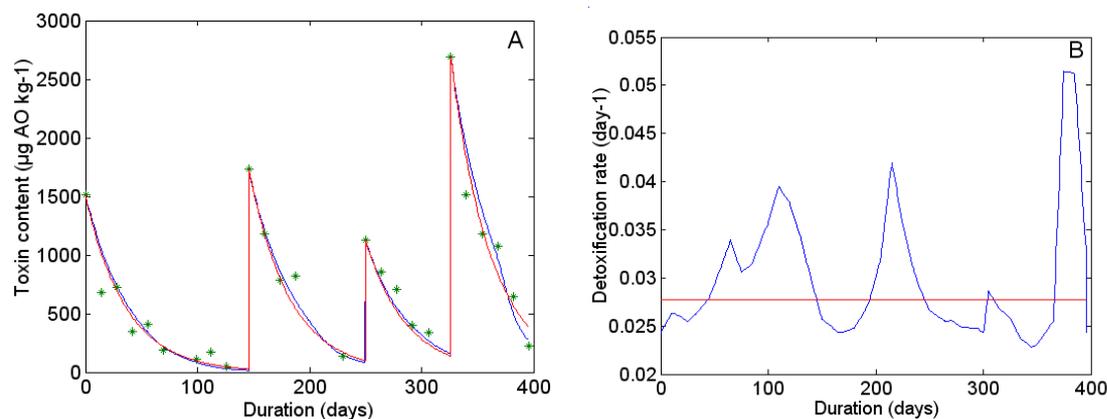


Fig. 82 A Detoxification kinetics of mussels containing diarrhetic toxins according to an one-compartment model) B- Variation of the two detoxification coefficients during the detoxification kinetics. ( $k = 0.0278$  in red and  $k = 0.019 + 8.962 \cdot 10^{-4} \times \text{Temperature} + 0.0026 \times \text{Chlorophyll}$  in blue)

Figure 82 A Cinétique de détoxification de moules contenant des toxines diarrhéiques selon un modèle à un compartiment B variation des deux coefficients de détoxification au cours de la cinétique de détoxification ( $k = 0.0278$  en rouge et  $k = 0.019 + 8.962 \cdot 10^{-4} \times \text{Température} + 0.0026 \times \text{Chlorophylle}$  en bleu)

L'utilisation d'un coefficient de détoxification dépendant linéairement de la température et de la quantité de matière organique (quantité de carbone et de chlorophylle) a permis, dans les cinétiques de détoxification des moules contenant des toxines DSP, d'obtenir un modèle décrivant mieux cette cinétique (Figure 80, 81 et 82A). Il est important de noter que l'effet de la matière organique n'est pas uniquement la résultante d'une modification du poids de la glande digestive pendant la détoxification. En effet, lors des essais sur les données du réseau norvégien, la toxicité est exprimée en concentration, donc si le poids de la glande digestive fluctue, la concentration en toxine va fluctuer en même temps. Dans ce cas, il est difficile de déterminer si ce facteur influence uniquement le poids de la glande digestive ou non. Cependant lors du premier essai sur les données de Duinker et al. (2007), le contenu toxinique est exprimé en quantité de toxine et on observe bien un effet de la matière organique. La matière organique semble donc jouer un rôle dans la cinétique de détoxification à proprement parler et dans la fluctuation du poids de la glande digestive, fluctuation qui peut entraîner la dilution de la toxine.

L'impact de la température est moins clair. La détoxification des moules de un an semble dépendre de la température. Ce résultat est moins net pour les moules de deux ans ou pour les moules issues du réseau de surveillance.

L'utilisation des données des réseaux de surveillance présente des limites. En effet, les analyses sont effectuées sur un site donné, avec une analyse toxinique réalisée sur un échantillon correspondant à un poids de moules et non à un nombre d'individu. Ce point est important car les petites moules concentrent plus les toxines dans leurs tissus que les grandes moules (Duinker et al. 2007) et peuvent donc atteindre des concentrations plus importantes. D'un prélèvement à l'autre, on peut donc observer une accélération de la cinétique de détoxification qui est uniquement la résultante d'un échantillonnage de moules de taille plus importante que l'échantillonnage précédent et inversement. De plus, les analyses chimiques sont réalisées sur un seul échantillon sans triplicat d'analyse. Il peut donc y avoir des erreurs sur les valeurs obtenues lors des analyses. Les données du réseau français de surveillance des phycotoxines (REPHY réseau de surveillance du phytoplancton et des phycotoxines) sont principalement basées sur des résultats de test souris. Peu de points sont disponibles sur un même site lors d'une contamination et d'une détoxification. De plus, les paramètres environnementaux ne sont pas toujours suivis sur les mêmes sites. Il est donc préférable d'utiliser des données conçues spécialement pour mettre en place le modèle.

Dans ces études, il a été choisi de remplacer le coefficient de détoxification par une équation linéaire dépendant des variables environnementales. Cependant, cette équation

linéaire n'est peut être pas la mieux adaptée. En effet, l'effet de la température sur la physiologie du mollusque (filtration, consommation..) est souvent décrite comme suivant une forme associée à la loi d'Arrhenius (van der Meer 2006). De plus, la dépendance de la vitesse de détoxification par rapport à la concentration en matière organique ne suit pas forcément une loi linéaire. Les jeux de données disponibles ne nous permettent toutefois pas de proposer des structures plus complexes avec un plus grand nombre de paramètres. Il est à noter que sur ces jeux de données le sous-échantillonnage limite la qualité des ajustements paramétriques.

Pour mieux identifier les paramètres environnementaux jouant un rôle dans la cinétique de détoxification ainsi que leur mode d'action, il est nécessaire de réaliser des expériences en laboratoire afin de déterminer l'influence de chaque paramètre. Il faudrait réaliser de nouvelles expériences sur l'effet de la matière organique pour déterminer s'il existe ou non un seuil et quelle est l'allure générale de la courbe, puis valider ces données en suivant une détoxification dans le milieu naturel.

De plus, lors des longues périodes de détoxification, le volume individuel des moules change beaucoup, pouvant entraîner la dilution apparente de la toxine. Il serait donc intéressant de pouvoir connaître les variations de poids corporel au cours des cinétiques. Pour cela il faudrait utiliser des modèles de croissance déjà existant comme les modèles DEB (Dynamic Energy Budget). Ces modèles ont été développées par Kooijman, pour un organisme individuel, et décrivent les taux d'assimilation de l'organisme ainsi que les taux d'utilisation de l'énergie pour sa maintenance, sa croissance et sa reproduction en fonction du stade physiologique et de l'environnement. L'état physiologique prend en compte l'âge, la taille et les quantités de réserves. Les facteurs environnementaux généralement pris en compte sont la densité en particules alimentaires et la température. Le modèle DEB est basé sur la loi  $\kappa$ . Les produits assimilés entrent dans le pool de réserves. Une fraction  $\kappa$  est allouée à la maintenance et à la croissance, le reste des réserves ( $1-\kappa$ ) sert au développement et à la reproduction. Il serait évidemment intéressant de pouvoir coupler un modèle de croissance de type DEB avec un modèle de contamination / détoxification. Cependant ce modèle demanderait à être ajusté en fonction de la concentration en phycotoxines dans le mollusque. En effet, Li et al. (2002) ont observé une diminution de la croissance de deux mollusques en association avec la présence de toxines PSP dans leurs tissus. Les taux d'assimilation devraient également être modifiés pour pouvoir prendre en compte la toxicité des microalgues toxiques, le ratio algue toxique / algue non toxique et la concentration en microalgues toxiques. L'utilisation d'un couplage de modèle de croissance avec un modèle de contamination / détoxification pourrait être un atout pour décrire les cinétiques dans le milieu naturel. Cependant

l'utilisation de modèles couplés nécessite encore un grand nombre d'ajustement pour bien décrire le modèle notamment en présence de phycotoxines.

## 6 Discussion

La mise en place de modèles prenant en compte les différents tissus n'améliore pas l'ajustement du modèle. Un modèle à deux compartiments du type glande digestive et autres tissus permet de décrire de la même façon la cinétique d'accumulation des toxines. Lors de l'essai de validation du modèle, construit à partir des données de contamination, sur des données de détoxification, il a été mis en évidence que les coefficients en contamination et en détoxification sont différents ou que les coefficients obtenus ne sont pas suffisamment robustes. Cependant, si le coefficient de détoxification est délimité dans une zone plus restreinte correspondant aux maxima et minima déjà observés dans d'autres expériences, cela va permettre d'obtenir un jeu de données plus robuste mais va également dénaturer la minimisation de l'ajustement du modèle.

Lors de la détoxification, peu ou pas de biotransformations sont observables chez les huîtres et chez les moules contenant respectivement des toxines PSP et des toxines DSP. Il est important de noter que la cinétique de détoxification des huîtres contaminées par *A. minutum* (AM89BM) est gouvernée par GTX3 et GTX2. GTX2 présente une cinétique de détoxification plus lente que les autres composés comme chez *Spisula solidissima* (Silvert et al. 1998).

La prise en compte de l'influence des variables environnementales a permis de confirmer l'influence de la matière organique décrite de manière expérimentale dans le chapitre 3-2.

En résumé, la cinétique de détoxification des huîtres contenant des toxines paralysantes peut être décrite à l'aide d'un modèle à deux compartiments tissulaires : la glande digestive et les autres tissus. La vitesse de détoxification des tissus devrait être fonction du ratio GTX3/GTX2 et des variables environnementales. Pour les moules contenant des toxines DSP, un modèle à un compartiment prenant en compte les variables environnementales semble suffisant.

The implementation of models taking into account the different tissues does not improve substantially the adjustment of the model. A two-compartment model (of the "digestive gland and other tissues" type) allows to describe toxin accumulation kinetics in a similar way. During validation

assay of the model built from the contamination data, detoxification data were used and it was shown that contamination and detoxification coefficients were different or that obtained coefficients were not strong enough. However, if detoxification coefficient is restricted to a zone corresponding to maxima and minima already observed in the other experiments, it will allow to obtain a stronger dataset but it will also distort the minimization of model adjustment.

During detoxification, little or no biotransformations are observed either in oysters or in mussels containing respectively PSP and DSP toxins. It is important to note that detoxification kinetics of oysters contaminated by *A. minutum* (AM89BM) is regulated by GTX3 and GTX2. GTX2 displays detoxification kinetics slower than other compounds, like in *Spisula solidissima* (Silvert and al. 1998).

Considering environmental variables influence allowed to confirm the influence of the organic matter as experimentally described in the chapter 3-2.

In summary, detoxification kinetics of PSP-contaminated oysters can be described by means of a two-compartment model (digestive gland and other tissues). Detoxification rates of tissues should be a function of the GTX3 / GTX2 ratio and of the environmental variables. For mussels containing DSP toxins, a one-compartment model taking into account environmental variables seems sufficient.



## **Conclusions et perspectives**



L'objectif de ce travail de thèse était de mettre en place des modèles permettant de décrire la cinétique de détoxification des huîtres *Crassostrea gigas* et des moules *Mytilus edulis* contenant respectivement des toxines paralysantes et des toxines diarrhéiques.

Deux grandes parties ont été développées pour répondre à cet objectif, une première basée sur la compréhension du devenir de la toxine une fois entrée dans le système digestif du mollusque. La seconde partie s'est intéressée à la formalisation mathématique des connaissances bibliographiques et des résultats obtenus lors de ce travail afin de décrire les cinétiques de détoxification.

### **Un devenir différent des Dinoflagellés en fonction de la paroi cellulaire**

Les dinoflagellés toxiques entrent par la bouche, cheminent le long de l'œsophage avant de se retrouver dans l'estomac du mollusque. A ce stade deux devenirs sont possibles en fonction de la nature de la paroi du dinoflagellé. D'une part, les Dinoflagellés ne pouvant pas former de kystes rapidement, comme *Dinophysis spp.*, vont être rapidement dégradés, libérant ainsi les toxines intracellulaires. D'autre part, les dinoflagellés à thèques épaisses capables de s'enkyster rapidement, comme *Alexandrium spp.*, vont pouvoir cheminer intacts dans le tube digestif ou produire des formes de résistances empêchant l'action des enzymes digestives ainsi que le broyage mécanique par le stylet. Les kystes vont ensuite être dirigés directement vers l'intestin et sont retrouvés entiers et revivifiables dans les fèces des mollusques. L'observation du temps nécessaire à une huître pour éliminer les kystes entiers d'*Alexandrium spp.* de son tube digestif a permis de mettre en place un modèle décrivant cette cinétique. Le modèle utilisé est de type « piston à dispersion axiale ». Ce modèle a été pris en compte lors des essais de modélisation, mais celui-ci correspond à des cinétiques de quelques heures. Or les données disponibles sur l'évolution des contenus toxiques ont une fréquence minimale de 24 heures. L'utilisation du modèle de transit intestinal dans la cinétique de contamination / détoxification ne présente pas un meilleur ajustement du modèle global. Cependant, ce modèle de transit pourrait être utilisé pour simuler des cinétiques plus rapides telles que le temps de transit des bactéries *Escherichia coli* dans le tube digestif de l'huître *Crassostrea gigas*. Ce modèle pourra être amélioré en considérant les vitesses de transfert en fonction des variables environnementales et plus particulièrement de la concentration en microalgues et de la température.

Certaines cellules d'*Alexandrium minutum* malgré leur capacité d'enkystement vont être dégradées principalement au niveau de l'estomac.

### **Un devenir différent en fonction de la nature de la phycotoxine considérée**

Lorsque les toxines DSP et PSP sont libérées dans l'estomac, elles peuvent suivre deux voies. Soit elles empruntent l'intestin, soit elles sont acheminées dans la glande digestive. La glande digestive est le siège de rétention principal des phycotoxines. Dans le cas des huîtres, les toxines PSP se répartissent dans les différents tissus selon des proportions différentes. La répartition des toxines dans les différents tissus s'effectue dès le premier jour de contamination des huîtres. La glande digestive constitue  $64 \pm 10 \%$ , le manteau  $11 \pm 4 \%$ , la gonade  $16 \pm 10 \%$ , les branchies  $6 \pm 2 \%$  et le muscle  $2 \pm 1\%$  du contenu toxinique total. Aucune donnée n'existe pour le moment sur les voies de transfert impliquées dans la répartition des toxines dans les différents tissus. Une voie envisageable pourrait être le transfert des toxines par les hémocytes.

Les toxines diarrhéiques sont principalement localisées dans la glande digestive où la toxine semble séquestrée. Nos résultats sur la localisation subcellulaire de l'AO sont encourageantes et permettent de mettre en place un début d'explication des processus entrant en jeu dans la rétention des toxines DSP. Nos observations ont permis de souligner une relation entre l'activité lysosomale et la quantité de toxines présente dans les différentes fractions obtenues par ultracentrifugation. De plus, les acyles d'AO et de DTX1 sont uniquement localisés dans les fractions constituées par des organites et non dans le cytosol. L'AO et les DTX1 ont été retrouvés dans les fractions contenant des organites et dans la fraction lysosomale. L'AO pourrait entrer dans la cellule digestive sous forme libre, soit par endocytose, soit par transfert à travers la membrane (Daranas et al. 2007). Une fois entré dans la cellule, l'AO serait dirigé vers les lysosomes où aurait lieu son acylation. L'AO serait ensuite séquestré sous cette forme jusqu'à la mort du lysosome. Des études complémentaires sont nécessaires pour confirmer le rôle des lysosomes dans la séquestration des organites. Les modèles de Moore et al. (2001, 2002) pourraient ensuite être développés et appliqués par rapport aux transferts des toxines dans la cellule de la glande digestive.

### **Un impact important de la nourriture sur la cinétique de détoxification**

Bien qu'évoqué par différents auteurs, l'impact de la matière en suspension n'a jamais été clairement identifié. Nos deux études réalisées sur les huîtres contenant des toxines PSP et sur les moules contenant de toxines DSP, ont nettement mis en évidence le rôle de la matière en suspension et plus précisément de la matière organique sur la cinétique de détoxification. Cet impact a été confirmé lors de la modélisation de la cinétique des moules contenant des toxines DSP. Ce résultat est important aussi bien pour la modélisation que pour la mise en

place d'un procédé de détoxification. Cependant, des travaux supplémentaires sont nécessaires afin, de pouvoir traduire mathématiquement la réponse de la matière organique et d'optimiser les conditions de détoxification. Il est nécessaire d'optimiser les concentrations de microalgues ajoutées, l'espèce utilisée et sa nature (apport sous la forme de microalgues vivantes ou de pâte d'algue). Il serait pertinent également de tester l'influence des lipides présents dans les différentes espèces de microalgues sur la cinétique de détoxification des moules contenant des toxines diarrhéiques. Il faudrait travailler sur la mise au point d'un procédé économiquement viable, permettant de traiter un grand nombre d'individus et de réduire significativement le temps nécessaire de détoxification par rapport au milieu naturel.

### **La modélisation de la cinétique de détoxification des huîtres contenant des toxines paralysantes : vers un modèle à deux compartiments.**

Nos études sur la modélisation de la détoxification ont mis en avant l'agrégation possible d'un modèle à sept compartiments à un modèle à cinq compartiments puis à un modèle à deux compartiments, prenant en compte l'évolution toxinique dans la glande digestive et dans les autres tissus. Les coefficients de détoxification semblent dépendre des différents ratios entre composés toxiques. Dans notre cas, c'est la proportion respective entre GTX3 et GTX2 qui semble gouverner une grande partie de la cinétique de détoxification. Des études de détoxification d'huîtres contaminées par une autre souche d'*Alexandrium minutum* (AM89BM) pourraient permettre de continuer à investiguer les différents composés impliqués dans cette cinétique. Il serait important de mettre en place des modèles prenant en compte l'influence des variables environnementales.

### **La modélisation de la cinétique de détoxification des moules contenant des toxines diarrhéiques : vers un modèle à un compartiment.**

Nos essais de modélisation ont souligné la possibilité d'agréger un modèle à deux compartiments en un modèle à un compartiment. L'influence des variables environnementales, et principalement de la matière organique a été mise en évidence. Des études complémentaires s'avèrent nécessaires pour mieux connaître et formaliser l'impact de la matière organique sur le taux de détoxification. D'autres facteurs environnementaux tels que la salinité et la matière inorganique pourraient être pris en compte. L'influence des variables intrinsèques est un point important qui nécessiterait d'être développé.

## **De la modélisation à la prédiction**

Les modèles mis en place dans cette étude concernent deux couples bivalves - phycotoxines. Il serait intéressant de travailler sur la mise en place de modèle de détoxification de moules contenant des PSP et, symétriquement, d'huîtres contenant des DSP afin de savoir si le modèle est dépendant des bivalves ou des phycotoxines ou des deux. Les modèles de détoxification demandent à être approfondis mais surtout à être couplés avec un modèle de contamination. Beaucoup de travail reste encore à faire dans ce domaine notamment pour les contaminations avec des cellules de *Dinophysis* spp.. Une fois un modèle de contamination / detoxication dans le milieu naturel mis en place, on pourra le coupler au modèle de prédiction des blooms phytoplanctoniques. Ces deux modèles couplés pourront à long terme être un outil essentiel pour les réseaux de surveillance et la gestion des zones à risques.

The aim of this work was to implement models assumed to describe detoxification kinetics of oysters *Crassostrea gigas* and mussels *Mytilus edulis* containing respectively paralytic and diarrheic toxins.

To achieve this aim two sections were developed, the first one based on the understanding of toxin fate once entered in mollusc digestive system, the second one assumed to reach a better description of detoxification kinetics and, therefore, dealing with mathematical formalization of data from the literature as well as results obtained during this work.

### **To what extent cell walls structure may affect Dinoflagellate fate ?**

Toxic dinoflagellate enters by the mouth, pass through the oesophagus before ending in mollusc stomach. At this stage two changes may occur according to the nature of Dinoflagellate cell wall. On one hand, Dinoflagellate which cannot form temporary cysts, like *Dinophysis* spp., will be rapidly degraded , so releasing their intracellular toxin. On the other hand, thecate Dinoflagellate able to produce temporary cysts, like *Alexandrium* spp will move intact in the digestive tract or produce resistance stages thus preventing digestive enzymes action as well as mechanical grinding by the stylet. Then, Cysts are driven directly to the intestine and are found intact and reviving in mollusc faeces. Observing the time needed for an oyster to eliminate *Alexandrium* spp intact cysts. from digestive tract allowed to set up a model describing these kinetics. The model used is of the " piston with axial dispersal " type. This model was considered during modelling trial, but this one corresponds to short term (a few hours) kinetics. However, data available on the evolution of toxin contents have a minimal frequency of 24 hours. The use of the 'intestinal transit' model in the contamination / detoxication kinetics does not present a better adjustment of the global model. However, this ' transit'

model could be used to simulate faster kinetics such as bacterium *Escherichia coli* transit time in the digestive duct of the oyster *Crassostrea gigas*. This model can be improved by considering transfer speeds as functions of the environmental variables and more particularly microalgae concentration and the temperature.

In spite of their ability to rapidly encyst some cells of *Alexandrium minutum* will be degraded mainly at the stomach level.

#### **A different fate according to phycotoxin nature**

When DSP and PSP toxins are released in the stomach, they can follow two ways : . either the intestine, or the digestive gland. The digestive gland is the main site for phycotoxin retention. Regarding oyster, PSP toxins divide up in the different tissues, as soon as the first day contamination, and at different proportions. As parts of the whole toxin body burden digestive gland is  $64 \pm 10 \%$ , mantle  $11 \pm 4 \%$ , gonad  $16 \pm 10 \%$ , gills  $6 \pm 2 \%$  and muscle  $2 \pm 1 \%$ . So far, no data are available on the transfer routes involved in toxin distribution in the different tissues. A possible way could be the transfer of toxin by haemocytes.

Diarrheic toxins are mainly located in the digestive gland where they seem to be sequestered. Our results on OA subcellular localization are promising and represents the first step of a complete understanding of the processes involved in DSP toxin retention. Our observations have underlined a relation between lysosomal activity and the relative amount of toxin in the different fractions obtained by ultracentrifugation. Furthermore, OA and DTX1 acyls are only localized in the organelles- and not in the cytosol fractions. OA and DTX1 were found in the organelle- and in the lysosome fractions. OA could enter digestive cells as free OA, either by endocytose, or by transfer through the membrane (Daranas et al. 2007). Once in the cell, AO would be driven towards lysosomes where its acylation would take place. OA would then be sequestered under this configuration up to lysosome death. Follow-up studies are necessary to confirm the role of lysosomes in the retention mechanism. Then the Moore et al. (2001, 2002) models could be developed and applied with regard to toxin transfers in digestive gland cells.

#### **An important impact of food on detoxification kinetics**

Although mentioned by different authors, the impact of total suspended matter was never clearly identified. Our two studies carried out on PSP-contaminated oysters and on DSP-contaminated mussels, drastically evidenced the role of total suspended matter - and more exactly organic matter - on detoxification kinetics. This impact was confirmed when modelling kinetics of DSP-contaminated mussels. This result is important for the modelling as well as for the implementation of a detoxification process. However, additional works are needed to mathematically express organic matter response and to optimize detoxification conditions Optimizing concentrations and nature of added microalgal species is really necessary. It would be worth developing an economically viable

process, allowing to treat individuals large numbers and to significantly reduce detoxication time as far as natural environment is concerned.

**Modelling detoxification kinetics of PSP-contaminated mussels: towards a two-compartment model.**

Our studies on detoxification modelling put forward the possible aggregation of a seven-compartment model with a five-compartments model and then with a two-compartment model, taking into account toxin evolution in the digestive gland and in the other tissues. The detoxification coefficients seem to depend on various ratios between toxin compounds. In our case, it is the respective proportion between GTX3 and GTX2 that seems to control a large part of detoxification kinetics. Detoxification studies of oysters contaminated by another *Alexandrium minutum* strain (AM89BM) could allow further investigation on the various compounds involved in these kinetics. It would be important to set up models taking into account the influence of environmental variables.

**Modelling detoxification kinetics of DSP-contaminated mussels: towards a one- compartment model**

Our modelling trials have underlined the possibility of aggregating a two-compartment model into one-compartment model. Environmental variable influence, mainly organic matter, was revealed. Additional studies turned out to be necessary for a better knowledge and formalization of the organic matter impact upon detoxification rate. Other environmental factors such as salinity and inorganic matter could be taken into account. The influence of intrinsic variables is an important item which would require further development.

**From modelling to prediction**

Models developed in this study were dealing with two bivalve / phycotoxins couples. In the future, it would be interesting to work on the implementation of detoxification model of PSP-contaminated mussels and, symmetrically, DSP-contaminated oysters to know if the model is depending on bivalves or on phycotoxins or both. The detoxification models requires further studies but especially needs to be coupled with a contamination model. A lot of work still remains to be undertaken in this context in particular the contamination by *Dinophysis spp.* cells. Once contamination / detoxication model set up in natural environment, it could be coupled with a predictive model applying to phytoplankton blooms. Later on these two coupled models could be an essential networking tool for the the management of "risky areas".

# **Bibliographie**



## A

- Abouabdellah R, Taleb H, Bennouna, Erler K, chafik A, Moukrim A (2008) Paralytic shellfish poisoning toxin profile of mussels *Perna perna* from southern Atlantic coasts of Morocco. *Toxicon* 51:780-786
- Amiard JC, Perrein-Ettajani H, Gérard A, Baud JP, Amiard-Triquet C (2005) Influence of ploidy and metal-metal interactions on the accumulation of Ag, Cd, and Cu in oysters *Crassostrea gigas* Thunberg. *Environmental Contamination and Toxicology* 48:68-74
- Amzil Z, Fresnel J, Le Gal D, Billard C (2001) Domoic acid accumulation in French shellfish in relation to toxic species of *Pseudo-nitzschia multiseriata* and *P-pseudodelicatissima*. *Toxicon* 39:1245-1251
- Amzil Z, Vernoux JP, Pottier I (2001) Les principales classes de phycotoxines. In: Frémy JM, Lassus P (eds) *Toxines d'algues dans l'alimentation*. Ifremer- afssa
- Andrasi A (1985). Uptake of dissolved Gonyaulax catenella from seawater by Mytilus edulis Linne. *Toxic Dinoflagellates* In: Anderson DM, White, A.W., Baden, D.G. (ed) *Toxic Dinoflagellates*. Elsevier, New york, p 473-478
- Artigas ML, Vale PJV, Gomes SS, Botelho MJ, Rodrigues SM, Arnorim A (2007) Profiles of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish from Portugal explained by carbamoylase activity. *Journal of Chromatography A* 1160:99-105

## B

- Bailley F (2006) Research and development of an accelerated detoxification system for live marine shellfish contaminated by algal PSP toxins. In: SHELLFISH report, Deliverable Δ28, CRAFT contract QLK1. 2002- 72076 105 pp.
- Baker SM, Levinton JS, Ward JE (2000) Particle transport in the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Bio. Bull.* 199:116-25
- Bardouil M, Bohec M, Cormerais M, Bougrier S, Lassus P (1993) Experimental study of the effects of the toxic microalgal diet on feeding of the oyster *Crassostrea gigas* Thunberg. *Journal of Shellfish Research* 12:417-422
- Barillé L, Cognie B (2000) Revival capacity of diatoms in bivalve pseudofaeces and faeces. *Diatom Research* 15:11-17
- Barillé L, Haure J, Cognie B, Leroy A (2000) Variations in pallial organs and eulatero-frontal cirri in response to high particulate matter concentrations in the oyster *Crassostrea gigas*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 57, 837-843.
- Barillé L, Haure J, Pales-Espinosa E, Morancais M (2003) Finding new diatoms for intensive rearing of the pacific oyster (*Crassostrea gigas*): energy budget as a selective tool. *Aquaculture* 217:501-514

- Barille L, Heral M, BarilleBoyer AL (1997) Ecophysiological deterministic model for *Crassostrea gigas* in an estuarine environment. *Aquatic Living Resources* 10:31-48
- Baron R, Couedel M, Joret C, Garen P, Truquet P, Masselin P, Bardouil M, Lassus P (2006) Continuous fluorescence recording as a way to improve Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) models of paralytic shellfish toxin accumulation. *Aquatic Living Resources* 19:77-84
- Bauder AG, Cembella AD (2000) Viability of the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* following ingestion and gut passage in the bay scallop *Argopecten irradians*. *Journal of Shellfish Research* 19:321-324
- Bauder AG, Cembella AD, Bricelj VM, Quilliam MA (2001) Uptake and fate of diarrhetic shellfish poisoning toxins from the dinoflagellate *Prorocentrum lima* in the bay scallop *Argopecten irradians*. *Marine Ecology-Progress Series* 213:39-52
- Belin C (1998) French phytoplankton monitoring: an exploration of optimum data presentation. *Ices Journal of Marine Science* 55:705-710
- Beninger PG, Cannuel R, Jaunet S (2005). Particle processing on the gill plicae of the oyster *Crassostrea gigas*: fine-scale mucocyte distribution and functional correlates. *Marine Ecology-Progress Series* 295, 191-199.
- Beninger PG, Le Pennec M, Donval A (1991) Mode of particle ingestion in five species of suspension-feeding bivalve molluscs. *Marine Biology* 108:255-261
- Beninger PG, StJean SD (1997) Particle processing on the labial palps of *Mytilus edulis* and *Placopecten magellanicus* (Mollusca: Bivalvia). *Marine Ecology-Progress Series* 147, 117-127.
- Beninger PG, Stjean SD, Poussart Y (1995) Labial palps of the blue mussel *Mytilus edulis* (Bivalvia, Mytilidae). *Marine Biology* 123, 293-303.
- Blanco J (2004) Modelling phycotoxins accumulation in bivalves: a review 5th International Conference on Molluscan Shellfish Safety, Galway
- Blanco J, Cano J, Marino MDC, Campos MJ (2006) Effect of phytoplankton containing paralytic shellfish and amnesic shellfish toxins on the culture of the king scallop *Pecten maximus* in Malaga (SE Spain). *Aquatic Living Resources* 19:267-273
- Blanco J, Fernandez ML, Marino J, Reguera B, Miguez A, Maneiro J, Cacho E, Martinez A (1995) From Dinophysis spp. toxicity to DSP outbreaks: a preliminary model of toxin accumulation in mussels. In: Lassus P, Arzul G, Erard E, Gentien P, Marcaillou C (eds). Lavoisier-Intercept Ltd, Paris, p 777-782
- Blanco J, Fernandez ML, Miguez A, Morono A (1999) Okadaic acid depuration in the mussel *Mytilus galloprovincialis*: one- and two-compartment models and the effect of environmental conditions. *Marine Ecology-Progress Series* 176:153-163

- Blanco J, Marino C, Martin H, Acosta CP (2007) Anatomical distribution of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicon* 50:1011-1018
- Blanco J, Morono A, Fernandez ML (2005) Toxic episodes in shellfish, produced by lipophilic phycotoxins: An overview. *Revista Galega de Recursos Mariños* 1:1-70
- Blanco J, Morono A, Franco J, Reyero MI (1997) PSP detoxification kinetics in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. One- and two-compartment models and the effect of some environmental variables. *Marine Ecology-Progress Series* 158:165-175
- Blanco J, Reyero I, Franco J (2003) Kinetics of accumulation and transformation of paralytic shellfish toxins in the blue mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicon* 42:777-784
- Blogoslawski WJ, Stewart ME (1978) Paralytic shellfish poison in *Spisula solidissima*-Anatomical location and ozone detoxification. *Marine Biology* 45:261-264
- Blogoslawski WJ, Stewart ME, Hurst JW, Kern FG (1979) Ozone detoxification of paralytic shellfish poison in the softshell clam (*Mya arenaria*). *Toxicon* 17:650-654
- Boucaud-Camou E, Lebesnerais C, Lubet P, Lihmann I (1983) Dynamique et enzymologie de la digestion chez l'huître *Crassostrea gigas* Bases biologiques de l'aquaculture. Ifremer, Montpellier, p 75-96
- Boyce SJ, Murray AWA, Peck LS (2000) Digestion rate, gut passage time and absorption efficiency in the Antarctic *Spiny plunderfish*. *Journal of Fish Biology* 57:908-929
- Bricelj VM, Connell L, Konoki K, MacQuarrie SP, Scheuer T, Catterall WA, Trainer VL (2005) Sodium channel mutation leading to saxitoxin resistance in clams increases risk of PSP. *Nature* 434:763-767
- Bricelj VM, Greene M, Cembella AD (1993) Growth of the blue mussel *Mytilus edulis* on toxic *Alexandrium fundyense* and effects of gut passage on dinoflagellate cells. In: Smayda TJ, Shimizu Y (eds) *Toxic phytoplankton blooms in the sea water*, Vol 3. Elsevier New york, p 371-376
- Bricelj VM, Shumway SE (1998a) An overview of the occurrence and transfer kinetics of paralytic shellfish toxins in Bivalve molluscs. In: Reguera B, Blanco J, Fernandez ML, Wyatt T (eds) *Harmful Algae*, p 431-436
- Bricelj VM, Shumway SE (1998b) Paralytic shellfish toxins in bivalve molluscs: occurrence, transfert kinetics and biotransformation. *Fisheries Science* 6:315-383
- Burkholder JM, Hallegraeff GM, Melia G, Cohen A, Bowers HA, Oldach DW, Parrow MW, Sullivan MJ, Zimba PV, Allen EH, Kinder CA, Mallin MA (2007) Phytoplankton and bacterial assemblages in ballast water of US military ships as a function of port of origin, voyage time, and ocean exchange practices. *Harmful Algae* 6:486-518

## C

- Cardoso J, Langlet D, Loff JF, Martins AR, Witte JIJ, Santos PT, van der Veer HW (2007) Spatial variability in growth and reproduction of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) along the west European coast. *Journal of Sea Research* 57, 303-315.
- Carriker MR (1992) Introductions and transfers of molluscs: risk considerations and implications. *Journal of Shellfish Research* 2:507-510
- Chedid HA, Cembella AD, Anderson DM (1993) Differential paralytic shellfish accumulation and detoxification kinetics in transplanted populations of *Mytilus edulis* exposed to natural blooms of *Alexandrium excavatum*. In: Smayda TJ, Shimizu Y (eds) *Toxic Phytoplankton Blooms in the sea*. Elsevier, New York, p 383-388
- Chen CY, Chou HN (2002) Fate of paralytic shellfish poisoning toxins in purple clam *Hiatula rostrata*, in outdoor culture and laboratory culture. *Marine Pollution Bulletin* 44:733-738
- Choi MC, Yu PKN, Hsieh DPH, Lam PKS (2006) Trophic transfer of paralytic shellfish toxins from clams (*Ruditapes philippinarum*) to gastropods (*Nassarius festivus*). *Chemosphere* 64:1642-1649
- Cognie B, Barille L, Rince E (2001) Selective feeding of the oyster *Crassostrea gigas* fed on a natural microphytobenthos assemblage. *Estuaries* 24:126-134
- Collins C, Graham J, Brown L, Bresnan E, Lacaze JP, Turrell EA (2009) Identification and toxicity of *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae) in scottish waters. *Journal of Phycology* 45:692-703
- Connell LB, MacQuarrie SP, Twarog BM, Iszard M, Bricelj VM (2007) Population differences in nerve resistance to paralytic shellfish toxins in softshell clam, *Mya arenaria*, associated with sodium mutations. *Marine Biology* 150:1227-1236
- Cordier S, Monfort C, Miossec L, Richardson S, Belin C (2000) Ecological analysis of digestive cancer mortality related to contamination by diarrhetic shellfish poisoning toxins along the coasts of France. *Environmental Research* 84:145-150

## D

- Dahl E, Johannessen T (2000) Relationship between occurrence of Dinophysis species (Dinophyceae) and shellfish toxicity 9th International Conference on Harmful Algal Blooms, Hobart, Australia, p 223-227
- Daranas AH, Cruz PG, Creus AH, Norte M, Fernandez JJ (2007) Self-assembly of okadaic acid as a pathway to the cell. *Organic Letters* 9:4191-4194
- Deslous-Paoli JM, Lannou AM, Geairon P, Bougrier S, Raillard O, Heral M (1992) Effects of the feeding-behavior of *Crassostrea gigas* (Bivalve mollusks) on biosedimentation of naturel particulate matter. *Hydrobiologia* 231, 85-91.

- Domouhtsidou GP, Dimitriadis VK (2000) Ultrastructural localization of heavy metals (Hg, Ag, Pb, and Cu) in gills and digestive gland of mussels, *Mytilus galloprovincialis* (L.). Archives of Environmental Contamination and Toxicology 38:472-478
- Duchemin MB, Fournier M, Auffret M (2007) Seasonal variations of immune parameters in diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thuenberg). Aquaculture 264:73-81
- Duinker A, Bergslien M, Strand O, Olseng CD, Svardal A (2007) The effect of size and age on depuration rates of diarrhetic shellfish toxins (DST) in mussels (*Mytilus edulis* L.). Harmful Algae 6:288-300
- Dupuy C, Le Gall S, Hartmann HJ, Breret M (1999) Retention of ciliates and flagellates by the oyster *Crassostrea gigas* in French Atlantic coastal ponds: protists as a trophic link between bacterioplankton and benthic suspension-feeders. Marine Ecology-Progress Series 177:165-175
- Dukerma R (1992) Large-scale recirculation systems for storage of imported bivalves as a means to counteract introduction of cysts of toxic dinoflagellates in the coastal waters of the Netherlands. In: Poggi R, Le Gall JY (eds) Purification des coquillages. Ifremer, Rennes

## E-F

- Estrada A, Ascencio F, Contreras RG, Cerejido M, Shoshani L, Torres R, Lagos N (2007) Absorption of paralyzing toxins from the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* in giant lions-paw scallop *Nodipecten subnodosus*. Journal of Shellfish Research 26:1309-1309
- Einsporn S, Bressling J, Koehler A (2009) Cellular localization of the lead an antibody-based detection system and enzyme activity changes in the gills and digestive gland of the blue mussel *Mytilus edulis*. Environmental Toxicology and Chemistry 28:402-408
- Einsporn S, Koehler A (2008) Electron-microscopic localization of lipophilic chemicals by an antibody-based detection system using the blue mussel *Mytilus edulis* as a model system. Environmental Toxicology and Chemistry 27:554-560
- FAO (2004) Marine Biology Rome
- FAO (2009)
- Fast MD, Cembella AD, Ross NW (2006) In vitro transformation of paralytic shellfish toxins in the clams *Mya arenaria* and *Protothaca staminea*. Harmful Algae 5:79-90
- Fernandez ML, Miguez A, Morono A, Cacho E, Martinez A, Blanco J (1998) Detoxification of low polarity toxins (DTX3) from mussels *Mytilus galloprovincialis* in Spain. In: Reguera B, Blanco J, Fernandez ML, Wyatt T (eds) Harmful Algae. Xunta de Galicia and Int. Oceanographic Com. UNESCO, Santiago de Compostela, p 449-442

- Fernandez ML, Shumway SE, Blanco J (2003) Management of shellfish resources In: Hallegraeff GM, D.M. A, Cembella AD (eds) Manual on harmful marine microalgae. IOC Manuals and guides, p 657-692
- Frémy JM, Lassus P (2001) Toxines d'algues dans l'alimentation.
- Figueroa RI, Bravo I, Garces E (2005) Effects of nutritional factors and different parental crosses on the encystment and excystment of *Alexandrium catenella* (Dinophyceae) in culture. *Phycologia* 44:658-670
- Fux E, Bire R, Hess P (2009) Comparative accumulation and composition of lipophilic marine biotoxins in passive samplers and in mussels (*M. edulis*) on the West Coast of Ireland. *Harmful Algae* 8:523-537
- Fux E, Marcaillou C, Mondeguer F, Bire R, Hess P (2008) Field and mesocosm trials on passive sampling for the study of adsorption and desorption behaviour of lipophilic toxins with a focus on OA and DTX1. *Harmful Algae* 7:574-583

## G-H-I

- Gainey LF, Shumway SE (1988) A compendium of the response of bivalve molluscs to toxic dinoflagellates. *Journal of Shellfish Research* 7, 623-628.
- Galimany E, Sunila I, Hegaret H, Ramon M, Wikfors GH (2008a) Experimental exposure of the blue mussel (*Mytilus edulis*, L.) to the toxic dinoflagellate *Alexandrium fundyense*: Histopathology, immune responses, and recovery. *Harmful Algae* 7:702-711
- Galimany E, Sunila I, Hegaret H, Ramon M, Wikfors GH (2008b) Pathology and immune response of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.) after an exposure to the harmful dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. *Harmful Algae* 7:630-638
- Garnier-Géré PH, Naciri-Graven Y, Bougrier S, Magoulas A, Héral M, Kotoulas G, Hawkins A, Gérard A (2002) Influence of triploidy, parentage and génétic diversity on growth of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* reared in constrasting natural environments. *Molecular Ecology* 11:1499-1514
- Garthwaite I (2000) Keeping shellfish safe to eat: a brief review of shellfish toxins, and methods for their detection. *Trends in Food Science & Technology* 11:235-244
- Gueguen M, Bardouil M, Baron R, Lassus P, Truquet P, Massardier J, Amzil Z (2008a) Detoxification of Pacific oyster *Crassostrea gigas* fed on diets of *Skeletonema costatum* with and without silt, following PSP contamination by *Alexandrium minutum*. *Aquatic Living Resources* 21:13-20
- Gueguen M, Lassus P, Laabir M, Bardouil M, Baron R, Sechet V, Truquet P, Amzil Z, Barille L (2008b) Gut passage times in two bivalve molluscs fed toxic microalgae: *Alexandrium minutum*, *A-catenella* and *Pseudo-nitzschia calliantha*. *Aquatic Living Resources* 21:21-29

- Haberkorn H, Lambert C, Le Goïc N, Gueguen M, Moal J, Palacios E, Lassus P, Soudant P, Effects of *Alexandrium minutum* exposure on physiological and hemocyte variables of the oyster *Crassostrea gigas*. Soumis en juin 2009 à Aquatic Toxicology
- Haure J, Penisson C, Bougrier S, Baud JP (1998) Influence of temperature on clearance and oxygen consumption rates of the flat oyster *Ostrea edulis*: determination of allometric coefficients. *Aquaculture* 169:211-224
- Hallegraeff GM (1995) 1. Harmful algal blooms: a global overview. In: Hallegraeff GMea (ed) Manual on Harmful Marine Microalgae. IOC Manuals and Guides N°33 UNESCO, p 1-22
- Hawkins A, Day AJ (2003) The metabolic basis of genetic differences in growth efficiency among marine animals. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 203:93-115
- Hawkins AJS, Bayne BL, Bougrier S, Heral M, Iglesias JIP, Navarro E, Smith RFM, Urrutia MB (1998) Some general relationships in comparing the feeding physiology of suspension-feeding bivalve molluscs. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 219, 87-103.
- Hegaret H, da Silva PM, Sunila I, Shumway SE, Dixon MS, Alix J, Wikfors GH, Soudant P (2009) Perkinsosis in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* affects responses to the harmful-alga, *Prorocentrum minimum*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 371:112-120
- Hess P, McMahon T, Slatery D, Swords D, Dowling G, McCarron M (2003) Use of LC-MS testing to identify lipophilic toxins, to establish local trends and interspecies differences and to test the comparability of LC-MS testing with mouse bioassay: an example from the Irish biotoxin monitoring programme 2001. In: Villarba A, Reguera B, Romalde JL, Beiras R (eds) Molluscan shellfish safety. Conselleria de Pesca e Asuntos Maritimos, Xunta de Galicia and IOC of UNESCO Santiago de Compostela, p 57-66
- Ichimi K, Yamasaki M, Okumura Y, Suzuki T (2001) The growth and cyst formation of a toxic dinoflagellate, *Alexandrium tamarense*, at low water temperatures in northeastern Japan. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 261:17-29
- Ignatiades L, Gotsis-Skretas O, Metaxatos A (2007) Field and culture studies on the ecophysiology of the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* (Halim) present in Greek coastal waters. *Harmful Algae* 6:153-165

## J-K

- Jaen D, Maman L, Dominguez R, Martin E (2009) First report of *Dinophysis acuta* in culture. *Harmful Algae News* 39:1-2
- Jaime E, Gerds G, Luckas B (2007) In vitro transformation of PSP toxins by different shellfish tissues. *Harmful Algae* 6:308-316

- Jiang TJ, Niu T, Xu YX (2006) Transfer and metabolism of paralytic shellfish poisoning from scallop (*Chlamys nobilis*) to spiny lobster (*Panulirus stimpsoni*). *Toxicon* 48:988-994
- Jiang TJ, Wang DZ, Niu T, Xu YX (2007) Trophic transfer of paralytic shellfish toxins from the cladoceran (*Moina mongolica*) to larvae of the fish (*Sciaenops ocellatus*). *Toxicon* 50:639-645
- Jin D, Thunberg E, Hoagland P (2008) Economic impact of the 2005 red tide event on commercial shellfish fisheries in New England. *Ocean & Coastal Management* 51:420-429
- Kamiyama T, Suzuki T (2009) Production of dinophysistoxin-1 and pectenotoxin-2 by a culture of *Dinophysis acuminata* (Dinophyceae). *Harmful Algae* 8:312-317
- Kao CY (1993) Paralytic shellfish poisoning. In: Falconer IR (ed) *Algal Toxins in Seafood and drinking water*. Academic Press, San Diego, p 75-86
- Kat M (1979) The occurrence of *Prorocentrum* species and coincidental gastrointestinal illness of mussel consumers. In: Taylor DL, Seliger HH (eds) *Toxic Dinoflagellates Blooms*. Elsevier, Amsterdam, p 215-220
- Kesarcodi-Watson A, Klumpp DW, Lucas JS (2001) Comparative feeding and physiological energetics in diploid and triploid Sydney rock oysters (*Saccostrea commercialis*) - II. Influences of food concentration and tissue energy distribution. *Aquaculture* 203:195-216
- Kikuchi T, Sato M, Kaga Y, Sato K, Sato S, Ogata T, Kodama M (1996) Secondary contamination of scallops by ingestion of PSP toxins in the feces of adjacent highly toxic scallop. In: Yasumoto T, Oshima Y, Fukuyo Y (eds) *Harmful and toxic Algal Blooms*, p 413-415
- Kjørboe T, Møhlenberg F (1981) Particle selection in suspension feeding bivalves. *Marine Ecology-Progress Series* 5:291-296
- Koudjonou BK, Croué JP, Legube B (1996) Formation des ions bromate lors de l'ozonation des ions bromure en présence de matières organiques. *Revue des sciences de l'eau* 2:231-245
- Kvitek RG, Goldberg JD, Smith GJ, Doucette GJ, Silver MW (2008) Domoic acid contamination within eight representative species from the benthic food web of Monterey Bay, California, USA. *Marine Ecology-Progress Series* 367:35-47

## L

- Laabir M, Amzil Z, Lassus P, Masseret E, Tapilatu Y, De Vargas R, Grzebyk D (2006) Viability, growth and toxicity of *Alexandrium catenella* and *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) following ingestion and gut passage in the oyster *Crassostrea gigas* Conference on New Developments in Coastal Environment Research, Nantes, FRANCE, p 51-57

- Laabir M, Gentien P (1999) Survival of toxic dinoflagellates after gut passage in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* Thunberg. *Journal of Shellfish Research* 18:217-222
- Langdon CJ, Newell RIE (1996) Digestion and nutrition in larvae and adults. In: Kennedy VS, Newell RIE, Eble AF (eds) *The eastern oyster Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant College, p 231-270
- Landsberg JH, Hall S, Johannessen JN, White KD, Conrad SM, Abbott JP, Flewelling LJ, Richardson RW, Dickey RW, Jester ELE, Etheridge SM, Deeds JR, Van Dolah FM, Leighfield TA, Zou YL, Beaudry CG, Benner RA, Rogers PL, Scott PS, Kawabata K, Wolny JL, Steidinger KA (2006) Saxitoxin puffer fish poisoning in the United States, with the first report of *Pyrodinium bahamense* as the putative toxin source. *Environmental Health Perspectives* 114:1502-1507
- Lassus P, Amzil Z, Baron R, Sechet V, Barille L, Abadie E, Bardouil M, Sibat M, Truquet P, Berard JB, Gueguen M (2007) Modelling the accumulation of PSP toxins in Thau Lagoon oysters (*Crassostrea gigas*) from trials using mixed cultures of *Alexandrium catenella* and *Thalassiosira weissflogii*. *Aquatic Living Resources* 20:59-67
- Lassus P, Bardouil M, Baron R, Berard JB, Masselin P, Truquet P, Pitrat JP (2005) Improving detoxification efficiency of PSP contaminated oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aquaculture Europe*:3-6
- Lassus P, Bardouil M, Beliaeff B, Bougrier S, Gubbins M, Masselin P, Mornet F, Thébaud O, Truquet P (2002) Coquillage contaminés par des phycotoxines paralysantes: vers une procédure de détoxification, Vol
- 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). *Journal of Shellfish Research* 18:211-216
- Lassus P, Bardouil M, Berthome JP, Maggi P, Truquet P, Le Dean L (1988) Seasonal occurrence of *Dinophysis* sp. along the French coast between 1983 and 1987 *Aquatic Living Resources* 1:155-164
- 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). *Journal of Natural Toxins* 9:1-12
- Lassus P, Baron R, Garen P, Truquet P, Masselin P, Bardouil M, Leguay D, Amzil Z (2004) Paralytic shellfish poison outbreaks in the Penze estuary: Environmental factors affecting toxin uptake in the oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquatic Living Resources* 17:207-214
- Lassus P, Marcaillou-Le Baut C (2001) Contamination, transformation et détoxification des produits marins. In: Freymy JM, Lassus P (eds) *Toxines d'algues dans l'alimentation*. Ifremer

- Ledoux M, Bardouil M, Nezan E, Erard E (1991) Field and experimental studies of shellfish contaminated by *Alexandrium minutum* strain. In: Fremy JM, et al. (ed) The symposium on marine biotoxins, Paris, Centre national d'études vétérinaires et alimentaires, p 43-51
- Le Gall S, Hassen MB, Le Gall P (1997) Ingestion of a bacterivorous ciliate by the oyster *Crassostrea gigas*: protozoa as a trophic link between picoplankton and benthic suspension-feeders. *Marine Ecology Progress Series* 152:301-306
- Lekhi P, Cassis D, Pearce CM, Ebell N, Maldonado MT, Oriens K (2008) Role of dissolved and particulate cadmium in the accumulation of cadmium in cultured oysters (*Crassostrea gigas*). *Science of the Total Environment* 393, 309-325.
- Le Moullac G, Queau I, Le Souchu P, Pouvreau S, Moal J, Le Coz JR, Samain JF, (2009). Metabolic adjustments in the oyster according to oxygen level and temperature. *Marine Biology Research* 3, 357-366.
- Le Pennec G (2003) L'adipogénèse dans la glande digestive du mollusque bivalve *Pecten maximus* *Bull Soc Zool Fr* 128:117-129
- Levins R (1966) The strategy of model building in population biology. *Am Sci* 54:421-431
- Levinton JS, Ward JE, Shumway SE (2002) Feeding responses of the bivalves *Crassostrea gigas* and *Mytilus trossulus* to chemical composition of fresh and aged kelp detritus. *Marine Biology* 141, 367-376.
- Li AMY, Yu PKN, Hsieh DPH, Wang WX, Wu RSS, Lam PKS (2005) Uptake and depuration of paralytic shellfish toxins in the greenlipped mussel, *Perna viridis*: A dynamic model. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24:129-135
- Li SC, Wang WX, Hsieh DPH (2002) Effects of toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* on the energy budgets and growth of two marine bivalves. *Marine Environmental Research* 53:145-160
- Lilly EL, Kulis DM, Gentien P, Anderson DM (2002) Paralytic shellfish poisoning toxins in France linked to a human-introduced strain of *Alexandrium catenella* from the western Pacific: evidence from DNA and toxin analysis. *Journal of Plankton Research* 24:443-452
- Lin HP, Cho Y, Yashiro H, Yamada T, Oshima Y (2004) Purification and characterization of paralytic shellfish toxin transforming enzyme from *Macra chinensis*. *Toxicon* 44:657-668

## M-N

- MacKenzie L, Beuzenberg V, Holland P, McNabb P, Selwood A (2004) Solid phase adsorption toxin tracking (SPATT): a new monitoring tool that simulates the biotoxin contamination of filter feeding bivalves. *Toxicon* 44:901-918
- Madenwald ND (1985) Effect of water temperature on the loss of paralytic shellfish poison from the butter clam, *Saxidomus giganteus*. In: Anderson D.M., White A.W., Baden D.G. (eds) *Toxic Dinoflagellates*. Elsevier- North Holland New York, p 479-484
- Mann DG (2002) Diatom life cycles. In: Garces E, Zingone A, Montresor M, Reguera B, Sale B (eds) *LIFEHAB- Life history of microalgal species causing harmful blooms*, p 13-17
- Mao YZ, Zhou Y, Yang HS, Wang RC (2006) Seasonal variation in metabolism of cultured Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Sanggou Bay, China. *Aquaculture* 253, 322-333.
- Marcaillou-Le Baut C, Amzil Z, Vernoux J-P, Pouchus Y-F, Bohec M, Simon J-F (1994) Studies on the detection of okadaic acid in mussels: Preliminary comparison of bioassays. *Natural Toxins* 2:312-317
- Marcaillou-Le Baut C, Bardin B, Bardouil M, Bohec M, Le Dean L, Masselin P, Truquet P (1993) DSP depuration rates of mussels reared in a laboratory and an aquaculture pond. In: Smayda TJ, Shimizu Y (eds) *Toxic phytoplankton blooms in the sea*. Elsevier, Amsterdam, p 531-535
- Marcaillou C, Gentien P, Lunven M, Legrand J, Mondeguer F, Daniélou MM, Crassous MP, Youenou A (2000) *Dinophysis acuminata* distribution and specific toxin content in relation to mussel contamination. In: Hallegraeff GM, Blackburn SI, Bolch CJ, Lewis RJ (eds) *Harmful Algae Blooms*. JOC-UNESCO, p 356-359
- Marcaillou C, Haure J, Mondeguer F, Courcoux A, Dupuy B, Péniçon C (soumis) Effect of food supply on the detoxification of contaminated mussels (*Mytilus edulis* L.) by diarrhetic shellfish toxins. *Harmful Algae*
- Masselin P, Amzil Z, Abadie E, Nézan E, Le Bec C, Chiantella C, Truquet P (2000) Paralytic shellfish poisoning on the French Mediterranean coast in the autumn 1988: *Alexandrium tamarense* complex (Dinophyceae) as causative agent. In: Hallegraeff GM, Blackburn SI, Bolch CJ, Lewis RJ (eds) *Harmful Algae Blooms*. JOC-UNESCO, p 407-410
- Medhioub W, Gueguen M, Lassus P, Bardouil M, Truquet P, Sibat M, Amzil Z, Medhioub N, Soudant P, Kraiem.(2009) Enhancement of detoxification process in the gymnodimine-contaminated grooved carpet shell *Ruditapes decussatus* Accepted in *Harmful Algae*
- Mondeguer F, Genin E, Mestre G, Nsengiyumva C (2004) Validation of an automated procedure of solid phase extraction of mussel digestive glands for identification and quantification of dinophysistoxins in LC/ESI/MS2 by quadrupole ion trap 5th International Conference on Molluscan Shellfish Safety, Galway, Ireland, p 94-99

- Montresor M, Nuzzo L, Mazzocchi MG (2003) Viability of dinoflagellate cysts after the passage through the copepod gut. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 287:209-221
- Morono A, Arevalo F, Fernandez ML, Maneiro J, Pazos Y, Salgado C, Blanco J (2003) Accumulation and transformation of DSP toxins in mussels *Mytilus galloprovincialis* during a toxic episode caused by *Dinophysis acuminata*. *Aquatic Toxicology* 62:269-280
- Morono A, Fernandez ML, Franco JM, Martinez A, Reyero MI, Miguez A, Cacho E, Blanco J (1998) PSP and DSP detoxification kinetics in mussel, *Mytilus galloprovincialis*: effect of environmental parameters and body weight. In: Reguera B, Blanco J, Fernandez ML, Wyatt T (eds) *Harmful Algae*. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO p445-448
- Morono A, Franco J, Miranda M, Reyero MI, Blanco J (2001) The effect of mussel size, temperature, seston volume, food quality and volume-specific toxin concentration on the uptake rate of PSP toxins by mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 257:117-132
- Nehring S (1998) Non-indigenous phytoplankton species in the North Sea: supposed region of origin and possible transport vector. *Archive of Fishery and Marine Research* 46:181-194
- Nell JA (2002) Farming triploid oysters. *Aquaculture* 210:69-88

## O-P

- Orton JH (1923) Summary of an account of investigations into the cause or causes of the unusual mortality among oysters in english oyster beds during 1920 and 1921. *Journal of Marine Biology Association UK* 13:1-23
- Oshima Y (1995) Chemical and enzymatic transformation of paralytic shellfish toxins in marine organisms. In: Lavoisier Publishine ILP (ed) *Harmful Marine Algal Blooms*. Lassus, P., Arzul, G., Erard-Le Denn, E., Gentien, P., Marcaillou-Le baut, C.
- Palmer RE, Williams RE (1980) Effect of particle concentration on filtration efficiency of the bay scallop *Argopecten irradians* and the oyster *Crassostrea virginica*. *Ophelia* 19:163-174
- Park MG, Kim S, Kim HS, Myung G, Kang YG, Yih W (2006) First successful culture of the marine dinoflagellate *Dinophysis acuminata*. *Aquatic Microbial Ecology* 45:101-106
- Paulmier G, Joly JP (1985) Manifestations de *Dinophysis acuminata* sur le littoral normand. *Rev Trav Inst Pêches marit* 47:149-157
- Penry DL, Jumars PA (1987) Modeling animal guts as chemical reactors. *American Naturalist* 129:69-96

- Pernet F, Tremblay R, Comeau L, Guderley H (2007) Temperature adaptation in two bivalve species from different thermal habitats: energetics and remodelling of membrane lipids. *Journal of Experimental Biology* 210:2999-3014
- Pernet F, Tremblay R, Redjah I, Sevigny JM, Gionet C (2008) Physiological and biochemical traits correlate with differences in growth rate and temperature adaptation among groups of the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Journal of Experimental Biology* 211:969-977
- Persson A, Smith BC, Wikfors GH, Quilliam M (2006) Grazing on toxic *Alexandrium fundyense* resting cysts and vegetative cells by the eastern oyster (*Crassostrea virginica*). *Harmful Algae* 5:678-684
- Pillet S, Pereira A, Braekman JC, Houvenaghel G (1995) Patterns in long term accumulation of okadaic acid and DTX-1 in blue mussels, *Mytilus edulis*, experimentally In: Lassus P, Arzul G, Erard E, Gentien P, Marcaillou C (eds) *Harmful Marine Algal Blooms*. Lavoisier, Intercept Ltd, Paris, p 487-492
- Pitcher GC, Franco JM, Doucette GJ, Powell CL, Mouton A (2001) Paralytic shellfish poisoning in the abalone *Haliotis midae* on the west coast of South Africa. *Journal of Shellfish Research* 20:895-904
- Piveteau F, Gandemer G, Baud JP, Demaimay M (1999) Changes in lipid and fatty acid compositions of European oysters fattened with *Skeletonema costatum* diatom for six weeks in ponds. *Aquaculture International* 7:341-355
- Piveteau F, Le Guen S, Gandemer G, Baud JP, Prost C, Demaimay M (2000) Aroma of fresh oysters *Crassostrea gigas*: Composition and aroma notes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48:4851-4857
- Pomati F, Sacchi S, Rossetti C, Giovannardi S, Onodera H, Oshima Y, Neilan BA (2000) The freshwater cyanobacterium *Planktothrix sp* FP1: molecular identification and detection of paralytic shellfish poisoning toxins. *Journal of Phycology* 36, 553-562.
- Potvin C, Lechowicz MJ, Tardif S (1990) The statistical-analysis of ecophysiological response curves obtained from experiments involving repeated measures. *Ecology* 71:1389-1400
- Puiseux-Dao S, Molgo J, Benoit E, Fessard V, Puech L, Ten-Hage L (2001) Toxicologie. In: Frémy JM, Lassus P (eds) *Toxines d'algues dans l'alimentation*. Ifremer -afssa, p 299-368

## Q-R

- Reid PC, Boalch GT (1987) A new method for the identification of dinoflagellate cysts. *Journal of Plankton Research* 9:249-253
- Robert R, Chretiennot-Dinet MJ, Kaas R, Martin-Jezequel V, Moal J, Le Coz JR, Nicolas JL, Bernard E, Connan JP, Le Dean L, Le Gourrierec G, Leroy B, Quere C (2004)

Amélioration des productions phytoplanctoniques en éclosion des mollusques: caractérisation des microalgues fourrage, Ifremer

Rouillon G, Navarro E (2001) Differential utilization of species of phytoplankton by the mussel *Mytilus edulis*, International Plankton Symposium, Portugal, pp. S299-S305.

Rossignoli AE, Blanco J (2008) Cellular distribution of okadaic acid in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819). *Toxicon* 52:957-959

## S

Sagou R, Amanhir R, Taleb H, Vale P, Blaghen M, Loutfi M (2005) Comparative study on differential accumulation of PSP toxins between cockle (*Acanthocardia tuberculatum*) and sweet clam (*Callista chione*). *Toxicon* 46:612-618

Saker ML, Nogueira ICG, Vasconcelos VM, Neilan BA, Eaglesham GK, Pereira P, (2003) First report and toxicological assessment of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* from Portuguese freshwaters. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 55, 243-250.

Samsur M, Yamaguchi Y, Sagara T, Takatani T, Arakawa O, Noguchi T (2006) Accumulation and depuration profiles of PSP toxins in the short-necked clam *Tapes japonica* fed with the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Toxicon* 48:323-330

Sato S, Sakai R, Kodama M (2000) Identification of thioether intermediates in the reductive transformation of gonyautoxins into saxitoxins by thiols. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 10:1787-1789

Sayfritz SJ, Aasen JAB, Aune T (2008) Determination of paralytic shellfish poisoning toxins in Norwegian shellfish by liquid chromatography with fluorescence and tandem mass spectrometry detection. *Toxicon* 52:330-340

Scarratt AM, Scarratt DJ, Scarratt MG (1993) Survival of live *Alexandrium tamarense* cells in mussel and scallop spat under simulated transfer conditions *Journal of Shellfish Research* 12:383-388

Schneider KR, Pierce RH, Rodrick GE (2003) The degradation of *Karenia brevis* toxins utilizing ozonated seawater. *Harmful Algae* 2:101-107

Schneider KR, Rodrick GE (1992) The use of ozone to degrade *Gymnodinium breve* toxins. In: Ifremer (ed) *Depuration des coquillages*, Rennes, p 277-290

Sechet V, Berard JB, Bohec M, Bougaran G, Carré C, Masselin P, Truquet P (2003) Growth and toxicity of *Alexandrium catenella* isolated from thau lagiin (France) cultured in stirred tank bioreactors. In: Villarba A, Reguera B, Romalde JL, Bairas R (eds) *Molluscan Shellfish Safety*, p 135-144

Sechet V, Safran P, Hovgaard P, Yasumoto T (1990) Causative species of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) in Norway. *Marine Biology* 105:269-274

- Shumway SE, Cembella AD (1993) The impact of toxic algae on scallop culture and fisheries. *Reviews in Fisheries Science* 1:121-150
- Sidari L, Nichetto P, Cok S, Sosa S, Tubaro A, Honsell G, Della Loggia R (1998) Phytoplankton selection by mussels, and diarrhetic shellfish poisoning. *Marine Biology* 131:103-111
- Sierra-Beltran AP, Cruz A, Nunez E, Del Villar LM, Cerecero J, Ochoa JL (1997). An overview of the marine food poisoning in Mexico, 12th World Congress on Animal, Plant and Microbial Toxins, Cuernavaca, Mexico, pp. 1493-1502.
- Silverman H, Lynn JW, Beninger PG, Dietz TH (1999). The role of latero-frontal cirri in particle capture by the gills of *Mytilus edulis*. *Biological Bulletin* 197, 368-376.
- Silvert W, Bricelj VM, Cembella AD (1998) Dynamic modelling of PSP toxicity in the surfcalm (*Spisula solidissima*): multicompartamental kinetics and biotransformation. In: Reguera B, Blanco J, Fernandez ML, Wyatt T (eds) *Harmful Algae*. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO
- Silvert WL, Cembella AD (1995) Dynamic modeling of phycotoxin kinetics in the blue mussel, *Mytilus edulis*, with implication for other marine-invertebrates. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 52:521-531
- Siringan FP, Azanza RV, Macalalad NJH, Zamora PB, Maria M (2008) Temporal changes in the cyst densities of *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* and other dinoflagellates in Manila Bay, Philippines. *Harmful Algae* 7:523-531
- Smaal, A., van Stralen, M., Schuiling, E., 2001. The interaction between shellfish culture and ecosystem processes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 58, 991-1002.
- Smith JC (1993) Toxicity and *Pseudo-nitzschia pungens* in Prince Edward Island. *Harmful Algae* 6, 1987-1992.
- Smith EA, Grant F, Ferguson CMJ, Gallacher S (2001) Biotransformations of paralytic shellfish toxins by bacteria isolated from bivalve molluscs. *Applied and Environmental Microbiology* 67:2345-2353
- Soletchnik P, Gouletquer P, Heral M, Razet D, Geairon P (1996) Evaluation of the energetic budget of rite Japanese oyster, *Crassostrea gigas*, in Marennes-Oleron Bay. *Aquatic Living Resources* 9:65-73
- Sornin JM, Deslous-Paoli JM, Hesse O (1988) Experimental study of the filtration of clays by the oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg): Adjustment of particle size for best retention. *Aquaculture* 69:355-366
- Stobo LA, Lacaze J, Scott AC, Petrie J, Turrell EA (2008) Surveillance of algal toxins in shellfish from Scottish waters. *Toxicon* 51:635-648

- Suzuki T, Igarashi T, Ichimi K, Watai M, Suzuki M, Ogiso E, Yasumoto T (2005) Kinetics of diarrhetic shellfish poisoning toxins, okadaic acid, dinophysistoxin-1, pectenotoxin-6 and yessotoxin in scallops *Patinopecten yessoensis*. *Fisheries Science* 71, 948-955.
- Svensson S (2003a) Depuration of Okadaic acid (Diarrhetic Shellfish Toxin) in mussels, *Mytilus edulis* (Linnaeus), feeding on different quantities of nontoxic algae. *Aquaculture* 218:277-291
- Svensson S (2003b) Effects, dynamics and management of okadaic acid in blue mussels, *Mytilus edulis*. Faculty of Natural Science
- Svensson S, Forlin L (2004). Analysis of the importance of lipid breakdown for elimination of okadaic acid (diarrhetic shellfish toxin) in mussels, *Mytilus edulis*: results from a field study and a laboratory experiment. *Aquatic Toxicology* 66, 405-418.
- Svensson S, Sarngren A, Forlin L (2003) Mussel blood cells, resistant to the cytotoxic effects of okadaic acid, do not express cell membrane p-glycoprotein activity (multixenobiotic resistance). *Aquatic Toxicology* 65:27-37

## T

- Tachibana V, Scheuner PJ, Tsukitani Y, Kikuchi H, Vanenden D, Clardy J, Gopichand Y, Schmitz FJ (1981) Okadaic acid, a cytotoxic polyether from two sponges of the genus *Halichondria*. *Journal of American chemistry society* 103:2469-2471
- Torgersen T, Miles CO, Rundberget T, Wilkins AL (2008a) New Esters of Okadaic Acid in Seawater and Blue Mussels (*Mytilus edulis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56:9628-9635
- Torgersen T, Sandvik M, Lundve B, Lindegarth S (2008b) Profiles and levels of fatty acid esters of okadaic acid group toxins and pectenotoxins during toxin depuration. Part II: Blue mussels (*Mytilus edulis*) and flat oyster (*Ostrea edulis*). *Toxicon* 52:418-427
- Touzet N, Franco JM, Raine R (2008) Morphogenetic diversity and biotoxin composition of *Alexandrium* (Dinophyceae) in Irish coastal waters. *Harmful Algae* 7:782-797
- Tsujino M, Kamiyama T, Uchida T, Yamaguchi M, Itakura S (2002) Abundance and germination capability of resting cysts of *Alexandrium* spp. (Dinophyceae) from faecal pellets of macrobenthic organisms. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 271:1-7
- Tsujino M, Uchida T (2004) Fate of resting cysts of *Alexandrium* spp. ingested by *Perinereis nuntia* (Polychaeta) and *Theola fragilis* (Mollusca). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 303:1-10
- Twarog BM, Yamaguchi H, Hidaka T (1972) Resistance to tetrodotoxin and Saxitoxin. *Toxicon* 10:273-278

## U-V

- Urban ER, Kirchman DL (1992) Effect of kaolinite clay on the feeding activity of the eastern oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 160:47-60
- van Apeldoorn ME, van Egmond HP, Speijers GJA, Bakker GJI (2007) Toxins of cyanobacteria. *Molecular Nutrition & Food Research* 51, 7-60.
- Vale P (2008) Complex profiles of hydrophobic paralytic shellfish poisoning compounds in *Gymnodinium catenatum* identified by liquid chromatography with fluorescence detection and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1195:85-93
- Van den Bergh J, Nunes P, Dotinga HM, Kooistra W, Vrieling EG, Peperzak L (2002) Exotic harmful algae in marine ecosystems: an integrated biological-economic-legal analysis of impacts and policies. *Marine Policy* 26:59-74
- Van der Meer J (2006) An introduction to Dynamic Energy Budget (DEB) models with special emphasis on parameter estimation. *Journal of Sea Research* 56:85-102
- Van Dolah FM (2000) Marine Algal Toxins: origins, Health Effects, and their increased occurrence. *Environmental Health Perspectives* 108:133-141
- Van Egmond HP, Aune T, Lassus P, Speijers GJA, Waldock M (1993) Paralytic and diarrhoeic shellfish poisons occurrence in Europe toxicity, analysis and regulation. *Journal of Natural Toxins* 2:41-83
- Veloso V, Amorin A (2009) Long term maintenance of *Dinophysis acuta* in co-culture with *Chaetoceros sp.* *Harmful Algae News* 39:1-2

## W-X-Y-Z

- Walter E (1982) Identifiability of state-space models. Springer Lecture Notes in Biomathematics, vol 46
- White AW, Marin JL, Legresley M, Blogoslawski WJ (1985) Inability of ozonation to detoxify shellfish toxins in soft-clams. In: Anderson DM, White, A.W., Badan, D.G. (ed) *Toxic Dinoflagellates*. Elsevier, New York, p 473-478
- Wright SH, Secomb TW (1986) Epithelial amino acid transport in marine mussels: role in net exchange of taurine between gills and sea water. *Journal of Experimental Biology* 121, 251-270.
- Yamamoto T, Flynn KJ, Takayama H (2003) Application of a two-compartment one-toxin model to predict the toxin accumulation in Pacific oysters in Hiroshima Bay, Japan. *Fisheries Science* 69:944-950

- Yasumoto T, Oshima Y, Sugawara W, Fukuyo Y, Oguri H, Igarashi T, Fujita N (1980) Identification of *Dinophysis fortii* as the causative organism of diarrhetic shellfish poisoning. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries 46:1405-1411
- Yasumoto T, Oshima Y, Yamaguchi M (1978) Occurrence of a new type of shellfish poisoning in Tohoku district. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries 44:1249-1255
- Yu KN, Choi MC, Shen XY, Wu RSS, Wang WX, Lam PKS (2005) Modeling of depuration of paralytic shellfish toxins in *Chlamys nobilis* and *Perna viridis*. Marine Pollution Bulletin 50:474-479
- Yu KN, Kwong RWM, Wang WX, Lam PKS (2007) Biokinetics of paralytic shellfish toxins in the green-lipped mussel, *Perna viridis*. Marine Pollution Bulletin 54:1068-1071
- Yu ZM, Zou JZ, Ma XN (1994) Application of clays to remove of red tide organisms I. Coagulation of red tide organisms with clay. Chin J Oceanol Limnol 12
- Yu ZM, Zou JZ, Ma XN (1995) Application of clays to remove of red tide organisms II. Coagulation of koalin on red tide organisms. Chin J Oceanol Limnol 13
- Yukihira H, Klumpp DW, Lucas JS (1998) Comparative effects of microalgal species and food concentration on suspension feeding and energy budgets of the pearl oysters *Pinctada margaritifera* and *P-maxima* (Bivalvia : Pteriidae). Marine Ecology-Progress Series 171:71-84
- Zingone A, Enevoldsen HO (2000) The diversity of harmful algal blooms: a challenge for science and management. Ocean & Coastal Management 43:725-748

# **Annexes**



## **Annexe I – Analyses des toxines paralysantes**

Chaque échantillon était passé 3 fois dans la chaîne HPLC pour l'analyse chimique quantitative des toxines paralysantes.

Les tissus des huîtres ont été disséqués et placés dans un Büchner pendant une heure afin d'éliminer l'eau en excès. À la fin de ce processus ils étaient broyés puis acidifiés avec de l'HCl à 0,1 N. Les échantillons ont été centrifugés pendant 15 minutes à 3000 g et à 4°C, et le pH a été ajusté à 3,0-3,5 avec de l'HCl à 6 N. Ils ont ensuite été soumis à une ultracentrifugation (15 min à 17000g et 4°C), puis à une ultrafiltration (10000 Da). Les filtrats étaient ensuite analysés.

Pour extraire les toxines PSP des cellules de phytoplancton, 10 mL de culture toxique ont été prélevés sur les ballons de culture utilisés lors de l'expérience. Les tubes ont été placés dans la centrifugeuse pendant 15 minutes à 3000 g et 4°C. Les culots ont été remis en suspension avec 1 mL d'acide acétique à 0.1 N puis conservés à 80°C. Ils ont été ensuite passés aux ultrasons pendant 15 minutes. Enfin les tubes ont été ultracentrifugés pendant 15 minutes à 17000 g et à 4°C et ultrafiltrés sur 0,2 µm Le filtrat est ensuite prêt à être analysé.

La quantification des toxines PSP a été réalisée en utilisant la méthode d'Oshima (1995) avec de légères adaptations. Les toxines ont été séparées en utilisant la chromatographie liquide haute performance en phase inverse avec une colonne C8 (débit de 0.8 ml/min). L'élution pH et la température de colonne ont été calibrées pour optimiser la séparation de quelques gonyautoxines (GTX1, GTX2, GTX3, GTX4, dc-GTX3, dc-GTX-2). Les toxines C1 et C2 ont été ensuite détectées et mesurées par hydrolyse acide des échantillons (HCl 0.4 N à 98°C pendant 5 min) (Masselin et al, 2001).

Les concentrations en toxines dans des cultures d'*A. minutum* ou dans les huîtres contaminées ont été converties en µg éq. STX / 100 g de chair humide ou en pg éq. STX / cell en utilisant les facteurs de conversion déterminés par Oshima (1995).



## **Annexe II – La voie d’assimilation des toxines paralysantes**

L’objectif de cette expérience est de déterminer si les toxines paralysantes suivent la même voie d’assimilation que l’azote et / ou le carbone. Les microalgues vont donc être enrichies en  $^{13}\text{C}$  et  $^{15}\text{N}$  et servir d’alimentation à des huîtres. L’incorporation des toxines et les changements dans les rapports isotopiques dans les tissus vont être suivis tout au long de la contamination. Ces expériences ont été réalisées en même temps que les expériences sur la répartition des toxines paralysantes dans les différents tissus de l’huître (Chapitre 2- partie 2-1). L’enrichissement des microalgues a été réalisé lors des deux dernières expériences à savoir les huîtres contaminées avec de l’*Alexandrium catenella* et les huîtres contaminées avec de l’*A. minutum* cultivé en bioréacteur.

### **Matériel et Méthode**

#### Matériel biologique

Le milieu de culture d’*Alexandrium catenella* est enrichi en  $^{13}\text{C}$  et  $^{15}\text{N}$  avec l’incorporation de  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  ( $15 \mu\text{gat N L}^{-1}$ ) et  $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$  ( $5 \mu\text{gat C L}^{-1}$ ) selon le protocole de Collos et al. (2004). Cette incorporation est effectuée en début de croissance. Pour l’*Alexandrium minutum* cultivé en bioréacteur de  $2 \times 100 \text{ L}$ , il n’a pas été possible d’enrichir le milieu de culture en  $^{13}\text{C}$  et  $^{15}\text{N}$  en début de croissance des microalgues. L’ajout de  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  ( $15 \mu\text{gat N L}^{-1}$ ) et  $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$  ( $5 \mu\text{gat C L}^{-1}$ ) a été additionné 2 heures avant l’utilisation comme nourriture pour les huîtres (Collos et al. 2004)

#### Les analyses

Les huîtres sont congelées à  $-80^\circ\text{C}$  puis disséquées par organes (glandes digestives, gonades, muscle, manteau et branchies). Des groupes par organes de quatre individus sont réalisés. Les groupes sont ensuite séparés en deux parties, une première partie va servir à l’analyse du contenu toxinique (Annexe I) et l’autre partie va servir pour les rapports isotopiques.

Les échantillons sont lyophilisés, puis broyés et enfin analysés par spectrométrie de masse de rapport isotopique à flux continu (CF-IRMS). Les analyses ont été réalisées par le SCRI (Scottish Crop Research Institute, Dundee, UK). Les données sont exprimées en  $\delta \text{ ‰}$

par rapport aux standards conventionnels c'est à dire le rostre de Bélemnites fossiles pour le carbone et l'azote atmosphérique pour l'azote. On a donc :

$$\delta^A X = \left( \left( \frac{R_{\text{échantillon}}}{R_{\text{standard}}} \right) - 1 \right) \times 10^3$$

avec : A la masse atomique de l'isotope de l'élément lourd X

R : rapport isotopique  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  et  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$

## Résultats

En ce qui concerne les huîtres contaminées quatre jours par de l'*Alexandrium catenella*, les huîtres diploïdes ont accumulé de la toxine dans leurs tissus (Fig. 83c). En même temps, une variation des rapports isotopiques du carbone et de l'azote est observable, ceux-ci se sont déplacés vers les rapports isotopiques de l'*Alexandrium catenella* enrichie (Fig. 83 a-b). Cependant, aucune relation entre la toxine incorporée et la variation du rapport isotopique, aussi bien pour le carbone que l'azote, n'a pu être identifiée. Ce résultat est peut être dû au faible contenu toxinique dans les différents tissus. En effet, les valeurs de concentrations en toxines correspondent aux seuils de détection par la méthode d'Oshima (1995), ce qui induit des variations très importantes entre les injections. Cette expérience nécessiterait d'être réitérée avec des concentrations en toxines plus importantes dans les différents tissus.

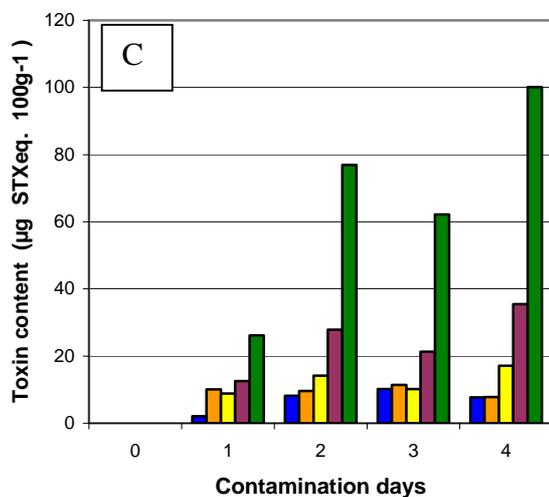
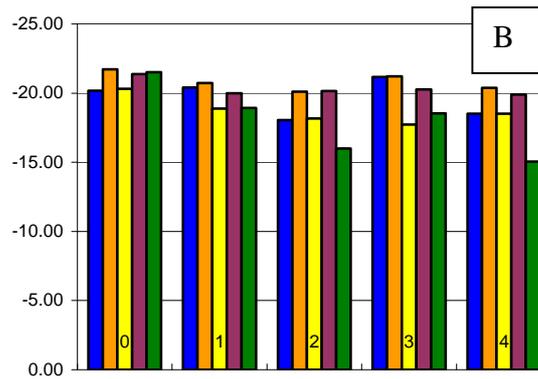
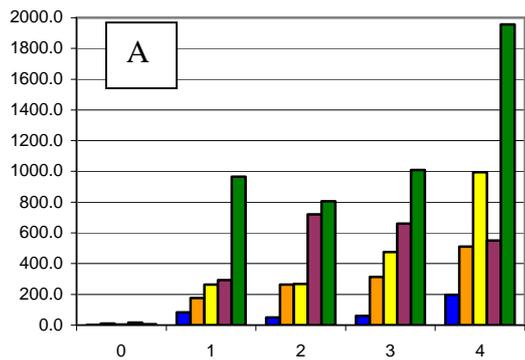


Fig. 83 Evolution of  $\delta^{15}\text{N}$  (A)  $\delta^{13}\text{C}$  (B) and PSP toxin content (C) during contamination by *Alexandrium minutum* in the different oyster tissues: muscle (blue), mantle (orange), gills (yellow), gonad (magenta) and digestive gland (green).

Fig. 83 Evolution des  $\delta^{15}\text{N}$  (A)  $\delta^{13}\text{C}$  (B) et du contenu toxique PSP (C) pendant la contamination par de l'*Alexandrium catenella* des tissus d'huîtres: le muscle (bleu), le manteau (orange), branchies (jaune), gonade (magenta) et glande digestive (vert).

Pour les huîtres contaminées avec de l'*Alexandrium minutum*, il n'y a pas de variation du  $\delta^{13}\text{C}$  au cours des 4 jours de contamination. Ceci peut être expliqué par deux processus : premièrement, l'incorporation des isotopes stables  $^{13}\text{C}$  et  $^{15}\text{N}$  dans la culture d'*Alexandrium minutum* a été réalisée que 2 heures avant le début de l'expérience, la microalgue a peut-être uniquement incorporé le  $^{15}\text{N}$  mais pas le  $^{13}\text{C}$  ; Deuxièmement, le temps de demi-vie du carbone dans l'huître est d'environ 38 jours contre 7 jours pour l'azote (Malet 2005), et le changement du rapport isotopique du carbone dans les tissus est donc plus lent que celui de l'azote.

La variation du contenu toxique a été tracée en fonction de la variation du rapport isotopique de  $\delta^{15}\text{N}$  (Fig. 84). On observe que les pentes de ces droites sont très différentes d'un tissu à l'autre (Table 15). Il y a bien incorporation de  $^{15}\text{N}$  et des toxines dans les différents tissus des huîtres. Cependant l'incorporation de l'azote et celle de la toxine ne s'effectuent pas à la même vitesse selon les tissus. Ainsi l'incorporation de l'azote dans les

branchies est beaucoup plus rapide que l'incorporation de la toxine (Fig. 84A). La glande digestive reste l'organe qui incorpore le plus les toxines. Le fait que l'incorporation de l'azote et de la toxine ne s'effectuent pas à la même vitesse laisse penser que les toxines paralysantes ne suivent pas exactement la même voie d'assimilation que l'azote.

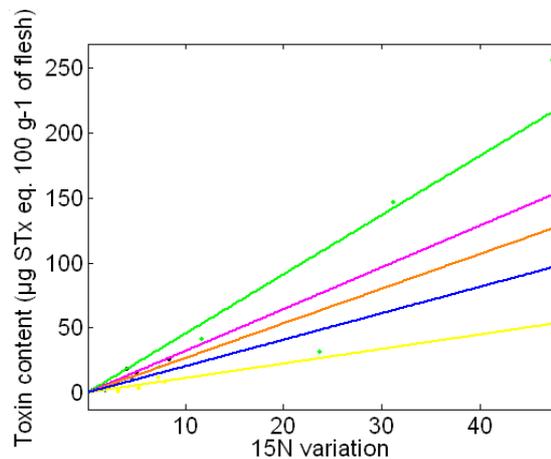


Fig. 84 Variation of the toxin content in function of the variation of the  $\delta^{15}\text{N}$  for the diploïds for the mantle (orange), muscle (blue), gills (yellow), gonad (pink) and digestive gland (green).

Fig. 84 Variation du contenu toxinique en fonction des variation de  $\delta^{15}\text{N}$  chez les huîtres diploïdes pour le manteau (en orange), le muscle (en blue), les branchies (en jaune), la gonade (en rose) et la glande digestive (en vert).

Table 15: slope coefficient of Fig. 84.

Table 15: Coefficient des pentes des droites de la Fig. 84.

	Diploïds	
	Mean	$r^2$
Mantle	$2.67 \pm 0.61$	0.95
Muscle	$2.04 \pm 0.97$	0.84
Gills	$1.12 \pm 0.73$	0.65
Gonad	$3.22 \pm 0.93$	0.78
Digestive gland	$4.57 \pm 2.57$	0.77

## Conclusion

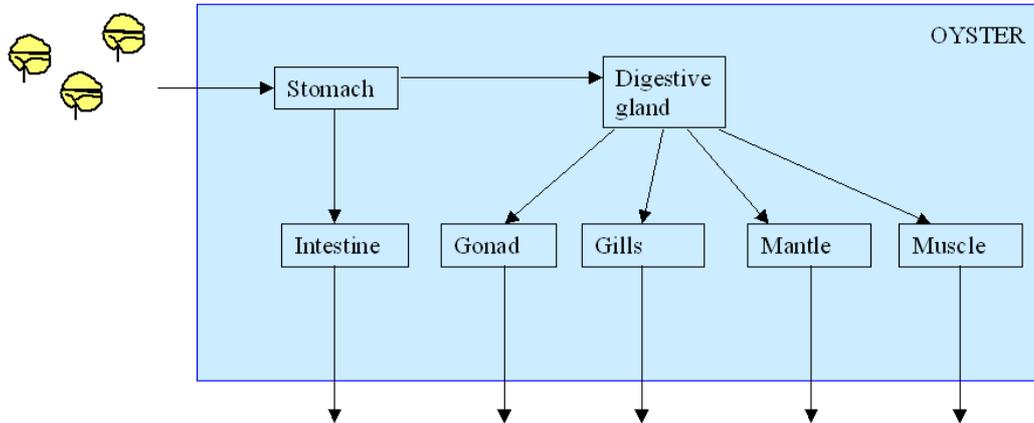
La première expérience laisse penser que la toxine paralysante ne suit pas les mêmes voies d'assimilation que le carbone ou l'azote car aucune relation n'a pu être mise en avant. De plus, ce résultat est confirmé dans le cas de l'azote lors de la deuxième expérience. Ces

deux expériences sont une première approche concernant l'identification de la voie d'assimilation. Les résultats obtenus ne permettent pas de conclure sur la voie empruntée par les toxines pour être transférée dans les différents tissus. Ce travail demanderait à être plus approfondi et notamment l'observations les variations des rapports isotopiques après une contamination plus longue ce qui permettra à la fois d'obtenir des concentration dans les tissus plus importantes mais également d'observer des plus grandes variations isotopiques.



## Annexe III- Modèles prenant en compte les transferts de toxines d'un tissu à un autre

### Modèle à 7 compartiments



$$\frac{dY_{est}}{dt} = Q_{tox} - \frac{Q_{est/GD}}{P_{est}} Y_{est} - \frac{Q_{est/in}}{P_{est}} Y_{est} \quad \text{avec } Y_{est} = P_{est} C_{est}$$

$$\frac{dY_{GD}}{dt} = \frac{Q_{est/GD}}{P_{est}} Y_{est} - \frac{(Q_{GD/mt} + Q_{GD/br} + Q_{GD/mus} + Q_{GD/gon})}{P_{GD}} Y_{GD}$$

$$\frac{dY_{mus}}{dt} = \frac{Q_{GD/mus}}{P_{GD}} Y_{GD} - \frac{K_{mus}}{P_{mus}} Y_{mus}$$

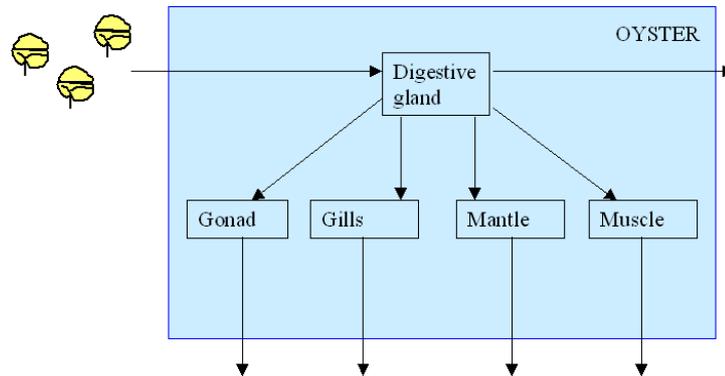
$$\frac{dY_{mt}}{dt} = \frac{Q_{GD/mt}}{P_{GD}} Y_{GD} - \frac{K_{mt}}{P_{mt}} Y_{mt}$$

$$\frac{dY_{br}}{dt} = \frac{Q_{GD/br}}{P_{GD}} Y_{GD} - \frac{K_{br}}{P_{br}} Y_{br}$$

$$\frac{dY_{gon}}{dt} = \frac{Q_{GD/gon}}{P_{GD}} Y_{GD} - \frac{K_{gon}}{P_{gon}} Y_{gon}$$

$$\frac{\delta C_{in}}{\delta t} = -\frac{Q_{est/in}}{\rho_{in} S_{in}} \frac{dC_{in}}{dx} + Da \frac{\partial^2 C_{in}}{\partial x^2}$$

## Modèle à 5 compartiments



$$\frac{dQ_{GD}}{dt} = a \times Q_{tox} - \left( T_{GD \rightarrow gon} + T_{GD \rightarrow br} + T_{GD \rightarrow mt} + T_{GD \rightarrow mus} + k_{GD} + \frac{dP_{GD}}{dt} \right) Q_{GD}$$

$$\frac{dQ_{gon}}{dt} = T_{GD \rightarrow gon} Q_{GD} - \left( k_{gon} + \frac{dP_{gon}}{dt} \right) Q_{gon}$$

$$\frac{dQ_{br}}{dt} = T_{GD \rightarrow br} Q_{GD} - \left( k_{br} + \frac{dP_{br}}{dt} \right) Q_{br}$$

$$\frac{dQ_{mt}}{dt} = T_{GD \rightarrow mt} Q_{GD} - \left( k_{mt} + \frac{dP_{mt}}{dt} \right) Q_{mt}$$

$$\frac{dQ_{mus}}{dt} = T_{GD \rightarrow mus} Q_{GD} - \left( k_{mus} + \frac{dP_{mus}}{dt} \right) Q_{mus}$$

$$C_{totale} = Q_{GD} \times \frac{P_{GD}}{P_{total}} \times 100 + Q_{gon} \times \frac{P_{gon}}{P_{total}} \times 100 + Q_{br} \times \frac{P_{br}}{P_{total}} \times 100 + Q_{mt} \times \frac{P_{mt}}{P_{total}} \times 100 + Q_{mus} \times \frac{P_{mus}}{P_{total}} \times 100$$

avec : *est* : estomac

*GD* : glande digestive

*gon* : gonade

*br* : branchies

*mt* : manteau

*mus* : muscle

*in* : intestin

$T_{a \rightarrow b}$  : Transfert du compartiment a vers le compartiment b en jour<sup>-1</sup>.

$Q_a$  : Quantité de toxines en µg éq. STX dans le tissu a

$k_a$  : Coefficient de détoxification du tissu a en jour<sup>-1</sup>.

$P_a$  : Poids humide du tissu a en g

$C_{totale}$  : Concentration en toxine totale en µg éq. STX par 100g de chair humide

## Solutions de la discernabilité des modèles à deux compartiments

Soit le système suivant :

$$\tilde{k}_{12} + \tilde{d}_2 + \tilde{d}_1 = \hat{d}_1 + \hat{k}_{12} + \hat{k}_{21}$$

$$\tilde{d}_2(\tilde{k}_{12} + \tilde{d}_1) = \hat{d}_1 \hat{k}_{12}$$

$$\tilde{d}_2 + \tilde{k}_{12} = \hat{k}_{21} + \hat{k}_{12}$$

Les solutions obtenues sont :

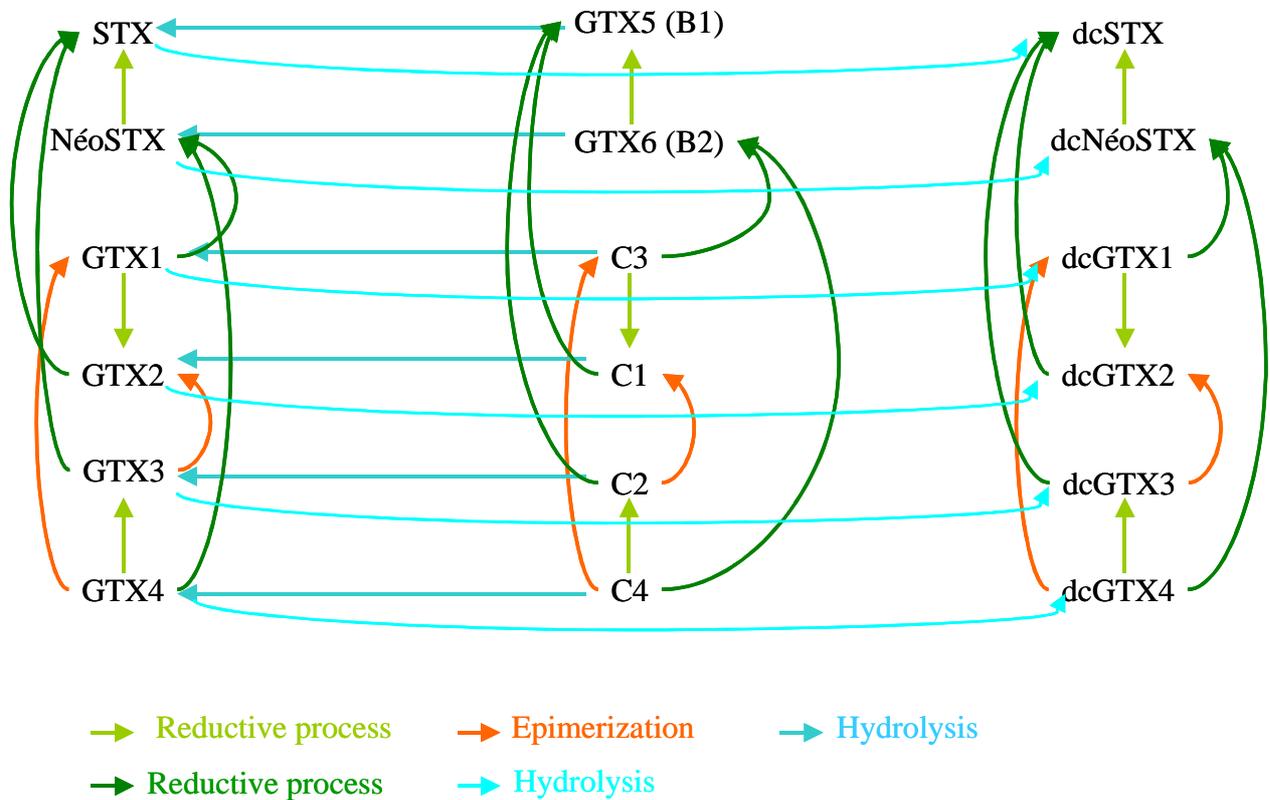
$$\left\{ \begin{array}{l} \tilde{k}_{12} = -\frac{\hat{d}_1}{2} + \frac{\hat{k}_{12}}{2} + \frac{\hat{k}_{21}}{2} - \frac{1}{2} \left( \hat{d}_1^2 + 2\hat{d}_1\hat{k}_{12} - 2\hat{d}_1\hat{k}_{21} + \hat{k}_{12}^2 + 2\hat{k}_{12}\hat{k}_{21} + \hat{k}_{21}^2 \right)^{1/2} \\ \tilde{d}_1 = \hat{d}_1 \\ \tilde{k}_{21} = \frac{\hat{d}_1}{2} + \frac{\hat{k}_{12}}{2} + \frac{\hat{k}_{21}}{2} + \frac{1}{2} \left( \hat{d}_1^2 + 2\hat{d}_1\hat{k}_{12} - 2\hat{d}_1\hat{k}_{21} + \hat{k}_{12}^2 + 2\hat{k}_{12}\hat{k}_{21} + \hat{k}_{21}^2 \right)^{1/2} \end{array} \right.$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \tilde{k}_{12} = -\frac{\hat{d}_1}{2} + \frac{\hat{k}_{12}}{2} + \frac{\hat{k}_{21}}{2} + \frac{1}{2} \left( \hat{d}_1^2 + 2\hat{d}_1\hat{k}_{12} - 2\hat{d}_1\hat{k}_{21} + \hat{k}_{12}^2 + 2\hat{k}_{12}\hat{k}_{21} + \hat{k}_{21}^2 \right)^{1/2} \\ \tilde{d}_1 = \hat{d}_1 \\ \tilde{k}_{21} = \frac{\hat{d}_1}{2} + \frac{\hat{k}_{12}}{2} + \frac{\hat{k}_{21}}{2} - \frac{1}{2} \left( \hat{d}_1^2 + 2\hat{d}_1\hat{k}_{12} - 2\hat{d}_1\hat{k}_{21} + \hat{k}_{12}^2 + 2\hat{k}_{12}\hat{k}_{21} + \hat{k}_{21}^2 \right)^{1/2} \end{array} \right.$$



## Annexe IV – Modèles prenant en compte les biotransformations

Modèle prenant en compte les différentes biotransformations décrites par Oshima (1995).



$$\frac{d[STX]}{dt} = I \times [STX]_m + R_{GTX2 \rightarrow STX}(pH, temp)[GTX2] + R_{GTX3 \rightarrow STX}(pH, temp)[GTX3] + H_{GTX5 \rightarrow STX}(pH, temp)[GTX5] + R_{Neo \rightarrow STX}(pH, temp)[Neo] - \left( H_{stx \rightarrow dcSTX} + k_{STX} + \frac{dP}{dt} \right) [STX]$$

$$\frac{d[Neo]}{dt} = I \times [Neo]_m + R_{GTX4 \rightarrow Neo}(pH, temp)[GTX4] + R_{GTX1 \rightarrow Neo}(pH, temp)[GTX1] + H_{GTX6 \rightarrow Neo}(pH, temp)[GTX6] - \left( H_{Neo \rightarrow dcNeo}(pH, temp) + R_{Neo \rightarrow STX}(pH, temp) + k_{Neo} + \frac{dP}{dt} \right) [Neo]$$

$$\frac{d[GTx1]}{dt} = I \times [GTx1]_m + H_{C3 \rightarrow GTx1}(pH, temp)[C3] + E_{\max GTx4 \rightarrow GTx1}(pH, temp)^* \left( 1 - \frac{\frac{1/3}{[GTx1]}}{[GTx4]} \right) [GTx4] - \left( H_{GTx1 \rightarrow dcGTx1}(pH, temp) + R_{GTx1 \rightarrow Neo}(pH, temp) + R_{GTx1 \rightarrow GTx2}(pH, temp) + k_{GTx1} + \frac{dP}{dt} \right) [GTx1]$$

$$\frac{d[GTx2]}{dt} = I \times [GTx2]_m + H_{C1 \rightarrow GTx2}(pH, temp)[C1] + E_{\max GTx3 \rightarrow GTx2}(pH, temp)^* \left( 1 - \frac{\frac{1/3}{[GTx2]}}{[GTx3]} \right) [GTx3] + R_{GTx1 \rightarrow GTx2}[GTx1] - \left( H_{GTx2 \rightarrow dcGTx2}(pH, temp) + R_{GTx2 \rightarrow STX}(pH, temp) + k_{GTx2} + \frac{dP}{dt} \right) [GTx2]$$

$$\frac{d[GTx3]}{dt} = I \times [GTx3]_m + H_{C2 \rightarrow GTx3}(pH, temp)[C2] + R_{GTx4 \rightarrow GTx3}(pH, temp)[GTx4] - \left( E_{\max GTx3 \rightarrow GTx2}(pH, temp)^* \left( 1 - \frac{\frac{1/3}{[GTx2]}}{[GTx3]} \right) + H_{GTx3 \rightarrow dcGTx3}(pH, temp) + R_{GTx3 \rightarrow STX}(pH, temp) + k_{GTx3} + \frac{dP}{dt} \right) [GTx3]$$

$$\frac{d[GTx4]}{dt} = I \times [GTx4]_m + H_{C4 \rightarrow GTx4}(pH, temp)[C4] - E_{\max GTx4 \rightarrow GTx1}(pH, temp)^* \left( 1 - \frac{\frac{1/3}{[GTx1]}}{[GTx4]} \right) [GTx4] - \left( H_{GTx4 \rightarrow dcGTx4}(pH, temp) + R_{GTx4 \rightarrow Neo}(pH, temp) + R_{GTx4 \rightarrow GTx3}(pH, temp) + k_{GTx4} + \frac{dP}{dt} \right) [GTx4]$$

$$\frac{d[GTx5]}{dt} = I \times [GTx5]_m + R_{GTx6 \rightarrow GTx5}(pH, temp)[GTx6] + R_{C1 \rightarrow GTx5}(pH, temp)[C1] + R_{C2 \rightarrow GTx5}(pH, temp)[C2] - \left( H_{GTx5 \rightarrow STX}(pH, temp) + k_{GTx5} + \frac{dP}{dt} \right) [GTx5]$$

$$\begin{aligned} \frac{d[GTX\ 6]}{dt} &= I \times [GTX\ 6]_m + R_{C3 \rightarrow GTX\ 6}(pH, temp)[C3] + R_{C4 \rightarrow GTX\ 6}(pH, temp)[C4] \\ &- \left( H_{GTX\ 6 \rightarrow Neo}(pH, temp) + R_{GTX\ 6 \rightarrow GTX\ 5}(pH, temp) + k_{GTX\ 6} + \frac{dP}{dt} \right) [GTX\ 6] \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \frac{d[C3]}{dt} &= I \times [C3]_m + E_{\max C4 \rightarrow C3}(pH, temp)^* \left( 1 - \frac{1/3}{\frac{[C3]}{[C4]}} \right) [C4] \\ &- \left( R_{C3 \rightarrow C1}(pH, temp) + R_{C3 \rightarrow GTX\ 6}(pH, temp) + H_{C3 \rightarrow GTX\ 1}(pH, temp) + k_{C3} + \frac{dP}{dt} \right) [C3] \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \frac{d[C1]}{dt} &= I \times [C1]_m + E_{\max C2 \rightarrow C1}(pH, temp)^* \left( 1 - \frac{1/3}{\frac{[C1]}{[C2]}} \right) [C2] + R_{C3 \rightarrow C1}(pH, temp)[C3] \\ &- \left( R_{C1 \rightarrow GTX\ 5}(pH, temp) + H_{C1 \rightarrow GTX\ 2}(pH, temp) + k_{C1} + \frac{dP}{dt} \right) [C1] \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \frac{d[C2]}{dt} &= I \times [C2]_m + R_{C4 \rightarrow C2}(pH, temp) \\ &- \left( E_{\max C2 \rightarrow C1}(pH, temp)^* \left( 1 - \frac{1/3}{\frac{[C1]}{[C2]}} \right) + R_{C2 \rightarrow GTX\ 5}(pH, temp) + H_{C2 \rightarrow GTX\ 3}(pH, temp) + k_{C2} + \frac{dP}{dt} \right) [C2] \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \frac{d[C4]}{dt} &= I \times [C4]_m \\ &- \left( E_{\max C4 \rightarrow C3}(pH, temp)^* \left( 1 - \frac{1/3}{\frac{[C3]}{[C4]}} \right) + R_{C4 \rightarrow C2}(pH, temp) + R_{C4 \rightarrow GTX\ 6}(pH, temp) + H_{C4 \rightarrow GTX\ 4}(pH, temp) + k_{C4} + \frac{dP}{dt} \right) [C4] \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \frac{d[dcSTX]}{dt} &= I \times [dcSTX]_m + R_{dcNeo \rightarrow dcSTX}(pH, temp)[dcNeo] + R_{dcGTX\ 2 \rightarrow dcSTX}(pH, temp)[dcGTX\ 2] \\ &+ H_{STX \rightarrow dcSTX}(pH, temp)[STX] + R_{dcGTX\ 3 \rightarrow dcSTX}(pH, temp)[dcGTX\ 3] - \left( k_{dcSTX} + \frac{dP}{dt} \right) [dcSTX] \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \frac{d[dcNeo]}{dt} = & I \times [dcNeo]_m + R_{dcGTX1 \rightarrow dcNeo}(pH, temp)[dcGTX1] + R_{dcGTX4 \rightarrow dcNeo}(pH, temp)[dcGTX4] \\ & + H_{Neo \rightarrow dcNeo}(pH, temp)[Neo] - \left( R_{dcNeo \rightarrow dcSTX}(pH, temp) + k_{dcNeo} + \frac{dP}{dt} \right) [dcNeo] \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \frac{d[dcGTX1]}{dt} = & I \times [dcGTX1]_m + H_{GTX1 \rightarrow dcGTX1}(pH, temp)[GTX1] + E_{\max dcGTX4 \rightarrow dcGTX1}(pH, temp)^* \left( 1 - \frac{\frac{1/3}{[dcGTX1]}}{[dcGTX4]} \right) [dcGTX4] \\ & - \left( R_{dcGTX1 \rightarrow dcNeo}(pH, temp) + R_{dcGTX1 \rightarrow dcGTX2}(pH, temp) + k_{dcGTX1} + \frac{dP}{dt} \right) [dcGTX1] \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \frac{d[dcGTX2]}{dt} = & I \times [dcGTX2]_m + H_{GTX2 \rightarrow dcGTX2}(pH, temp)[GTX2] + R_{dcGTX1 \rightarrow dcGTX2}(pH, temp)[dcGTX1] \\ & + E_{\max dcGTX3 \rightarrow dcGTX2}(pH, temp)^* \left( 1 - \frac{\frac{1/3}{[dcGTX2]}}{[dcGTX3]} \right) [dcGTX3] - \left( R_{dcGTX2 \rightarrow dcSTX}(pH, temp) + k_{dcGTX2} + \frac{dP}{dt} \right) [dcGTX2] \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \frac{d[dcGTX3]}{dt} = & I \times [dcGTX3]_m + R_{dcGTX4 \rightarrow dcGTX3}(pH, temp)[dcGTX4] + H_{GTX3 \rightarrow dcGTX3}(pH, temp)[GTX3] \\ & - \left( E_{\max dcGTX3 \rightarrow dcGTX2}(pH, temp)^* \left( 1 - \frac{\frac{1/3}{[dcGTX2]}}{[dcGTX3]} \right) + R_{dcGTX3 \rightarrow dcSTX}(pH, temp) + k_{dcGTX3} + \frac{dP}{dt} \right) [dcGTX3] \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \frac{d[dcGTX4]}{dt} = & I \times [dcGTX4]_m + H_{GTX4 \rightarrow dcGTX4}(pH, temp)[GTX4] - E_{\max dcGTX4 \rightarrow dcGTX1}(pH, temp)^* \left( 1 - \frac{\frac{1/3}{[dcGTX1]}}{[dcGTX4]} \right) [dcGTX4] \\ & - \left( R_{dcGTX4 \rightarrow dcGTX3}(pH, temp) + R_{dcGTX4 \rightarrow dcNeo}(pH, temp) + k_{dcGTX4} + \frac{dP}{dt} \right) [dcGTX4] \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} Tox = & 1 \times [STX] + 0.9243 \times [Neo] + 0.9940 \times [GTX1] + 0.3592 \times [GTX2] + 0.6379 \times [GTX3] + 0.7261 \times [GTX4] \\ & + 0.0644 \times [GTX5] + 0.0644 \times [GTX6] + 0.0133 \times [C3] + 0.0060 \times [C1] + 0.0963 \times [C2] + 0.0576 \times [C4] \\ & + 0.5131 \times [dcSTX] + \alpha^* \times [dcNeo] + \beta^* \times [dcGTX1] + 0.1538 \times [dcGTX2] + 0.3766 \times [dcGTX3] + \gamma^* \times [dcGTX4] \end{aligned}$$

Avec :

- $[A]$  : concentration en toxine A dans le mollusque en  $\mu\text{g}$  par 100g de chair humide
- $[A]_m$  : concentration en toxine A dans le milieu en  $\mu\text{g L}^{-1}$
- $I$  : taux d'ingestion du mollusque en  $\text{L d}^{-1}$  par 100g de chair humide
- $H_{a \rightarrow b}$  : hydrolyse du composé a vers b en  $\text{d}^{-1}$
- $R_{a \rightarrow b}$  : réduction du composé a vers b en  $\text{d}^{-1}$
- $E_{a \rightarrow b}$  : épimérisation du composé a vers b en  $\text{d}^{-1}$
- $k_a$  : coefficient de détoxification du composé a en  $\text{d}^{-1}$
- $\alpha^*, \beta^*, \gamma^*$  : coefficients de conversion de dcNeo, dcGTX1 et dcGTX4 respectivement

en STX (A ce jour, ces facteurs n'ont pas encore été évalués ; les autres facteurs de conversion ont été évalués par Oshima (1995))

- $\frac{dP}{dt}$  : correspond à la variation du poids du mollusque ou de l'organe considéré au

cours du temps.









## **Modélisation de la détoxification de mollusques bivalves contenant des phycotoxines paralysantes ou diarrhéiques**

Cette étude a pour objectif la mise en place de modèles permettant de décrire la cinétique de détoxification des huîtres *Crassostrea gigas* et des moules *Mytilus edulis* contenant des phycotoxines de type paralysant et diarrhéique respectivement. Dans un premier temps, des études ont permis de compléter les connaissances de la littérature sur la compréhension des processus entrant en jeu lors de la détoxification des mollusques. Il a ainsi été mis en évidence une différence dans la capacité des mollusques à dégrader les cellules de dinoflagellés, productrices de phycotoxines, selon leurs capacités d'enkystement. La présence de phycotoxines paralysantes dans les différents tissus de l'huître a été mise en évidence, contrairement au cas des toxines diarrhéiques qui, dans la moule, sont principalement séquestrées au niveau de la glande digestive. Ces dernières semblent être retenues par les lysosomes situés dans les cellules digestives. L'influence des variables intrinsèques (ploïdie) et extrinsèques (matière en suspension et température) lors de l'élimination des phycotoxines a également été mise en évidence.

Les résultats obtenus ont ensuite permis de mettre en place différents modèles prenant en compte les transferts entre tissus, les biotransformations et l'influence de variables environnementales. Il en ressort que la cinétique de détoxification des huîtres contenant des toxines paralysantes peut être appréhendée à l'aide d'un modèle à deux compartiments, de type glande digestive et autres tissus, dont les coefficients de détoxification dépendent des variables environnementales et des ratios entre les différents analogues de la saxitoxine. La détoxification des moules contenant des toxines diarrhéiques peut être modélisée en utilisant un modèle à un compartiment dont le coefficient de détoxification dépend des variables environnementales.

Mots clés : Modélisation, *Mytilus edulis*, *Crassostrea gigas*, phycotoxines, détoxification, acide okadaïque, toxines paralysantes.

## **Detoxification modelling of bivalves containing paralytic and diarrheic phycotoxins**

The purpose of this study is to implement models to describe detoxification kinetics of Pacific oysters *Crassostrea gigas* and Blue mussels *Mytilus edulis* containing paralytic and diarrheic phycotoxins respectively. First, experimental trials made it possible to complement data from the literature regarding the understanding of processes involved in mollusc detoxification. In particular, they pointed out a difference in the mollusc capacity to degrade cellwalls of phycotoxin-producing dinoflagellates, according to their encystment capacities. It was observed that paralytic phycotoxins reached the various oyster tissues whereas diarrheic toxins were mainly sequestered in the digestive gland of mussels. The latter seem to be retained by lysosomes localized in digestive cells. The influence of intrinsic and extrinsic variables was also demonstrated.

Then, the results obtained made it possible to implement various models taking into account transfers between tissues, biotransformations and the influence of environmental variables. It was proved that the detoxification kinetics of oysters containing paralytic toxins can be represented by two-compartment model, representing the digestive gland and the other tissues, the detoxification coefficients depending on environmental variables and on ratios between the various saxitoxin analogues. The detoxification of mussels containing diarrheic toxins can be simulated by a one-compartment model where the detoxification coefficient depends on environmental variables.

Key words: Modelling, *Mytilus edulis*, *Crassostrea gigas*, phycotoxins, detoxification, okadaic acid, paralytic toxin.