

Rapport final MODECOPHY

ANR

AGENCE NATIONALE DE LA RECHERCHE

PROGRAMME ANR-SEST

Rapport de fin de projet

I-FICHE D'IDENTITE DU PROJET MODECOPHY

DECISION D'AIDE N°06SEST23

Numéro de référence du projet : 06SEST23

Titre du projet : Modélisation Des mécanismes de Contamination des coquillages par des PHYcotoxines (MODECOPHY)

Coordinateur du projet : Patrick Lassus

Mél du coordinateur du projet : patrick.lassus@ifremer.fr

Laboratoire de rattachement du coordinateur : laboratoire Phycotoxines (PHYC) département EMP (Environnement, Microbiologie et Phycotoxines)

Adresse postale du laboratoire : IFREMER centre de Nantes, Rue de l'Île d'Yeu, BP 21105, 44311 Nantes cedex 3

Numéro d'unité : sans objet

Montant global :

Durée : 3 ans

Partenaires du projet	Laboratoires
IFREMER	Laboratoire Phycotoxines, Nantes Laboratoire STBM, Nantes
Université de Bretagne Occidentale	Laboratoire des Sciences de l'Environnement marin, Plouzané
Université de Bordeaux II	UMR5805 EPOC Arcachon (<i>Ce partenaire a été rattaché au projet pour la valvométrie en continu</i>)

1 – Rappel des objectifs initiaux du projet :

Le projet avait pour objectifs de comprendre et de modéliser les mécanismes de contamination des coquillages commerciaux des côtes françaises (essentiellement moules et huîtres) par des toxines algales. La compréhension de ces mécanismes nécessitait de valider expérimentalement et *in situ* le rôle des différents facteurs amplifiant ou au contraire réduisant la bioaccumulation de neurotoxines et de toxines diarrhéiques dans la chair des bivalves mis sur le marché. Cette bioaccumulation est connue pour être la résultante de l'ingestion et de l'excrétion, ces deux processus étant eux-mêmes régulés par des facteurs biologiques (quantité/qualité des algues toxiques, état physiologique des coquillages, transformation des toxines, coefficient de transfert dans les tissus...) et abiotiques (facteurs environnementaux, propriétés physico-chimique des toxines). Le projet devait permettre de construire des modèles simples mais prenant en compte les caractéristiques des cinétiques d'accumulation propres aux deux grands types de phycotoxines posant problème sur les côtes françaises, les DSP (toxines diarrhéiques lipophiles) et les PSP (toxines paralysantes hydrophiles). Même si une élimination simultanée des toxines pouvait être prise en compte dans le modèle, le projet devait se concentrer sur la prédiction des niveaux maxima de contamination (objectif d'évaluation précoce du risque) et non sur les processus de décontamination accélérée (objectif de remédiation).

2 – Rapport final:

2.1 Programme des actions engagées

Le projet initial prévoyait d'étudier les mécanismes de contamination naturels et *in vitro*, avec des cultures monospécifiques de microalgues toxiques. Du fait d'une réduction de 30 % de l'enveloppe budgétaire demandée le périmètre du projet a été réduit à des essais expérimentaux uniquement pour les toxines paralysantes (PSP) et à des évaluations *in situ* uniquement, pour les toxines diarrhéiques (DSP).

Par ailleurs, certains essais de laboratoire ayant du être programmés pendant la période estivale, la question s'est posée de savoir si les huîtres creuses (*Crassostrea gigas*) utilisées dans les bancs écophysiologiques devaient systématiquement être des individus triploïdes afin de bloquer la gamétogénèse et d'éviter ainsi le biais introduit par des pontes en cours d'expérience. Les partenaires du programme ont décidé de procéder à des essais comparatifs entre huîtres diploïdes et triploïdes afin d'évaluer l'éventualité d'une différence de réponse physiologique et/ou de bioaccumulation en présence de microalgues productrices de toxines paralysantes.

Ces essais ont été dès le départ mis en place par le LEMAR (IUEM Brest) et à partir de la deuxième année du programme par le laboratoire PHYC (Ifremer Nantes). Dans le cas d'Ifremer une subvention complémentaire a été demandée et obtenue auprès de la Région pays de la Loire afin de financer cette étude qui n'était pas prévue dans le plan de charge initial.

Les deux principaux laboratoires impliqués, le LEMAR et le laboratoire PHYC avaient déjà eu l'occasion de coopérer dans le cadre d'une étude co-financée par le Programme National sur l'Environnement Côtier (PNEC), plus particulièrement pour l'évaluation du rôle des paramètres environnementaux sur la contamination PSP des huîtres de l'étang de Thau (Chantier Lagunes, atelier contamination des bivalves). Dans cette étude sur 4 ans, IFREMER avait développé des outils expérimentaux en écophysiologie (circuit fermé et mesure en continue de la fluorescence) et avait validé un modèle de bioaccumulation des toxines. Le LEMAR avait apporté son concours pour l'évaluation de la réponse immunitaire des huîtres. Les résultats de cette collaboration ont fait l'objet d'une publication dans *Marine Biology* (Hegaret et al, 2007)

En fait les deux approches des laboratoires partenaires se complètent parfaitement dans le cadre du programme MODECOPHY, à savoir, pour IFREMER, l'estimation de la quantité de toxines accumulées par des techniques quantitatives en CLHP-AI et CL-SM (ITSM), la modélisation de la bioaccumulation, et pour le LEMAR, le rôle des facteurs environnementaux et les réponses physiologiques des bivalves.

Le projet a été géré par IFREMER Nantes en relation étroite avec le LEMAR dans le cadre d'un comité de suivi de projet. Ce comité s'est réuni à Nantes ou à Brest au moins deux fois par an, les procès-verbaux de réunion permettant de faciliter la rédaction des rapports semestriels d'activité envoyés au bureau de l'ANR. Par ailleurs, les travaux réalisés aussi bien à Brest qu'à Nantes ont pu s'appuyer sur deux thèses encadrées par chaque partenaire du programme :

- Haberkorn H, 2009 : Impact du dinoflagellé toxique *Alexandrium minutum* sur l'huître creuse, *Crassostrea gigas* : approche intégrative, thèse soutenue le 15 décembre 2009 en Océanologie biologique à Brest, Université de Bretagne Occidentale
- Guéguen M, 2009. Detoxification modelling of bivalves containing paralytic and diarrhoeic phycotoxins, thèse avec label européen soutenue le 26 octobre 2009 en Océanologie biologique, à Nantes, Université de Nantes.

2.2 Apports et résultats scientifiques

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). 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. Les toxines diarrhéiques (DSP) et les toxines paralysantes (PSP) 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.

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 les déplacer dans des bassins à terres dès l'apparition des premières cellules phytoplanctoniques toxiques ; dans les zones très 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. L'application d'un tel procédé nécessite de connaître au préalable les conditions initiales de contamination des mollusques ainsi que les paramètres intrinsèques (digestion, métabolisme, réponse immunitaire) et extrinsèque (composition floristique, température, salinité, matières minérales) capables de modifier les coefficients de contamination et de décontamination. Cette étude a donc porté sur l'influence de quelques variables intrinsèques et extrinsèques intervenant dans la contamination des mollusques. Par ailleurs, il est important de bien comprendre les mécanismes intervenant dans le devenir des toxines dans les mollusques bivalves car peu d'études se sont attachées à décrire ces mécanismes (Blanco et al. 2008) en particulier tout ce qui peut altérer les différentes fonctions physiologiques des bivalves. Des modèles mathématiques permettant de prédire la cinétique de contamination ou de décontamination ont été développés par différents auteurs. 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

contamination / détoxification observées, mais ils demandent le plus souvent à être ajustés pour chaque nouveau jeu de données.

2.2.1 Données disponibles dans la littérature sur les réponses physiologiques et immunitaires des mollusques bivalves aux micro-algues produisant des toxines

Les efflorescences toxiques peuvent être constituées par des espèces phytoplanctoniques qui produisent des molécules ayant des effets négatifs directs sur les organismes. La majorité des études sur ce sujet se sont intéressées aux toxines pouvant affecter la santé humaine. Deux types d'exposition peuvent être répertoriés : i) par voie aérienne et ii) par voie alimentaire. Cependant, dans la plupart des cas, les effets provoqués par les phycotoxines sur la santé humaine interviennent suite à la consommation d'organismes marins contaminés (Van Dolah, 2000 ; Backer et al., 2003 ; 2005). Le programme se limite à l'étude des effets sur les mollusques filtreurs de deux familles de phycotoxines présentes sur les côtes françaises : les toxines paralysantes (PSP) et les toxines diarrhéiques (DSP).

La présence de **toxines PSP** est observée presque partout dans le monde: une grande partie de l'Europe, de l'Amérique du Nord, de l'Asie, de l'Océanie, et également en Amérique du Sud et en Afrique du Sud (UNESCO, 2004 ; Toyofuku, 2006). Ces toxines sont produites par des dinoflagellés appartenant aux genres *Alexandrium*, *Gymnodinium* et *Pyrodinium*, et sont des dérivés substitués de la saxitoxine (STX). Dix-huit dérivés sont connus à ce jour, dont les gonyautoxines (GTXs) et la néosaxitoxine (NeoSTX). Ce sont des composés hydrophiles, thermostables et stables en milieu acide. Leur principal mode d'action connu est le blocage des canaux sodium des cellules nerveuses, empêchant ainsi la dépolarisation et donc la transmission de l'influx nerveux. Après ingestion de coquillages contaminés, ces toxines provoquent rapidement chez l'homme une paresthésie brutale (en 5 à 30 minutes) des lèvres, du visage, des bras puis des jambes. Des cas graves ont été signalés avec perte de la coordination motrice, incohérence, et décès par paralysie respiratoire. La norme européenne retenue pour la consommation humaine est de 800 µg équivalent saxitoxine par Kg de chair de coquillage. Cependant l'unité de quantification de la toxicité majoritairement trouvée dans la littérature internationale est le ' µg eq STX 100g⁻¹ de chair'.

La présence de **toxines DSP** est observée dans de nombreuses régions du monde : une grande partie de l'Europe de l'ouest, le Canada (baie du Saint Laurent), le Chili, l'Afrique du Sud, l'Inde, le Japon, la Nouvelle Zélande, etc (UNESCO, 2004 ; Toyofuku, 2006). Ces phycotoxines sont produites par des dinoflagellés appartenant aux genres *Dinophysis* et *Prorocentrum* (uniquement les espèces épiphytes) et dérivent toutes de l'acide okadaïque (AO). Ce sont les efflorescences à *Dinophysis* spp qui causent la grande majorité des fermetures de mise en marché des bivalves filtreurs sur le littoral français comme dans le reste de l'Europe. L'AO et ses dérivés (les dinophysistoxines) sont lipophiles et thermostables. Ils provoquent rapidement diarrhée et vomissements (30 minutes à 2

heures après ingestion), disparaissant spontanément en 2 à 3 jours, sans séquelles. On y associe d'autres substances lipophiles telles que les pectenotoxines (PTX) qui sont hépatotoxiques, les yessotoxines (YTX) sans toxicité avérée, et les azaspiracides (AZA) qui sont diarrhéiques. Les normes sanitaires retenues sont de 160 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de chair de coquillage pour l'acide okadaïque et les azaspiracides, et 1000 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ pour les pectenotoxines.

L'acide okadaïque, la plus fréquente de ces phycotoxines, est un polyéther cyclique, plutôt lipophile, qui porte une fonction acide carboxylique terminale. Cette molécule est un puissant inhibiteur de certaines protéines phosphatases (PP2a), enzymes qui jouent un rôle essentiel dans les processus de multiplication cellulaire. Suivant les espèces de *Dinophysis*, l'AO est accompagné d'une forme substituée (DTX-1) qui comprend un groupe CH₃ à la place d'un hydrogène, ou d'un isomère (DTX-2). Ces dérivés ont des propriétés toxicologiques similaires.

Chez les mollusques bivalves, les DTXs sont essentiellement concentrées dans la glande digestive où l'on retrouve les différentes toxines phytoplanctoniques sous forme libre (AO, DTX-1 ou 2) et sous forme estérifiée dans des proportions très variables suivant les espèces de bivalves. En fait, la structure moléculaire des esters mis en évidence la première fois dans la glande digestive est un type d'ester différent de celui identifié plus tard dans les cellules de *P. lima*. Dans ce cas, le dérivé acylé est constitué d'une chaîne d'acide gras (de 14 à 22 atomes de carbone et de degré d'insaturation de 0 à 6) fixée sur le septième atome de carbone de la molécule d'AO (ou DTX-1 ou 2) d'où leur nom de 7-0-acyl esters pour les distinguer des esters identifiés dans les cellules algales. Ces esters d'acide gras sont beaucoup moins actifs sur les PP2a (d'un facteur 4 à 5) et comme ils ont été détectés essentiellement dans les mollusques, cela laisse penser qu'ils sont le produit du métabolisme des animaux.

La présence de ces composés plus lipophiles et moins toxiques dans les bivalves suggère une relation avec le métabolisme des lipides. Susuki et al. (1996) ont suivi sur un mois (mi mai-fin juin) l'évolution de la concentration en acides gras et de leur distribution relative dans des glandes digestives de moules en même temps que la flore phytoplanctonique (la température restant pratiquement constante). Ces auteurs ont observé que le contenu en acides gras insaturés dans les glandes digestives peut augmenter en quelques jours. Les moules étant incapables de synthétiser certains d'entre eux, les résultats obtenus confirment que les acides gras sont issus de l'ingestion des diatomées, celles-ci étant majoritairement présentes au moment de l'étude. Dans les formes acylées connues des DTX3, on retrouve les acides gras habituellement majoritaires dans les glandes digestives des mollusques bivalves : acide palmitique (16:0), acide palmitoléique (16:1), acide oléique (18:1) ainsi que les acides gras polyinsaturés à longue chaîne (20 :5n-3 et 22 : 6n-3).

Chez la coquille Saint Jacques, des auteurs (Yasumoto 1983 et Susuki, 1994) trouvent des dérivés acylés qui comportent une chaîne d'acide gras insaturée de type 20 :5n-3 et 22 :n-3. Plus tard, Susuki et al (1999) ont montré que l'acylation était très rapide dans la glande digestive de *Patinopecten yessoensis*. Chez les huîtres, ces toxines

peuvent se trouver à 100% sous forme d'acyl ester. Nous l'avons observé aussi sur des moules immergées lors d'un bloom à *Dinophysis*. Mais si l'on compare avec d'autres espèces de bivalves, le taux d'acylation chez les moules est beaucoup plus faible et surtout très variable. Cela suggère l'existence éventuelle d'une réaction inverse (hydrolyse) ou bien d'échanges entre d'autres compartiments cellulaires ou organiques.

L'acylation de l'AO pourrait correspondre à une séquestration des toxines et/ou à une transformation en molécules inactives, comme les DTX3. Des données de la littérature est née l'idée d'investiguer la relation entre les toxines et le turnover lipidique dans les moules au cours de la contamination et de la décontamination par des expérimentations et des suivis sur le terrain.

Les effets des micro-algues toxiques sur la biologie et la physiologie des bivalves peuvent être observés à plusieurs niveaux d'intégration de l'organisme. Ils peuvent intervenir à toutes les étapes de la vie des bivalves (gamètes, embryons, larves, juvéniles, adultes/géniteurs) et toucher différentes fonctions physiologiques (comportement, nutrition, digestion, immunité, métabolisme énergétique, activités cellulaires, reproduction).

De par leur statut de filtreurs, les bivalves peuvent être directement en contact avec les micro-algues toxiques présentes en suspension dans le milieu. Un des premiers mécanismes de défense des bivalves consiste à limiter l'ingestion des micro-algues, soit en restant fermé, soit en les rejetant sous forme de pseudo fèces.

Très peu d'études ont porté sur la modification de l'activité valvaire des bivalves en lien avec une exposition à des micro-algues toxiques. Nagai et al. (2006) ont observé une augmentation de la fréquence des micro-fermetures (fermeture rapide et incomplète des valves) chez l'huître perlière, *Pinctada fucata*, exposée au dinoflagellé toxique, *Heterocapsa circularisquama*. Les auteurs soulignent que cette augmentation de fréquence est corrélée à l'augmentation de concentration de la micro-algue toxique. Plus récemment, Basti et al. (2009) ont mis en évidence une modification de comportement chez la palourde, *Ruditapes philippinarum*, exposée à *H. circularisquama*. Cette modification se traduit, comme dans l'exemple précédent, par une augmentation significative de la fréquence des adductions valvaires même pour des concentrations très faibles en micro-algues toxiques, de l'ordre de 5 cellules.ml⁻¹. Les auteurs ont également observé une réaction de fermeture des valves qui survient d'autant plus rapidement que la concentration en *H. circularisquama* est importante (Basti et al., 2009).

En terme de tri pré-ingestif, les bivalves ont, semble-t-il, la capacité de trier les particules qu'ils captent en fonction de différents critères tels que la taille des particules, leur concentration dans le milieu ou encore le contenu en matière organique (Ward et Shumway, 2004). Par contre, les bivalves ne semblent pas capables de trier les micro-algues selon un critère de toxicité. En effet, Li et Wang (2001) ont montré, en utilisant des radio-traceurs, que la moule, *Perna viridis*, et la palourde, *Ruditapes philippinarum*, nourries

avec un mélange contenant deux espèces d'*A. tamarense* toxiques et non-toxiques, sont incapables d'ajuster leur ingestion en fonction de leur contenu en PSTs.

L'impact de micro-algues toxiques appartenant au genre *Alexandrium* sur les fonctions de filtration et d'ingestion de bivalves a été largement étudié (Bardouil et al., 1993 ; Wildish et al., 1998 ; Li et al., 2001 ; Bougrier et al. 2003 ; Lassus et al., 2004 ; Navarro et al., 2008 ; Fernandez-Reiriz et al., 2008). Plusieurs études ont mis en évidence une inhibition de l'activité de filtration, au moins temporaire, chez *C. gigas* (Bardouil et al., 1993 ; Wildish et al., 1998 ; Lassus et al., 2004) et *Mytilus chilensis* (Navarro et al., 2008) exposées à des micro-algues toxiques appartenant au genre *Alexandrium*. Lorsque *M. chilensis* est exposée à *A. catenella*, l'inhibition de l'activité de nutrition est réversible dans le temps. Cela suggère que les moules sont capables d'adapter leur comportement alimentaire et de se nourrir des micro-algues toxiques (Navarro et al., 2008).

Cette inhibition des activités de filtration et d'ingestion semble plus ou moins prononcée selon les espèces de micro-algues toxiques et de bivalves considérées. Elle peut être interprétée comme un mécanisme de protection permettant de limiter le contact avec les cellules toxiques.

L'adaptation du comportement alimentaire chez les bivalves exposés à des espèces d'*Alexandrium* produisant des PSTs se traduit par des différences de capacité d'accumulation des toxines.

L'exposition de bivalves à des micro-algues toxiques peut affecter la digestion et l'allocation d'énergie. Li et al. (2002) ont étudié l'effet d'*A. tamarense* sur le budget énergétique, évalué par une approche « scope for growth » (SFG), de la moule, *Perna viridis*, ainsi que de la palourde, *Ruditapes philippinarum*. Les auteurs ont suggéré un lien entre l'augmentation de l'accumulation des PSTs et une diminution significative du SFG chez ces deux bivalves, principalement à cause de la diminution de l'efficacité d'absorption (Li et al., 2002). Fernandez-Reiriz et al. (2008) ont démontré que l'exposition de *Mytilus chilensis* à *Alexandrium catenella* pouvait aboutir à une inhibition temporaire des processus digestifs, notamment une diminution des activités enzymatiques.

Pour ce qui est de l'impact des phycotoxines sur le système digestif des bivalves, Pearce et al. (2005) ont observé que des larves de *C. gigas* exposées à *Prorocentrum rathymum* présentaient un amincissement de l'épithélium des tubules digestifs ainsi qu'une exfoliation des cellules de l'épithélium dans la lumière de ces mêmes tubules. Des réactions inflammatoires, notamment des infiltrations et des diapédèses hémocytaires (passage des hémocytes entre les cellules de l'épithélium depuis le tissu conjonctif vers la lumière de l'estomac ou de l'intestin), ont également été observées dans différents tissus de la glande digestive de *M. edulis* exposée à *A. fundyense* (Galimany et al., 2008a), *Prorocentrum minimum* (Galimany et al., 2008b) et *Karlodinium veneficum* (Galimany et al., 2008c). Lors de l'exposition des moules à *A. fundyense*, les auteurs ont également constaté une dégradation importante des conduits et des tubules digestifs après neuf jours d'exposition (Galimany et al., 2008a). Hégaret et al. (2009a) ont également observé des

réactions inflammatoires dans le système digestif de la palourde, *R. philippinarum*, exposée à *P. minimum*.

Les micro-algues toxiques affectent le système digestif des bivalves exposés, mais semblent aussi provoquer une réaction immunitaire, comme le suggèrent les réactions inflammatoires observées chez différentes espèces de bivalves. Les mollusques bivalves sont des invertébrés et possèdent un système immunitaire de type inné (Janeway, 1994), à médiation cellulaire et humorale. Le système immunitaire à médiation cellulaire est porté par les hémocytes, qui sont aussi impliqués dans la nutrition, la formation et la réparation de la coquille. Ces hémocytes jouent un rôle essentiel dans l'inflammation, la réparation des tissus endommagés, ainsi que dans la phagocytose et l'encapsulation de corps étrangers, couvrant ainsi les fonctions connues de plusieurs types cellulaires (granulocytes, macrophages, plaquettes) chez les vertébrés.

Plusieurs observations histo-pathologiques ont montré que les hémocytes sont impliqués dans les réponses des bivalves lors d'une efflorescence d'algues toxiques (Wikfors and Smolowitz, 1993 ; 1995 ; Galimany et al, 2008a ; 2008b ; 2008c). Les réactions inflammatoires décrites ci-dessus pourraient aussi être interprétées comme un effet de stimulation du système immunitaire des bivalves en présence de micro-algues toxiques. Par exemple, des agrégats d'hémocytes ont été observés dans l'intestin de la palourde, *R. philippinarum*, exposée à *Prorocentrum minimum* (Hégaret et al., 2009a), ce qui suggère une stimulation du système immunitaire.

Le phytoplancton toxique peut moduler le système immunitaire des bivalves. Dans certains cas, le système immunitaire semble plutôt être stimulé (augmentation des capacités d'adhésion, de phagocytose et de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les hémocytes), alors que dans d'autres cas le système immunitaire semble plutôt être inhibé (immuno-suppression) (Hégaret, 2007).

Plusieurs espèces de micro-algues toxiques (*Alexandrium fundyense*, *Amphidinium carterae*, *Heterosigma akashiwo*, *Karlodinium veneficum*, *Karenia* sp.) ont montré des effets immunosuppresseurs lors d'interactions in vitro avec les hémocytes de différentes espèces de bivalves (Hégaret, 2007). Hégaret et al. (2007c) ont observé une immuno-suppression chez la palourde *R. philippinarum* exposée à *Karenia selliformis* et *K. mikimotoi*. Par ailleurs, une corrélation positive entre la quantité de PSTs accumulée et le pourcentage d'hémocytes morts, a été observée chez *C. gigas* exposée à *A. catenella* (Hégaret et al., 2007a). Cette relation peut être interprétée comme un effet immunosuppresseur de la micro-algue toxique, bien que les autres paramètres hémocytaires présentent peu de variations.

Ces différentes études illustrent la diversité et la complexité des effets que peuvent avoir les micro-algues toxiques sur le système immunitaire des bivalves. Celui-ci peut-être stimulé ou inhibé en fonction du couple bivalve / micro-algue toxique considéré.

La majorité des études concernant l'impact des micro-algues toxiques sur le cycle de reproduction des bivalves, s'intéresse au développement embryonnaire et larvaire (Yan

et al., 2001 ; 2003 ; Springer et al., 2002 ; Leverone et al., 2006 ; Padilla et al., 2006 ; Shumway et al., 2006). L'impact direct d'une micro-algue toxique sur le recrutement d'un bivalve, *Argopecten irradians concentricus*, a été observé en milieu naturel (Caroline du Nord, Etats-Unis) lors d'une efflorescence de *Ptychodiscus brevis* (= *Karenia brevis*) survenue en 1987 (Summerson and Peterson, 1990). Les auteurs ont observé, à posteriori, un taux de recrutement des pétoncles égal à 2% du taux de recrutement moyen des trois années précédentes. Yan et al. (2001) ont observé que la micro-algue productrice de PSTs, *Alexandrium tamarense*, diminuait significativement le taux d'éclosion des œufs fertilisés ainsi que la survie des larves du pétoncle, *Chlamys farreri*, lors d'expositions in vitro. Cette même micro-algue toxique provoque également une diminution importante du taux de croissance et des capacités de fixation des larves du pétoncle *Argopecten irradians concentricus* (Yan et al., 2003). Cependant, Galimany et al. (2008a ; 2008b) ont observé la présence d'agrégats hémocytaires dans les follicules gonadiques ainsi que la dégradation des ovocytes de *M. edulis* exposée respectivement à *Prorocentrum minimum* et *A. fundyense*.

Ainsi, les micro-algues toxiques peuvent affecter différentes fonctions, organes et tissus des bivalves. Le modèle d'interaction choisi dans le cadre du programme concerne *Alexandrium. minutum*, espèce toxique fréquemment mise en cause lors de contaminations de bivalves par des PSTs sur le littoral français. Ces contaminations touchent plus particulièrement l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, l'organisme cible intégré dans notre modèle d'interaction.

2.2.2 Données disponibles dans la littérature sur la modélisation des interactions entre microalgues toxiques et mollusques bivalves : cas des toxines DSP et PSP

La cinétique d'accumulation 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 biotransformations vers d'autres dérivés toxiques et la détoxification au travers de divers processus (Silvert & Cembella 1995). De plus, 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 termes d'altération des processus alimentaires ou de mise en œuvre des mécanismes de défense. L'optimisation des modèles décrivant les cinétiques de contamination nécessite de prendre en compte tous les types d'interactions entre microalgues toxiques et mollusques bivalves.

Les mollusques bivalves présentent, comme cela a été évoqué plus haut, différentes **réponses vis-à-vis des micro-algues 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, une modification de l'activité cardiaque (Gainey & Shumway 1988) et de 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 Dinoflagellés producteurs de toxines paralysantes.

Le devenir et la distribution des toxines paralysantes dans les bivalves varient en fonction (i) des caractéristiques du bloom phytoplanctonique (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 détoxication, qui entrent en jeu dès la phase de contamination. L'accumulation des toxines paralysantes apparaît fréquemment après une phase de latence entre la concentration maximale observée *in situ* des microalgues toxiques et le contenu maximum en toxines détecté 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 amplifié par une adaptation génétique qui affecte la sous-unité α 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 le pied représente moins de 3%. Les biotransformations dans les mollusques sont liées aux conditions physicochimiques, 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 β : α (1 : 3) des gonyautoxines. Peu de choses sont connues sur les facteurs influençant la cinétique de détoxication et à 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).

Les objectifs de la mise en place de modèles décrivant la cinétique de contamination des bivalves contenant des phycotoxines paralysantes sont : (i) l'aide à

la compréhension des mécanismes biologiques et des paramètres environnementaux pouvant modifier cette cinétique; (ii) la prédiction du temps au bout duquel la contamination sera maximale. Les modèles généralement utilisés sont à un ou deux compartiments (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 au même 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). 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 correctement les cinétiques observées mais ne fournissent qu'une compréhension très limitée des phénomènes. Ils s'avèrent généralement peu fiables lors des phases de validation, ce qui en limite fortement le caractère prédictif.

Les bivalves exposés aux mêmes conditions de contamination par des toxines paralysantes montrent une capacité variable à se détoxifier sur la base d'un T80, soit le temps nécessaire pour que la charge toxique corporelle diminue jusqu'au seuil santé publique de $80 \mu\text{g eq STX } 100 \text{ g}^{-1}$. Hurst et Gilfillan, cités par Bricelj et Shumway (1998), trouvent une corrélation positive entre le log de la toxicité initiale et le temps nécessaire pour atteindre ce seuil, chez la moule, la mye et la modiole. Silvert et Cembella (1995) obtiennent une description de l'accumulation et de l'élimination des toxines chez la moule avec un modèle à deux compartiments. Plus récemment Blanco *et al.* (1997) ont également testé deux modèles à deux compartiments sur la contamination/détoxification de *Mytilus galloprovincialis* exposés *in situ* à des blooms de *Gymnodinium catenatum* : l'un intégrant l'effet des variables environnementales (salinité, température, lumière, biomasse algale), l'autre non. Peu de différences ont été constatées entre ces deux modèles, ce qui suggérerait un impact faible des variables environnementales sur les cinétiques de contamination / détoxification.

Actuellement, des essais sur la mise en place de modèles 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). Cependant 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 l'élimination des toxines contenues dans les tissus commence d'abord au niveau des reins.

Dans les modèles globaux de contamination / décontamination PSP prenant en compte les toxines « liées » (aux tissus) et les toxines « libres » (transitant par le tractus digestif) , lorsqu'on cherche à estimer les coefficients, on constate que, souvent, de nombreux jeux de données peuvent convenir. En effet, dans le cas du modèle décrivant les cinétiques de contamination / décontamination de la moule *Perna viridis* par les toxines PSP (Silvert et al.,1995), il est clair que pour un même jeu de données, on peut obtenir des coefficients différents qui donnent globalement une toxicité totale très proche. Les cinétiques des toxines libres et liées peuvent sous certaines conditions de simulation s'avérer différentes. Comme il est difficile de quantifier les toxines libres et totales, il est donc délicat de trancher pour un jeu de paramètre plutôt qu'un autre puisqu'on ne connaît pas le devenir de ces différents types de toxines. Enfin, si certains auteurs (Blanco et al, 2003) considèrent que les coefficients sont les mêmes en phase de contamination ou de décontamination, d'autres (Li et al, 2005 ; Yu et al, 2007) défendent l'inverse.

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 car 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). Dans la cinétique de contamination/décontamination, il est important de différencier l'AO libre de ses acyl-esters (DTX-3) plus lipophiles car ces produits du métabolisme ne s'éliminent pas à la même vitesse. 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 pourrait également modifier les paramètres de la contamination par les toxines DSP. Il existe des modèles qui prennent en compte les biotransformations des toxines DSP (Fernandez et al. 1998 ; Morono 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). 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 contamination des moules contenant des toxines DSP reste non élucidé. 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 que faiblement prédictifs.

2.2.3 Suivi in situ des épisodes de contamination DSP de moules en Baie de Vilaine

Des épisodes de contamination de moules par des toxines diarrhéiques ont été observés en Baie de Vilaine au cours de l'été 2007 et mis en relation avec de fortes pluies, donc avec des apports de contaminants et de nutriments issus du lessivage des sols. Il était par conséquent nécessaire d'essayer de discriminer les effets des polluants de ceux des toxines.

Entre le 17 avril et le 17 juillet 2007, des prélèvements ont été réalisés tous les 15 jours (9 campagnes au total) avec une fréquence plus importante lors des contaminations DSP sur les sites Les Granges et Maresclé en Baie de Vilaine. Le contenu toxinique et la composition lipidique (réserves et lipides) ont été analysés sur les glandes digestives. Les paramètres hématocytaires (typage, comptage, viabilité, production d'espèce réactive de l'oxygène) ont été mesurés sur l'hémolymphe par cytométrie en flux. Ces deux sites ont été comparé pour le contenu toxinique à Kervoyal, site référence REPHY¹ pour la contamination des moules aux DSP. Kervoyal est aussi le site d'origine de moules contaminées utilisées dans le cadre d'un projet européen visant à étudier l'effet de l'apport de nourriture sur la détoxification dans un système expérimental (BIOTOX).

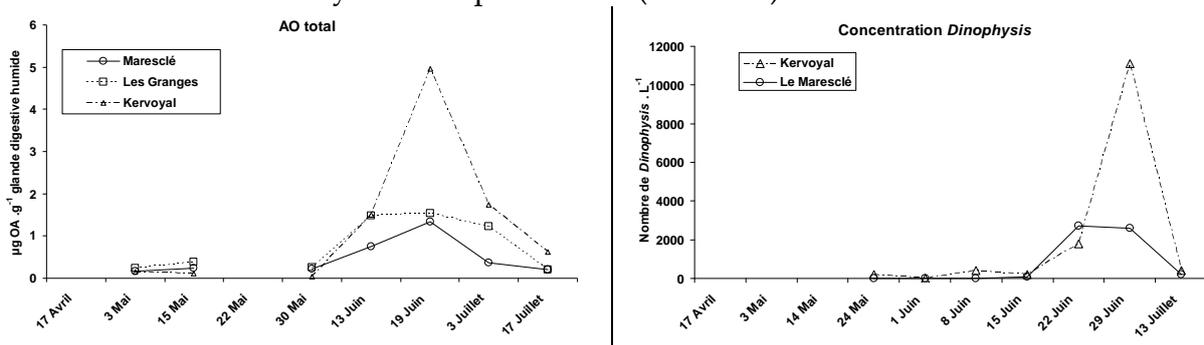


Figure 1. Evolutions comparées des concentrations en acide okadaïque total et des concentrations de *Dinophysis* en mai-juin 2007 sur la station de Kervoyal et sur les stations du Maresclé et des Granges

Le REPHY a mis en évidence une prolifération de cellules de *Dinophysis acuminata* au mois de juin. Le maximum de densité cellulaire ne coïncide pas avec la

¹ REPHY : Réseau de surveillance du Phytoplancton et des Phycotoxines, géré par IFREMER.

toxicité maximale enregistrée sur les moules (Fig. 1) mais ce phénomène est souvent observé quand on examine les données de la surveillance. Il est attribué à une variation de la toxicité du genre *Dinophysis* lors de l'évolution du « bloom ». En comparant les trois points, le site de Kervoyal est apparu comme le site le plus contaminé en AO total, ce qui s'explique par l'hétérogénéité de la répartition des *Dinophysis* dans les masses d'eau de la Baie de Vilaine.

Tableau 1 : Temps (en h) avant mortalité des souris injectées en i.p.

Date	Kervoyal	Maresclé
14 Mai	23h40	+ > 24h
24 Mai	> 24h	- > 24h
1 Juin	> 24h	- > 24h
8 Juin	>24	- >24
15 Juin	1h25	+ 2h35
22 Juin	1h20	+ 50mn
29 Juin	3h40	+ 4h20
13 Juillet	5h35	+ 15h20
20 Juillet	>24h	- >24h

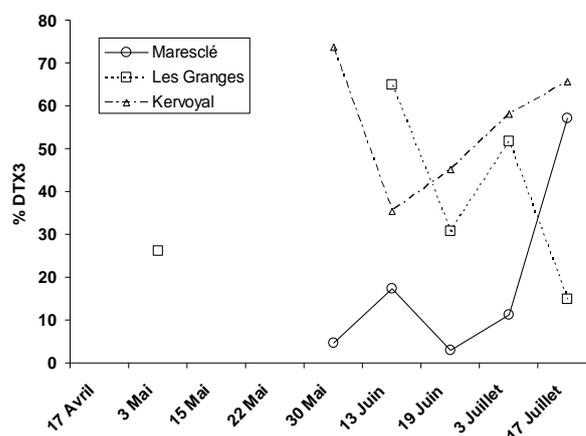


Figure 2 : Proportions d'acide okadaïque sous forme d'acyl-esters

Le suivi réalisé montre qu'à partir de début juin, la présence d'AO dans les glandes digestives s'accompagne de la formation concomitante d'acyl-esters mais l'évolution de ces esters ne montre pas un maximum suivi d'une diminution continue comme l'AO libre (Fig 2). De plus, la transformation de l'AO en ses métabolites, les acyl-esters, n'est pas tout à fait comparable entre "Le Maresclé" et "Les Granges". La maturation plus rapide des moules aux "Granges" pourrait avoir une influence sur le processus de métabolisation. Début mai, alors que des traces d'AO étaient quantifiables dans les moules, la présence d'ester n'avait pas été mise en évidence. L'examen des données bibliographiques montre que la présence d'acyl-esters (DTX3) n'est pas systématique dans les moules exposées à *Dinophysis spp.* Les analyses physiologiques durant cet épisode toxique ont été compliquées du fait d'une période de seconde maturation des moules entraînant de fortes variations individuelles pendant le suivi (Fig. 3).

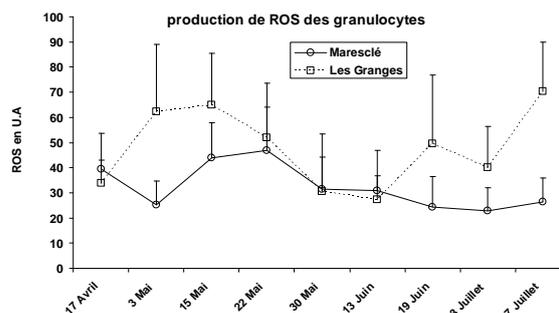
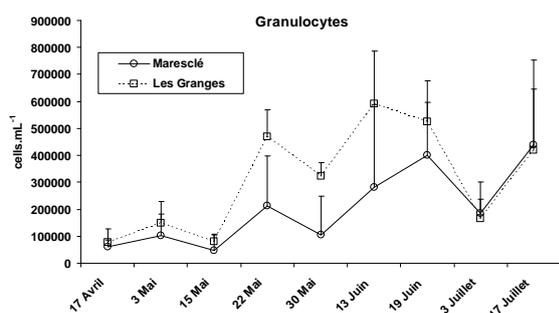


Figure 3 : Variations des concentrations en granulocytes et de leur production d'espèces réactives de l'oxygène en fonction du site d'élevage pendant la période de contamination des moules aux DSPs.

Aucune relation claire n'a pu être mise en évidence entre l'AO total (ou ses deux formes) et les paramètres hématocytaires (production de granulocytes et de ROS). Néanmoins, ces paramètres révèlent une activité physiologique plus forte des moules du point « Les Granges » par rapport à celles du Maresclé. Ceci est à mettre en parallèle avec les plus fortes contaminations dans le site « Les Granges » qui pourrait refléter une activité de nutrition plus importante.

L'analyse des classes de lipides de réserves et de structures a également été réalisée sur les glandes digestives des moules prélevées aux mêmes dates sur les points "Les Granges" et "Le Maresclé".

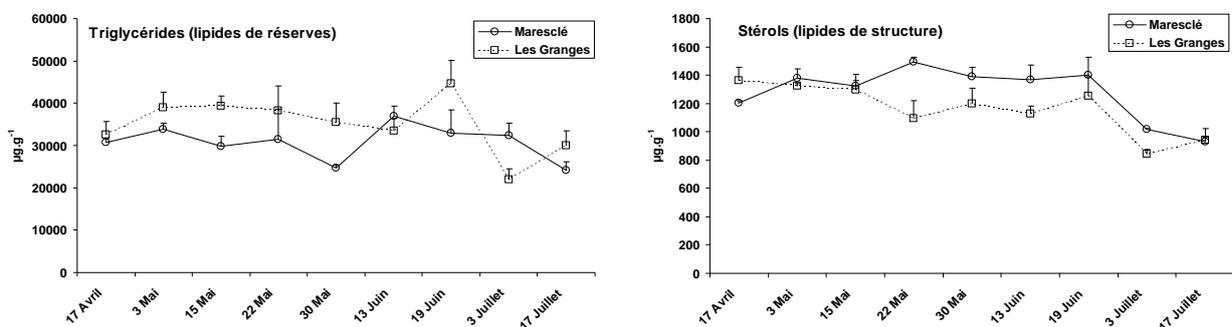


Figure 4 : Variations des contenus en triglycérides et en stérols des glandes digestives de moules en fonction du site d'élevage pendant la période de contamination aux DSPs.

Les résultats montrent peu de différences dans les niveaux de lipides de réserves (triglycérides) et de lipides de structures (stérols) pendant le suivi sur les deux sites (Figure 4). Les variations temporelles reflètent des phénomènes de rematuration des moules pendant cette période. Néanmoins, les plus hauts niveaux de triglycérides dans les moules provenant du site « Les Granges » semblent confirmer que ces moules ont une activité de nutrition plus importante (leur permettant de stocker plus d'énergie) que celles du Maresclé. On peut aussi remarquer que les niveaux les plus forts en acides gras libres sont détectés pendant les périodes de plus fortes contaminations aux DSPs.

Approche expérimentale de la décontamination DSP

Le rôle de la nourriture dans les processus de contamination / décontamination des moules (collectées à Kervoyal, Baie de Vilaine) contaminées par l'acide okadaïque (toxines diarrhéiques) pourrait passer par la formation d'acyl-esters. Deux observations vont dans le sens de cette hypothèse : d'une part l'élimination plus rapide de l'Acide okadaïque (AO) total chez les moules contaminées nourries avec du phytoplancton non toxique et d'autre part, la structure moléculaire (liaison ester avec un acide gras) qui confère aux esters un caractère plus lipophile que l'AO lui-même suggérant une relation avec le métabolisme des lipides.

	Concentrations d'acide okadaïque total en $\mu\text{g g}^{-1}$ de glande digestive de moule (poids sec)			
	<i>In situ</i>	Expérimental		
		Pas d'apport	Apport A	Apport B
18 juin	14.25	15.25	14.25	14.25
2 juillet	5.35	7.6	3.8	2.45
9 juillet	3.2	5.5	3.1	1.5
16 juillet	1.8	Pas de mesure		

Tableau 2 Comparaison de la décontamination observée en milieu naturel (*in situ*) et en système expérimental. Le système expérimental comportait trois conditions : sans apport de nourriture et avec apports de deux doses d'une culture de diatomée (*S. costatum*) (A : 15.10^3 cell. ml^{-1} ; B: 30.10^3 cell. ml^{-1}).

La comparaison des vitesses de détoxification DSP observées *in situ* en 2007 avec celles obtenues expérimentalement par nutrition avec des microalgues fourrages dans le cadre du projet européen BIOTOX montre peu de différence (Tableau 2) sinon un gain d'une semaine en expérimental avec la concentration maximale (colonne la plus à droite) en *Skeletonema costatum*.

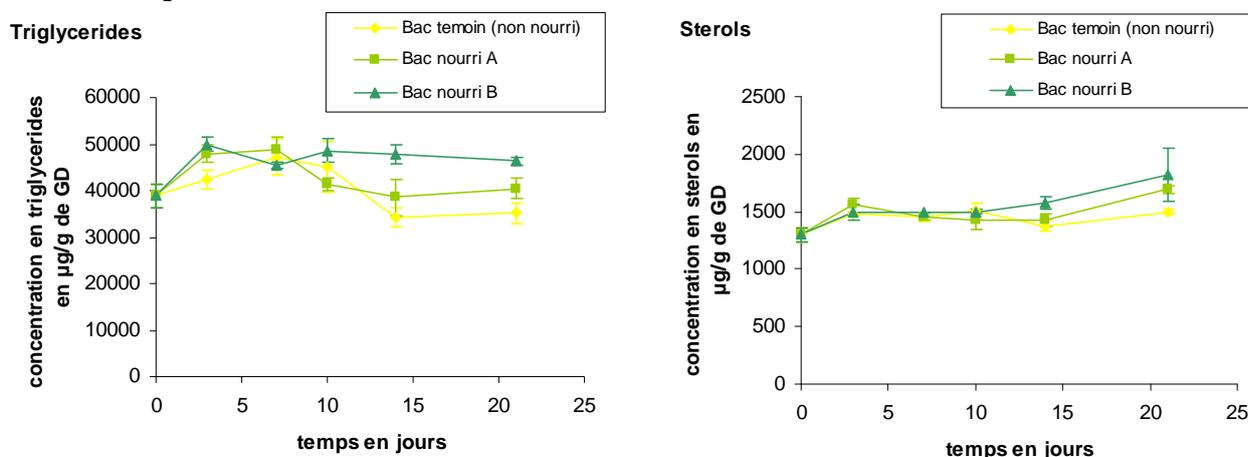


Figure 5 : Variations des contenus en triglycérides et en stérols des glandes digestives de moules soumises à trois niveaux de nutrition pendant la décontamination DSP (Témoin : non nourri ; A : 15.10^3 cell. ml^{-1} ; B: 30.10^3 cell. ml^{-1})

L'analyse des classes de lipides de réserves et de structures a également été réalisée sur les glandes digestives des moules soumises à trois régimes nutritionnels pendant l'expérimentation de décontamination du projet BIOTOX. L'impact de la nutrition sur le niveau de réserves lipidiques (triglycérides) n'apparaît qu'après 15 jours d'expérimentation. Ces régimes nutritionnels n'ont par ailleurs que peu d'impact sur les lipides de structures (stérols). Ces résultats montrent que l'élimination de l'AO, et plus particulièrement des DTX3, de la glande digestive n'est pas dépendante du métabolisme lipidique que ce soit au niveau des réserves ou des structures. Cette étude et celle réalisée *in situ* (voir ci-dessus)

permettent de rejeter l'hypothèse largement répandue dans la littérature que la contamination et la décontamination de toxines lipophiles telles que les DSP sont modulées par le métabolisme lipidique.

2.2.4 Modèle de contamination DSP des moules des côtes Norvégiennes

Afin de tenter de modéliser la contamination des moules par les algues de la famille des *Dinophysis*, des données provenant du réseau de surveillance de Norvège ont été considérées. Elles présentent, pour certains sites cibles, par rapport aux données françaises, l'avantage majeur que le suivi de la contamination et de la décontamination des moules est systématiquement quantifié par des analyses chimiques, indépendamment de la concentration en algues toxiques dans l'eau, à une périodicité de l'ordre de la semaine soit un échantillonnage plus conséquent qu'en France. A partir de ces données, nous avons sélectionné les périodes où le taux de bioaccumulation dans les moules était bien supérieur aux taux de décontamination observés sur des périodes où la présence de toxines était négligeable et où les moules se détoxifiaient. Sur ces jeux de données, chaque période s'étend sur plusieurs mois, ce qui donne un grand nombre de données. De plus, grâce à un suivi régulier, de nombreux paramètres, tels que la chlorophylle, la température, la salinité, les taux d'O₂, de phosphate ou d'azote, sont disponibles avec un taux d'échantillonnage satisfaisant.

Cependant, ces données présentent quelques limites pour une extrapolation potentielle au cas des côtes françaises. Les températures étudiées sont généralement basses pour des périodes de contamination avec une moyenne de 14°C, un minimum de 1°C et un maximum de 19°C. Le taux de chlorophylle dans l'eau est également faible pour une extrapolation. L'objectif sera donc de déterminer les variables influentes et la structure de modèles qui devront être à nouveau paramétrisés pour s'adapter aux conditions de notre littoral.

Les concentrations en *Dinophysis acuta*, *Dinophysis acuminata* et *Dinophysis norvegica* dans le milieu sont déterminées par dénombrement au microscope. La quantité de toxines par cellule de *D. acuta* est généralement considérée comme environ 10 fois supérieure à la quantité de toxines par cellule de *D. acuminata* et *D. norvegica*. Certains travaux norvégiens laissent à penser que la quantité de toxines par cellule varie au cours du temps en fonction des conditions environnementales et qu'elle est probablement aussi liée au taux de croissance spécifique des dinoflagellés. Toutefois aucun modèle prédictif, ni aucune mesure de la quantité de la quantité de toxines par cellule n'est disponible et nous supposons donc que cette quantité reste constante. Une estimation de la concentration en particules toxiques du type *Dinophysis* est donc calculée en pondérant les concentrations algales par un coefficient de pondération de 10 pour *D. acuta* et de 1 pour *D. acuminata* et *D. norvegica* respectivement. Dans les moules, les concentrations en acide okadaïque, en acyl-acide okadaïque et en DTX 1 et acyl DTX 1 ont été mesurées. Les DTX 2 et acyl DTX 2 n'ont pas été retenues pour cette étude en raison des incertitudes analytiques et car elles suivent une cinétique particulière dans la moule.

On ne constate pas de corrélation directe entre la concentration totale en DSP dans la moule et la concentration pondérée en particules toxiques DSP dans le milieu (Fig 6).

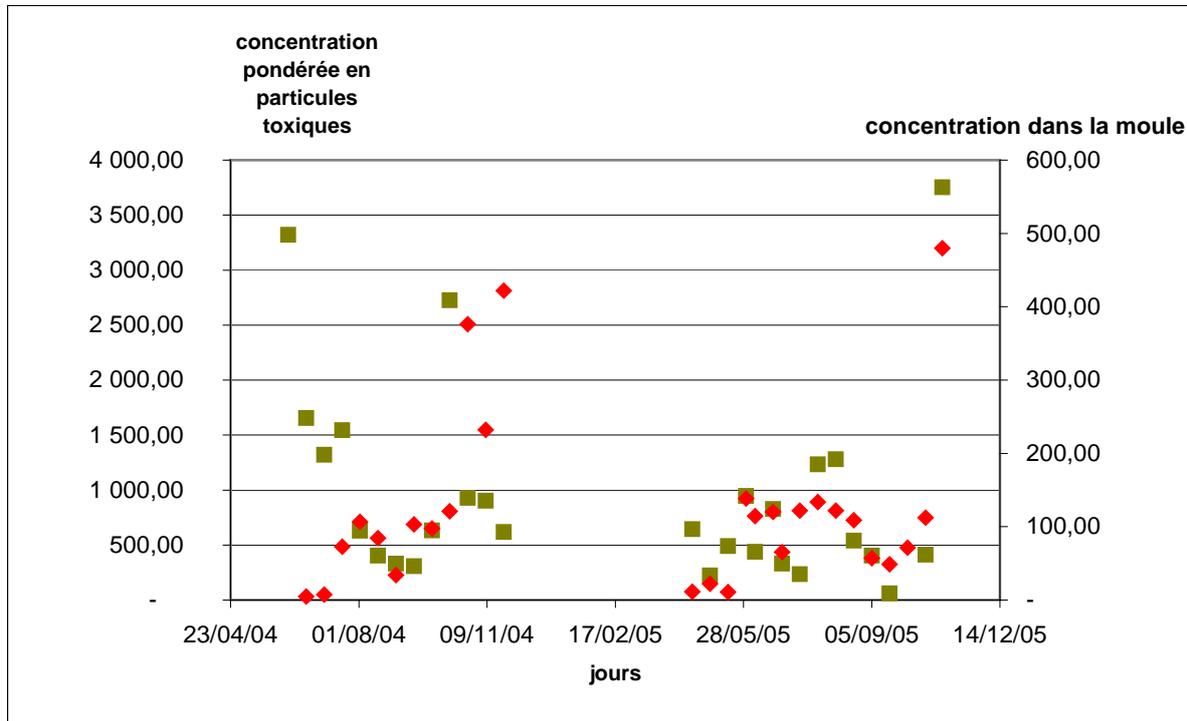


Figure 6 : Estimation de la concentration pondérée en particules toxiques (particules L-1) présentes dans le milieu (vert) et de la concentration en toxines dans la moule, en $\mu\text{g AO/kg}$ de chair (rouge) en fonction du temps.

Au vu des données disponibles retenues, les concentrations en oxygène, en phosphate, en azote, ainsi que la salinité, ne semblent pas agir de façon cohérente sur la concentration en algues toxiques dans le milieu ou sur l'accumulation de toxines dans la moule.

Par contre, la température de l'eau et la chlorophylle (Fig 7) dans le milieu semblent des variables environnementales présentant plus de liaisons avec la concentration en *Dinophysis* et avec la bio-accumulation de toxines dans la moule. Certaines données sont remarquables. Par exemple, en août et septembre 2004, la concentration en algues toxiques chute lors des températures d'eau les plus élevées. La quantité de chlorophylle représentative de l'ensemble des microalgues du milieu (fourrage + toxique) reste dans le même temps relativement constante à un niveau important par rapport aux saisons plus froides.

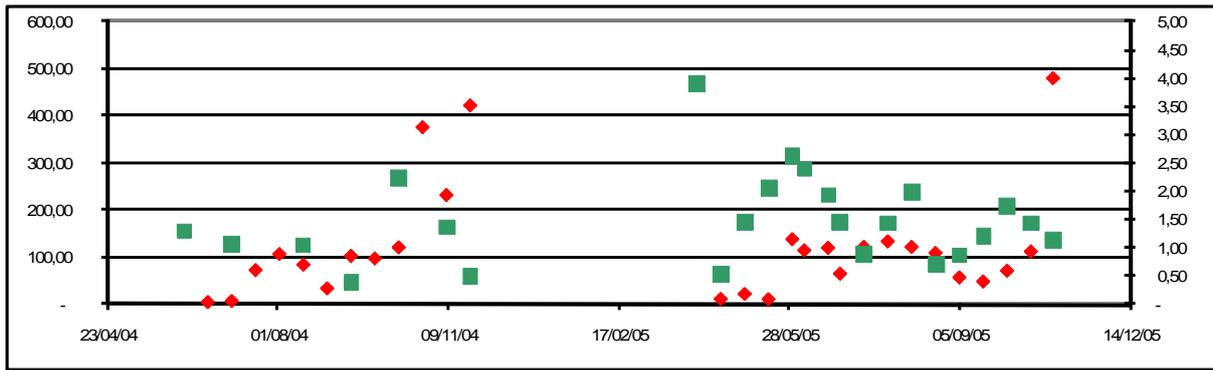


Figure 7 : Concentration en toxines dans la moule, en $\mu\text{g AO/kg}$ de chair (rouge) et quantité de chlorophylle en $\mu\text{g/L}$ dans le milieu (vert) en fonction du temps.

Il n'a pas été possible à ce jour de poursuivre des investigations permettant d'établir un modèle dynamique en cohérence avec les jeux de données disponibles. Des modèles simples décrivant le taux de bioaccumulation en fonction de la température, de l'estimation de la quantité de toxines dans le milieu et de la Chlorophylle, comme celui décrit par l'équation (1) ont été ajustés mais fournissent des résultats très mitigés. De nouvelles réflexions sur la structure des modèles devront donc être menées avant de tirer de plus amples conclusions,

$$\frac{dC}{dt} = \frac{\delta(T + \chi)\widehat{C}_{tox}}{[Chloro] + \varphi} - k(1 + \alpha[Chloro] + \beta T)C \quad (1)$$

avec $\delta, \chi, \varphi, \alpha, \beta, k$ des paramètres constants du modèle, C la concentration en toxines dans la moule, T la température, $[Chloro]$ la concentration en Chlorophylle dans le milieu, \widehat{C}_{tox} l'estimation sans dimension de la concentration en particules toxique dans le milieu par une somme pondéré de la concentration des trois espèces de *Dinophysis*.

2.2.5 Contamination par les PSP : interactions entre *Alexandrium minutum* et *Crassostrea gigas* en conditions expérimentales

D'une façon générale, il est préférable de parler de réponses biologiques ou physiologiques à l'exposition à la micro-algue toxique (ici *A. minutum*) plutôt que de l'impact de la toxine connue (généralement associée à des symptômes chez l'Homme). En effet, *A. minutum* produit des molécules toxiques, autres que les PSTs, qui sont susceptibles d'avoir des effets négatifs sur les organismes. L'exposition de *C. gigas* à *A. minutum* provoque aussi bien des réponses externes (comportement) que des réponses internes (tissulaires, cellulaires ou métaboliques).

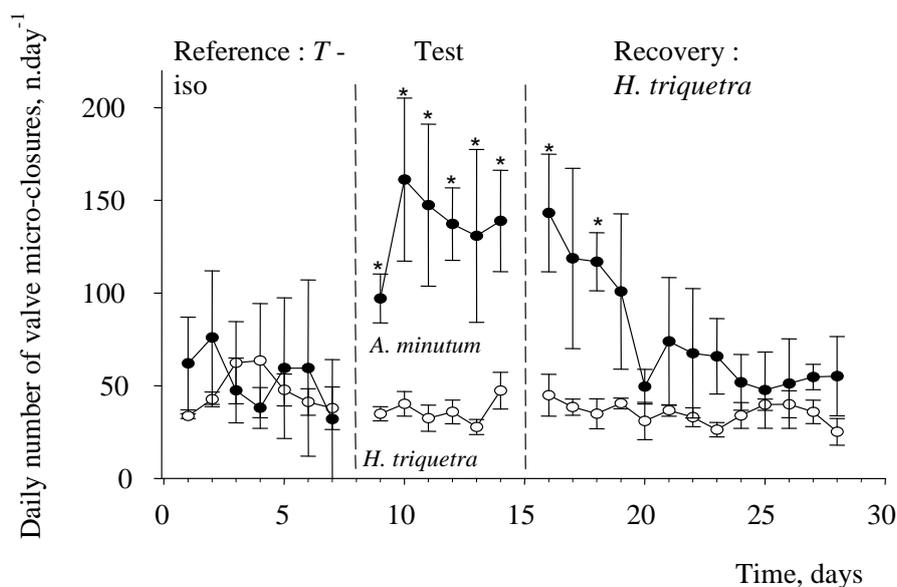


Figure 8. Nombre de micro fermetures valvaires (par jour) d’huîtres exposées à 10 mL.min⁻¹ d’une suspension d’ *A. minutum* et d’ *H. triquetra* (contrôle) à 5000 cellules.mL⁻¹. Pendant la période d’acclimatation (référence) les deux groupes d’huîtres étaient nourris avec T-Iso.

L’augmentation de la fréquence des micro-fermetures (Fig 8) observée chez *C. gigas* exposée à *A. minutum* peut être interprétée comme une réaction favorisant l’expulsion des cellules toxiques hors de la cavité palléale.

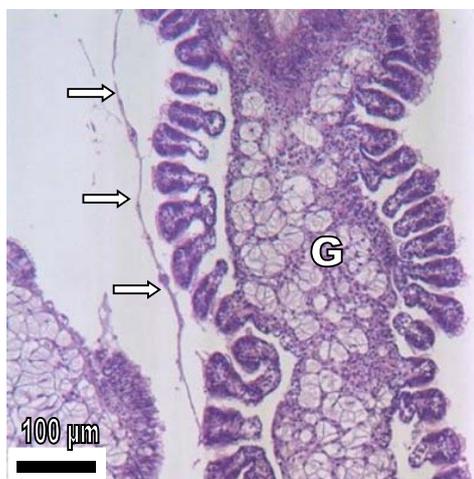


Figure 9 – Branchies (G) d’huîtres exposées à *A. minutum*. Mucus (flèches) produit par les branchies (barre d’échelle = 100 μm)

De plus, l’augmentation de la production de mucus par les branchies (Fig. 9) est supposée favoriser l’agglutination des cellules algales et donc leur expulsion sous forme de pseudo-fécès. Ce phénomène peut aussi être interprété comme le signe d’une irritation des ces organes fragiles. La production de composés hémolytiques par *A. minutum* (Arzul et al., 1999) pourrait être à l’origine de cette irritation voir un stress oxydatif.

Ces observations par histologie ont été complétées par des analyses au niveau moléculaire de l’expression de quelques gènes spécifiquement impliqués dans le métabolisme oxydatif et les réponses anti-oxydantes. Ainsi, une augmentation significative du taux d’ARNm des gènes codant pour des enzymes du système antioxydant (Superoxyde dismutase SOD, Catalase CAT, glutathion reductase GR, Glutathion-S-transférase GST) dans les branchies des huîtres exposées à *A. minutum* a été mise en évidence. Ceci suggère qu’un stress oxydatif (production de ROS) a été

induit par l'exposition à *A. minutum* et que le système antioxydant a été stimulé pour détruire l'excès de ROS dans les cellules. Néanmoins, les variations les plus drastiques concernent plus particulièrement l'expression des gènes codant pour la GR et la GST. La fonction majeure de la GR est de catalyser une conversion de glutathion oxydé (GSSG) à glutathion réduit (GSH). Pour qu'une cellule fonctionne correctement, la majorité du glutathion doit être sous forme réduite. La GST contribue aussi à maintenir un taux de glutathion réduit élevé dans les cellules. Ainsi, la GR et la GST permettent de maintenir la capacité anti-oxydante de la cellule contre les espèces réactive d'oxygène générées pendant le stress oxydatif.

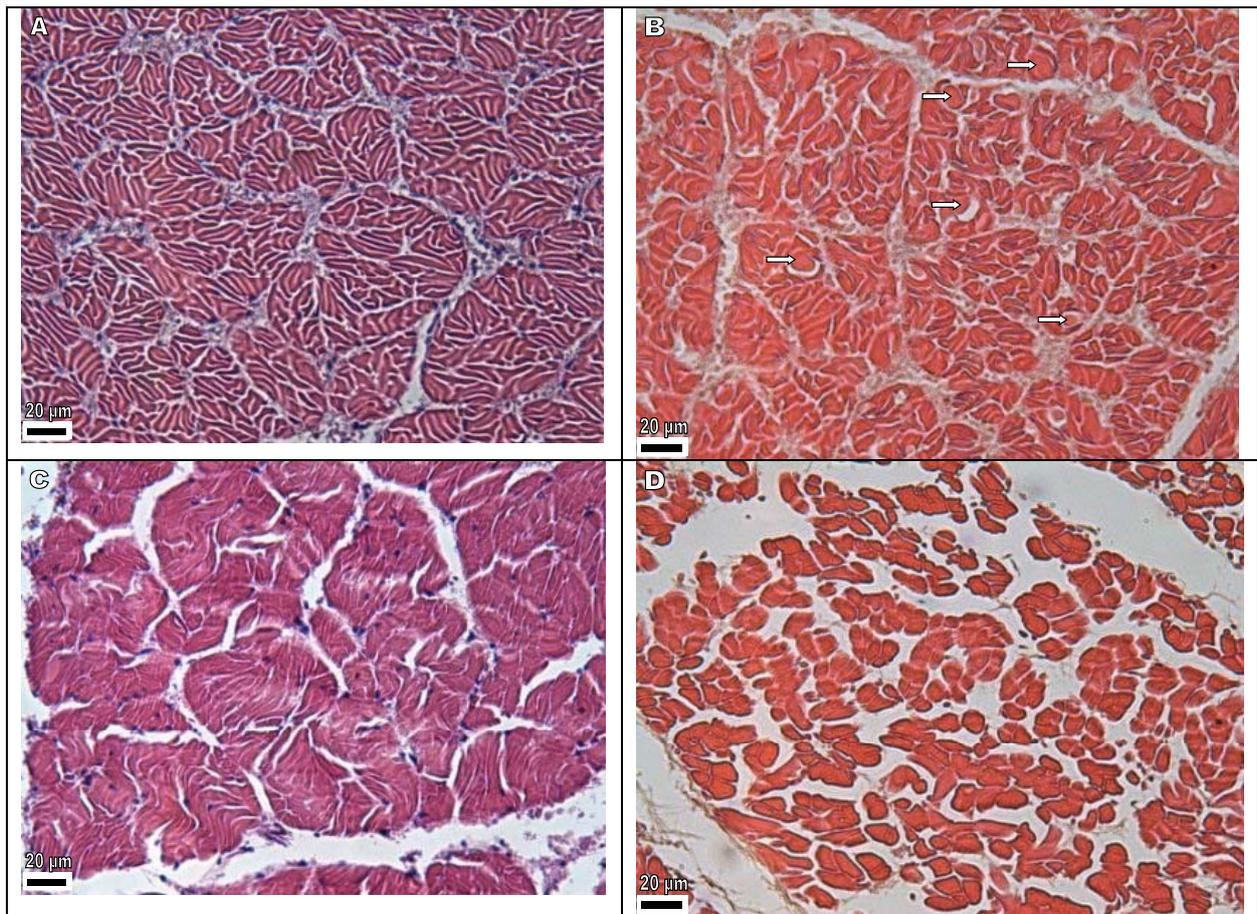


Figure 10 – Différents niveaux de myopathie (myo dégénérescence) observées dans les muscles des huîtres exposées à *A. minutum*. (barre d'échelle = 20 µm). A. fibres musculaires en bon état dans les huîtres contrôles; B. myoatrophie avec fibres musculaires atrophiées; C. dégénérescence musculaire formant des vagues; D. myoatrophie avec dégénérescence hyaline

Des altérations des fibres musculaires (atrophie, dégénérescence en forme de vagues, dégénérescence hyaline) ont également été observées au niveau du muscle adducteur des huîtres exposées à *A. minutum* (Fig. 10). Ces altérations musculaires peuvent aussi expliquer la modification de l'activité valvaire des huîtres mais cela reste à établir. L'exposition de *C. virginica* à *A. fundyense* peut aussi conduire à la paralysie du muscle adducteur Hégaret et al. (2007) suggérant dans ce cas un effet direct des PSTs sur le muscle.

Les cellules d'*A. minutum* ingérées par *C. gigas* provoquent une forte réaction inflammatoire dans la glande digestive (Fig. 11). Cette réaction se caractérise par une agglutination massive d'hémocytes autour de différents organes et tissus de la glande digestive : l'estomac, l'intestin ainsi que les conduits et tubules digestifs. Des hémocytes en diapédèse au niveau des épithéliums de ces mêmes organes ont également été observés. La présence de débris cellulaires et de kystes temporaires d'*A. minutum* dans la glande digestive peut en partie expliquer cette réaction inflammatoire. En effet, les hémocytes sont impliqués dans la réponse immunitaire des bivalves face aux pathogènes et aux polluants (Chu et Lapeyre, 1993 ; Ford et al., 1993 ; Fisher et al., 2000).

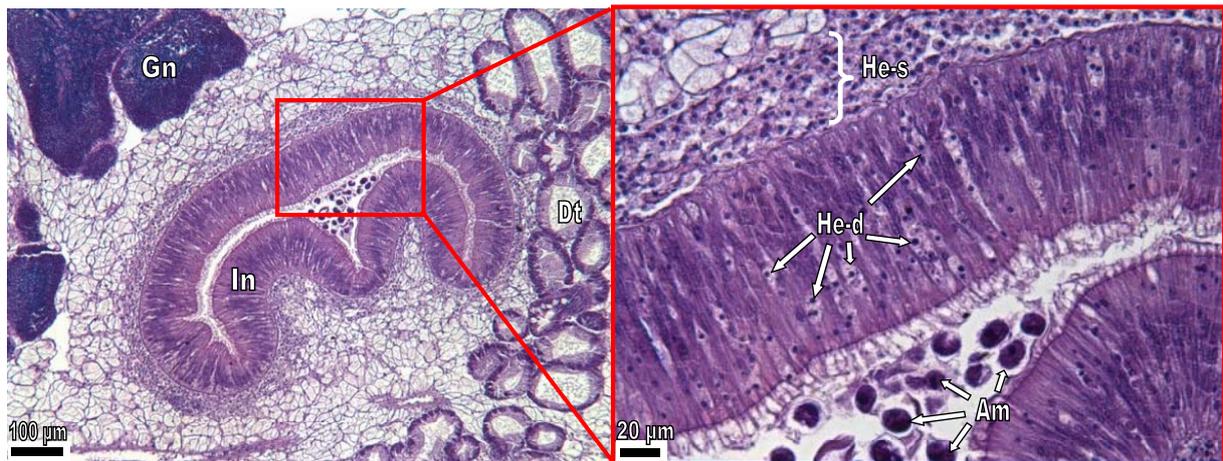


Figure 11 – Réponse inflammatoire dans l'intestin d'une huître exposée à *A. minutum*, avec agglutination massive des hémocytes dans les tissus conjonctifs entourant l'intestin et avec des hémocytes en diapédèse à travers l'épithélium intestinal. Intestin (In), gonade (Gn) et tubules digestifs (Dt) des huîtres. Cellules d'*A. minutum* (Am), hémocytes agglutinés (He-s) et hémocytes en diapédèse (He-d).

La réaction inflammatoire observée ici irait donc plutôt dans le sens d'une activation du système immunitaire des huîtres creuses, *C. gigas*, lorsque celles-ci sont exposées à *A. minutum*.

En parallèle de cette réaction inflammatoire, les paramètres hématologiques et hémolymphatiques de *C. gigas* ont présenté des variations, bien que modestes, à la suite de l'exposition à *A. minutum*. Ces variations paraissent pour certaines liées à la quantité de PSTs accumulées par les huîtres. La concentration totale en hémocytes, l'activité de la phénoloxydase des hémocytes et la production d'espèces réactives de l'oxygène par les granulocytes et les hyalinocytes augmentent de façon parallèle aux quantités de PSTs accumulées par *C. gigas* (Fig. 12). Cela va dans le sens de l'existence d'un stress oxydatif consécutif à l'exposition à *A. minutum*.

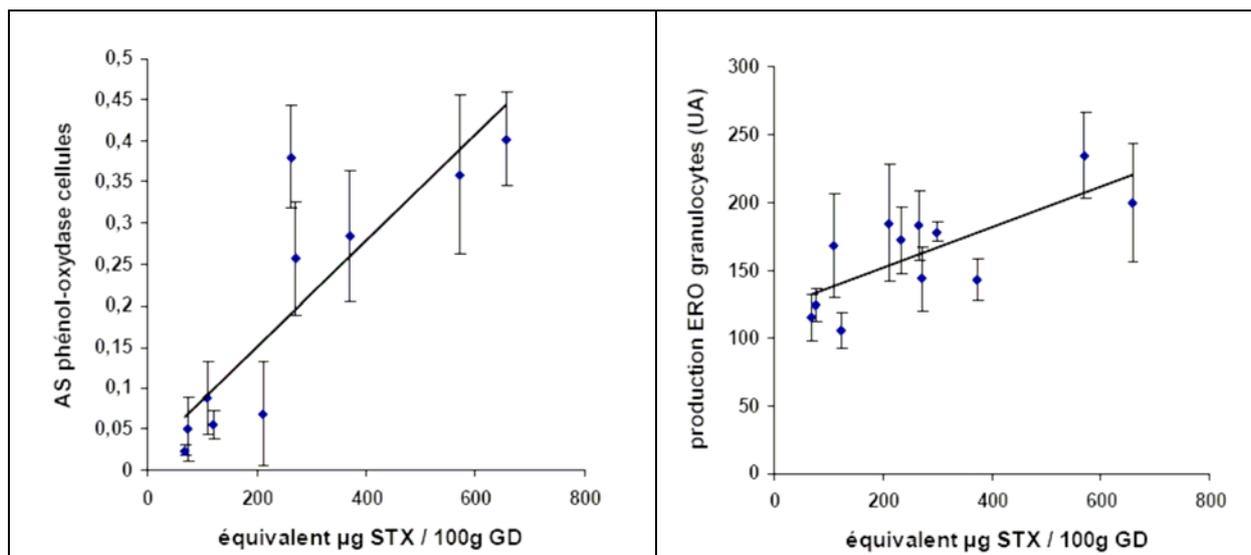


Figure 12 : Relations entre l'accumulation de toxines (équivalent saxitoxine) et l'activité phénoloxydase (à gauche) et la production d'espèces réactives de l'oxygène (à droite) par les hémocytes.

Néanmoins, les relations causales entre la présence de PSTs dans les tissus de *C. gigas* et les variations des paramètres hémocytaires observées suite à une exposition à *A. minutum* ne sont pas toujours évidentes.

Au-delà de la réaction inflammatoire observée dans la glande digestive, les lipides structuraux et les lipides de réserves sont aussi modifiés dans les glandes digestives des huîtres exposées à *A. minutum*. La variation la plus importante est la diminution de la quantité de lipides structuraux (phospholipides), essentiellement liée à la diminution de la quantité de phosphatidylcholine (Fig. 13).

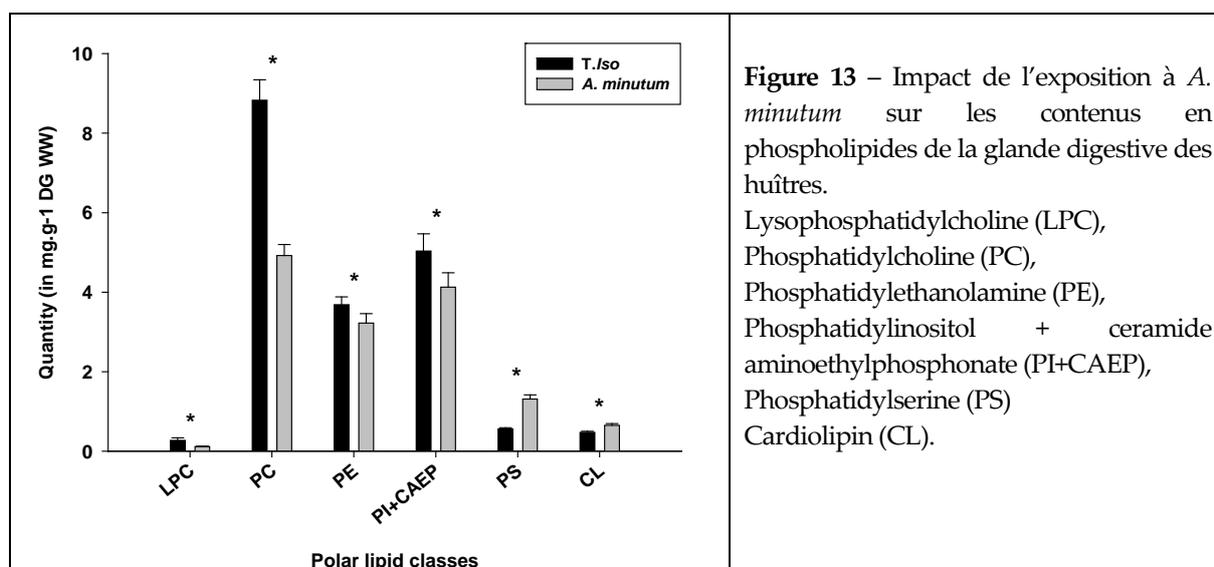


Figure 13 – Impact de l'exposition à *A. minutum* sur les contenus en phospholipides de la glande digestive des huîtres.
Lysophosphatidylcholine (LPC),
Phosphatidylcholine (PC),
Phosphatidylethanolamine (PE),
Phosphatidylinositol + ceramide aminoethylphosphonate (PI+CAEP),
Phosphatidylserine (PS)
Cardiolipin (CL).

Ces variations pourraient être liées, soit à une **perturbation de la synthèse même des phospholipides**, soit à une **modification des compositions cellulaires et sub-cellulaires de cet organe**. L'impact des micro-algues toxiques sur le métabolisme et/ou la

composition lipidique des huîtres mérite d'être confirmé et approfondi, du fait de leur rôle clef dans le développement et la reproduction des bivalves (Soudant et al. 1999). La peroxydation des lipides, associée à la réaction inflammatoire pourrait constituer une autre hypothèse expliquant la disparition des phospholipides.

L'impact de l'exposition à *A. minutum* a également été évalué au niveau des gamètes mâles produits par les huîtres exposées à cette micro-algue. **L'exposition des géniteurs mâles de *C. gigas* à *A. minutum* entraîne une diminution de la mobilité des spermatozoïdes et de leur contenu en ATP par rapport à des géniteurs nourris avec T-Iso (Fig. 14).** Les résultats obtenus indiquent également une altération de la structure du noyau ainsi qu'une modification de l'activité mitochondriale. On peut supposer que ces modifications peuvent avoir des effets sur la fertilité des spermatozoïdes et compromettre le succès reproductif des huîtres.

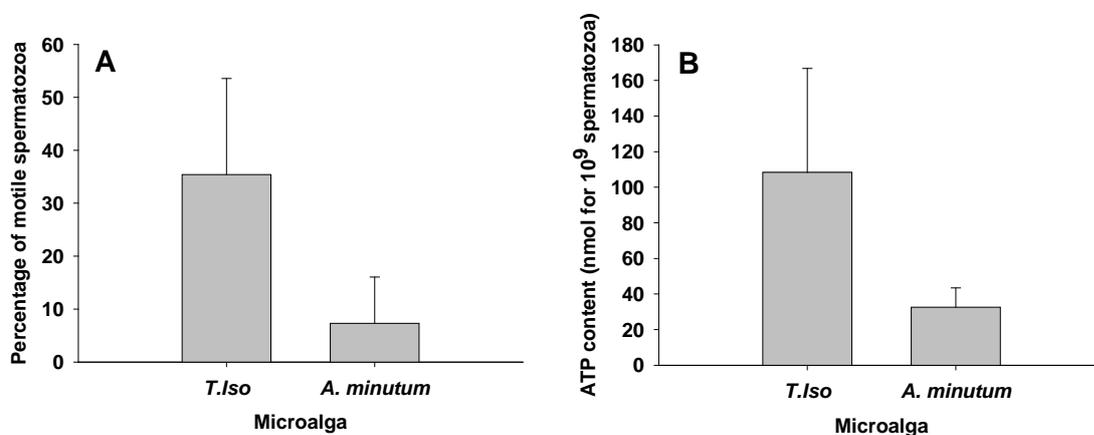


Figure 14 – Mobilité (A) et contenu en ATP (B) des spermatozoïdes produits par les huîtres exposées à *A. minutum*.

Des expérimentations de fécondation *in vitro* après exposition de géniteurs mâles à *A. minutum* pourraient permettre de tester cette hypothèse. Il serait aussi intéressant d'évaluer la qualité des ovocytes produits par les huîtres selon le même type d'approche. À plus long terme, la qualité des larves et des juvéniles (dans le cas d'une fécondation réussie) pourrait aussi être évaluée. De même, une recherche d'effets trans-générationnels pourrait être réalisée.

Implication de l'état physiologique de l'huître dans l'accumulation de PSTs

L'enregistrement de l'activité valvaire des huîtres exposées à *A. minutum* a permis de faire un lien entre l'accumulation de toxines et le comportement : **plus les huîtres ont un temps et une amplitude d'ouverture importants, plus elles accumulent de PSTs (Fig. 15).** Cela suggère que plus une huître est ouverte (en termes de durée et d'amplitude), plus elle ingère de micro-algues et plus elle accumule de toxines.

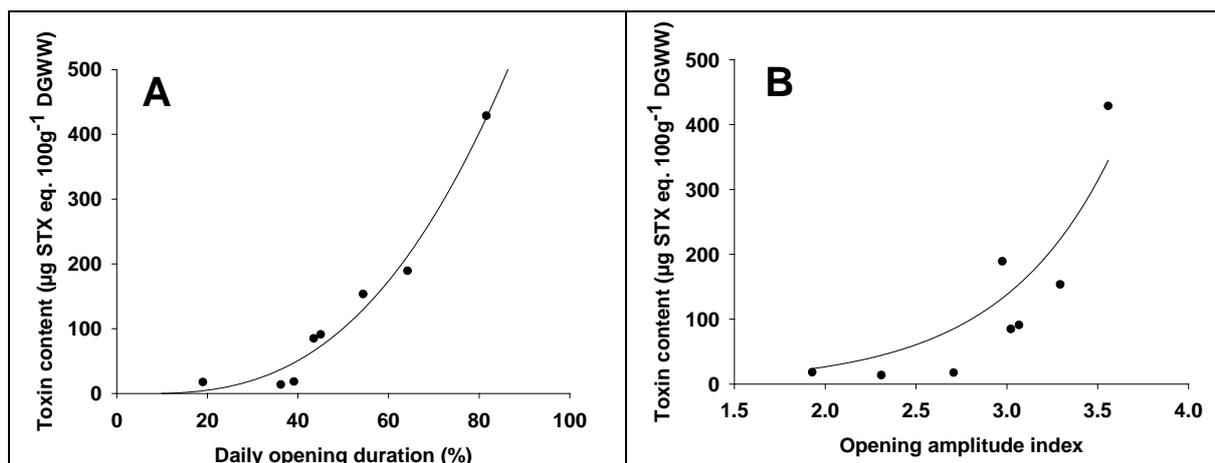


Figure 15 – Relation entre le contenu en toxine (exprimée en µg STX eq. 100 g⁻¹ de poids frais de glande digestive) et la durée journalière d’ouverture des valves (A) et l’amplitude d’ouverture des valves (B) des huîtres exposées à *A. minutum*.

L’existence d’une variabilité inter-individuelle de sensibilité des huîtres vis-à-vis d’*A. minutum* et/ou de ses toxines pourrait aider à expliquer ce phénomène. En effet, les individus qui augmentent leur temps et leur amplitude d’ouverture s’exposent d’avantage aux micro-algues toxiques que ceux qui ne modifient pas ou peu leur comportement. Ils seraient donc moins sensibles à la toxicité des micro-algues et ne mettraient pas en place les mécanismes leur permettant de minimiser le contact. De telles différences de sensibilité aux PSTs ont été décrites dans la littérature entre différentes espèces de bivalves (Bricelj et Shumway, 1998) mais aussi entre individus d’une même espèce mais provenant de différents sites (Bricelj et al. 2005). Bricelj et al. (2005) ont exposé des myes (*Mya arenaria*) provenant de deux populations différentes à *A. tamarense*, dans des conditions identiques. Les individus de l’une de ces populations présentaient une mutation les rendants moins sensibles aux PSTs (diminution d’un facteur 1000 de l’affinité de la saxitoxine pour les sites actifs des pompes à sodium des cellules nerveuses). En parallèle, ces mêmes individus présentaient une accumulation en toxines quatre fois supérieure à celle des individus sensibles (provenant de la seconde population et ne présentant pas de mutation). Lors des expositions de *C. gigas* à *A. minutum*, les **variations individuelles d’accumulation des PSTs peuvent atteindre un facteur 80** entre deux huîtres placées dans les mêmes conditions d’exposition. **Les résultats de la présente étude tendent à montrer l’existence d’une différence de sensibilité vis-à-vis des PSTs entre des huîtres appartenant à une même population.**

Historique de la contamination PSP des huîtres

Des études précédentes (Lassus et al, 2004) avaient montré que la bioaccumulation de toxines PSP par les huîtres pouvait être modulée par les concentrations en microalgues toxiques disponibles (*Alexandrium minutum*) et la concentration en matières minérales. En fait on observait un accroissement de la

bioaccumulation avec l'augmentation de la concentration en algues toxiques jusqu'à un optimum. Au delà de cette valeur (par exemple à 10 000 cellules ml⁻¹) la consommation des mollusques filtreurs était inhibée et la bioaccumulation réduite. En se positionnant en dessous des concentrations induisant un début d'inhibition de la consommation (5000 cellules ml⁻¹) il était intéressant de vérifier expérimentalement si deux régimes différents en *Alexandrium minutum* pouvaient induire chez des huîtres creuses des cinétiques différentes de contamination et surtout si ces conditions (« historique de contamination ») pouvaient entraîner des vitesses différents d'élimination des toxines. Des essais de contamination ont donc été réalisés sur des huîtres triploïdes avec deux concentrations cellulaires en *A.minutum*, 200 et 1000 cellules mL⁻¹. La détoxification a été réalisée dans les deux cas par une alimentation en continue avec la diatomée *Skeletonema costatum* à 2000 cellules ml⁻¹. On n'observe aucun effet du régime toxique sur la pente des courbes de contamination, à 200 ou à 1000 cellules/ml, ce qui semblerait indiquer que l'augmentation de la concentration cellulaire ne modifie pas le comportement alimentaire (Fig. 16). La similitude des productions cumulées de bio-dépôts au cours du temps va dans le sens de cette hypothèse. Enfin, on n'observe pas de différence significative entre les vitesses de détoxification, quelle que soit la toxicité initiale. Ces résultats semblent montrer que des différences importantes de biomasse d'algues toxiques disponibles ne modifieraient pas le taux de consommation des bivalves et que ces derniers ne prélèveraient que la quantité nécessaire à leur nutrition.

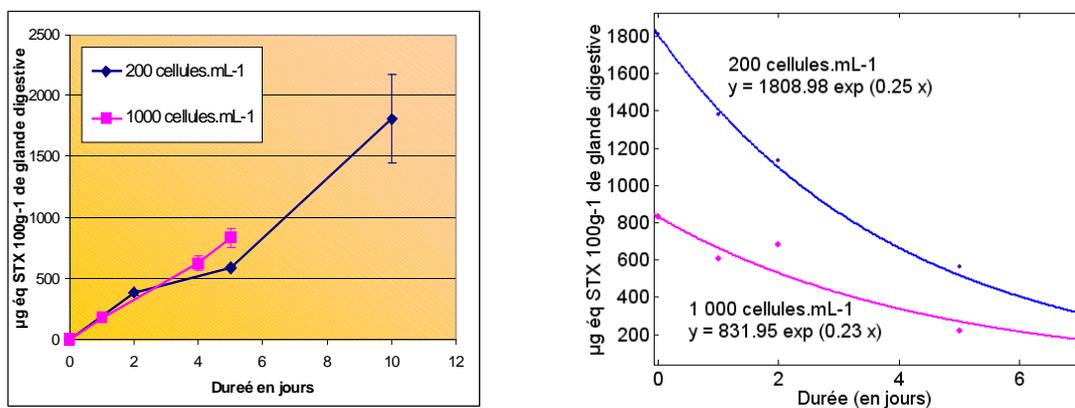


Figure 16 : Cinétiques observées de contamination (à gauche) et courbes de tendance des cinétiques de détoxification (à droite) des glandes digestives des huîtres *C. gigas* selon les concentrations en *A. minutum* ayant servi à la contamination

En effet, on n'observe pas d'inhibition de l'activité valvaire ni de la production de biodépôts des huîtres triploïdes utilisées pendant la contamination, que ce soit pour 200 ou 1000 cellules mL⁻¹ d'*A.minutum*. Cette observation diffère cependant de résultats antérieurs obtenus avec des huîtres diploïdes (inhibition de l'activité valvaire).

Effets de la ploïdie (2n versus 3n) sur la bioaccumulation de toxines

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 faible permettant d'éviter l'aspect dit « laiteux » des huîtres lorsqu'elles sont en période de reproduction. Les triploïdes peuvent ainsi être vendues tout au long de l'année. De plus, ces huîtres ont généralement une mortalité estivale plus faible que l'on peut attribuer à leurs dépenses énergétiques réduites (Kesarodi-Watson et al. 2001b, Garnier-Géré et al. 2002), et à la limitation de la métabolisation des protéines (Hawkins & Day 2003). L'effort de reproduction étant moindre chez les triploïdes, elles investiraient moins d'énergie dans la production de gamètes, et auraient donc plus d'énergie pour d'autres fonctions métaboliques, telles que la nutrition ou la croissance (Nell, 2002). Il était donc important d'envisager un impact éventuel de la ploïdie sur l'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. La seule étude réalisée sur l'influence de la ploïdie sur la contamination de métaux lourds (Amiard et al. 2005) indiquait que les diploïdes juvéniles accumulaient, lors d'une seconde exposition, davantage le cadmium et l'argent que les huîtres triploïdes ; par contre, si elles n'avaient jamais été exposées à l'argent, les huîtres triploïdes accumulaient plus de ce métal lourd que les diploïdes.

Dans le cadre de MODECOPHY et d'une étude co-financée par le SMIDAP six expériences de contamination expérimentale de diploïdes et de triploïdes ont été réalisées à Brest et à Nantes (5 en période de reproduction et une en repos sexuel). La ploïdie des huîtres a été systématiquement contrôlée par cytométrie de flux.

Lorsqu'elles sont exposées à *A. minutum* pendant la période de reproduction, les huîtres triploïdes accumulent deux à trois fois plus de PSTs dans leur glande digestive que les huîtres diploïdes. Par contre, aucune différence dans le contenu toxinique des huîtres diploïdes et triploïdes n'a été observée pendant l'hiver, en dehors de la période de reproduction. La différence observée sur le contenu toxinique se retrouve dans tous les tissus à l'exception du manteau (Fig. 17).

L'accumulation significativement plus importante de toxines par les triploïdes par rapport aux diploïdes entre avril et juin lors des essais réalisés soit à Brest, soit à Nantes, pourrait éventuellement s'expliquer par un état physiologique différent des diploïdes pendant les expériences. On sait, en effet, que les réponses métabolique et alimentaire de *Crassostrea gigas* varient en fonction du stade de reproduction (Soletchnik et al. 1996 ; Delaporte et al, 2006). Néanmoins, la bioaccumulation plus élevée de PST chez les triploïdes ne semblait provenir ni de la filtration, ni de la consommation, ni de la quantité de toxines prélevées, ni des biotransformations des toxines (Guéguen et al, 2008). Cependant, le bilan énergétique des huîtres en phase de fin de maturation est négatif (-15 J h⁻¹) alors qu'il est compris entre 110 et 170 J h⁻¹ pour les huîtres en stade immature ou post ponte (Soletchnik et al. 1996). Ce déficit énergétique observé à la fin de la maturation sexuelle serait dû à la diminution de la fonction d'absorption, les huîtres diploïdes ayant 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. 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 induirait une différence de contenu toxinique entre les huîtres diploïdes et les huîtres triploïdes pendant la saison estivale.

La différence d'accumulation de PSTs entre les huîtres diploïdes et triploïdes peut également s'expliquer par des différences d'activités métaboliques entre les huîtres triploïdes et diploïdes en période de reproduction active. À la période durant laquelle les expérimentations ont été réalisées (avril-mai-juin), **les huîtres triploïdes présentent un métabolisme (oxydatif notamment) plus actif que les diploïdes**. L'effort de reproduction étant moindre chez les triploïdes, elles investiraient moins d'énergie dans la production de gamètes, et auraient donc plus d'énergie pour d'autres fonctions métaboliques, telles que la nutrition ou la croissance (Nell, 2002). Toutefois il faut rappeler que les différences physiologiques et métaboliques observées entre les diploïdes et les triploïdes pourraient aussi s'expliquer par leurs patrimoines génétiques respectifs. L'augmentation du matériel génétique et du nombre de copies des gènes chez les triploïdes pourraient avoir des implications en terme de physiologie, en ayant des effets additifs et non-additifs sur l'expression de certains gènes (Riddle et al., 2006; Johnson et al., 2007).

Une différence de sensibilité pourrait également expliquer l'écart important entre les quantités de PSTs accumulées par les huîtres diploïdes et triploïdes exposées à *A. minutum*. Les huîtres triploïdes seraient moins « incommodées » par la présence d'*A. minutum*, ingéreraient plus de cellules toxiques et donc accumuleraient plus de toxines.

En conclusion, deux hypothèses non exclusives peuvent dès lors être proposées :

- i) Les huîtres triploïdes sont physiologiquement et métaboliquement plus actives que les huîtres diploïdes en période de gamétogenèse active et accumuleraient ainsi plus de toxines.
- ii) Les huîtres triploïdes sont moins sensibles aux toxines paralysantes (PSP) que les diploïdes facilitant leur acquisition d'énergie à partir d'algues toxiques et entraînant ainsi une accumulation accrue de toxines.

Ces différences de sensibilité et/ou d'activités métaboliques pourraient s'expliquer non seulement pas la différence d'effort reproductif entre triploïdes et diploïdes mais aussi par l'augmentation du matériel génétique et du nombre de copies des gènes chez les triploïdes (Riddle et al., 2006 ; Johnson et al., 2007).

Cette étude a ainsi soulevé l'hypothèse d'un effet possible du stade de reproduction sur l'accumulation des toxines PSP dans les huîtres diploïdes. Il serait utile de tester l'influence de l'état de maturation des huîtres sur l'accumulation des toxines en réitérant la même expérience, dans les mêmes conditions, à chaque stade du cycle de reproduction.

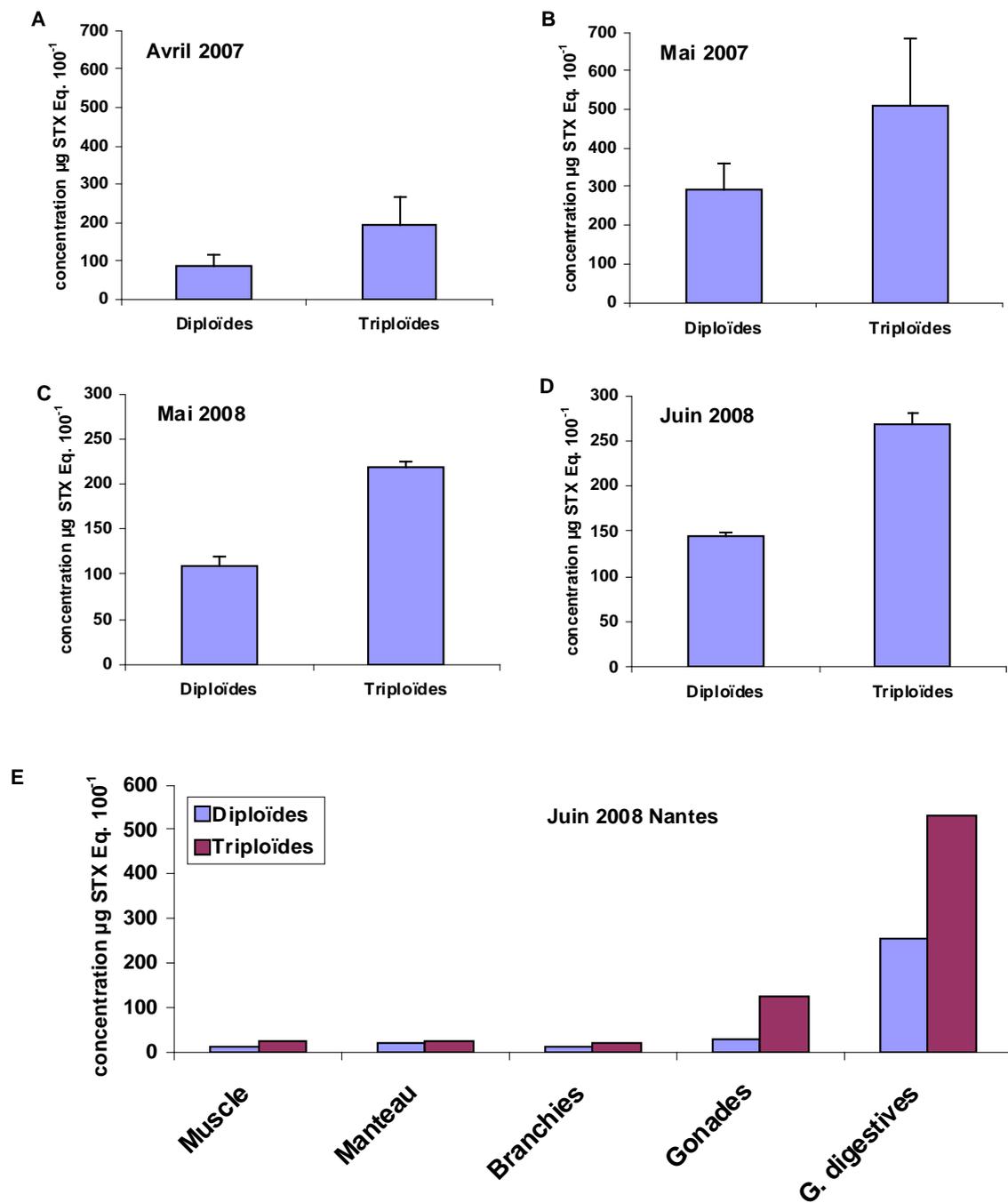


Figure 17 – Contenus en PSTs (exprimé en $\mu\text{g STX eq. } 100 \text{ g}^{-1}$ de tissus en poids frais, \pm CI) dans les glandes digestives d’huîtres diploïdes et triploïdes exposées à *A. minutum* lors des expérimentations d’avril (A) et mai (B) 2007 et de mai (C) et juin (D) 2008 et dans les différents organes (E) d’huîtres diploïdes et triploïdes exposées à *A. minutum* lors d’une expérience en juin 2008.

2.2.6 Modèle intégratif (toxines PSP et huîtres)

Les objectifs de la mise en place d'un modèle intégratif décrivant la cinétique de contamination des bivalves contenant des phycotoxines sont :

- l'aide à la compréhension des mécanismes biologiques et des paramètres environnementaux pouvant modifier cette cinétique;
- la prédiction de la concentration en toxines accumulées au cours du temps. Les modèles généralement utilisés sont à un ou deux compartiments. Dans le cas présent, un modèle à un seul compartiment sera préféré et nous avons fait le choix de travailler sur la base des données de contamination exprimées par rapport à la chair totale. Les vitesses de contamination spécifiques à chaque organe ne seront donc pas prises en compte. C'est la contamination globale du bivalve qui sera considérée sachant que l'organe qui accumule principalement la toxine PSP est la glande digestive (qui représente environ 20 à 30 % du poids de chair).

Dans un premier temps, on constate que les courbes d'accumulation de toxines dans l'huître en fonction du temps peuvent être généralement assimilées à des droites. Les modèles environnementaux à un compartiment décrivent la variation de concentration en toxine comme la résultante de la différence entre un terme de prise de toxine et un terme d'élimination des toxines. La 'prise' de toxines est considérée, le plus souvent, comme proportionnelle à la quantité de toxines dans le milieu et peut donc être considérée comme constante si cette quantité de toxines dans le milieu reste constante. La décontamination est généralement décrite par le produit d'une vitesse relative d'élimination des toxines (supposée constante pour des conditions environnementales fixes) et de la concentration en toxines présentes dans le mollusque. Cette proportionnalité de l'élimination permet d'exprimer que le flux sortant du mollusque est plus élevé pour une forte concentration de toxines accumulées et qu'il est faible pour des concentrations faibles. Cette relation entraîne un tassement au cours du temps du taux de bioaccumulation des toxines puisque l'élimination augmente mais que la 'prise' reste constante. Cependant une relation de cette forme n'a que très rarement été observée lors des expérimentations de contamination réalisées dans MODECOPHY ou dans d'autres projets. Nous avons même pu observer pour quelques expérimentations un phénomène d'accroissement du taux de bioaccumulation après le 3^{ème} jour de contamination. Toutefois, les incertitudes sur nos données ne nous permettent pas de garantir un tel phénomène et nous avons choisi de considérer une prise de toxines constante pour une quantité constante de toxines dans le milieu. Par contre, la relation proposée pour l'élimination a pu, à plusieurs reprises, être mise en évidence, notamment dans les travaux d'une des thèses associées à MODECOPHY (M.Guéguen).

Il semble donc possible que la relation traduisant l'élimination des toxines soit perturbée pendant les phases de contamination. Une hypothèse serait que la présence de toxines dissoutes bloquerait ou limiterait les mécanismes d'élimination. Notre modèle étant axé sur la prédiction de l'accumulation de toxines pendant la contamination, nous avons donc fait le choix de travailler sur un taux de bioaccumulation de toxines paralysantes constant pour chacune de nos expérimentations. Cela sous-entend que, soit l'élimination des toxines est nulle, soit elle est faible et constante et donc indépendante de la concentration en toxines accumulées dans le coquillage. L'assimilation à un accroissement de la concentration en toxines avec une pente dépendant du temps égale à une constante est corroborée par des

R² élevés lors des ajustements. On obtient ainsi les pentes correspondant à chaque période de contamination (tableau 3), ce qui permet désormais de s'affranchir du facteur temps.

	pen	Intervalles de confiance	R ²
Historique de contamination Rc1	45,13	[39,09 - 51,17]	0,988
Historique de contamination Rc2	59,73	[45,86 - 73,61]	0,967
Modecophy nov 07*	57,60	[45,97 - 69,22]	0,945
Modecophy nov 07	57,72	[39,5 - 75,93]	0,835
Modecophy mars 08	10,33	[7,39 - 13,28]	0,858
Modecophy juin 08*	14,63	[8,76 - 20,5]	0,838
Modecophy juin 08	27,92	[17,19 - 38,65]	0,848
Penzé oct 01	34,28	[13,39 - 55,17]	0,723
Penzé avr 02	63,95	[47,63 - 80,26]	0,927
Penzé oct 01	8,62	[3,502 - 13,74]	0,588
Penzé oct 01	10,81	[7,518 - 14,09]	0,865
Penzé oct 01	47,39	[38,09 - 56,7]	0,969
Penzé avr 02	74,26	[57,63 - 90,9]	0,904
Penzé oct 02	71,27	[56,59 - 85,94]	0,942
Penzé avr 02	102,60	[66,88 - 138,4]	0,873
Penzé avr 02	114,80	[103,6 - 125,9]	0,984
Thau	14,81	[8,68 - 20,94]	0,627
Thau	37,60	[23,12 - 52,08]	0,697

Tableau 3 : Estimation des pentes pour différentes expériences de contamination avec *A.minutum* : résultats obtenus avec Matlab et la fonction « cftool ». Les étoiles (*) correspondent aux expériences sur des huîtres diploïdes. En *italique*, les expériences avec un autre dinoflagellé toxique : *A.catenella*.

Nous avons ensuite procédé à une évaluation / modélisation de la correspondance entre le taux estimé de bioaccumulation des toxines et les conditions expérimentales testées. Ceci a permis de déterminer les facteurs environnementaux influents tels que nombre de cellules toxiques, nombre de cellules non toxiques, biovolume toxique et non toxique, température, toxicité des cellules, vitesse de circulation autour des huîtres et taille des cellules. Nous avons ensuite testé les interactions possibles entre les différents paramètres autrement que par des relations linéaires. En effet, ce modèle simple n'explique que très faiblement le taux de bioaccumulation (R² = 0.41). De plus, certains paramètres ont plus d'importance que les autres.

La fonction « Regress » de Matlab permet de tester le poids des différents paramètres les uns par rapport aux autres. Par cette approche de type « boîte noire », nous avons mis en évidence un effet quadratique sur la concentration en cellules toxiques (ou sur le biovolume toxique). Mais aucun modèle de type fonction polynomiale d'ordre 2 avec interactions n'a permis d'améliorer le R² au delà de 0.59. Les R² ajustés, qui tiennent compte du nombre de paramètres via le nombre de degré de liberté pour l'ajustement, sont médiocres en raison du grand nombre de paramètres (R² ajusté maximum = 0.51). La fonction Corrcoeff permet de

mettre en évidence les redondances existant dans le jeu de données et de ne sélectionner que les données les plus importantes.

Les données utilisées sont issues d'expériences réalisées dans d'autres projets et dans MODECOPHY. Elles sont en général réalisées sur 4 jours, exception faite de l'essai 'Historique de contamination', qui a duré 10 jours. Le modèle s'appuie donc sur des données récoltées en France, sur *Crassostrea gigas* contaminée par *Alexandrium minutum*, avec des algues fourrages de type *Skeletonema costatum*, à 16°C.

Sur la base de ces premiers résultats, nous avons choisi de ne retenir uniquement que les trois facteurs suivants :

- Biovolume total (BVT) d'algues toxiques et fourrages. Les diamètres considérés sont de 24 μm pour *A.minutum* et de 8 μm pour *S.costatum* et sont exprimés en μm^3 . Les biovolumes prennent en à la fois le nombre et la taille des cellules présentes dans le milieu.
- Ratio 'R' entre biovolume d'algues toxiques et biovolume total, soit la quantité d'algues toxiques par rapport à l'ensemble des algues présentes dans le milieu (toxiques + non-toxiques). Ce paramètre permet de représenter l'influence de la dilution 'massique'.
- Quantité de toxines par unité de biovolume (Q), en $\mu\text{g eq STX}/\mu\text{m}^3$ d'algues toxiques, qui prend en compte la toxicité de l'algue toxique par rapport à son volume.
- Quantité de toxines dans le milieu (Qté), obtenue par le produit des trois facteurs précédents, en $\mu\text{g eq STX}/\text{ml}$.

La meilleure simulation obtenue sur la base de ces trois facteurs correspond à un modèle avec effet multiplicatif pour décrire les interactions entre variables. Le premier terme du modèle permet d'exprimer le taux de nourriture consommée et assimilée. Le produit du second terme R par la quantité de Toxine par unité de biovolume permet de tenir compte de la dilution de la toxine au sein de la nourriture consommée et assimilée. Le modèle est le suivant:

$$\tau_{\text{tox}} = \frac{\beta \times \text{BVT}}{k_s + \text{BVT}} \times R(t/nt) \times Q \times \varphi$$

La fonction φ permet de prendre en compte le fait que l'huître cesse d'accumuler des toxines à partir d'une certaine concentration en cellules dans le milieu (ou sous forme dissoute sous l'hypothèse d'une proportionnalité entre la forme dissoute et la quantité de toxines dans le milieu sous forme particulaire) et tente d'intégrer l'existence d'une inhibition. La fonction φ doit avoir les propriétés suivantes : une fonction strictement décroissante partant de 1 pour une quantité de toxines dans le milieu nulle et terminant sur zéro pour une quantité de toxines tendant vers l'infini. Elle doit présenter un point d'inflexion représentatif de l'inhibition, et avec un domaine autour de cette valeur permettant d'ajuster l'ampleur de la zone d'inhibition. Nous avons cherché une fonction respectant l'ensemble de ces propriétés et décrite avec un minimum de paramètre à ajuster, et dont les paramètres sont physiquement explicites. La fonction φ suivante a donc été retenue :

$$\varphi = \frac{1}{\arctan((k_0 k_1) + \pi/2)} \times [\arctan(k_0(k_1 - Q_{\text{té}})) + \pi/2]$$

Avec :

τ_{tox} : Taux de bioaccumulation de toxines dans le mollusque en $\mu\text{g eq STX}/100\text{g}$ de chair/jour.
 BVT : Biovolume total d'algues dans le milieu en μm^3 .
 R(t/nt) : Ratio d'algues toxiques / non toxiques.
 Q : Quantité d'algues toxiques par unité de biovolume en $\mu\text{g eq STX}/\mu\text{m}^3$.
 Qté : Quantité de toxines dans le milieu en $\mu\text{g eq STX}/\text{ml}$.

β : Quantité maximale de toxines consommée et assimilée par l'huître en $\mu\text{m}^3/100\text{g}/\text{jour}$.
 k_s : Biovolume d'algues toxiques quand $\beta=1/2$.
 k_1 : Point d'inflexion de la courbe, auquel l'accumulation des toxines dans l'huître diminue.
 $k_0 k_1$: Pente à k_1 .

Une fonction spécifique, baptisée mintox a été écrite pour l'occasion pour permettre l'identification sous Matlab des paramètres. Cette fonction permet une minimisation par la méthode des moindres carrés et recherche les quatre paramètres du modèle via la fonction Fminsearchbnd dans un domaine prédéfini par l'utilisateur (ce qui est rendu faisable aisément par le sens « physique » donné aux paramètres).

On obtient :

$\beta = 371,4060 \cdot 10^6 \mu\text{g eq STX}/100\text{g}$ de chair/jour
 $k_s = 0,5740 \cdot 10^6 \mu\text{m}^3$
 $k_0 = 6,9383$
 $k_1 = 5,2298$

Avec un $R^2 = 0,7773$.

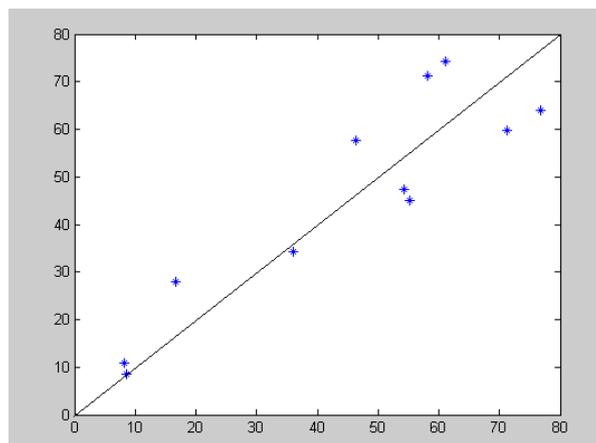


Figure 18 : Relation entre valeurs prédites et observées du taux de bioaccumulation des toxines

Dans l'idéal, les points devraient être alignés sur une droite de coefficient 1. Ici, (Fig 18) ils sont répartis de manière plutôt uniforme autour de cette droite. Le modèle manque de précision mais reste envisageable et fournit un bon R^2 et un bon R^2 ajusté.

Nous avons ensuite affiné ce modèle en intégrant un terme multiplicatif complémentaire permettant la prise en compte de la vitesse de circulation autour des huîtres. Ce terme est de la forme :

$$\frac{v+\delta}{v+\delta+k_v}$$

avec v la vitesse de circulation en cm/s et δ une constante ajustée à 0.34 et k_v une autre constante à 0.12. Dans ce cas, la valeur de β passe de 371.4 à 403.7. Il permet d'accroître légèrement le R^2 (0.795) et de façon moindre le R^2 ajusté (0.764).

Un terme d'une forme similaire pourrait probablement à terme être intégré pour tenir compte de la quantité de matière minérale dans le milieu. De même, l'effet de la température pourrait être exprimé par un terme de la forme de l'équation de Van der Meer de type Arrhénius

$$\frac{e^{(\chi-\frac{\epsilon}{T})}}{1+e^{(\frac{\phi}{T}-\eta)}+e^{(\gamma-\frac{\omega}{T})}}$$

avec T la température et 6 paramètres d'ajustement de cette structure. Nos jeux de données ne nous permettent pas actuellement d'effectuer un tel ajustement.

De la même façon, plusieurs facteurs liés au comportement des huîtres nourries avec des micro-algues toxiques n'ont pu être exprimés de façon quantifiable au cours du temps (manque de cinétiques complètes). De plus, certaines réponses physiologiques peuvent présenter un caractère réversible. Le modèle proposé n'intègre donc pas - dans l'état actuel de l'étude - l'impact de la maturation (différence entre diploïdes et triploïdes) ni la réponse immunitaire ou la modification du ratio entre lipides de réserve et lipides de structure.

2.2.7 Discussion et conclusions

Malgré une importante littérature concernant les interactions entre phycotoxines et mollusques bivalves, en particulier en ce qui concerne les toxines DSP et PSP, quelques points cruciaux, parmi d'autres, restent à éclaircir :

- La relation existant entre les métabolites de l'acide okadaïque (DTX3) et le métabolisme des lipides dans les mollusques bivalves et plus particulièrement le rôle de cette relation – si elle existe – sur les cinétiques de contamination.
- Les raisons pour lesquelles les taux d'acylation des DSP sont plus faibles chez les moules que chez d'autres bivalves

- Le procédé par lequel les micro-algues toxiques peuvent modifier l'activité valvaire et plus généralement les facteurs qui modulent les capacités d'adaptation des bivalves à la nutrition sur des micro-algues toxiques
- La réponse du système immunitaire des bivalves à la consommation de micro-algues toxiques : la réponse inflammatoire est-elle identique, quelles que soient les espèces et les toxines ?
- En terme de localisation des toxines, y-a-t-il une correspondance anatomique aux 'compartiments' utilisés dans les modèles de contamination / décontamination
- La validation des coefficients utilisés en contamination et décontamination
- Le poids des différentes variables environnementales dans les cinétiques de contamination / décontamination

Les objectifs initiaux du projet MODECOPHY étaient ambitieux puisqu'ils prévoyaient une approche expérimentale et in situ pour chacune des deux familles de toxines étudiées (DSP et PSP). Du fait des allocations budgétaires disponibles l'étude a été restreinte à deux types d'approche : des mesures in situ pour les DSP et de l'expérimental pour les PSP. Afin de contre-balancer cette contrainte les données d'autres études ont été mises à contribution. Cela a été en particulier le cas des données de détoxication expérimentales DSP (programme européen BIOTOX) et des jeux de données de surveillance sur le long terme obtenues par les équipes norvégiennes (programme de coopération AURORA).

En ce qui concerne la problématique de contamination DSP des moules l'épisode de toxicité des moules de Baie de Vilaine (Bretagne Sud) de Juin 2007 a été exploité au mieux. Les résultats montrent que le maximum de densité cellulaire des *Dinophysis* ne coïncide pas avec la toxicité maximale enregistrée chez les moules. Il est intéressant de noter que les données norvégiennes, sur des échelles de temps plus longues, montrent le même type de résultat. Il y a bien eu formation d'acyl-esters de l'AO dans les moules sud-bretonnes mais avec des évolutions différentes selon les sites. Ces différences sont attribuées à des stades de maturation différents des mollusques. Cependant, les données in situ et expérimentales montrent que **l'élimination des acyl-esters et de l'AO n'est pas dépendante du métabolisme lipidique, que ce soit au niveau des lipides de réserve ou de structure**. Il en résulterait que l'hypothèse d'une modulation de la contamination / décontamination DSP par le métabolisme lipidique serait à rejeter. Pour ce qui est de l'impact des toxines DSP sur les bivalves eux-mêmes on ne constate pas d'effet sur les lipides, comme évoqué précédemment, ni sur les paramètres hématocytaires tels que production de granulocytes et de ROS. Par ailleurs, l'analyse des données norvégiennes montre que plusieurs paramètres environnementaux ne semblent pas avoir d'effet sur les cinétiques de contamination DSP. Il s'agit en particulier de

l'oxygène dissous, des phosphates, des nitrates et de la salinité. En revanche, **la température et la concentration en chlorophylle a paraissent avoir un effet sur les variations de contenu toxinique**. Malheureusement les jeux de données disponibles ne permettent pas de quantifier ces relations de façon suffisante pour construire un modèle de contamination.

L'exposition expérimentale de *C. gigas* à *A. minutum* provoque aussi bien des réponses externes (comportement) que des réponses internes (tissulaires, cellulaires ou métaboliques). L'**activité valvaire** d'huîtres exposées à *Alexandrium* a été mesuré en continu par une technique originale développée par l'UMR 5805 EPOC. Les résultats montrent une augmentation significative des micro-fermetures de façon dépendante de la dose d'*A. minutum* dans un régime alimentaire mixte. Cette réponse pourrait être interprétée comme une réaction favorisant l'expulsion des cellules toxiques hors de la cavité palléale.

Des **altérations des fibres musculaires** (atrophie, dégénérescence en forme de vagues, dégénérescence hyaline) ont également été observées au niveau du muscle adducteur des huîtres exposées à *A. minutum*. Elles pourraient aussi expliquer la modification de l'activité valvaire des huîtres mais cela reste à établir.

Les cellules d'*A. minutum* ingérées par *C. gigas* provoquent, chez certains individus, une forte **réaction inflammatoire** dans la glande digestive. Cette réaction se caractérise par une agglutination massive d'hémocytes autour de l'estomac, de l'intestin ainsi que des conduits et tubules digestifs. **Des hémocytes en diapédèse** au niveau des épithéliums de ces mêmes organes ont également été observés. La présence de débris cellulaires et de kystes temporaires d'*A. minutum* dans la glande digestive peut en partie expliquer cette réaction inflammatoire. En effet, les hémocytes sont impliqués dans la réponse immunitaire des bivalves face aux pathogènes et aux polluants. La réaction inflammatoire observée ici irait donc plutôt dans le sens d'une **activation du système immunitaire** des huîtres creuses, *C. gigas*, lorsque celles-ci sont exposées à *A. minutum*. En parallèle, la concentration totale en hémocytes, l'activité de la **phénoloxydase** des hémocytes et la production **d'espèces réactives de l'oxygène** par les granulocytes et les hyalinocytes augmentent avec la quantité de PSP accumulée par *C. gigas*. Cette observation va dans le sens de l'existence d'un stress oxydatif consécutif à l'exposition à *A. minutum*

Les **lipides structuraux** et les **lipides de réserves** sont aussi modifiés dans les glandes digestives des huîtres exposées à *A. minutum*. La variation la plus importante est la diminution de la quantité de lipides structuraux (phospholipides), essentiellement liée à la diminution de la quantité de phosphatidylcholine. Ces variations pourraient être liées, soit à une **perturbation de la synthèse** même des phospholipides, soit à une modification des compositions cellulaires et sub-cellulaires de cet organe. L'impact des micro-algues toxiques sur le métabolisme et/ou la composition lipidique des huîtres mérite d'être

confirmé et approfondi, du fait de leur rôle clef dans le développement et la reproduction des bivalves. La peroxydation des lipides, associée à la réaction inflammatoire pourrait constituer une autre hypothèse expliquant la disparition des phospholipides.

Enfin, **l'activité spécifique de l'amylase** dans la glande digestive est également augmentée après exposition à *A. minutum* mais l'amplitude de la réponse est modulée par la ploïdie et l'état de maturité des huîtres.

Malgré le petit nombre de paramètres intégrables dans une cinétique de contamination un modèle a été élaboré pour les toxines PSP pouvant être accumulées dans les huîtres. Il s'appuie principalement sur les biovolumes totaux d'algues toxiques et non toxiques ainsi que sur les quantités de toxines dans les algues et dans le milieu. **La meilleure simulation obtenue sur la base de ces facteurs correspond à un modèle avec effet multiplicatif pour décrire les interactions entre variables.**

Concernant la question particulière de la bioaccumulation de phycotoxines du type PSP chez les triploïdes et chez les diploïdes, aucune étude comparative n'avait été tentée jusqu'ici. C'est donc dans le cadre du projet MODECOPHY, et avec le soutien complémentaire d'une étude régionale financée par le SMIDAP (convention 08/5 210 074/F) qu'un ensemble de résultats ont été obtenus.

Ainsi, l'étude a montré qu'en période de reproduction (d'Avril à Juin), **les huîtres triploïdes accumulent deux à trois fois plus de PSP dans leur glande digestive que les huîtres diploïdes lorsqu'elles sont exposées à *Alexandrium minutum* dans des conditions identiques.** Deux hypothèses non exclusives ont été proposées : i) les huîtres triploïdes seraient moins « incommodées » par la présence d'*A. minutum*, ingéreraient plus de cellules toxiques et donc accumuleraient plus de toxines ou bien ii) des différences d'activités physiologiques (alimentation, métabolisme) entre triploïdes et diploïdes en période de reproduction active expliqueraient un rendement d'accumulation plus faible chez les diploïdes.

Ces résultats originaux ont été présentés en mai 2009 devant le bureau de l'ANR CES. Les équipes participant à MODECOPHY ayant été encouragées à poursuivre dans cette voie un projet a été soumis sur le site de l'ANR dans le cadre de l'appel à projets de l'ANR CES de février 2010. Ce projet (STAMINAL) entièrement concentré sur la question de savoir si le blocage de la maturation chez les triploïdes, pouvait expliquer ou non les différences de performance de bioaccumulation en période de reproduction, était porté par le même coordonnateur (IFREMER) que le projet MODECOPHY et avec les mêmes équipes mais avec d'autres laboratoires impliqués. Malheureusement la direction d'IFREMER a demandé à ce que ce projet soit retiré. Il n'y a donc pas eu de candidature sur ce thème particulièrement sensible dans le contexte environnemental et socio-économique que l'on connaît. Les partenaires de MODECOPHY ne peuvent que regretter cette censure interne d'un des organismes partenaire.

2.3 Avancées permises par une collaboration nationale externe

L'UMR 5805 EPOC a redéveloppé depuis 1997 les techniques de mesure du mouvement des valves chez les mollusques en développant la valvométrie HFNI². L'idée est que l'analyse du comportement animal est une des nouvelles portes d'accès à l'étude de l'impact des contaminants à des doses infra-létales. La technique a été appliquée avec succès chez le mollusque, *Corbicula fluminea* à la mise en évidence des concentrations minimums de métaux traces détectables (Tran et al. 2003 ; 2004 ; 2007 ; Fournier, 2004), au changement de comportement valvaire à différents niveaux d'oxygénation de l'eau (Tran et al, 2005, 2008) et de CO₂ (Tran et al., 2003). Chez *Crassostrea gigas* on a aussi décrit au laboratoire des changements comportementaux en présence d'algues toxiques du type *Alexandrium minutum* à des concentrations écologiquement réalistes (Tran et al., 2010). Il a pu être mis en évidence que les huîtres exposées à *A. minutum* révèlent un comportement atypique, comparées à des huîtres nourries avec des algues non toxiques (*T-iso*, *Heterocapsa triquetra*), caractérisé par une réduction de l'amplitude d'ouverture valvaire, une augmentation des microfermetures valvaires et contrairement à ce que l'on pouvait anticiper, à une augmentation de la durée d'ouverture. De plus ces phénomènes sont dose-dépendants.

2.4 Collaborations internationales

Projet AURORA : collaboration entre l'IFREMER et le NIFES en ce qui concerne le suivi à long terme de la contamination DSP des moules, la survie intra intestinale des *Dinophysis* et la localisation sub cellulaire des toxines DSP dans la glande digestive des moules. Séjour de trois mois de M.Guéguen à Bergen dans le cadre de sa thèse.

Les travaux d'histologie ont été réalisés en collaboration avec Inke Sunila (State of Connecticut, Bureau of Aquaculture, Milford, Connecticut, USA) spécialiste en histopathologie des mollusques.

Des échanges de chercheurs et d'étudiants ont également pris place dans le cadre de l'ANR MODECOPHY entre l'équipe de Gary Wikfors (NOAA, Milford, USA) et l'équipe de P. Soudant (LEMAR, IUEM).

² Haute Fréquence, Non Invasive, voir http://www.domino.u-bordeaux.fr/molluscan_eye pour une description de notre technologie

2.5 Publications par les chercheurs impliqués dans le programme (avec résumés des communications)

Guéguen M, Lassus P, Laabir M, Bardouil M, Baron R, Séchet V, Truquet P, Amzil Z, 2008, Gut passage times in two bivalve molluscs fed toxic microalgae (*Alexandrium spp.* and *Pseudo-nitzschia calliantha*) *Aquatic Living Resources* 21, 21-29

Résumé : 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.

Guéguen M, Duinker A, Marcaillou C, Aasen J A B, Barillé L, 2010. First approach to localize lipophilic biotoxins in mussel digestive glands, *Accepté dans : Proceedings of the 7th International Conference on Molluscan Shellfish safety.*

Résumé : 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.

Guéguen M, Bardouil M, Baron R, Lassus P, Truquet P, Massardier J, Amzil Z, 2008. 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.

Résumé : 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⁻¹. 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⁻¹ 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⁻¹. The *Skeletonema costatum* diet significantly reduced the time needed for oysters to reach the regulatory threshold (80µg STX eq. 100g⁻¹ 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 decarbamylation of gonyautoxins 2 and 3.

Haberkorn H, Lambert C, Le Goïc N, Moal J, Suquet M, Gueguen M, Sunila I, Soudant P, 2010, Effects of *Alexandrium minutum* exposure on nutrition-related processes and reproductive output in oysters *Crassostrea gigas*, Harmful Algae, 9, 427–439.

Résumé : This study assessed the effects of an artificial bloom of the toxin-producing dinoflagellate, *Alexandrium minutum*, upon nutrition related processes and reproductive output of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Oysters were exposed to *A. minutum*, Paralytic Shellfish Toxins (PST) producer and compared to a control batch of oysters fed *Isochrysis galbana* clone Tahitian (T.Iso). The experiment was performed in June 2008, when oysters were found ripe. Several physiological variables of oysters, such as PSTs accumulation, digestive gland and hematological variables, histological observations as well as spermatozoa quality, were measured at the end of the exposure. Results indicate that the digestive gland was greatly impacted upon *A. minutum* exposure. Monoacylglycerol and diacylglycerol contents as well as phospholipids (mainly phosphatidylcholine) drastically decreased in the digestive gland of oysters exposed to *A. minutum* compared to control oysters. At the same time, many oysters exposed to the harmful microalgae presented a strong inflammatory response in different tissues of the digestive gland: in intestine as well as in digestive ducts and tubules. Spermatozoa in oysters exposed to *A. minutum* were morphologically and functionally modified compared to spermatozoa of control oysters. Indeed, spermatozoa were less motile and had lower ATP content in oysters exposed to *A. minutum*. Meanwhile, spermatozoa produced by control oysters showed a higher percentage of mortality but a lower relative DNA content than those produced by *A. minutum* exposed oysters. Finally, the characteristics of the mitochondria of spermatozoa also appeared to be modified upon *A. minutum* exposure. The results of this study suggests that an exposure of oysters to *A. minutum*, reducing energy status and motility of spermatozoa associated to morphological changes at the cellular and sub-cellular levels, can have consequences on spermatozoa fertility and reproduction success.

Haberhorn H, Lambert C, Le Goïc N, Guéguen M, Moal J, Palacios E, Lassus P, Soudant P, 2010. Effects of *Alexandrium minutum* exposure upon physiological and hematological variables of diploid and triploid oysters, *Crassostrea gigas*, *Aquatic Toxicology*, 97, 96-108.

Résumé : The effects of an artificial bloom of the toxin-producing dinoflagellate, *Alexandrium minutum*, upon physiological parameters of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, were assessed. Diploid and triploid oysters were exposed to cultured *A. minutum* and compared to control diploid and triploid oysters fed *T. Isochrysis*. Experiments were repeated twice, in April and mid-May 2007, to investigate effects of maturation stage on oyster responses to *A. minutum* exposure. Oyster maturation stage, Paralytic Shellfish Toxin (PST) accumulation, as well as several digestive gland and hematological variables, were assessed at the ends of the exposures. In both experiments, triploid oysters accumulated more PSTs (approximately twice) than diploid oysters. Significant differences, in terms of phenoloxidase activity (PO) and reactive oxygen species (ROS) production of hemocytes, were observed between *A. minutum*-exposed and non-exposed oysters. PO in hemocytes was lower in oysters exposed to *A. minutum* than in control oysters in an early maturation stage (diploids and triploids in April experiment and triploids in May experiment), but this contrast was reversed in ripe oysters (diploids in May experiment). In the April experiment, granulocytes of oysters exposed to *A. minutum* produced more ROS than those of control oysters; however, in the May experiment, ROS production of granulocytes was lower in *A. minutum*-exposed oysters. Moreover, significant decreases in free fatty acid, monoacylglycerol, and diacylglycerol contents in digestive glands of oysters exposed to *A. minutum* were observed. Concurrently, the ratio of reserve lipids (triacylglycerol, ether glycerides and sterol esters) to structural lipids (sterols) decreased upon *A. minutum* exposure in both experiments. Also, several physiological responses to *A. minutum* exposure appeared to be modulated by maturation stage as well as ploidy of the oysters.

Tran D, Haberhorn H, Soudant P, Ciret P, Massabuau JC, 2010. Behavioral responses of *Crassostrea gigas* exposed to the harmful algae *Alexandrium minutum*. *Aquaculture*, 298: 338-345

Résumé : we describe the valve-activity behavior of oysters, *Crassostrea gigas*, exposed experimentally to the harmful alga *Alexandrium minutum* ($\approx 3500 \text{ cell.ml}^{-1}$) for 7-day periods under laboratory conditions. Our aim was to assess behavioral responses of oyster species during a mimicked bloom exposure. We determined different characteristic parameters of valve activity, such as daily valve opening duration, daily number of micro-closures, and valve-opening amplitude using a High Frequency – Non Invasive valvometer. In comparison with oysters exposed to non-toxic algae, *T-Isochrysis* or *Heterocapsa triquetra*, the valve activity of *C. gigas* is measurably different when exposed to toxic algae *A. minutum*. Surprisingly, daily valve-opening duration increased, as well as micro-closure activity, while valve-opening amplitude decreased. The response to *A. minutum* is fast, within 1h after algae exposure. Following *A. minutum* exposure, recovery to control patterns was observed within 4-5 days. We suggest that the behavioral alterations upon exposure to *A. minutum* can be used as a complementary physiological variable to other well-established physiological and biochemical measurements.

Haberhorn H, Marie D, Lambert C, Soudant P, 2010. Flow cytometric measurements of *Alexandrium minutum* cellular characteristics upon exposure to thermal, chemical and mechanical stresses, *in prep*

Résumé : the purpose of the present study was to provide a flow cytometry approach to evaluate *A. minutum* cellular responses upon mechanical, thermal, chemical and hydrodynamic stresses. Coupling SYBR-Green I and SYTOX-Green staining, FCM analysis - sorting, and microscopic observations

permitted identification and characterization of five cellular states/forms of *A. minutum*; 1) vegetative cells, 2) pellicle cysts, 3) degraded cells, 4) empty theca and 5) dead cells.

Storage on ice resulted in the transformation of a part of the vegetative cells in dead cells, pellicle cysts and “degraded” cells while centrifugation resulted mostly in pellicle cysts and few degraded cells. After these thermal and mechanical stresses, control and stressed cultures were monitored for 14 days after. Stressed *A. minutum* culture appeared to grow at the same rate than control culture during the first seven days. However, during the last week of monitoring, cell concentrations of stressed cultures reached their plateau earlier compared to control culture suggesting recovery from stress was not total. Upon 30 min of exposure to chemical stressors (saponine and H₂O₂), only vegetative cells, pellicle cysts and dead cells were detected. For both chemicals, encystment was dose-dependent. Concentrations of pellicle cysts increased concomitantly with increasing saponine or H₂O₂ concentration. Pellicle cysts were the predominant cell type above 0.05 g.L⁻¹ saponine and above 0.015% H₂O₂. Occurrence of dead cells appeared to follow an all-or-none law as dead cell percentage increased from 3% at 0.015% H₂O₂ to 81% at 0.03% H₂O₂ without pellicle cyst formation.

Present study also demonstrated that use of water pump (formerly designed for commercial small aquariums) was a more stressful condition in comparison to air-flow. Overall, both percentages of dead cells and pellicle cysts were about twice as much in “pump” tanks than “air flow” tanks for the whole duration of the exposure to hydrodynamic stresses.

In the present study, we demonstrated that culture handling or experimental systems used in bivalves – Harmful algae interaction studies are susceptible to affect physiology of *A. minutum* cells which could potentially influence experimental results and conclusions. More attention should be drawn on formation of pellicle cysts and its implication on toxin accumulation of exposed bivalves.

Haberkorn H, Tran D, Massabuau JC, Cyret P, Soudant P, 2010. Relationship between valve activity and toxin accumulation in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, exposed to *Alexandrium minutum*, *in prep*

Résumé : the present study aimed to observe modifications of oyster behavior upon exposure to *Alexandrium minutum*, a dinoflagellate producing Paralytic Shellfish Toxins (PSTs), and to explore relationship between toxin content and oyster behavior at the individual level.

Oysters were acclimated for ten days with a continuous flow of 12.5 L.day⁻¹ (8.7 mL.min⁻¹) of seawater (filtered to 0.5 µm) with *H. triquetra* at 5.10³ cells.ml⁻¹. After acclimation, oysters were exposed to four food mixtures: i) 100% *A. minutum* (5.10³ cells.ml⁻¹), ii) 50% *A. minutum*- 50% *H. triquetra* (2.5 10³ cells.ml⁻¹ of *A. minutum* and 2.5 10³ cells.ml⁻¹ of *H. triquetra*), iii) 25% *A. minutum*- 75% *H. triquetra* (1.25 10³ cells.ml⁻¹ of *A. minutum* and 3.75 10³ cells.ml⁻¹ of *H. triquetra*) and iv) 100% *H. triquetra* (5 10³ cells.ml⁻¹ of *H. triquetra*).

Different characteristic parameters of valve activity, such as daily valve opening duration, valve-opening amplitude, and daily number of micro-closures were measured using a High Frequency – Non Invasive valvometer during the five last days of acclimation and for five days during exposure to the four food mixtures.

Oysters fed 100 % *A. minutum* showed a significantly higher valve-opening duration and opening amplitude index during exposure than before. Moreover, valve-opening duration and opening amplitude index increased with increasing proportion of *A. minutum* in the food, although there were no significant differences between conditions. Average behavior of each individual oyster (within the same tank) exposed to some concentration of *A. minutum* was more clearly modified between before and during exposure to *A. minutum*. However, measured behavior parameters were highly variable according to individuals.

The average accumulated toxins in digestive glands per treatment was proportional to the concentration of *A. minutum* cells supplied into the tanks. Toxin accumulation was also highly variable according to oyster individuals. Such individual variability of toxin content and changes in behavior

upon exposure to *A. minutum* may indeed reflect differences of toxin sensitivity. Less sensitive oysters seemed to open longer and wider their valves and consume more toxic dinoflagellates.

2.5 Autres résultats

- Haberkorn H, 2009 : Impact du dinoflagellé toxique *Alexandrium minutum* sur l'huître creuse, *Crassostrea gigas* : approche intégrative, thèse soutenue le 15 décembre 2009 en Océanologie biologique à Brest, Université de Bretagne Occidentale

Résumé : Les effets de la micro-algue toxique, *Alexandrium minutum*, sur l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, ont été analysés par une approche intégrative. Cette démarche a conduit à s'intéresser à différents aspects de la physiologie de l'huître, tels que le comportement, l'activité digestive, des activités cellulaires et la reproduction.

Dans un premier temps, le statut physiologique de *A. minutum* a été abordé en utilisant la cytométrie en flux, la microscopie ainsi que des marqueurs fluorescents. Cela nous a permis de démontrer que certaines conditions expérimentales étaient susceptibles de perturber la physiologie de ce dinoflagellé. Les systèmes expérimentaux permettant d'exposer les huîtres ont donc été conçus afin de limiter les conditions stressantes pour la micro-algue toxique. Dans un second temps, les huîtres ont été exposées à *A. minutum*, en milieu contrôlé, au cours de plusieurs expérimentations, et comparées à des huîtres témoins nourries avec *Isochrysis galbana* ou *Heterocapsa triquetra*.

L'exposition de *C. gigas* à *A. minutum* provoque chez les huîtres une réponse comportementale, se traduisant notamment par une augmentation du temps d'ouverture et de la fréquence des micro-fermetures des valves. Une corrélation positive entre le temps et l'amplitude d'ouverture des valves et la quantité de toxines accumulées par les huîtres a été observée. De même, des pathologies du muscle adducteur des huîtres ont été constatées, ce qui pourrait expliquer les changements de comportement des huîtres.

Le dinoflagellé toxique induit une activation des mécanismes de défense des huîtres. Ainsi, une augmentation de la production de mucus a été observée au niveau des branchies, de même qu'une importante réaction inflammatoire dans la glande digestive. Les paramètres hématologiques ont également présenté des variations. Des différences, en terme d'activité de la phenoloxydase et de la production d'espèces réactives de l'oxygène dans les hémocytes, ont été observées entre les huîtres exposées à *A. minutum* et les témoins. Les variations des paramètres hématologiques semblent liées au stade de maturité des huîtres et à la quantité de toxines accumulées, mais aussi à leur statut métabolique lors de l'exposition.

Les contenus de la glande digestive en lipides sont également modifiés suite à l'exposition à *A. minutum*. Une réduction significative des contenus en monoglycérides (MG) et diglycérides (DG) ainsi qu'une importante diminution du contenu en phosphatidylcholine (PC) ont été observés. La diminution de la PC étant parallèle à celle des MG et DG, cela suggère une diminution de la synthèse des lipides liée à une altération des tissus de la glande digestive. Finalement, les spermatozoïdes produits par les huîtres exposées à *A. minutum* présentaient une réduction de leur activité (diminution de la mobilité et du contenu en ATP) en comparaison aux huîtres témoins. Cette altération de la physiologie des gamètes pourrait avoir des répercussions sur la reproduction des huîtres.

Etant donné la subtilité de certains changements et l'interconnexion des paramètres mesurés, la mise en place d'une approche intégrative nous a permis d'obtenir une vision holistique de l'interaction *A. minutum* / *C. gigas*. La présente étude a mis en évidence des interactions peu ou mal connues entre des caractères comportementaux, morphologiques et physiologiques des huîtres. Cela nous a conduit de

mieux comprendre les interactions entre les micro-algues toxiques et les bivalves, ainsi que les impacts écologiques potentiels.

- Guéguen M, 2009. Detoxification modelling of bivalves containing paralytic and diarrhoeic phycotoxins, thèse avec label européen soutenue le 26 octobre 2009 en Océanologie biologique, à Nantes, Université de Nantes.

Résumé : 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 et extrinsèques 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.

2.6 Valorisation

Les travaux réalisés sur la comparaison de la bioaccumulation PSP entre diploïdes et triploïdes ont fait l'objet, pour la partie traitée par Ifremer, d'une restitution devant les producteurs lors des journées du SMIDAP, en février 2009. Par ailleurs, plusieurs présentations, écrites et orales, ont pu être réalisées à partir des acquis de l'étude, dans des conférences nationales et internationales :

- Benthic Ecology Meeting, avril 2008, Providence, USA
- National Shellfisheries Association meeting, avril 2008, Providence, USA.
- Physiomar, septembre 2008, Brest, France
- 7th International Conference on Molluscan Shellfish Safety, june 2009, Nantes, France

Annexe

Littérature citée

- 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* Thuenberg. *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 multiseries* and *P-pseudodelicatissima*. *Toxicon* 39:1245-1251
- Backer, L., Fleming, L.E., Rowan, A., et al., 2003. Epidemiology and public health of human illnesses associated with harmful marine phytoplankton. In: Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., Cembella, A.D. (Eds.), *Manual on Harmful Marine Algae*. UNESCO/WHO, Geneva, Switzerland, pp. 725–750.
- Backer, L.C., Schurz Rogers, H., Fleming, L.E., et al., 2005. Phycotoxins in marine seafood. In: Dabrowski, W. (Ed.), *Chemical and Functional Properties of Food Components: Toxins in Food*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 155–190.
- Bardouil, M., Bohec, M., Cormerais, M., Bougrier, S., Lassus, P., 1993. Experimental study of the effects of a toxic microalgal diet on feeding of the oyster *Crassostrea gigas* Thunberg. *J. Shellfish Res.* 12, 417–422.
- 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
- Basti, L., Nagai, K., Shimasaki, Y., Oshima, Y., Honjo, T., Segawa, S., 2009. Effects of the toxic dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* on the valve movement behaviour of the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Aquaculture* 291, 41–47.
- 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
- Blanco J (2004) Modelling phycotoxins accumulation in bivalves: a review 5th International Conference on Molluscan Shellfish Safety, Galway
- 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, 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
- Bougrier, S., Lassus, P., Bardouil, M., Masselin, P., Truquet, P., 2003. Paralytic shellfish poison accumulation yields and feeding timeactivity in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and king scallop (*Pecten maximus*). *Aquat. Living Resour.* 16, 347–352

- 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, transfer kinetics and biotransformation. *Fisheries Science* 6:315-383
- 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
- Chu, F.L.E., La Peyre, J.F., 1993. *Perkinsus marinus* susceptibility and defense-related activities in eastern oysters *Crassostrea virginica*: temperature effects. *Dis. Aquat. Org.* 16, 223–234.
- 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
- 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
- Delaporte, M., Soudant, P., Lambert, C., Moal, J., Pouvreau, S., Samain, J.F., 2006. Impact of food availability on energy storage and defense related hemocyte parameters of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* during an experimental reproductive cycle. *Aquaculture* 254, 571–582.
- 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
- 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, Míguez 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
- Fernández-Reiriz, M.J., Navarro, J.M., Contreras, A.M., Labarta, U., 2008. Trophic interactions between the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* and *Mytilus chilensis*: Feeding and digestive behaviour to long-term exposure. *Aquat. Toxicol.* 87, 245–251.
- 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
- Fisher, W.S., Oliver, L.M., Winstead, J.T., Long, E.R., 2000. A survey of oysters *Crassostrea virginica* from Tampa Bay, Florida: associations of internal defense measurements with contaminant burdens. *Aquat. Toxicol.* 51, 115–138.
- Ford, S.E., Kanaley, S.A., Littlewood, D.T.J., 1993. Cellular Responses of Oysters Infected with *Haplosporidium nelsoni*: Changes in Circulating and Tissue-Infiltrating Hemocytes. *J. Invertebr. Pathol.* 61, 49–57.
- Frangópulos, M., Guisande, C., Maneiro, I., Riveiro, I., Franco, J., 2000. Short-term and long-term effects of the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* on the copepod *Acartia clausi*. *Marine Ecology Progress Series.* 203, 161–169.
- 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
- Galimany, E., Place, A.R., Ramon, M., Jutson, M., Pipe, R.K., 2008c. The effects of feeding *Karlodinium veneficum* (PLY # 103; *Gymnodinium veneficum* Ballantine) to the blue mussel *Mytilus edulis*. *Harmful Algae* 7, 91–98.
- 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
- 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
- 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
- Hégaret, H., 2007. Impacts of Harmful Algal Blooms on Physiological and Cellular Processes of Bivalve Molluscs. Thesis. Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Rennes.
- Hégaret, H., Wikfors, G., Soudant, P., Lambert, C., Shumway, S., Bérard, J., Lassus, P., 2007a. Toxic dinoflagellates (*Alexandrium fundyense* and *A. catenella*) have minimal apparent effects on oyster hemocytes. *Mar. Biol.* 152, 441–447.
- Hégaret, H., da Silva, P.M., Wikfors, G.H., Lambert, C., De Bettignies, T., Shumway, S.E., Soudant, P., 2007b. Hemocyte responses of Manila clams, *Ruditapes philippinarum*, with varying parasite, *Perkinsus olseni*, severity to toxic-algal exposures. *Aquat. Toxicol.* 84, 469–479.
- Hégaret, H., Wikfors, G.H., Shumway, S.E., 2007c. Diverse feeding responses of five species of bivalve mollusc when exposed to three species of harmful algae. *J. Shellfish Res.* 26, 549–559.
- Hégaret, H., da Silva, P., Sunila, I., Dixon, M.S., Alix, J., Shumway, S.E., Wikfors, G.H., Soudant, P., 2009a. Perkinsosis in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* affects responses to the harmful-alga, *Prorocentrum minimum*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 371, 112–120.
- Hess P, McMahan T, Slatery D, Swords D, Dowling G, McCarron M (2003) Use of LC-MS testing to identify lipophilic toxins, to establish local trends and intespecies 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
- Jaime E, Gerdtz G, Luckas B (2007) In vitro transformation of PSP toxins by different shellfish tissues. *Harmful Algae* 6:308-316
- Johnson, R.M., Shrimpton, J.M., Cho, G.K., Heath, D.D., 2007. Dosage effects on heritability and maternal effects in diploid and triploid Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Heredity* 98, 303–310.
- 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
- 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, 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., 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*. *Aquat. Living Resour.* 17, 207–214.
- Lassus P, Marcaillou-Le Baut C (2001) Contamination, transformation et détoxification des produits marins. In: Fremy 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
- Leverone, J.R., Blake, N.J., Pierce, R.H., Shumway, S.E., 2006. Effects of the dinoflagellate *Karenia brevis* on larval development in three species of bivalve mollusc from Florida. *Toxincon* 48, 75–84.
- 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, S.C., Wang, W.X., 2001. Radiotracer studies on the feeding of two marine bivalves on the toxic and nontoxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 263, 65–75.
- Li, S.C., Wang, W.X., Hsieh, D.P.H., 2002. Effects of toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* on the energy budgets and growth of two marine bivalves. *Mar. Environ. Res.* 53, 145–160.
- Lin HP, Cho Y, Yashiro H, Yamada T, Oshima Y (2004) Purification and characterization of paralytic shellfish toxin transforming enzyme from *Macra chinensis*. *Toxincon* 44:657-668
- 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
- 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
- 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
- Nagai, K., Honjo, T., Go, J., Yamashita, H., Oh, S.J., 2006. Detecting the shellfish killer *Heterocapsa circularisquama* (Dinophyceae) by measuring bivalve valve activity with a Hall element sensor. *Aquaculture* 255, 395–401.

- Navarro, J.M., Contreras, A.M., Chaparro, O.R., 2008. Short-term feeding response of the mussel *Mytilus chilensis* exposed to diets containing the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 81, 41–49.
- Nell JA (2002) Farming triploid oysters. *Aquaculture* 210:69-88
- Padilla, D.K., Doall, M.H., Gobler, C.J., Hartson, A., O’Boyle, K., 2006. Brown tide alga, *Aureococcus anophagefferens*, can affect growth but not survivorship of *Mercenaria mercenaria* larvae. *Harmful Algae* 5, 736–748
- Pearce, I., Handlinger, J.H., Hallegraeff, G.M., 2005 Histopathology in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spat caused by the dinoflagellate *Prorocentrum rhathymum*. *Harmful Algae* 4:61-74
- 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
- Riddle, N.C., Kato, A., Birchler, J.A., 2006. Genetic variation for the response to ploidy change in *Zea mays*. *Theor. Appl. Genet.* 114, 101–111.
- Rossignoli AE, Blanco J (2008) Cellular distribution of okadaic acid in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819). *Toxicon* 52:957-959
- 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
- Sechet V, Safran P, Hovgaard P, Yasumoto T (1990) Causative species of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) in Norway. *Marine Biology* 105:269-274
- Shumway, S.E., Burkholder, J.A.M., Springer, J., 2006. Effects of the estuarine dinoflagellate *Pfiesteria shumwayae* (Dinophyceae) on survival and grazing activity of several shellfish species. *Harmful Algae* 5, 442–458.
- Silvert W, Bricelj VM, Cembella AD (1998) Dynamic modelling of PSP toxicity in the surfclam (*Spisula solidissima*): multicompartmental 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
- 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 the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*, in Marennes-Oleron Bay. *Aquatic Living Resources* 9:65-73
- Springer, J.J., Shumway, S.E., Burkholder, J.A.M., Glasgow, H.B., 2002. Interactions between the toxic estuarine dinoflagellate *Pfiesteria piscicida* and two species of bivalve mollusks. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 245, 1–10.
- Summerson, H.C., Peterson, C.H., 1990. Recruitment failure of the bay scallop, *Argopecten irradians concentricus*, during the first red tide, *Ptychodiscus brevis*, outbreak recorded in North Carolina. *Estuaries and Coasts*. 13, 322–331.
- Toyofuku, H., 2006. Joint FAO/WHO/IOC activities to provide scientific advice on marine biotoxins (research report). *Marine Poll. Bull.* 52, 1735–1745
- Twarog BM, Yamaguchi H, Hidaka T (1972) Resistance to tetrodotoxin and Saxitoxin. *Toxicon* 10:273-278
- UNESCO, 2004. Report of the Joint FAO/IOC/WHO ad hoc Expert. Consultation on Biotoxins in Bivalve Molluscs. Oslo, Norway, 26–30

- 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
- Ward, J.E., Shumway, S.E., 2004. Separating the grain from the chaff: particle selection in suspension- and deposit-feeding bivalves. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 300, 83-130.
- Wikfors, G.H., Smolowitz, R.M., 1993. Detrimental effects of a *Prorocentrum* isolate upon hard clams and bay scallops in laboratory feeding studies. In Smayda, T.J., Shimizu, Y., eds., *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea.*, pp. 447-452.
- Wikfors, G.H., Smolowitz, R.M., 1995. Experimental and histological studies of four lifehistory stages of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, exposed to a cultured strain of the dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. *Biological Bulletin* 188, 313-328.
- Wildish, D., Lassus, P., Martin, J., Saulnier, A., Bardouil, M., 1998. Effect of the PSP-causing dinoflagellate, *Alexandrium sp.*, on the initial feeding response of *Crassostrea gigas*. *Aquat. Living Resour.* 11, 35-43.
- 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
- Yan, T., Zhou, M., Fu, M., Wang, Y., Yu, R., Li, J., 2001. Inhibition of egg hatching success and larvae survival of the scallop, *Chlamys farreri*, associated with exposure to cells and cell fragments of the dinoflagellate *Alexandrium tamarense*. *Toxicon*. 39, 1239-1244.
- Yan, T., Zhou, M.J., Fu, M., Yu, R.C., Wang, Y.F., Li, J., 2003. Effects of the dinoflagellate *Alexandrium tamarense* on early development of the scallop *Argopecten irradians concentricus*. *Aquaculture*. 217, 167- 178.
- 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