

Contamination des mollusques bivalves par des phycotoxines : interactions entre niveaux de toxicité et réponses physiologiques

LASSUS Patrick(1), SOUDANT Philippe(2), MASSABUAU Jean-Charles (3), BARDOUIL Michèle(1), BARON Régis(4), GUEGUEN Marielle(1), HABERKORN Hansy(2), LAMBERT Christophe(2), LEGOIC Nelly(2), MARCAILLOU Claire(1), TRAN Damien (3), TRUQUET Philippe(1)

(1) Laboratoire Phycotoxines, IFREMER Nantes, BP21105, 44311 Nantes Cedex 3.

(2) Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR), UMR 6539, Université de Bretagne Occidentale, IUEM, Technopole Brest Iroise, Place Nicolas Copernic, 29280 Plouzané.

(3) CNRS UMR 5805 EPOC, Université de Bordeaux, Place Dr Peyneau, 33120 Arcachon.

(4) Département STBM IFREMER Nantes, BP21105, 44311 Nantes Cedex 3.

INTRODUCTION

En France trois principaux types de phycotoxines peuvent contaminer les mollusques bivalves : les toxines diarrhéiques (DSP), les toxines paralysantes (PSP) et les toxines amnésiantes (ASP). Les toxines DSP et PSP ont été retenues pour cette étude en raison d'une part, de la fréquence et de l'extension croissante des épisodes dus aux DSP et d'autre part au risque élevé présenté par les toxines PSP. 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. Une 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.

Les objectifs de cette étude étaient d'établir i) le poids des différentes variables environnementales dans les cinétiques de contamination des mollusques bivalves ii) la localisation des toxines et la correspondance anatomique aux 'compartiments' utilisés dans les modèles de contamination / décontamination iii) la capacité des micro-algues toxiques à modifier l'activité valvaire et plus généralement à moduler les capacités d'adaptation des bivalves à ce type de nourriture iv) la spécificité de la réponse inflammatoire du système immunitaire des bivalves, selon les espèces de bivalves et les toxines v) la relation entre la métabolisation des toxines DSP et le métabolisme des lipides chez les bivalves

MATERIELS ET METHODES

Des épisodes de contamination de moules par des toxines diarrhéiques ont été observés en Baie de Vilaine au cours de l'été 2007. A cette occasion, des prélèvements de mollusques ont été réalisés tous les 15 jours au cours de 9 campagnes, avec une fréquence plus importante lors des contaminations des sites 'Les Granges' et 'Maresclé'. Le contenu toxinique et la composition lipidique (réserves et lipides) ont été analysés sur les glandes digestives, respectivement par HPLC-MS-MS (Hess et al, 2003), et par HPTLC. Les paramètres hématologiques morphologiques et fonctionnels ont été mesurés sur l'hémolymphe par cytométrie en flux. La contamination de ces deux sites a été comparée à celle de 'Kervoyal', site de référence du réseau de surveillance REPHY¹ pour le DSP. L'analyse des classes de lipides de réserves et de structures a également été réalisée sur les glandes digestives de moules soumises à trois régimes nutritionnels pendant une expérience de décontamination expérimentale « à terre » réalisée dans le cadre d'un projet Européen².

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

² projet BIOTOX

Afin de tenter de modéliser la contamination des moules par les algues de la famille des *Dinophysis*, des données provenant du réseau de surveillance utilisé en Norvège ont été considérées. Ces données présentaient l'avantage de fournir un suivi hebdomadaire du niveau de contamination des moules quantifié par analyse chimique, en distinguant les acyl-esters de l'AO libre avec en parallèle un suivi des paramètres environnementaux

Les réponses physiologiques d'huîtres creuses exposées à des cultures toxiques d'*Alexandrium minutum* (PSP) ont été évaluées dans différents modules expérimentaux variant en volume et en modalités d'exposition. L'activité valvaire a été suivie lors d'expérimentations de nutrition avec des algues toxiques (*A.minutum*) et non toxiques (*S.costatum*, *Heterocapsa triquetra*, *Isochrysis galbana*) par valvométrie en continu (Tran et al, 2010) Les examens histologiques ont été complétés par des analyses des paramètres hématocytaires et de l'expression de quelques gènes impliqués dans le système anti-oxydant. 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'influence de la dynamique de contamination sur la détoxification ultérieure a fait l'objet d'une étude expérimentale sur des huîtres triploïdes. Deux concentrations cellulaires en *A.minutum*, 200 et 1000 cellules mL⁻¹ ont été utilisées pendant la phase d'accumulation puis la détoxification a été réalisée dans les deux cas avec une alimentation en continue avec la diatomée *Skeletonema costatum* à 2000 cellules mL⁻¹.

Afin d'estimer l'impact de la ploïdie des huîtres sur les performances de bioaccumulation PSP, 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.

Enfin, en ce qui concerne le développement d'un modèle intégratif décrivant les cinétiques de contamination PSP des huîtres creuses, les données utilisées sont issues de différentes expériences réalisées dans ce projet ou dans des études précédentes (Guéguen et al, 2008 ; Lassus et al, 2004, 2005, 2007). Le modèle s'appuie donc sur des données récoltées en France, sur *Crassostrea gigas* contaminée 4 à 10 jours par *Alexandrium minutum*, puis décontaminée avec des algues fourrages de type *Skeletonema costatum*, à 16°C.

Sur la base de ces résultats, il a été choisi de ne retenir que les trois facteurs suivants :

- Le biovolume total (BVT) d'algues toxiques et d'algues fourrages. Les biovolumes prennent en compte à la fois le nombre et la taille des cellules présentes dans le milieu.
- Le ratio 'R' entre biovolume d'algues toxiques et biovolume microalgal total. Ce paramètre permet de représenter l'influence de la dilution 'massique'.
- La quantité de toxines par unité de biovolume (Q), en µg eq STX/µm³ d'algues toxiques, qui prend en compte la toxicité de l'algue toxique par rapport à son volume.

Le résultat est exprimé en quantité de toxines dans le milieu (τ_{tox}) et est obtenu par le produit des trois facteurs précédents, en µg eq STX/ml.

RESULTATS

Le maximum de densité cellulaire des *Dinophysis*, espèce phytoplanctonique productrice de l'acide okadaïque et de ses dérivés, en Baie de Vilaine au cours du mois de juin 2007 ne coïncide pas avec la toxicité maximale enregistrée sur les moules (Fig. 1). En comparant les trois points, le site de Kervoyal est apparu comme le site le plus contaminé en AO total. 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 que l'évolution de ces esters ne montre pas un maximum suivi d'une diminution continue, comme c'est le cas pour l'AO 'libre'.

Du fait d'une période de seconde maturation des moules entraînant de fortes variations individuelles pendant le suivi, aucune relation claire n'a pu être mise en évidence entre l'AO total (ou ses deux formes) et les paramètres hématocytaires tels que production de granulocytes et de ROS. De même, les niveaux de lipides de réserves (triglycérides) et de lipides de structures (stérols) ne semblent pas affecter par la présence de l'AO dans les glandes digestives des moules

Au cours de la décontamination expérimentale en présence de *S. costatum*, l'impact de la nutrition 'non toxique' sur le niveau de réserves lipidiques (triglycérides) n'apparaît qu'après 15 jours d'expérimentation.

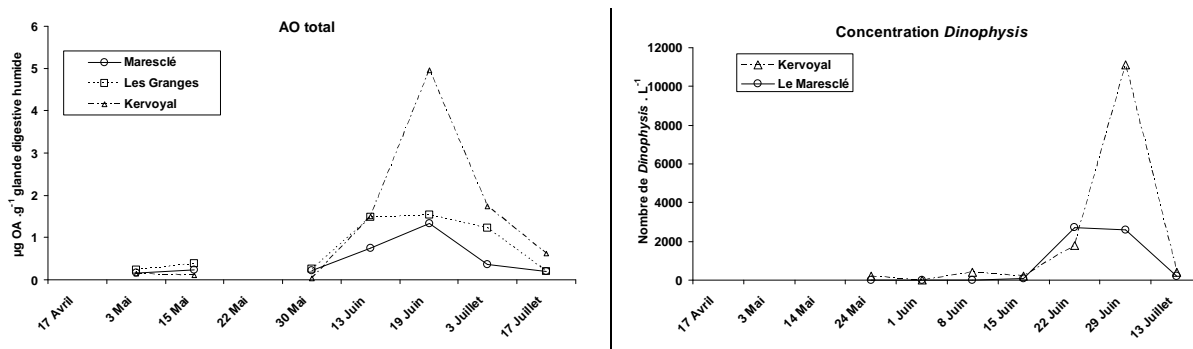


Figure 1. Evolutions comparées des concentrations en acide okadaïque total et des concentrations de *Dinophysis* en mai-juin 2007 sur la station de Kervoyal et sur les stations du Maresclé et des Granges

L'analyse des données de la surveillance des moules sur plusieurs sites norvégiens ne permet pas non plus de constater de corrélation directe entre la concentration totale en DSP dans le mollusque et la concentration pondérée en particules toxiques DSP dans le milieu. Parmi les paramètres environnementaux mesurés, seules la température de l'eau et la chlorophylle a présente dans le milieu semblent avoir une influence sur la concentration en *Dinophysis spp* et sur la bio-accumulation des toxines dans la moule.

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.

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

(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, \hat{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*).

En ce qui concerne les toxines PSP et leur impact sur les fonctions métaboliques et sur les capacités de bioaccumulation des huîtres creuses *Crassostre gigas*, l'approche a été exclusivement expérimentale. On constate d'abord (Fig. 2) un effet de l'exposition à *A. minutum* sur l'activité valvaire des huîtres qui se traduit par une augmentation de la fréquence des micro-fermetures. Une corrélation positive entre l'accumulation des PSP et l'amplitude d'ouverture des valves a également pu être démontrée.

On observe aussi une augmentation de la production de mucus par les branchies. Enfin, un accroissement significatif du taux d'ARNm a été mis en évidence au niveau des gènes codant pour les enzymes du système antioxydant notamment la glutathion reductase et la glutathion-S-transférase.

Des altérations des fibres musculaires telles qu'atrophie, dégénérescence en forme de vagues, et dégénérescence hyaline ont également été observées au niveau du muscle adducteur des huîtres exposées à *A. minutum*.

Les cellules d'*A. minutum* ingérées par *C. gigas* provoquent une forte réaction inflammatoire dans la glande digestive (Fig. 3). 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.

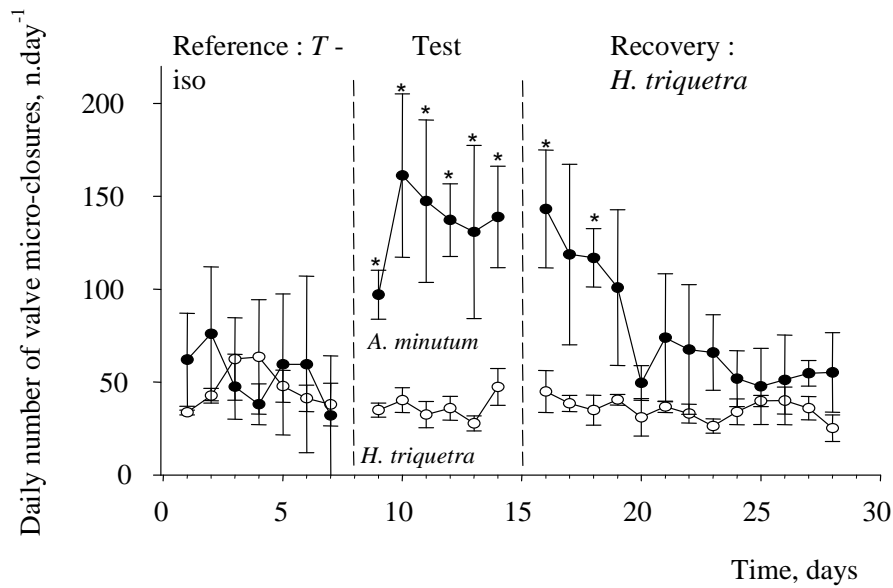


Figure 2. Nombre de micro fermetures valvaires (par jour) d'huîtres exposées à 10 mL.min⁻¹ d'une suspension d' *A. minutum* et d' *H. triquetra* (contrôle) à 5000 cellules.mL⁻¹. Pendant la période d'acclimatation (référence) les deux groupes d'huîtres étaient nourris avec T-Iso.

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 PSP accumulées par *C. gigas*.

Au-delà de la réaction inflammatoire, les lipides structuraux et les lipides de réserves de la glande digestive sont aussi modifiés. 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. 4).

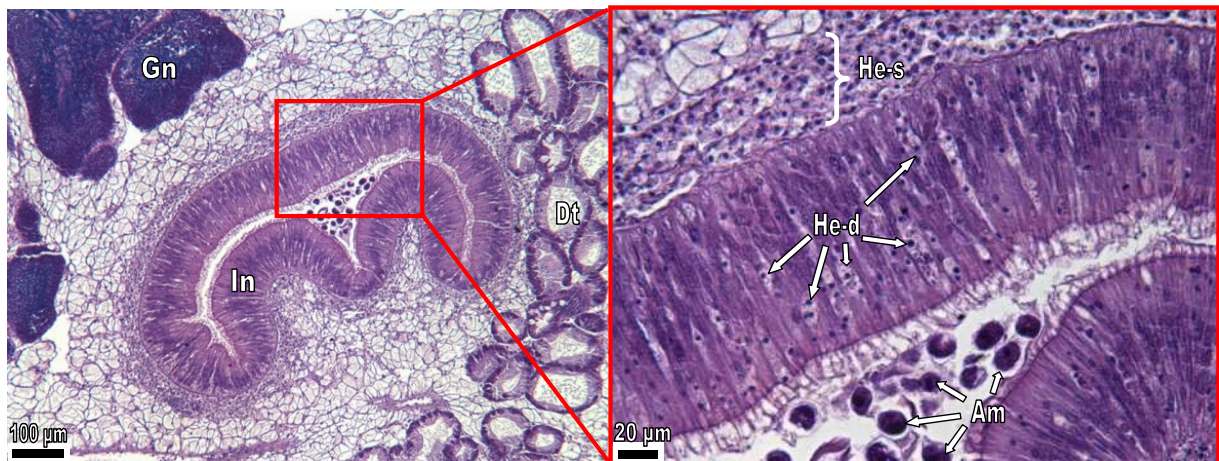


Figure 3 – Réponse inflammatoire dans l'intestin d'une huître exposée à *A. minutum*, avec agglutination massive des hémocytes dans les tissus conjonctifs entourant l'intestin et avec des hémocytes en diapédèse à travers l'épithélium intestinal. Intestin (In), gonade (Gn) et tubules digestifs (Dt) des huîtres. Cellules d'*A. minutum* (Am), hémocytes agglutinés (He-s) et hémocytes en diapédèse (He-d).

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. Les résultats obtenus indiquent également une altération de la structure du noyau ainsi qu'une modification de l'activité mitochondriale

En se positionnant en dessous des concentrations induisant un début d'inhibition de la consommation (5000 cellules ml⁻¹) on n'observe par ailleurs aucun effet d'un régime toxique constitué

d'*A.minutum* sur la pente des courbes de contamination, que ce soit pour 200 ou pour 1000 cellules/ml injectées dans le circuit expérimental. De la même façon, on n'observe pas de différence significative entre les vitesses de détoxification, quelle que soit la toxicité initiale. Enfin, on n'observe pas d'inhibition de l'activité valvaire ni de la production de biodépôts des huîtres triploïdes utilisés pendant la contamination, que ce soit pour 200 ou 1000 cellules mL⁻¹ d'*A.minutum*

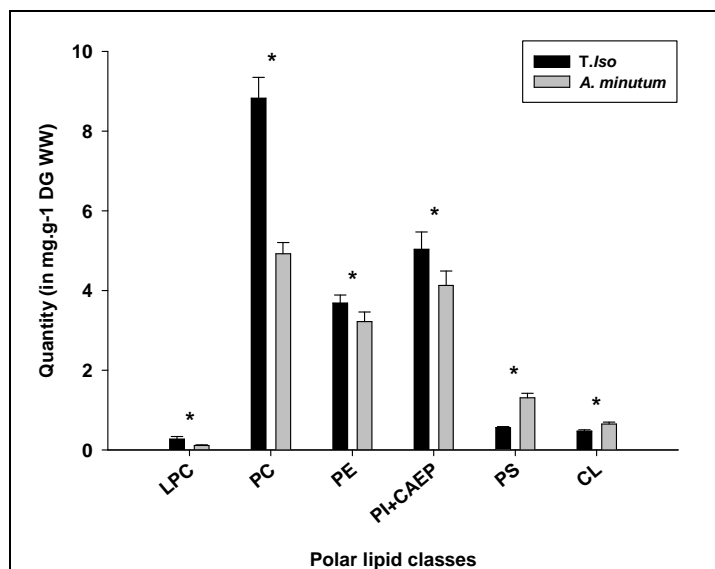


Figure 4 – Impact de l'exposition à *A. minutum* sur les contenus en phospholipides de la glande digestive des huîtres. Lysophosphatidylcholine (LPC), Phosphatidylcholine (PC), Phosphatidylethanolamine (PE), Phosphatidylinositol + ceramide aminoethylphosphate (PI+CAEP), Phosphatidylserine (PS) Cardiolipin (CL).

Lorsqu'elles sont exposées à *A. minutum* pendant la période de reproduction, les huîtres triploïdes accumulent deux à trois fois plus de PSP 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. 5).

En ce qui concerne le développement d'un modèle intégratif de la contamination PSP des huîtres, le choix a été fait de travailler sur un taux de bioaccumulation de toxines paralysantes τ_{tox} constant pour chacune de nos expérimentations conformément à un modèle tel que :

$$\tau_{tox} = \left(\beta \frac{BVT}{k_s + BVT} \right) * R * Q * \left(\frac{\arctan(k_0(k_1 - QT)) + \frac{\pi}{2}}{\arctan(k_0 k_1) + \frac{\pi}{2}} \right) * \left(\frac{v + \delta}{v + \delta + k_v} \right).$$

Le premier terme du modèle permet d'exprimer le taux de nourriture (en biovolume) consommée et assimilée. Le produit du second terme du ration R du biovolume toxique sur le biovolume total par la quantité de Toxine par unité de biovolume Q permet de tenir compte de la dilution de la toxine au sein de la nourriture consommée et assimilée.

Le terme suivant permet de prendre en compte le fait que l'huître est inhibé dans son taux d'accumulation des toxines à partir d'une certaine concentration en toxines dans le milieu QT. Le dernier terme permet de prendre en compte la vitesse v de circulation de la colonne d'eau autour des huîtres. Les coefficients obtenus à partir des données disponibles sont les suivants : $\beta = 371,4060 \cdot 10^6$ $\mu\text{g} / 100\text{g}$ de chair/jour, $k_s = 0,5740 \cdot 10^6 \mu\text{m}^3$, $k_0 = 6,9383 \text{ ml} / \mu\text{g}$ equ STX, $k_1 = 5,2298 \mu\text{g}$ equ STX/ml, $\delta = 0,34 \text{ cm/s}$ et $k_v = 0,12 \text{ cm/s}$ avec un $R^2 = 0,8$.

Les jeux de données disponibles ne permettent pas, actuellement, d'aller plus loin en terme d'ajustement. De plus, du fait de cinétiques incomplètes et du caractère réversible de certaines réponses physiologiques, 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.

DISCUSSION

En ce qui concerne la problématique de la contamination DSP des moules l'épisode de toxicité de Juin 2007 en Baie de Vilaine (Bretagne Sud) a montré que le maximum de densité cellulaire des *Dinophysis* ne coïncidait pas avec la toxicité maximale enregistrée chez les bivalves, ce qui avait déjà été montré par différents auteurs (Dahl et al, 2000 ; Marcaillou et al, 2000). Des données étrangères (Norvège), sur des échelles de temps plus longues, montrent le même type de résultat. Il y a bien eu métabolisation de l'AO dans les moules sud-bretonnes – c'est à dire formation d'acyl-esters - mais avec des évolutions différentes selon les sites. Cependant, les données *in situ* comme les données expérimentales ne suggèrent pas de relation entre l'élimination de l'AO et de ses esters et le profil lipidique ni d'effet de ces toxines sur les paramètres hématologiques. Par ailleurs, l'analyse des données norvégiennes montre que parmi les paramètres environnementaux étudiés, seules la température et la concentration en chlorophylle a paraissent avoir un effet sur les variations de contenu toxique. 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). Ainsi l'activité valvaire d'huîtres exposées à *Alexandrium* montre une augmentation significative des micro-fermetures de façon dépendante de la proportion d'*A. minutum* dans un régime alimentaire mixte. Cette réaction favoriserait l'expulsion des cellules toxiques hors de la cavité palléale. Les altérations des fibres musculaires observées au niveau du muscle adducteur des huîtres exposées à *A. minutum* 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, au niveau de la glande digestive de certains individus, une forte réaction inflammatoire caractérisée 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 qui irait plutôt dans le sens d'une activation du système immunitaire des huîtres creuses lorsque celles-ci sont exposées à *A. minutum*. Le fait que la concentration totale en hémocytes, l'activité de la phénoloxydase de ces hémocytes et la production d'espèces réactives de l'oxygène par les granulocytes et les hyalinocytes augmentent avec la quantité de PSP accumulé 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 également modifiés dans les glandes digestives des huîtres contaminées.

La variation la plus importante est la diminution de la quantité de phospholipides, en particulier la phosphatidylcholine. L'impact des micro-algues toxiques sur le métabolisme et/ou la composition lipidique des huîtres mériterait d'être confirmé et approfondi, du fait de leur rôle clef dans le développement et la reproduction des bivalves. 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.

La concentration en toxine lors de l'exposition aux algues toxiques ne modifie pas significativement les cinétiques de contamination et de décontamination.

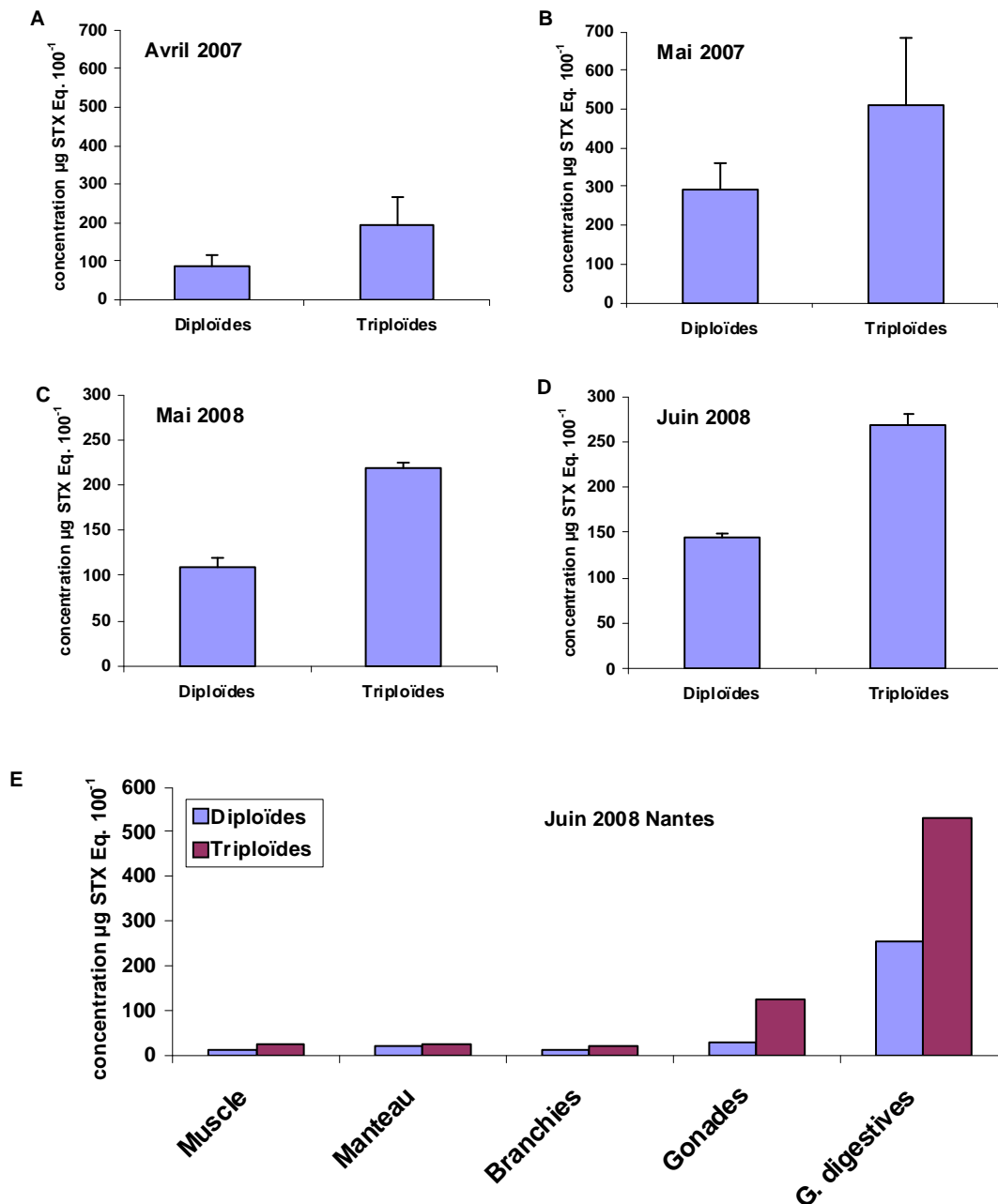


Figure 5 – Contenus en PSP (exprimé en $\mu\text{g STX eq. } 100 \text{ g}^{-1}$ de tissus en poids frais, \pm CI) dans les glandes digestives d’huîtres diploïdes et triploïdes exposées à *A. minutum* lors des expérimentations d’avril (A) et mai (B) 2007 et de mai (C) et juin (D) 2008 et dans les différents organes (E) d’huîtres diploïdes et triploïdes exposées à *A. minutum* lors d’une expérience en juin 2008.

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. La présente étude a révélé que les huîtres diploïdes en période de reproduction accumulent deux à trois fois moins de PSP dans leur glande digestive que les huîtres triploïdes 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.

REFERENCES

- 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
- Gueguen 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
- Hess P, McMahon T, Slatery D, Swords D, Dowling G, McCarron M (2003) Use of LC-MS testing to identify lipophilic toxins, to establish local trends and interspecies differences and to test the comparability of LC-MS testing with mouse bioassay: an example from the Irish biotoxin monitoring programme 2001. In: Villarba A, Reguera B, Romalde JL, Beiras R (eds) Molluscan shellfish safety. Conselleria de Pesca e Asuntos Maritimos, Xunta de Galicia and IOC of UNESCO Santiago de Compostela, p 57-66
- 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., 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.
- 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
- Tran D., H. Haberkorn, P. Soudant, P. Ciret, and J.-C. Massabuau. 2010. Behavioral responses of *Crassostrea gigas* exposed to the harmful algae *Alexandrium minutum*. *Aquaculture*, 298: 338-345.