

Les
publications
de la Direction de l'innovation
et des technologies

Compte rendu

N° 20

**Atelier de travail
« Indicateurs de stress
chez les mollusques »**

**Réjean Tremblay
Bruno Myrand
Daniel Proulx**

**Atelier de travail
« Indicateurs de stress
chez les mollusques »**

Compte rendu n° 20

Bruno Myrand
Daniel Proulx
Réjean Tremblay

Rédaction

Réjean Tremblay

Organisation de l'atelier

Bruno Myrand
Réjean Tremblay
Daniel Proulx

Commanditaires

Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation (MAPAQ)
Réseau Aquaculture Québec (RAQ)
Société de développement de l'industrie maricole du Québec (SODIM)
Canadian Centre for Fisheries Innovation (CCFI).

Réalisation

Marc Veillet, responsable du bureau d'édition
Nancy Godin, agente de secrétariat du bureau d'édition

Note

Les textes anglais et les présentations PowerPoint intégrées au présent document n'ont pas fait l'objet d'une révision linguistique.

Important note

The texts written in English and the PowerPoint presentations attached to the following document have not been subjected to a linguistic revision They are, therefore, the sole responsibility of their authors.

Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec

Bureau d'édition - DIT

96, montée de Sandy Beach, bureau 2.05

Gaspé (Québec) G4X 2V6

publications.dit@mapaq.gouv.qc.ca

Pour une version gratuite (fichier pdf) de ce document, visitez notre site Internet à l'adresse suivante : <http://www.mapaq.gouv.qc.ca/Fr/Peche/md/Publications/> ou écrire à l'adresse de courriel ci-dessus.

ISBN (version imprimée) : 978-2-550-49753-0

ISBN (version PDF) : 978-2-550-49754-7

Dépôt légal – Bibliothèque nationale du Québec, 2007

Dépôt légal – Bibliothèque nationale du Canada, 2007

Atelier de travail
« Indicateurs de stress chez les mollusques »

Bruno Myrand¹, Réjean Tremblay², Daniel Proulx³

1. MAPAQ, CeMIM, Cap-aux-Meules
2. SODIM, Gaspé (maintenant ISMER - UQAR, Rimouski)
3. RAQ, Québec

On doit citer ce document comme suit : Myrand, B., D. Proulx, R. Tremblay. 2007. Atelier de travail « Indicateurs de stress chez les mollusques ». MAPAQ-DIT, Gaspé. Compte rendu n° 20. 65 pages.

Sommaire

Un atelier de travail sur les indicateurs de stress chez les bivalves s'est tenu à Québec du 24 au 26 février 2003. Réunissant plus d'une vingtaine de participants, cet atelier était organisé sous le patronage du Réseau Aquaculture Québec (RAQ) qui considère ce thème comme prioritaire pour son intervention en mariculture. Plusieurs chercheurs du RAQ étaient d'ailleurs présents auxquels s'étaient ajoutés d'autres participants du Québec, des Maritimes, de la Colombie-Britannique et de la France. Plusieurs chercheurs du réseau d'excellence canadien AquaNet étaient également présents. Ce fut l'occasion pour chacun de prendre connaissance de la grande variété des travaux menés en rapport avec le thème de l'atelier. Plusieurs ont présenté le fruit de leurs travaux pour assurer une mise à niveau de chacun des participants. Des discussions ont suivi les différents blocs de présentations.

Les participants ont convenu qu'il n'existait pas d'indicateur « universel » pouvant être utilisé en toutes circonstances. En fait, il existe une panoplie d'indicateurs mesurés à différents niveaux d'organisation des organismes, de la cellule à l'individu. Ils n'ont donc pas la même signification. De même, divers indicateurs caractérisent le stress propre aux grandes fonctions spécifiques d'un organisme, le développement et la croissance, la reproduction, la neurologie et le comportement, par exemple. Encore là, un indicateur donné sera privilégié selon la grande fonction à examiner. Par exemple, pour quantifier le stress de jeunes semis de pétoncles à être ensemencés sur les fonds, il faut songer à utiliser des indicateurs se rapportant à la capacité des pétoncles à fuir leurs prédateurs peu de temps après leur arrivée sur le fond. L'usage spécifique d'un indicateur donné dépend donc de l'objectif visé. Les participants à l'atelier ont entrepris une démarche afin de classer les principaux indicateurs connus en fonction de différents objectifs. Une suite à cet atelier est souhaitée dans deux ou trois ans pour tracer le bilan de l'avancement des travaux.

Mots-clés

indicateur
stress
vitalité
bivalves

Key Words

indicator
stress
vitality
bivalves

Table des matières

Programme de l'atelier	v
Participants invités.....	vi
Mot de bienvenue	1
Présentations	
Vitalité, stress et risque de mortalité : comment les définir et comment les mesurer chez les mollusques bivalves?.....	2
Marqueurs biochimiques d'exposition chez la moule : intégration dans un indice de qualité des milieux côtiers	6
Utilisation de marqueurs immunologiques pour le suivi d'organismes vivants exposés à des substances toxiques	11
Evaluation of short-term transport conditions on stress response of cultivated blue mussels (<i>Mytilus</i> spp.)	14
Marqueurs biochimiques chez la moule : aperçu des méthodes développées dans le cadre du programme européen BEEP (Biological Evaluation of Environmental Pollution)	16
Development of Biochemical Indicators of Stress Response for Bivalves: Recent Studies on Heat Shock Proteins and Proteases	21
Indices de stress chez des bivalves marins. Un nouvel outil : l'indice de maturation sexuelle.....	23
Morest (étude des mortalités estivales de l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i>) : synthèse des résultats fin 2002.....	28
The relationship between glycogen, water temperature and post harvest mortality in <i>Mytilus edulis</i>	30
Suivi saisonnier d'indices physiologiques chez la moule bleue pour l'estimation de la qualité nutritionnelle du milieu de croissance	34
La dissymétrie de la coquille chez les bivalves : un outil à approfondir?.....	38
La résistance au stress peut être liée aux caractéristiques génétiques des individus en cause : l'exemple de la moule bleue	42
Les réponses de fuite comme indicateur de l'état physiologique des pétoncles : essais avec <i>Chlamys islandica</i> , <i>Euvola ziczac</i> et <i>Placopecten magellanicus</i>	44
Cultured mussel responses to waterborne starfish scents and to environmental insults	48
Quelques indices de vitalité simples appliqués à la coquille Saint-Jacques européenne, <i>Pecten maximus</i> : aptitudes au retournement et à l'enfouissement.....	53
Physiological and behavioral indicators of stress induced by PSP toxins in <i>Mya arenaria</i>	56
Quantifying stress in the scallop <i>Pecten maximus</i> in relation to aquaculture and dredging	59
Compte rendu des discussions	65

Programme de l'atelier

Lundi le 24 février

10 h à 10 h 30	Mot de bienvenue (B. Myrand)
10h30 à 11 h	Présentation du Réseau Aquaculture Québec (R. Lallier)
11 h à 11 h 30	Vitalité, stress, récupération et risque de mortalité : quelques définitions et comment les mesurer? (P.-G. Fleury)
11 h 30 à 12 h	Marqueurs biochimiques d'exposition chez la moule : intégration dans un indice de qualité des milieux côtiers (J.-F. Narbonne)
12 h à 14 h	Dîner
14 h à 14 h 30	La phagocytose par les hémocytes : indicateurs de stress toxique (M. Fournier, J. Pellerin, M. Leboeuf et P. Brousseau)
14 h 30 à 15 h	Subcellular stress indicators in cultured blue mussels in response to environmental and culture activities (C. Couturier, J. Harding <i>et al.</i>)
15 h à 15 h 30	Pause
15 h 30 à 16 h	Marqueurs biochimiques chez la moule : aperçu des méthodes développées dans le cadre du programme européen BEEP (Biological Evaluation of Environmental Pollution) (J.F. Narbonne)
16 h à 16 h 30	Development of biochemical indicators for bivalves: recent studies on heat shock proteins and proteases (N. Ross)
16 h 30 à 17 h 30	Échanges Rôle des indicateurs biochimiques Peut-on penser développer un ou des marqueurs biochimiques efficaces et simples d'utilisation pour les producteurs? Si oui, quand y arrivera-t-on? Avantages et contraintes des indicateurs biochimiques Variabilité des réponses observées, nb d'échantillons requis Certains indicateurs plus prometteurs que d'autres Connaissances manquantes et besoins de recherche

Mardi le 25 février

9 h à 9 h 30	La maturation sexuelle chez les bivalves marins : un indice de la qualité du milieu (J. Pellerin, S. Gauthier-Clerc, O. Assoi Etchian, A. Siah, M. Fournier, N. Lemaire)
9 h 30 à 10 h	Le programme MOREST sur les mortalités massives chez <i>Crassostrea gigas</i> en France (J.-F. Samain, P.-G. Fleury)
10 h à 10 h 30	Pause
10 h 30 à 11 h	The relationship between glycogen, water temperature and post harvest mortality in <i>Mytilus edulis</i> (T. Landry, J. Davidson)
11 h à 11 h 30	Suivi saisonnier d'indices physiologiques chez la moule bleue pour l'estimation de la qualité nutritionnelle du milieu de croissance (J. Pellerin, S. Cartier, M. Fournier, L. Girault, E. Tamigneaux, M.-L. Larivée)
11 h 30 à 12 h	La dissymétrie de la coquille chez les bivalves h un outil à approfondir (M. Fréchette)
12 h à 14 h	Dîner
14 h à 14 h 30	La résistance au stress peut être liée aux caractéristiques génétiques des individus en cause : l'exemple de la moule bleue (B. Myrand, R. Tremblay, J.-M. Sévigny)
14 h 30 à 15 h	Les réponses de fuite comme indicateur de l'état physiologique des pétoncles : essais avec <i>Chlamys islandica</i> , <i>Euvola ziczac</i> et <i>Placopecten magellanicus</i> (H. Guderley <i>et al.</i>)
15 h à 15 h 30	Pause
15 h 30 à 16 h 30	Échanges Indicateurs de stress utiles pour prédire les mortalités massives? Lesquels semblent les plus pertinents? Peut-on prédire longtemps d'avance les mortalités massives? Comment incorporer la variabilité génétique dans la mesure et l'interprétation des indicateurs de stress? Connaissances manquantes et besoins de recherche.

Mercredi le 26 février

9 h à 9 h 30	Cultured mussel responses to waterborne starfish scents and to environmental insults (C. Couturier <i>et al.</i>)
9 h 30 à 10 h	Quelques indices de vitalité simples appliqués à la coquille Saint-Jacques européenne, <i>Pecten maximus</i> : retourne-ment, enfouissement et force musculaire intervalvaire (P.-G. Fleury)
10 h à 10 h 30	Pause
10 h 30 à 11 h	Physiological and behavioral indicators of stress induced by PSP toxins in <i>Mya arenaria</i> (S. MacQuarrie, M. Bricelj)
11 h à 11 h 30	Quantifying stress in the scallop <i>Pecten maximus</i> in relation to aquaculture and dredging (J. Maguire)

11 h 30 à 12 h	Échanges Avantages et contraintes des indicateurs comportementaux Les indicateurs comportementaux peuvent-ils être utilisables facilement? Les indicateurs comportementaux sont-ils fiables, si oui dans quelles conditions? Comment standardiser leur mesure? Que penser des tests impliquant la survie à un stress additionnel standardisé? Certains indicateurs plus prometteurs que d'autres ? Connaissances manquantes et besoins de recherche
12 h à 14 h	Dîner
14 h à 15 h 30	Échanges généraux Comment définir la vitalité (ou le stress) chez les bivalves? Comment établir qu'un indicateur de stress est valable? Quel niveau de stress entraîne des répercussions sur la performance générale? Les indicateurs offrant le plus grand intérêt pratique? Indicateurs rapides, pratiques et fiables pour les mariculteurs Tous les indicateurs potentiels identifiés donnent-ils la même réponse? Que doit-on mesurer dans un contexte de production maricole? Utilité des indicateurs de stress Intérêt et potentiel d'une approche multidisciplinaire? Manque de connaissances et besoins de recherche Possibilités de collaboration entre les groupes et équipes
15 h 30 à 15 h 45	Mot de clôture

Participants invités

Québec

Bruno Myrand (CeMIM - DIT - MAPAQ)
bruno.myrand@mapaq.gouv.qc.ca

Réjean Tremblay (SODIM)
rejean_tremblay@uqar.qc.ca

Benoît Thomas (CAMGR - DIT - MAPAQ)
benoit.thomas@mapaq.gouv.qc.ca

Marcel Fréchette (IML - MPO)
frechettem@dfo-mpo.gc.ca

Jean-Marie Sévigny (IML - MPO)
sevignyjm@dfo-mpo.gc.ca

Jocelyne Pellerin (ISMER - UQAR)
jocelyne_pellerin@uqar.qc.ca

Michel Fournier (INRS - IAF)
michel.fournier@inrs-iaf.quebec.ca

Jean Côté (Pec-Nord inc.)
jean.ct1@sympatico.ca

Madeleine Nadeau (CeMIM - DIT - MAPAQ)
madeleine.nadeau@mapaq.gouv.qc.ca

Pierre Blier (UQAR)
pierre_blier@uqar.qc.ca

France Dufresne (UQAR)
france_dufresne@uqar.qc.ca

Helga Guderley (Université Laval)
helga.guderley@bio.ulaval.ca

John Himmelman (Université Laval)
john.himmelman@bio.ulaval.ca

Sandrine Briatte (ISMER - UQAR)
mobrisan@globetrotter.net

Julie Pariseau (ISMER - UQAR)
requin_2@hotmail.com

Simon Cartier (ISMER - UQAR)
simon_cartier@uqar.qc.ca

Nouveau-Brunswick

Thomas Landry (MPO - GFC)
landryt@dfo-mpo.gc.ca

Nouvelle-Écosse

Neil Ross (National Research Council - IMB)
neil.ross@nrc.ca

Fabrice Pernet (National Research Council - IMB)
fabrice.pernet@nrc.ca

Emmanuel Egbosimba (National Research Council - IMB)
emmanuel.egbosimba@nrc.ca

Scott MacQuarrie (National Research Council - IMB)
scott.macquarrie@nrc.ca

Nicole T. Brun (National Research Council - IMB)
nicole.brun@nrc.ca

Île-du-Prince-Édouard

Jeff Davidson (Atlantic Veterinary College)
davidson@upei.ca

Terre-Neuve

Cyr Couturier (Marine Institute)
cyr@mi.mun.ca

Joanne Harding (School of Fisheries, Marine Institute)
jomharding@hotmail.com

France

Jean-François Narbonne (Université Bordeaux)
jf.narbonne@lptc.u-bordeaux.fr

Pierre-Gildas Fleury (Ifremer-LCB)
pgfleury@ifremer.fr

Jean-François Samain (Ifremer Brest)
Jean.Francois.Samain@ifremer.fr

Irlande

Julie Maguire (University College Cork)
julie.maguire@ucc.ie

Mot de bienvenue

Problématique et objectifs

Lors des différentes opérations conchylicoles, les bivalves subissent un stress plus ou moins important difficilement quantifiable. L'évaluation du niveau de stress, de l'état de santé ou de la performance des individus est pour l'instant pratiquement impossible ou nécessite l'utilisation de moyens techniques très élaborés et plusieurs jours d'évaluation. Une évaluation générale peut être effectuée, mais seulement lorsque les individus sont moribonds. À ce stade, le bivalve est ouvert et se referme très difficilement lorsqu'on le touche. Mais entre cette situation, où les chances de survie sont pratiquement inexistantes, et un niveau de stress nul, les outils d'évaluation ne sont pas disponibles.

Pourtant, l'identification simple du niveau de stress d'un bivalve en aquaculture pourrait être un moyen d'optimiser rapidement les pratiques conchylicoles. En effet, en connaissant le niveau de stress subi par les bivalves lors de la mise en boudins, du transport du naissain, de l'ensemencement ou de la mise en marché, il serait possible de développer les méthodes, les techniques et les technologies permettant de ramener le stress à un minimum, ce qui se traduirait par une augmentation de la survie et de la performance des productions.

Deux buts principaux étaient visés par cet atelier soit faire le point sur les travaux de recherche et identifier les pistes de solutions les plus probables pour le développement d'outils simples, efficaces et pouvant être utilisés facilement par l'industrie afin d'évaluer le niveau de stress des bivalves en culture. En plus d'orienter le nouveau programme de recherche du RAQ sur le sujet, cet atelier a également permis de tisser des liens entre les chercheurs et éventuellement, d'initier de nouvelles collaborations.

Lors de cet atelier, les relations entre les différents indices de stress ont été examinées en fonction des caractéristiques génétiques des individus. Les indicateurs de stress discutés ont été :

- des indices biochimiques : relations ADN/ARN, protéines de chocs thermiques, charge des adénylates, radicaux libres, métabolites dans le muscle, composés énergétiques, etc.;
- des indices physiologiques : potentiel de croissance, taux physiologiques, rapport oxygène/azote, force du muscle adducteur, etc.;
- des indices biométriques : masse des tissus, indices de condition, asymétrie fluctuante, etc.;
- des indices comportementaux : retournement, enfoncement, vitesse d'enfouissement, production de byssus, etc.;
- des réponses à un stress additionnel : fuite face aux prédateurs, durée de survie à l'émersion, durée de survie à un stress hyalin, etc.

Bruno Myrand

Vitalité, stress et risque de mortalité : comment les définir et comment les mesurer chez les mollusques bivalves ?

Fleury, P.-G., J. Mazurié

Ifremer, Laboratoire Conchylicole de Bretagne, La Trinité sur mer, France

Le risque de mortalité dans les élevages est le problème numéro un rencontré par l'éleveur. De même la mortalité « naturelle » des animaux sauvages intéresse les gestionnaires des ressources halieutiques (évolution des stocks) ou de l'environnement (indicateurs biologiques).

De plus, cette mortalité n'est que la face émergée d'un iceberg sous lequel peuvent se cacher aussi des altérations des performances de croissance, de qualité ou de reproduction.

Le scientifique cherche dans les fonctions vitales des organismes les mécanismes de ces mortalités, de ces baisses de performances ou les facultés de récupération, d'où la quête de tests et d'indices de vitalité ou de stress, descripteurs de l'état physiologique des animaux ou de leurs aptitudes. À long terme, ces travaux peuvent offrir des perspectives en matière de sélection génétique ou d'acclimatation des animaux par des pratiques zootechniques.

Mais qu'est-ce que la « vitalité » et le « stress » ?

Selon le dictionnaire électronique *Le Robert* :

La vitalité :

- (Biologie). Vie, propriétés vitales. La vitalité s'exprime par la vitesse de croissance, la résistance aux agents extérieurs, une grande capacité énergétique (mobilité, fertilité, etc.);
- Caractère de ce qui manifeste une vie puissante et féconde, de ce qui est éminemment vivant. - Dynamisme, énergie, vigueur.

On distingue donc :

- un sens large : vie, propriétés vitales;
- un sens plus restrictif : vie puissante et féconde.

Au premier sens du terme, la vitalité représente donc les propriétés vitales, les expressions ou des manifestations de la vie (croissance, résistance aux agents extérieurs, énergie, mobilité, fertilité, etc.). On ne mesure donc pas la vitalité mais ses manifestations.

L'objectif est d'arriver à une synthèse la plus large possible. Ces manifestations de la vie sont assez discrètes chez les mollusques bivalves, mais couvrent néanmoins une quantité de fonctions, candidates potentielles à des tests de vitalité.

Ces fonctions peuvent s'estimer ou se mesurer à différents niveaux d'organisation :

- À l'échelle de la population : abondance, structure d'âge, etc.;
- À l'échelle de l'individu : croissance, morphologie, comportement, taux de filtration, activité valvaire, force musculaire, herméticité;

- À l'échelle organique ou tissulaire : aplatissement des cellules épithéliales digestives, état des branchies, taille du muscle, épaisseur de la coquille;
- À l'échelle cellulaire : capacité de phagocytose, typologie des hémocytes;
- À l'échelle moléculaire : charge énergétique, « heat-shock proteins », réserves glycogéniques, enzymes, ARN, ADN, etc.

D'ailleurs, le maintien d'une grande diversité génétique et d'une grande plasticité phénotypique chez les mollusques témoigne de la diversité des aptitudes nécessaires à ces espèces dans un environnement changeant et imprévisible. Il y a diverses formes de vitalité correspondant à différentes fonctions. Aucune fonction miracle ne permet de « gagner à tous les coups ».

Qu'il y ait des corrélations positives entre différentes aptitudes est une éventualité qui validerait le concept de « vitalité » générale et non spécifique, correspondant un peu à la rusticité recherchée en zootechnie ou à une vigueur ou une robustesse de fait (face à une large diversité d'agressions).

Mais cela doit être précisé (quelles aptitudes sont corrélées entre elles?) et étayé par des résultats expérimentaux. Ce ne peut pas être un postulat préalable.

Le stress :

Selon *Le Robert* encore :

- Réponse de l'organisme aux facteurs d'agression physiologiques (...) qui nécessitent une adaptation;
- Action brutale sur un organisme : choc infectieux (...).

Théoriquement, le stress peut donc être autant l'effet que la cause : la réponse de l'organisme à des agressions (1^{er} sens) autant que ces agressions elles-mêmes (2^e sens).

Pratiquement, dans la littérature scientifique, le terme de stress est souvent réservé au 1^{er} sens (réponse physiologique à une agression). Et on donnera plutôt le terme d'agressions, d'épreuves ou de facteurs de stress aux causes engendrant un stress.

D'autre part, particulièrement dans les études environnementales, le terme peut être utilisé de manière restrictive, réservé par exemple à des causes « anormales » (« abnormal impact of the environment », in Dhert *et al.*, 1992). Mais, en aquaculture, c'est le plus souvent des facteurs tout à fait habituels, naturels, qui induiront des stress sur les animaux : exondation à marée basse par exemple, variations de température, de salinité ou de nourriture dans le milieu, sans oublier des facteurs endogènes comme la gamétogenèse.

L'élevage implique aussi des agressions spécifiques : fortes densités, manipulations, transport, etc.

Caractérisation d'un stress

Face à la diversité des épreuves et en fonction de la diversité des aptitudes des animaux, la réponse physiologique (stress) peut s'exprimer de différentes façons.

Différents types de réactions physiologiques

Trois paramètres caractérisent une épreuve : sa nature, son intensité et sa durée et on peut distinguer deux types d'épreuves contre lesquelles peut se développer une réponse adaptative (en excluant des épreuves fortes et longues, en général létales) :

- des épreuves fortes mais courtes (hypoxie forte, pollution aiguë, arrivée d'un prédateur);
- des épreuves longues mais peu intenses (dessalure hivernale, mise à jeun, parasites, pathogènes, pollution chronique);

et, parallèlement, deux types de réponses adaptatives :

- des mécanismes de maintien : maintien des fonctions vitales au prix d'une consommation des réserves (qui est une stratégie utile face à une épreuve forte mais courte);
- des mécanismes de réduction : baisse du métabolisme (stratégie utile face à des épreuves longues mais faibles) pour se conformer aux limites du milieu.

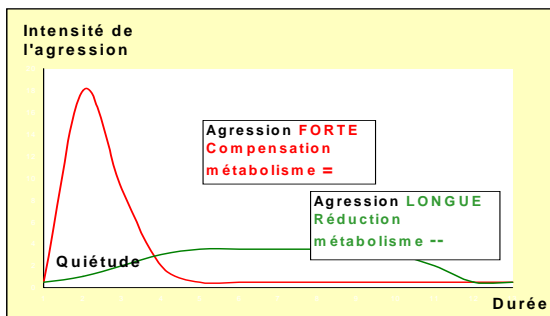


Figure 1 : Deux types de stress et deux types de réponses adaptatives.

Une bonne illustration de la différence entre les deux derniers types de réponses est la réponse du métabolisme des animaux en hypoxie du milieu :

- si les animaux maintiennent leur consommation d'oxygène en compensant l'hypoxie par une augmentation de leur taux de pompage, ce sont des animaux dits « régulateurs » développant une aptitude à des stress forts (mais pas trop longs, car puisant dans les réserves énergétiques);
- si les animaux adaptent leur consommation d'oxygène en proportion du taux d'oxygène, ce sont des animaux dits « conformeurs » développant une aptitude à des stress longs (mais pas trop forts, car les fonctions vitales sont diminuées).

On voit donc que la vitalité ne peut pas être universelle, mais demande des aptitudes différentes, voire opposées selon les types d'épreuves.

Inversement, on devra étudier des indices de vitalité pertinents pour des stress longs (glycogène par exemple) et des indices plus pertinents pour des stress courts (charge énergétique, tests comportementaux, etc.).

Évolution d'un stress

Le stress se termine par la récupération (retour à l'état physiologique initial) ou la mort.

La récupération

La récupération (« recovery ») marque le retour à l'état initial. La durée totale du stress est une notion importante pour l'éleveur. Elle lui permet de savoir quand les animaux auront retrouvé un état physiologique habituel, qui lui permet par exemple, de pouvoir intervenir à nouveau sur les animaux.

À l'opposé, la mort est évidemment l'arrêt complet et irréversible des fonctions vitales. C'est la conjonction de deux facteurs : une épreuve et une inaptitude des animaux à répondre à cet épreuve.

La mortalité

Il s'agit du rapport entre le nombre des décès et le chiffre de la population dans un lieu et dans un espace de temps déterminés.

Ici, ce n'est plus de l'individu dont il s'agit, mais de la population. La mortalité est donc une mesure statistique, un risque. Mais il faut se méfier des moyennes, car en matière de risque, c'est le pourcentage d'« animaux faibles » qui importe.

On voit aussi que la perte de vitalité peut induire une mortalité totale ou partielle des animaux, mais elle peut parfois passer inaperçue (mortalité nulle) alors que l'on a frôlé une hécatombe!

Mesurer un stress?

Il paraît malgré tout intéressant de trouver un indicateur global le mieux corrélé possible au risque de mortalité, un indicateur d'une « vitalité la plus globale possible » permettant de l'estimer, voire de la mesurer sur les animaux.

On peut supposer que plus cette « vitalité la plus globale possible » initiale est élevée, plus l'animal pourra subir des épreuves fortes induisant des changements importants de son métabolisme (traduits par une « baisse de vitalité » qui est plus précisément une baisse des indices de vitalité).

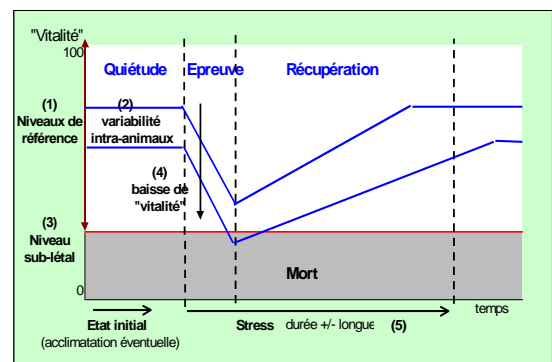


Figure 2 : Vitalité théorique simpliste au cours d'un stress.

Pour un indice de vitalité donné, l'objectif sera donc d'acquérir des informations de référence concernant (figure 2) :

- le niveau de référence standard, habituel;
- sa variabilité intra-animaux, intersaisons, etc.;
- le seuil léthal.

Puis pour une épreuve donnée :

- la « baisse de vitalité » associée à cette agression;
- la durée du stress (temps de récupération).

Les qualités d'un bon indice de vitalité

De l'étude des populations à la biologie moléculaire, l'éventail des tests et indices de vitalité potentiels est très large. Quels critères doit-on privilégier dans le choix de quelques-uns de ces outils?

Pertinence

Il convient d'abord que l'indice soit adapté à ce qu'on veut mesurer. Le choix de l'organe de prélèvement est à prendre en considération. Il faut aussi savoir si on appréhende des agressions courtes ou des agressions longues et définir des indices ou des tests de vitalité en conséquence.

Il faut aussi définir si on souhaite avoir un indice de vitalité en situation physiologique normale (animaux « au repos ») ou lors d'un test d'effort (méthode S.O.S. ou « Stress On Stress »).

Fiabilité et sensibilité

Comme tout outil, un bon indice de « vitalité » doit être au minimum :

- fiable (reproductible) : des lots identiques ou placés dans des conditions identiques doivent donner des résultats identiques;
- sensible : des lots différents doivent donner des résultats différents (résolution du test; seuil de détection, rapport signal/bruit de fond).

En fait, ces deux qualités primordiales sont liées, un défaut de fiabilité entraînant un défaut de sensibilité. Cependant, la reproductibilité des expériences est souvent délicate, voire impossible et la fiabilité est donc difficile à appréhender. Un défaut de fiabilité peut traduire un manque de pertinence du test.

La sensibilité, quant à elle, peut être améliorée par une augmentation des effectifs testés (individus ou nombre de « pools ») mais au détriment de la rapidité des mesures. L'emploi de tests « Stress On Stress » peut aussi augmenter la sensibilité d'un indice.

Tests globaux et tests spécifiques

Pour appréhender une « vitalité » au plus large spectre d'aptitudes possibles, on privilégiera des indices portant sur des fonctions générales de l'organisme. Cela se fera au dépend de la compréhension précise des stress et des aptitudes, et peut-être aussi au dépend de la sensibilité. Les indices issus de tests de comportement ou de physiologie fonctionnelle paraissent à cet égard les plus aptes à prendre en compte une grande part de l'état physiologique des animaux.

Cependant, en réponse à des problèmes particuliers, des indices spécifiques pourront se révéler plus adaptés, plus sensibles.

D'autres qualités peuvent aussi être prises en compte :

- la possibilité de mise en œuvre *in situ*;
- la possibilité à la fois de mesures individuelles permettant d'appréhender la variabilité interindividus et de mesures collectives (« pools ») pouvant être intéressantes en terme de simplicité, de rapidité et de précision à effort égal;
- la facilité de prise en compte de l'allométrie, sans avoir à adapter le test à la taille des animaux;
- la possibilité de mesures non létales, voire non traumatisantes facilitant des comparaisons avec d'autres épreuves ou avec d'autres tests;
- la rapidité, la simplicité, la robustesse, le faible coût. L'idéal serait de pouvoir impliquer la profession elle-même de manière à pouvoir disposer de très nombreuses données.

Quelques indices généralistes d'une forme de vitalité des bivalves.

Au laboratoire Ifremer de La Trinité sur mer, nous nous intéressons depuis quelques années à la mise au point d'indicateurs physiologiques fonctionnels simples, susceptibles de qualifier quelques aptitudes (et, on l'espère, l'état général) des mollusques bivalves.

On ne recherche pas tant l'explication physiologique de ces indices que leur corrélation avec l'apparition de mortalités (« boîte noire »).

Les principaux indices expérimentés sont la mortalité à la suite d'épreuves standards, des indices de comportement, la force musculaire et les qualités hermétiques de la coquille par mesure de la « perte de sel » en eau douce.

La mortalité

La mortalité à la suite d'épreuves est assez sélective, mais pose de gros problèmes de standardisation des épreuves et plus particulièrement d'adaptation à différentes tailles d'animaux, ce qui implique en général de contraignantes expérimentations préalables de calibrage du test. L'utilisation de DL50 (dose) ou de TL50 (durée) pour lesquelles on observe 50 % de mortalité est bien connue et particulièrement utilisée en écotoxicologie. On se méfiera quand même de ce qu'elles différencient mal des lots avec 10 % d'animaux « faibles » et des lots qui en ont 40 %.

Les tests de comportement

Les tests de comportement sont la vitesse de retournement (juvéniles de coquille Saint-Jacques), la vitesse d'enfouissement (coques et coquille Saint-Jacques) et la vitesse de refixation par le byssus (moules). Ils apparaissent généralement bien discriminants entre des lots d'animaux différemment affaiblis, mais leur usage en routine implique une standardisation des épreuves délicate à mettre en œuvre. Ils ont aussi le gros défaut d'être très spécifiques et particulièrement peu adaptés à l'huître, notre première production nationale.

La force musculaire

La force musculaire des bivalves est mesurée avec un dynamomètre du commerce (avec ou sans enregistrement). Le problème technique principal est l'insertion des animaux sur l'appareil (nécessité de meuler le bord des valves pour les huîtres ou les coques). La comparaison d'animaux de tailles différentes nécessite une correction d'allométrie. La force musculaire paraît être un indicateur pertinent corrélé négativement avec une baisse de vitalité provoquée par des épreuves (exondation, eau douce, élévation de température) de durée croissante.

L'enregistrement de la force musculaire permet de calculer d'autres indices : force des pics due au muscle strié, perte de tonus, etc. On cherchera aussi à améliorer la sensibilité par l'analyse d'animaux en test d'effort (méthode « Stress on Stress ») plutôt que sur des animaux au repos, telle que pratiquée jusqu'ici pour l'acquisition de références.

L'herméticité

L'herméticité (« perte de sel ») n'a pas été testée en soi (en conditions normales) mais plutôt comme révélateur d'affaiblissement en cours d'épreuve thermique (« Stress on Stress »). Les résultats sont disparates; certains sont encourageants et d'autres, peu discriminants. Le test gagnerait sans doute à être réalisé en mesures individuelles plutôt que par « pool » (méthode initiale car plus rapide).

Quelques conclusions

La « vitalité » des mollusques est une notion assez floue, peu identifiée ainsi dans la littérature scientifique. Son intérêt est évident, mais sa définition physiologique reste périlleuse car la vitalité n'est pas un état ou une fonction définie de l'organisme, mais un ensemble d'aptitudes innées ou acquises pour répondre au mieux à différentes agressions courantes ou occasionnelles. C'est pourquoi la recherche d'un indice de « vitalité » conduira sans doute à définir un ensemble d'indices plus ou moins complémentaires.

Pour appréhender cet ensemble d'aptitudes, de nombreux indices de vitalité peuvent être proposés, dont certains sont utilisés pour qualifier le milieu (propre/pollué). Il en est déjà beaucoup moins, si ce n'est aucun, qui répondent aux qualités requises d'un indice de vitalité des bivalves qui implique une sensibilité beaucoup plus forte : la gamme « en forme »/« fatigué » que nous voulons cerner est moins large que celle utilisée dans l'environnement qui va, elle, au-delà de la zone de viabilité des animaux.

Parmi les critères de choix d'un indice de vitalité, nous avons voulu privilégier l'aspect « généraliste » des indices possibles. C'est pourquoi nous étudions depuis plusieurs années des indices de comportement des individus (refixation, enfouissement, redressement) ou de physiologie fonctionnelle (force musculaire, maintien de l'herméticité de la coquille).

Avant de pouvoir être validé comme indice d'une certaine vitalité face à des épreuves *in situ*, un indice de vitalité doit être qualifié par de nombreuses expériences de laboratoire permettant de vérifier sa fiabilité, de mesurer sa sensibilité, de préciser les conditions d'allométrie, de comparer ses performances sur des animaux « au repos » ou sur des animaux déjà stressés

(méthode « Stress On Stress »). La comparaison avec des tests de mortalité à la suite d'épreuves reste primordiale pour qualifier ces tests.

Toutes ces qualités et études préalables pourraient être utilement renseignées dans un fichier standardisé des indices de vitalité des mollusques.

Références

- Baillon, N., 1992. Analyse des stries de croissance des post-larves de coquille Saint-Jacques *Pecten maximus* ; méthodologie et perspectives d'application pour la description de stress d'élevage. (Study of growth rings in scallop *Pecten maximus* post-larvae; methodology and prospect of application for the description of stresses in rearing). Rapport Interne Ifremer/DRV 92.003.
- Baird, R. H., 1958. On the swimming behaviour of scallops (*Pecten maximus*). Proc. Malac. Soc. Lond. 33: 67-71.
- Bricelj, M., S. Shumway. 1991. Physiology: Energy acquisition and utilization. In *Scallops : Biology Ecology and Aquaculture*. Shumway S. (ed), Developments in Aquaculture and Fisheries Science. 21 :305-337.
- Dhert, P., P. Lavens, P. Sorgoloos. 1993. Stress evaluation : a tool for quality control of hatchery-produced shrimp and fish fry. *Aquacult. Eur.* 17/2: 6-10.
- Eertman, R. H. M., A. J. Wagenvoort, H. Hummel, A.C. Smaal. 1993. Survival in air of the blue mussel *Mytilus edulis* as a sensitive response to pollution-induced environmental stress. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 170: 179-195.
- Fleury, P.-G., C. Mingant, A. Castillo. 1996. A preliminary study of the behaviour and vitality of reseeded juvenile great scallops, of three sizes in three seasons. *Aquaculture International* 4: 325-337.
- Fleury, P.-G., C. Mingant, R. Philippe. 1996. Transfer of scallop (*Pecten maximus*) post-larvae from hatchery-nursery to off-shore cages: stress and re-settlement. International symposium on settlement and metamorphosis of marine invertebrate larvae. Plymouth (U.K.) 15-18 July 1996.
- Fleury, P.-G., J. Mazurié, J.-F. Bouget, T. Vollen. 2001. Comparaison de tests physiologiques simples d'estimation de la « vitalité » de naissain d'huîtres creuses *Crassostrea gigas*. Journées conchyliques Ifremer, Nantes 4-5 avril 2001.
- Gäde, G., E. Weeda, P.-A. Gabott. 1978. Changes in the level of octopine during the escape responses of the scallop *Pecten maximus*. *J. comp. Physiol.* 124: 121-127.
- Maguire, J. A., P.-G. Fleury, G.-M. Burnell. 1999 Some methods for quantifying quality in the scallop *Pecten maximus* (L.). *J. of Shellfish Research* 18-1: 59-66.
- Mazurié, J., P. G. Fleury, C. Pelvin. 2001. Comparaison de tests physiologiques simples d'estimation de la « vitalité » de naissain de moules *Mytilus edulis*. Journées conchyliques Ifremer, Nantes 4-5 avril 2001.
- Moal, J., J. R. Le Coz, J. F. Samain, J. Y. Daniel. 1989. Nucleotides in Bivalves: Extraction and Analysis by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). *Comp. Biochem. Physiol.* 93B, 2: 307-316.

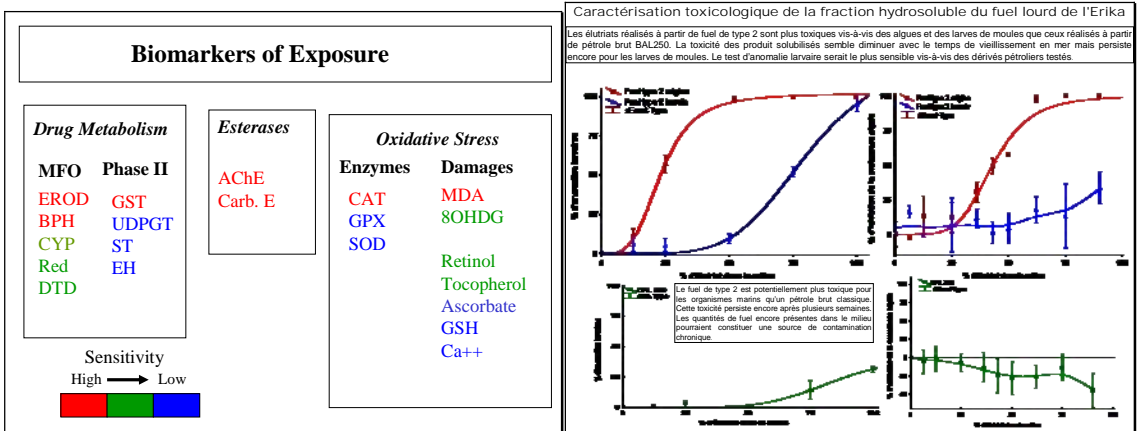
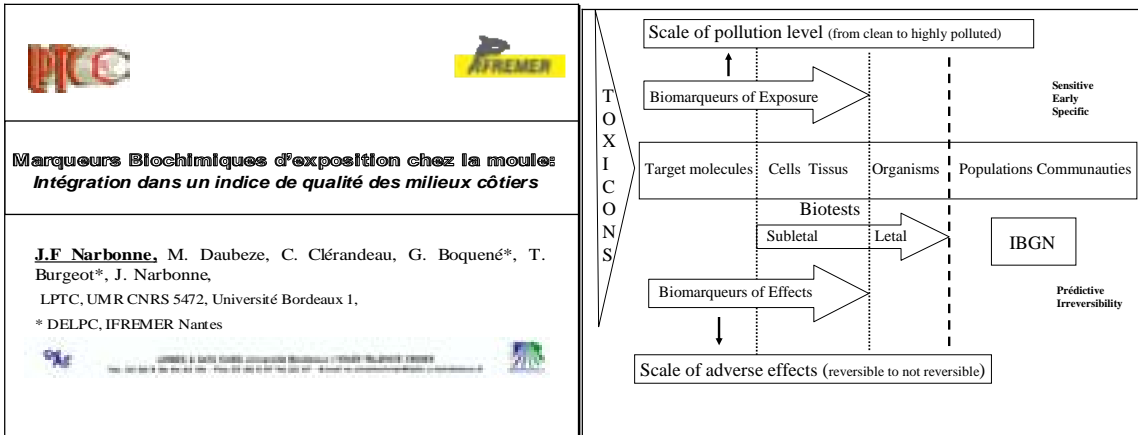
Marqueurs biochimiques d'exposition chez la moule : intégration dans un indice de qualité des milieux côtiers

J.-F. Narbonne¹, M. Daubeze¹, C. Clérandeau¹, G. Boquené², T. Burgeot², J. Narbonne¹

1. LPTC, UMR CNRS 5472, Université de Bordeaux, France

2. DELPC, Ifremer, Nantes, France

PRÉSENTATION POWER POINT

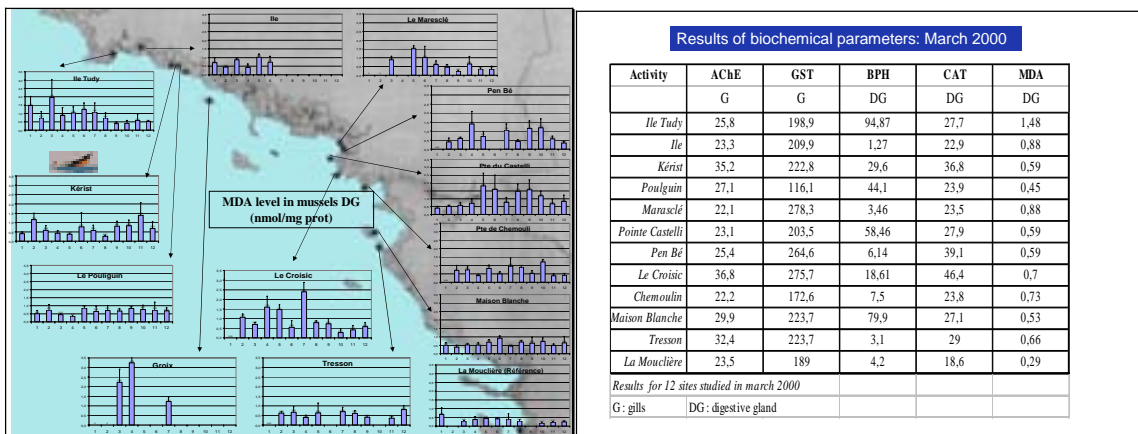
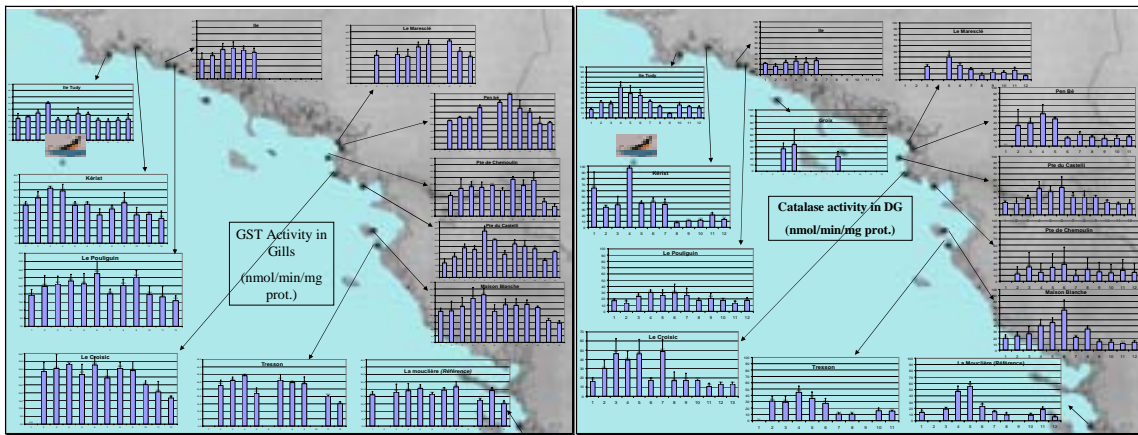
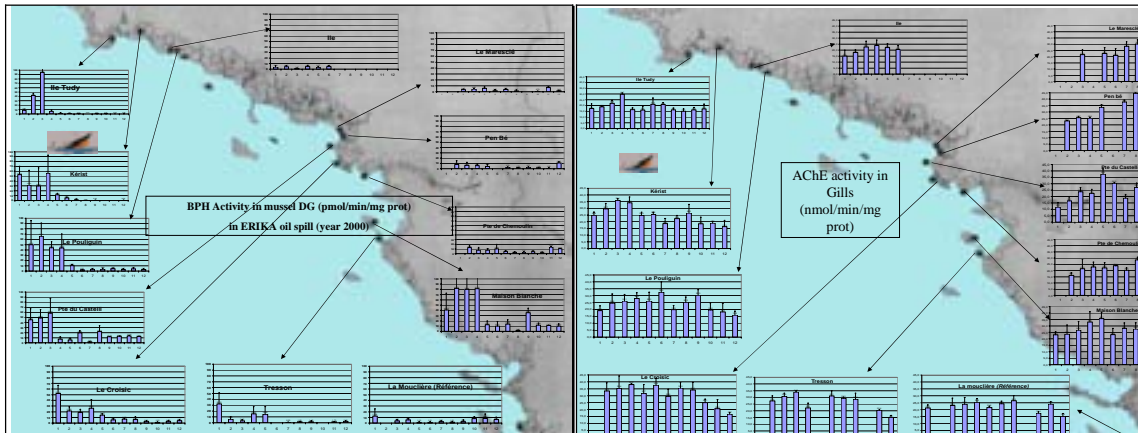


Multimarker of Exposure

- Sentinel species: *Mytilus galloprovincialis*
- Biochemical markers selected:
 - Gills : AChE, GST
 - Digestive gland: BPH, GST, CAT/MDA

Key for interpretation of multimarker profile:

- Contamination from water column: Gill response
- Contamination from food chain: DG response
- Contamination by Heavy metals: AChE, ROS
- Contamination by PAHs: BPH, GST
- Contamination by Organic chemicals: GST
- Contamination by Pesticides: AChE (GST) (ROS)



Results of biochemical parameters: March 2000

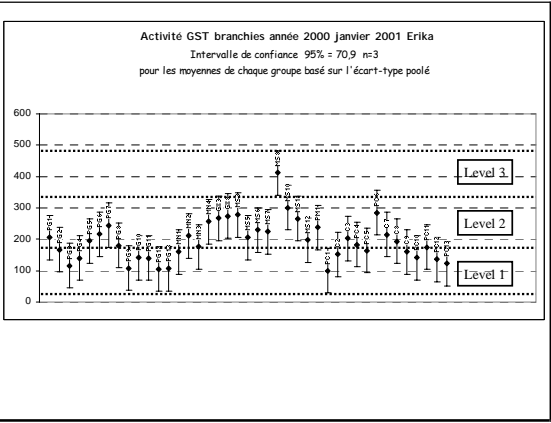
Activity	ACHE		GST		BPH		CAT		MDA	
	G	DG	G	DG	DG	DG	DG	DG	DG	DG
Ile Tudy	25,8	198,9		94,87	27,7	1,48				
Ile	23,3	209,9		1,27	22,9	0,88				
Kérist	35,2	222,8		29,6	36,8	0,59				
Pouguin	27,1	116,1		44,1	23,9	0,45				
Marasclé	22,1	278,3		3,46	23,5	0,88				
Pointe Castelli	23,1	203,5		58,46	27,9	0,59				
Pen Bé	25,4	264,6		6,14	39,1	0,59				
Le Croisic	36,8	275,7		18,61	46,4	0,7				
Chemoulin	22,2	172,6		7,5	23,8	0,73				
Maison Blanche	29,9	223,7		79,9	27,1	0,53				
Tresson	32,4	223,7		3,1	29	0,66				
La Mouschière	23,5	189		4,2	18,6	0,29				

Results for 12 sites studied in march 2000

G: gills DG: digestive gland

Construction de l'Indice Biomarqueur

- Test de Tuckey
- Analyse discriminante (sélection des marqueurs)
- Calcul des niveaux de discrimination
- Attribution des indices individuels
- Somme des 5 indices (représentatifs et discriminants)
- Classification et cartographie



Conversion to Biomarker Index

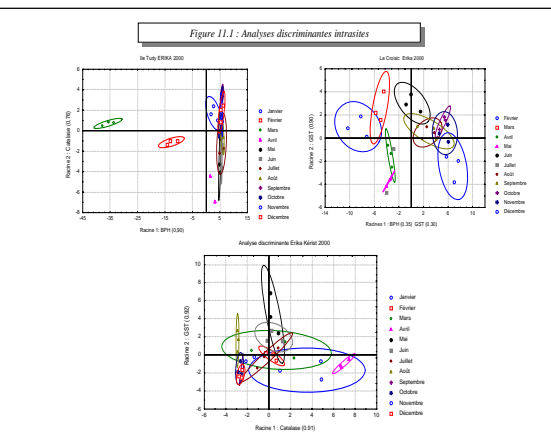
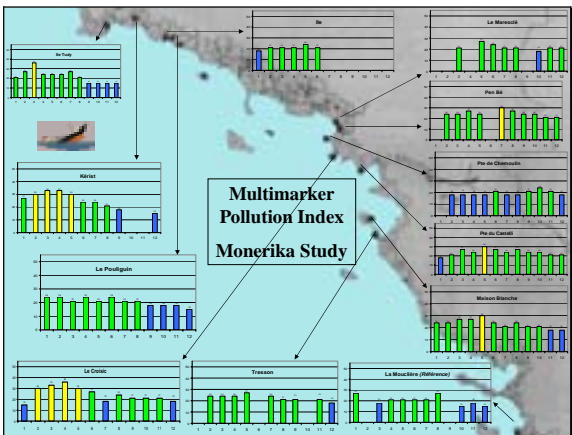
Discrimination Levels (DL de 2 à 5)	1	2	3	4	5
Biomarker Pollution Index (BPI)	4	10			
	3	6	12		
	2	4	7	12	
	1	2	4	8	14

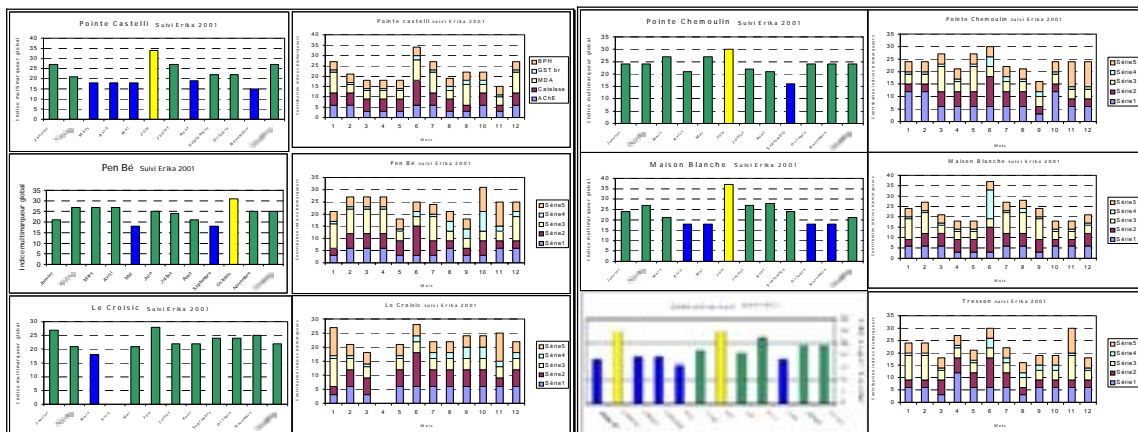
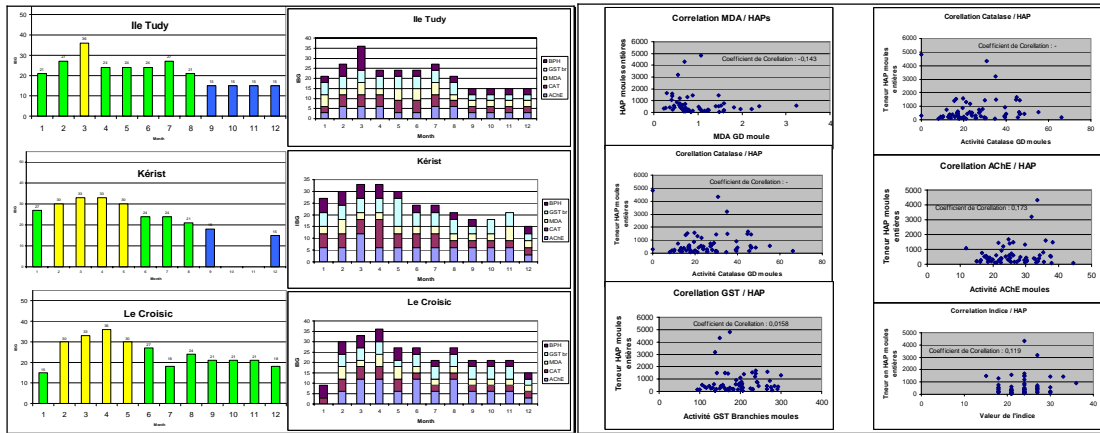
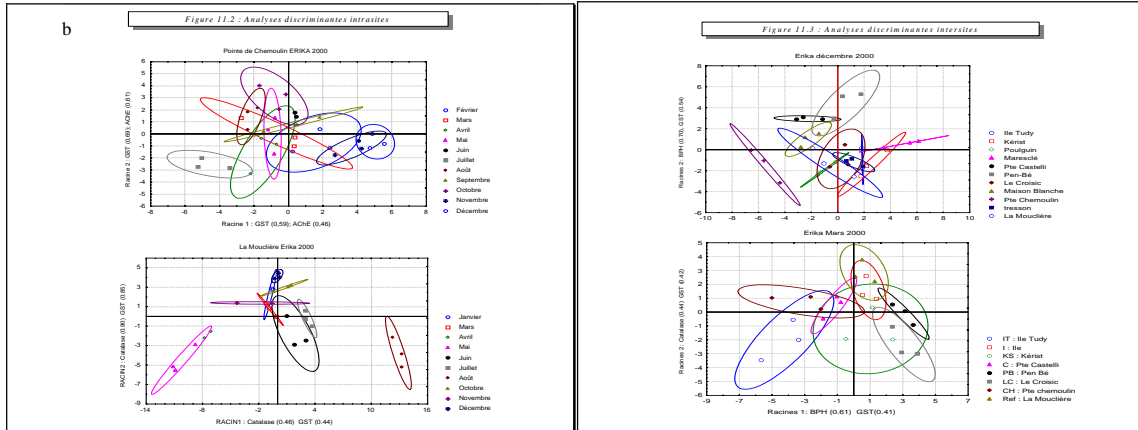
Biomarker and Multimarker Pollution Index (BPI, MPI)

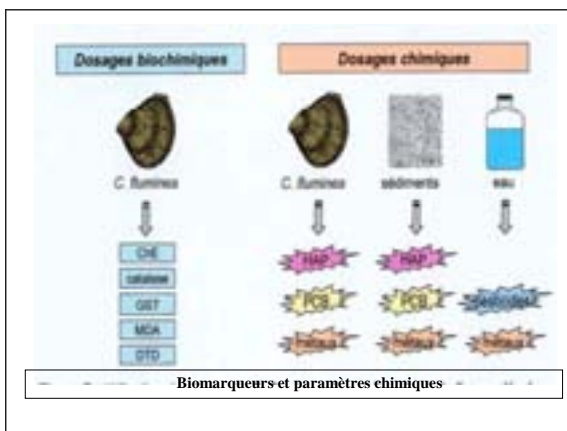
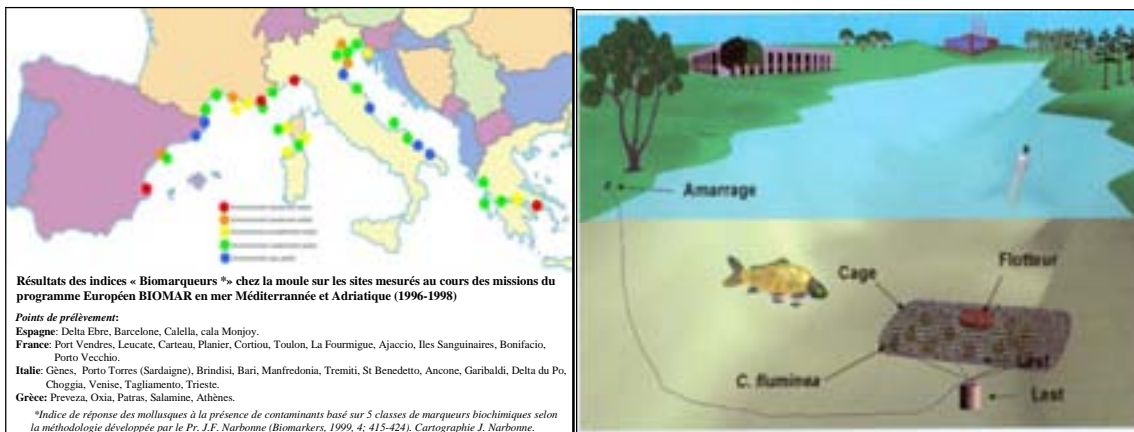
Activity	AChe	GST	BPH	CAT	MDA	MPI
	G	G	DG	DG	DG	
<i>Ile Tudy</i>	6	6	12	6	6	36
<i>Ile</i>	6	6	3	3	3	21
<i>Kérist</i>	12	6	6	6	3	33
<i>Poulguin</i>	6	3	6	3	3	21
<i>Marasclé</i>	6	6	3	3	3	21
<i>Pointe Castell</i>	6	6	6	6	3	27
<i>Pen Bé</i>	6	6	3	6	3	24
<i>Le Croisic</i>	12	6	6	6	3	33
<i>Chemoulin</i>	3	6	3	3	3	18
<i>Maison Blanche</i>	6	6	6	6	3	27
<i>Tresson</i>	6	6	3	6	3	24
<i>La Moulière</i>	3	6	3	3	3	18

G : gills DG : digestive gland

critically contaminated environment
 moderately polluted environment
 lightly polluted environment







Utilisation de marqueurs immunologiques pour le suivi d'organismes vivants exposés à des substances toxiques

Fournier, M. J. Pellerin, D. Cyr, M. Lebeuf, P. Brousseau

INRS - Institut Armand-Frappier, Pointe-Claire, Québec.

Introduction

Les trois dernières décennies furent marquées par l'émergence d'une prise de conscience de la part du public, des secteurs académique et réglementaire du risque pour la santé associée à l'exposition aux substances toxiques persistantes (STP) telles que les dioxines, les biphényles polychlorés (BPC) et les pesticides. Des efforts concertés ont été entrepris dans le but d'éliminer leur utilisation et leur émission incontrôlée dans l'environnement. Depuis les années 1970, par la législation et les programmes de suivi environnemental régissant au point de décharge le déversement de ces polluants dans l'environnement, les niveaux de STP ont décliné rapidement dans les Grands Lacs et le bassin hydrographique du fleuve Saint-Laurent. Cependant, vers le milieu des années 1980, un ralentissement de cette diminution a été noté. Les concentrations dans l'environnement semblaient avoir atteint un état d'équilibre. Ces baisses de polluants persistants en Amérique du Nord ont été notées aussi bien pour les compartiments abiotiques que biotiques, à l'exception des écosystèmes arctiques (Gilbertson *et al.*, 1998). Ce constat a permis de mettre l'accent sur l'importante contribution des sources diffuses libérant toujours dans l'environnement ces substances toxiques. Parmi ces sources, les sédiments marins et ceux des eaux douces sont de grands réservoirs potentiels pouvant relâcher dans le temps ces substances dans l'environnement. Il est donc crucial de développer et de valider des modèles qui serviront à identifier et à gérer ces aires environnementales actives dans le relargage des STP, les rendant ainsi biodisponibles pour les organismes de la chaîne alimentaire.

Malgré la baisse des concentrations de STP observée en général dans l'environnement, les effets toxiques nocifs pour la santé des organismes du biote ne semblent pas diminuer de façon parallèle. Plusieurs espèces présentent encore des problèmes de santé suite aux expositions chroniques aux STP. La toxicité systémique de ces produits étant bien connue, il devient crucial de développer des biomarqueurs sensibles qui permettraient de mettre en évidence leurs effets souvent subtils sur les différents organes. En considérant que les effets toxiques liés au STP ont déjà été démontrés pour le système reproducteur, immunitaire et nerveux chez plusieurs populations humaines habitant autour des Grands Lacs ou du fleuve Saint-Laurent, il apparaît justifié d'utiliser ces sentinelles environnementales afin de mieux cibler la menace pour la santé humaine (Colborn *et al.*, 1992).

Le système immunitaire bien intégré interagit intimement avec les fonctions de plusieurs systèmes et de plusieurs organes. Il est extrêmement sensible et vulnérable aux xénobiotiques qui peuvent altérer sérieusement ses fonctions. Une atteinte sévère de ce système peut conduire rapidement à des signes évidents de morbidité et même provoquer la mort de l'organisme. Toutefois, ces effets sont souvent précédés de changements subtils dans une ou plusieurs de ses composantes. L'identification rapide de ces changements à l'aide de bio-indicateurs précoces d'immunotoxicité peut être d'un grand intérêt pour évaluer la santé humaine ou celle de l'environnement (Fournier *et al.*, 2000;

Brousseau *et al.*, 1997, 2002; Dean and Murray, 1990). La possibilité de cibler rapidement l'atteinte du système présente un avantage puisque les effets se manifestent généralement à de faibles niveaux et sont souvent associés à une toxicité aiguë (Brousseau *et al.*, 1997; Koller et Exon, 1985).

Parmi ces bio-indicateurs, l'utilisation d'une des fonctions essentielles des phagocytes, soit la phagocytose, semble *a priori* très prometteuse pour les applications *in situ*. En effet, le suivi des compétences immunitaires, quoique très sensibles, requiert habituellement un protocole inadapté pour les restrictions rencontrées sur le terrain (c'est-à-dire que l'exposition à un antigène spécifique demande au moins une période d'une semaine avant la mesure du bio-indicateur). Puisque l'activité phagocytaire est une fonction conservée et maintenue tout au cours du processus évolutif chez toutes les espèces et qui, parmi les espèces les plus avancées, est essentielle au développement de réponses immunes plus complexes (immunité humorale et cellulaire), son utilisation comme marqueur de troubles précoces semble un choix approprié (Fournier *et al.*, 2000).

Chez une grande majorité d'espèces, les cellules phagocytaires peuvent être obtenues du sang périphérique ou des fluides circulants ne nécessitant pas l'utilisation de techniques invasives. L'activité première de ces cellules, comme la phagocytose de particules étrangères ou la production de particules biocides, est facilement mesurée par des méthodes standardisées pour une grande variété d'espèces (Brousseau *et al.*, 1999).

Tout au cours de cette présentation, nous vous démontrerons que les toxiques persistant dans l'environnement marin peuvent devenir biodisponibles et toxiques pour les organismes vivants dans ces écosystèmes et que le transfert de ces contaminants de l'eau ou de sédiments contaminés aux poissons et aux mollusques peut faire l'objet d'un suivi *in situ* ou sous des conditions contrôlées telles que rencontrées dans les laboratoires. Les cellules phagocytaires, telles que les macrophages du pronéphrost chez les poissons ou les hémocytes chez les mollusques, seront utilisées comme biomarqueurs d'immunotoxicité. Il sera également discuté de données obtenues suite au suivi d'exposition *in vitro* à des xénobiotiques sélectionnés de cellules immunitaires afin de démontrer la sensibilité comparative du système immunitaire chez différentes espèces marines.

Bivalves exposés à des sédiments marins contaminés

Dans cette section, nous présentons les effets sur l'activité de macrophages (hémocytes) prélevés chez deux espèces de myes (*Mya arenaria* et *Mactromeris polynima*) suite à une période d'exposition aux sédiments marins contaminés. L'activité des macrophages a été mesurée par cytométrie en flux. Les deux espèces, *Mya arenaria* et *Mactromeris polynima*, ont été exposées, pour une période totale de 10 et de 12 semaines respectivement, à des sédiments provenant de la baie des Anglais, de Baie-Comeau et de Québec. Tel que déjà mentionné, ces sédiments ont une forte teneur en BPC et en HAP. Les sédiments

du groupe témoin étaient constitués de sable non contaminé. Après une période de quatre semaines, des individus des deux espèces ont été échantillonnés et l'activité phagocytaire des hémocytes a été mesurée. Les résultats ont indiqué que l'activité phagocytaire chez *Mactromeris polynoma* était significativement supprimée par rapport au témoin tandis qu'aucun effet n'était mesuré sur *Mya arenaria*. Cette dernière présentait une activité normale. Cependant, à la fin de la période d'incubation, l'activité phagocytaire était supprimée chez les deux espèces. Il est peu probable que l'effet soit lié à une toxicité systémique puisque des paramètres physiologiques tel que le dosage des protéines du manteau ou les niveaux de malondialdéhyde, les protéines et le taux de glycogène de la glande digestive n'ont pas été affectés par l'exposition. Cependant, la suppression de la phagocytose concordait avec le transfert des polluants des sédiments aux organismes et leur accumulation subséquente dans les tissus comme l'a démontré la charge corporelle en BPC. Il est intéressant de noter qu'il y avait une prévalence pour les molécules à faible poids moléculaires et pour les congénères de BPC peu chlorés. Ces résultats supportent l'idée que les bivalves sont d'excellentes sentinelles pour la surveillance de la contamination des sédiments et que l'activité phagocytaire est un biomarqueur sensible à l'exposition de polluants (Brousseau *et al.* 2000; Bouchard *et al.*, 1999; Fournier *et al.*, 2002).

Bivalves exposés à une contamination de l'eau au mercure

Tel que démontré à la section précédente, les bivalves marins sont reconnus comme étant de bons bio-indicateurs pour les suivis environnementaux. La présente étude a permis de vérifier les effets *in vivo* du chlorure de mercure (HgCl_2) et du chlorure de méthylmercure (CH_3HgCl) sur les fonctions phagocytaires d'hémocytes provenant de *Mya arenaria* (mye commune) et de *Mytilus edulis* (moule bleue). Les bivalves ont été exposés pendant 28 jours à des concentrations variant entre 10^{-5} à 10^{-9}M de HgCl_2 et de CH_3HgCl ajoutés à l'eau des différents bassins. L'activité phagocytaire des hémocytes a été déterminée par la phagocytose de billes fluorescentes (microsphères de latex marquées au FITC) par cytométrie en flux. Après sept jours d'exposition, toutes les myes exposées à 10^{-6}M de HgCl_2 sont mortes. À la fin de l'exposition, soit au jour 28, les résultats ont révélé que la viabilité des hémocytes diminuait significativement pour les hémocytes de myes exposés à 10^{-6}M de HgCl_2 . Une diminution significative de l'activité phagocytaire a également été notée chez les myes exposées à 10^{-6}M de HgCl_2 . Un patron similaire a été observé avec le CH_3HgCl , l'effet se produisant plus tôt dans le temps. *Mytilus edulis* présentait par contre une plus grande sensibilité au mercure. La suppression de l'activité phagocytaire se produisait plus tôt et à des concentrations plus faibles que celles observées pour *Mya arenaria*. Les analyses chimiques effectuées sur les tissus de *Mya arenaria* ont clairement démontré qu'il y avait une accumulation de la forme organique du mercure. Par ailleurs, une corrélation a été établie entre la charge corporelle en mercure et les effets sur l'activité phagocytaire des hémocytes. Cette étude a donc permis de démontrer que les deux formes chimiques de mercure inhibent les fonctions phagocytaires des hémocytes de *Mya arenaria* suite à une exposition *in vivo* (Fournier *et al.*, 2001).

Sensibilité comparative d'espèces marines aux xénobiotiques

Une plus vaste étude sur l'immunité non spécifique de plusieurs espèces de bivalves marins (*Cyrtodaria siliqua*, *Mactromeris polynoma*, *Mesosdesma arctatum*, *Mya arenaria*, *Mya truncata*, *Mytilus edulis*, *Serripes groenlandis* et *Siliqua costata*) a été menée dans nos laboratoires. Afin de vérifier les différences entre les espèces, les hémocytes de ces bivalves ont été exposés *in vitro* à une variété de métaux (AgNO_3 , CH_3HgCl , HgCl_2 , CdCl_2 , et ZnCl_2) et la cinétique de la phagocytose a été mesurée suite à une incubation de 24 heures avec des billes de latex fluorescentes. Une augmentation significative de l'activité phagocytaire des hémocytes a été mesurée, la réponse optimale étant observée après quatre heures d'incubation. Aux faibles concentrations, les deux formes de mercure (organique et inorganique) ont stimulé l'activité phagocytaire pour la moitié des espèces considérées. Par contre, à des concentrations fortes, tous les métaux testés ont induit une inhibition significative de la phagocytose dans une relation dose-réponse pour toutes les espèces. La sensibilité espèce-spécifique a été déterminée en comparant les concentrations inhibant 50 % de l'activité phagocytaire des hémocytes (CI_{50}) obtenues pour chacune des espèces. Les résultats obtenus permettent de supposer qu'il y a des niveaux de sensibilité entre les espèces. Ainsi, les réponses des CI_{50} variaient entre $4 \times 10^{-7}\text{M}$ pour la forme organique de mercure chez *Mytilus edulis* et 10^{-2}M pour le cadmium et le zinc pour les différentes espèces. On doit également noter que des analyses de viabilité ont été réalisées en parallèle et que l'inhibition de la phagocytose n'est pas nécessairement la conséquence d'une mortalité cellulaire (Brousseau *et al.*, 1999; Sauvé *et al.*, 2002a,b).

Une approche similaire a été explorée sur une variété de mammifères marins d'espèces différentes. Nous avons pu établir que les différences de sensibilité vis-à-vis l'action des toxiques étaient non seulement en relation avec l'espèce mais également avec le sexe des animaux et leur stade de développement (Brousseau *et al.*, 2002; De Guise *et al.*, 1996, 1998, 2002; Pillet *et al.*, 2000, 2002; Dufresne *et al.*, 2002; Lalancette *et al.*, 2002). Ces résultats, confirmant ceux obtenus avec d'autres espèces d'eaux douces ou dépendantes de celles-ci, telles que la truite, les grenouilles, l'aigle à tête blanche, etc., (Audet *et al.*, 2002; Christin *et al.*, 2002; Escarné *et al.*, 2002; Gendron *et al.*, 2002; Ménard *et al.*, 2002; Sauvé *et al.*, 2002c,d) démontrent très clairement l'utilité des marqueurs immunologiques en écotoxicologie.

Références

- Audet, M., W. W. Bowermann, A. E. Roe, P. Brousseau, M. Fortier, M. Fournier. Assessment of phagocytic competence of heterophils from Bald eagle (*Haliaeetus leucocephalus*) nestling in Great Lakes Basin. En revision dans Journal of Great Lakes Research.
- Bouchard, N., M. Fournier, É. Pelletier. 1999. Effects of butyltin compounds on hemocytes phagocytosis activity of three marine bivalves. J. Tox. Env. Chem. 18(3):519-522.
- Brochu, C., S. Moore, É. Pelletier. 1995. Polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in sediments and biota of the Saguenay Fjord and the St. Lawrence Estuary. Mar. Pollut. Bull. 30:515-523.
- Brousseau, P., M. Dunier, S. De Guise, M. Fournier. 1997. Marqueurs immunologiques. In: J.F. Ramade *et al.* Biomarqueurs en écotoxicologie, aspects fondamentaux. Masson, 287-315.

- Brousseau, P., Y. Payette, B. Blakley, H. Boermans, H. Tryphonas, M. Fournier. 1999. Manual of Immunological Methods. CRC Press., Boston, USA, 141 p.
- Brousseau, P., J. Pellerin, Y. Morin, D. Cyr, B. Blakley, H. Boermans, M. Fournier. 2000. Flow cytometry as a tool to demonstrate the disturbance of phagocytosis in the clam. *Mya arenaria* following exposure to heavy metals. *Toxicology* 142: 145-156.
- Brousseau, P., I. Voccia, S. De Guise, S. Ruby, M. Fournier. 2002. Immunotoxicology of St. Lawrence beluga whales. In: *Toxicology of marine mammals*. (Vos, J. G., G. D. Bossart, M. Fournier, T. J. O'Shea, editors). Pp. xx-xx. Taylor & Francis, London, In Press.
- Colborn, T., C. Clement. 1992. Chemically-induced alterations in sexual and functional development : the wildlife-human connection. *Advances in Modern Environmental Toxicology*, vol. 21. Princeton Scientific Publishing Co., New Jersey.
- Christin, M. S., P. Brousseau, A. Gendron, L. Ménard, D. Marcogliese, D. Cyr, S. Ruby, M. Fournier. 2002. Effects of agricultural pesticides on the immune system of *Rana pipiens* and on their resistance parasitic infection. Accepted dans *Environmental Toxicology and Chemistry*.
- Christin, M. S., P. Brousseau, S. Ruby, D. Cyr, D. Marcogliese, L. Ménard, M. Fournier. 2002. Effects of agricultural pesticides on the immune and reproductive systems of *Xenopus laevis* and *Rana pipiens*. Soumis à *Aquatic Toxicology*.
- Dean J. H., M. J. Murray. 1990. Toxic responses of the immune system. In *Klaassen C.D., Amdur M.O., Doull J. (Eds), Toxicology: The Basic Science of Poisons, Vol 4, New York, McMillan, 282-333.*
- De Guise, S., J. Bernier, D. Martineau, P. Beland, M. Fournier. 1996. Effects of *In vitro* exposure of beluga whales (*Delphinapterus leucas*) lymphocytes to heavy metals. *Env. Tox. Chem.*, 15:1357-1364.
- De Guise, S., S. D. Shaw, J. S. Barclay, J. Brock, A. Brouwer, E. Dewailly, P. A. Fair, M. Fournier, P. Grandjean, L. J. Jr Guillette, M. E. Hahn, C. Koopman-Esseboom, R. J. Letcher, A. Matz, R. J. Norstrom, C. R. Perkins, L. Schwacke, J. U. Skaare, J. Sowles, D. J. St-Aubin, J. Stegeman, J. E. Whaley. 2001. Consensus Statement of the Atlantic Coast Contaminants Workshop. *Environmental Health Perspective*. 109: 1301-8.
- De Guise, S., D. Martineau, P. Beland, M. Fournier. 1998. Effect of *In vitro* exposure of beluga whale (*Delphinapterus leucas*) lymphocytes to selected organochlorines. *J. Tox. Env. Health*. 55:479-493.
- Dufresne, M., S. Pillet, M. Hammill, V. Lesage, Y. Payette, M. Fournier. 2002. Comparative sensitivity of lymphocytes from different species of seals to selected organochlorines and heavy metals. En Préparation.
- Escarné R., K. W. Finnsen, D. Cyr, D. Marcogliese, M. Fournier. 2002. Effects of municipal sewage effluents on immune and thyroid function of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Soumis à *Journal of Toxicology and Environmental Health*.
- Fournier, M., D. Cyr, B. Blakley, H. Boermans, P. Brousseau. 2000. Phagocytosis as a biomarker of immunotoxicity in wildlife species exposed to environmental xenobiotics. *Amer. Zoologist*. 40 :412-420.
- Fournier, M., Y. Clermont, Y. Morin, J. Pellerin, P. Brousseau, 2001. Effects of *in vivo* exposure of *Mya arenaria* to organic and inorganic mercury on phagocytic activity of hemocytes. *Toxicology*. 161(3): 201-211.
- Fournier, M., J. Pellerin, M. Lebeuf, P. Brousseau, Y. Morin, D. Cyr. 2002. Effects of exposure of *Mya arenaria* and *Mactromeris polymya* to contaminated marine sediments on phagocytic activity of hemocytes. *Aquatic Toxicology*, 59:83-92.
- Gearing, J. N., P. J. Gearing, M. Noël, J. N. Smith. 1994. Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments of the St. Lawrence Estuary. *Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci.* 1989: 58-64.
- Gendron, A. D., D. J. Marcogliese, S. Barbeau, M.-S. Christin, P. Brousseau, S. Ruby, D. Cyr, M. Fournier. 2002. Exposure of leopard frogs to a pesticide mixture increases the virulence of the lungworm *Rhabdias ranae*. Submitted to *Oecologia*.
- Gilbertson, M., G. A. Fox, W. W. Bowerman. 1998. Trends in levels and effects of persistent toxic substances in the Great Lakes. Kluwer Academic Publishers Norwell, USA, 258p.
- Koller L. D., J. H. Exon. 1985. - The rat as a model for immunotoxicity assessment. In *Dean J. H., Luster M. I., Munson A. E., Amos H. (Eds), Immunotoxicology and Immunopharmacology*. Raven Press, New York, 99-111.
- Krzystyniak, K., H. Tryphonas, M. Fournier. 1995. Evaluation of chemical-induced immunotoxicity. *Env. Health Perspect.* 103:17-22
- Lacroix, A., M. Fournier, M. Lebeuf, J. J. Nagler, G. D. Cyr. 2001. Phagocytic response of macrophages from the pronephros of American plaice (*Hypoglossoides platessoides*) exposed to contaminated sediments from Baie des Anglais, Quebec. *Chemosphere* 45(4):599-607.
- Lalancette A., Y. Morin, L. Measures, M. Fortier, P. Brousseau, M. Fournier. 2002. Contrasting changes of sensitivity by lymphocytes and neutrophils to mercury in developing grey seals. En Révision dans *Developmental and Comparative Immunology*.
- Lebeuf, M., C. Gobeil, Y. Clermont, C. Brochu, S. Moore. 1995. Non-ortho chlorobiphenyls in fish and sediments of the Estuary and gulf of St. Lawrence. *Organohalogen Comp.* 25:421-426.
- Lee, K., J. J. Nagler, M. Fournier, M. Lebeuf, D. G. Cyr. 1999. Toxicological characterization of sediments from Baie des Anglais on the St. Lawrence Estuary. *Chemosphere* 39(6):1019-1035.
- Marcogliese, D. J., M. Fournier, D. Cyr. 2001. Nonspecific immune response associated with infections of lymphocystis disease virus in American plaice (*Hippoglossoides platessoides*). *Journal of Fish Diseases*. 24:121-124.
- Ménard, L., R. Escarné, D. Cyr, D. Marcogliese, M. Fournier. 2002. Assessment of municipal effluent in proximity of Montreal island on immunological function in the spottail shiner (*Notropis hudsonius*). Submitted to *Journal of Toxicology and Environmental Health*.
- Pillet, S., V. Lesage, M. Hammill, D. Cyr, L. Bouquegneau, M. Fournier. 2000. *In vitro* exposure of seal peripheral blood leukocytes to different metals reveal a sex-dependent effect of zinc on phagocytic activity. *Mar. Poll. Bull.* 40(11): 921-927.
- Pillet, S., M. Fournier, L. Measures, J. M. Bouquegneau, D. G. Cyr. 2002. Metallothioneins in human and grey seals peripheral blood leukocytes and their possible roles in heavy metals immunotoxicity. En Révision dans *Toxicology and Applied pharmacology*.
- Sanchez-Dardon, J., I. Voccia, A. Hontela, S. Chilmonczyk, M. Dunier, H. Boermans, B. Blakley, M. Fournier, 1999. Immunomodulation by heavy metals tested individually or in mixtures in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* exposed *in vivo*. *Env. Tox. Chem.*, 18(7): 1492-1497.
- Sauvé, S., P. Brousseau, J. Pellerin, Y. Morin, P. Gougreau, L. Sénécal, M. Fournier. 2002a. *In vitro* Exposure of Hemocytes To Metals (Ag, Cd, Hg, and Zn). *Aquatic Toxicology*, 58:189-200.
- Sauvé, S., M., Hendawi, P. Brousseau, M. Fournier. 2002b. Phagocytic activity of coelomocytes from terrestrial and aquatic invertebrates following *in vitro* exposure to trace elements. *Ecotox. Env. Safety*, 52: 21-9.
- Sauvé, S., P. Brousseau, J. Pellerin, Y. Morin, L. Sénécal, P. Goudreau, M. Fournier, 2002c. Phagocytic activity of marine and freshwater bivalves: *in vitro* exposure of hemocytes to metals (Ag, Cd, Hg and Zn). *Aquatic Toxicology*: 58:189-200.
- Sauvé, S., M. Fournier, 2002d. Age-specific immunocompetence of earthworm *Eisenia feittida* (Annelida: olichaeta): Exposure to methyl mercury chloride. Submitted to *Soil Biology Biochemistry*
- Wong S., M. Fournier, D. Coderre, W. Banska, K. Krzystyniak. 1992. - Environmental immunotoxicology. In *Peakall D. (Eds), Animal Biomarkers as Pollution Indicators*. Chapman and Hall, London, 167-189.

Evaluation of short-term transport conditions on stress response of cultivated blue mussels (*Mytilus* spp.)

Harding, J.¹, C. Couturier¹, G.-J. Parsons¹, N.-W. Ross²

1. Fisheries and Marine Institute, Memorial University of Newfoundland, St. John's, Newfoundland

2. National Research Council – Institute for Marine Biosciences, Halifax, Nova Scotia

Abstract

The stress responses to that transport, short-term dry holding, and reimmersion (short-term wet holding) were evaluated on cultured blue mussels (*Mytilus* spp.). The results showed that a 30 h transport in coolers equipped only with ice packs, followed by a 42 h reimmersion period induced little change in mussel stress response. Stress response levels as measured by the Neutral Red Retention (NRR) assay were not significantly different from the initial sampling compared with the final sampling at 72 h post harvesting. In general, short-term transport conditions, coupled with short-term reimmersion do not alter the quality of mussels and do not introduce additional sources of stress in cultured mussels.

Introduction

Due to the coastal and rural setting of many mussel aquaculture sites, the transport of the cultured product to markets can often involve extended air exposure, dry holding of the mussels in transport containers, and potential excessive shaking and clashing of mussels due to mishandling of the containers and possible road conditions. Based on previous studies, air exposure, processing activities and storage conditions have all been found to reduce lysosomal stability, affect overall quality, and reduce shelf life of mussels (Dare 1974; Moore, 1976; Slabyj and Hinkle, 1976; Boyd and Wilson, 1978; Slabyj, 1980; Brooks and Harvie, 1981; Prochazka and Griffiths, 1991; Eertman *et al.* 1993; Harding 2003). To assist the mussel culture industry, we were interested in determining the impact of transportation and dry holding for a 30-hour period had on mussels, and how a 42-hour reimmersion period in seawater could change or improve mussel quality following such conditions. A secondary objective was to determine the impact of short-term transportation on mussel stress response and the subsequent use of mussels in experimental studies. The neutral red retention assay was used as a measure of lysosomal destabilization, the lysosome having been reported by Moore (1985) as the site of earliest detectable change in marine organisms due to a stress event.

Materials and Methods

Animals and experimental design

This experiment was designed to evaluate the Neutral Red Retention assay (NRR) in assessing stress response in mussel hemocyte lysosomes. Stress response was assessed following a 30 h transport period to the laboratory, and a subsequent 42 h recovery period in seawater raceways in the laboratory; all prior to any further experimental use of the mussels. Unprocessed mussels (shell length of >50 mm) were obtained from a growout site (Charles Arm, Notre Dame Bay, Newfoundland 49.34 N, 55.28 W), in the prespawning period (June 2002) and kept in a cooler with ice packs during a 30 h transport to the laboratory (Marine Institute), where they were reimmersed in aerated, un-

filtered ambient seawater (temperature and salinity) for a further 42 h. Samples (n = 10 mussels) were taken at harvest (T = 0), and thereafter at hours 3, 6, 16, 30, 42, and 72 following harvest period for the NRR assay.

Sampling procedures

The NRR assay was performed using the method of Lowe *et al.* (1995) with minor modifications. Poly-L-lysine and neutral red stock solution volumes were doubled from 10 mL to 20 mL. The neutral red retention (NRR) of 25 cells per animal (n=10) was observed at the 15 min point of incubation with neutral red. The number of cells displaying little or no stress response characteristics (unstressed cells) was recorded for each mussel.

Data analyses

Data were analysed using a one-way analysis of variance (ANOVA). Significant differences among treatments were identified using Tukey's b multiple comparison test. The level of significance was set at $\alpha=0,05$

Results

There was a significant difference in the number of unstressed cells throughout the transport and laboratory holding times but there was no consistent pattern (one-way ANOVA; $F(6,62)=3,574$, $p=0,005$) (figure 1). There was no difference in NRR from the beginning of the 72 h period, when the mussels were removed from the growout site, to the time at the end of the holding period, which was prior to mussels being used in any subsequent experimental trials, as the number of unstressed cells at hours 0 and 72 were the same (Tukey's b, $p > 0,05$) (Figure 1).

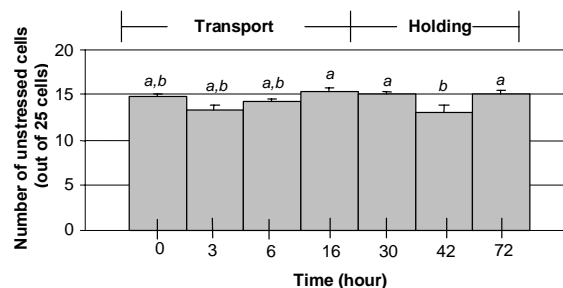


Figure 1 : Progression of neutral red retention in lysosomes of *Mytilus* spp. exposed to initial transport and laboratory holding conditions. Mussels were held on ice for the first 30 hours and were then placed in ambient seawater (6°C, 29 ppt) in holding tanks for the remainder of the period. Bars represent the mean number of unstressed cells (out of 25 cells) + S.E., n = 10 animals. Common letters denote no significant difference among treatments (Tukey's b, $p > 0,05$).

Discussion

The initial transport and dry holding of mussels from the field to the laboratory, and reimmersion in the laboratory in seawater raceways, prior to experimental use, showed no consistent change in stress response in mussels. This was not surprising given that the mussels were kept in a cooler with ice (ice packs) during transport, and that the animals were kept out of water for only a brief period. Similar dry storage conditions have shown no detrimental effects on mussels in other studies (Boyd and Wilson, 1978; Prochazka and Griffiths, 1991). As well, a reimmersion period of 42 h was used to facilitate post-transportation recovery, which has also been shown to improve to mussel condition in earlier studies (Slabyj and Hinkle, 1976; Slabyj, 1980; Prochazka and Griffiths, 1991). Thus, it was concluded that the collection, short-term transportation and dry holding, and short-term reimmersion of mussels in the laboratory for short periods of time did not cause any observable stress response. Thus, the mussels could be considered non-stressed due to short-term transportation and holding prior to subsequent experimental manipulations. However, Bayne and Thompson (1970) showed that holding mussels a few weeks in the laboratory in unfed conditions could affect condition indices and physiological function. This was consistent with our observations when we examined wet storage of mussels over a twelve-day period and found stress response (decreased NRR) increased (Harding, 2003). It is possible that extended holding of mussels in the laboratory prior to experimental use would have affected the initial stress response, and thus the overall experimental results. However, minimizing the pre-experimental holding conditions for three to four days is unlikely to be of concern.

Acknowledgements

We would like to thank AquaNet, the Canadian Network Centre of Excellence for Aquaculture for partial funding of this project, Memorial University School of Graduate Studies, Marine Institute of Memorial University, Canadian Centre for Fisheries Innovation, National Research Council – Institute for Marine Biosciences and to the staff and management of Black Gold Inc.

Also we would like to thank the organizers of the Stress Indicators Workshop for the invitation to participate.

References

- Boyd, N. S., N. D. C. Wilson. 1978. Handling and processing of raft-cultured mussels. Symposium on fish utilisation technology and marketing in the Indo-Pacific Fishery Commission Region. Food and Agriculture Organisation of the United Nations, Rome. 1978 IPFC/78/SYMP/52.
- Brooks, J. D., R. E. Harvie. 1981. Quality changes during storage of the green-lipped mussel, *Perna canaliculus*. Food Technology in Australia 33(10):490–495.
- Dare, P. J. 1974. Damage caused to mussels (*Mytilus edulis* L.) by dredging and mechanized sorting. Journal du Conseil. Conseil International pour l'Exploration de la Mer 35(3):296–299.
- Eertman, R. H. M., A. J. Wagenvoort, H. Hummel, A. C. Smaal. 1993. "Survival in air" of the blue mussel *Mytilus edulis* L. as a sensitive response to pollution-induced environmental stress. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 170:179–195.
- Harding, J. M. 2003. Evaluation of the neutral red assay as a stress response indicator in mussels (*Mytilus* spp.) in relation to seasonal, environmental, handling, harvesting, processing, and post-harvest storage conditions. M.Sc. Thesis, Memorial University, St. John's, Newfoundland. 94p.
- Lowe, D. M., V. U. Fossato, M. H. Depledge. 1995. Contaminant-induced lysosomal membrane damage in blood cells of mussels *Mytilus galloprovincialis* from Venice Lagoon: an *in vitro* study. Marine Ecology Progress Series 129:189-196.
- Moore, M. N. 1976. Cytochemical demonstration of latency of lysosomal hydrolases in digestive cells of the common mussel, *Mytilus edulis*, and changes induced by thermal stress. Cell and Tissue Research 175:279-287.
- Moore, M. N. 1985. Cellular responses to pollutants. Marine Pollution Bulletin 16:134-139.
- Prochazka, K., C. L. Griffiths. 1991. Factors affecting the shelf life of live cultured mussels. Journal of Shellfish Research 10(1):23-28.
- Slabyj, B. M. 1980. Storage and processing of mussels. pp. 247-262. In: Mussel Culture and Harvest: A North American Perspective, (R.A. Lutz, ed.). Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam – Oxford – New York.
- Slabyj, B. M., C. Hinkle. 1976. Handling and storage of blue mussels in shell. Research in the Life Sciences 23(4):1-13.

Marqueurs biochimiques chez la moule : aperçu des méthodes développées dans le cadre du programme européen BEEP (Biological Evaluation of Environmental Pollution)

Narbonne, J.-F., P. Carrigues

LPTC, UMR CNRS 5472, Université de Bordeaux, France

PRÉSENTATION POWERPOINT





Aperçu des méthodes développées dans le cadre du Programme Européen BEEP
(Biological Evaluation of Environmental Pollution)

J.F. Narbonne et P. Garrigues

LPTC, UMR CNRS 5472, Université Bordeaux I,


Specific objectives of the BEEP project

- Develop new biological markers ranging over different levels of biological organization
- Validate the use of selected biomarkers in specific sites for both routine assessment of chemical contamination and for the improvement of national and international monitoring programmes
- Validate a methodology for the biomarker exploration in ecological risk assessment
- Prepare information and advices for user group policy-makers and fishery institutions about biological effects of chemical contamination on coastal marine resources
- Establish a network of biomarkers researchers through European countries



BEEP programme is organized into workpackages


- **Novel Biomarkers (WP1):** Development of new biomarkers of stress/exposure at both the cellular levels and subsequent effects at the population level
- **Biomonitoring programmes in Baltic Sea (WP 2), Mediterranean Sea (WP 3) and North Atlantic Sea (WP 4):** Selected sites in each coastal environment will be monitored during three years for deploying a set of 5 common biomarkers for all the workpackages. In addition other specific biomarkers will be also studied for in situ validation.
- **Data Management (WP 5):** A data base will be built and a statistical approach will be carried out on all the data collected during the project. Data handling will provide a classification scale of environmental pollution for the assessment of pollution level
- **Project Management (WP 0):** Coordination of WPs, communication between participants, exploitation of the results and production of deliverables



LIST OF PARTICIPANTS

Project coordinator: Dr. P. Garrigues


- University Bordeaux I France
- University Alessandria Italy
- FIMR Helsinki Finland
- IFREMER DEL Nantes France
- Roagland Research, Stavanger Norway
- PML, Plymouth United Kingdom
- University Bilbao, Spain
- NCMR, Athens Greece
- University Thessaloniki, Greece
- University Le Havre, France
- CSIC Barcelona Spain
- University Brest, France
- CTIS Rilleux la Pape, France
- Technische Universität Berlin, Germany
- IPMR, Hamburg Germany
- University Göteborg Sweden
- Institute of Ecology Vilnius Lithuania
- Inst. Applied Envir. Research, Stockholm Sweden
- University Trondheim Norway
- University Reading, UK
- INRA Antibes, France
- IMR Warnemünde, Rostock, Germany
- FRI Helsinki, Finland
- Institut für Fischerökologie, Cuxhaven Germany
- Institute of Oceanography Sopot Poland
- University of Gdansk, Poland
- Tel Aviv University Israel
- Ins. of Applied Ecology Neu Broderstorf, Germany
- NCI, Genova Italy
- PERC, Plymouth United Kingdom



CORE BIOMARKERS

	FISH	MUSSEL
AChE §	*	*
Lysosomal stability §	*	*
EROD/BPH §	*	*
MTs §	*	*
Micronuclei	*	*
DNA adducts	*	*
DNA damage	*	*
CYP 1A1	*	*
Bile FACs §	*	*
MDR		*
Hormonal shift+VTG	*	
GST		*
CAT/MDA		*

§ Yet accepted by the CIESM



NOVEL BIOMARKERS WP1

	FISH	MUSSEL
Peroxisome		*
MDR		*
Hormonal shift	*	*
Embryo sex ratio	*	*
Reproductive success	*	*
Signal transduction	*	*
Mitochondrial activity	*	*
Genotoxic risk assessment	*	
Molecular probes	*	*
Gonadal alterations	*	*
Apoptosis	*	
Sperm mobility/physiology	*	*
Aromatase / Testosterone	*	*
Oxydative stress	*	*
VTG / VTG like	*	*

BIOLOGICAL MARKERS DEVELOPED IN THE THREE SUBREGIONAL SITES

	FISH	MUSSEL
Micronuclei	WP 2-3	WP 2-3
DNA adducts	WP 2-3-4	WP 2-3-4
DNA damage (Comet, SSBS)	WP 2	WP 3-4
CYP 1A1	WP 2-4	WP 2-3
BPH	*	WP 3
MDR		WP 3
VTG	WP 2-3-4	*
GST	WP 2	WP 2-3-4
CAT / MDA	WP 2	WP 3-4
Reproductive success	WP 2-4	
Macrophage activity	WP 2	WP 3-4
Neutral lipid accumulation	WP 2-4	WP 2-3-4
8-oxo-DG		WP 3-4
Zonal RP	WP 4	
Peroxisome	WP 3	WP 3

RESEARCH DEVELOPMENT ON NOVEL BIOMARKERS (WP1)

METHOD	ISSUES ADDRESSED	BIOLOGICAL SIGNIFICANCE
Hormonal shift	Wide variety of pollutants affecting the endocrinological system	Index of stress and indication of alteration of organism reproductive performance (sex hormones)
Gonad alterations	Wide variety of pollutants	Index of stress and indication of alteration of organism reproductive performance
Aromatase/Testosterone	Wide variety of pollutants and in particular organic aromatic xenobiotics	Index of exposure indicating alteration in hormonal metabolism related to alteration of organism reproductive performance
Vitellogenin induction (VTG)	Pollutants able to mimic particular sex hormones or chemicals able to oxidize this protein	Index of exposure indicating alterations in organisms reproductive performance

DEVELOPING IN SITU BIOLOGICAL MARKERS IN THE THREE SUBREGIONAL SITES (REPRODUCTION MARKERS)

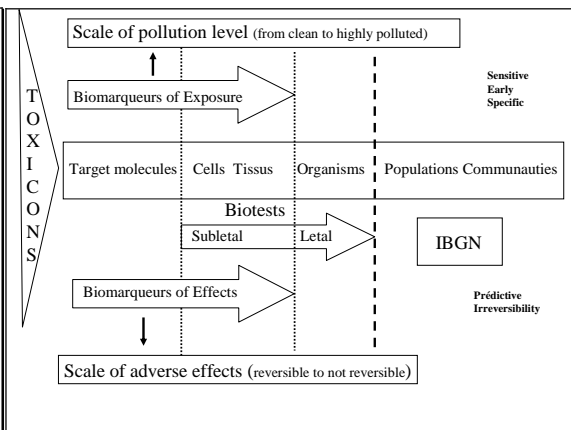
METHOD	ISSUES ADDRESSED	BIOLOGICAL SIGNIFICANCE
Vitellogenin induction (VTG) Zona Radiata Protein	Estrogenic substances	Feminization of male fish and reproductive impairment eggshell protein produced in fish liver
Aromatase/Testosterone	Hormone disruption	Inhibition of aromatase activity by TBT
Rproductive success	Wide range of contaminants	Measures reproductive output and survival of eggs and fry in relation to contaminants
Embryo sex ratio	Hormone disruption	Embryo development and survival in eelpout viviparous fish

DEVELOPING IN SITU BIOLOGICAL MARKERS IN THE THREE SUBREGIONAL SITES (GENOTOXICITY AND POP'S METABOLISM)

METHOD	ISSUES ADDRESSED	BIOLOGICAL SIGNIFICANCE
Benzo(a)pyrene hydroxylase	Induction by aromatic compounds	Index of metabolism of aromatic compounds, Exposure of the major group of phase 1 enzymes
DNA damages: -DNA strand breaks -Comet assay -8-oxo-deoxyguanosine	Induction by various chemicals and reactive oxygen species	Measure of genotoxic effect and DNA oxydation predictor of pathology
Induction of CYP 1A1	Enzyme induction by PAHs, coplanar PCBs and Dioxins	Measurement of exposure to organic contaminants
PAH metabolites in Bile	PAH exposure	Measurement of PAH exposure, bioavailability and metabolism

DEVELOPING IN SITU BIOLOGICAL MARKERS IN THE THREE SUBREGIONAL SITES (IMMUNOTOXICITY and OTHERS)

METHOD	ISSUES ADDRESSED	BIOLOGICAL SIGNIFICANCE
Multidrug xenobiotic resistance (MXR)	Organic xenobiotics	Measure of exposure Immunological mechanisms decreasing intracellular levels of xenobiotics
Immunocompetence	Wide variety of pollutants	Macrophage aggregate activity of the system Cytotoxic test: impairment of immunocompetence of hemocytes
Apoptosis	Wide variety of contaminants	Programmed cell death in liver cells
Neutral lipid accumulation	Organic xenobiotics	Abnormal fat accumulation



Parameters for Biomarker selection

- **Sentinel species:** Easily available
Widely distributed
Resistant in sampling condition
- **Biochemical parameter:**
 - *Low price (specially for biomarkers of exposure, <100 EUR, able to be performed in all countries)
 - *Relevant in terms of Exposure or Effect or Ecotox
 - *Able to be integrated in index calculations

Multimarker Approach: Exposure

Drug Metabolism MFO Phase II EROD GST BPH UDPGT CYP ST Red EH DTD	Esterases AChE Carb. E	Oxidative Stress Enzymes Damages CAT MDA GPX 8OHDG SOD Retinol Tocopherol Ascorbate GSH Ca++
--	---	--

Sensitivity
High → Low

BEEP 1 : Calculation of Pollution Index

Biomarkers	Response	Response	Confidence	Discriminatory	Discriminatory
	Factor	Range	Index	Factor	Index
AChE	3.77	63.93	26.00	3.46	2
GST G	3.44	234.24	60.80	4.85	3
GST G	8.01	1181.97	281.00	5.21	4
Catalase/MDA	13.81	201.25	79.30	3.54	2
BPH	283.50	5.85	3.40	2.72	3

	Biomarkers Pollution Index					MPI
	AChE	GST G	GST G	Catalase/MDA	BPH	
Ste Croix	4	12	4	4	12	36
La Darse	10	6	2	4	6	28
Port de Bouc	10	6	2	10	6	34
Cortiou	10	12	4	10	3	39
Porto Fino	4	6	7	4	6	27
Voltri	4	6	4	4	6	24
Genova in	10	6	4	10	3	33
Genova out	4	6	7	4	6	27
Cala Monjoy	4	6	4	10	6	30
Fangal	4	6	2	4	6	22
Los Alfaques	4	3	2	4	6	19
Barcelona	10	12	12	4	6	44

Site ranking from Biomarker Index

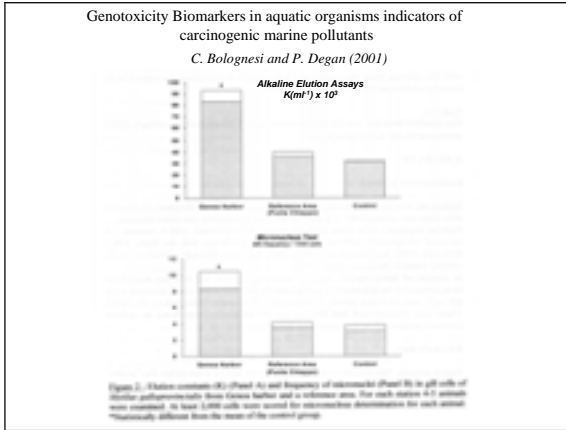
- Los Alfaques
- Fangal
- Voltri
- Portofino
- Genova out
- La Darse
- Cala Monjoy
- Genova in
- Port de Bouc
- Ste Croix
- Cortiou
- Barcelona

Biomarker and field applications 2 Maroccan Atlantic coast

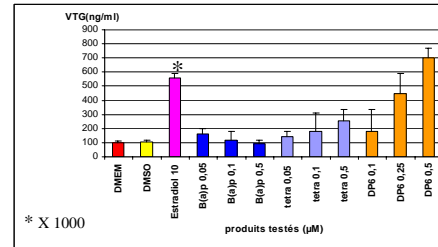
BPH activity in mussel digestive gland (Moukrin et al. 2002)

Multimarker Approach: Effects

	Genotoxicity	Reproduction	Immunity	Neurotox
Molecular	Post labelling 8OHDG Comet 3D Micronuclei SSBs UDS	Testo metabolism Hormonal Pattern ER binding	Ig Im. Phyl.	AChE Dopa (Mediators)
Function	Gene expression (RNA, Prot)	Vitellogenin ER TTR	Macrophage Heamocytes	Conduction Behaviour
Histology	Foci Tumors	Gonads Gametes Sex Ratio	Im. Tissues	



Estrogenic potency of Phenoclor DP6 and PCB congeners : In vitro Vitellogenin synthesis in rainbow trout hepatocytes



DP6 = 0.03 E2, PCB 77 = 0.005 E2,

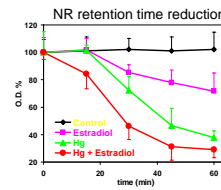
(Narbonne & al 2002)

- ✓ Data will be presented showing that different inorganic pollutants are able to promote cell signaling responses.
- ✓ These include specific, stress-activated pathways, as well as other cellular responses.
- ✓ 'Signaling disruption' can unbalance responses to extracellular signal molecules, and consequently affect the physiology of cells, tissues and organisms.
- ✓ In order to study this kind of processes we have initially considered:
 - ✓ Cell signaling components: cell calcium tyrosine kinase/MAP kinase pathway.
 - ✓ Different classes of pollutants: heavy metals: Cu^{2+} , Hg^{2+} oxidants: H_2O_2
 - ✓ Environmentally-relevant experimental models: fish cell line (RTH), mussel hemolymph cells

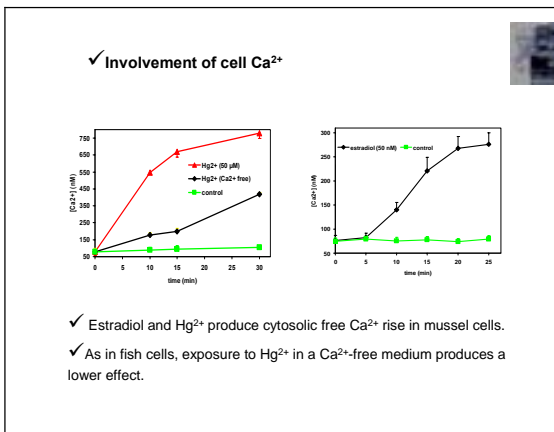


✓ **Lysosomal membrane destabilization**

✓ Lysosomes have been stained with neutral red (NR), and the dye retention time measured through digital imaging

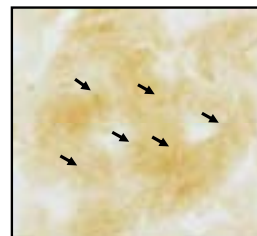


- ✓ Exposures of haemocytes to Hg^{2+} (25 µM), or to 17β-estradiol (10 nM), cause lysosome membrane destabilisation.
- ✓ Effects are additive, suggesting a common pathway.



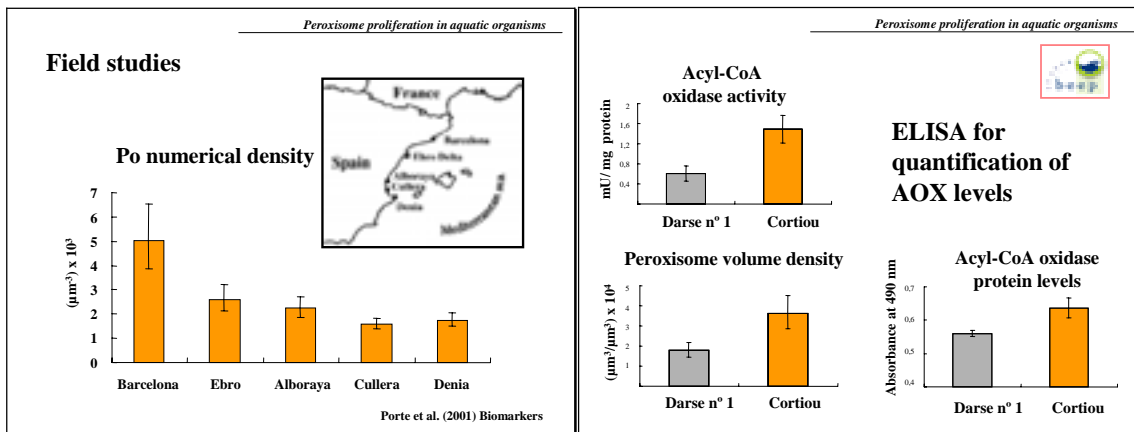
Peroxisome proliferation in aquatic organisms

Histochemical detection of catalase activity in cryostat sections of mussel digestive gland



Cajaraville et al. (1993) Histol Histopathol

- Enables quantification of:
- Catalase activity (microspectrophotometry)
 - Density of peroxisomes and related parameters (point counting stereology or image analysis)



Development of Biochemical Indicators of Stress Response for Bivalves: Recent Studies on Heat Shock Proteins and Proteases

Ross, N.-W.¹, E., Egbosimba^{1,2}, N. T. Brun^{1,2}, V. M. Bricelj¹, T. H. MacRae², J. M. Harding³, C. Couturier³, G. J. Parsons³

1. National Research Council, Institute for Marine Biosciences, Halifax, Nova Scotia

2. Department of Biology, Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia

3. Fisheries and Marine Institute of Memorial University of Newfoundland, St. John's, Newfoundland

Abstract

We are investigating new biochemical methods for assessing stress response in bivalves to assist researchers and growers in obtaining immediate information on the health status of cultured bivalves. Here we report on preliminary studies investigating the responses of mussels, hard clams and scallops to thermal shock. The first study demonstrated correlation of a known stress response indicator, neutral red retention and the release of a metalloprotease into the hemolymph following heat shock. The second study demonstrated that both cold and heat shock induced prolonged elevated levels of tissue HSP70 in scallops and hard clams.

Introduction

Traditionally, the stress response in bivalves has been monitored at the whole animal level, using time-insensitive physiological parameters such as reduced growth, inhibition of feeding and death. Recently, the use of more time-sensitive physiological and biochemical parameters has become common in stress response monitoring. Examples include use of the highly conserved heat shock proteins (HSPs) that are expressed in most organisms in response to different stressors, assay of stress induced enzymes and assessment of degree of lysosomal membrane damage using neutral red retention (NRR) assay.

In the marine environment the NRR assay is a sensitive indicator of general cellular stress response for a range of physical and chemical stressors (Lowe *et al.*, 1992). Matrix metalloproteases are important mediators of the immune response. In mammals, a metalloprotease produced by neutrophils, a 92 kDa gelatinase (MMP9) is thought to assist in the migration of neutrophils to site of tissue damage or infection to initiate the immune response (Armstrong and Jude, 2002). The role of metalloproteases in the stress response of bivalves has not previously been investigated.

The heat shock or stress protein response is involved in protecting organisms from environmentally induced damage (Sanders, 1990; Lewis *et al.*, 1999). Heat shock response has been studied in mussels (Sanders *et al.*, 1992; Smerdon *et al.*, 1995), but limited information is available for other bivalves. Cold shock response has not been previously investigated in bivalves. Cultured and wild bivalve populations in Atlantic Canada, such as the commercially important sea scallop *Placopecten magellanicus*, and the estuarine bay scallop *Argopecten irradians irradians* are often subjected to temperature fluctuations. In addition, juvenile hard clams *Mercenaria mercenaria* suffer heavy mortalities during overwintering in Atlantic Canada and the mid-Atlantic US.

The goals of the research in our laboratories are to investigate and correlate potential biochemical indicators of stress response in order to further understand stress response at the biochemical

level and to provide tools to the shellfish industry and research community for assessing culture and harvesting practices. By understanding the bivalve stress response at the biochemical level, we may be able to mitigate stressful situations and provide the animals with a chance to recover (and avoid death), and, as well to potentially allow the animals to acclimate to subsequent stressors, including those that may otherwise be lethal (e.g., acquisition of thermotolerance). Below are a couple of initial studies related to these goals.

Study 1: Correlation of neutral red retention assay with hemolymph metalloprotease levels following heat shock

Protease concentration in the cell free hemolymph was correlated with neutral red retention (NRR) assay and used to assess stress response in *Mytilus edulis* acclimatized at 5 °C and subjected to 10 °C temperature shock. NRR assay of hemocytes from animals sampled from 0 h to 24 h showed a progressive decrease in retention time up to 9 h, and a recovery to pre-stress values at about 24 h (Figure 1A). There was no significant change in the levels of HSP70 proteins for the same period. Protease profiles of cell free hemolymph sampled over the same period and analyzed by gelatin zymography, showed

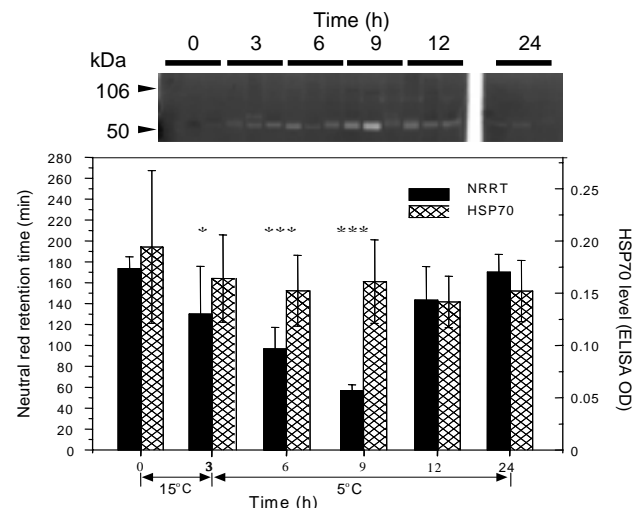


Figure 1 : Biochemical and cytological changes in cell free hemolymph and hemocytes of mussels subjected to a 3 h temperature shock. (a) Gelatin (1 %) substrate zymography on (12 % SDS-PA gel) of cell free hemolymph of control and temperature shocked *Mytilus edulis*. Triplicate samples were run for each sample point, re-natured and stained with 0,025% Coomassie Blue (Ross *et al.* 2000). (b) Changes in NRR time of corresponding hemocytes (■) and stress-70 levels (▨) in cell free hemolymph samples. *, **, ***, represent significant differences in NRR values from 0 time values of $p < 0,05$, $p < 0,01$ and $p < 0,001$, respectively (Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test). No significant differences were noted for HSP levels from 0 time values (n=6).

a progressive increase in the activity of a 55 kDa protease from non detectable levels in controls up to 9 h, and a return to control levels at about 24 h. The activity of 55 kDa protease was inhibited by 5 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) and 5mM 1, 10-phenanthroline suggesting it is a metalloprotease. The NRR time values negatively correlated ($R = -0,88$) with the levels of the cell free hemolymph metalloprotease following temperature shock.

We propose that the metalloprotease was released from hemocytes into the cell-free hemolymph following temperature shock and that levels of the cell-free hemolymph metalloprotease may be an indicator of temperature shock induced stress in mussels.

Study 2: HSP 70 response of scallops and hard clams to heat and cold shock

The objectives of the second study were to determine HSP 70 expression in mantle tissue of juvenile sea scallops (*Placopecten magellanicus*) and juvenile bay scallops (*Argopecten irradians*) in response to acute heat shock (deeper water species vs estuarine species), and to determine if acute cold shock modulated HSP 70 response in bay scallops (*A. irradians*) and hard clams (*Mercenaria mercenaria*). These preliminary experiments were conducted to test the methodology and to help plan future experiments, which are now underway.

The stress protein response (SPR) to acute heat shock was compared in the two scallop species (10 °C increase for 3 h). No differences in HSP 70 expression were observed in sea scallops, except at 21 d, when levels were significantly lower than initial, control levels. In contrast, HSP 70 levels in bay scallops increased significantly during and following heat shock, attaining a maximum by 12 h, and exceeded control levels after an 8 d recovery (figure 2). The SPR of bay scallops and hard clams to acute cold shock (17 °C decrease for 3 h) was examined to determine if this stressor also modulates HSP 70. The latter increased significantly in both bivalves, with levels still increasing after 8 d and 24 h, respectively (results not shown). Characterization of the SPR to acute temperature shock may have application in acquired thermotolerance of bivalves transferred from hatchery to field growout sites.

Future work will include examination of changes in tissue protease activities following heat and cold shock in other species in order to assess the universality of this response. As well, we plan to study the changes in metalloprotease activities in response to other environmental stressors. We will examine expression of tissue inhibitors of metalloproteases (TIMPs) in order to investigate the balance in tissues between the levels of metalloproteases and their inhibitors following stress. In collaboration with T. Landry (DFO-Moncton), we plan to investigate the role of HSPs in hard clams in order to develop strategies to mitigate overwintering mortalities.

Acknowledgements

This research has been supported in part by funds from AquaNet, the Network of Centres of Excellence for Aquaculture.

References

Armstrong, D. G., Jude, E. B. 2002. The role of matrix metalloproteinases in wound healing. *Journal American Podiatric Medical Association*, 92:12-18.

Lewis S, Handy, R. D., Cordi, B., Billinghamurst, Z., M. H. Depledge. 1999. Stress proteins (HSP'S): Methods of detection and their use as an environmental biomarker. *Ecotoxicology* 8: 351-368.

Lowe, D.M., M.N. Moore, B.M Evans. 1992. Contaminant impact on interactions of molecular probes with lysosomes in living hepatocytes from dab *Limanda limanda*. *Marine Ecology Progress Series*, 91: 135-140.

Ross, N. W., K. J. Firth, A. Wang, J. F. Burka, S. C. Johnson. 2000. Changes in hydrolytic enzyme activities of naïve Atlantic salmon *Salmo salar* skin mucus due to infection with the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* and cortisol implants. *Dis. Aquat. Org.* 41: 43-51.

Sanders, B. 1990. Stress Proteins: potential as multitered biomarkers. Pp. 165-191 in, *Biomarkers of environmental contamination*. McCarthy JF, Shugart LR (eds.). Lewis Publishers, Chelsea, MI USA.

Sanders, B. M., V.M. Pascoe, P. A. Nakagawa, L. S. Martin. 1992. Persistence of the heat-shock response over time in a common *Mytilus* mussel. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 1(2): 147-154.

Smerdon G. R., J. P. Chapple, A. J. S. Hawkins. 1995. The simultaneous immunological detection of four stress-70 protein isoforms in *Mytilus edulis*. *Mar Environ Res* 40(4): 399-407.

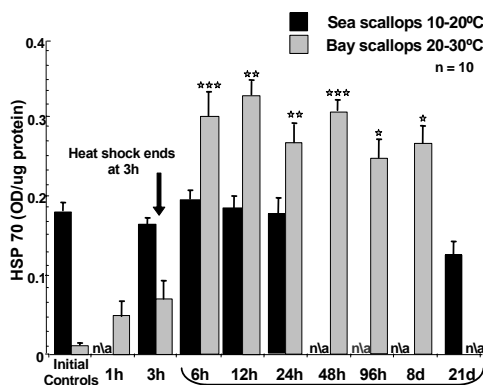


Figure 2 : HSP 70 levels in mantle tissue of sea scallops (■); Bay scallops (▒) subjected to acute heat shock (3 h). *, **, ***, represent significant differences from 0 time values of $p < 0,05$, $p < 0,01$ and $p < 0,001$, respectively (Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test). n/a data not available.

Indices de stress chez des bivalves marins. Un nouvel outil : l'indice de maturation sexuelle

Pellerin, J., S. Gauthier-Clerc, O. Assoi-Etchian, A. Siah, M. Fournier, N. Lemaire, S. Cartier

ISMER - UQAR, Rimouski, Québec

Introduction

Les indices de stress chez les bivalves marins sont nombreux et répondent à une préoccupation grandissante au sein de la communauté des chercheurs et producteurs en conchyliculture. Nous avons développé dans notre laboratoire au fil des années des signaux cellulaires et moléculaires fiables pour détecter à différents degrés les stress subis par les bivalves marins étudiés. Fidèles à l'approche multiparamétrique, utile lors des études sur le terrain et aussi pour bien détecter l'ampleur des effets des stress, ou tout simplement pour aider à l'interprétation des réponses obtenues, nous présentons ici des indications de signaux moléculaires et cellulaires qui s'apparient bien et s'utilisent avec succès chez les bivalves marins et estuariens.

Variations de croissance : Pourquoi et comment ?

Les acquis

L'observation de variations de croissance en milieu intertidal nous a conduits à étudier les mécanismes d'adaptation physiologique, explicatifs de la variabilité spatiale de la croissance et de la reproduction de bivalves marins présents en milieu estuarien froid. Cette recherche s'est avérée un champ de recherche pertinent, autant pour estimer les impacts réels de perturbateurs anthropiques que pour estimer la qualité du milieu aquatique ou marin en vue d'une exploitation d'espèces comestibles et d'importance économique. L'hypothèse de départ de ces programmes de recherche étant qu'en plus des facteurs de densité, de compétition et de prédation déjà étudiés en écologie marine, les facteurs abiotiques comme le temps d'émersion, la concentration en oxygène, la disponibilité des substances nutritives ainsi que la présence de contaminants pouvaient contribuer aux variations des réponses.

Espèces utilisées

Les espèces utilisées résultent d'intentions de développement de l'aquaculture à un haut niveau de production d'ici 2003. Dans le secteur de la mariculture, des phénomènes de mortalité massive sont observés fréquemment, laissant les producteurs démunis d'une source importante de revenus. Certains des chercheurs de notre équipe s'étaient penchés sur un phénomène similaire aux Îles-de-la-Madeleine au début des années 1990. Il s'était avéré que l'expertise conjointe des chercheurs impliqués dans le projet avait contribué à trouver la cause des mortalités de moules. Les facteurs combinés d'une densité trop forte sur les boudins de culture et des pontes successives dues à l'augmentation de la température des lagunes en août avaient conduit à une mortalité importante suite à un déficit énergétique chez les moules (Pellerin-Massicotte, 1997; Tremblay *et al.*, 1998). Nous utilisons donc depuis plusieurs années trois

bivalves différents, la moule bleue, la mye commune, et plus récemment, le pétoncle d'Islande et le pétoncle géant, pour bien comprendre les facteurs déterminants du bien-être physiologique de ces bivalves, les quatre espèces étant à fort potentiel économique pour la mariculture au Québec.

Le pétoncle d'Islande (*Chlamys islandica*) et le pétoncle géant (*Placopecten magellanicus*)

Actuellement, l'exploitation commerciale des pétoncles en eaux côtières du Québec porte sur deux espèces de pétoncle, le pétoncle géant et le pétoncle d'Islande, indistinctement chez les deux espèces. L'augmentation constante des débarquements de pétoncles de la Gaspésie et des autres zones d'exploitation s'explique par le développement de l'exploitation du pétoncle d'Islande. L'état de la ressource qu'est le pétoncle géant est préoccupant notamment en Basse-Côte-Nord car les mortalités massives observées par le passé sur certains sites de pêche rendent cette espèce très fragile à la surexploitation. Même si le pétoncle d'Islande est actuellement une ressource de remplacement, les stocks sont fragiles et la surexploitation menace la pérennité des stocks. Les experts sont d'avis que les gisements ne sont pas inépuisables (MPO, 1999).



Figure 1 : *Placopecten magellanicus*
(pétoncle géant)



Figure 2 : *Chlamys islandica*
(Pétoncle d'Islande)

La mye commune (coque ou mye des sables) (*Mya arenaria*)

L'exploitation commerciale et artisanale de mollusques constitue, dans l'estuaire du Saint-Laurent et sur la Côte-Nord en particulier, une activité importante. En effet, malgré une diminution de la qualité bactériologique des eaux ayant entraîné la fermeture de certaines zones coquillères, la cueillette récréative et commerciale des mollusques demeure une activité qui est une source de revenus non négligeable. La mye commune est de loin l'espèce la plus cueillie et la plus consommée, suivie du buccin commun et de la moule bleue. Il apparaît toutefois, au terme de l'analyse en laboratoire de mollusques prélevés dans plusieurs secteurs coquilliers, que la consommation de la mye commune constitue une source substantielle d'exposition aux microorganismes pathogènes et aux contaminants chimiques. Sur le plan de la contamination chimique, notamment, ont été détectées des concentrations mesurables pour dix-neuf contaminants, dont les BPC, plusieurs métaux lourds et composés organochlorés. À l'heure actuelle, ces contaminants ne font l'objet d'aucune tentative de détection lorsqu'on évalue la qualité des secteurs coquilliers. Il importe donc de favoriser la production et l'exploitation de cette espèce dans des secteurs dénués de risque toxicologique.



Figure 3 : *Mya arenaria* (mye commune)

La moule bleue (*Mytilus edulis*)

On trouve *M. edulis* partout dans le monde dans la plupart des eaux polaires et tempérées. En Amérique du Nord, les moules ont une répartition circumpolaire, s'étendant vers le sud dans l'Atlantique ouest jusqu'à la Caroline du Sud. Elle peut vivre dans des estuaires peu profonds et légèrement saumâtres jusque dans des milieux très profonds à forte salinité en haute mer, mais elle privilégie les baies et les estuaires qui ont un taux élevé de nutriments en raison du ruissellement, ce qui favorise un accroissement du phytoplancton. Dans la région du Golfe, les moules vivent sur les rivages rocaillieux, le long des côtes, des baies et à l'embouchure des cours d'eau, où elles se fixent à des surfaces immergées. Elle fait l'objet d'un élevage intensif partout dans le golfe du Saint-Laurent.



Figure 4 : *Mytilus edulis* (moule bleue)

Santé et croissance

L'importance écologique des bivalves benthiques est bien connue pour le maintien de la structure des communautés des zones intertidales (Desrosiers et Brêthes, 1984) et des populations servant de support à la cueillette artisanale et commerciale. Il est de plus reconnu que la croissance, la reproduction et la performance physiologique en général sont des composantes clés qui déterminent la performance écologique des populations. Compte tenu de l'hétérogénéité de la croissance et de la reproduction des bivalves dans l'étage intertidal, nous avons, au fil des années, réalisé des études à différentes échelles spatiales et temporelles et par transfert d'organismes. Nous avons pu caractériser les facteurs de stress les plus importants dans ce milieu, pour expliquer finalement la variabilité de la condition physiologique de ces bivalves (Pellerin-Massicotte, 1997).

Les travaux réalisés dans notre équipe ont établi clairement que les facteurs du milieu, propres à chaque site, tels la variation du temps d'émergence et la présence de contaminants comme le pétrole en zone intertidale, sont des facteurs majeurs pour expliquer les différents taux de croissance et, par le fait même, la santé des populations de bivalves. Nos résultats démontrent, selon les sites et les habitats, l'importance des fluctuations des paramètres physico-chimiques naturels et anthropogéniques dans l'induction des processus oxydants et de variations de la performance physiologique en général (Pellerin-Massicotte, 1994).

Il importe donc, pour une bonne gestion des sites coquilliers, de bien comprendre la dynamique de croissance des bivalves en fonction des conditions particulières des sites étudiés.

Le système endocrinien et le système reproducteur

Il existe depuis peu un urgent besoin de développer des méthodologies chez des espèces indigènes pour déceler des modulations sur le système endocrinien puisque plusieurs substances toxiques persistantes (STP) présentant des caractéristiques œstrogéniques qui peuvent remplacer les hormones stéroïdiennes sexuelles sur les récepteurs et ainsi modifier les processus de maturation sexuelle et de développement des gonades.

Nos observations récentes d'un délai de maturation sexuelle, (Gauthier-Clerc *et al.*, 2002) associé à un entreposage de glycogène et des concentrations basses de vitellogénine (figure 5), une molécule essentielle au développement des ovocytes, et ce à partir des mêmes myes, (Blaise *et al.*, 1999) nous laissent présager d'effets de perturbateurs endocriniens sur la reproduction de *Mya arenaria* dans le fjord du Saguenay. Nous disposons maintenant d'outils performants pour déceler ces dysfonctionnements, tels les dosages d'aspartate transcarbamylase (Assoi-Etchian et Pellerin, 2003), les dosages d'hormones stéroïdiennes sexuelles (Siah *et al.*, 2002, 2003) et les mesures de protéines de type vitelline (Blaise *et al.*, 1999) associées aux observations histologiques des stades de maturation sexuelle (Gauthier-Clerc *et al.*, 2002).

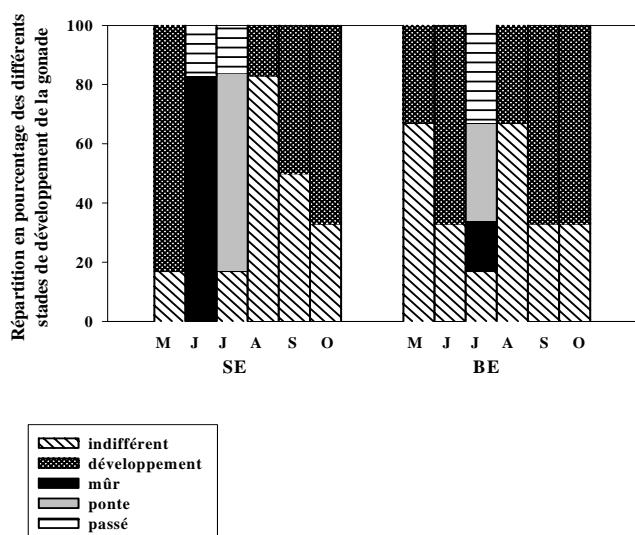


Figure 5 : Variations des stades de maturation sexuelle de *Mya arenaria* dans un site témoin du Saguenay à l'Anse Saint-Étienne (SE) et à Baie-Éternité (BE) suivant un profil saisonnier, de mai à octobre 1998. Tiré de Gauthier-Clerc *et al.* 2002.

Les processus oxydants

Les cellules des êtres aérobies en état d'oxydoréduction normal ont une concentration basale en radicaux libres de l'oxygène. On appelle stress oxydant une augmentation de radicaux libres de l'oxygène qui provoque des dommages cellulaires irréversibles tels que la peroxydation des lipides ainsi que la dénaturation oxydante des acides aminés et des bases azotées (Regoli, 2000). La peroxydation des lipides constitués d'acides gras polyinsaturés entraîne une désorganisation des structures membranaires. Les protéines qui y sont imbriquées n'y sont plus fonctionnelles et on observe la libération de pentane et d'aldéhydes qui, à fortes concentrations, s'avèrent toxiques pour la cellule. La dénaturation oxydante des acides aminés conduit à une déstabilisation des structures secondaires et tertiaires des protéines, ainsi qu'à l'inactivation des enzymes. La modification des bases azotées par les radicaux libres de l'oxygène provoque, quant à elle, un arrêt ou une aberration de l'expression du message génétique dans la cellule. Dans la majorité des cas, l'augmentation de la teneur cellulaire en radicaux libres de l'oxygène provient d'une production exagérée que les systèmes antioxydants ne sont pas capables de faire diminuer. À l'échelle des organes, si ces radicaux libres de l'oxygène sont formés en forte quantité, les dommages cellulaires vont conduire à une nécrose des tissus; par contre, si les radicaux libres de l'oxygène sont générés de façon continue mais à des concentrations modérément plus élevées que la concentration basale, il sera plus probable d'assister à une cancérisation des tissus ou à un vieillissement prématuré (Cossu *et al.*, 1997).

Une approche multiparamétrique

Le premier ensemble de mesures préconisées pour estimer les stress chez les bivalves marins comprend au plan moléculaire, la mesure du stress oxydant occasionné par la surproduction de radicaux libres de l'oxygène en réponse aux stress du milieu, dont la présence de contaminants. Les mesures des activités catalasiques et des glutathione-S-transférases sont utiles pour estimer de façon aiguë les effets des variations des facteurs du milieu (température, hydrodynamisme, concentrations en phytoplancton lorsque ces conditions sont limitantes) et constituent

un signal précoce de perturbations plus importantes telles les diminutions de réserves énergétiques et conséquemment, du processus de reproduction des bivalves. Les réponses moléculaires reliées aux processus oxydants sont corrélées aux réponses cellulaires conduisant à la déstabilisation de la membrane lysosomale, lesquelles peuvent être indicatrices de dommages physiologiques plus fonctionnels, tels une cytophagie par protéolyse et une utilisation rapide des réserves énergétiques pour contrer les effets chroniques d'un stress.

Exemples de stress oxydant en milieu marin

Chez les invertébrés, des études chez la moule méditerranéenne, *Mytilus galloprovincialis*, montrent la présence de la malondialdéhyde (MDA) dans la glande digestive, les branchies et le manteau et des concentrations importantes de glutathion dans le manteau. Il n'y aurait pas chez cette espèce de différences selon le sexe dans la distribution des molécules de défense. Les travaux de Viarengo *et al.* (1991) chez *Mytilus edulis* L. indiquent nettement que les processus de peroxydation des lipides sont plus importants chez les moules plus âgées, la GSH et la vitamine E étant présentes en concentrations moins grandes chez les moules plus âgées. Chez le pétoncle antarctique transplanté d'un site sain vers un lieu proche des décharges d'une station d'observation en Antarctique, malgré le peu de différences dans la stabilité de la membrane lysosomale, l'exposition aux effluents domestiques a entraîné des diminutions importantes des activités catalasiques et des glutathione-S-transférases. Ceci indique sans contester une perte des propriétés antioxydantes du pétoncle, contrairement à d'autres résultats qui démontraient la capacité de moules à capter le surplus de production des espèces réactives de l'oxygène, par une augmentation de l'activité catalasique (Pellerin-Massicotte, 1997). Ces résultats sur le pétoncle viennent renforcer nos observations sur la perte de la capacité immunitaire des bivalves en réponse à une exposition aux métaux (Sauvé *et al.*, 2002) et réaffirment bien la nécessité d'une approche multiparamétrique pour estimer avec justesse les effets toxiques des contaminants en milieu naturel. Ces effets peuvent être durables et mettre en danger la survie de l'organisme, voire de la population. Aux différents paramètres biochimiques et physiologiques choisis, les données de croissance et de variations des mesures pondérales viennent en support pour estimer le risque pour les populations à l'étude. Chaque biomarqueur devant être validé en milieu naturel et ses réponses basales bien comprises pour une interprétation juste. C'est dans ce sens que nous nous sommes posés la question suivante : « Les processus oxydants, en plus d'être induits par la présence de polluants, sont-ils amplifiés par les facteurs naturels comme la période d'immersion, la température, la salinité? »

De plus, chez la moule bleue, même si nous avons démontré antérieurement qu'en milieu naturel les processus oxydants sont induits par des températures plus froides (Pellerin-Massicotte, 1997), les températures chaudes estivales et les variations de salinité tout au long de l'exposition en mésocosmes n'ont pas induit de production de radicaux libres. Chez *Mya arenaria*, on observe une corrélation significative entre la réponse de la catalase et les changements de salinité et de température, autant en milieu naturel qu'en mésocosmes (figure 6).

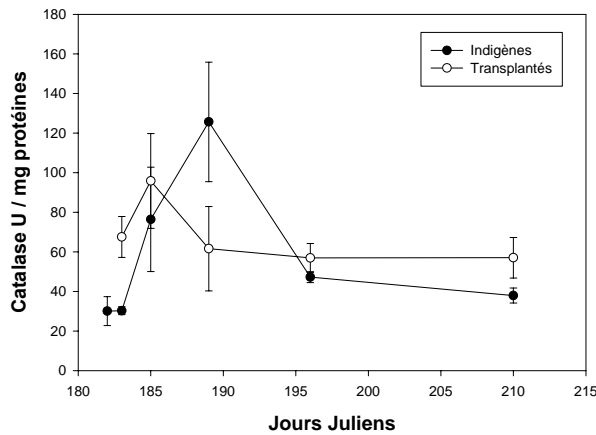


Figure 6 : Variations de la catalase chez *Mya arenaria*

La déstabilisation de la membrane lysosomale

La déstabilisation de la membrane lysosomale est un bel exemple d'un signal cellulaire d'un stress, bien corrélé avec le stress oxydatif (Regoli *et al.*, 1998), comme nous l'avons souligné ci-dessus. Les lysosomes sont des organelles cellulaires responsables d'un nombre considérable de fonctions digestives. À raison de plusieurs centaines par cellule, ils se présentent sous la forme de vésicules membraneuses contenant un stock d'enzymes hydrolytiques diverses, impliquées dans des processus de digestion de constituants intra et extracellulaires ou celle de micro-organismes préalablement phagocytés. La barrière de perméabilité représentée par la membrane lysosomale est suffisante pour empêcher ces enzymes de s'échapper dans la cellule et d'y provoquer des altérations du cytoplasme.

Réponses de la membrane lysosomale aux paramètres du milieu

La déstabilisation de la membrane lysosomale, indicatrice de stress est plus grande chez *Mytilus edulis* (L.) mais plus constante chez *Mya arenaria* et est corrélée avec le temps d'exposition à l'air lors du cycle des marées, durant lequel, le contenu protéique de la glande digestive décroît en période d'émersion alors que l'on observe une augmentation de la déstabilisation de la membrane lysosomale. Il y a alors une activité accrue des enzymes lysosomales qui sont alors libérées dans le cytoplasme et il en résulte une cytophagie par protéolyse (Tremblay et Pellerin-Massicotte, 1997).

Relations entre la disponibilité des réserves énergétiques et la régulation endocrinienne de la maturation des gonades

Mori (1969) fut l'un des premiers à montrer que la gonade des invertébrés est l'organe cible des hormones stéroïdes tout en démontrant le lien direct entre l'utilisation du glycogène et la maturation de la gonade. Il a également démontré que des réserves insuffisantes d'hydrates de carbone entraînent l'inhibition de la synthèse des hormones sexuelles chez *Crassostrea gigas*, ce qui trouble les mécanismes reproducteurs. La présence de progestérone, d'androgènes et de prostaglandines a aussi été observée dans les gonades et les reins de plusieurs bivalves dont *Mytilus edulis* (L.) (De Longcamp *et al.* 1974; Reis-Henriques *et al.* 1990). La progestérone s'élève en période de ponte en même temps que le 17 β -œstradiol et l'estrone, supportant l'hypothèse qu'elles sont impliquées dans la régulation de la maturation sexuelle.

Le rôle physiologique des stéroïdes chez les mollusques bivalves

Très peu d'études ont été effectuées pour préciser le rôle physiologique des stéroïdes chez les mollusques. Cependant, *Mytilus* sp. est l'une des espèces dont les mécanismes de la stéroïdogénèse ont été élucidés tout au moins en partie. Chez *Mya arenaria* une corrélation est observée entre les niveaux de progestérone et la maturation des gonades, particulièrement quand la mye arrive au stade mature (figure 7).

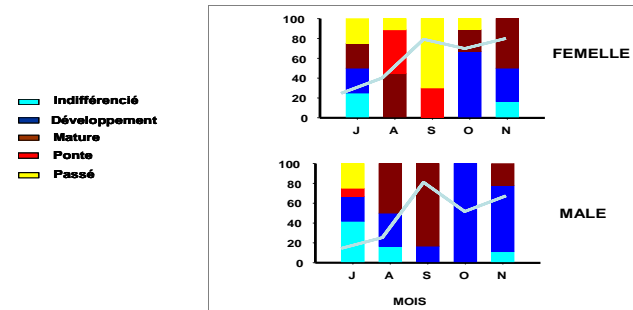


Figure 7 : Variations des niveaux de progestérone chez *Mya arenaria* mâle et femelle, en fonction de la variation saisonnière des stades de maturation gonadique.

Le potentiel de croissance

Pour estimer des dommages potentiels à l'échelle de la population, des études de la croissance des individus et de paramètres fonctionnels reliés à la reproduction sont essentiels pour en déterminer la signification physiologique. Les mesures du potentiel de croissance, intégrant les mesures d'excrétion d'azote, de respiration et d'assimilation ont été utilisées avec succès sur le terrain pour estimer la performance physiologique d'individus à différentes positions en zone intertidale et aussi en mésocosmes, lors d'une exposition de bivalves à du pétrole et à un coagulant à base de silicone (figure 8).

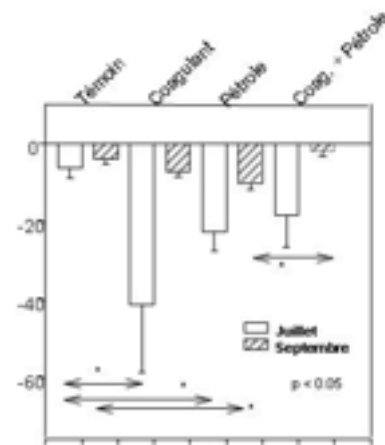


Figure 8 : Potentiel de croissance de la moule bleue. Diminution en fonction de l'exposition à des xénobiotiques.

Conclusion

Parmi ces signaux performants, l'activité de l'aspartate transcarbamylase (ATCase) s'est avérée un bon indice de l'activité gonadique lors de la reproduction, signal moléculaire que nous avons utilisé en parallèle avec les relevés histologiques de stades de maturation sexuelle, les mesures de protéines apparentées à la

vitelline et les niveaux d'hormones stéroïdes dans la gonade et s'avéreront fort utiles en mytiliculture pour expliquer les causes de mortalité massive en termes de déplétion énergétique due aux pontes successives.

Viarengo A., L. Canesi L., M. Pertica, D.R. Livingstone. 1991. Seasonal variations in the antioxidant defense systems and lipid peroxidation of the digestive gland of mussels, *Comparative Biochemistry and Physiology*, vol. 100C, no 1-2, p. 187-190.

Références

- Blaise, C., F. Gagné, J. Pellerin, P.-D. Hansen. 1999. Determination of vitellogenin-like properties in *Mya arenaria* hemolymph (Saguenay Fjord, Canada) : a potential biomarker for endocrine disruption. *Environ. Toxicol.* 14 (5), 455-465.
- Cossu, C., A. Doyotte, M.-C. Jacquin, P. Vasseur. 1997. Mécanismes de formation et effets des espèces réactives de l'oxygène, dans L. Lagadic *et al.* (ed), *Biomarqueurs en écotoxicologie*, Paris, Masson, p. 125-148.
- De Loncamp, D., P. Lubet, M. Drowski. 1974. The *in vitro* biosynthesis of steroids by the gonad of the mussel (*Mytilus edulis*), *General and Comparative Endocrinology* 22: 116-127.
- Desrosiers G., J.C. Brethes. 1984. Etude bionomique de la communauté à *Macoma balthica* de la batture de Rimouski. *Sci. Tech. Eau* 17: 25-30.
- Etchian, O.A., J. Pellerin. 2003. Characterization of aspartate transcarbamylase activity from gonads of the soft shell clam *Mya arenaria*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 134/4: 615 – 629.
- Gauthier-Clerc, S., J. Pellerin, C. Blaise, F. Gagné. 2002. Delayed gametogenesis of *Mya arenaria* in the Saguenay fjord (Canada): a consequence of endocrine disruptors? *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology and Pharmacology* 131 (4): 457-467.
- Mori, K. 1969. Effect of steroid on oyster. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 35: 1077-1079
- Pellerin-Massicotte, J. 1997. Influence of elevated temperature and air-exposure on MDA levels and catalase activities in digestive glands of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.). *J. Rech. Océanographique* 22(3): 91-98.
- Regoli, F. 2000. Total oxyradical scavenging capacity (TOSC) in polluted and translocated mussels: a predictive biomarker of oxidative stress. *Aquat. Toxicol.* 50: 351-361.
- Regoli, F., M. Nigro, E. Orlando. 1998. Lysosomal and antioxidant responses to metals in the antarctic scallop *Adamussium colbecki*. *Aquat. Toxicol.* 40: 375-392.
- Reis-Henriques, M.A., J. Coimbra. 1990. Variations in the levels of progesterone in *Mytilus edulis* during the annual reproductive cycle, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 95A: 343-348.
- Sauvé, S., P. Brousseau, J. Pellerin, Y. Morin, L. Senécal. P. Goudreau, M. Fournier. 2002. Phagocytic activity of marine and freshwater bivalves: *in vitro* exposure of hemocytes to metals (Ag, Cd, Hg and Zn). *Aquatic Toxicology* 58 (3-4): 189 – 200.
- Siah, A., A. Benosman, J. Pellerin, J.-P. Gagné, J.-C. Amiard. 2002. Seasonal gonad progesterone pattern in the soft-shell clam *Mya arenaria*. *Comparative Biochemistry and Physiology- Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 132 (2): 499-511.
- Siah, A., J. Pellerin, J.C. Amiard, E. Pelletier, L. Viglino. 2003. Delayed gametogenesis and progesterone levels in soft-shell clams (*Mya arenaria*) in relation to in situ contamination to organotins and heavy metals in the St Lawrence River (Canada). *Comp. Biochem. Physiol.* 135/2 (C) : 145-156.
- Tremblay, R., J. Pellerin-Massicotte. 1997. Effects of the tidal cycle on lysosomal membrane stability in the digestive gland of *Mya arenaria* and *Mytilus edulis* L.. *Comp. Biochem. & Physiol.* 117A (1) : 99-104.
- Tremblay, R., B. Myrand, J.-M. Sévigny, P. Blier, H. Guderley. 1998. Bioenergetic and genetic parameters in relation to susceptibility of blue mussels, *Mytilus edulis* (L.) to summer mortality. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 221: 27–58.

Morest (étude des mortalités estivales de l'huître creuse *Crassostrea gigas*) : synthèse des résultats fin 2002

J. F. Samain *et al.*

Ifremer, Laboratoire de physiologie des Invertébrés, Brest-Plouzané, France

Le défi Morest a été initié par l'Ifremer en 2001 sous forme d'un projet pluridisciplinaire entre des équipes du Département des Ressources Aquacoles (RA) de la Direction des Ressources Vivantes (DRV), et celles de plusieurs Instituts de recherches (Centre National de la Recherche Scientifique, Muséum National d'Histoire Naturelle), d'Universités, de structures régionales ou départementales de développement aquacole et en relation avec la profession.

Il est devenu un « défi » de l'Ifremer en 2002, par la priorité qui a été donnée à son objectif et par son extension à la Direction de l'Environnement Littoral (DEL), la Direction de la Technologie Marine et des Systèmes d'Information (TMSI) de l'Ifremer, et à d'autres partenaires universitaires.

Objectif

L'objectif de ce défi est de comprendre le phénomène des mortalités estivales rapporté dans la littérature internationale depuis une cinquantaine d'années pour les principales zones de production de l'huître *C.gigas* dans le monde. Ces mortalités, qui peuvent affecter de 30 à 60 % des huîtres de certains élevages, touchent principalement les animaux dans leurs deux premières années, principalement dans les eaux riches en phytoplancton. Elles sont devenues une préoccupation majeure de la profession ostréicole en France depuis les années 1995.

Malgré les recherches de nombreux experts internationaux en pathologie, il n'a pas été possible de démontrer l'existence d'une pathologie stricte. Ceci laisse présumer l'existence d'un mécanisme probable d'interactions complexes entre l'environnement, l'huître et des pathogènes opportunistes. Seul un projet « horizontal », c'est à dire faisant intervenir de nombreuses disciplines pouvait donc répondre à la complexité de ce problème. Le défi Morest est la concrétisation de cette organisation de recherche coopérative entre des spécialistes en génétique, physiologie, immunologie, pathologie, écotoxicologie, écologie côtière et environnement.

Suite au premier séminaire tenu en 2001 à Nantes, le second séminaire annuel de travail a réuni 70 participants du 13 au 15 novembre 2002 au centre Ifremer de Brest. Cette étape d'échanges de résultats et de concertation a permis de faire le bilan des études engagées au regard des hypothèses de travail formulées en 2001, puis à recadrer la programmation des étapes pour les années suivantes.

Les résultats

Effet génétique

Dès l'exercice 2001, des avancées importantes avaient été réalisées, permettant de montrer que la mortalité estivale affectait aussi bien le naissain sauvage que le naissain d'écloserie, répondant ainsi à une première question des producteurs. De plus, il mettait en évidence un fort effet génétique. Certaines familles de demi-frères résistaient mieux que d'autres, quels

que soient les écosystèmes testés (3 sites ateliers : Marennes, Bretagne Sud, Baie des Veys), sans aucune relation avec les performances de croissance. Cependant, une composante environnementale, dépendant de l'écosystème, était associée à l'intensité de mortalité. Le phénomène ne semblait se déclencher qu'au-dessus de 19°C et à un stade de reproduction particulièrement sensible : la préonte. Parmi de nombreux isolats bactériens ou viraux issus d'animaux affectés, aucun ne permettait de reproduire une mortalité.

L'exercice 2002 a permis de confirmer la très forte héritabilité du caractère « résistance » ou « sensibilité » par sélection divergente (croisements entre bonnes familles ou entre mauvaises familles) et croisements en consanguinité (croisements entre frères et sœurs). L'absence de corrélation génétique entre croissance et survie a également été confirmée. Parallèlement, des huîtres triploïdes issues de croisements entre diploïdes et tétraploïdes sont également résistantes. Ces résultats ouvrent une première voie possible pour résoudre le problème posé. Elle devra cependant être confortée en 2003.

Nutrition et reproduction

Un autre résultat important est la démonstration expérimentale de l'impact de niveaux de nourriture élevés sur l'effort de reproduction et sur la sensibilité accrue qui en résulte, notamment lors d'infections expérimentales par injection. Les réponses du système immunitaire sont à l'étude. Ce résultat est remarquablement complémentaire d'une différence très marquée observée en 2002 dans la stratégie de reproduction entre les familles d'huîtres sélectionnées en 2001 comme « sensibles » ou « résistantes ». Les huîtres résistantes, pour de mêmes conditions de nourriture, investissent moins dans la reproduction et pondent plus facilement, contrairement aux autres. Ce deuxième ensemble de résultats ouvre une seconde sortie de crise déjà empiriquement exploitée au Japon, consistant à déplacer les huîtres dans des zones moins riches pendant la période de température supérieure à 19°C. Il en résulte un plus faible effort de reproduction et, en conséquence, une moindre fragilité. Un premier essai, réalisé en Normandie, semble confirmer cette hypothèse. L'effet de ce transfert sur la croissance sera évalué en 2003. Ce résultat expliquerait la meilleure survie des huîtres triploïdes qui sont stériles.

L'environnement local joue aussi un rôle important dans le phénomène des mortalités estivales. Ainsi, à titre d'exemple, sur estran, la mortalité des huîtres élevées à proximité du sédiment est environ 30 % supérieure à celle des huîtres qui sont sur tables. Dans cette situation, l'activité immunitaire des huîtres semble « déficiente » durant la période de reproduction alors que ce n'est pas le cas des huîtres triploïdes (qui ne se reproduisent pas). Ce résultat est à confirmer par d'autres études en 2003.

Pathogènes

Plusieurs *Vibrio* septicémiques ont été isolés chez les huîtres bâillantes (moribondes) collectées lors d'épisodes de mortalités.

Les techniques de biologie moléculaire ont permis de réaliser de très grands progrès dans l'identification de ces bactéries. Plusieurs souches différentes ont été identifiées. Elles appartiennent à plusieurs espèces relativement proches mais qui n'ont pas la même virulence. Une méthode d'estimation de la virulence de ces différentes bactéries a été mise au point par injection aux huîtres. Une température égale ou supérieure à 19°C et le stade de reproduction accentuent leur pathogénicité. Ces résultats démontrent le caractère opportuniste de ces bactéries.

Un mécanisme de communication remarquable a été mis en évidence entre bactéries. Il se traduit par une augmentation de leur pathogénicité quand certaines souches sont associées deux à deux.

Enfin, la recherche systématique du virus *Herpes* se poursuit sans pour autant que sa présence n'explique toutes les mortalités. L'amélioration des techniques de détection va permettre de continuer d'étudier son rôle, seul ou en synergie avec les infections bactériennes.

Les projets à venir

Les expérimentations concernant la sélection de familles résistantes (et sensibles) aux mortalités estivales et le lien avec leur stratégie de reproduction vont être poursuivies. Le testage de triploïdes issus de croisements entre géniteurs diploïdes et tétraploïdes résistants est envisagé.

Concernant les bactéries, les méthodes d'injections sont bonnes pour tester la virulence des souches, mais cette méthode qui permet de franchir artificiellement des barrières naturelles de l'hôte ne peut servir de modèle d'infection expérimentale. L'induction directe d'une mortalité par les pathogènes opportunistes n'est pas encore possible par leur simple mise en contact avec des huîtres (baignade). Ce résultat conforte les hypothèses formulées au départ, ainsi que plusieurs observations expérimentales selon lesquelles un stress environnemental supplémentaire serait probablement nécessaire pour achever d'affaiblir suffisamment les défenses immunitaires de l'huître: stress naturel (dessalure, oxygène, etc.) ou anthropique: (manipulations des cheptels, polluants à des doses sub-létales, etc.). Ceci va donc être repris expérimentalement et conforté par les observations sur le terrain où de nombreux stress peuvent être générés.

C'est pourquoi dès 2002, un volet concernant l'environnement a été initié avec la Direction de l'Environnement Littoral (DEL). Il sera poursuivi en 2003 avec les services de l'État des différents bassins versants de façon à réaliser une analyse épidémiologique environnementale en confrontant des séries de données historiques des différents réseaux d'observation environnementaux avec les observations de mortalités disponibles. Cette analyse sera complétée par une analyse de l'effet des pratiques culturelles.

Des outils de suivi de l'environnement des écosystèmes conchylicoles seront mis au point pour compléter les informations manquantes. L'adaptation de modèles hydrodynamiques à deux et à trois dimensions est programmée. Elle permettra de simuler l'effet de scénarios climatiques sur la dispersion de polluants issus de bassins versants, ou de simuler la production primaire, avec couplage à l'effort de reproduction.

Dans la logique des résultats acquis, les projets 2003 vont tenter de comprendre, à partir des familles sélectionnées comme sensibles et résistantes, quelle est l'origine de leur fragilité biologique et quels sont les facteurs les plus déterminants. En particulier, on ajoutera au modèle d'interactions l'effet des stress (par des expérimentations contrôlées) afin de les hiérarchiser, de reproduire expérimentalement le phénomène et d'avancer dans la recherche d'autres explications et solutions.

The relationship between glycogen, water temperature and post harvest mortality in *Mytilus edulis*

Landry, T. ¹, J. Davidson¹, S. Burton², A. Mackenzie²

1. Centre des Pêches du Golfe, MPO, Moncton, Nouveau-Brunswick

2. Atlantic Veterinary College, University of Prince Edward Island, Charlottetown, Prince Edward Island

PRÉSENTATION POWER POINT

<h3>Post Harvest Mortality and Glycogen Levels in <i>Mytilus edulis</i></h3> <p>Thomas Landry Jeff Davidson Shelley Burton Allan Mackenzie</p>	<h3>Objectives</h3> <ul style="list-style-type: none"> • Determine if mussel glycogen levels differ due to location on the mussel sock • Relate post harvest mortality to glycogen level, condition index and water temperature at the time of harvest • Describe post harvest glycogen levels and relate it to post harvest mortality
--	---

<h3>Method and Materials</h3> <ul style="list-style-type: none"> • Measurements <ul style="list-style-type: none"> – Glycogen: whole body in mg/g – CI: dry weight/(dry weight + shell weight) X 100 at the time of harvest – Temperature: degrees C at the time of harvest 	<h3>Glycogen and Location on Sock</h3> <ul style="list-style-type: none"> • An individual sock from St. Peter's Bay was sampled • Sampling: <ul style="list-style-type: none"> – 0.3 m from top of sock on the outside of sock – 0.3 m from top of sock on the inside of sock – 1.0 m from the top of sock on the outside of sock – 1.0 m from the top of sock on the inside of the sock • N = 5 for all groups
--	---

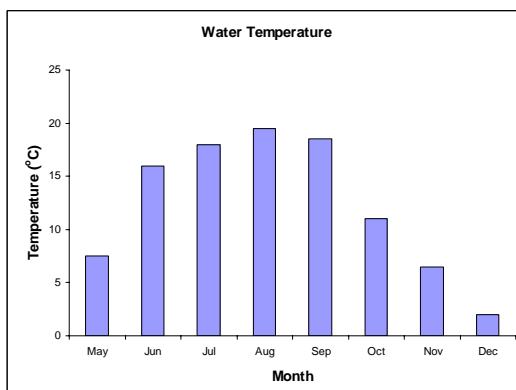
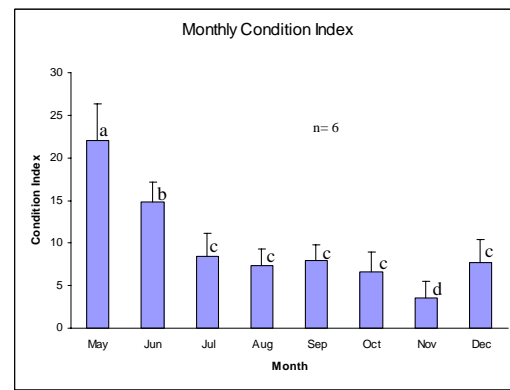
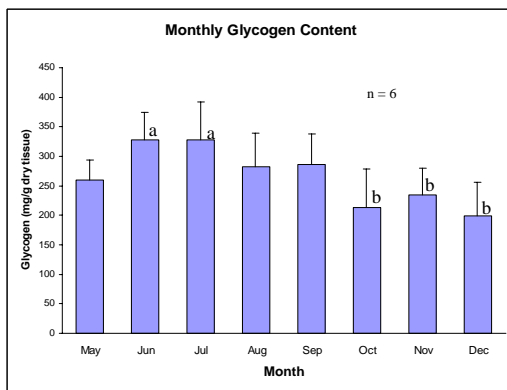
<h3>Glycogen and Location on Sock</h3> <p>n = 5</p> <p>No statistically significant differences May be due to lack of power</p>	<h3>Glycogen and Location on Sock</h3> <p>n = 10</p> <p>a, b Statistically significant difference p = .025</p>
---	--

Temporal Glycogen, CI and Temperature

- Eight mussel socks in consecutive order on a longline were harvested on the following dates:
 - May 17 May sampling
 - June 11 June sampling
 - July 9 July sampling
 - August 5 August sampling
 - September 4 September sampling
 - October 1 October sampling
 - October 29 November sampling
 - November 26 December sampling

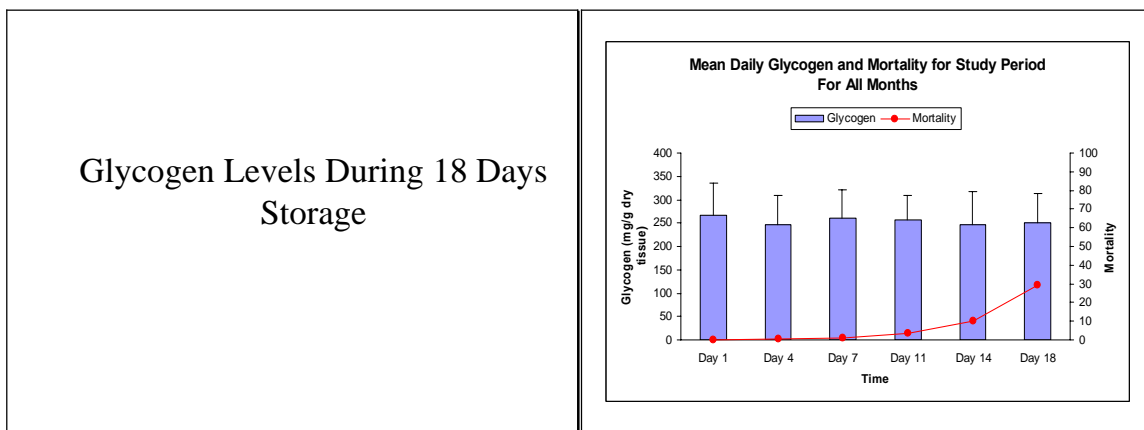
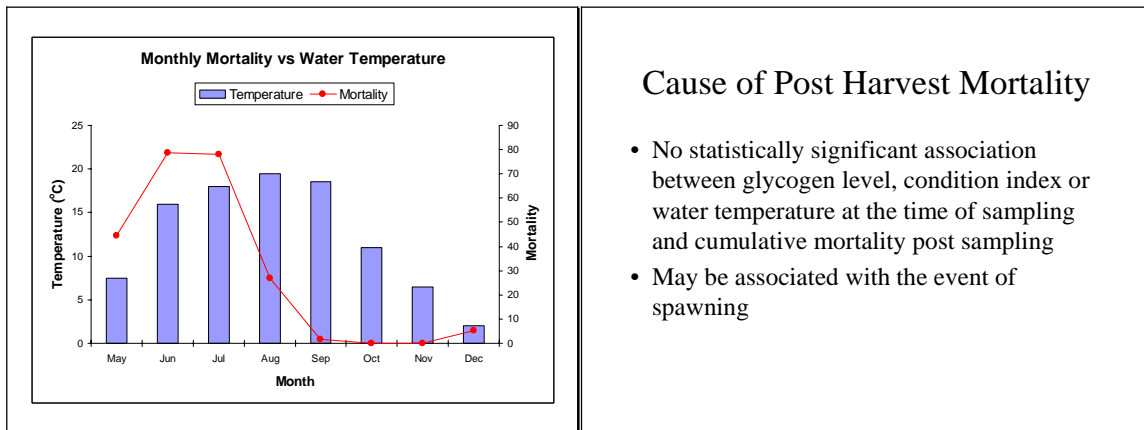
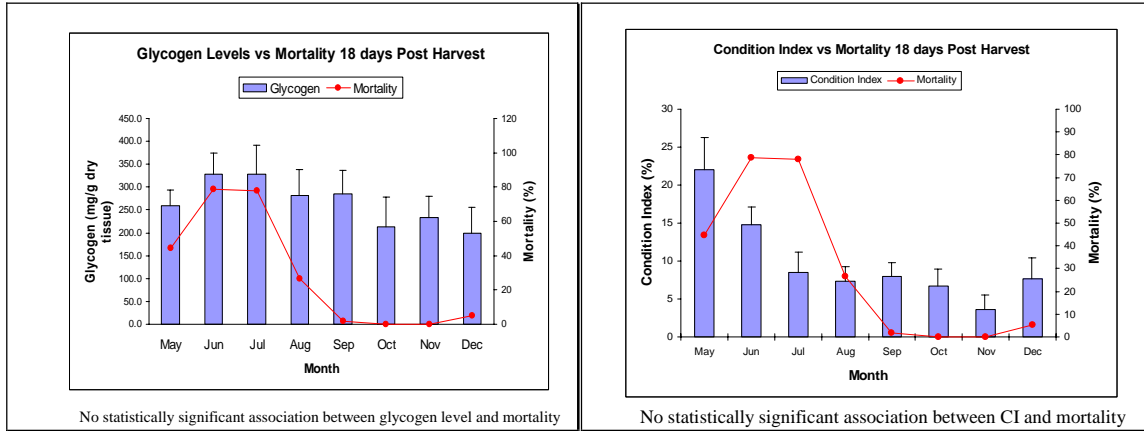
Sampling

- One hundred mussels were randomly selected from the top 1 meter of the sock
- Mussels were randomly selected from mussels measuring 45 to 55 mm in shell length
- Glycogen level, condition index and water temperature were determined at the time of harvest



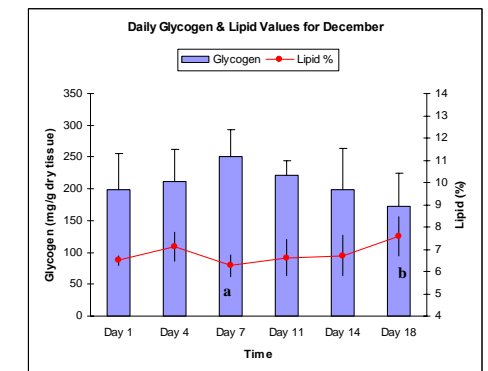
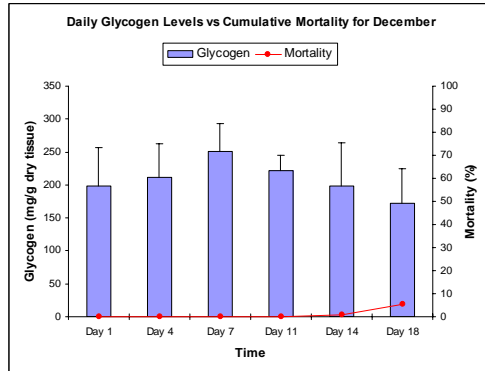
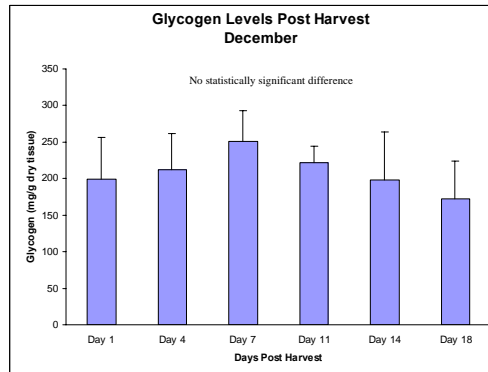
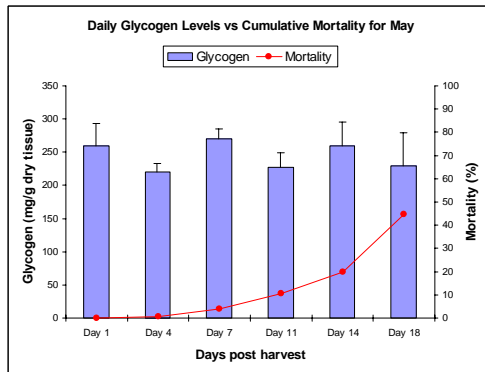
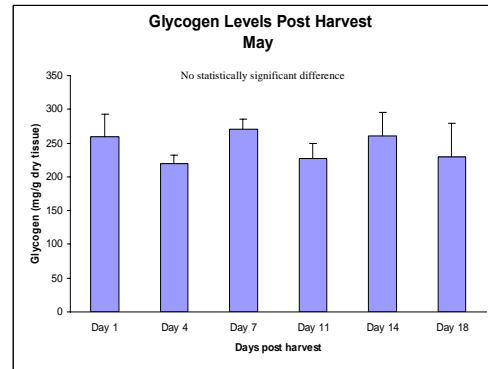
Glycogen & Mortality Post Harvest

- For each collection date, 96 mussels were held at 4° C in a refrigerator
- 6 mussels were sampled for glycogen level at the time of harvest and 4, 7, 11, 14 and 18 days post harvest
- Cumulative mortality was noted at the time of sampling



Glycogen Post Harvest

- There was no significant difference in glycogen level over the storage period of 18 days for any month from May to December
- In months with high cumulative mortality, glycogen levels didn't decrease indicating that a decreased glycogen level didn't play a significant role in mortality.
- Glycogen level are not a predictable indicator of mussel health in the post harvest period




Suivi saisonnier d'indices physiologiques chez la moule bleue pour l'estimation de la qualité nutritionnelle du milieu de croissance

Pellerin, J¹., S. Cartier¹, M. Fournier¹, L. Girault², É. Tamigneaux², M.-L. Larrivée²

1. ISMER - UQAR, Rimouski, Québec
2. CSP, Grande-Rivière, Québec

Présentation PowerPoint

<p>Développement et validation de l'utilisation de l'indice hépatosomatique comme indice de la qualité nutritionnelle de sites mytilicoles</p> <p>Projet CORPAQ (ISMER CSP INRS-IAF)</p> <p>Simon Cartier, Jocelyne Pellerin, Michel Fournier, Laurent Girault, Éric Tamigneaux, Marie-Lyne Larivée, Nicolas Lemaire</p> <p>En partenariat avec les producteurs</p> 	<h3>Sommaire</h3> <ul style="list-style-type: none">• Problématique• Objectifs• Méthodologie• Résultats• Conclusion <p>08/04/2004 2</p>
<h3>Problématique</h3> <ul style="list-style-type: none">• Quels sont les meilleurs sites ?<ul style="list-style-type: none">– Suivi saisonnier de différents paramètres du milieu et biologiques– Semblable à l'étude réalisée sur le pétoncle en 1996 <p>08/04/2004 3</p>	<h3>Projet Hépatopancréas Problématique</h3> <ul style="list-style-type: none">– Mytilus edulis:<ul style="list-style-type: none">• Bivalve suspensivore filtreur de substrat dur• Facteurs principaux influençant la croissance (Bayne, 1976; Pellerin-Massicotte, 1997) :<ul style="list-style-type: none">– Qualité du seston– Température– Salinité– Position dans la zone intertidale– Lumière– Etc. <p>08/04/2004 4</p>
<h3>Projet Hépatopancréas Problématique</h3> <ul style="list-style-type: none">• Rôle de l'hépatopancréas:<ul style="list-style-type: none">– Digestion– Entreposage des réserves énergétiques (lipides, glycogène et protéines)<ul style="list-style-type: none">• Utilisation pour croissance• Maintien du métabolisme• Stress• Reproduction <p>08/04/2004 5</p>	<h3>Projet Hépatopancréas Problématique</h3> <ul style="list-style-type: none">– Situation de la mytiliculture dans l'Est du Québec:<ul style="list-style-type: none">• Problèmes de vitalité aux Îles-de-la-Madeleine<ul style="list-style-type: none">– 1- Augmentation de la température dans les lagunes– 2- Pontes successives– 3- Déplétion des réserves énergétiques– 4- Mortalité– Observations de L.Girault (CSP) lors d'un stage de DEA dans le laboratoire de J. Pellerin:<ul style="list-style-type: none">• conditions défavorables du milieu = diminution de la masse de l'hépatopancréas <p>08/04/2004 6</p>

Projet Hépatopancréas

- Particularités du projet
 - Développement d'un indice de condition variant à court terme reflétant les conditions du milieu
 - Transfert de technologie vers les producteurs
 - Équipe multidisciplinaire: J. Pellerin et l'équipe... (écophysiologie) M. Fournier (immunologie), L. Girault et E. Tamigneaux (logistique des arrivages et analyses du phytoplancton) et 5 mytilculteurs de l'Est du Québec.

08/04/2004

7

Projet Hépatopancréas

Objectif général:

- effectuer un suivi de l'état physiologique chez *Mytilus sp.* (indigènes et transplantées) en fonction des paramètres du milieu (température et concentration de phytoplancton) dans 4 sites afin de développer un outil facile à utiliser pour les exploitants.

08/04/2004

8

Projet Hépatopancréas

- Hypothèses
 - Masse de l'hépatopancréas varie à court terme de façon proportionnelle à la croissance en chair à long terme
 - Masse de l'hépatopancréas varie proportionnellement à une abondance en phytoplancton
 - Masse de l'hépatopancréas varie proportionnellement avec les indices de bien-être physiologiques soit la maturation sexuelle et la croissance en chair

08/04/2004

9

Projet Hépatopancréas Méthodologie

- Transplanté (lot initial provenant de Gaspé): Carleton, Gaspé, Havre-St-Pierre et Grande-Rivière
- Indigène: Carleton, Gaspé, Havre-St-Pierre, Blanc-Sablon et Îles-de-la-Madeleine
- Suivi de paramètres environnementaux: température et concentration de phytoplancton

08/04/2004

10

Projet Hépatopancréas Méthodologie

- **Méthodologie:**
 - Prise de données pondérales et morphométriques sur les moules:
 - masse totale de l'organisme
 - Masse de chair humide
 - Taille coquille
 - Masse des organes (hépatopancréas, gonade et manteau)



08/04/2004

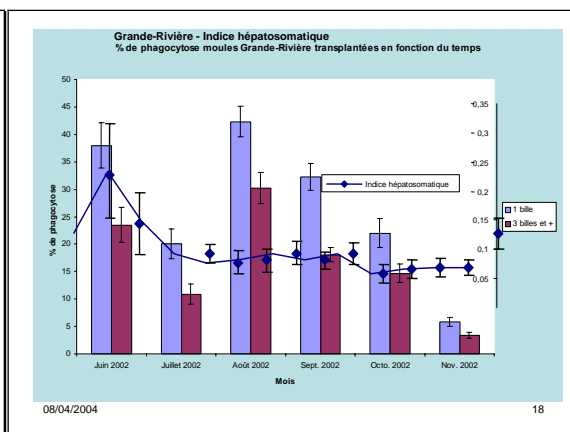
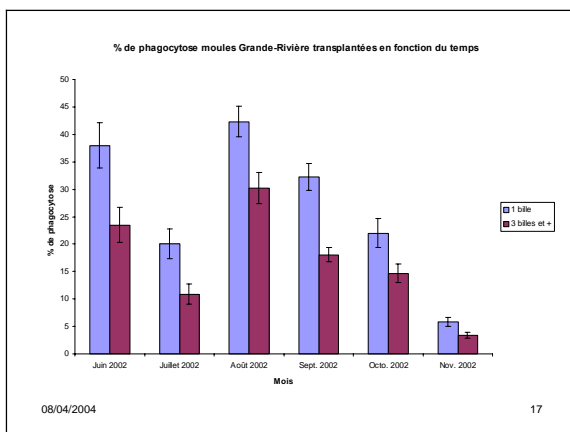
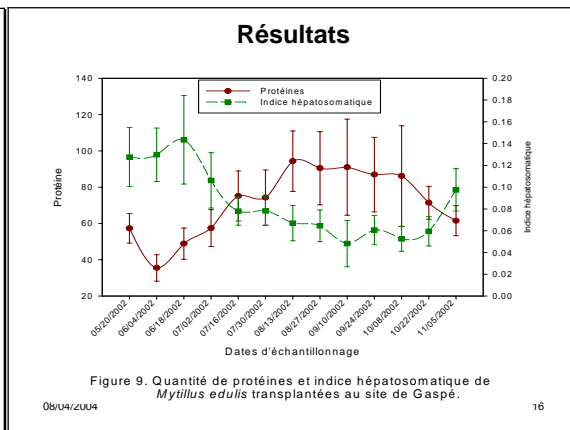
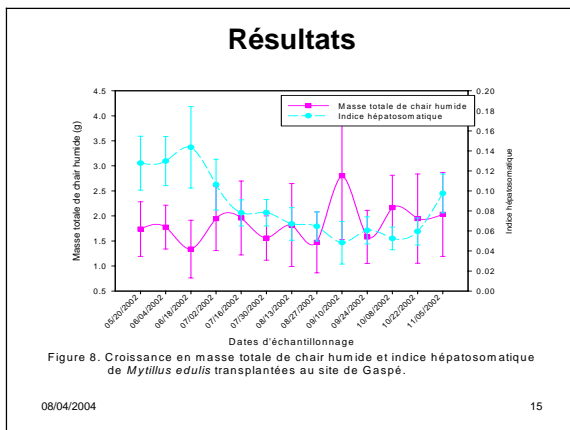
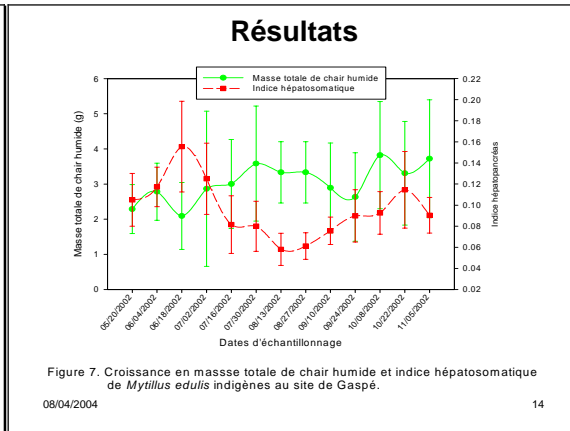
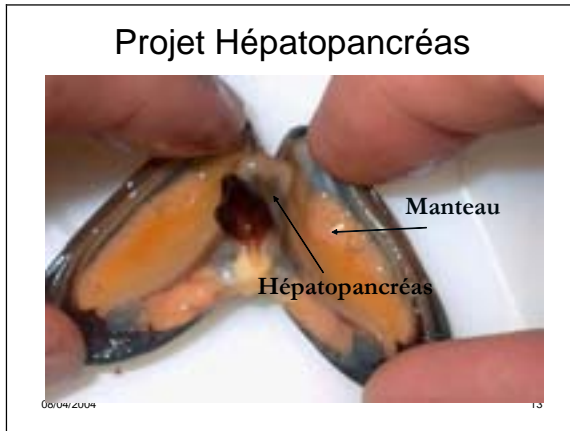
11

Projet Hépatopancréas Méthodologie

- Dissection de la gonade, du manteau et de l'hépatopancréas
 - Analyses biochimiques des réserves énergétiques (glycogène, lipides totaux et protéines) et immunocompétence
 - Détermination du sexe et des stades de maturation sexuelle (Nicolas Lemaire)



08/04/2004



Projet Hépatopancréas Conclusion

- Les réserves énergétiques suivent le patron normal saisonnier
- L'indice hépatosomatique varie en fonction du stade de maturation sexuelle
- L'indice hépatosomatique varie de façon inversement proportionnelle à la croissance en chair
- La phagocytose : un indice complémentaire

08/04/2004

19

Remerciements

Organismes qui ont supporté ce projet:

- ISMER
- Réseau VRQ en écotoxicologie
- CORPAQ
- Fondation de l'UQAR
- CRSNG

08/04/2004

20

La dissymétrie de la coquille chez les bivalves : un outil à approfondir?

Fréchette, M.

IML, MPO, Mont-Joli, Québec

Introduction

La qualité d'un spécimen dépend non seulement du potentiel de croissance et de survie offert par sa complexion génétique mais également de sa capacité à exprimer ce potentiel. Si un spécimen éprouve des problèmes homéostatiques d'origine environnementale, l'expression de son potentiel s'en trouvera réduite. Comment savoir si la performance d'un spécimen est entachée d'un problème homéostatique entravant l'expression de son potentiel?

Le naissain est constitué de jeunes spécimens de petite taille, vulnérables aux agents physiques et ayant la plus grande partie de leur cycle vital devant eux. Sa vulnérabilité aux agents de mortalité lors de l'élevage peut varier selon le stock d'origine des spécimens, comme le montrent les expériences « stock-site » (Mallet *et al.*, 1990; Myrand et Gaudreault, 1995). Ces différences peuvent être associées à la complexion génétique des spécimens (Tremblay *et al.*, 1998; Myrand *et al.*, 2002), mais également à des effets épigénétiques du site, comme l'impliquent les travaux de Phillips (2002). Ceux-ci, sans exclure la présence d'effets strictement environnementaux, reflètent des déficits de la stabilité ontogénique des spécimens menant à un ralentissement de la croissance et à la mortalité précoce des spécimens. Les déficits de la stabilité ontogénique peuvent se mesurer par les défauts de symétrie (DF : dissymétrie fluctuante; pour l'instant nous adopterons cette traduction littérale du terme anglais « fluctuating asymmetry »). La DF est définie comme les variations morphologiques aléatoires de part et d'autre d'un plan de symétrie d'un organisme (Graham *et al.*, sous presse). Les cellules des structures opposées de part et d'autre d'un plan de symétrie contiennent la même information génétique. En l'absence de toute perturbation de l'expression du génome, les traits phénotypiques de part et d'autre d'un plan de symétrie devraient être identiques. En pratique, cependant, on observe de légères différences. Ces différences, qui sont la DF, constituent l'expression morphologique des perturbations de l'expression idéalisée du programme génétique, et dès lors on les interprète comme une manifestation des déficits homéostatiques survenus au cours de l'ontogénie (van Valen, 1962; Debat et David, 2001; voir aussi Polak, 2003). La DF pourrait donc être très utile dans le contexte actuel.

La DF est déterminée à la fois par des influences génétiques et des influences environnementales (Cadée, 2000). Des valeurs élevées de DF ont été associées à des déficits d'hétérozygotie et la rupture de complexes de gènes coadaptés (Palmer et Strobeck, 1986; Clarke, 1993; Wilkins *et al.*, 1995; Hochwender et Fritz, 1999). La DF augmente généralement avec le niveau de stress éprouvé pendant l'ontogénie (Hochwender et Fritz, 1999; Badyaev *et al.*, 2000; Hosken *et al.*, 2000; Lens et Van Dongen 2000; Kozlov *et al.*, 2001) et elle est un indicateur pratique de la capacité individuelle à résister aux agressions environnementales diverses (Brown et Bomberger Brown 1998; mais voir aussi Bjorksten *et al.*, 2000; Lens et Van Dongen, 2000).

Un aspect capital de la prévision de la performance de spécimens est qu'elle soit fondée sur des caractéristiques permanentes. La FA répond à cette condition du fait qu'elle met en jeu le plan de symétrie des organismes, qui est un invariant au cours du cycle vital (Graham *et al.*, 1993). Mais ce n'est pas suffisant : il faut aussi qu'une fois acquise, la DF soit stable – ici nous postulons que les influences environnementales dominent les influences génétiques. Dans plusieurs cas, on observe un processus de croissance compensatoire qui, avec le temps, masque les éléments de dissymétrie (Collin, 1997; voir aussi les travaux cités dans Freeman *et al.*, 2003; et dans Palmer et Strobeck, 2003). On trouve cependant d'autres cas où la FA est stable dans le temps (Chippindale et Palmer, 1993; Shykoff et Møller, 1999). Des preuves indirectes permettent de conclure que la DF est stable chez la coquille de l'huître *Crassostrea gigas* (Fréchette *et al.*, 2003).

De plus, la FA répond à un large spectre d'agressions, que ce soit les températures extrêmes, les polluants, la fragmentation des écosystèmes, le niveau de radiation, etc. (voir les travaux cités dans Polak, 2003). Les opérations aquacoles impliquent la possibilité de l'application de nombreux stress variés, que ce soit au moment de la vie larvaire, dans les collecteurs, au moment du dégrappage et des transferts de spécimens, de leur calibrage et de leur installation dans les structures d'élevage, ou encore au moment des ensemencements. Finalement, l'estimation de la FA est généralement basée sur des mesures des dimensions linéaires des spécimens, ce qui peut se faire près des sites aquicoles et avec les équipements les plus simples.

La DF semble donc un outil de choix pour examiner la qualité des spécimens aquicoles, mais il reste à répondre à un certain nombre de questions. En particulier, est-elle stable au cours du temps? Est-elle corrélée à la capacité de résistance aux agressions futures? Ce sont des questions auxquelles je me propose de répondre d'abord dans le cas du pétoncle d'Islande, pris comme modèle du pétoncle géant. Ceci nous permet de profiter des informations déjà disponibles sur le pétoncle d'Islande (la DF serait associée à la survie, mais non à la croissance; Fréchette et Daigle, 2002) et des travaux actuellement en cours. Ces informations seront appliquées au développement des travaux sur la DF du pétoncle géant aux Îles-de-la-Madeleine.

Méthodes

La DF peut se définir comme les variations aléatoires d'un caractère autour d'un plan de symétrie. Ces variations aléatoires peuvent se manifester dans trois cas de figure : la DF peut être centrée, directionnelle, ou antisymétrique (figure 1; voir Møller, 1997). Dans le premier cas, les variations se font de part et d'autre de l'axe de symétrie de façon égale. Dans le deuxième cas, les variations ne sont pas centrées et dans le dernier, on pourra être en présence de dissymétrie directionnelle, mais avec une population comptant des spécimens gauchers et d'autres droitiers. Ce sera le cas avec les pinces de homard ou de crabe violon, par exemple. Une première étape de l'analyse consiste donc à détecter le type de symétrie observée. Les

résultats présentés ci-dessous portent sur le pétoncle d'Islande et sur l'huître creuse. La méthode d'estimation de la DF dans les deux cas ne tiennent pas compte de la présence d'une composant directionnelle à la dissymétrie totale des coquilles et en conséquence, les estimés sont entachés d'une certaine erreur (voir Graham *et al.*, 1998). Toutefois, les résultats publiés dans Fréchette *et al.* (2003) sont corrigés en conséquence.

La seconde étape consiste à déterminer le type de modèle de croissance, additif ou multiplicatif, affiché par le caractère mesuré. Ceci a des implications majeures pour la méthode d'estimation de la DF (Graham *et al.*, sous presse). Si le modèle est additif, la DF mesurée au temps t+1 sera indépendante de celle mesurée au temps t. S'il est multiplicatif, la DF mesurée au temps t+1 sera dépendante de celle mesurée au temps t. En présence d'un modèle multiplicatif, l'estimation de la DF par différence de la valeur des caractères est biaisée, donnant l'impression que la DF augmente avec la taille des spécimens, alors que le logarithme du rapport de la valeur des caractères n'est pas entaché de ce biais (figure 2, tirée de Graham *et al.*, sous presse). Les caractères estimés étaient, chez l'huître, la masse des coquilles et chez le pétoncle d'Islande, la longueur totale des oreilles gauche et droite des coquilles (figure 3).

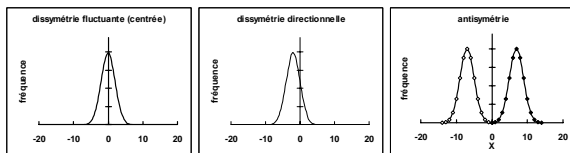


Figure 1 : Représentation idéalisée des trois types de dissymétries possibles. En abscisse : valeur de dissymétrie (X). En ordonnée : fréquence des observations.

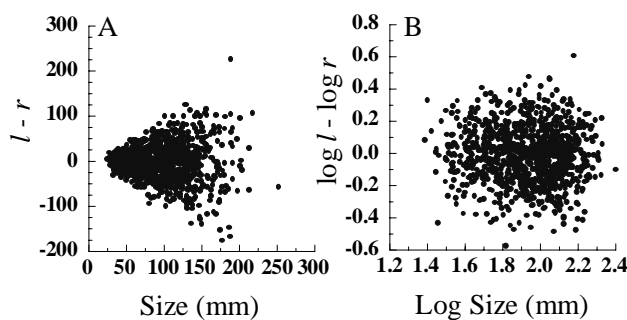


Figure 2 : Effet de la méthode d'estimation de la DF en présence d'un modèle de croissance multiplicatif. A : méthode basée sur la soustraction de la valeur des caractères. Cette méthode indique faussement que la DF croît avec la taille des spécimens. B : méthode basée sur le logarithme du rapport de la valeur des caractères (tiré de Graham *et al.*, in press).

Résultats et discussion

La variance de la relation entre la différence entre les valves des huîtres et la taille des huîtres augmente de façon significative avec la taille des huîtres dans les groupes e042 et x042, et de façon non significative dans le groupe b041 (figure 4). De plus, les spécimens morts et vivants n'ont pas la même DF moyenne dans les groupes b041 et x042 (figure 5). Ces résultats indiquent qu'on est en présence d'un modèle de croissance multiplicatif, ce qui implique que la DF est conservée au moins en partie au cours du temps (Fréchette *et al.* 2003). Il semble donc que dans le cas de ces huîtres, la DF serait associée à la capacité de résister à la mortalité estivale et que cette capacité puisse être prévue à des stades précoces du cycle vital. Ces conclusions demandent toutefois à être étayées par des observations supplémentaires.

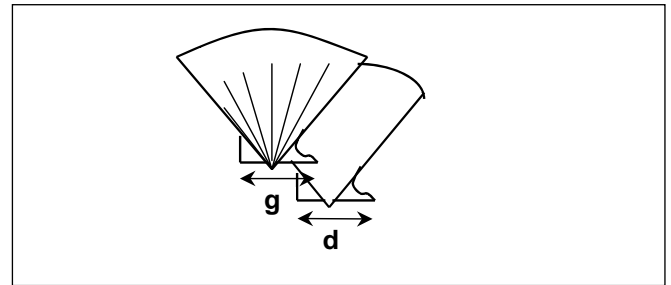


Figure 3 : Caractères mesurés chez le pétoncle d'Islande pour l'estimation de la dissymétrie. g : oreille gauche (supérieure normale); d : oreille droite. Nous avons également mesuré la DF des coquilles selon la hauteur (de l'apex à la frange supérieure de la coquille sur ce schéma).

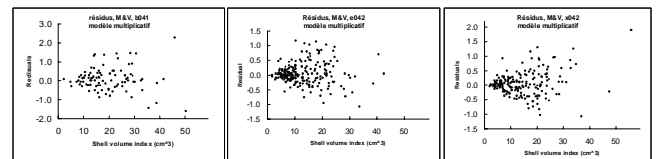


Figure 4 : Différence entre la valeur des coquilles gauche et droite chez l'huître creuse en élevage dans le Bassin de Marennes-Oléron en fonction de la taille des spécimens. La variance augmente de façon significative pour les groupes e042 et x041, ce qui indique un modèle multiplicatif, mais pas pour le groupe b041.

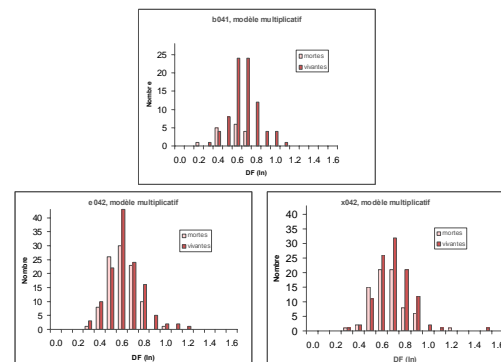


Figure 5 : Distribution de la DF pour les 3 groupes d'huîtres. Les huîtres mortes sont significativement différentes des huîtres vivantes pour les groupes b041 et x042, mais non dans le cas du groupe e042.

La relation entre la taille de pétoncles d'Islande échantillonnés à la drague en 2001 et la différence entre les valves des pétoncles est présentée à la figure 6. Il semble y avoir deux patrons distincts : d'abord une phase de resserrement de la variabilité jusqu'à 1,5 cm, puis une augmentation progressive de la variance aux tailles dépassant 1,5 cm. Ces tendances n'ont pas encore été testées statistiquement. S'il y avait hétéroscédasticité à partir de 1,5 cm et plus, ce serait ici aussi le signe que la DF est conservée au cours de la croissance. Celle-ci est présentée à la figure 7. On y voit que la DF semble très variable à petite taille, et que la variabilité diminue avec l'augmentation de la taille. L'augmentation de la taille s'accompagne également d'une augmentation progressive de la DF moyenne. La dispersion de la DF semble suivre un modèle de diffusion classique, du type de celui représenté à la figure 7. Une des caractéristiques importantes de ce modèle est que le paramètre A représente le taux auquel la distribution se resserre au fil de l'augmentation en taille. Si on prend en compte la figure 8, qui conforte l'idée que le modèle de croissance est de type multiplicatif, ce qui implique que la DF est au moins partiellement conservée au cours du temps, le paramètre A peut être interprété comme une estimation du taux de mortalité des spécimens. En effet, puisqu'il y a à la fois conservation de la DF individuelle et resserrement de la distribution des valeurs de DF, ce resserrement peut être interprété comme le reflet de la disparition des spécimens dont la DF se localise aux extrêmes de la distribution. Ce résultat est particulièrement important car il donne un moyen de calculer la mortalité du naissain de façon indépendante de l'efficacité de la méthode d'échantillonnage, sous réserve que celle-ci est indépendante de la DF. Il permet également d'examiner la variabilité spatio-temporelle (annuelle et de site en site) de la qualité du naissain. Il reste toutefois quelques étapes essentielles à franchir avant que cette méthode soit opérationnelle pour le calcul de la mortalité, sans compter le fait que cette estimation de la DF ne tient pas compte de la composante directionnelle de la dissymétrie (Graham *et al.*, 1998). Il faut en particulier 1) passer du domaine des tailles à celui du temps au moyen de la relation âge-longueur et 2) s'assurer que le modèle de diffusion présenté à la figure 7 est approprié. Une expérience est en cours depuis novembre 2002 à l'IML pour tester si le modèle actuel est approprié ou s'il ne faudrait pas plutôt utiliser un modèle de réaction-diffusion en raison de la possibilité qu'il y ait croissance compensatoire (Collin, 1997; Freeman *et al.*, 2003; Palmer et Strobeck, 2003).

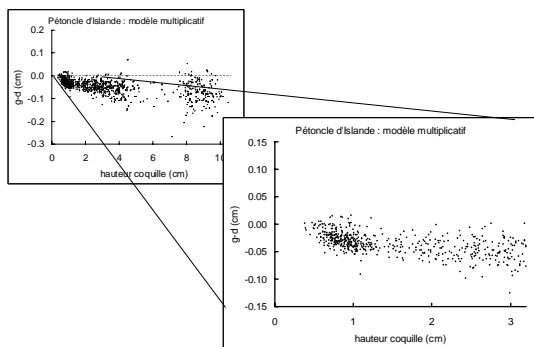


Figure 6 : Différence de la valeur des coquilles gauche et droite (oreilles) de pétoncles d'Islande échantillonnés à la drague en 2001, en fonction de la hauteur des spécimens. Le patron de dispersion semble coller avec un modèle de croissance multiplicatif.

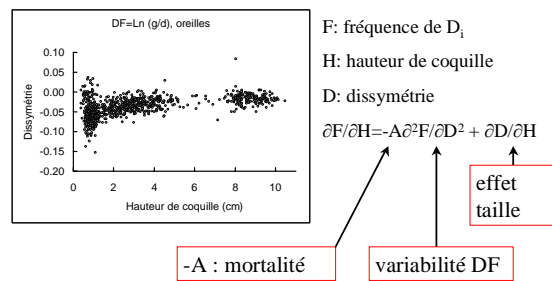


Figure 7 : Pétoncle d'Islande, Minganie 2001. Dissymétrie des oreilles des coquilles en fonction de la taille des spécimens (hauteur des coquilles, cm).

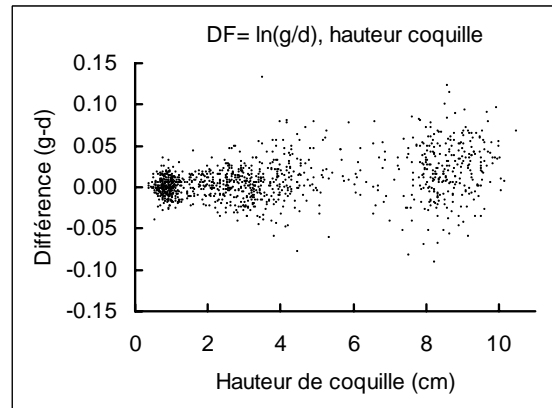


Figure 8 : Différence de la valeur des coquilles gauche et droite (hauteur de la coquille) de pétoncles d'Islande échantillonnés à la drague en 2001, en fonction de la hauteur des spécimens. Le patron de dispersion semble coller avec un modèle de croissance multiplicatif.

Conclusion

Les informations actuellement disponibles indiquent que la DF est une avenue de recherche prometteuse pour la gestion des cheptels de naissain de pétoncle d'Islande et d'huître creuse en élevage. Vu le caractère largement général des principes relatifs à la DF, rien n'interdit de penser qu'elle puisse également être mise à contribution chez le pétoncle géant pour 1) évaluer les effets épigénétiques chez les familles qui seront étudiées dans le programme de recherche du RAQ, 2) estimer le taux de mortalité chez le naissain en sac, en éclosérie ou en situation naturelle, 3) être mise à contribution dans la prévision de la capacité du naissain de résister au stress au cours de l'élevage.

Références

- Badyaev, A.V., K. R. Foresman, M. V. Fernandes. 2000. Stress and developmental stability: vegetation removal causes increased fluctuating asymmetry in shrews. *Ecology* 81, 336-345.
- Bjorksten, T., K. Fowler, A. Pomiakowski. 2000. What does sexual trait FA tell us about stress? *TREE* 15, 163-166.
- Brown, C.R., M. Bomberger Brown. 1998. Intense natural selection on body size and wing and tail asymmetry in cliff swallows during severe weather. *Evolution* 52, 1461-1475.
- Cadée, N., 2000. Genetic and environmental effects on morphology and fluctuating asymmetry in nesting barn swallows. *J. Evol. Biol.* 13, 359-370.

- Chippindale, A.K., A. R. Palmer. 1993. Persistence of subtle departures from symmetry over multiple molts in individual brachyuran crabs: relevance to developmental stability. *Genetica* 89, 185-199.
- Clarke, G.M. 1993. The genetic basis of developmental stability. I. Relationships between stability, heterozygosity and genomic coadaptation. *Genetica* 89, 15-23.
- Collin, R. 1997. Ontogeny of subtle skeletal asymmetries in individual larvae of the sand dollar *Dendraster excentricus*. *Evolution* 51, 999-1005.
- Debat, V., P. David. 2001. Mapping phenotypes: canalisation, plasticity and developmental stability. *TREE* 16, 555-561.
- Fréchette, M., G. Daigle. 2002. Growth, survival and fluctuating asymmetry of Iceland scallops in a test of density-dependent growth in a natural bed. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 270, 73-91.
- Fréchette, M., P. Gouletquer, G. Daigle. 2003. Fluctuating asymmetry and mortality in cultured oysters (*Crassostrea gigas*) in Marennes-Oléron Basin. *Aquat. Living Resour.* 16, 000-000.
- Freeman, C.D., J. H. Graham, J. M. Emlen, M. Tracy, R. A. Hough, C. L. Alados, J. Escós. 2003. Plant developmental instability: new measures, applications, and regulation. In: Polak, M. (Ed), *Developmental instability. Causes and consequences*. Oxford university Press, pp. 367-386.
- Graham, J.H., J. M. Emlen, D. C. Freeman, L. J. Leamy., J. A. Kieser. 1998. Directional asymmetry and the measurement of developmental instability. *Biol. J. Linn. Soc.* 64, 1-16.
- Graham, J.H., D. C. Freeman, J. M. Emlen. 1993. Developmental stability: A sensitive indicator of populations under stress. In: Landis, W.G., Hughes, J.S., Lewis, M.A. (Eds), *Environmental toxicology and risk assessment*, ASTM STP 1179. American Society for testing and materials, Philadelphia, pp. 136-158.
- Graham, J.H., K. Shimizu, J. M. Emlen, C. D. Freeman, J. Merkel, in press. Growth models and the expected distribution of fluctuating asymmetry. *Biol. J. Linn. Soc.*
- Hochwender, C.G., R. S. Fritz. 1999. Fluctuating asymmetry in a *Salix* hybrid system: the importance of genetic versus environmental causes. *Evolution* 53, 408-416.
- Hosken, D.J., W. U. Blanckenhorn, P. I. Ward. 2000. Developmental stability in yellow dung flies (*Scathophaga stercoraria*): fluctuating asymmetry, heterozygosity and environmental stress. *J. Evol. Biol.* 13, 919-926.
- Kozlov, M.V., E. L. Zvereva, P. Niemelä. 2001. Shoot fluctuating asymmetry: a new and objective stress index in Norway spruce (*Picea abies*). *Canadian Journal of Forest Research* 31, 1289-1291.
- Lens, L., P. Van Dongen. 2000. Fluctuating and directional asymmetry in natural bird populations exposed to different levels of habitat disturbance, as revealed by mixture analysis. *Ecology Letters* 3, 516-522.
- Mallet, A.L., C. E. A. Carver, K. R. Freeman. 1990. Summer mortality of the blue mussel in eastern Canada: spatial, temporal, stock and age variation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 67, 35-41.
- Møller, A.P. 1997. La nature préfère la symétrie. *La Recherche* 304, 50-55.
- Myrand, B., J. Gaudreault. 1995. Summer mortality of blue mussels (*Mytilus edulis* Linnaeus, 1758) in the Magdalen Islands (Southern Gulf of St Lawrence, Canada). *J. Shellfish Res.* 14, 395-404.
- Myrand, B., R. Tremblay, J.-M. Sévigny. 2002. Selection against blue mussel (*Mytilus edulis* L.) homozygotes under various stressful conditions. *J. Heredity* 93, 238-248.
- Palmer, A.R., C. Strobeck. 1986. Fluctuating asymmetry: measurement, analysis, pattern. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 17, 391-421.
- Palmer, R. A., C. Strobeck. 2003. Fluctuating asymmetry analyses revisited. In: Polak, M. (Ed), *Developmental instability. Causes and consequences*. Oxford University Press, p. 279-319.
- Phillips, N.E., 2002. Effects of nutrition-mediated larval condition on juvenile performance in a marine mussel. *Ecology* 83, 2562-2574.
- Polak, M., 2003. *Developmental instability: causes and consequences*. Oxford University Press, New York.
- Shykoff, J.A., A. P. Møller. 1999. Fitness and asymmetry under different environmental conditions in the barn swallow. *Oikos* 86, 152-158.
- Tremblay, R., B. Myrand, J.-M. Sévigny, P. Blier, H. Guderley. 1998. Bioenergetic and genetic parameters in relation to susceptibility of mussels, *Mytilus edulis* (L.) to summer mortality. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 221, 27-58.
- Van Valen, L., 1962. A study of fluctuating asymmetry. *Evolution* 16, 125-142.
- Wilkins, N.P., E. Gosling, A. Curatolo, A. Linnane, C. Jordan, H. P. Courtney. 1995. Fluctuating asymmetry in Atlantic salmon, European trout and their hybrids, including triploids. *Aquaculture* 137, 77-85.

La résistance au stress peut être liée aux caractéristiques génétiques des individus en cause : l'exemple de la moule bleue

Sévigny, J.-M.¹, B. Myrand², R. Tremblay³

1. IML, MPO, Mont-Joli, Québec

2. CeMIM - DIT - MAPAQ, Cap-aux-Meules, Québec

3. ISMER - UQAR, Rimouski, Québec

Introduction

Il y a deux différents stocks de moule bleue (*Mytilus edulis*) aux Îles-de-la-Madeleine (Myrand et Gaudreault 1995) caractérisés par différents niveaux d'hétérozygotie mesurés sur plusieurs loci. Le stock du Havre Aubert (BHA) est plus hétérozygote que le stock provenant des lagunes du Havre aux Maisons (HAM) et de Grande Entrée (GE) avec des niveaux d'hétérozygotie observé aux alentours 0,50 comparés à 0,33 (Tremblay *et al.*, 1998a). Ces stocks diffèrent également par différents paramètres associés à la performance. Les moules de BHA démontrent une meilleure condition physiologique que celle de GE durant les périodes de stress associées aux mortalités massives (Tremblay *et al.* 1998b,c,d). En effet les moules de BHA expriment un potentiel de croissance plus élevé, un rapport oxygène : azote plus grand, un rapport métabolisme de maintien sur maximal plus faible, une déstabilisation des membranes lysosomiales plus courtes et plus faibles et finalement une thermosensibilité métabolique plus basse. Pellerin-Massicotte (1997) observait également que les moules de BHA démontraient une réponse plus faibles des processus oxydatifs suggérant qu'elles subissaient un niveau de stress moins important que les moules de GE dans les mêmes conditions environnementales.

Afin de valider la présence d'une relation entre hétérozygotie et performance, nous avons réalisé une expérience qui fut publiée dans *Journal of Heredity* (Myrand *et al.*, 2002) et résumé dans ce court texte.

Matériels et méthodes

Cette étude sur la relation entre performance et hétérozygotie était basée sur la comparaison entre l'hétérozygotie moyenne calculé d'un groupe contrôle et des moules résistantes à un stress léthal. Un stress aérobique et un autre anaérobique ont été réalisés en laboratoire et l'expérience s'est terminée lorsque chacun des lots avaient atteint 50 % de mortalité. Deux groupes différents de moules d'une longueur moyenne de 50 à 60 mm ont été exposés aux conditions de stress: soit des moules sauvages de Havre-Aubert et des moules captées dans la lagune du Havre Aubert puis transférées dans la lagune du Havre aux Maisons pour la croissance sur boudins suspendus.

Le stress aérobique était causé par une température élevée et un faible apport alimentaire dans une eau bien oxygénée. Cent moules de chaque groupe furent introduites dans les bassins alimentés par une eau filtrée sur sable maintenue entre 26 et 27 °C. La moitié de l'eau fut changée quotidiennement dans les bassins expérimentaux sans ajout de nourriture. Un bullage fut ajouté pour assurer l'oxygénation. L'oxygène dissous fut mesuré quotidiennement avant le changement d'eau et était constamment > 90 % de saturation. Les moules étaient collées avec du gel de cyanoacrylate sur des pièces de Plexiglass™ et distribuées aléatoirement afin de diminuer la variabilité spatiale dans les bassins. Les moules de chaque population étaient

examinées deux fois par jour jusqu'à ce que 50 % des individus soient décédées (LT50).

Le stress anaérobique était causé par une exposition prolongée à l'air. Cent moules de chaque groupe furent maintenues hors de l'eau dans une chambre maintenue à une température entre 17 et 19 °C et une humidité relative d'environ 100 %. Les moules de chaque groupe furent positionnées en alternance et étaient examinées deux fois par jour jusqu'à ce que 50 % des individus soient morts (LT50).

Résultats et discussion

Il y avait d'importantes différences entre les deux groupes de moules, même si celles-ci étaient toutes originaires du bassin du Havre Aubert. Les moules de culture en suspension avaient une survie plus faible que les moules sauvages dans les deux conditions de stress (figure 1).

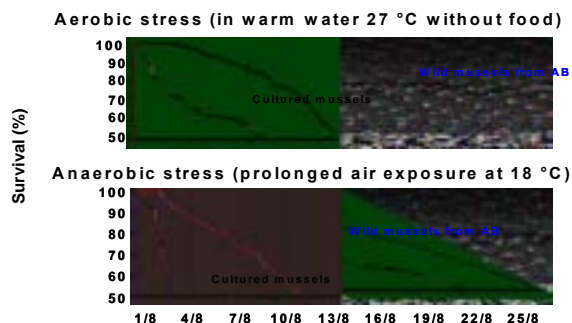


Figure 1 : Survie des moules d'élevage et sauvage provenant du Bassin du Havre-Aubert dans des conditions de stress.

Le déficit en hétérozygotie changeaient drastiquement pour les moules survivantes provenant du groupe d'élevage comparativement au contrôle T0 (avant de subir le stress). Les moules survivantes de ce groupe avaient systématiquement un degré d'hétérozygotie significativement plus élevé que les moules de groupe contrôle T0. Le même patron était observé autant chez les survivantes de stress aérobique que celles provenant du stress anaérobique (figure 2).

Ces résultats montrent une nette relation entre l'hétérozygotie moyenne calculée sur plusieurs loci et le niveau de performance estimé par la survie aux stress chez les moules d'élevage. Des conditions importantes de stress causes donc une augmentation de l'hétérozygotie moyenne dans le groupe de moule d'élevage par une mortalité sélective des individus les plus homozygotes. Toutefois, contrairement aux moules d'élevage l'hétérozygotie des moules sauvages du bassin du Havre Aubert était similaire entre les survivantes aux stress aérobique et anaérobique et le témoin. Ainsi, pour ce groupe de moule, aucune mortalité sélective n'a été détectée. La différence la plus importante entre ces deux groupes étaient que les moules d'élevage étaient caractérisées par un important déficit en hé-

térozygotie au départ de l'expérience contrairement aux moules sauvages du bassin du Havre-Aubert. Nous suggérons que la faible proportion de moules homozygotes dans le groupe de moule sauvage au départ de l'expérience empêchait d'observer une sélection contre les homozygotes, et ainsi une augmentation de l'hétérozygotie suite aux stress létaux. Une telle relation entre l'hétérosis et le déficit en hétérozygotie a déjà été suggérée dans plusieurs études (Zouros, 1987; Gaffney, 1990; Bricelj et Krause, 1992; Pogson et Zouros, 1994).

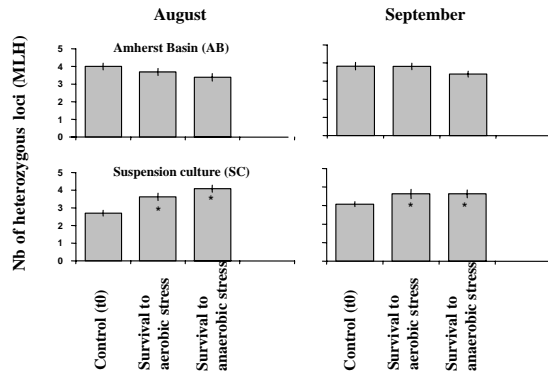


Figure 2 : Hétérozygotie moyenne des moules du groupe contrôle et des survivantes aux stress

Références

- Bricelj, V. M., M. K. Kraus. 1992. Ressource allocation and population genetics of the bay scallop, *Argopecten irradians irradians*: effects of age and allozyme heterozygosity on reproductive output. *Mar. Biol.* 113: 253-261.
- Gaffney, P. M. 1990. Enzyme heterozygosity, growth rate and viability in *Mytilus edulis*: another look. *Evolution* 44: 204-210.
- Myrand, B., R. Tremblay, J.-M. Sévigny. 2002. Selection against blue mussels (*Mytilus edulis* L.) homozygotes under various stressful conditions. *J. Heredity* 93: 238-248.
- Myrand, B., J. Gaudreault. 1995. Summer mortality of blue mussels (*Mytilus edulis linneaus*, 1758) in the Magdalen Islands (southern gulf of the St-Lawrence, Canada). *J. Shell. Res.* 14: 395-404.
- Pellerin-Massicotte, J. 1997. Influence of elevated temperature and air-exposure on MDA levels and catalase activities in digestive glands of the blue mussel (*Mytilus edulis* L.). *J. Rech. Oceanogr.* 22: 91-98.
- Pogson, G. H., E. Zouros. 1994. Allozyme and RFLP heterozygosities as correlates of growth rate in the scallop *Placopecten magellanicus*: A test of the associative overdominance hypothesis. *Genetics* 137: 221-231.
- Tremblay, R. B. Myrand, J.-M. Sévigny. 1998a. Genetic characterization of wild and suspension-cultured blue mussels (*Mytilus edulis linneaus*, 1758) in the Magdalen Islands (southern gulf of st.lawrence, Canada). *J. Shell. Res.* 17: 1191-1202.
- Tremblay, R., B. Myrand, J.-M. Sévigny, H. Guderley. 1998b. Bioenergetic and genetic parameters in relation to susceptibility of blue mussels, *Mytilus edulis* (L.) to summer mortality. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 221: 27-58.
- Tremblay, R., B. Myrand, H. Guderley. 1998c. Thermal sensitivity of organismal and mitochondrial VO_2 in relation to susceptibility of blue mussels, *Mytilus edulis* (L.), to summer mortality. *J. Shell. Res.* 17: 141-152.
- Tremblay, R., B. Myrand, H. Guderley. 1998d. Temporal variation of lysosomal capacities in relation to susceptibility of mussels, *Mytilus edulis*, to summer mortality. *Mar. Biol.* 132: 641-648.
- Zouros, E. 1987. On the relation between heterozygosity and heterosis: An evolution of the evidence from marine mollusks. *Isozymes* 15: 255-270.

Les réponses de fuite comme indicateur de l'état physiologique des pétoncles : essais avec *Chlamys islandica*, *Euvola ziczac* et *Placopecten magellanicus*

Guderley, H.¹, K. Brokordt,² M. Lafrance¹, J. Himmelman¹, O. Nusetti² et G. Cliche³

1. Département de biologie, Université Laval, Québec, Québec

2. Universidad del Oriente, Cumana, Venezuela

3. CeMIM - DIT - MAPAQ, Cap-aux-Meules, Québec

PRÉSENTATION POWER POINT

<p>Les réponses de fuite comme indicateur de l'état physiologique des pétoncles: <i>Chlamys islandica</i>, <i>Euvola ziczac</i> et <i>Placopecten magellanicus</i></p> <p>Escape responses and scallop physiological status: <i>Chlamys islandica</i>, <i>Euvola ziczac</i> and <i>Placopecten magellanicus</i></p> <p>Helga Guderley, Katherina Brokordt, Martin Lafrance, John Himmelman, Osmar Nusetti & Georges Cliche</p> <p>Dép. de biologie, Université Laval Universidad del Oriente, Cumana, Venezuela MAPAQ</p>	<p>Escape responses as an integrative measure of organismal status</p> <ul style="list-style-type: none"> • Requires sensory motor coordination • Complex, stereotypic behavior • Evolved response with presumed adaptive value • Measured with entire organism + predator • Relies heavily upon muscle activity <p>⇒ Does the escape response change with shifts in physiological status?</p>
---	---

<p>Scallop Adductor Muscle</p> <ul style="list-style-type: none"> • Roles: <ul style="list-style-type: none"> - Swimming - Storage of macromolecular reserves • Conflicts <p>⇒ Does mobilisation of muscle reserves during the reproductive cycle change the escape response ?</p>	<p>To what extent does the mobilisation of reserves for reproduction compromise other aspects of organismal performance?</p>
---	--


<p>What happens during an escape response?</p> <table border="0"> <tr> <th style="text-align: left;">Behaviour</th> <th style="text-align: left;">Biochemistry</th> </tr> <tr> <td>stimulation → clapping</td> <td>Arginine Phosphate ATP anaerobic glycolysis (ATP + octopine)</td> </tr> <tr> <td>exhaustion → anaerobic recuperation (-valve closure)</td> <td>anaerobic glycolysis (ATP + octopine)</td> </tr> <tr> <td>valves opened → aerobic recuperation</td> <td>aerobic metabolism mitochondrial ATP production</td> </tr> </table>	Behaviour	Biochemistry	stimulation → clapping	Arginine Phosphate ATP anaerobic glycolysis (ATP + octopine)	exhaustion → anaerobic recuperation (-valve closure)	anaerobic glycolysis (ATP + octopine)	valves opened → aerobic recuperation	aerobic metabolism mitochondrial ATP production	<p>ATP Generation during Escape Responses</p> <table border="0"> <tr> <td colspan="2"><i>Placopecten magellanicus</i></td> </tr> <tr> <td>Arginine phosphate</td> <td>75%</td> </tr> <tr> <td>Anaerobic glycolysis</td> <td>20%</td> </tr> <tr> <td>Aerobic glycolysis</td> <td>5%</td> </tr> <tr> <td colspan="2"><i>Argopecten irradians concentricus</i></td> </tr> <tr> <td>Arginine phosphate</td> <td>60%</td> </tr> <tr> <td>Anaerobic glycolysis</td> <td>35%</td> </tr> <tr> <td>Aerobic glycolysis</td> <td>5%</td> </tr> </table>	<i>Placopecten magellanicus</i>		Arginine phosphate	75%	Anaerobic glycolysis	20%	Aerobic glycolysis	5%	<i>Argopecten irradians concentricus</i>		Arginine phosphate	60%	Anaerobic glycolysis	35%	Aerobic glycolysis	5%
Behaviour	Biochemistry																								
stimulation → clapping	Arginine Phosphate ATP anaerobic glycolysis (ATP + octopine)																								
exhaustion → anaerobic recuperation (-valve closure)	anaerobic glycolysis (ATP + octopine)																								
valves opened → aerobic recuperation	aerobic metabolism mitochondrial ATP production																								
<i>Placopecten magellanicus</i>																									
Arginine phosphate	75%																								
Anaerobic glycolysis	20%																								
Aerobic glycolysis	5%																								
<i>Argopecten irradians concentricus</i>																									
Arginine phosphate	60%																								
Anaerobic glycolysis	35%																								
Aerobic glycolysis	5%																								

Quantification of escape responses

- Stimulation of scallop with its predator
Chlamys islandica *Leptasterias polaris*
Euvola ziczac *Fasciolaria tulipa*
Placopecten magellanicus *Asterias vulgaris*
- Clapping number, rate, time to exhaustion

Quantification of recovery

- Glycolytic recovery (time of valve closure, extent of response at valve opening)
- Aerobic recovery (escape responses at different periods once the valves have opened)



For adult scallops


After gonadal maturation and spawning

↓

levels of energetic reserves
↓
muscle metabolic capacities

↓

weaker escape response
↓
slower recuperation



Chlamys islandica Mingan Archipelago, northern Gulf of St. Lawrence (30 m)

Sampling periods

mid-June	→ immature	} gonadal aspect GSI lipid & protein histology
mid-July	→ mature	
early August	→ pre-spawned	
mid-August	→ spawned	

Sample use

- evaluation of escape responses and recuperation
- metabolite, enzymes and mitochondrial assays

Brokordt, Himmelman & Guderley 2000 JEMBE

Evaluation of escape responses

stimulation with *Leptasterias polaris* → 48 scallops

anaerobic recovery → 48 scallops

aerobic recovery → groups of 8 scallops

restimulation with *L. polaris* → groups of 8 scallops

number of claps
duration of clapping

time spent, valves closed

- 2 min
- 2 h
- 4 h
- 6 h
- 12 h
- 18 h

number, duration of claps
after valves opened

Exhausting escape responses and duration of subsequent valve closure in *Chlamys islandica*

Reproductive stage	Claps	Clapping rate (claps · min ⁻¹)	Time spent closed (min)	n
Immature	26 ± 1	13 ± 1	33.2 ± 2.7	40
Mature	25 ± 1	13 ± 1	23.2 ± 1.7 *	48
Pre-spawned	30 ± 2	17 ± 1*	34.1 ± 3.4	29
Spawned	24 ± 1	13 ± 1	28.8 ± 3.3	48

* P<0.01

Percent initial response vs duration of recuperation at different reproductive stages in *Chlamys islandica*


Time of recuperation	Immature	Mature	Pre-spawned	Spawned
2 min ♦	34.8 ± 2.7	24.6 ± 3.6	28.1 ± 6.7	10.6 ± 5.8'
2 h	73.3 ± 5.5	54.2 ± 7.1	72.7 ± 3.4	69.5 ± 11.5
4 h	95.2 ± 6.3	60.5 ± 6.3	60.9 ± 9.8	70.1 ± 8.9
6 h	103.0 ± 4.1	63.0 ± 7.0	78.1 ± 6.2	70.8 ± 4.8
12 h		50.0 ± 10.7	102.0 ± 3.9	81.9 ± 5.5
18 h		100.6 ± 4.7		105.2 ± 8.8

♦ glycolytic recovery efficiency
* P<0.05

Conclusion

During gonadal maturation and spawning, *C. islandica* did not change its clapping capacity, but slowed both the glycolytic and aerobic recuperation after exhausting burst exercise, in parallel with the decreased macromolecular reserves and metabolic capacities of the adductor muscle.

* Mobilisation of muscle components for reproduction slowed recuperation from exhaustion




In the tropics, scallops can spawn more than once a year....

Euvola ziczac Golfo de Cariaco, Chacopatita, (10 - 15 m), Venezuela

Sampling periods	mid-March	immature	} gonadal aspect GSI lipid & protein contents histology
	mid-May	mature	
	late May	spawned	
	mid June	immature	
	mid August	mature	
	early September	spawned	

Sample use: evaluation of escape responses, recuperation, metabolite and enzyme assays



Brokordt, Nusetti, Himmelman & Guderley 2000 Marine Biology

Evaluation of escape responses


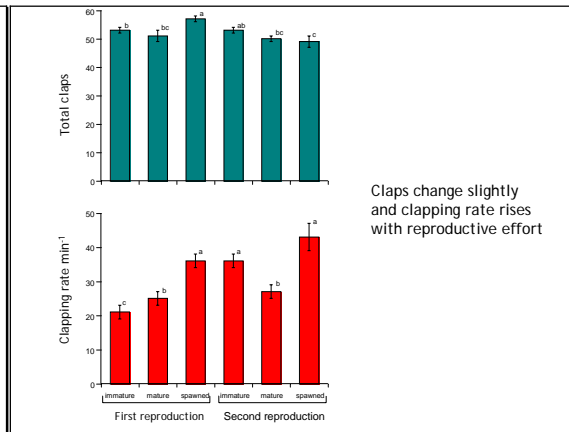
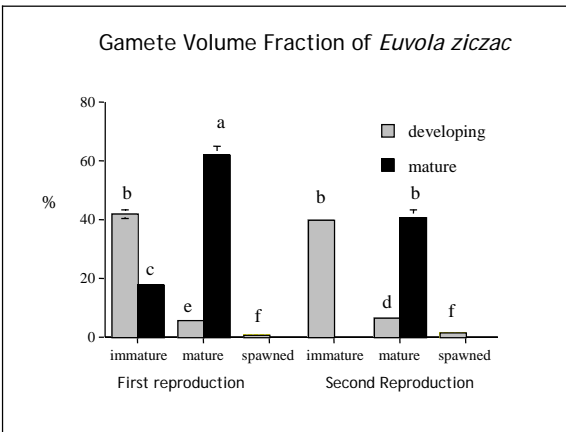
Stimulation with *Fasciolaria tulipa* → 42 scallops

- number of claps
- duration of clapping

Aerobic recovery (open valves) → groups of 7 scallops


- 5 min post exhaustion
- 10 min
- 20 min
- 25 min
- 30 min
- 35 min
- 40 min

Restimulation with *F. tulipa* → clap number and duration

Percent initial claps vs duration of recuperation during different reproductive stages in *Euvola ziczac*


Time (min)	First reproduction			Second reproduction		
	Immature	Mature	Spawned	Immature	Mature	Spawned
5	30	26	45	59	48	47
10	76	54	57	86	50	54
20	95	56	78	100	89	73
25	103	86	80		93	72
30		87	88		101	101
35		103	95			
40			102			



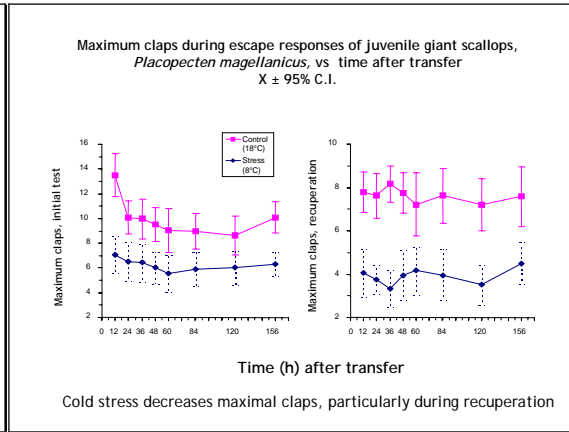
Reproductive investment systematically slows recuperation from exhaustive exercise

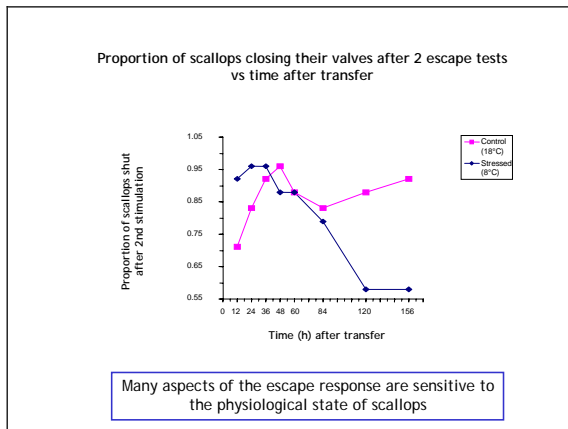
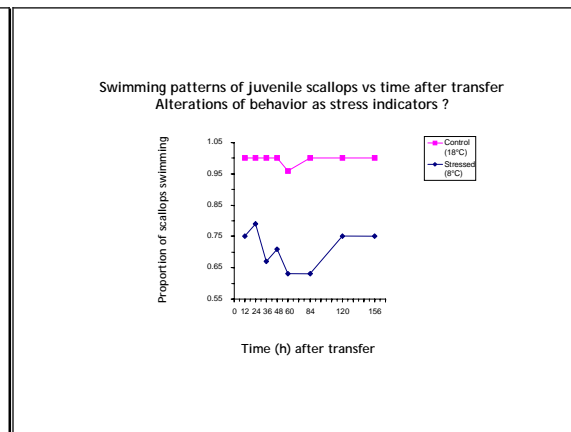
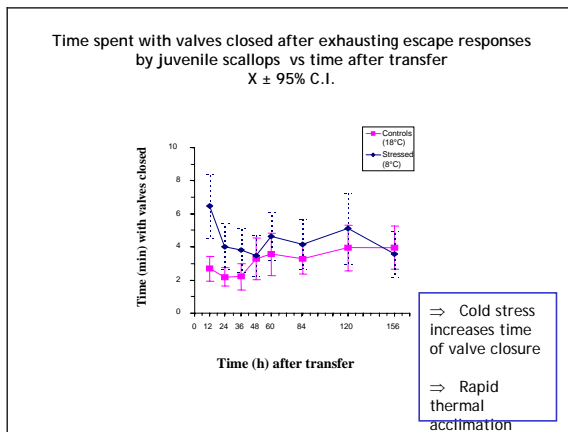
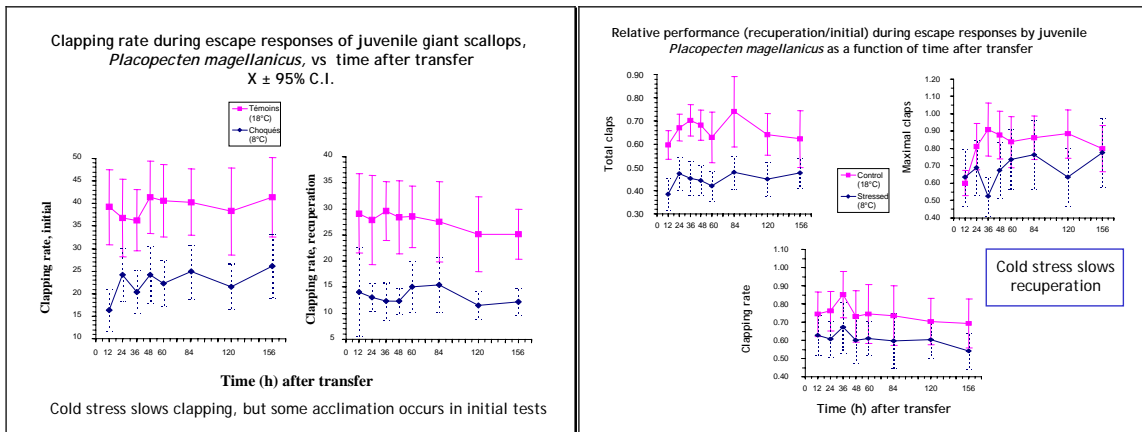
Thermal stress slows the recuperation of giant scallops, *Placopecten magellanicus*, from exhausting escape responses

Martin Lafrance, Georges Cliche & Helga Guderley et al. 2003 Journal of Shellfish Research



- Experimental design:
- Juvenile scallops (~40 mm shell height) from pearl nets in House Harbor lagoon, temperature at sampling 18°C
 - Thermal shock scallops transferred to 8°C
 - Control scallops transferred to 18°C
 - Escape responses measured regularly during one week
 - Stimulation with *Asterias vulgaris* (starved 24 h)
 - Number of claps, duration of claps, number of claps in a series, jumps vs swimming until no claps within 1 min of last clap
 - Recuperation evaluated 15 min after exhaustion





Escape responses and recuperation of wild and cultured *Placopecten magellanicus*

Origin	Number of claps	Clapping time (min)	Clapping rate (claps · min ⁻¹)	Max number of claps in a series ¹	Time spent closed (min) ²
Initial response					
Cultured	48.5 (1.5, 76)	1.42 (0.06, 76)	37.5 (1.5, 76)	10.3 (0.8, 52)	5.1 (0.3, 70)
Wild	44.2 (1.0, 76)	0.90 (0.02, 76)	50.7 (1.2, 76)	11.2 (0.6, 52)	6.5 (0.3, 70)
p	0.014	<0.0001	<0.0001	0.17	0.0006
Response after 15 min of recuperation*					
Cultured	28.3 (1.0, 74)	1.00 (0.06, 74)	33.1 (1.6, 74)	7.3 (0.4, 50)	-
Wild	23.7 (1.1, 72)	0.66 (0.05, 72)	39.9 (1.3, 72)	5.8 (0.3, 50)	-
p	0.0041	<0.0001	0.0010	0.0054	-

Cultured scallops out perform wild scallops except in clapping rate

Extent of recuperation from exhausting escape responses by wild and cultured scallops

Origin	% initial number of claps*	% initial clapping time*	% initial clapping rate*	% initial max number of claps in a series*
Cultured	60.8 (2.7, 73)	70.4 (3.9, 72)	93.4 (4.6, 73)	84.7 (6.3, 49)
Wild	56.2 (3.3, 72)	66.1 (3.4, 68)	80.6 (2.6, 72)	58.1 (4.6, 49)
p	0.24	0.57	0.046	0.0013

Cultured scallops recuperate as well as or better than wild scallops, in line with their higher glycogen reserves and greater muscle glycolytic capacities


- Escape responses**
- Do change with physiological status in scallops
 - Reproductive effort (*Chlamys islandica*, *Euvoila ziczac*)
 - Air exposure (*Placopecten magellanicus*)
 - Do respond to changes in environmental conditions
 - Thermal change (*Placopecten magellanicus*)
 - Suggest that cultured scallops are as well, if not better protected from predation by starfish as wild scallops...
 - Only one of several organismal protective mechanisms (shell strength, righting response)
-


Cultured mussel responses to waterborne starfish scents and to environmental insults

Couturier, C.

Fisheries and Marine Institute, Memorial University of Newfoundland, St. John's, Newfoundland

PRÉSENTATION POWER POINT

<p>Responses of Cultured Mussels to Biological, Environmental, & Toxic Insults</p> <p>Cyr Couturier, Memorial University</p>  <p>Atelier sur les indicateurs de stress, le 24-26 fev. 2003, Qc</p>	<p>Outline:</p> <ul style="list-style-type: none">• Background and objectives• Mussel responses to starfish substances• Byssal production in mussels• Indicators of shelflife• Mussel responses to growout gear• Scallop mass mortalities• Biochemical indicators of stress in scallops• Conclusions <p>Atelier sur les indicateurs de stress, le 24-26 fev. 2003, Qc</p>
--	---

<p>Background:</p> <ol style="list-style-type: none">1. A variety of losses / mortalities at the level of shellfish farms2. Development of simplified assays to evaluate some possible causes of the losses3. Summary of small scale trials related to a variety of causes (ADA student projects) <p>Atelier sur les indicateurs de stress, le 24-26 fev. 2003, Qc</p>	<p><u>Starfish Mussel Interactions</u></p> <p>J. Copp (2000):</p> <ol style="list-style-type: none">1. Farmers suggested presence of starfish on culture gear reduces growth of mussels2. Farm observations suggest increased drop-off from culture gear  <p>Atelier sur les indicateurs de stress, le 24-26 fev. 2003, Qc</p>
---	--

<p><u>Starfish Mussel Interactions</u></p> <p>J. Copp (2000):</p> <ol style="list-style-type: none">1. Natural, intertidal mussels alter behaviour in response to the presence of starfish (Charles 1966, Ward and Targett 1989)2. Reimer et al. (1995), Reimer and Tendengren (1996) found reduced shell growth in subtidal mussels exposed to starfish in both lab and field trials3. Uncertain whether response due to presence of starfish, prey substances, or both4. Question: will cultured blue mussels exhibit altered behaviour and growth patterns in response to starfish and prey-released substances? <p>Atelier sur les indicateurs de stress, le 24-26 fev. 2003, Qc</p>	<p><u>Starfish Mussel Interactions</u></p> <p>J. Copp (2000):</p>  <p>Atelier sur les indicateurs de stress, le 24-26 fev. 2003, Qc</p>
--	--

Starfish Mussel Interactions
J. Copp (2000):

Atelier sur les indicateurs de stress, le 24-26 fev. 2003, Qc

Starfish Mussel Interactions
J. Copp (2000):

Atelier sur les indicateurs de stress, le 24-26 fev. 2003, Qc

Starfish Mussel Interactions
J. Copp (2000):

Methods:

1. Individually tagged
2. Daily mixed ration (ca. 2%)
3. 1-2C, 30-32 ppt
4. Shell morphometry
5. Feeding behaviour
6. Feeding rate

Atelier sur les indicateurs de stress, le 24-26 fev. 2003, Qc

Starfish Mussel Interactions
J. Copp (2000):

Methods

n = 10 mussels per container
 *concentration employed by Reimer et al. (1995)

Atelier sur les indicateurs de stress, le 24-26 fev. 2003, Qc

Starfish Mussel Interactions
J. Copp (2000):

- Mussels grew significantly at 1C
 Control &
 - unfed star treatments were not significantly different in terms of SL (ANOVA, $p > 0.05$)

Figure 6: Increase in shell length of individually tagged mussels exposed to various concentrations of waterborne starfish. T1 = control, T2 = 10 g seawater fed mussels, T3 = 500 g seawater fed mussels, T4 = 100 g seawater fed mussels, T5 = 58 g seawater unfed mussels. Bars represent the mean shell length and error bars represent the standard deviation.

Atelier sur les indicateurs de stress, le 24-26 fev. 2003, Qc

Starfish Mussel Interactions
J. Copp (2000):

Dry Tissue Weight, NS

Figure 7: Dry tissue weight (mg) of individually tagged mussels exposed to various concentrations of waterborne starfish. T1 = control, T2 = 10 g seawater fed mussels, T3 = 500 g seawater fed mussels, T4 = 100 g seawater fed mussels, T5 = 58 g seawater unfed mussels. Boxes represent the median and whiskers represent the range.

Dry Shell Weight, NS

Figure 8: Increase in dry shell weight (mg) of individually tagged mussels exposed to various concentrations of waterborne starfish. T1 = control, T2 = 10 g seawater fed mussels, T3 = 500 g seawater fed mussels, T4 = 100 g seawater fed mussels, T5 = 58 g seawater unfed mussels. Bars represent the mean shell weight and error bars represent the standard deviation.

Atelier sur les indicateurs de stress, le 24-26 fev. 2003, Qc

Starfish Mussel Interactions
J. Copp (2000):

Shell Height, $P < 0.03$

Figure 9: Change in individual mussel shell height among treatments for 10 starfish mussels. Bars represent the mean shell height and error bars represent the standard deviation.

Shell Height, NS

Figure 10: Change in individual mussel shell height among treatments for 10 starfish mussels. Bars represent the mean shell height and error bars represent the standard deviation.

Atelier sur les indicateurs de stress, le 24-26 fev. 2003, Qc

Starfish Mussel Interactions
J. Copp (2000):

Shell Roundness index declined in all fed starfish treatments relative to unfed star or controls

Figure 11: Shell Roundness Index results at the start and end of experiment.

Atelier sur les indicateurs de stress, le 24-26 fev. 2003, Qc

Starfish Mussel Interactions
J. Copp (2000):




Figure 10: Starfish Mussel Interactions: Clearance rate (NS) for treatments T1, T2, T3, T4, T5.

Atelier sur les indicateurs de stress, le 24-26 fev. 2003, Qc

Starfish Mussel Interactions
J. Copp (2000):

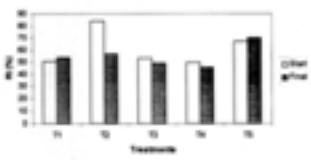



Figure 11: Shell Breakdown Index results at the start and end of experiment.

Atelier sur les indicateurs de stress, le 24-26 fev. 2003, Qc

Starfish Mussel Interactions
J. Copp (2000) conclusions:

1. Cultured mussel growth can be affected by the presence of feeding starfish
2. Cultured mussels exposed to starfish-released substances produce rounder (thicker?) shells, as do wild mussels



Atelier sur les indicateurs de stress, le 24-26 fev. 2003, Qc

Indicators of Mussel Shelflife
T. Peckham (1999):

- Standardized shelflife tests can be employed by the industry to evaluate post-harvest performance and quality
- Two types principally: total bacterial loads, and assessment of mortality following air exposure at 2-4C in 100% humidity

Atelier sur les indicateurs de stress, le 24-26 fev. 2003, Qc

Indicators of Mussel Shelflife
T. Peckham (1999):

Mussel shelflife varies among lots from different farms, and this is related to environmental conditions at the farm and corresponding mussel condition

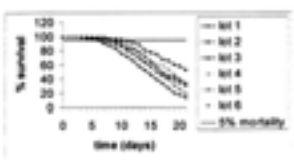


Figure 1: Average percent survival of each mussel lot stored at 4°C. Shelf life begins at 5% mortality.

Atelier sur les indicateurs de stress, le 24-26 fev. 2003, Qc

Indicators of Mussel Shelflife
T. Peckham (1999):

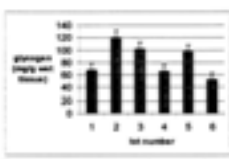
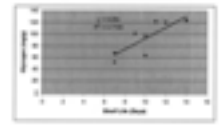


Figure 2: Average glycogen concentration (mg/g wet tissue) for each lot of mussels.

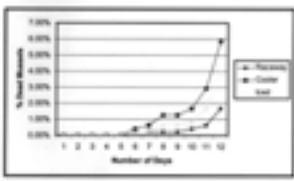
Glycogen content is related to shelflife in culture mussels in winter in NL



Atelier sur les indicateurs de stress, le 24-26 fev. 2003, Qc

Indicators of Mussel Shelflife
C. Cole (2001):

Cultured mussel shelflife varies as a function of post-harvest holding conditions (see Harding et al.)



Atelier sur les indicateurs de stress, le 24-26 fev. 2003, Qc

Mussel Responses to Socking
J. Bertrand (1999):

- Occasionally new products introduced to industry
- One such product included socking material that is woven, not extruded
- Noticed large losses of mussels post-deployment
- Sock deterioration about one year later

Atelier sur les indicateurs de stress, le 24-26 fev. 2003, Qc

Mussel Responses to Socking
J. Bertrand (1999):

Atelier sur les indicateurs de stress, le 24-26 fev. 2003, Qc

Mussel Responses to Socking
J. Bertrand (1999):

New socking
 Traditional socking

Atelier sur les indicateurs de stress, le 24-26 fev. 2003, Qc

Mussel Responses to Socking
J. Bertrand (1999):

Series of trials undertaken to investigate rates of drop-off

Figure 1: Schematic drawing of set up of Experiment 4.

Atelier sur les indicateurs de stress, le 24-26 fev. 2003, Qc

Mussel Responses to Socking
J. Bertrand (1999):

Cumulative drop-off significantly higher in new socking material ($P < 0.001$)

Atelier sur les indicateurs de stress, le 24-26 fev. 2003, Qc

Mussel Responses to Socking
J. Bertrand (1999):

Byssal thread production and attachment strength NS ($P > 0.05$)

Atelier sur les indicateurs de stress, le 24-26 fev. 2003, Qc

Mussel Responses to Socking
J. Bertrand (1999):

Valve closure response time affect ($P < 0.001$)

All lubricants 4 ppm

Atelier sur les indicateurs de stress, le 24-26 fev. 2003, Qc

Mussel Responses to Socking
J. Bertrand (1999) conclusions:

- Lubricant in new woven socking might account for loss of mussels post-seeding
- Lubricant altered mussel response behaviour significantly, in a fashion similar to hydrocarbon effects such as naphthalene

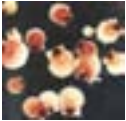
Atelier sur les indicateurs de stress, le 24-26 fev. 2003, Qc

Scallop Mass Mortalities
G. Hillier (1999):


1. Episodic mass of mortalities of giant scallops occur
2. One such event in 1988 resulted in 80%+ Mortality
3. Unknown bacterial pathogen isolated by Swab and grown in MA

Atelier sur les indicateurs de stress, le 24-26 fev. 2003, Qc

Scallop Mass Mortalities
G. Hillier (1999):

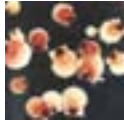


Scallop survival compromised at very low concentrations of the bacterium ($P < 0.01$ from Controls), over very short periods of exposure




Atelier sur les indicateurs de stress, le 24-26 fev. 2003, Qc

Scallop Mass Mortalities
G. Hillier (1999):




Scallop survival compromised at very low concentrations of the bacterium ($P < 0.01$ from Controls), over very short periods of exposure



Atelier sur les indicateurs de stress, le 24-26 fev. 2003, Qc

Scallop Mass Mortalities
G. Hillier (1999):




- bacterium "Photobacterium-like" based on FA
- specific to scallops (no lethality in mussels, clams, or oysters at elevated doses)
- Further work required to characterize and examine biochemical responses to challenges (e.g., NRA)

Atelier sur les indicateurs de stress, le 24-26 fev. 2003, Qc

Biochemical Indicators of Stress in Scallops
N. Penton (2003):





Atelier sur les indicateurs de stress, le 24-26 fev. 2003, Qc

Quelques indices de vitalité simples appliqués à la coquille Saint-Jacques européenne, *Pecten maximus* : aptitudes au retournement et à l'enfouissement.

Fleury, P.-G., S. Mary

Ifremer, Laboratoire conchylicole de Bretagne, La Trinité sur mer, France

Qu'est-ce qui différencie une coquille juvénile « apte au semis » (qui va survivre) d'une autre qui va mourir des diverses agressions du milieu ?

De nombreux critères de vitalité sont proposés pour les mollusques, mais restent subjectifs (couleur, forme de la coquille, bruit, comportement), létaux (biochimie), complexes (physiologie) ou peu sensibles sur quelques jours (index de condition).

Objectif

Notre objectif sera de trouver un indice simple, c'est-à-dire un test praticable par les professionnels. Les tests de comportement ont semblé les plus aptes à répondre à cet objectif. Mais, parmi ces tests, tous ne sont pas applicables à des juvéniles de coquille Saint-Jacques, *Pecten maximus* :

- La refixation par le byssus n'est plus fonctionnelle au-delà de 10 mm;
- L'aptitude à la nage paraît dépendante de la taille des animaux chez *P. maximus* : les petites (3 cm) semblent nager plus spontanément que les grosses (5 cm et +).

On a donc choisi de s'intéresser aux aptitudes au retournement (ou redressement) et à l'enfouissement, qui paraissent les plus pertinentes en ce qui concerne l'aptitude au semis. L'objectif de cette étude a été de qualifier ces aptitudes, c'est-à-dire d'en cerner les limites et de définir un test standard. On a ainsi cherché à étudier quatre qualités essentielles pour un test de vitalité :

- La fiabilité : cohérence des mesures sur des animaux de vitalité comparable ;
- La sensibilité : degré de différenciation de lots différents ;
- L'allométrie : variabilité des mesures en fonction de la taille ;
- La pertinence : cohérence avec d'autres tests de vitalité (non présentée ici).

Méthode

Les études ont été menées au laboratoire dans de petits bacs de 0,25 m², sans bullage (plus facile à standardiser, et facilitant les observations) :

- Soit sans sédiment, pour le retournement ;
- Soit avec un sédiment de sable d'environ 1 mm de diamètre, pour l'enfouissement.

Les animaux utilisés étaient des juvéniles de coquille Saint-Jacques *Pecten maximus* dans une gamme de taille de 18 à 38 mm, ce qui correspond à la taille de semis de ces animaux en France.

Parmi les divers paramètres descripteurs possibles pour quantifier la réponse aux épreuves de retournement ou d'enfouissement, on a surtout analysé ici la moyenne logarithmique des

temps de réponse aux tests.

Plusieurs modalités sont également possibles pour qualifier le degré de réalisation du test. Mais on a observé peu de stades intermédiaires (vertical ou demi-enfoui), ce qui fait qu'ils n'ont pas été pris en compte dans cette étude.

Fiabilité

La fiabilité a été étudiée avec deux expérimentations :

- En répétant les tests de jour en jour, avec les mêmes 30 coquilles (dites « en forme »); puis avec les mêmes animaux mais « fatigués » chaque jour par une émergence préalable de trois heures;
- En répétant les tests d'heure en heure, sur des coquilles « en forme ».

Sensibilité

La sensibilité a été étudiée avec deux expérimentations différents pour chaque test :

- 1^{re} méthode : en créant une gamme de fatigue des animaux par des émergences de 0, 2, 4 et 6 heures à température ambiante (20 °C).
- 2^e méthode : en affaiblissant progressivement les animaux par la répétition perpétuelle du test de retournement (retournement « non stop » : dès qu'une coquille se remet à l'endroit on la repositionne à l'envers).

Allométrie

L'allométrie a été étudiée par l'examen des corrélations entre les temps de réponse aux tests et la biométrie des animaux y compris les poids du muscle strié et du muscle lisse, organes essentiels dans les réponses de retournement ou d'enfouissement. Elle ne s'applique qu'à la gamme d'animaux utilisée ici, soit 18 à 38 mm (gamme assez large toutefois du point de vue des tailles usuelles au semis).

Pertinence

Enfin la pertinence devait être testée par comparaison avec les résultats d'autres tests de vitalité (force musculaire et survie à une épreuve standard) mais seuls quelques comparaisons partielles ont pu être réalisées.

Résultats

Test de retournement

Fiabilité

Expérimentation « de jour en jour » : On observe un résultat paradoxal le 1^{er} jour sur les huîtres « en forme » avec des temps de réponse plus longs que ceux des jours suivants (stress du marquage?) Ensuite on observe une différence hautement

significative ($p < 0,1 \%$) entre les deux traitements (« en forme » et « fatiguées »), mais pas de différence entre les répétitions de l'expérience de chaque traitement.

On obtient un même résultat en répétant l'expérimentation d'heure en heure au lieu de chaque jour.

Mis à part le résultat paradoxal du 1^{er} jour, la fiabilité est donc acceptable et le temps de récupération apparaît être inférieur à une heure.

Sensibilité

Gamme de fatigue des animaux par des émergences de 0, 2, 4 et 6 heures à température ambiante (20 °C) : les performances diminuent légèrement quand le temps d'émergence (la « fatigue ») augmente. Mais l'étude semble avoir rencontré un artefact car les temps de retournements sont très longs : est-ce dû à une fatigue ou à une « humeur » initiale des animaux trop souvent manipulés par les expériences précédentes?

En ce qui concerne le test d'affaiblissement progressif des animaux par la répétition perpétuelle du test de retournement (retournement « non stop »), l'épreuve est apparue peu épuisante, les animaux ne présentant pas de baisse progressive des performances. Par contre on a observé un effet diurne décalé par rapport à la lumière du jour : lumière? bruits de la journée? effet diurne avec retard? On ne peut que constater cet artefact.

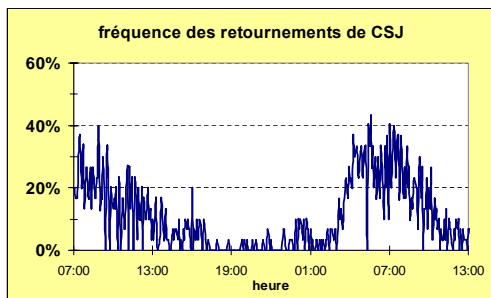


Figure 1 : Fréquence du nombre de redressements successifs d'un lot de coquille Saint-Jacques en fonction de l'heure de la journée.

Allométrie

On n'observe pas de relation entre les réponses aux tests et la taille des coquilles, du moins dans la gamme étudiée : 18 à 38 mm ($r^2 = 0,07$). On n'observe pas de corrélation non plus avec d'autres paramètres biométriques, y compris les poids de muscle lisse ou de muscle strié.

Pertinence

Le test de retournement (impliquant la capacité de nage) est *a priori* pertinent pour des semis, mais sa cohérence avec d'autres indicateurs (force musculaire et survie à une épreuve standard) n'a pas pu être vraiment testée.

Test d'enfouissement

D'une manière générale, les résultats des tests d'enfouissement sont très comparables à ceux des tests de retournement.

Fiabilité

Il est étonnant de constater le même résultat inattendu le premier jour (temps de réponse plus long que les autres jours, et cette

fois-ci pour les deux lots « en forme » et « fatiguées ») dans l'épreuve de fiabilité des résultats de jour en jour. Les temps de réponse des autres jours sont comparables.

En répétant l'épreuve d'heure en heure plutôt que de jour en jour, on ne constate pas non plus de différence. Mis à part le résultat paradoxal du 1^{er} jour, la fiabilité est donc validée ici aussi et le temps de récupération inférieur à une heure.

Sensibilité

On obtient encore des résultats très comparables à ceux de l'épreuve de retournement : les performances diminuent légèrement quand le temps d'émergence préalable (la « fatigue ») augmente. Mais les durées d'enfouissement sont très longues en raison, sans doute, des mêmes causes : fatigue ou « humeur » initiale des animaux trop manipulés par les expériences précédentes?

Dans l'expérience des réenfouissements « non-stop », on observe le même effet diurne décalé par rapport à la lumière du jour que pour l'épreuve de retournement (figure 2).

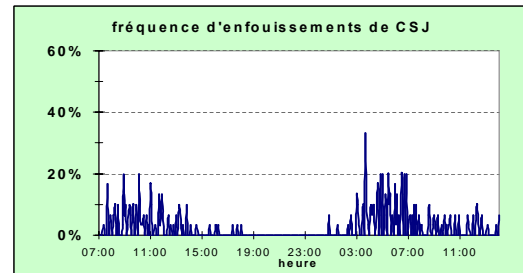


Figure 2 : Fréquence du nombre d'enfouissements successifs d'un lot de coquille Saint-Jacques en fonction de l'heure de la journée.

Allométrie

On observe la même absence de corrélation entre les temps d'enfouissement et la biométrie des animaux (poids des muscles inclus). Ce test est donc lui aussi indépendant de l'allométrie.

Pertinence

La similitude de résultats entre test de retournement et test d'enfouissement est déjà un élément d'une certaine cohérence (sinon une pertinence) des résultats. Cependant, comme pour l'épreuve de retournement, la corrélation avec d'autres tests n'a pas pu être vraiment testée.

Conclusion

Les résultats de ces expériences et les conclusions qui en découlent ne sont évidemment applicables qu'à la coquille européenne *Pecten maximus*, et pour la taille d'animaux de semis (gamme de 18 à 38 mm) :

- Fiabilité et sensibilité acceptables à condition d'éviter certains artefacts;
- Allométrie : pas de problème d'allométrie;
- Pertinence probable, mais non vraiment testée par comparaison avec d'autres indicateurs.

Concernant les artefacts observés, on peut émettre certaines hypothèses et recommandations. Il apparaît (cycle quasi diurne

notamment) que l'activité des animaux varie selon l'heure de la journée et que les animaux ne répondent pas toujours au maximum de leur capacité à se retourner ou à s'enfouir. Si leur état «naturel» est d'être à l'endroit et enfoui dans le sédiment, ils semblent s'accommoder très bien d'un état temporaire à l'envers ou non enfoui. Ceci pourrait interpeller fortement sur la fiabilité de telles épreuves. Il semble cependant qu'après l'apprentissage (?) d'une première fois, les performances soient plus stables.

On ne peut que recommander la répétition des épreuves dans de tels tests, et le besoin d'un effectif suffisamment conséquent (30 animaux au moins pour pallier à l'« humeur » potentielle de certains animaux).

En dehors de ces conditions, les deux tests s'avèrent simples d'emploi et praticables par la profession (même si le test d'enfouissement suppose un sédiment relativement standard : sable fin).

La précision de ces tests pourrait en outre être améliorée par le couplage des deux tests dans un test standard unique avec une réponse (après deux heures?) décrite et quantifiée selon plusieurs modalités (cf. travaux de Julie Maguire). Par exemple, en partant d'animaux posés à l'envers hors sédiment :

0 = À l'envers, hors sédiment

0,25 = Vertical hors sédiment

0,5 = Posé à l'endroit hors sédiment

0,75 = Demi-enfoui (parfois vertical mais dans le sédiment)

1 = Enfoui (recouverte de sédiment).

Pratiquement, il conviendrait :

- 1) d'acclimater les animaux (30 minimum) pendant une journée, tant à leur environnement (bacs expérimentaux) qu'à la pratique des tests (les retourner et des déenfouir plusieurs fois);
- 2) de réaliser ensuite deux tests, l'un le matin, l'autre en fin d'après-midi avec les mêmes animaux.


La moyenne des notes de chaque animal (30 animaux x 2) à la fin de chaque épreuve (deux heures?) quantifierait le degré de vitalité du lot, particulièrement son aptitude à être semé en mer.

Physiological and behavioral indicators of stress induced by PSP toxins in *Mya arenaria*

MacQuarrie, S., M. Bricelj

National Research Council, Institute for Marine Biosciences, Halifax, Nova Scotia

PRÉSENTATION POWERPOINT



Physiological and behavioral indicators of stress induced by PSP toxins in *Mya arenaria*

Scott P. MacQuarrie and V. Monica Bricelj

Institute for Marine Biosciences, National Research Council,
Halifax, Nova Scotia, Canada

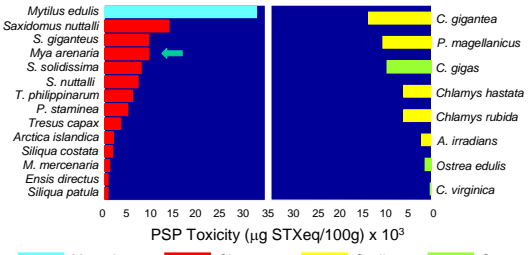
Funding provided by NOAA / ECOHAB (Ecology and Oceanography of Harmful Algal Blooms)

Research on shellfish stress responses currently underway at IMB

- 1) Burrowing & physiological responses to PSP toxins (US ECOHAB project).
- 2) Overwintering stress response in *M. mercenaria* juveniles. Stress proteins in response to cold & heat shock (collaboration with N. Ross & N. Brun, ACRDP project led by T. Landry, DFO).
- 3) Lipid classes & fatty acid composition as indices of nutritional condition in scallops (AquaNet NCE project).

BACKGROUND

Bivalve species differ up to 100x in their capacity for PSP toxin accumulation, as illustrated by historical toxicity maxima of field-toxified North American species (Source: Anderson et al. 2001 from data compiled by Bricelj and Shumway 1998)



Regulatory level = 80 µgSTXeq/100g

Nerve sensitivity of North American bivalve molluscs to saxitoxin

BIVALVE SPECIES	COMMON NAME	Block of action potential by STX (g ml ⁻¹)					SENSITIVITY
		10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	
<i>Mytilus edulis</i> ^a	blue mussel	0	0	0	0	0	nd
<i>Placopecten magellanicus</i> ^a	sea scallop	0	0	0	0	0	nd
<i>Humularia kennerleyi</i> ^b	Kennerly venus	0	0	0	0	0	(+)
<i>Mercenaria mercenaria</i> ^a	northern quahog	0	0	0	0	0	(+)
<i>Saxidomus giganteus</i> ^b	butter clam	0	0	0	0	0	nd
Sequim (always toxic)		0	0	0	0	0	(+)
Mukileto (non-toxic)		0	0	0	0	0	(+)
Hood canal (never toxic)		0	0	0	0	0	(+)
<i>Saxidomus nuttalli</i> ^b	Washington clam	0	0	0	0	0	(+)
<i>Geukensia demissa</i> ^a	ribbed mussel	0	0	0	0	0	+
<i>Mya truncata</i> ^a	truncate softshell	0	0	0	0	0	(+)
<i>Argopecten irradians</i> ^a	bay scallop	0	0	0	0	0	(+)
<i>Mya arenaria</i> ^{a,b}	softshell	0	0	0	0	0	(+)
<i>Tresus capax</i> ^a	fat gaper	0	0	0	0	0	(+)
<i>Protothaca staminea</i> ^b	Pacific littleneck	0	0	0	0	0	(+)
<i>Crassostrea virginica</i> ^a	eastern oyster	0	0	0	0	0	(+)

Modified from Bricelj & Shumway 1998; sources: a) Atlantic spp. Twarog et al. 1972; b) Pacific spp., Kvitek & Beitler 1991.
+: block; (+): partial block; 0: no effect.

RESEARCH GOALS

Test the following hypotheses:


Mya populations with different histories of toxin exposure vary in their sensitivity to toxins and capacity for toxin accumulation

Resistant clams predominate in red tide-affected areas.

Mya populations undergo genetic selection for resistance to PSP toxins in areas with a long-term history of PSP outbreaks.

Specific mutations in the Na⁺ channel pore region confer toxin resistance via differential binding affinity to PSP toxins


EXPERIMENTAL DESIGN FOR TOXIFICATION STUDIES



Softshell clams, *Mya arenaria*
Juveniles, 32 – 47 mm, toxified at 16°C, in sand, from:

- Lepreau Basin, Bay of Fundy, New Brunswick (NB):
 - ➡ recurrent, annual PSP outbreaks
- Lawrencetown Estuary, southeastern Nova Scotia (NS):
 - ➡ no PSP history

Exposed to



Alexandrium tamarense cf. *excavatum* (strain PR18b)
~ 60 - 106 pg STXeq/cell, unialgal suspension,
at bloom densities =100 cells/ml.

Characterization of *Mya arenaria* responses to PSP toxins:

- Burrowing activity & siphon retraction
- In vitro* nerve sensitivity to STX
- Feeding (clearance) rate
- Metabolic rate (VO₂)
- Toxin accumulation rate
- Mortality rate

PSP toxins differentially affect burrowing & siphon retraction of *Mya arenaria* populations depending on their history of PSP exposure

NB = long-term history of PSP
NS = no history of PSP

Modified from Bricelj & MacQuarrie, in press.

In vitro nerve test used to determine the sensitivity of individual clams to STX

Control Reduced action potential Full Block

Comparison of the Burrowing Index and the Nerve Assay (Bricelj et al., in press)

	Lepreau, NB	Lawrencetown, NS	Orleans, MA	Essex, MA
Burrowing Index	1997, n = 60	1997, n = 60	2000, n = 60	2000, n = 90
Nerve Test	2000, n = 11	2000, n = 13	2000, n = 12	2000, n = 12

■ Sensitive □ Resistant

Relative merits of the burrowing and nerve tests

	Burrowing index	Nerve test
Destructive	No	Yes
Reversible	Yes	Yes
Level of difficulty	Low	High; Instrumentation required
Time of assay	2 h assay following 24 h toxification	Time-intensive Requires no toxification
# of individuals assayed	Numerous (100+ /day)	~ 2 /day
Variability	Some over time	Highly reproducible
Clam size	Limited: small preferred	Limited: larger preferred for ease of nerve dissection
Allows detection of intermediate phenotypes	No	Yes
Applicability	Infaunal spp. only	Both infaunal and epifaunal spp.

Modified from Bricelj & MacQuarrie, in press.

PSP toxin accumulation rate in viscera of *Mya arenaria* (modified from Bricelj & MacQuarrie, in press).

— NB Resistant = burrowers — NS Sensitive = non-burrowers

Toxicity (µg STXeq/100g)

Toxin exposure period (days)

$y = 3145x + 371$ $r^2 = 0.97$

$y = 494x + 2459$ $r^2 = 0.74$

Sensitivity differences explain 6-8x variation in mean toxin uptake rate, and up to 52x in individual toxicity within ~2 wks of lab exposure to toxic *Alexandrium* cells.

Causes of toxin-induced clam mortalities?

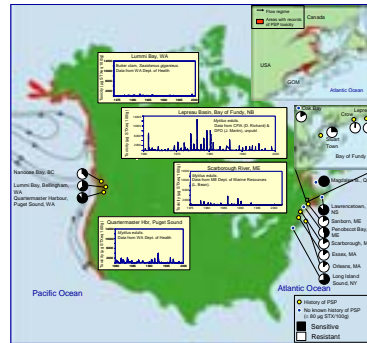
They were not associated with:

- Neoplasia
- Starvation
- Exposure out of sediment (effects of reduced substrate resistance on internal hydraulics)
- Histopathology (based on light microscopy)

Proposed mechanism:

Hypoxia associated with reduced irrigation of the pallial cavity

Map of PSP toxin resistance of North American *Mya arenaria* populations (determined using the burrowing index) (Bricelj et al., in press). Populations from Baie de Gaspé and the Gulf of St. Lawrence estuary (data not shown) were dominantly resistant (Bricelj & MacQuarrie, unpubl.)



References

- Anderson D., P. Andersen, V. M. Bricelj, J. Cullen and J. Rensel, 2001. Monitoring and Management Strategies for Harmful Algal Blooms in Coastal Waters, APEC #201-MR-01.1, Asia Pacific Economic Program, Singapore and Intergovernmental Oceanographic Commission Technical Series No. 59, Paris, 268 pp. http://www.whoi.edu/redtide/Monitoring_Mgt_Report.html
- Bricelj, V.M. and S. MacQuarrie. Intrinsic factors influencing the accumulation of PSP toxins in bivalve molluscs. Proc. of the Molluscan Shellfish Safety Conference, Santiago de Compostela, Spain, June 4-8, 2002, in press.
- Bricelj, V.M., S. MacQuarrie, B. Twarog and V. Trainer. Characterization of sensitivity to PSP toxins in North American populations of the softshell clam *Mya arenaria*. Proc. of the Xth Int. Conf. on Harmful Algae, Oct. 21-25, 2002, St. Pete's Beach, FL, in press.
- Kvitek, R. G. and M. K. Beitler, 1991. Relative insensitivity of butter clam neurons to saxitoxin: a pre-adaptation for sequestering paralytic shellfish poisoning toxins as a chemical defense. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 69:47-54.
- Twarog, B. M., T. Hidaka and H. Yamaguchi, 1972. Resistance to tetrodotoxin and saxitoxin in nerves of bivalve molluscs. *Toxicon*. 10: 273-278.

Quantifying stress in the scallop *Pecten maximus* in relation to aquaculture and dredging

Maguire, J.

Aquaculture Development Centre, University College Cork, Lee Maltings, Prospect Row, University College Cork, Cork, Ireland.

Introduction

The stress effects of various husbandry practices in aquaculture such as the transportation of scallop juveniles and the fishing practice of returning undersized animals to the seabed (<110mm shell height) has received little attention. Transport mortality has been shown to be as high as 50% in some cases (Maguire *et al.*, 1999a). Similarly, Shepard and Auster (1991), estimated that damage to scallops left behind in the dredge track can be as high as 7 % on sandy bottoms and 25 % on rock bottoms. Discard scallops have also been shown to be more susceptible to predation. Caddy (1973) observed that predatory fish and crabs were attracted to dredge tracks within one hour of dredging at densities of up to 30 times greater than in areas outside the tracks.

Transport and dredging induced stress can be assessed in scallops using a variety of biochemical indicators. Maguire *et al.* (1999b) discussed the usefulness of various techniques for stress assessment in scallops and found Adenylic Energetic Charge (AEC) and behavioural indices to be the most effective in the measurement of acute stress. AEC was first proposed as a stress index by Atkinson (1968) and is defined by the ratio:

$$\text{AEC} = (\text{ATP} + 0,5\text{ADP})/(\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP})$$

where: ATP = adenosine tri-phosphate, ADP = adenosine di-phosphate and AMP = adenosine mono-phosphate.

The AEC ratio varied from 0 to 1 i.e. 0 (all nucleotides were energy deficient AMP molecules) or 1 (all nucleotides were energy rich ATP molecules). In optimal conditions animals typically displayed AEC levels >0,8 while under stress conditions values ranged from 0,5 to 0,75. Such animals had a reduced growth rate and did not reproduce, but recovered when returned to optimal conditions. Severely stressed animals yielded values of <0,5 and these animals had a negative scope for growth and did not recover (Duncan, 1993; Ivanovici, 1980). Many studies on bivalves have been carried out using AEC as a stress index e.g. the oysters *Crassostrea gigas* (Moal, *et al.* 1989b) and *C. angulata* (Madureira *et al.*, 1993) the mussels *Mytilus edulis* (Wijsman 1976) and *M. galloprovincialis* (Isani *et al.*, 1997) and the scallops *Placopecten magellanicus* (de Zwaan *et al.*, 1980; Livingstone *et al.*, 1981) and *P. maximus* (Duncan, 1993; Fleury *et al.* 1997; Maguire *et al.*, 1999a,b, 2002a,b,c).

Behavioural changes in bivalves have been used as a stress index in many species for example, the reccensing and righting ability of the scallop *P. maximus* (Maguire *et al.*, 1999c, 2002a,b, Minchin *et al.*, 2000), reccensing in the scallop *Mizuhopecten yessoensis* (Tyurin, 1991), activity in the freshwater mussel *Anodonta cygnea* (Salanki & Varanka, 1976), shell closure in the mussel *Mytilus edulis* (Coleman and Trueman, 1971; Kramer *et al.*, 1989), valve movement in the mussel *Dreissena polymorpha* (Sluyts *et al.*, 1996), burrowing in the marine clam *Venerupis decussates* (Stephenson & Taylor, 1975), valve movement in the cockles *Cerastoderma edule* and *C. glaucum* (Boyden, 1972) and valve movement and burrowing in the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* (Byrne *et al.* 1990).

Both field and laboratory trials were carried out, for some of the laboratory experiments a dredge simulator was used. A dredge simulator was used in these experiments to eliminate certain variables e.g. ground type and weather conditions that field studies may create. During the exploratory phase of these experiments a mechanical scallop was developed that measured acceleration and angle of pitch and roll of scallops in the dredge bag. Measurements were taken every 0,1 seconds for 10 minutes. The measurements taken from a « real » dredge were compared to those taken from the simulator. The simulator was fine tuned until there was no difference in the acceleration and angle of pitch and roll between the « real » and simulated dredge. A speed of 22 rpm in the simulator equated to 2,5 knots in a « real » dredge. Maguire *et al.* (2002a) showed that the AEC levels in scallops sampled from a dredge were similar to those sampled from the dredge simulator for the same time period.

The aim of this study was;

- To measure the essential environmental parameters and the levels of AEC in juvenile scallops during transport (wet and dry) and look for any correlation with length of journey and stocking density;
- The effect of dredging on both AEC levels and the reccensing and righting ability of undersized dredged scallops. Both laboratory (using a dredge simulator) and field experiments were carried out to examine the stress effect of different; dredge tow lengths, tow speeds, scallop sizes and also the stress effect of emersion periods, repeated dredging and to determine any temporal and spatial variability in dredging induced stress. Also diving was undertaken to collect scallops, which encountered dredges but were not captured. AEC was measured to determine the extent to which these scallops were negatively affected by this experience.

Materials and Methods

Transport Trials

Three transport trials were carried out.

- 12 hour dry transport of scallops 63.5mm ± 4.9 (2 years old) in polystyrene boxes containing seaweed
- Fifty thousand overwintered one year old scallops (21.1mm ± 4.84) were transported by vivier lorry (24.75 hours) at a density of 7,9, 6,3, 4,6, 4,6, 9,2 and 9,2 scallops per litre.
- 10,425 two-year old scallops (51,54mm ± 3,54) were transported by vivier lorry (19 hours) at a density of 2,4, 2,3, 4,0 and 3,7 scallops per litre. 30 scallops were placed in a polystyrene box (0,5m³) placed on the floor of the vivier to simulate dry transport.

Samples for AEC and water quality analysis were taken at regular intervals and post-transport mortality was assessed. More detail of these trials can be found in Maguire *et al.* (1999a).

Dredging Experiments

Field Experiments

The scallops were caught using a Newhaven type spring-loaded dredge. Eight dredges were towed at a speed of 5 kph for forty five minutes. At least two tows per trial were sampled. At the end of each tow at least 15 scallops were taken from two random dredges and 10 control samples below the minimum legal landing size (<110 mm shell height). Samples of muscle and gonad tissue was taken for AEC and glycogen analysis. The following trials were carried out:

- Comparison of different seasons (March, June, October, February) in the Irish Sea;
- Comparison of different grounds in the Irish Sea Laxey (predominantly sandy with areas of dead maerl), Bradda (large numbers of pebbles and cobbles) and Chickens (intermediate amounts of pebbles);
- AEC levels in dredged scallops was compared to scallops found on and outside the dredge track by divers.

More detail on these trials can be found in Maguire *et al.* (2002c).

Laboratory Experiments

All scallops used in the laboratory experiments were under-size (<110 mm shell height) and were collected from the west coast of Ireland. For each experiment five replicates of four scallops were used per treatment. Each replicate was a separate dredge event. The dredge simulator was originally a meat turner, which rotates at an angle of 45° at variable speed (figure 1). It consists of a stainless steel barrel (diameter 60 cm; depth 80 cm), powered by two motors each 3.8/220 Volts with 1,15/2 Amps. Small rocks, stones and sand were placed in the simulator, which was constantly filled with seawater through a hose at a flow rate of 9 l/sec. The scallops were placed in a mesh bag and suspended from a rope across the top of the barrel. After dredge simulation ten scallops per treatment were sampled for AEC analysis and behaviour was monitored for the remaining 10 animals. Recovery was also monitored. The following laboratory experiments were carried out.

The effects of tow length (0 (no dredge simulation) 15 or 30 minutes respectively) and scallop size; small (59,1 ± 4,8 mm), medium (70,9 ± 2,2mm) and large (81,7 ± 3,6 mm) on stress levels were examined. A second experiment examined the effect on scallops of a 0 or 45 minute simulation on small (72,9 ± 3,4mm) or large (107,6 ± 8,7 mm) animals.



Figure 1 : Dredge simulator.

The combined effect on scallops of dredging (0, 15 or 30 minutes dredge simulation) followed by an emersion period of 0 or 6 hours was examined.

The stress effect on scallops of speed (11 rpm or 22 rpm) and duration (0, 15 and 30 minutes) in the simulator was assessed.

- Repeated daily dredging was examined for three days at different speeds (11 rpm and 22 rpm) and for different durations in the simulator (0, 15 and 30 minutes).

More detail on these experiments can be found in Maguire *et al.* (2002a,b).

Adenylic Energetic Charge

The scallops were rapidly dissected and a small portion (0,2 g) of the striated adductor muscle was removed and placed in liquid nitrogen. It was stored and analysed within one month using the technique of Moal *et al.* (1989a).

Behavioral Studies

The scallops were labeled with a permanent marker and placed upside-down (flat side down) in a tank with recirculating seawater. The bottom of each tank was covered with 10 cm of sediment (collected from a scallop bed) with a predetermined granulometry of "sandy silty gravel" as defined in the Wentworth scale. The righting and recessing time was monitored every 12 hours for 72 hours (unless otherwise stated). The scallops were recorded as recessed = 3 (completely covered by substrate), semi-recessed = 2 (half covered by sediment), righted = 1 (flipped over but not recessed) or not righted = 0. The sum of the individual scores was calculated every 12 hours.

Statistical Analyses

After testing for normality, non parametric data were normalized by log transformation or arcsine square root transformation. One-way analyses of variance (ANOVAs) were used to test significant differences between treatments and a *posteriori* Tukey test was used to contrast treatments. The level of significance was set at 0.05.

Results and Discussion

Transport Trials

AEC levels in scallops (figure 2) remained high after 24,75 hours of vivier transport in trial two (0,54 – 0,69) and after 17 hours vivier transport in trial three (0,79 – 0,82) whereas after 12 hours of dry transport in trial one AEC levels in the striated muscle had significantly decreased ($F_{247,12} = 32.06$ $p < 0,01$) to 0,42.

Dredging Experiments

Field Experiments

Seasonal Field Trial

The AEC level (figure 3) decreased significantly in the dredged scallops from the control samples at each sampling period ($p < 0,001$). However, the AEC levels of the control samples varied throughout the year but not significantly. The highest AEC levels in the control animals were found in October (0,90 ± 0,01)

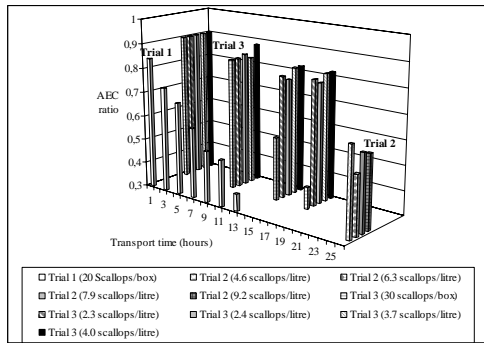


Figure 2 : Mean and standard deviation AEC levels in the striated muscle during transport in trial one, two and three (in Maguire *et al.* 1999a).

and the lowest levels were found in February ($0,77 \pm 0,05$). Because of this seasonal AEC variation in the control animals the % AEC decrease from the control to dredged scallops was calculated for each season. The AEC reduction was highest in February ($44,8 \% \pm 3,3$) and June ($43,4 \% \pm 2,9$) and significantly less ($F_{136,3} = 3,476, p < 0,05$) in March ($33,6 \% \pm 2,8$). The lowest absolute value of AEC in the striated muscle of scallops following dredging was also in February ($0,43 \pm 0,03$) and the highest was in October ($0,53 \pm 0,01$). The % glycogen content in the striated muscle of the animals showed a similar pattern to the AEC results found in the control animals. The lowest glycogen levels in the striated muscle were found in the scallops sampled in February ($4,38 \% \pm 0,27$), with levels over three times higher in October ($F_{165,3} = 83,32, p < 0,001$). Similarly, Moal *et al.* (1989b), also found that the AEC response to the stressor aerial exposure was different according to the time of year in the oyster *Crassostrea gigas*.

Comparison of scallops from different grounds.

There was no difference in the AEC levels of scallops dredged at different sites in June. The AEC level varied in scallops from 0,46 to 0,48 on all three grounds.

Stress in non captured scallops.

Scallops that came in contact with the dredge but remained uncaught had a significantly lower AEC level than the control scallops ($t69 = 7,401, p < 0,001$). However, the reduction in AEC

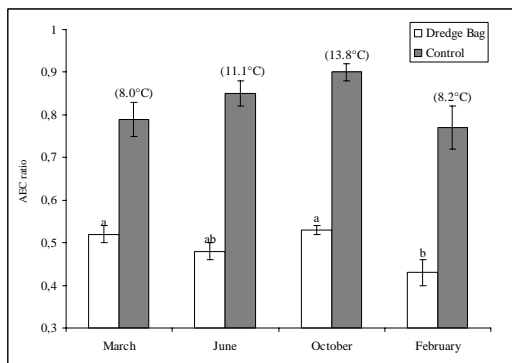


Figure 3 : The seasonal effects of dredging on the AEC level (mean \pm s.e.) of scallops from Chickens (March 2000 to February 2001). Sea water temperatures shown in parenthesis. Any two means sharing a common letter between each treatment are not significantly different at $p < 0,05$ (in Maguire *et al.*, 2002c).

was not as great as in captured scallops. Figure 4 showed that the AEC level in captured scallops was significantly lower ($t55 = 6,869, p < 0,001$) than in the non-captured scallops.

Laboratory Experiments

Experiment 1 : Stress in relation to the size of shellfish and tow length.

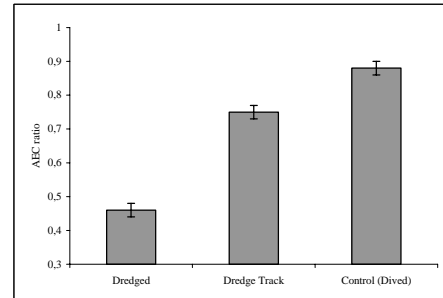


Figure 4. Comparison of the AEC levels (mean \pm s.e.) of dredged scallops and scallops left behind on the dredge track from Bradda in June (in Maguire *et al.* 2002c).

Similar AEC results were found between laboratory and field experiments. The smallest scallops had a significantly higher AEC level ($F_{88,2} = 4,58, p < 0,05$) than the larger animals (figure 5). The AEC levels in scallops significantly decreased ($F_{88,2} = 50,25, p < 0,001$) from the control (no dredge simulation) to animals treated to 15 and 30 minutes in the simulator. Scallops from these treatments (D to I) recovered significantly to within 5 % of their control levels ($p < 0,01$) when returned to seawater for three days. A similar pattern to the AEC results was found for the behaviour results (figure 6). In general the smaller scallops were more active than the larger animals and had a higher behavioural score. However this result was not significant. A significant difference was found ($F_{81,2} = 4,95, p < 0,01$) between the treatments with time as a variable, with the control animals (no dredge simulation) being significantly more active than scallops from the other treatments (15 and 30 minutes simulation). Similarly, after 45 minutes in the simulator the smaller animals had a higher AEC level ($0,51 \pm 0,15$) than larger animals ($0,38 \pm 0,17$) however not significantly. The AEC levels in scallops significantly decreased ($F_{45,1} = 53,11, p < 0,001$) from the control (no dredge simulation) to animals treated to 45 minutes in the simulator.

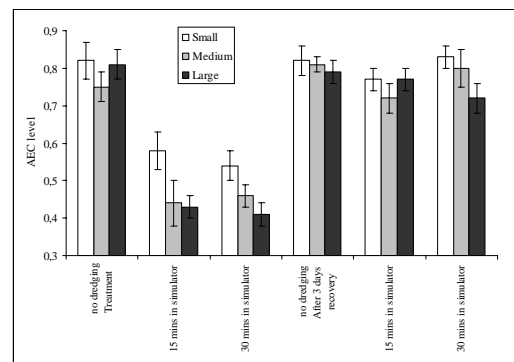


Figure 5 : The effect of simulated dredging for 0, 15 and 30 minutes on the AEC ratio (mean \pm s.e.) of different sized (60 mm, 70 mm and 80 mm) scallops (in Maguire *et al.* 2002a).

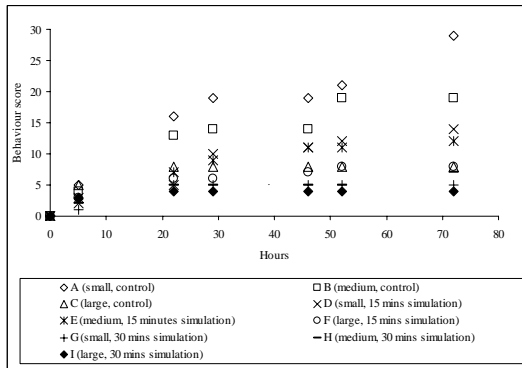


Figure 6 : The effect of simulated dredging (no dredging, 15 and 30 minutes) on the righting and recessing ability of different sized (60 mm, 70 mm and 80 mm) scallops (in Maguire *et al.* 2002a).

Experiment 2: Comparison of the effect of emersion and physical stress on scallops

A two way ANOVA was carried out and both emersion and dredge simulation had a significant effect on the AEC levels ($F_{59,1} = 10,78, p < 0,001$ and $F_{59,2} = 12,91, p < 0,001$ respectively) of scallops (figure 7). Again, there was no difference between the AEC level in scallops from treatment B (15 minutes in the simulator; $0,47 \pm 0,16$) and treatment C (30 minutes in the simulator; $0,47 \pm 0,19$). However scallop AEC levels decreased in treatment E (15 minutes in the simulator followed by a 6 hour emersion to $0,41 \pm 0,21$) and further decreased in treatment F (30 minutes in the simulator followed by a 6 hour emersion to $0,34 \pm 0,22$) but not significantly. Similarly Moal *et al.* (1989b) found a decrease in AEC levels in the oyster *Crassostrea gigas* after a 3 hour emersion period. Scallops from all treatments (B to F) significantly recovered once returned to seawater after three days ($p < 0,05$). For the behaviour experiments (Figure 8) the control scallops were most active in the first few hours and at the end of the 3 days period had a score of 20, which was exactly the same as treatment B (15 minute simulation). However the scallops from group B were more active after 6 hours in seawater so presumably needed this time to recover from the dredge simulator before righting and recessing. Group C (30 minutes simulation), D (6 hours emersion) and E (15 minutes in the simulator, 6 hours emersion) displayed a similar gradual increase in activity and at the end of the experiment had a score of 14, 15 and 13 respectively. Only 8 individuals righted themselves from group F (30 minutes in the simulator followed by a 6 hour emersion). A two way ANOVA was carried out and both emersion and dredge simulation had a significant effect on the righting and recessing ability of scallops ($F_{51,1} = 11,71, p < 0,001$ and $F_{51,2} = 5,5, p < 0,01$ respectively).

Experiment 3: Stress in relation to the speed and duration of tows

The speed of the simulator had an important impact on the AEC level of the treatment scallops (figure 9). The AEC decreased significantly from the control for all treatments ($F_{43,4} = 13,04, p < 0,001$). A Tukey test contrasted the treatments and there was no effect of length of simulation on AEC levels. However a significant difference was shown in the AEC levels between the scallops from the low to high speed treatments, which decreased from $0,70 \pm 0,03$ to $0,54 \pm 0,03$ respectively. Recovery was rapid and scallops from treatment B (15 minutes in simulator,

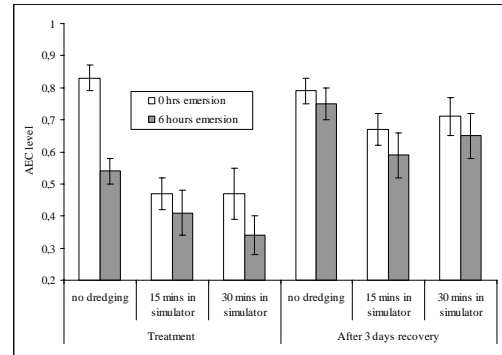


Figure 7 : The combined effect of simulated dredging followed by emersion on the AEC ratio (mean \pm s.e.) of scallops (in Maguire *et al.* 2002a).

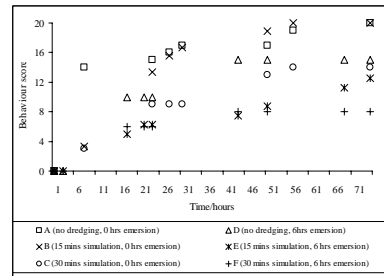


Figure 8 : The combined effect of simulated dredging followed by emersion on the righting and recessing ability of scallops (in Maguire *et al.* 2002a).

low speed) had AEC levels of $> 0,8$ after 2 hours. In the remaining scallop treatments (C-E) the AEC returned to levels of $> 0,8$ after 6 hours. The behaviour results are shown in figure 10. The control scallops were most active in the first few hours of the experiment and after 24 hours had a score of 22 and at the end of the 3 days period had a score of 24. At 24 hours, treatment B (15 minute simulation 11rpm) and treatment C (30 minutes simulation 11 rpm) had a score of 15 and 22 respectively which increased to 24 and 23 respectively after three days. Group D (15 minute simulation 22 rpm) and E (30 minute simulation 22 rpm) displayed a similar gradual increase in activity and at 24 hours had a score of 8 and 9 respectively and by the end of the experiment both groups had score of 14. An ANOVA was carried out after 24 hours recovery as this was the time when the non dredged scallops had recovered and speed had a significant effect on the righting and recessing ability of scallops ($F_{45,4} = 5,37, p < 0,01$) with groups D and E significantly different from group A. However there was no difference between groups A, B and C.

Experiment 4: Cumulative effects of scallop stress at different speeds

The cumulative effects of simulated dredging at 11rpm on the AEC levels of the test scallops are shown in figure 11. There was a significant decrease in AEC levels from a mean of $0,85 \pm 0,03$ in control scallops to $0,70 \pm 0,03$ after 15 minutes dredge simulation (Treatment B). AEC levels then significantly decreased further when the scallops were subjected to further dredging after 24 hours ($0,58 \pm 0,03$). No further decline was evident on repeated dredging at 48 hours. The results were similar for treatment C (30 minute dredge simulation, $T_0 = 0,66 \pm 0,05$; $T_{24} = 0,59$

$\pm 0,03$; $T_{48} = 0,57 \pm 0,03$). A two way ANOVA was carried out and both dredge simulation and repeated dredging had a significant effect on the AEC levels $F_{238,2} = 46,22$ $p < 0,001$. Recovery was rapid and AEC levels returned to normal in the scallops from treatment B after only 2 hours. In treatment C, after 2 hours recovery in seawater scallop AEC levels were between 0,7 and 0,8 but returned to $>0,8$ after a 24 hour recovery period. The behaviour results followed a similar pattern to the results from experiment 3 (figure 12). In the control group most of the animals righted and recessed during the first 24 hours after treatment. Activity was similar for treatments B (15 minute simulation) and C (30 minute simulation) after repeated dredging at time 24 and 48 hours. A two way ANOVA was carried out and only dredge simulation had a significant effect on the behavioural score ($F_{81,2} = 7,56$ $p < 0,001$). However, the cumulative effect of stress did not seem to have an added effect on behaviour.

At the higher speed (22 rpm) there was a slight decrease in the AEC levels for both groups B (15 minutes simulation) and C (30 minute simulation) following repeated dredge simulation

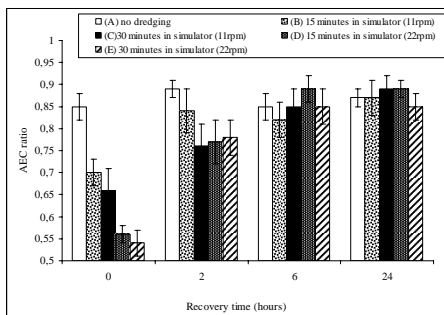


Figure 9 : The effect of simulated dredging (no dredging, 15 and 30 minutes) at two different speeds (11 rpm and 22 rpm) on the AEC ratio (mean \pm s.e.) of undersized scallops (in Maguire *et al.* 2002b).

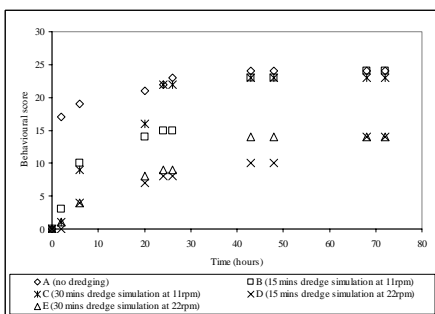


Figure 10: The effect of simulated dredging (no dredging, 15 and 30 minutes) at two different speeds (11 rpm and 22 rpm) on the behavioural score of undersized scallops (in Maguire *et al.* 2002b)

3 days in a row but it was not statistically significant (figure 13). All the experimental scallops significantly recovered after three days. The AEC decreased significantly from the control for all treatments (figure 5). A two way ANOVA was carried out and the length of tow had a significant effect on the AEC levels ($F_{89,2} = 46,22$ $p < 0,001$).

The behaviour results are shown on figure 14. The results displayed a similar pattern to the previous experiment. Scallop activity was similar for treatments B and C after 24 and 48 hours but

decreased after three days of successive dredge simulation. In treatment C (30 minutes daily simulation) the activity of the scallops did not increase further over the following days of recovery. The period between dredge disturbances was long enough for scallops to recover from the previous stress.

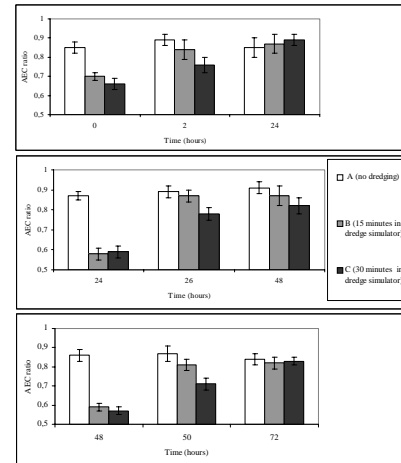


Figure 11 : The effects of daily simulated dredging (11rpm) and recovery on the AEC ratio (mean \pm s.e.) of scallops (in Maguire *et al.* 2002b).

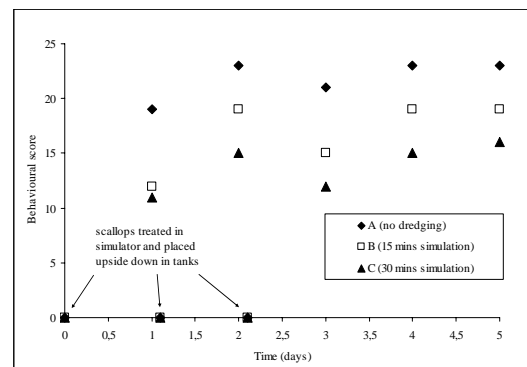


Figure 12 : Cumulative effects of daily simulated dredging (11 rpm) on the behavioural score of undersized scallops (in Maguire *et al.*, 2002b).

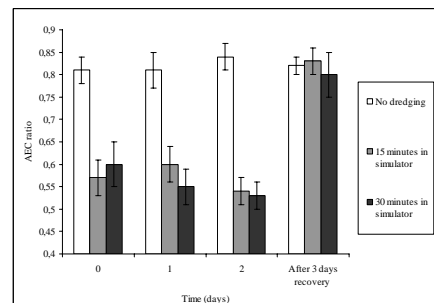


Figure 13 : The effects of daily simulated dredging (22 rpm) on the AEC ratio (mean \pm s.e.) of scallops (in Maguire *et al.* 2002b).

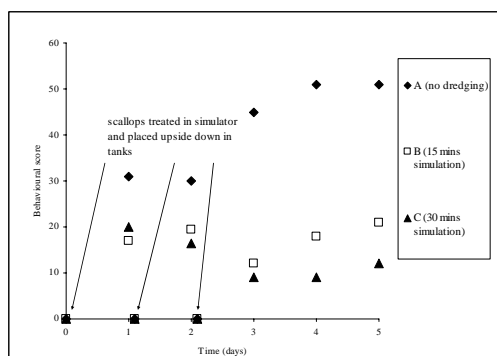


Figure 14 : Cumulative effects of daily simulated dredging (22 rpm) on the behavioural score of undersized scallops (in Maguire *et al.*, 2002b).

References

- Atkinson, D. E. 1968. The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. *Biochemistry*, 7, 4030-4034.
- Boyden, C. R. 1972. The behaviour, survival and respiration of the cockles *Cerastoderma edule* and *C. glaucum* in air. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 52, 661-680.
- Byrne, R. A., Gnaiger, E., McMahon, R. F., Dietz, T. H. 1990. Behavioral and metabolic responses to emersion and subsequent reimmersion in the freshwater bivalve, *Corbicula fluminea*. *Biol. Bull.* 178, 251-259.
- Caddy, J. F. 1973. Underwater observations of tracks of dredges and trawls and some effects of dredging on a scallop ground. *J. Fish. Res. Board. Can.* 30, 173-180.
- Coleman, N., E. R. Trueman. 1971. The effect of aerial exposure on the activity of the mussels *Mytilus edulis* L. and *Modiolus modiolus* (L.). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 7, 295-304.
- Duncan, P.F. 1993. Post-harvest physiology of the scallop *Pecten maximus* (L.). PhD Thesis, University of Glasgow, Scotland, 184pp.
- Fleury, P. G., C. Mingant, A. Castillo. 1997. A preliminary study of the behaviour of reseeded juvenile great scallops of three sizes in three seasons. *Aquaculture International* 4, 325-337.
- Isani, G., Serra, R., Cattani, O., Cortesi, P., Carpena, E., 1997. Adenylate Energy Charge and methallothionein as a stress indices in *Mytilus galloprovincialis* exposed to cadmium and anoxia. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 77, 1187-1197.
- Ivanovici, A.M., 1980. The adenylate energy charge in the estuarine mollusk, *Pyrazus ebeninus*. Laboratory studies of responses to salinity and temperature. *Comp. Biochem. Physiol.* 66A, 43-55.
- Kramer, K. J. M., H. A. Jenner, D. de Zwart. 1989. The valve movement response of mussels: a tool in biological monitoring. *Hydrobiol.* 188/189, 433-443.
- Livingstone, D.R., A. de Zwaan, R. J. Thompson. 1981. Aerobic metabolism, octopine production and phosphoarginine as sources of energy in the phasic and catch adductor muscles of the giant scallop *Placopecten magellanicus* during swimming and the subsequent recovery period. *Comp. Biochem. Physiol.* 70B, 35-44.
- Madureira, M.J., Picado, A.M., Ferreira, A.M., Mendonca, E., Le-Gal Y. 1993. PCB contamination in the oyster *Crassostrea angulata*: effects on lipids and adenylate energetic charge. Sloof W., de-Kruijff H. (eds), Proceedings of the Second European Conference on Ecotoxicology 1993 Vol. Suppl. Pts. 1-2.
- Maguire, J. A., D. Cashmore and G. M. Burnell. 1999a. The effect of transportation on the juvenile scallop *Pecten maximus* (L.). *Aquaculture Research*. 30:325 – 333.
- Maguire, J. A., P. G. Fleury, G. M. Burnell. 1999b. Some methods for quantifying quality in the scallop *Pecten maximus* L. *Journal of Shellfish Research*. 18:1:59 - 66
- Maguire, J. A., D. A. O'Connor, G. M. Burnell. 1999c. An investigation into behavioural indicators of stress in juvenile scallops. *Aquaculture International*. 7:169 – 177.
- Maguire, J. A., A. Coleman, S. Jenkins, G. M. Burnell. 2002a. Effects of dredging on undersized scallops. *Fisheries Research*. 56:2:155-165
- Maguire, J. A., S. Jenkins, G. M. Burnell (2002b) Effects of repeated dredging and speed of tow on undersized scallops. *Fisheries Research*. 58:3:367-377
- Maguire, J. A., M. O'Donoghue, S. Jenkins, A. Brand, G. M. Burnell. 2002c. Temporal and spatial variability in dredging induced stress in the great scallop *Pecten maximus* (L.). *The Journal of Shellfish Research*. 21:1:81-86
- Minchin, D., H. Skjaeggstad, G. A. Haugum, O. Strand. 2000. Righting and recessing ability of wild and native cultivated scallops. *Aquaculture Research* 31, 473-474.
- Moal, J., J. R. Le Coz, J. F. Samain, J. Y. Daniel. 1989a. Nucleotides in bivalves: extraction and analysis by high performance liquid chromatography (HPLC). *Comp. Biochem. Physiol.* 93B, 2, 307-316.
- Moal, J., J. R. Le Coz, J. F. Samain, J. Y. Daniel. 1989b. Responses and adaptations of adenylate energy charge and digestive enzyme activities to tidal emersion of *Crassostrea gigas* population in Marennes - Oleron Bay. *Sci. Mar. Barc.* 53, 2-3, 699-704.
- Shepard, A.N., P. J. Auster. 1991. Incidental (non-capture) damage to scallops caused by dragging on rock and sand substrates. Pages 219-230, Shumway, S.E. and Sandifer, P.A. (eds), An international compendium of scallop biology and culture. Baton Rouge. World Aquaculture Society.
- Salanki, J., L. Varanka. 1976. Effect of copper and lead compounds on the activity of the fresh-water mussel. *Annal. Biol. Tihany.* 43, 21-27.
- Sluyts, H., F. Van Hoof, A. Cornet, J. Paulussen. 1996. A dynamic new alarm system for use in biological early warning systems. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 8, 1317-1323.
- Stephenson, R. R., D. Taylor. 1975. The influence of EDTA on the mortality and burrowing activity of the clam (*Venerupis decussata*) exposed to sub lethal concentrations of copper. *Bull. Envir. Contam. Toxicol.* 14, 304-308.
- Wijisman, T. C. M., 1976. ATP content and mortality in *Mytilus edulis* from different habitats in relation to anaerobiosis. *Neth. J. of Sea Res.* 10, 1, 140-148.
- de Zwaan, A., R. J. Thompson, D. R. Livingstone. 1980. Physiological and biochemical aspects of the valve snap and valve closure responses in the giant scallop *Placopecten magellanicus*. II. *Biochemistry. J. Comp. Physiol.* 137, 105-114.

Compte rendu des discussions

Tremblay, R., F. Pernet, P.-G. Fleury

L'atelier a été l'occasion de présenter de nombreux indices de stress utilisés lors d'expériences avec des bivalves :

- en immunologie : phagocytose et activité antibactérienne, lysosomes, nombre et viabilité des haémocytes, apoptose.
- en biochimie : protéines de choc thermique, protéase, niveau de glycogène, charge des adénylates, les radicaux libres oxygénés, l'ATKase, les niveaux d'hormone, le « neutral red assay », les enzymes digestifs, les profils d'acide gras, etc.
- en morphologie : dissymétrie de la coquille.
- en biométrie : indice hépato-somatique
- et surtout en éthologie, compte tenu de la recherche d'un outil simple et pratique pour les aquaculteurs : nage, redressement, enfouissement, etc.

Les aspects génétiques d'aptitude au stress ont aussi été présentés au travers de l'exposé du programme MOREST (Ifremer, France) et de ceux de la mortalité massives des moules d'élevage aux Îles-de-la-Madeleine.

Lors des discussions, il a été rapidement convenu qu'il n'existe pas d'indice de vitalité universel, et qu'on a même un antagonisme patent entre les facultés d'adaptation à un stress court et celles à un stress long. L'approche méthodologique des programmes européens BIOMAR et BEEP d'éco-surveillance des milieux côtiers européens (réunissant une trentaine d'organismes) présentées lors de cet atelier semblait un très bon modèle pour le développement d'outil afin d'évaluer le stress des bivalve en élevage. Cette approche est caractérisée par :

- le catalogage des indicateurs du milieu;
- l'expérimentation commune, avec des mesures en aveugle sur les lots à comparer;
- le traitement statistique des résultats confié à un statisticien (neutre);
- le classement des indices selon les fonctions du milieu qu'ils caractérisent, et leur hiérarchisation dans ces fonctions, avec l'antagonisme que plus un indice est précis, moins il sera prédictif (comme pour la météo).
- la définition d'un panel d'indicateurs d'altérations du milieu globalisés dans un indice global grâce à une analyse discriminante des nombreux indices possibles qui a révélé les quels étaient les plus pertinents.

Cet atelier a permis également de commencer la classification des indicateurs selon les fonctions des organismes et également le type de stress imposé, tel que présenté dans le tableau suivant.

Finalement, les participants ont discuté de projet conjoint dans le cadre des Réseau Aquacole du Québec et particulièrement d'expérimentation commune permettant de valider plusieurs types d'indicateurs.

	Reproduction	Growth and metabolism	Vital function		
			Mobility	Immunology	Genetic
<i>Predation</i>		Basal Metabolic Rate (BMR), Adenylate Energy Charge (AEC)	BMR, AEC, Muscular strength (MS), Behaviour tests (BT)		
<i>Competition</i>		Scope for growth (SFG)	BMR, AEC, MS, BT		
<i>Aquaculture manipulation</i>	Gonad Histology (GH)	ROS, Neutral Red Assay (NRA), SFG	BMR, AEC, MS, BT		Heterozygosity (He), diploidy (2n)
<i>Emersion</i>	Sexual maturation (SM), GH	ROS, NRA, Oxygen-nitrogen ratio (ON)	BMR, AEC, MS, BT		Heterozygosity (He)
<i>Pathology</i>	SM, GH	ROS, NRA, ON	BMR, AEC, MS, BT	Haemocyte number, viability and apoptosis (HVA), Phagocytose and antibacterial activity (PAA)	
Stress					
<i>Temperature</i>	SM, GH	ROS, NRA, HSP, BMR, ON	BMR, AEC, MS, BT		He
<i>Salinity</i>		ROS, NRA, Total oxyradical scavenging capacity (TOSC), haemocytes, respiration rate	BMR, AEC, MS, BT		
<i>Pollution</i>	SM, GH	ROS, NRA, respiration rate, TOSC, SFG, ON, RNA:DNA ratio	BMR, AEC, MS, BT, TOSC, respiration rate	Membrane stability of haemocytes, HVA, PAA	Cornet test for DNA integrity, 2n
<i>O2</i>		ROS, NRA, TOSC	BMR, AEC, MS, BT, TOSC		



**Agriculture, Pêcheries
et Alimentation**

Québec 

07-0076