

**Etude de la décontamination
de moules toxiques
(Toxines diarrhéiques)
en laboratoire et
en milieu naturel.**

C. MARCAILLOU-LE BAUT, B. BARDIN, M. BARDOUIL,
M. BOHEC, L. LE DEAN, P. MASSELIN et P. TRUQUET.

Avec la collaboration de J.P. BAUD qui a mis à notre disposition les
installations de la station de Bouin.



DERO-90-02-MR

IFREMER
CENTRE DE NANTES
B.P n° 1049
44037 NANTES CEDEX 01
TEL. 40.37.40.00

DIRECTION DE L'ENVIRONNEMENT
ET DES RECHERCHES OCEANIQUES

DEPARTEMENT MILIEU ET RESSOURCES - NANTES

<p>AUTEUR (S) :</p> <p>MARCAILLOU-LE BAUT C., BARDIN.B., BARDONJI. M., BOHEC M., LE DEAN L., MASSELIN P. et TRUQUET P.</p>	<p>CODE :</p> <p>N° <u>DERO-90-02-MR</u></p>
<p>TITRE</p> <p>ETUDE DE LA DECONTAMINATION DE MOULES TOXIQUES (TOXINES DIARRHEIQUES) EN LABORATOIRE ET EN MILIEU NATUREL</p>	<p>date : 7 mars 1990</p> <p>tirage nb : 60</p> <p>Nb pages : 21 Nb figures : Nb photos :</p>
<p>CONTRAT (intitulé)</p> <p>N° _____</p>	<p>DIFFUSION</p> <p>libre <input checked="" type="checkbox"/></p> <p>restreinte <input type="checkbox"/></p> <p>confidentielle <input type="checkbox"/></p>

RESUME : Deux études de décontamination de moules toxiques (contenant des toxines diarrhéiques produites par le dinoflagellé *Dinophysis*) ont été réalisées l'une en laboratoire, l'autre dans une claire d'une station aquacole à partir de lots de coquillage peu et très toxiques (1 et 3 U.S). Les cinétiques ont été suivies par le test biologique sur souris adulte et par l'analyse chimique de l'acide okadaïque. Il en résulte qu'il faut une vingtaine de jours en claire pour que des moules très toxiques atteignent 0,5 U.S.g⁻¹ d'hépatopancréas, seuil généralement admis en Europe pour autoriser la mise sur le marché. Ce délai diminue quand la toxicité initiale est plus faible mais il augmente quand les moules n'ont pas à leur disposition une quantité de nourriture suffisante. Enfin, il apparaît une bonne corrélation entre la toxicité globale et le contenu en acide okadaïque.

ABSTRACT : Two studies of depuration, one in laboratory conditions and the other one in an oyster's pond were performed using 2 sets of contaminated mussels with diarrhetic toxins at a high and a low level (3 and 1 M.U). Depuration kinetics were followed both by the adult mouse test and okadaic acid analysis.

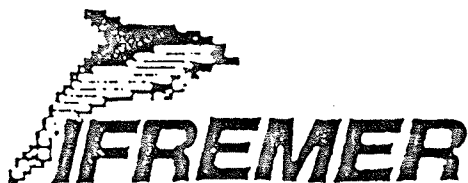
Results are :

- in the pond, high toxic mussels need about 20 days to become eatable (toxicity level : 0,5 M.U.g⁻¹ digestive glands),
- this time decreases when the initial toxicity is low but it increases when mussels are underfed.
- a good correlation is observed between the total toxicity and okadaic acid concentration.

Mots-clés : moules, toxines diarrhéiques, décontamination, acide okadaïque, test souris, *Dinophysis*.

Key-words : mussels, Diarrhetic Shellfish Poisoning (D.S.P.), depuration, okadaic acid, mouse test, *Dinophysis*.

© IFREMER - Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer.



SOMMAIRE

	<i>PAGES</i>
I - Introduction	1
II - Protocole expérimental	2
II - 1 Prélèvement et préparation des moules	2
II - 2 Montages expérimentaux	3
II - 3 Suivi de la décontamination	5
III - Résultats et discussion	8
III - 1 Les paramètres expérimentaux	8
III - 2 L'apport nutritif	8
III - 3 Cinétique de décontamination	13
IV - Conclusion	18
Bibliographie	20
Annexe	21

I - Introduction

A partir de la fin du printemps et en été, la présence d'algues toxiques dans les efflorescences phytoplanctoniques rend les moules impropres à la consommation. Un réseau de surveillance, basé sur un contrôle de la flore planctonique et des coquillages tout le long du littoral, a été mis en place pour garantir la santé publique.

Une méconnaissance des délais de contamination et de décontamination rend impossible toute prévision à court terme. Quand ces algues toxiques sont signalées dans le milieu, le réseau d'alerte est déclenché, entraînant une multiplication systématique du nombre de prélèvements dans l'espace et dans le temps. Ainsi, suivant les résultats des analyses toxicologiques, nous assistons à une succession d'interdictions et d'autorisations à la vente des produits conchyliques (généralement des moules) de la région concernée qui se traduit par une certaine confusion pour le marché comme cela a été constaté en 1986 (Belin et Berthomé, 1988).

Faute de disposer d'une culture de l'algue toxique, du genre Dinophysis, une étude de la contamination ne pouvait être envisagée ; par contre un suivi de la décontamination dans des conditions plus ou moins contrôlées, de moules toxiques, était réalisable et permettait d'apporter quelques éléments contribuant à l'optimisation d'un contrôle de routine.

En plus d'informations précises sur la méthodologie à adopter, les essais préliminaires réalisés en 1988 (Bardouil et al, 1989) nous ont appris qu'il fallait travailler à partir de moules suffisamment contaminées (toxicité supérieure à l'unité-souris par gramme d'hépatopancréas). Deux sites de prélèvements pouvaient répondre à cette exigence : ce sont la baie de Douarnenez (Morgat) et la zone d'Antifer au nord du Havre. De plus, si l'on se réfère aux résultats des années précédentes, seuls ces deux sites présentaient une répétition quasi-annuelle du phénomène. En effet, dès le début du mois de juin les moules de Morgat se révélaient toxiques, malheureusement à un niveau moins élevé que prévu, par contre fin juin à Sète (Méditerranée), les moules étaient interdites à la vente du fait de leur toxicité élevée. Nous avons donc travaillé avec des lots de coquillages en provenance de Morgat et de Sète.

L'étude de la décontamination a comporté deux expérimentations : l'une en laboratoire où les moules ont été maintenues en état de diète, l'autre dans une claire (bassin aquacole) où les moules sont restées immergées et ont donc pu s'alimenter en continu. La cinétique de détoxification a été suivie par deux méthodes : un test biologique sur souris et un dosage chimique de la toxine majoritaire.

II - Le protocole expérimental.

II - 1 Prélèvement et préparation des moules.

Afin de pouvoir réaliser deux cinétiques de décontamination dans la saison, le premier prélèvement de 50 kg de moules a été réalisé quelques jours après les premiers résultats toxicologiques positifs relevés par le réseau de surveillance, c'est-à-dire : le 6 juin à Morgat en Baie de Douarnenez (Fig. 1).

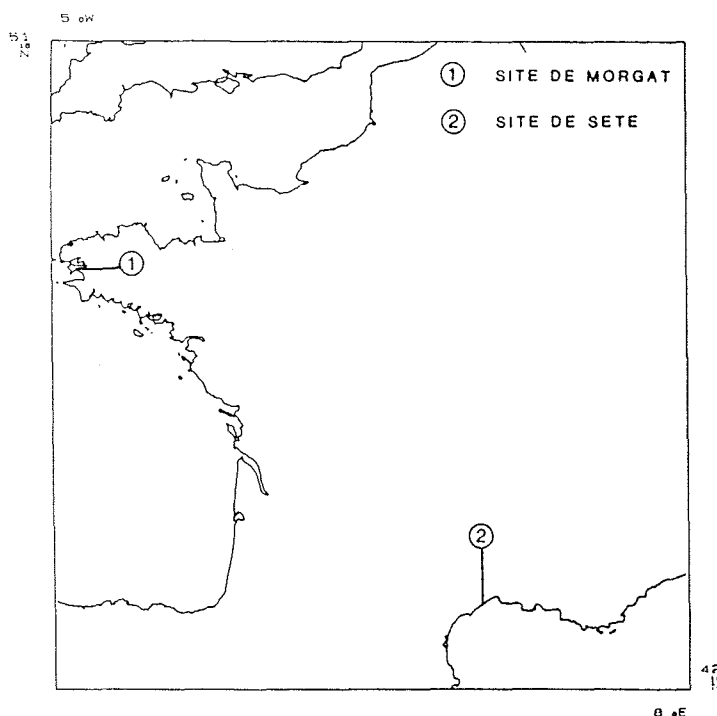


Figure 1 : Situation des sites de prélèvements des moules.

Le second prélèvement (100 Kg de moules) a été effectué le 26 juin à Sète en Méditerranée où le contrôle a révélé une toxicité très élevée, de l'ordre de 3 unités-souris, valeur qui n'avait jamais été observée jusqu'alors.

Les moules bretonnes et méditerranéennes ont été acheminées par camion réfrigéré jusqu'à Nantes où elles ont été aussitôt triées et nettoyées avant d'être réimmergées pour l'expérimentation.

II - 2 Montages expérimentaux.

II - 2 - a - En laboratoire :

Des lots de moules de 1,250 kg, en nombre au moins égal au nombre de prélèvements nécessaire pour étudier la décontamination, sont constitués et placés dans des bacs en plastique de 5 litres. Ces bacs sont alimentés par un flux continu d'eau de mer décantée avec un débit de 5 litres/heure, assuré par un système gravitaire (Fig. 2). L'installation est située dans une salle thermostatée à $16 \pm 1^\circ\text{C}$.

La nourriture est fournie une fois par jour sous forme d'une culture de Tetraselmis suecica (algue unicellulaire appartenant aux chlorophycées) à raison de $185 \cdot 10^6$ cellules. A cette occasion, s'il y a des coquillages morts, ils sont enlevés.

II - 2 - b - Dans la claire :

Plusieurs kilos de moules sont placés dans des paniers totalement immergés dans une claire de 60 cm de profondeur, alimentée en eau de mer à chaque marée, soit un renouvellement journalier de l'ordre de 400 %. L'apport alimentaire n'est pas limité et reflète au mieux la diversité du milieu naturel. La biomasse disponible est contrôlée une fois par semaine quantitativement par une mesure de chlorophylle a et qualitativement par une détermination des espèces phytoplanctoniques. Ce contrôle qualitatif permet de vérifier aussi l'absence de Dinophysis dans l'eau de la claire et d'exclure ainsi toute possibilité de recontamination.

II - 2 - c - Suivi de la qualité de l'eau :

Aussi bien en laboratoire que dans la claire, les concentrations en Oxygène (O_2) et en ammoniacque (NH_4) sont contrôlées régulièrement, pendant toute la durée de l'expérience. Le dosage de l'oxygène est réalisé par la méthode de Winkler, celui de l'ammoniacque par la méthode de Koroleff et les mesures de chlorophylle a (Chl. a) par la méthode de Lorenzen. Ces méthodes sont décrites dans le manuel des analyses chimiques en milieu marin (CN.E.XO., 1983).

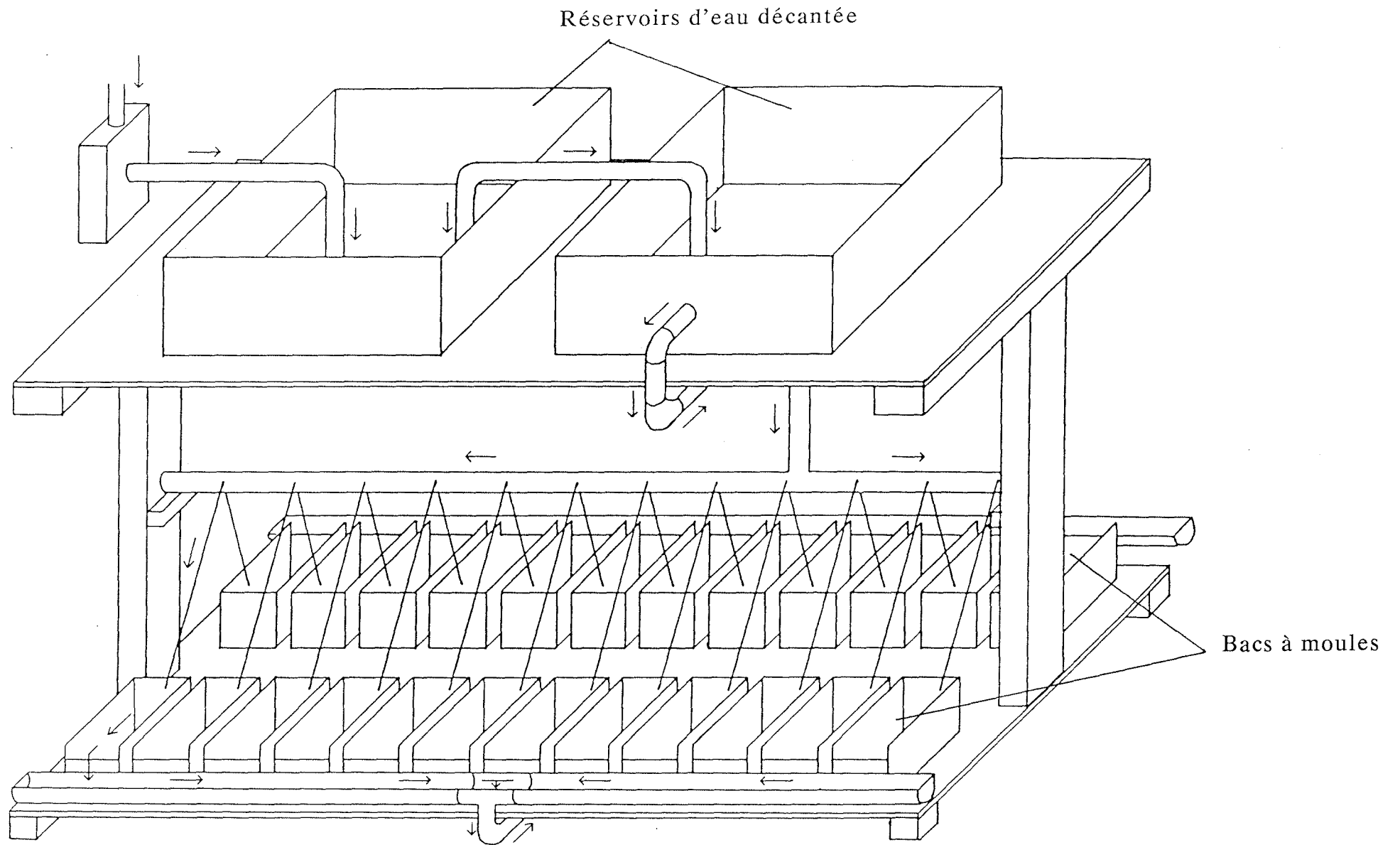


Figure 2 : Schéma de l'installation pour l'étude de la décontamination en laboratoire (————— : Circulation de l'eau).

II - 3 Suivi de la décontamination.

II - 3 - a - Fréquence des prélèvements.

Les résultats préliminaires obtenus en 1988 (Bardouil *et al*, 1989) ont montré qu'il fallait une durée d'étude d'au moins 40 jours en portant attention au début. Les jours (J) de prélèvement d'un lot de moules (1,250 Kg) ont donc été les suivants : J₀, J₂, J₇, J₁₀, J₁₄, J₂₁, J₂₈, J₃₅, J₄₂.

II - 3 - b - Extraction des toxines.

D'une manière générale, les moules sont ouvertes au couteau, les hépatopancréas sont prélevés et mis à égoutter. Toutefois, pour gagner du temps, les moules de Morgat ont été ouvertes au four à micro-ondes, ce qui entraîne une perte d'eau supérieure à un égouttage et revient donc à concentrer un peu plus les toxines. Ensuite, on utilise le mode opératoire suivant :

- Broyer 32 g d'hépatopancréas dans 100 ml d'acétone.
- Filtrer sur papier filtre.
- Reprendre le broyat, deux fois avec 40 ml d'acétone.
- Réunir les fractions acétoniques, évaporer l'acétone.
- Reprendre la phase aqueuse résiduelle dans 80 ml d'une solution à 80 % de méthanol.
- Transférer dans une ampoule à décanter.
- Laver la phase méthanol par agitation modérée (pour éviter une émulsion) avec 40 ml d'hexane, deux fois.
- Décanter, jeter l'hexane.
- Compléter à 96 ml avec la solution à 80 % de méthanol.
- Fractionner la phase méthanolique de la manière suivante : 90 ml pour le test souris, et 6 ml pour l'analyse HPLC.

Les échantillons, ainsi préparés, sont conservés à - 20°C.

II - 3 - c - Le test-souris.

On injecte à 3 souris mâles pesant de 18 à 20 g, 1 ml d'extrait en suspension dans une solution de Tween 60 à 1 %, puis on mesure le temps de survie des 3 souris. L'unité souris (U.S.) est la quantité de substance injectée (exprimée en équivalent de poids d'hépatopancréas) qui tue 2 souris sur 3 en 24 heures. L'inverse de cette quantité donne le nombre d'unités souris par gramme d'hépatopancréas ; il est d'autant plus faible qu'il faut injecter plus de substance.

Réalisation de l'extrait : On prélève un volume de la phase méthanolique correspondant à la quantité d'hépatopancréas que l'on veut injecter à 3 souris, sachant que 3 ml de cette phase équivalent à 1 g d'hépatopancréas. Puis on évapore le méthanol sous faible pression à température ambiante jusqu'à l'obtention d'un résidu pratiquement sec qui est finalement dissous dans 4 ml d'une solution de Tween. La quantité d'hépatopancréas à injecter sous forme d'extrait, à 1 souris, peut varier de 0,2 à 7,5 g en fonction de la toxicité de l'échantillon. Pour une quantité donnée, si les souris survivent, on augmentera la dose pour le test suivant, si elles meurent vite, on diluera l'extrait. De proche en proche, on cernera peu à peu la quantité définissant l'U.S.

Des témoins sont réalisés à partir de moules en provenance d'un site non contaminé.

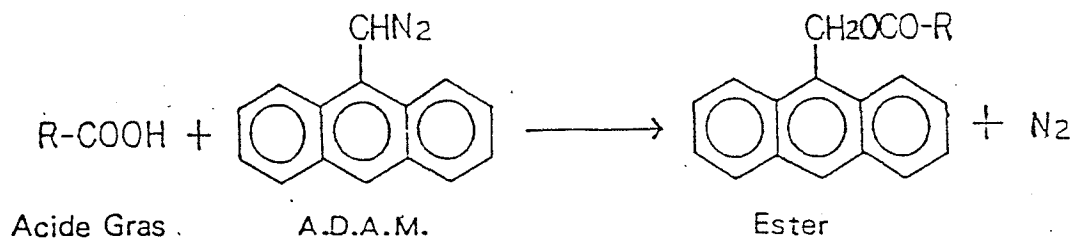
II - 3 - d - L'analyse chimique.

Elle consiste à doser l'acide okadaïque (A.O.), principale toxine du poison diarrhéique rencontré dans les coquillages en France, par chromatographie liquide à haute pression (C L H P). L'acide okadaïque qui est un acide gras polyétheré (formule brute : $C_{44}H_{68}O_{13}$ et poids moléculaire 804.) est estérifié par un réactif fluorescent puis chromatographié ; la détection se fait par fluorescence.

Mode opératoire.

Une partie aliquote de la phase méthanolique à 80 % est lavée deux fois à l'hexane afin d'éliminer les lipides et éventuellement le PSP. La phase méthanol est ensuite reprise deux fois avec du chloroforme. Après centrifugation, la phase chlorée est séchée sur sulfate de sodium. L'extrait est évaporé sous azote et repris par une solution méthanolique à 0,1 % d'anthyldiazométhane (ADAM : réactif de fluorescence pour le dosage des acides gras).

La réaction de dérivation s'effectue, à l'obscurité, pendant douze heures à température ambiante.



L'extrait est ensuite purifié sur des cartouches SEP-PAK au gel de silice. L'élution s'effectue successivement par 5 ml des mélanges de solvants suivant :

- Hexane/chloroforme 50/50.
- Chloroforme.
- Chloroforme/méthanol 95/5.

Les deux premières fractions qui contiennent les impuretés dues à l'échantillon et/ou à l'ADAM sont éliminées. L'analyse porte sur la troisième fraction qui contient l'ester de l'acide okadaïque. Cette fraction est donc recueillie puis évaporée, et enfin reprise par 100 μ l de méthanol. 10 μ l sont élués par HPLC et détectés par spectro-fluorescence.

Le dosage s'effectue par étalonnage externe à l'aide d'un étalon d'acide okadaïque, fourni par le professeur Yasumoto (Japon).

Conditions chromatographiques.

Phase stationnaire :	Superspher RP 18 4 μ m
Colonne :	(250 x 4) mm
Eluant :	CH ₃ CN/H ₂ O 80/20
Débit - Pression :	1.1 ml/min., 170 bars
Température :	35°C
Volume d'injection :	- 10 μ l - de 10 μ l à 50 μ l par pas de 10 μ l
Fluorescence :	λ exc : 365 nm. λ em : 412 nm filtre : 10 nm
Vitesse de l'enregistreur :	3.3 mm/min.

III - Résultats et discussion.

III - 1 - Les paramètres expérimentaux.

L'évolution de l'oxygène dissous et de l'ammoniaque au cours du temps est représentée sur les figures 3 et 4.

Dans la claire de la station expérimentale, nous constatons que l'eau est normalement oxygénée et a une faible teneur en ammoniaque.

Au laboratoire, les deux paramètres (NH_4 et O_2) varient beaucoup. En particulier, on observe des teneurs élevées en ammoniaque au début de l'expérience, peut-être dues à la mortalité de quelques moules survenues entre deux interventions. Ces mortalités ne peuvent s'expliquer que par le stress du transport puisqu'elles disparaissent en quelques jours.

III - 2 L'apport nutritif.

Dans cette étude, la quantité de nourriture réellement ingérée par les moules n'a pas pu être mesurée, mais on a cherché à l'estimer à partir des données de la littérature.

- Au laboratoire ; la ration quotidienne servie à chaque lot de moules représente un apport de chlorophylle a, d'environ 6 200 μg , pour 30 à 50 moules soit 250 g de chair humide ou 70 g de chair sèche (c.s.) si l'on tient compte d'une teneur en eau moyenne, estivale, de 72 % (pourcentage obtenu à partir de l'évolution mensuelle des teneurs en eau de moules de 5 cm cultivées sur bouchots dans le bassin de Marennes Oléron ; d'après S. Boromthanasarat 1986). Nous obtenons ainsi une estimation de l'apport nutritif égale à 88 $\mu\text{g Chl.a.g}^{-1}(\text{cs}).\text{jour}^{-1}$.

- Pour la claire, les résultats de la biomasse phytoplanktonique fournie, ainsi que les espèces dominantes, sont reportés dans le tableau 1. Pour évaluer la nourriture en équivalent Chl.a, nous avons retenu un taux moyen de filtration de 4 $\text{l.h}^{-1}.\text{g}^{-1}(\text{cs})$, d'après les résultats de W. Boromthanasarat (1986) obtenus à partir de moules de 4 cm expérimentées en eau estuarienne durant toute une année. On constate que la quantité de chlorophylle a varie d'un facteur 4 pendant la durée de notre expérience. Nous établirons donc un minimum

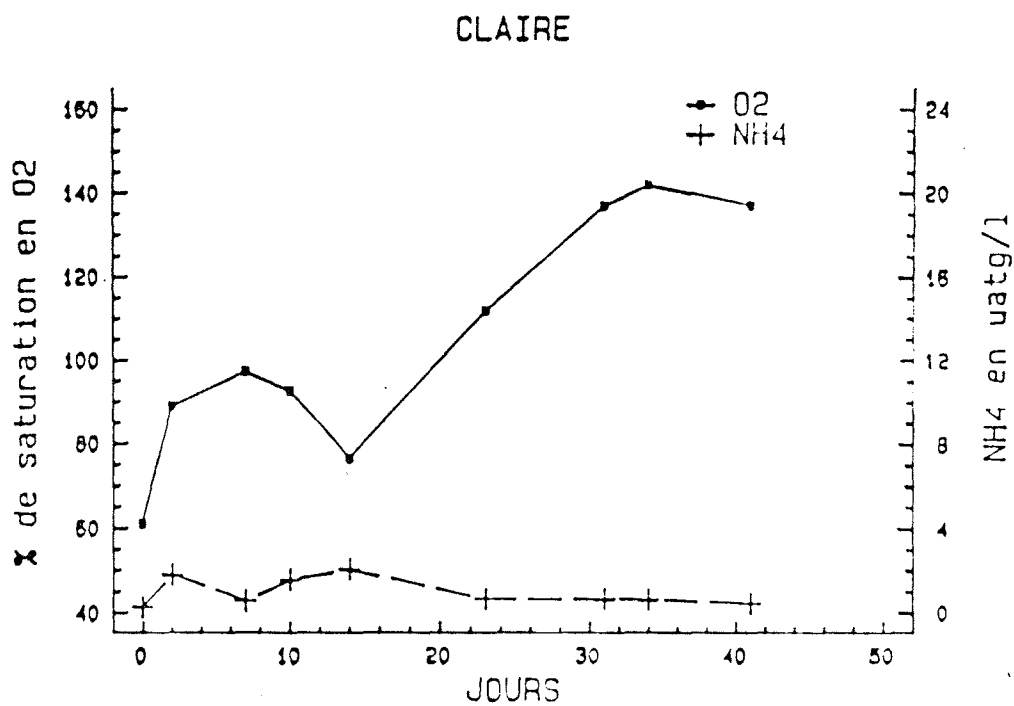
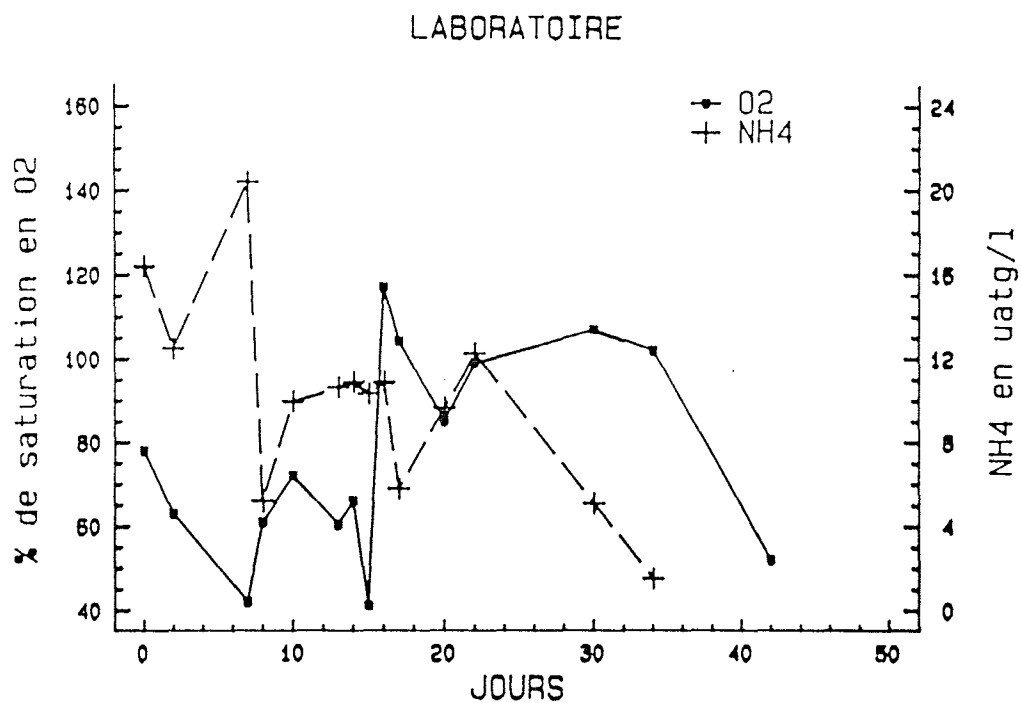


Figure 3 : Evolution de l'oxygène dissous et de l'ammoniaque au cours du temps en laboratoire et dans la claire
- Moules de Morgat -

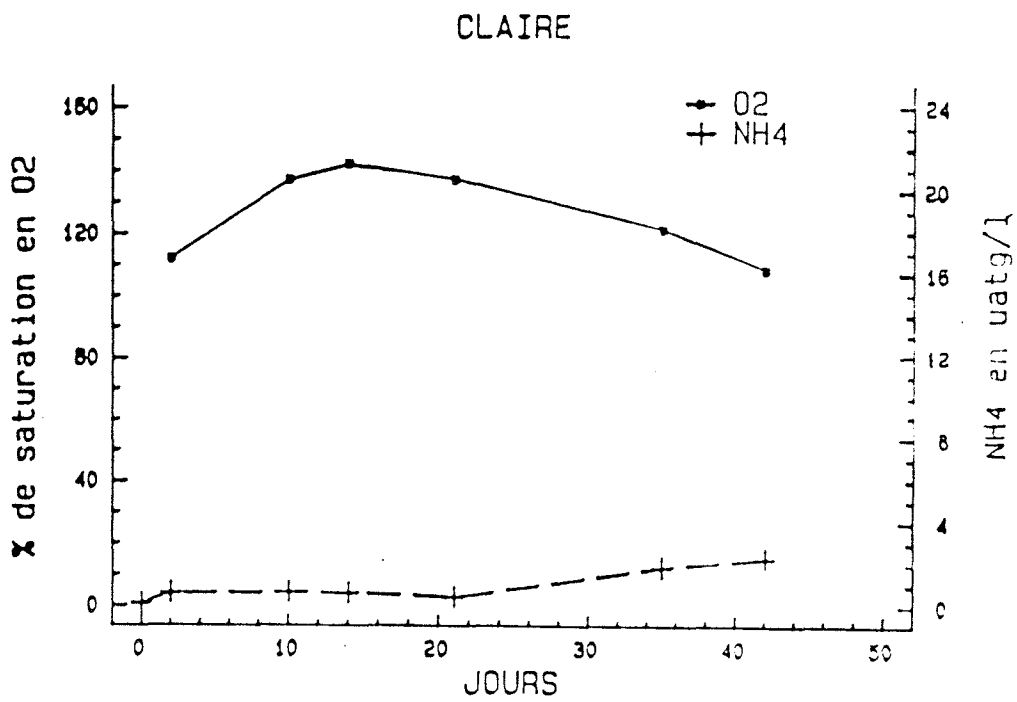
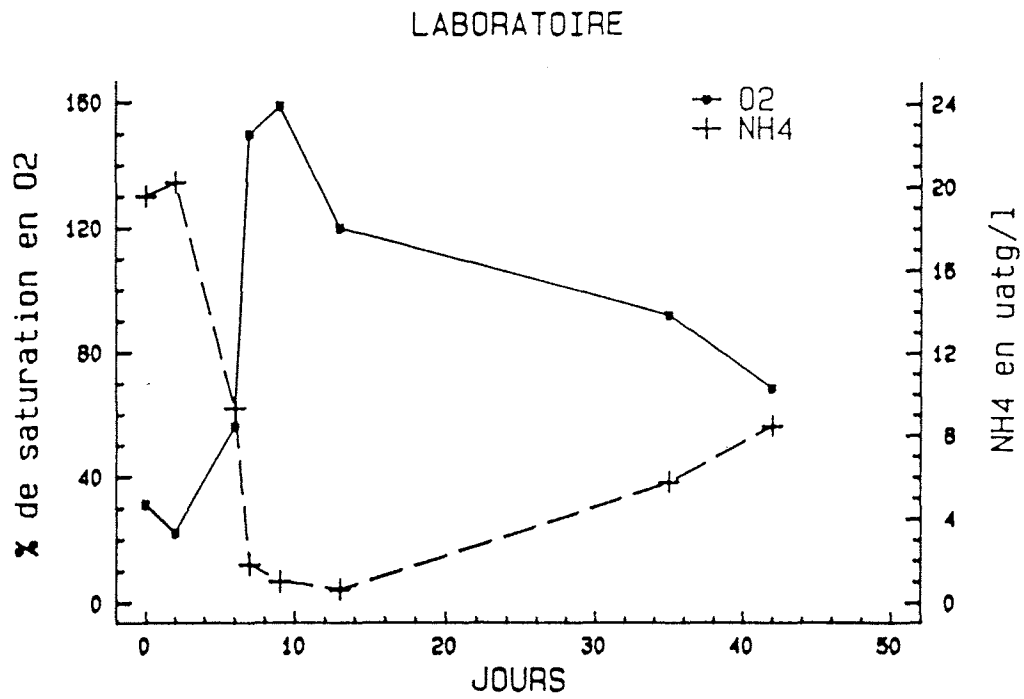


Figure 4 : Evolution de l'oxygène dissous et de l'ammoniaque au cours du temps en laboratoire et dans la claire
- Moules de Sète -

Tableau 1 : Quantité de chlorophylle a et espèces phytoplanctoniques présentes dans la claire au cours de l'expérimentation.

Date	Teneur en chl.a en µg.l ⁻¹	Quantité de chla disponible en µg.g ⁻¹ (cs).jour	Espèces présentes dans la claire													+ Présente ++ Abondante +++ Très abondante						
			<i>Chaetoceros sp.</i>	<i>Cocconeis sp.</i>	<i>Coscinodiscus sp.</i>	<i>Diploneis sp.</i>	<i>Melosira nummuloides</i>	<i>Nitzschia closterium</i>	<i>Nitzschia longissima</i>	<i>Nitzschia sp.</i>	<i>Pleurosigma sp.</i>	<i>Skeletonema costatum</i>	<i>Glenodinium foliaceum</i>	<i>Gymnodinium sp.</i>	<i>Helerothapsa triquetra</i>	<i>Proocentrum micans</i>	<i>Protoperidinium quinquecornu</i>	<i>Chlorophycées</i>	<i>Eutreptiella</i>	<i>Spores de macrophytes</i>		
6 Juin	6.5	624						++			+										+	
8 Juin	-	-								+	+											+
13 Juin	7.76	745						+		+	+	++		+	+	+				++		
16 Juin	-	-	+					+		+		+		+							+	
20 Juin	2.07	199			+		+	+			+											+
27 Juin	3.35	322					+	++				+									+	
4 Juillet	2.66	255					++			+												
11 Juillet	2.32	223		+			++					++									+	+
25 Juillet	2.03	195				+	+					++	+			+	+++				+	
1er Août	4.43	425		+									+									
8 Août	2.54	244														+						

et un maximum théoriques pour définir la consommation quotidienne dans la claire : $195 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}(\text{cs}) \cdot \text{jour}^{-1}$ et $745 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}(\text{cs}) \cdot \text{jour}^{-1}$ en considérant que les moules filtrent durant 24 heures.

Ces approximations montrent que l'apport en chlorophylle a est faible dans l'expérimentation au laboratoire.

De plus, en terme énergétique, les populations phytoplanctoniques naturelles, plurispécifiques sont 2 à 4 fois plus riches que les cultures monospécifiques (Strickland 1960). Ainsi pour l'évaluer, en l'absence de données plus précises, nous utiliserons un rapport carbone organique sur chlorophylle a, respectivement égal à 60 pour le phytoplancton. Puis nous appliquerons le coefficient calorique de Brody (1945) de 11,4 cal pour 1 mg de carbone organique pour calculer l'apport énergétique E (sachant que 1 cal = 4,185 Joules):

Au laboratoire :

$$E = (88/24) \times 16 \times 11,4 \cdot 10^{-3} \times 4,185 \approx 2,8 \text{ J} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}(\text{cs})$$

Dans la claire :

$$E \text{ min} = 6 \times 60 \times 11,4 \cdot 10^{-3} \times 4,185 \approx 17,2 \text{ J} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}(\text{cs})$$

$$E \text{ max} = 31 \times 60 \times 11,4 \cdot 10^{-3} \times 4,185 \approx 88,7 \text{ J} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}(\text{cs})$$

Si l'on compare ces valeurs à la quantité d'énergie nécessaire pour assurer un bon état physiologique (déterminée à partir de la ration retenue par les branchies, W. Boromthanasat, 1986) qui est de l'ordre de $10 \text{ J} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}(\text{cs})$ hors de la période de ponte, on constate que l'apport alimentaire est insuffisant au laboratoire. Il correspond à peu près à la ration de maintenance qui est, d'après W. Boromthanasat (1986), la quantité nécessaire pour maintenir la respiration et qui est 3 à 4 $\text{J} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}(\text{cs})$. Bien que nous n'ayons pas observé de mortalité, mise à part celles consécutives au transport, nous avons effectivement observé un certain amaigrissement en fin d'expérimentation.

III - 3 Cinétique de décontamination.

Les données brutes sont reportées sur l'annexe 1.

Le tableau 2 synthétise les résultats en donnant la perte de toxicité en pourcentage par rapport à la toxicité initiale, elle-même exprimée en U.S. et en concentration d'A.O.

Lieu d'expérimentation Origine des moules		En laboratoire			Dans la claire		
		J ₀	J ₄₂	%	J ₀	J ₄₂	%
Morgat	U.S/g	0.6	0.3	50.0	0.6	0.18	70.0
	(A.O.) u g/g	3.1	0.8	74.0	3.1	0.00	100.0
Sète	U.S/g	2.9	1.0	65.0	2.9	0.13	95.0
	(A.O.) u g/g	16.0	6.3	61.0	16.0	0.00	100.0

Tableau 2 : Synthèse des résultats de la décontamination réalisée en laboratoire et dans la claire.

Pour chaque expérience, les cinétiques de décontamination sont représentées par un graphique donnant les U.S. et la concentration en A.O. en fonction du temps (Fig. 5 et 6).

Avant de commenter ces résultats, une remarque doit être apportée au sujet de l'U.S., l'U.S. est une notion théorique ; dans la pratique la détermination précise du nombre d'U.S. est difficile, c'est pourquoi dans la plupart des cas, ce nombre est encadré

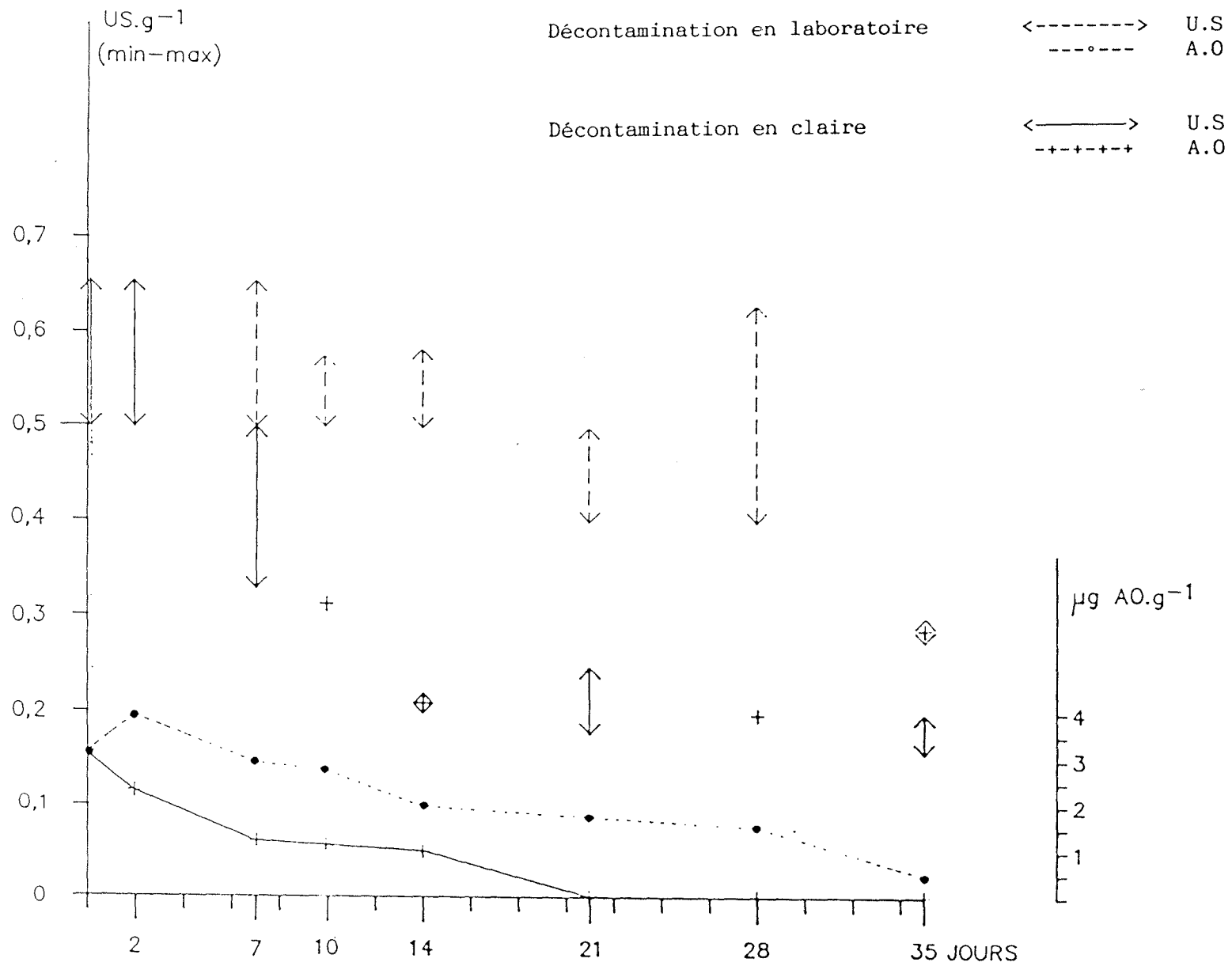


Figure 5 : Décontamination des moules de Douarnenez.

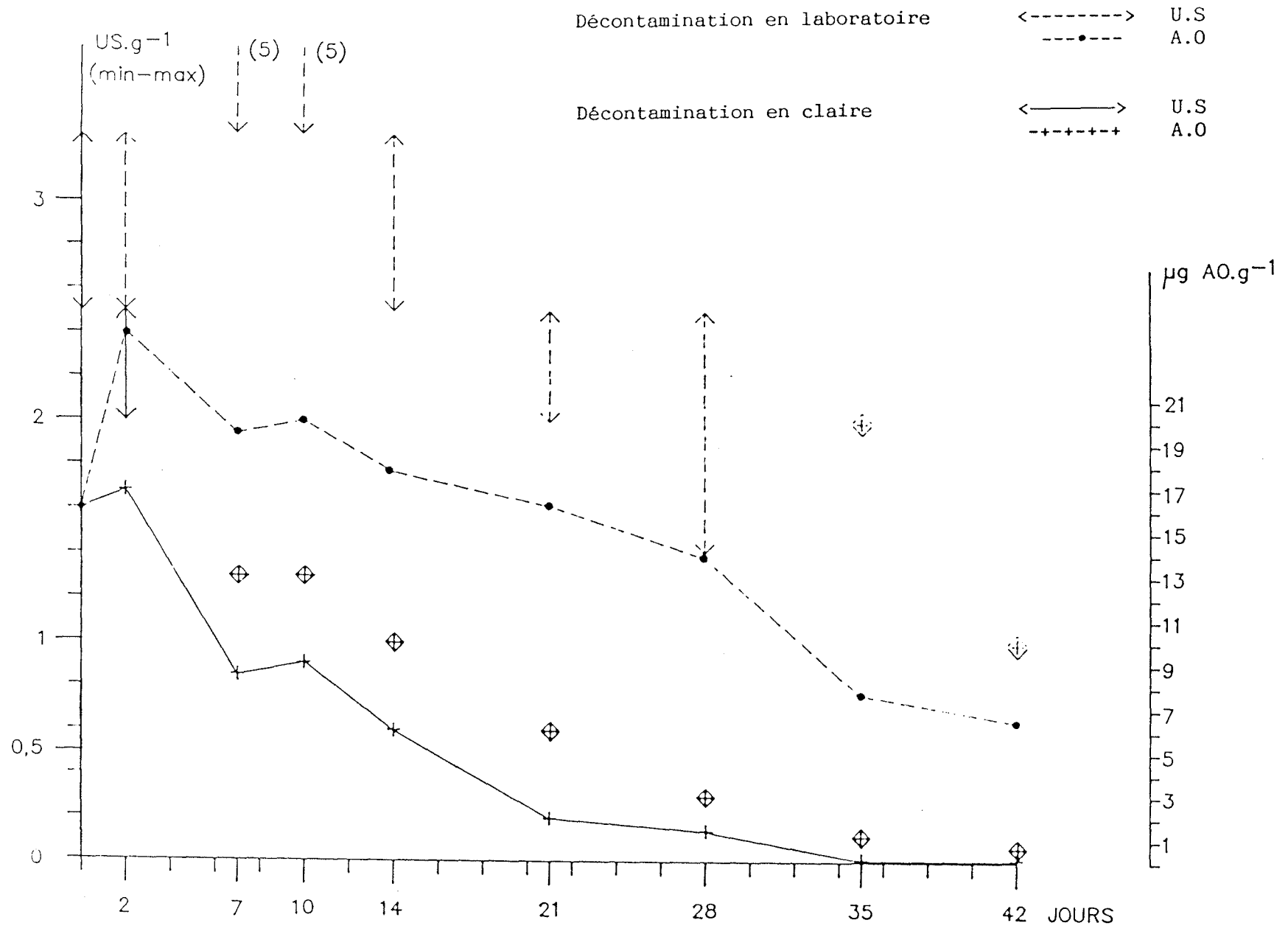


Figure 6 : Décontamination des moules de Sète.

par un minimum et un maximum entre lesquels il peut y avoir un écart important pour deux raisons :

- Quand l'échantillon est faiblement toxique, comme c'est le cas pour les moules de Morgat, il n'y a pas suffisamment d'extrait pour cerner le nombre d'U.S. par injections successives ;

- Quand l'échantillon est très toxique, une faible variation en poids d'hépatopancréas (0,1 g par ex.) entraîne une variation importante du nombre d'U.S. par gramme d'hépatopancréas.

D'après les figures 5 et 6, on constate une décontamination objective mise en évidence à la fois par le test biologique et l'analyse chimique. La vitesse de décontamination est plus rapide dans la claire, comparée à celle obtenue au laboratoire. De plus, dans la claire, cette vitesse est d'autant plus grande que la toxicité initiale est élevée, puisqu'au bout de 35 jours celle-ci est au-dessous de 0,2 U.S., que ce soit pour les moules de Morgat ou celles de Sète. On observe aussi un phénomène curieux, déjà noté l'année dernière : le deuxième jour, la concentration en A.O. est supérieure à la concentration initiale pour 3 cinétiques sur 4. Les résultats sur test souris confirment cette observation pour les moules de Sète mais avec 3 à 5 jours de retard. Une nouvelle contamination peut difficilement être invoquée pour expliquer ce phénomène : il s'agirait plutôt du résultat du stress dû au transport et au changement de milieu qui provoquerait une diminution des réserves des bivalves sans métabolisation de la toxine, ce qui se traduirait par une augmentation de sa concentration dans l'hépatopancréas. Une observation semblable a été décrite dans un rapport japonais : au cours d'une décontamination de coquilles St-Jacques transférées dans une zone salubre, la toxicité est passée de 1-2 U.S. à 3-4 U.S. au bout du 7ème jour (Rapport des préfectures de Miyagi et Aomori, 1987).

Par ailleurs, cette étude révèle que, dans les meilleures conditions expérimentales, la toxicité mesurée par le test souris n'est pas nulle au bout de 42 jours alors que la concentration en A.O. est au-dessous du seuil de détection dès le 28ème jour pour Morgat et dès le 35ème jour pour Sète. Les moules en provenance du site témoin non contaminé n'ont révélé ni de toxicité au test-souris, ni la présence d'A.O. à l'analyse. Suite à la décontamination, au-delà d'une trentaine de jours, il subsiste donc une substance toxique pour les souris qui ne serait pas de l'A.O.

La dose létale 24 heures de l'A.O. étant de 4 µg pour une souris de 20 g (Kumagai *et al*, 1986), si celui-ci est responsable de la quasi-toxicité, la valeur moyenne de l'U.S. doit être proche, aux variations expérimentales près, de ce nombre, qu'elle soit déterminée à partir de moules bretonnes ou de moules méditerranéennes.

Pour le vérifier, nous avons exprimé l'U.S. (quantité minimum d'hépatopancréas pour tuer 2 souris sur 3 en 24 heures) trouvée pour chaque prélèvement en quantité d'A.O. en tenant compte de sa concentration obtenue par analyse chimique (Tableau 3).

Morgat		Sète	
U.S.(g)	A.O. en μ g	U.S.(g)	A.O. en μ g
1.75	5.4	0.35	5.6
1.0	3.9	0.35	8.4
1.75	4.0	0.45	7.6
1.75	5.1	0.25	4.9
2.5	1.3	0.75	6.2
1.9	5.1	0.25	5.1
3.0	3.6	0.75	6.8
1.8	3.7	0.35	6.1
5.0	5.5	1.0	6.0
2.3	3.9	0.45	7.3
2.0	3.0	2.0	4.2
3.0	2.4	0.55	7.6
$m = 3.9$ $S_{n-1} = 1.3$		3.0	3.9
		0.45	3.5
		1.0	6.3
		$m = 5.9$ $S_{n-1} = 1.4$	

Tableau 3 : Calcul de la valeur moyenne de l'U.S. à partir des échantillons de Morgat et de Sète (S : écart type).

La comparaison des valeurs moyennes (m) de l'U.S. par un test (t) montre que leur différence n'est pas significative au risque de 10 %. Comme ces valeurs sont proches de la dose létale de l'A.O., il semble que dans les 2 cas étudiés, l'A.O. est responsable de la toxicité globale.

IV - Conclusion

D'après l'étude réalisée dans la claire, le délai nécessaire est :

- une trentaine de jours pour que des moules relativement toxiques ($3 \text{ U.S.} \cdot \text{g}^{-1}$) transplantées dans un site sans Dinophysis, ne présentent plus aucune trace détectable d'A.O.

- une vingtaine de jours pour que ces mêmes moules révèlent un niveau toxicologique inférieur à $0,5 \text{ U.S.} \cdot \text{g}^{-1}$, seuil de salubrité exigé au Japon et relativement admis en Europe.

Ce délai diminue quand la toxicité initiale est plus faible ; ainsi pour les moules de Morgat moins de 10 jours ont suffi pour être au-dessous de $0,5 \text{ U.S.} \cdot \text{g}^{-1}$.

Des observations semblables ont été rapportées par les Japonais qui ont noté qu'en 42 jours, après transfert en zone salubre, la toxicité des pectinidées diminuait de $2 \text{ U.S.} \cdot \text{g}^{-1}$ à $0,5 \text{ U.S.} \cdot \text{g}^{-1}$.

De même, en Suède, Haamer et ses collaborateurs (1990) ont réalisé une transplantation de moules relativement toxiques (entre 60 et $130 \mu\text{g}$ d'A.O. pour 100 g de chair) dans un secteur naturel non toxique ; ils ont aussi observé une diminution de la teneur toxique mais pas d'une manière continue. La décontamination moyenne obtenue sur 10 jours, compte-tenu des fluctuations journalières, a été évaluée à $12 \mu\text{g}$ d'A.O. pour 100 g de chair par jour. Pour tenter une comparaison avec ce que nous avons obtenu ; nous estimerons que le poids d'hépatopancreas représente environ 20 % du poids de chair humide hors période de ponte. Haamer et al (1990) observeraient alors une décontamination d'environ : $0,6 \mu\text{g A.O.} \cdot \text{g}^{-1}$ (hépatop) $\cdot \text{jour}^{-1}$ ce qui est du même ordre de grandeur que ce que nous observons pour les moules de Sète sur une période de 10 Jours, soit $0,8 \mu\text{g A.O.} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{jour}^{-1}$.

Quant à l'expérimentation en laboratoire, elle n'a pas apporté de résultats directement utilisables dans une application pratique car la décontamination a été beaucoup plus lente ; ainsi en 42 jours la toxicité des moules de Sète atteignait encore $1 \text{ U.S.} \cdot \text{g}^{-1}$.

Ce résultat est sans doute la conséquence de l'état de diète dans lequel ont été maintenus les bivalves. Il semblerait donc que la quantité de nourriture ingérée joue un rôle dans la décontamination. La dégradation de la toxine pourrait être liée au métabolisme du coquillage.

Enfin, indépendamment des conditions expérimentales et conformément aux résultats obtenus l'année précédente, il se confirme qu'une toxicité résiduelle ($0,2 \text{ U.S. } \cdot \text{g}^{-1}$) subsiste après 40 jours d'expérimentation alors que la concentration d'A.O. est inférieure au seuil de détection. Actuellement il n'est pas possible de fournir une explication à cette constatation ; on ne peut invoquer une toxicité intrinsèque à la moule vis à vis des souris puisque des moules prélevées à la même période dans un site non contaminé n'ont jamais provoqué la mort des souris ni même des symptômes inquiétants. On peut penser évidemment à d'autres toxines que l'A.O., ces toxines existant en quantité plus ou moins importante dans les coquillages japonais mais, pour le moment, nous n'avons pas les moyens de le prouver.

BIBLIOGRAPHIE

- Anonyme ; 1987 - Recherches techniques pour développer l'utilisation des coquillages périssables. Rapport des préfectures de Miyagi et Aomori. En japonais.
- BARDOUIL M., MASSELIN P. et BOHEC M. 1989. Cinétiques de décontamination en milieu contrôlé de moules toxiques (D.S.P.). Premiers résultats. Rapport IFREMER. DERO.89.02 - MR.
- BELIN C. et BERTHOME J.P. - 1988 - Bilan des perturbations phytoplanctoniques observées sur les côtes françaises en 1986. Rapport IFREMER - D.R.V. - 88 008 - CSRU Nantes.
- BOROMTHANARAT S., 1986 - Les bouchots à Mytilus edulis Linnaeus dans l'écosystème estuarien du bassin de Marennes-Oléron (France) : Aspects biologiques et bioénergétiques. Thèse 3ème cycle - Université d'Aix Marseille II . 141 p.
- BOROMTHANARAT W., 1986 - Ecophysiologie de Mytilus edulis L. dans le bassin de Marennes-Oléron : Alimentation et bilan d'énergie. Thèse 3ème cycle Université de Nantes. 104 p.
- BRODY S., 1945. Bioenergetics and growth - Reinhold Publishing Corp - New York 1023 p.
- HAAMER J., ANDERSSON P.O., LANGE S., LI X.P. et EDEBO L. - 1990. Effects of transplantation and reimmersion of mussels on their contents of okadaic acid - Dans "Toxic Marine Phytoplankton" Eds : E. Granéli, B. Sundström, L. Edler et D.M. Anderson. Elsevier, 554 p.
- HERAL M., DESLOU-PAOLI J.M. et SORNIN J.M. - 1983. Transferts énergétiques entre l'huître Crassostrea gigas et la nourriture potentielle disponible dans un bassin ostréicole : premières approches. Oceanis, Vol 9, Fasc. 3 pp 169-194.
- KUMAGAI (M.), YANAGI (T.), MURATA (M.), YASUMOTO (T), KAT (M.), LASSUS (P.) and RODRIGUEZ-VASQUEZ (J-A), 1986 - Okadaic acid as the causative Toxin of Diarrhetic Shellfish Poisoning in Europe. - Agric. Biol. Chem. 50 (11), 2853-2857.
- STRICKLAND J.D.H., 1960 - Measuring the production of marine phytoplankton. Bull. Fish. Res. Bd. Can. 122 : 1-172.
- Manuel des analyses chimiques en milieu marin - CNEXO, 1983.

ANNEXE

Résultats de la décontamination de moules contenant du D.S.P. exprimés par rapport au poids d'hépatopancréas frais.

Jours de prélèvement	Suivi au laboratoire			Suivi en claire		
	Toxicité U.S. . g ⁻¹		Toxicité µg A.O. . g ⁻¹	Toxicité U.S. . g ⁻¹		Toxicité µg A.O. . g ⁻¹
	min	max		min	max	
MORGAT						
J ₀	0.50	0.66	3.1	0.50	0.66	3.1
J ₂	-	-	3.9	0.50	0.66	2.3
J ₇	0.50	0.66	2.9	0.33	0.50	1.3
J ₁₀	0.50	0.57	2.7	0.33		1.2
J ₁₄	0.50	0.58	2.0	0.20	0.22	1.1
J ₂₁	0.40	0.50	1.7	0.18	0.25	0.0
J ₂₈	0.40	0.63	1.5	0.20		0.0
J ₃₅	0.28	0.30	0.4	0.16	0.20	0.0
J ₄₂	0.33		0.8	Pas de prélèvement		
SETE						
J ₀	2.5	3.3	16.0	2.5	3.3	16.0
J ₂	2.5	3.3	24.0	2.0	2.5	16.8
J ₇	3.3	5.0	19.4	1.30		8.3
J ₁₀	3.3	5.0	20.5	1.30		9.0
J ₁₄	2.5	3.3	17.5	1.00		6.0
J ₂₁	2.0	2.5	16.2	0.50		2.1
J ₂₈	1.4	2.5	13.8	0.30		1.3
J ₃₅	2.0		7.7	0.16		0.0
J ₄₂	1.0		6.3	0.13		0.0
J ₁₀₂	Pas de prélèvement			0.20		