

**DIRECTION DE L'ENVIRONNEMENT  
ET DE L'AMENAGEMENT LITTORAL**

**Dosage par C.L.H.P. des toxines paralysantes  
de coquillages contaminés par *Alexandrium minutum*  
en rivières de Morlaix et de la Penzé en 1994**

**par Pierre MASSELIN \*, Jean-Claude LE SAUX \*\*, Dominique LE GAL \*\*, et Patrick LASSUS.\***

\* Laboratoire Phycotoxines et Nuisances de Nantes

\*\* Laboratoire Côtier de Concarneau

**R.INT. DEL/96.04/NANTES**

## FICHE DOCUMENTAIRE

<b>Type de rapport :</b> R S T	
<b>Numéro d'identification du rapport :</b> R.INT. DEL/96.04/NANTES  <b>Diffusion :</b> libre <input checked="" type="checkbox"/> restreinte <input type="checkbox"/> interdite <input type="checkbox"/> <b>Validé par :</b>  Adresse électronique : - chemin UNIX :  - adresse WWW :	<b>date de publication</b> juillet 1996 <b>nombre de pages</b> 27 <b>bibliographie</b> (Oui)  <b>illustration(s)</b> (Oui)  <b>langue du rapport</b> français
<b>Titre et sous-titre du rapport :</b> Dosage par C.L.H.P. des toxines paralysantes de coquillages contaminés par <i>Alexandrium minutum</i> en rivières de Morlaix et de la Penzé en 1994.  <b>Titre traduit :</b>	
<b>Auteur(s) principal(aux) :</b>  MASSELIN Pierre*, LE SAUX Jean-Claude**, LE GAL Dominique**, LASSUS Patrick.*	<b>Organisme / Direction / Service, laboratoire</b>  *Laboratoire Phycotoxines et Nuisances B.P. 1105, 44311 Nantes Cedex 03  **Laboratoire Côtier de Concarneau 13, rue de Kérose - 29900 Concarneau
<b>Collaborateur(s) :</b> nom, prénom	<b>Organisme / Direction / Service, laboratoire</b>
<b>Organisme commanditaire :</b> nom développé, sigle, adresse	
<b>Titre du contrat :</b>	<b>n° de contrat Ifremer</b>
<b>Organisme(s) réalisateur(s) :</b> nom(s) développé(s), sigle(s), adresse(s)	
<b>Responsable scientifique :</b>	
<b>Cadre de la recherche :</b> Programme : <span style="float: right;">Convention :</span>  Projet : <span style="float: right;">Autres (préciser) :</span>  Campagne océanographique : (nom de campagne, année, nom du navire)	

## FICHE DOCUMENTAIRE

### Résumé :

La zone sensible des rivières de Morlaix et de la Penzé (Bretagne Nord, France) a fait l'objet pendant l'année 1994 d'un suivi régulier de la contamination des moules et huîtres sur parcs par les phycotoxines paralysantes. Les toxines ont été détectées par CLHP-AI, ces résultats comparés aux bioessais de routine utilisés par les Laboratoires Côtiers de l'IFREMER. Il apparaît que la contamination des coquillages suit de près l'apparition d'*Alexandrium minutum* dont la concentration minimale précédant la détection de toxines était de 400 cellules/l. La décontamination est rapide dans un premier temps, puis plus progressive ce qui permet de détecter des concentrations résiduelles de toxines dans les glandes digestives des bivalves trois mois après l'exposition. Les toxicités maximales sont inférieures au seuil de santé publique en rivière de Morlaix, mais dépassent ce seuil (maximum : 290 µg éq. STX/ 100g de chair) en Penzé pendant 15 jours. Cette différence s'explique par les valeurs des concentrations maximales d'*A. minutum* qui sont  $1,44 \cdot 10^6$  cellules/l pour la rivière de Morlaix et de  $7,98 \cdot 10^6$  cellules/l pour la rivière de la Penzé. Durant l'hiver, on ne note pas de contamination, ce qui laisse supposer que la toxicité potentielle des kystes de résistance n'a pas d'effet. Les deux principales gonyautoxines (GTX2 et GTX3) produites par *A. minutum* sont détectées dans la chair des coquillages contaminés, plus concentrées dans les glandes digestives, mais dans des proportions inversées par rapport au phytoplancton. A l'inverse des expériences de contamination pratiquées en laboratoire, on n'observe pas de formation de saxitoxine (STX). Enfin, la corrélation CLHP/ test souris n'est pas bonne ( $R^2 = 0,59$ ) du fait des faibles niveaux de toxicités trouvés et du faible échantillonnage.

### Abstract :

PSP toxin levels in cultivated mussels and oysters were monitored over a one year period (1994) in two keys areas, the Morlaix and la Penzé estuaries (Northern Brittany, France). Toxins were detected by IP-HPLC and results compared to those given by the bioassay routinely used by IFREMER Coastal Laboratories. Shellfish contamination seems closely related to *A. minutum* occurrences (the minimum concentration of cells resulting in toxin detection in mussels was 400 cells/l). Toxins were depurated rapidly initially, and subsequently at a slower rate, such that residual toxin levels were detected in mussel digestive glands three months later.

Maximum toxin levels were lower than the quarantine threshold level in Morlaix river, but exceeded this level (maximum : 290 µg STX eq./100 g meat) in la Penzé river over a 15 day period. This discrepancy is explained by the differing maximum concentrations of *A. minutum* at each site ( $1.44 \cdot 10^6$  cells/l in Morlaix river,  $7.98 \cdot 10^6$  cells/l in la Penzé). During winter no shellfish contamination was recorded, which suggests that potentially toxic resting stages had no effect. GTX2 and GTX3, the two predominant toxins found in *A. minutum*, were also detected in shellfish meat, with highest concentrations recorded in the digestive glands in inverse proportions to those found in the phytoplankton cells. In contrast with previous experimented results, no saxitoxin (STX) production was observed. Finally, the correlation between HPLC and the mouse test was not good ( $R^2 = 0.59$ ) due to the low toxicity levels in contaminated shellfish and too few samples.

**Mots-clés :** Toxines paralysantes, C.L.H.P., *Alexandrium minutum*, bivalves.

**Keywords :** PSP toxins, H.P.L.C., *Alexandrium minutum*, bivalves.

Commentaire :

# SOMMAIRE

	page
INTRODUCTION .....	2
MATERIEL ET METHODES .....	4
Rivière de Morlaix .....	4
Rivière de la Penzé .....	4
RESULTATS .....	8
Rivière de Morlaix .....	8
Rivière de la Penzé .....	17
DISCUSSION .....	21
BIBLIOGRAPHIE .....	23
ANNEXE 1 .....	25
ANNEXE 2 .....	26
ANNEXE 3 .....	27

o

o o

## INTRODUCTION

L'intoxication par les toxines paralysantes, après consommation de coquillages est un phénomène historique, dont la mention écrite la plus ancienne remonte à 1793 (VANCOUVER, cité par HALSTEAD, 1965). Ce n'est qu'assez récemment (SOMMER & MEYER, 1937), que la source de ce phénomène a été reliée à la présence dans l'eau de dinoflagellés toxigènes dont les coquillages filtreurs se nourrissent. Ce problème est maintenant mondialement reconnu (SHUMWAY, 1989) et son impact sur la conchyliculture évalué. Sur le littoral français, un épisode de contamination des coquillages a été clairement répertorié en août 1988, dans l'Aber Wrac'h sur la côte nord du Finistère (NEZAN & PICLET, 1989) en présence d'un dinoflagellé reconnu comme étant *Alexandrium minutum*. Depuis, cette espèce a été mise en culture à partir de kystes de résistance sédimentés dans le substrat vaseux de la rivière de Morlaix (ERARD- LE DENN, 1991). Son contenu toxinique a été déterminé par la suite (FREMY *et al.*, 1989).

Les toxines paralysantes constituent une famille de 12 molécules (cf. tableau 1), dont le noyau de base est celui de la saxitoxine (STX). En fonction des substituants présents, les toxines peuvent être classées en trois groupes :

Le groupe A, avec la saxitoxine et la néosaxitoxine qui n'ont pas de substituants soufrés.

Le groupe B, avec les gonyautoxines (GTX) 1, 2, 3 et 4 ainsi que les GTX B1 et B2. Ces molécules possèdent un radical soufré.

Le groupe C, avec les toxines C1, C2, C3 et C4, qui possèdent deux radicaux soufrés.

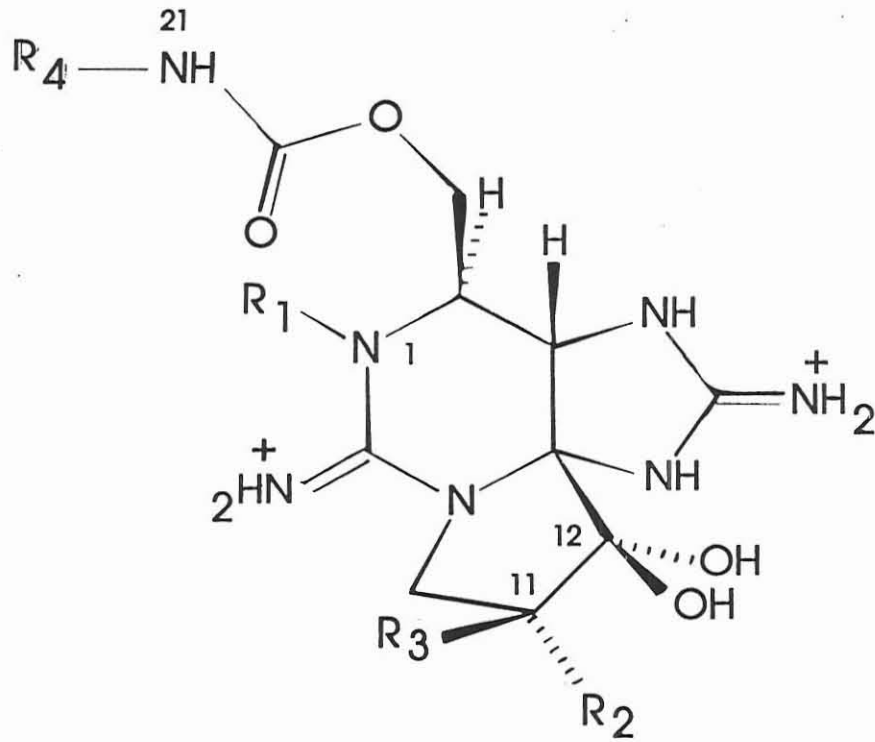
Chacune de ces molécules possède une toxicité spécifique, qui décroît du groupe A vers le groupe C. Des méthodes analytiques performantes sont donc nécessaires pour séparer, identifier puis quantifier chacune de ces toxines. La chromatographie liquide à haute performance par appariement d'ions (C.L.H.P.-A.I.) constitue, à l'heure actuelle, la méthode analytique la plus utilisée. Parmi les cinq méthodes de chromatographie existantes, seule celle décrite par OSHIMA (1984, 1989) possède l'avantage de pouvoir séparer **toutes** les toxines présentes dans un échantillon.

La Baie de Morlaix, constituée des estuaires des rivières de Morlaix et de la Penzé étant régulièrement le lieu d'efflorescences à *A. minutum*, nous avons voulu savoir :

- Quelles sont les éventuelles contaminations, au cours d'une année, de coquillages situés dans une zone à risque, à savoir la Rivière de Morlaix ?
- Quelle corrélation existe entre la méthode C.L.H.P. et le test-souris, bio-essai standardisé de toxicité des coquillages pratiqué par les laboratoires côtiers DEL de l'Ifremer, étude menée en rivière de la Penzé.

Ce sont les résultats de ces deux études que nous présentons ici.

Tableau 1 : Structure des Toxines Paralysantes.



R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	
H	H	H	H	STX
OH	H	H	H	NEO-STX
H	H	H	SO <sub>3</sub> H	B1
OH	H	H	SO <sub>3</sub> H	B2
H	H	OSO <sub>3</sub> H	H	GTX3
H	OSO <sub>3</sub> H	H	H	GTX2
OH	H	OSO <sub>3</sub> H	H	GTX1
OH	OSO <sub>3</sub> H	H	H	GTX4
H	H	OSO <sub>3</sub> H	SO <sub>3</sub> H	C1
H	OSO <sub>3</sub> H	H	SO <sub>3</sub> H	C2
OH	H	OSO <sub>3</sub> H	SO <sub>3</sub> H	C3
OH	OSO <sub>3</sub> H	H	SO <sub>3</sub> H	C4

## MATERIELS ET METHODES

### *Rivière de Morlaix*

Fin décembre 1993, 54 kg de moules ont été installées en poches sur tables sur l'estran de la rivière de Morlaix au Dourduff, cf. figure 1. Ce lieu est voisin du site de prélèvement du réseau REPHY de Locquéolé.

Un prélèvement mensuel d'environ 2 kg de ces moules a été effectué, au moment de la vive-eau. Expédiés le jour même au laboratoire Phycotoxines et Nuisances, ces échantillons ont été traités selon le protocole décrit en annexe 1. Après l'apparition d'une eau colorée à *Alexandrium minutum*, en juillet 1994, des prélèvements ont été régulièrement effectués, chaque semaine, pour suivre l'évolution du phénomène.

Trois types de prélèvements ont été réalisés sur un même échantillon de moule : chair totale\*, chair\*, glande digestive. La méthode officielle préconisée par l'Association of Official Analytical Chemists (A. O. A. C.) recommande une extraction sur la chair totale (en général, ce qui est consommé). Il nous a semblé toutefois intéressant de prélever la chair pour voir si celle-ci se contamine aussi ; enfin en ne prélevant que la glande digestive, on peut abaisser le niveau de sensibilité car on sait que la glande digestive concentre l'essentiel des toxines ; en moyenne, dans les échantillons, la glande digestive représente 16,39% (+/- 2,55) de la chair totale, après égouttage.

Deux types d'extraction acide ont été effectuées sur les prélèvements, à savoir :

- l'extraction à chaud par l'acide chlorhydrique 0,1 N.
- l'extraction à froid par l'acide acétique 0,1 N.

La première de ces extractions est celle recommandée par la méthode standardisée A.O.A.C. elle permet donc de recalculer nos résultats avec ceux trouvés dans la littérature et de comparer les valeurs obtenues avec celles issues du test-souris, si besoin. Cependant, l'hydrolyse à chaud par un acide fort provoque une conversion des toxines présentes vers des formes plus virulentes et, en général, provoque une augmentation de la toxicité de l'échantillon ainsi traité.

Une seconde méthode d'extraction " plus douce " par l'acide acétique (AcOH) à froid permet de retrouver dans les coquillages le profil toxinique de l'espèce planctonique (BOYER, 1986 ; LEDOUX, 1992), et de mieux estimer la toxicité réelle de l'échantillon. Toutefois, contrairement à l'extraction du plancton qui utilise l'AcOH 0,03N, la concentration de l'acide utilisé pour les coquillages, à cause d'un effet matrice plus important, reste élevée (0,1N) de façon à maintenir le pH de l'échantillon voisin de 3,5, zone de pH dans laquelle les toxines sont chimiquement stables.

### *Rivière de la Penzé*

Dans le cadre du réseau de suivi des efflorescences phytoplanctoniques, des huîtres ont été prélevées régulièrement au Pont de la Corde et à Pors Doun (cf. figure 2) et expédiées au laboratoire côtier de Concarneau. En vue du test-souris, les échantillons ont été extraits selon la méthode officielle A.O.A.C. (chair totale, HCl à chaud) et le même extrait acide a été conservé à 4° C pour l'analyse par C.L.H.P.

\* : Dans ce rapport, l'ensemble de la chair de la moule est appelé "chair totale" , une fois la glande digestive enlevée, ce qui reste est, alors, appelé "chair".



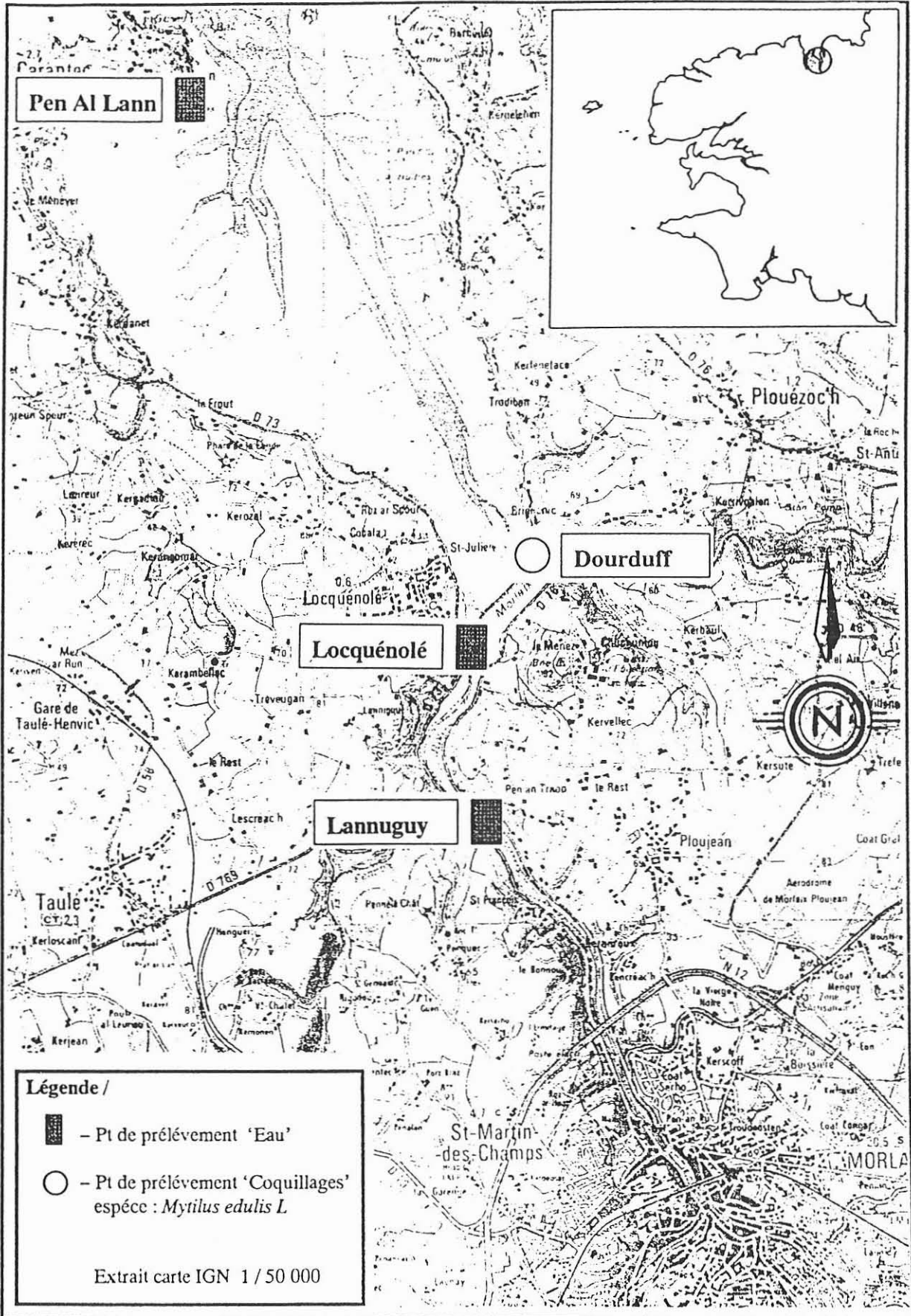


Fig 1 : Rivière de Morlaix – localisation des points de prélèvement



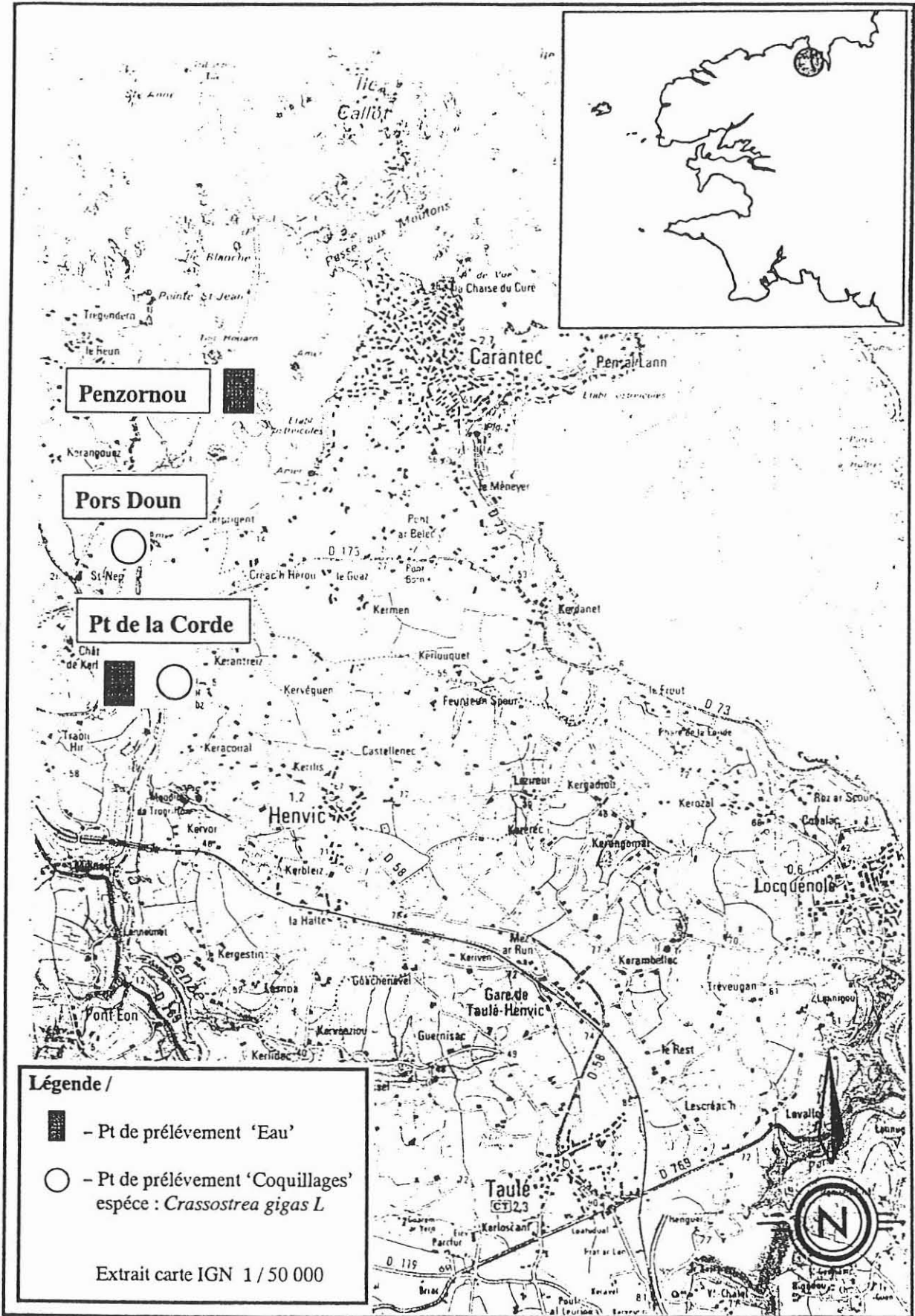


Fig 2 : Rivière de Penzé – localisation des points de prélèvement

Les conditions de l'analyse des toxines paralysantes par chromatographie selon la méthode décrite par OSHIMA (1989) sont indiquées en annexe 2. Brièvement résumée, la séparation des toxines s'effectue sur une colonne phase inverse par chromatographie liquide d'appariement d'ions ; cette technique de chromatographie met en jeu une paire d'ions constituée d'une part du co-ion, ici les toxines ionisées, d'autre part d'un contre-ion formé d'une chaîne carbonée portant un ion de charge opposée à celle des toxines, ici un C7 sulfonate. La variation de distribution de ces paires d'ions, entre la phase stationnaire apolaire constituée par la silice greffée C<sub>8</sub> et la phase mobile constituée par un tampon de pH approprié, constitue la base de la séparation chromatographique.

Une fois les toxines séparées, il est nécessaire, pour pouvoir les quantifier, de modifier la structure chimique des molécules pour les rendre fluorescentes. Ceci se fait par action de l'acide périodique en milieu alcalin. Cette réaction d'oxydation est arrêtée et stabilisée par acidification de l'éluant avec l'acide acétique. La détection s'effectue par fluorescence aux longueurs d'ondes d'émission et d'excitation de 330 nm et 390 nm, respectivement.

Comme indiqué par LEDOUX (comm. pers.), la séparation des toxines est très liée au pH de l'éluant et de l'oxydant, ainsi qu'aux températures du four de colonne et du four de réaction post-colonne. Une légère variation des valeurs indiquées par OSHIMA peut s'avérer nécessaire pour optimiser la séparation des toxines. C'est ainsi que, pour cette étude, la température du four de réaction post-colonne est fixée à 50° C, et que, pour le dosage des toxines A, la proportion d'acétonitrile dans l'éluant est abaissée à 4,76 % avec un pH ramené à 6,9.

Les deux avantages de la méthode décrite par OSHIMA sont :

- La stabilité des paramètres chromatographiques liés à une élution isocratique.
- Une composition d'éluant spécifique à chaque groupe de toxines qui permet de séparer individuellement chaque toxine à l'intérieur de son groupe.

L'inconvénient majeur réside dans le fait qu'il faut procéder à trois séparations chromatographiques pour analyser totalement un échantillon.

Le schéma de la chaîne d'analyse est présenté dans l'annexe 3, elle est constituée d'une pompe programmable à gradient Merck L-6200, d'un injecteur automatique Merck AS-2000, d'un four de colonne à effet Peltier, de deux pompes isocratiques Merck L-6000, d'un bain-marie thermostaté et d'un spectrofluorimètre Merck F-1080. Le système d'acquisition de données et de traitement des chromatogrammes utilisé est le logiciel HP-Chem.

Après vérification de la stabilité de la réponse et des temps de rétention, 10 µl de chaque échantillon sont injectés deux fois pour chaque groupe de toxines. La quantification s'effectue par étalonnage externe à l'aide de standards de référence. La concentration molaire obtenue est convertie, affecté des facteurs de dilution, en µg éq. STX/100 g de chair en utilisant les coefficients de conversion définis par HUNGERFORD (cité par LEDOUX, 1992). Les coefficients de conversion utilisés sont respectivement 297 pour la GTX3 et 186 pour la GTX2. Les standards sont injectés de manière périodique pour vérifier la permanence de la qualité de la séparation chromatographique. Les étalons utilisés ont été les standards de saxitoxine, néosaxitoxine, gonyautoxine-2 et 3 commercialisés sous la référence PSP-1, par le MACSP/IMB - Halifax, Canada.

## RESULTATS

### *Rivière de Morlaix*

En l'absence de nombreux étalons de référence, seules les toxines A, à savoir la saxitoxine et la néosaxitoxine, et deux toxines B, à savoir les gonyautoxines 2 et 3 ont été recherchées.

Le profil toxinique d'*A. minutum* permet d'affirmer que la recherche et le dosage de ces quatre toxines (STX, Néo-STX, GTX3, GTX2) suffisent à la quantification. En effet, les chromatogrammes de l'échantillon de ce plancton prélevé le 21 juillet 1994 à Lannuguy, (chromatogrammes 1 et 2), indiquent l'absence des saxitoxine et néosaxitoxine, la seule présence des GTX3 et GTX2 et quelques traces de toxines C. Ces derniers composés ont une faible toxicité. On les remarque, non séparés, au début du chromatogramme des toxines B. Selon LEDOUX (comm. pers.) qui a travaillé sur la même espèce en culture, les toxines C présentes sont la C2 et la C1, cette dernière étant majoritaire à 66 %.

Toxicité de cet échantillon :		6,0 pg équ. STX/ cellule.
Profil toxinique :	pour la GTX3	20,0 fM/cellule.
	pour la GTX2	2,8 fM/cellule.
Fraction molaire :	pour la GTX3	87,7 %
	pour la GTX2	12,3 % .

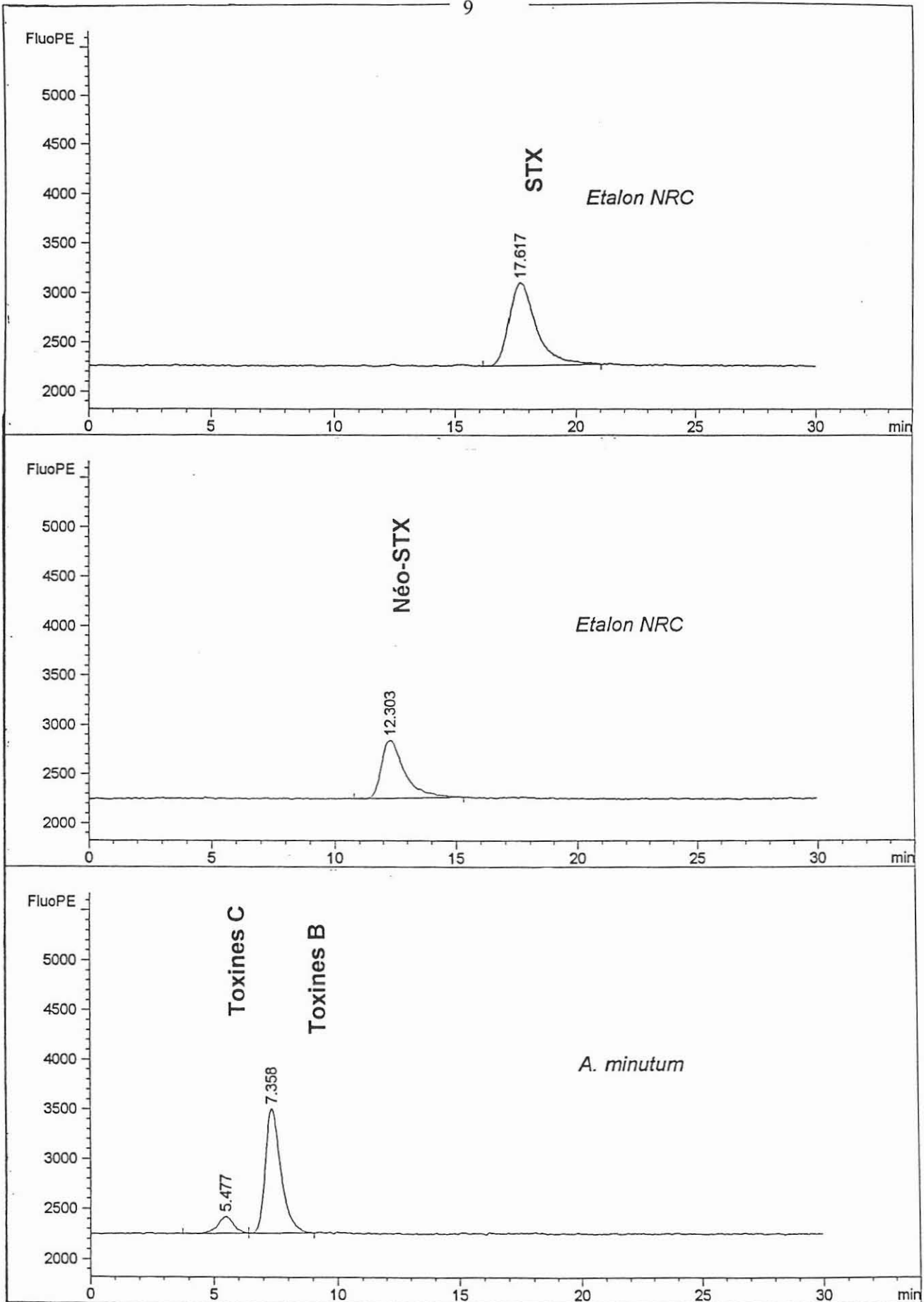
Les prélèvements d'eau de mer effectués par le Laboratoire côtier de Concarneau permettent de suivre l'évolution des concentrations en cellules d'*Alexandrium minutum* en trois points de la rivière de Morlaix, (cf. figure 1) à savoir : Penn al Lann, qui se situe en aval de la rivière, Locquéolé qui se trouve face au site de séjour des moules du Dourduff, enfin Lannuguy qui se trouve en amont.

Sans préjuger des mouvements des masses d'eau et de l'influence du cycle tidal, ces données peuvent permettre de suivre le phénomène d'eau colorée sur l'ensemble de la rivière de Morlaix au cours de l'année 1994.

On peut noter, sur l'histogramme représentatif, (cf. tableau 2) l'apparition sporadique de cellules d'*Alexandrium*, dès mi-avril à Locquéolé et Penn-al-Lann et ce jusque début mai, suivi de la disparition des cellules sur la zone étudiée jusque mi-juin.

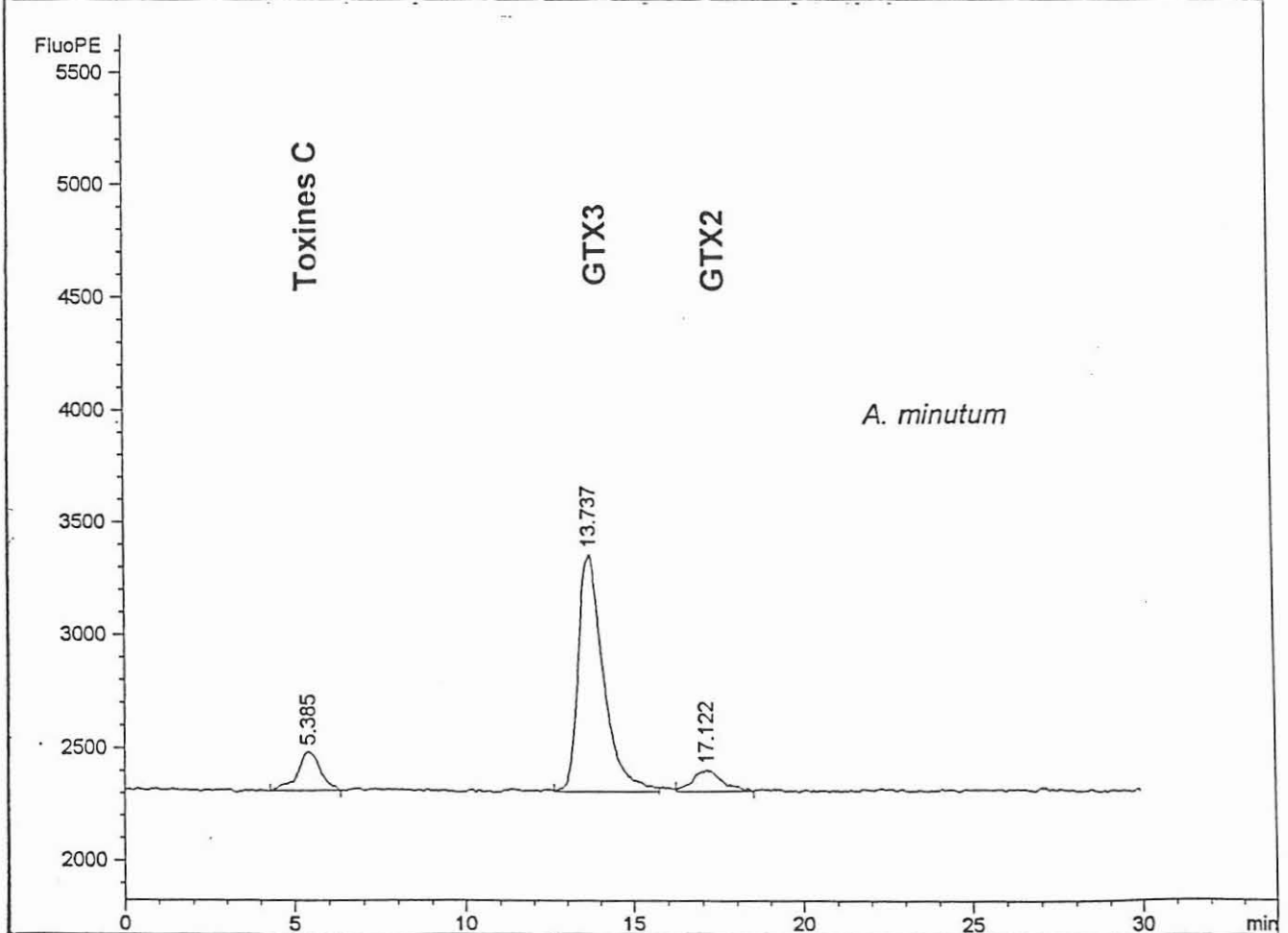
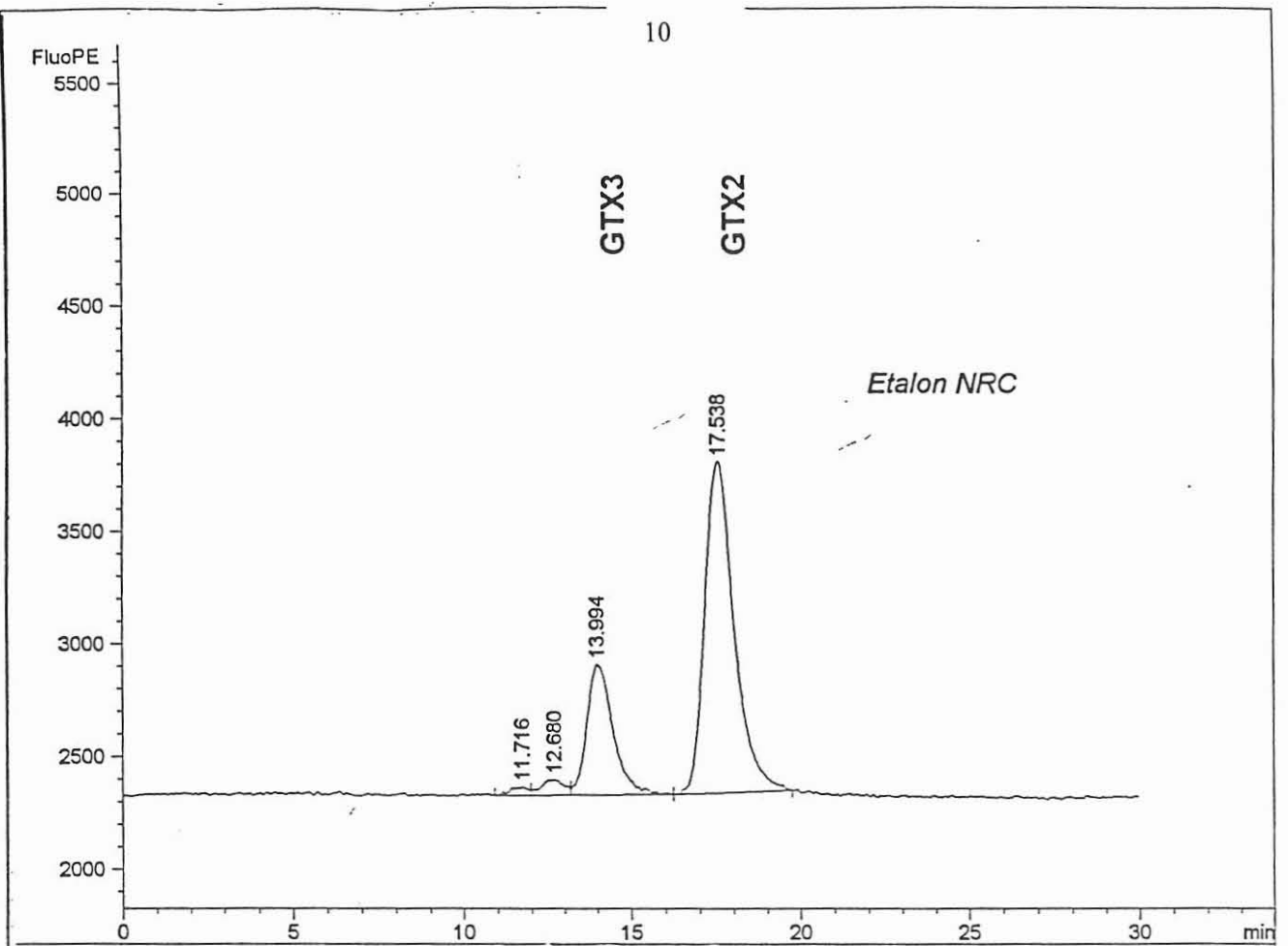
Dans la zone centrale de Locquéolé, on observe la présence de cellules d'*Alexandrium* dans l'eau entre le 15 juin et le 5 septembre. L'efflorescence débute réellement le 20 juillet avec un maximum observé le 2 août avec 110 000 cellules/litre.

Parallèlement, la zone de Penn al Lann, en aval, se trouve touchée 10 jours plus tard, à un moindre degré. Le maximum observé est de 10 200 cellules/litre le 4 août, avec disparition du phénomène fin août.



**Chromatogramme 1 : Toxines A chez *A. minutum*  
échantillon de Lannuguy - 21 juillet 1994**

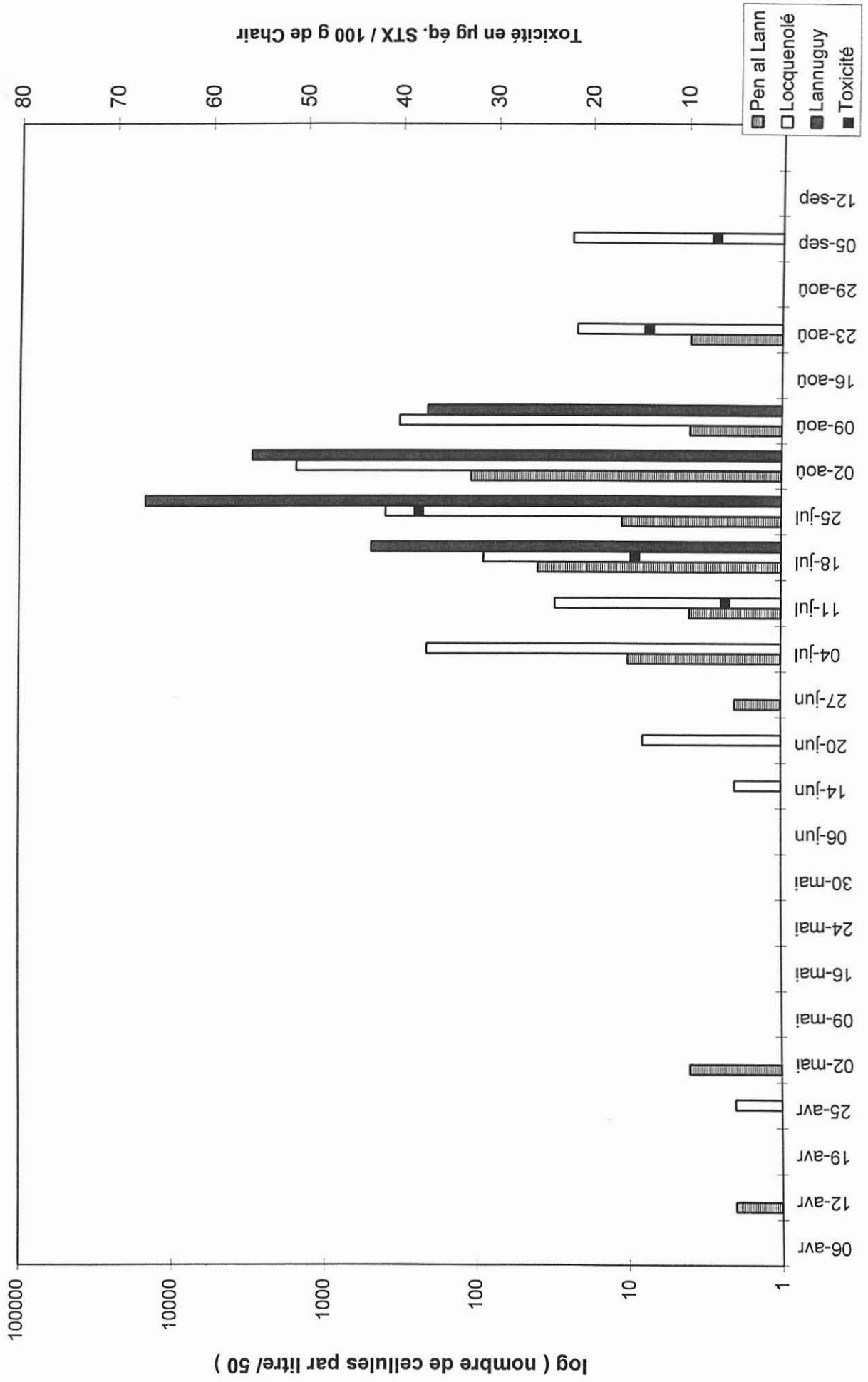
(cf. Annexe 2 pour les conditions d'éluion spécifiques aux Toxines A)



**Chromatogramme 2 : Toxines B chez *A. minutum*  
échantillon de Lannuguy - 21 juillet 1994**

(cf. Annexe 2 pour les conditions d'éluion spécifiques aux Toxines B)

Tableau 2 : Concentration d'*A. minutum* et Toxicité des Moules en rivière de Morlaix en 1994



En amont de Locquénoilé, la contamination du site de Lannuguy est à la fois plus tardive (18 juillet) et plus brève puisqu'elle ne dure qu'un mois. L'efflorescence a lieu du 18 au 24 juillet, elle est aussi plus intense puisque le maximum observé est de 1 440 000 cellules/litre, le 21 juillet, mais il faut noter en même temps la présence de *Gonyaulax spirale* à 7 300 000 cellules/litre.

A l'exception de celui du mois de novembre, un prélèvement mensuel de moules a été effectué, auquel se sont ajoutés les trois prélèvements hebdomadaires de juillet, soit un total de 13 échantillons. Si l'on regarde les résultats des analyses des échantillons de moules, on note l'absence totale de toxines dans les échantillons prélevés jusque fin juin 1994 quelque soit l'organe analysé ou bien le mode d'extraction utilisé.

Comme indiqué dans le tableau 3, la présence des toxines est confirmée dans l'échantillon prélevé le 27 juin, même si ce n'est qu'en très faibles quantités et seulement dans la glande digestive des moules. A cette date, la présence de cellules d'*Alexandrium* a été noté à Locquénoilé depuis 15 jours.

Après quoi, la concentration en toxines croît pour atteindre son maximum dans la glande digestive de l'échantillon prélevé le 25 juillet avec 150 µg éq. STX/ 100 g de chair (cf. chromatogrammes 3 et 4). Cette date est très voisine de celle du maximum de cellules observées pour le site de Locquénoilé et du bloom de Lannuguy.

Les toxines restent présentes dans les échantillons à des valeurs notables jusqu'en septembre et l'on peut encore en trouver quelques traces dans les glandes digestives prélevés en octobre et décembre.

L'ensemble des trois sous-échantillons est contaminé pour les prélèvements effectués en juillet et août. La chair reste contaminée à des niveaux très faibles, toujours inférieurs à 10 µg éq. STX pour 100 g de chair. De même, si la chair totale se contamine davantage (cf. tableau 2), le niveau de toxicité n'atteint pas le seuil réglementaire d'interdiction de mise sur le marché des coquillages, seuil établi à 80 µg éq. STX pour 100 g. Les concentrations mesurées dans les glandes digestives sont nettement plus élevées que celles observées dans la chair totale, puisque le facteur de concentration peut être estimé en moyenne à 4,2 (n=8).

L'influence de la méthode d'extraction n'apparaît pas de façon flagrante dans ces échantillons puisque les toxicités obtenues restent dans un même ordre de grandeur, voisin de 1,4. Ceci peut s'expliquer par le profil toxinique d'*Alexandrium minutum* qui contient peu de toxines susceptibles d'être modifiées par hydrolyse à chaud. Rappelons que, dans ce cas, les interconversions entre toxines se réalisent selon le schéma indiqué par LEDOUX (1992) :

B1 se transforme en STX  
 B2 " " néo-STX

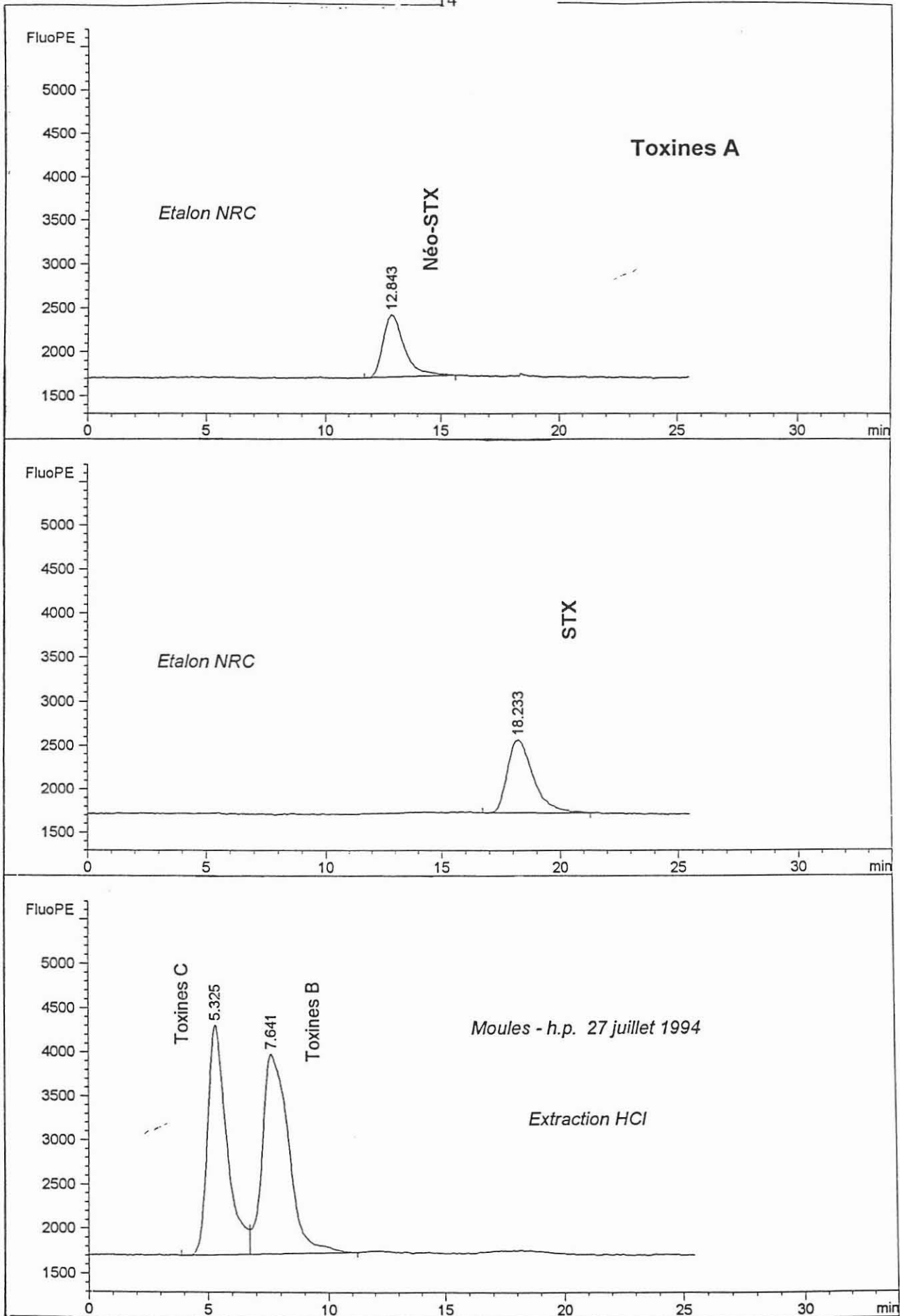
C1 se transforme en GTX2  
 C2 " " GTX3  
 C3 " " GTX1  
 C4 " " GTX4



**Tableau 3 : Contenu toxinique total\* des échantillons de moules en fonction du mode d'extraction.**

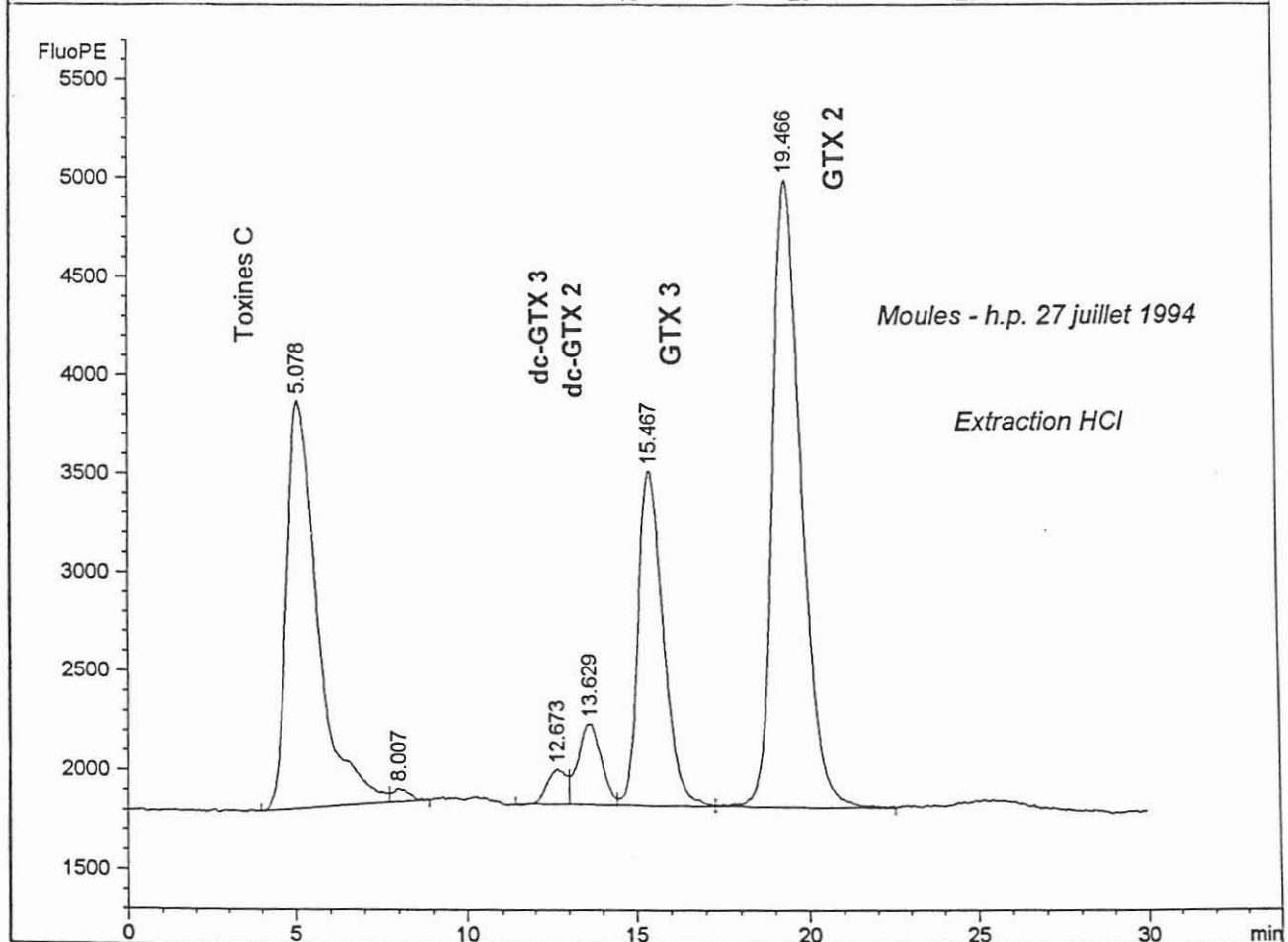
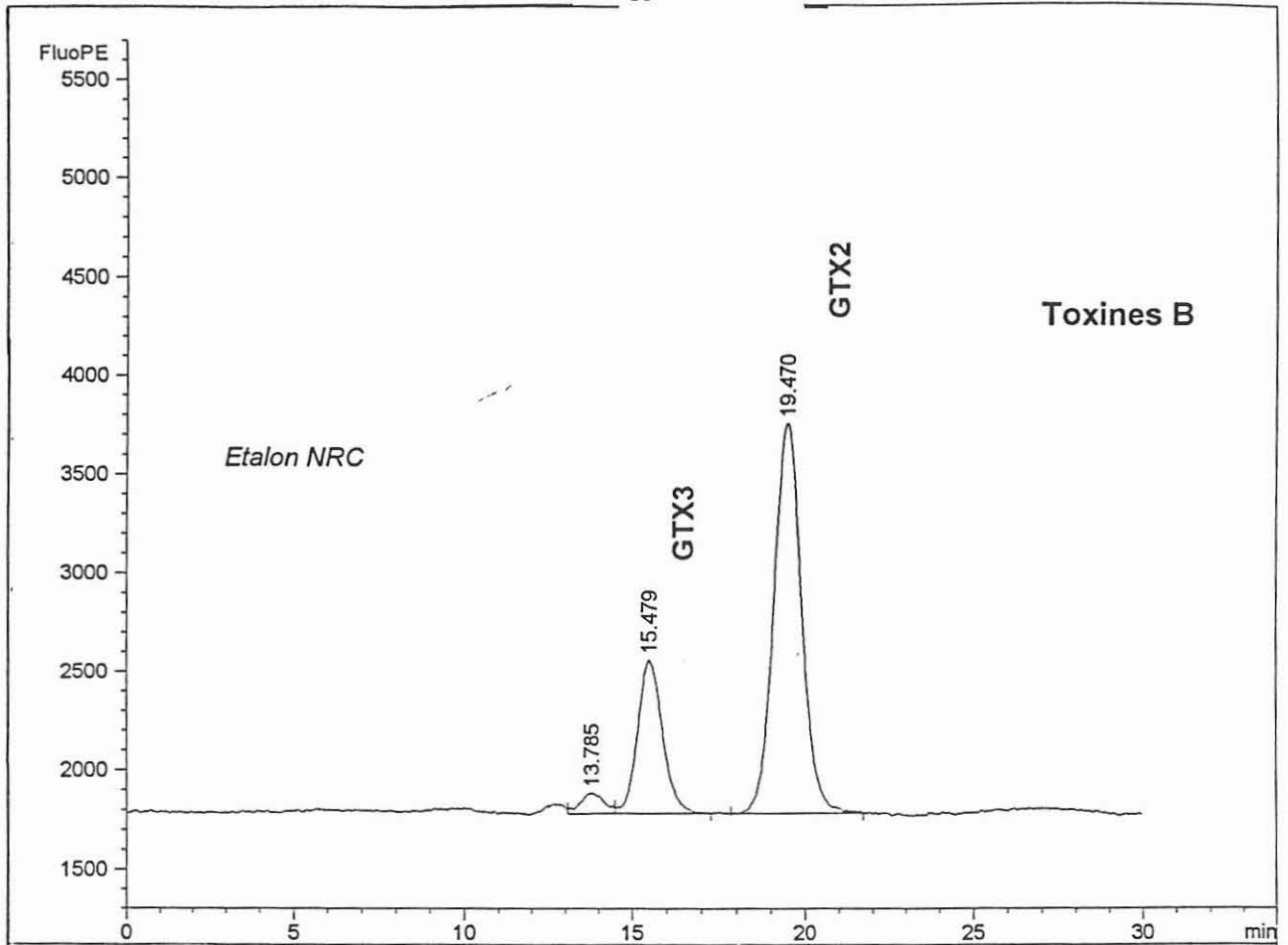
Echantillon	Date de prélèvement	Extraction AcOH	Extraction HCl
Glande Digestive	27-jun-94		< 5
Chair Totale	11-jul-94	5,20	5,80
Glande Digestive	" "	22,10	29,60
Chair	18-jul-94	< 5	5,10
Chair Totale	" "	10,10	15,30
Glande Digestive	" "	54,00	55,20
Chair	25-jul-94	6,30	7,80
Chair Totale	" "	29,20	38,00
Glande Digestive	" "	126,50	150,10
Chair	24-août-94	5,60	< 5
Chair Totale	" "	7,60	14,00
Glande Digestive	" "	25,10	54,10
Chair	06-sep-94	< 5	< 5
Chair Totale	" "		7,00
Glande Digestive	" "	14,00	16,50
Glande Digestive	04-oct-94	6,00	< 5
Glande Digestive	05-déc-94	< 5	

\* Toxicité exprimée en µg équivalent STX pour 100g de chair



**Chromatogramme 3 : Toxines A dans la glande digestive  
Moules prélevées le 27 juillet 1994**

(cf. Annexe 2 pour les conditions spécifiques aux Toxines A)



**Chromatogramme 4 : Toxines B dans la glande digestive  
Moules prélevées le 27 juillet 1994**

(cf. Annexe 2 pour les conditions spécifiques aux Toxines B)

Compte tenu du profil toxinique d'*A. minutum* avec une majorité de toxine C1 par rapport à C2, il y aurait surtout néo-formation de GTX2 et dans une moindre mesure de GTX3. Ceci peut se retrouver dans l'échantillon du 25 juillet (tableau 4), où le contenu toxinique vis-à-vis de la GTX2 se trouve multiplié d'un facteur 1,5 entre les deux modes d'extraction tandis que pour la GTX3, il reste constant.

Tableau 4 : Variation ( $\Delta$ ) du profil toxinique, exprimé en  $\mu\text{M}$ , suivant le mode d'extraction.

Organe	GTX3			GTX2		
	Extr. AcOH	Extr. HCl	$\Delta$	Extr. AcOH	Extr. HCl	$\Delta$
Chair	0,054	0,057	<b>1,05</b>	0,082	0,118	<b>1,44</b>
Chair totale	0,253	0,283	<b>1,12</b>	0,38	0,569	<b>1,5</b>
Glande Digestive	1,069	0,884	<b>0,83</b>	1,694	2,623	<b>1,55</b>

Si l'on observe maintenant (cf. tableau 5) la contribution toxinique, exprimée en mole %, entre l'échantillon de plancton et les extraits de moules utilisant l'extraction à l'acide acétique, on remarque que les contributions de chaque toxine sont inversées ; soit respectivement de 87,7% pour la GTX3 et 12,3% pour la GTX2 dans le cas du plancton, et 27,1% pour la GTX3 et 73,9% pour la GTX2 en moyenne dans le cas des moules.

Tableau 5 : Concentration et fraction molaire des échantillons extraits à l'Acide Acétique à froid

Echantillon	Date	Conc. GTX.3	Conc. GTX2	% GTX3	% GTX2
Chair totale	11 juillet 94	0.055 $\mu\text{M}$	0.11 $\mu\text{M}$	<b>33.3</b>	<b>66.7</b>
Glande digestive	" "	0.174 $\mu\text{M}$	0.32 $\mu\text{M}$	<b>35.2</b>	<b>64.8</b>
Chair	18 juillet 94	0.01 $\mu\text{M}$	0.042 $\mu\text{M}$	<b>19.2</b>	<b>80.8</b>
Chair totale	" "	0.075 $\mu\text{M}$	0.151 $\mu\text{M}$	<b>33.2</b>	<b>66.8</b>
Glande digestive	" "	0.4 $\mu\text{M}$	0.815 $\mu\text{M}$	<b>32.9</b>	<b>67.1</b>
Chair	25 juillet 94	0.054 $\mu\text{M}$	0.082 $\mu\text{M}$	<b>39.7</b>	<b>60.3</b>
Chair totale	" "	0.253 $\mu\text{M}$	0.38 $\mu\text{M}$	<b>40.0</b>	<b>60.0</b>
Glande digestive	" "	1.069 $\mu\text{M}$	1.694 $\mu\text{M}$	<b>38.7</b>	<b>61.3</b>
Chair	24 août 94	0.029 $\mu\text{M}$	0.104 $\mu\text{M}$	<b>21.8</b>	<b>78.2</b>
Chair totale	" "	0.03 $\mu\text{M}$	0.155 $\mu\text{M}$	<b>16.2</b>	<b>83.8</b>
Glande digestive	" "	0.151 $\mu\text{M}$	0.435 $\mu\text{M}$	<b>25.8</b>	<b>74.2</b>

Cette inversion peut s'expliquer par deux phénomènes, d'une part une transformation enzymatique au sein du coquillage, d'autre part l'épimérisation naturelle due au stockage des échantillons avant analyse ; il est en effet reconnu que la forme GTX2 est une forme thermodynamiquement plus stable et qu'il se crée au cours du temps un équilibre entre les deux formes GTX3/GTX2. Pour cette étude, il est difficile de dire lequel des deux mécanismes est prépondérant.

Enfin, la recherche de saxitoxine néo-formée au cours du temps s'est révélée négative pour les échantillons prélevés après l'eau colorée de juillet.

### *Rivière de la Penzé*

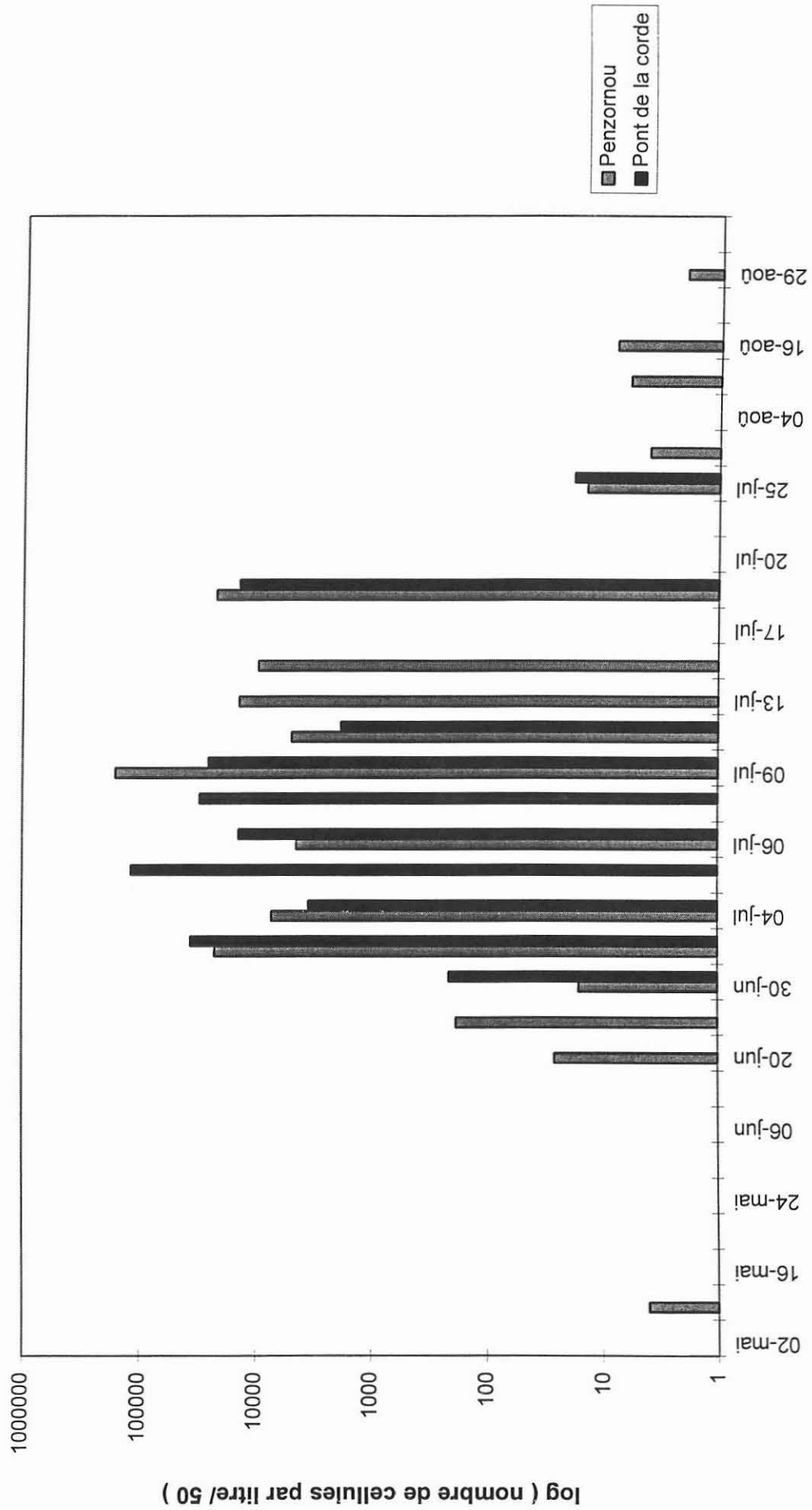
Pour le plancton, les deux points de prélèvements échantillonnés (cf. figure 2) sont : Penzornou situé à l'embouchure et Pont de la Corde situé plus en amont. Les cellules d'*Alexandrium* (cf tableau 6) sont présentes, épisodiquement, début mai à Penzornou, puis du 20 juin au 16 août sur les 2 points. L'efflorescence se produit entre le 2 et le 18 juillet, avec un maximum au Pont de la Corde de 5 800 000 cellules/litre le 5 juillet, à Penzornou de 7 985 000 cellules/litre le 9 juillet.

Pour les coquillages, ce sont 12 échantillons d'huîtres creuses qui ont été prélevés pendant la durée du phénomène toxique du 4 au 25 juillet. Le même extrait acide (chair totale, acide chlorhydrique à chaud) a été utilisé pour le test-souris et la C.L.H.P./A.I. Toutefois, une centrifugation et une ultra-filtration (seuil de coupure : 20 000 Da) ont été nécessaires avant l'injection chromatographique. Les résultats des deux méthodes ont été rassemblés dans le tableau 7. La contamination est rapide puisque qu'en 3 jours, la toxicité passe de 83 à 244 µg éq.STX/100g de chair pour le Pont de la Corde. A ce niveau de toxicité, la récolte des bivalves et des gastéropodes a été interdite du 7 au 29 juillet dans cet estuaire par arrêté préfectoral. La toxicité se maintient à ce niveau pendant toute la période de l'efflorescence, puis diminue rapidement. Ainsi le 25 juillet on se situe au-dessous du seuil de toxicité de 80 µg éq. STX/100g de chair. De nouveau, on note l'absence de saxitoxine dans les échantillons. On observe un schéma identique pour le point de Porsdoun qui se situe en aval du Pont de la Corde.

Il est important de remarquer que, dans notre cas, l'analyse chromatographique déclare "positif" (>80 µg éq. STX/100g de chair) 3 échantillons qui se révèlent "faux-négatif" dans le cas du test-souris, le cas contraire ne se présentant pas.

Enfin, la corrélation entre le test-souris et l'analyse chimique n'est pas très bonne (cf. graphe 1) avec  $R^2 = 0.59$ ,  $n = 9$ . Le faible échantillonnage analysé peut en être une première cause.

Tableau 6 : Concentration d' *A. minutum* en rivière de la Penzé en 1994



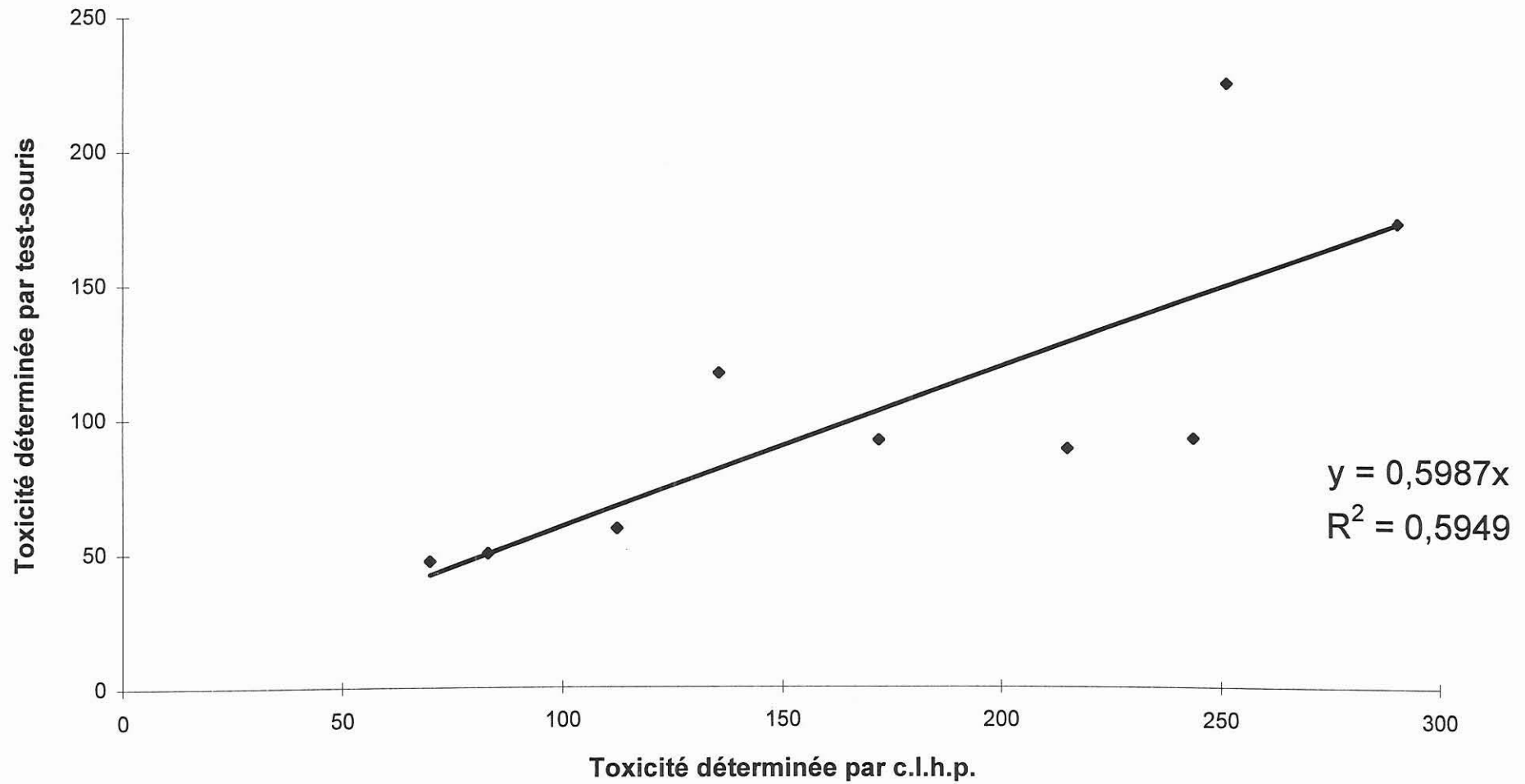
**Tableau 7 : Comparaison des résultats c.l.h.p. / tests-souris effectués sur des huîtres creuses**

Lieu	Date	GTX3 *	GTX2 *	C.L.H.P. *	Test-souris *
Pont de la corde	04-juillet-94	28,3	54,8	<b>83,1</b>	<b>50</b>
Penzé	06-juillet-94	39,3	73,1	<b>112,4</b>	<b>59</b>
Pors doun	07-juillet-94	74,4	97,6	<b>172</b>	<b>92</b>
Pont de la corde	07-juillet-94	88,4	155,4	<b>243,8</b>	<b>93</b>
Pors doun	10-juillet-94	44,4	91,2	<b>135,6</b>	<b>117</b>
Pont de la corde	10-juillet-94	80,2	171,1	<b>251,3</b>	<b>226</b>
Pors doun	18-juillet-94	134,4	155,9	<b>290,3</b>	<b>174</b>
Pont de la corde	18-juillet-94	109,5	105,6	<b>215,1</b>	<b>89</b>
Dourduff	21-juillet-94	9,7	17,4	<b>27,1</b>	<b>&lt; 40</b>
Pont de la corde	25-juillet-94	21,4	48,5	<b>69,9</b>	<b>47</b>
Pors doun	25-juillet-94	10,8	20,7	<b>31,5</b>	<b>&lt; 40</b>
Kerarmel	26-juillet-94	17,8	25,5	<b>43,3</b>	<b>&lt; 40</b>

\* : toxicité exprimée en  $\mu\text{g}$  équivalent STX pour 100g de chair



**Grappe 1 : Corrélation c.l.h.p. / test-souris  
sur les échantillons d'Huîtres creuses.**



## DISCUSSION

Cette étude présente, d'une part, le suivi pendant une année des moules implantées dans une zone estuarienne contaminée annuellement par *A. minutum* et, d'autre part, la comparaison des résultats de deux méthodes d'analyse de la toxicité des coquillages.

Dans les deux cas, elle a permis de montrer que la contamination des coquillages suit de peu la présence dans l'eau des cellules toxigènes et qu'elle est rapide. La décontamination des coquillages est aussi rapide ; sans doute selon un processus en deux temps, une première phase de diminution importante de la toxicité, que l'on peut estimer à sept jours dans le cas de Pors Doun ou du Pont de la Corde, suivie d'une phase lente d'élimination, avec présence de toxines encore détectables en décembre dans les glandes digestives, pour la rivière de Morlaix. Les niveaux de toxicité atteints ne sont pas élevés dans le cas de la rivière de Morlaix, la limite d'interdiction à la vente n'a pas été atteinte pour la chair totale. A l'opposé, dans le cas de la rivière de la Penzé, ce seuil est dépassé pendant 15 jours. Sans doute faut-il y voir l'influence de la concentration cellulaire en *Alexandrium* lors de l'efflorescence au niveau des deux rivières.

Même si l'estran contient des formes enkystées d'*A. minutum* pouvant atteindre jusque 195 kystes/g. de sédiment humide dans les premiers centimètres à la station du Dourduff (E. ERARD-LE DENN, comm. pers) il ne semble pas exister de contamination hivernale détectable due à une remise en suspension de kystes d'*Alexandrium*, forme réputée plus toxique que le stade végétatif (OSHIMA *et al.*, 1992). Cela confirme les résultats de la surveillance du phytoplancton réalisée en 1992 et 1993.

L'étude des chromatogrammes des échantillons toxiques montre que les deux principales toxines présentes dans le plancton se retrouvent dans les moules, principalement dans les glandes digestives mais dans des rapports de concentration inversés. Cette inversion semble liée soit à une transformation enzymatique dans le coquillage, soit à une épimérisation naturelle des toxines de l'échantillon avant analyse.

Enfin, la néo-formation de saxitoxine au cours de la décontamination ne semble pas se produire alors qu'elle a été observée dans une étude de contamination / décontamination de moules par *A. minutum* en milieu contrôlé (LASSUS *et al.*, 1994). Cela peut être dû au niveau de contamination des coquillages, les moules analysées en laboratoire ayant atteint un niveau égal à 174 µg éq. STX/100 g de chair, alors que dans cette étude en milieu naturel seulement 38 µg éq. STX/100 g ont été atteints dans le cas de la rivière de Morlaix.

Le régime alimentaire des bivalves au moment de la décontamination peut être un autre facteur explicatif. Au laboratoire, c'est une culture monospécifique de *Tetraselmis suecica* qui a servi pour nourrir les moules, alors que dans le milieu naturel, le suivi du réseau phytoplanctonique permet d'affirmer que l'alimentation était plurispécifique. Cette dernière décontamination peut alors se produire à un rythme plus rapide et empêcher la néo-formation de saxitoxine.

Pour ce qui est de la corrélation entre C.L.H.P/A.I. et test-souris, les études publiées dans la littérature donnent généralement de meilleurs coefficients comme l'indique le tableau suivant :

Auteurs	SULLIVAN	SULLIVAN	FILEMAN	SALTER		
Année	1983	1985	1988	1989		
test-souris	A.O.A.C.	A.O.A.C.	A.O.A.C.	A.O.A.C.	A.O.A.C.	A.O.A.C.
méthode clhp	Sullivan	Sullivan	Sullivan	Sullivan		
bivalves	?	?	?	moules	clams	?
gamme étudiée	>80µg éq.STX	?	?	?	?	<100 µg éq.STX
n	?	100	19	94	86	100
Coefficient	<b>0.76</b>	<b>0.90</b>	<b>0.82</b>	<b>0.948</b>	<b>0.832</b>	<b>0.531</b>

Toutefois, on peut remarquer que lorsque la zone de toxicité est inférieure à 100 µg éq. STX/100 g de chair, le coefficient trouvé par SALTER (1989) devient proche de celui obtenu dans cette étude. La faible toxicité généralement observée, dans le cas de la rivière de la Penzé, peut expliquer une corrélation aussi faible.

L'analyse par C.L.H.P.-A.I. des toxines paralysantes permet l'identification et la quantification de chacune d'entre elles. Elle apporte donc des informations plus précises sur :

- les profils toxiques chez le dinoflagellé et le coquillage, ou mieux encore à l'intérieur de chaque organe de ce dernier. Ce dernier point est une aide précieuse à la compréhension du devenir des toxines, en suivant leur éventuelle bio-transformation.
- les phénomènes de contamination et de décontamination des coquillages, que ce soit en milieu ouvert ou en milieu contrôlé.

Toutefois, la faible disponibilité de standards de toxines reste un obstacle à l'amélioration de la séparation chromatographique, de la sensibilité de la détection. De même, une quantité suffisante de ces standards doit aider à une meilleure connaissance des toxicités spécifiques à chaque toxine, cela permettrait de mieux calibrer le test-souris.

Enfin, la longueur de l'analyse C.L.H.P. et la maintenance quotidienne nécessaire à son fonctionnement indiquent clairement qu'elle demeure plus un outil de recherche que de surveillance du milieu.

**Remerciements** : Nous tenons à remercier Elizabeth Nezan pour sa participation à l'identification des espèces phytoplanctoniques et aux dénombrements cellulaires.

**BIBLIOGRAPHIE :**

Anon.-A.O.A.C., 1990. Official method of analysis, 15th ed. , Paralytic Shellfish poison, **2** , 950-08 , Assoc. of Official Analytical Chemists, Arlington, Va, 881-882.

BOYER G.L., SULLIVAN J.J., ANDERSEN R.J., TAYLOR F.J.R., HARRISON P.J. and CEMBELLA A.D., 1986. Use of high-performance liquid chromatography to investigate the production of paralytic shellfish toxins by *Protogonyaulax spp.* in culture, *Marine Biology* **93**, 361-369.

ERARD-LE DENN E., 1991. Le phytoplancton nuisible des côtes de France, A. Sournia et al. eds., IFREMER (S.D.P., Brest)/ C.N.R.S., 119-126.

FILEMAN T.W., 1988. A comparison of HPLC and mouse bio-assay techniques for the determination of paralytic shellfish poisoning toxins. ICES CM1988/E:10.

FREMY J.M., LEDOUX M., NEZAN E., PICLET G. et BELVEZ H., 1989. Evolution de la présence des toxines paralysantes dans les coquillages lors de l'épisode toxique en Aber Wrac'h (1988). *Toxicorama* **1**(1) , 23-28.

HALSTEAD B.W., 1965. Poisonous and venomous marine animals Vol.I : Invertebrates, U.S. Government Printing Office, Washington D.C., 994 pages.

LASSUS P., LEDOUX M., BARDOUIL M., BOHEC M. and ERARD-LE DENN E., 1994. Kinetics of *Alexandrium minutum* Halim toxin accumulation in mussels and clams, *Natural toxins*, **2**, 329-333.

LEDOUX M., 1992. Optimisation d'un dosage par C.L.H.P. des phycotoxines paralysantes ; application à l'étude de la contamination de fruits de mer. Mémoire ingénieur C.N.A.M. 68 pages.

NEZAN E. et PICLET G., 1989. Alerte aux coquillages empoisonnés. *La recherche* **212** , 956-957.

OSHIMA Y., MACHIDA M., SASAKI K., TAMAOKI Y. and YASUMOTO T., 1984. Liquid Chromatographic Fluorometric Analysis of Paralytic Shellfish Toxins, *Agric. Biol. Chem* **48** (7) , 1707-1711.

OSHIMA Y., SUGINO K. and YASUMOTO T., 1989. Latest advances in hplc analysis of paralytic shellfish toxins, *In Mycotoxins and Phycotoxins'88 Proceedings 7th International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins in 1988*, S. Natori et al. Eds - Elsevier, New York, 319-326.

OSHIMA Y., BOLCH C.J. and HALLEGRAEFF G.M., 1992. Toxin composition of resting cysts of *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae). *Toxicon* **30**(12) , 1539-1544.

SALTER J.E., TIMPERI R.J., HENNIGAN L.J., SEFTON L. and REECE H., 1989. Comparison evaluation of liquid chromatography and bioassay methods of analysis for determination of paralytic shellfish poisons in shellfish tissues. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **72**(4), 670-673.

SHUMWAY S.E., 1989. Toxic algae : a serious threat to shellfish aquaculture. *World aquaculture* **20**(4) , 65-74.

SOMMER H. and MEYER K.F. , 1937. Paralytic Shellfish Poisoning , *Arch. Path.*, **24** , 560-598.

SULLIVAN J.J., SIMON M.G. and IWOAKA W.T., 1983. Comparison of HPLC and mouse bioassay methods for determining PSP toxins in shellfish. *J. Food Sci.* **48**(4), 1312-1314.

SULLIVAN J.J., JONAS-DAVIES J. and KENTALA L., 1985. The determination of PSP toxins by HPLC and autoanalyzer. *Toxic dinoflagellates* Anderson, White and Baden Eds. - Elsevier Science publishing company. 275-280.

## ANNEXE 1

## EXTRACTION des MOULES de MORLAIX pour ANALYSE PSP par CLHP

- Dès réception de l'échantillon, lui attribuer un numéro d'arrivée.
- Brosser les moules sous l'eau courante pour enlever la vase.
- Trier l'échantillon en retirant les coquilles vides, les bissus, etc....
- Prélever 5 à 6 moules pour l'étude des contenus stomacaux.
- Après égouttage, peser l'échantillon ainsi préparé et noter le poids total.
  
- Disséquer, à l'aide d'un scalpel, les moules pour prélever successivement :
  - 1- les glandes digestives,
  - 2- la chair sans les glandes digestives, notée après "chair",
  - 3- la chair totale, notée après C.T.
 de façon à obtenir, après égouttage, les poids suivants :
  - 1- : 40 g ; 2- : 120 g ; 3- : 120 g.
- Conserver les coquilles vides.
- Après égouttage, peser les trois sous-échantillons ainsi préparés de même que les coquilles vides.
- Broyer les échantillons à l'Ultra-Turrax jusqu'à homogénéisation (environ 4 minutes).
- Etiqueter 2 flacons SVL 100ml par sous-échantillon.
- Peser 10 g avec précision.
  
- Ajouter 10 ml de l'acide considéré soit :
 

- HCl	0,1N.
- AcOH	0,1N.
- Agitation magnétique : 10 minutes.
- Vérifier le pH de la solution à l'aide d'une bandelette pH (0-6), Réf. Merck 9531  
il doit être compris entre 3 et 3,5.
- Pour abaisser le pH, ajouter goutte à goutte respectivement HCl 12N et AcOH 100%,
- Vérifier le pH ainsi obtenu.
- Pour l'extraction chlorhydrique, porter l'échantillon à ébullition pendant 5 minutes, sous forte agitation magnétique, **bouchon légèrement dévissé**.
- Refroidir rapidement et avec **précaution** dans un bain d'eau froide.
- Vérifier le pH après refroidissement.
  
- Transvaser dans des tubes à centrifugation conique gradué, mesurer le volume obtenu.
- Diluer au demi par H<sub>2</sub>O distillée.
- Centrifuger 20 minutes à 3000 t/min., soit 4 500 g.
- Transvaser le surnageant dans un tube SVL 10ml, dûment étiqueté, et conserver l'échantillon au réfrigérateur (4° C).
- Transvaser environ 2ml dans un tube type Eppendorf et centrifuger (15 min., 14000 t/min., soit 16000g.)
- Prélever le surnageant et le transvaser dans le système d'ultrafiltration Centrisart-1 avec un seuil de coupure de 20 000 Da, Réf. Sartorius SM 13249
- Centrifuger pendant 60 min. à 2000 t/min.
- Transvaser le filtrat dans un flacon pour injecteur étiqueté et conserver au frais (4° C) avant injection.

## ANNEXE 2

**Détection des toxines paralysantes par C.L.H.P. d'appariement d'ions, oxydation alcaline post-colonne et détection par fluorescence.**

**Colonne** : Develosil C8, 5 $\mu$ , 250\*4 mm.

**Pré-colonne** : Lichrospher 100 RP-8, 5 $\mu$ .

**Eluants :**

<b>Toxines</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
<b>Contre-ion :</b>	C7 Sulfonate 2 mM	C7 Sulfonate 10 mM	TétrabutylAmmonium 1.0 mM
<b>Tampon :</b>	← Acide Phosphorique 30 mM →		Acide Acétique 50 mM
<b>pH</b>	7,10	7,20	5,80
<b>Température</b>	← 22° C →		
<b>Débit</b>	← 0,8 ml/min →		

**Oxydation post-colonne :**

<b>Température :</b>	50° C	35° C	45° C
<b>Oxydant :</b>	Acide périodique 7 mM		<b>Acidification :</b>
<b>Tampon :</b>	Phosphate Sodium 10 mM		Acide Acétique : 50 mM
<b>pH</b>	: 9,00		
<b>Débit</b>	: 0,4 ml/min		<b>Débit</b> : 0,4 ml/min

**Fluorescence :**

$\lambda$  excitation : 330 nm

$\lambda$  émission : 390 nm



ANNEXE 3 : Schéma de la chaîne d'analyse des toxines paralysantes par Chromatographie.

