

63604

N600R201-AMZ-C

Doc 1 EL

Direction de l'Environnement et de l'Aménagement Littoral
Département Microbiologie et Phycotoxines
Laboratoire Phycotoxines et Nuisances



Zouher AMZIL
Amaury MATHIAS

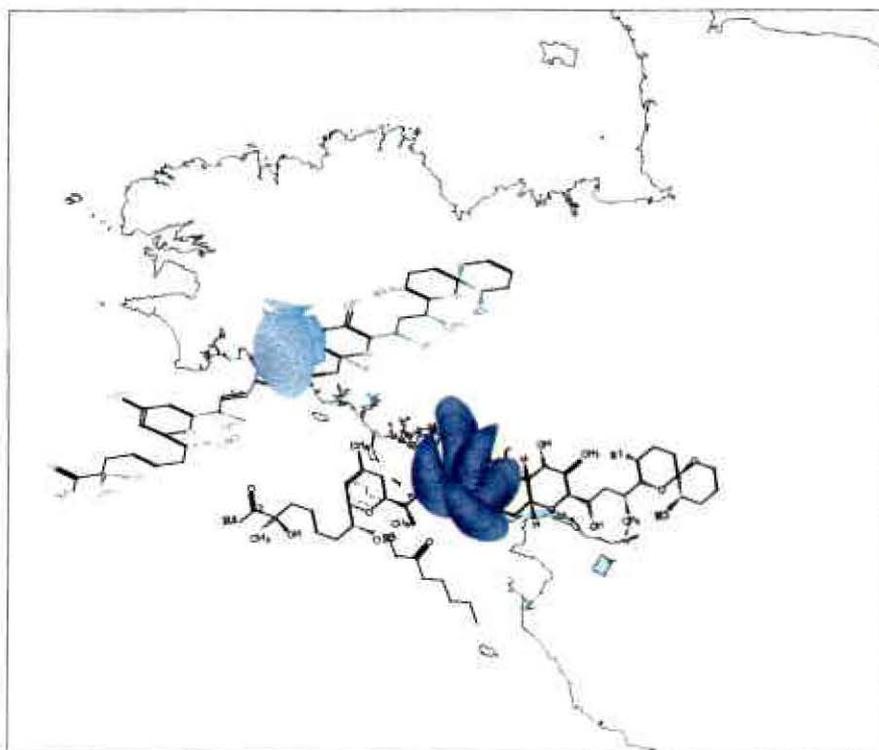
RST.DEL/02.03/PN

ifremer

Contamination en dinophysistoxines des moules de Bretagne sud

Mise en évidence des dérivés acyls-esters de l'acide okadaïque (DTX-3)

Etude comparative : analyses chimiques, tests biologiques et
concentrations cellulaires de *Dinophysis*



N600
R201
AMZ
C

IFREMER Bibliothèque de BREST



OEL09432

Novembre 2002

Fiche documentaire

| | |
|---|--|
| Numéro d'identification du rapport : RST.DEL/02.03/PN Diffusion : libre : <input checked="" type="checkbox"/> restreinte : <input type="checkbox"/> interdite : <input type="checkbox"/> Validé par : Patrick Lassus Adresse électronique : - chemin UNIX : - adresse WWW : | date de publication : novembre 2002 nombre de pages : 34 bibliographie : Oui illustration(s) : Oui langue du rapport : Français |
| Contamination en dinophysistoxines des moules de Bretagne sud Mise en évidence des dérivés acyls-esters de l'acide okadaïque (DTX-3) Etude comparative : analyses chimiques, tests biologiques et concentrations cellulaires de <i>Dinophysis</i> <i>Dinophysistoxins contamination in southern Brittany mussels</i> First report of okadaic acid acyl-esters derivatifs (DTX-3) Comparative study : chemical analysis versus biological test and <i>Dinophysis</i> cell count. | |
| Contrat n° _____ Rapport intermédiaire <input type="checkbox"/> Rapport définitif <input checked="" type="checkbox"/> N° _____ | |
| Auteur(s) principal(aux) : Zouher AMZIL, Amaury MATHIAS (*) | Organisme / Direction / Service, laboratoire Ifremer Direction de l'Environnement et de l'aménagement Littoral DEL/MP/PN |
| Collaborateur(s) : Secrétariat : Michelle Vrignaud | Organisme / Direction / Service, laboratoire |
| Cadre de la recherche : Programme : Comportement des polluants Projet : B 12004 – Pôle Chimie des Phycotoxines Convention : Autres (préciser) : | |
| Résumé : – Le réseau de surveillance du phytoplancton et des phycotoxines de l'Ifremer (REPHY) chargé des contrôles de la salubrité des coquillages procède à des tests de toxicité des coquillages sur souris dès l'apparition des espèces de <i>Dinophysis</i> (producteur d'acide okadaïque, AO) dans l'eau de mer. Or, ce test ne permet pas d'identifier ni de quantifier les toxines mises en cause, en particulier l'AO et ses dérivés (DTX-1, DTX-3). Seule une analyse chimique permet d'y parvenir. Dans un premier temps, le protocole de préparation des extraits de coquillages utilisé lors des tests-souris a été optimisé en vue de l'adapter à l'analyse chimique des toxines recherchées. A défaut de standard de DTX-3 (dérivés acyls-esters de l'AO), leur dosage se fait indirectement après une étape d'hydrolyse libérant l'AO. L'analyse chimique des échantillons naturels de coquillages collectés dans la cadre du REPHY sur trois sites d'élevage en eaux profondes de la Bretagne sud en 2001 montre, en plus de l'AO, d'une part la présence de DTX-3 à des proportions allant de 50 % à 100 % de la quantité totale de toxines, et d'autre part, l'absence de DTX-1 (dérivé méthylé de l'AO). Le processus de contamination des coquillages par <i>Dinophysis</i> dure environ une semaine. De plus, pour tous les échantillons, les données acquises font ressortir une cohérence globale entre l'évolution des concentrations cellulaires de <i>Dinophysis</i> dans l'eau de mer, la toxicité des extraits de moules sur souris et la concentration en équivalent AO (AO + DTX-3). – | |

(*) stagiaire, IUP-Université Nantes / Ingénieur Maître

Abstract :

Ifremer monitoring network for phytoplankton and phycotoxins (REPHY) is in charge of shellfish safety control and carries out shellfish toxicity test on mice as soon as *Dinophysis* cells (okadaic acid "OA" producer) are observed in sea water. However, this test can neither identify or quantify the diarrhetic toxins OA and its analogues (DTX-1, DTX-3). Only a chemical analysis is able to detect them. At first, the shellfish extraction procedure used for mouse-tests was optimised in order to adjust it for OA/DTX-1 chemical analysis. Due to the lack of standard, DTX-3 quantification is done indirectly after a hydrolysis stage releasing OA. Chemical analysis of shellfish samples collected in 2001 from three locations of "Long-line Mussel Farming" of southern Brittany reveals, in addition to OA, in one hand, the presence of DTX-3 ranging from 50% to 100% of the total OA quantity ; and in other hand, the absence of DTX-1. Shellfish contamination by *Dinophysis* takes approximately one week. Furthermore, data collected in this study indicate a close relationship between *Dinophysis* cell count variations, mussel toxicity mouse-tests and [OA + DTX-3] concentration.

Mots-clés : Acide okadaïque (AO), 7-O-acyl-AO (DTX-3), moule, *Dinophysis*, analyse chimique.

Words keys : Okadaic acid (OA), 7-O-acyl-OA (DTX-3), mussel, *Dinophysis*, chemical analysis.

Sommaire

| | |
|---|----|
| Introduction | 3 |
| 1. Contexte | 4 |
| 1.1. Complexe toxines diarrhéiques | 4 |
| 1.2. Réglementation | 4 |
| 1.3. Dinophysistoxines | 6 |
| 2. Procédure d'analyse chimique des DTXs par CLHP / Fluorimétrie | 7 |
| 2.1. Rappel de la méthode existante pour le dosage de l'acide okadaïque | 7 |
| 2.1.1. Protocole de préparation des extraits | 7 |
| 2.1.2. Analyse chimique AO / DTX-1 par CLHP/FL | 7 |
| 2.2. Adaptation du protocole d'extraction DSP-REPHY à l'analyse chimique de l'AO et ses dérivés DTXs | 9 |
| 2.2.1. Etude de faisabilité du dosage de l'AO dans les extraits REPHY | 10 |
| 2.2.2. Optimisation et adaptation du protocole d'extraction DSP du REPHY | 13 |
| 2.2.3. Evaluation des dérivés DTX-3 en équivalent AO : dosage indirect | 15 |
| 3. Relation : analyse chimique/tests-souris/ <i>Dinophysis</i> ... | 19 |
| 3.1. Représentation des données | 20 |
| 3.2. Interprétation des résultats | 22 |
| 3.3. Discussion et conclusion | 23 |
| 4. Conclusion générale | 29 |
| 5. Références bibliographiques | 31 |
| Annexe | 33 |



Introduction

En France, les coquillages des zones de production sont régulièrement contaminés par des micro-algues du genre *Dinophysis*, producteurs d'acide okadaïque (AO). Une fois dans les coquillages, une partie de l'AO peut faire l'objet d'une acylation donnant des dérivés acyls-esters de l'AO appelés dinophysistoxines-3 (DTX-3). La consommation des bivalves contaminés peut alors provoquer des gastro-entérites. Ce syndrome est connu sous le nom anglo-saxon de DSP (Diarrhetic Shellfish Poisoning). Ces événements conduisent à des interdictions de commercialisation et donc à une perte économique pour les professionnels de la conchyliculture. En effet, le réseau de surveillance de l'Ifremer (REPHY), chargé des contrôles de la salubrité des coquillages depuis 1983, procède à un test de toxicité sur souris dès l'apparition des cellules de *Dinophysis* dans l'eau de mer.

Le test-souris consiste en une évaluation de la toxicité des extraits d'hépatopancréas (HP) sur un lot de trois souris par voie intrapéritonéale. Le test est considéré comme positif si on observe la mort d'au moins deux souris sur trois sur une période de 24 heures. Or, ce test ne permet pas d'identifier ni de quantifier les toxines diarrhéiques en cause. De plus, il peut donner des résultats « faux positifs » à cause du manque de fiabilité dû aux variations de réponse inter-individuelle des souris. Seule une méthode physico-chimique permet la quantification des toxines diarrhéiques recherchées (AO et ses dérivés les dinophysistoxines "DTXs").

Il existe une méthode de dosage de l'AO/DTX-1 par Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à un fluorimètre (CLHP/FL) qui fait partie des outils de confirmation du laboratoire Phycotoxines et Nuisances de l'Ifremer (DEL/MP-PN). La procédure analytique (extraction des toxines et analyse physico-chimique) est basée sur celle utilisée pour l'échantillon de moules de référence contenant l'AO et la DTX-1 (MUS-2). Or, ce protocole d'extraction des toxines n'est pas le même que celui pratiqué pour le dépistage du complexe toxines diarrhéiques sur souris, car ce dernier permet d'extraire l'ensemble des toxines y compris l'AO et ses dérivés les DTXs. Afin d'évaluer la quantité de toxines inoculée aux souris, il est indispensable de réaliser les analyses CLHP/FL sur les mêmes extraits. Disposant de l'échantillon de moules certifié (MUS-2), une optimisation du protocole d'extraction DSP - REPHY a été menée dans un premier temps pour l'adapter à l'analyse chimique de l'AO/DTX-1. A défaut de standards de dérivés DTX-3, leur dosage se fait indirectement en ajoutant une étape d'hydrolyse libérant l'AO qui est ensuite dosé par CLHP/FL.

L'évaluation par CLHP/FL des toxines de la famille de l'AO (AO libre et sous forme DTX-3) a porté sur des échantillons de moules d'eaux profondes "REPHY" de l'année 2001 en provenance de Bretagne sud, parmi les zones les plus touchées par *Dinophysis*. Une étude comparative a été menée entre les résultats des analyses chimiques et ceux des tests souris DSP en relation avec la concentration cellulaire de *Dinophysis* dans l'eau de mer en vue de vérifier la cohérence entre les différents jeux de données.



1. Contexte

1.1. Complexe toxines diarrhéiques

Les premiers cas d'intoxications gastro-intestinales liés à la consommation des coquillages contaminés par des dinoflagellés ont été observés aux Pays-Bas dans les années 60. Le même phénomène s'est produit au Japon dans les années 70. Les premiers travaux réalisés par les équipes japonaises ont permis d'établir une liaison entre la contamination des coquillages et la présence du dinoflagellé *Dinophysis* dans l'eau de mer (Yasumoto *et al.*, 1978).

Actuellement, le complexe toxines diarrhéiques comprend quatre familles de composés qui sont des polyéthers cycliques moyennement polaires (Amzil *et al.*, 2000) : le groupe Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP) [acide okadaïque, dinophysistoxines "DTXs"], les pecténotoxines (PTXs), (Yasumoto *et al.*, 1989), les yessotoxines (YTXs) (Tubaro *et al.*, 1998 ; Yasumoto et Satake, 1998), et les azaspiracides (AZAs) (Satake *et al.*, 1998). L'accumulation de ces toxines - via les dinoflagellés producteurs - dans les bivalves à des teneurs supérieures au seuil sanitaire, conduit à des interdictions de commercialisation et donc à une perte économique pour les professionnels de la conchyliculture.

En Europe, les intoxications diarrhéiques peuvent être dues à la présence de la famille DSP et/ou AZA et/ou PTXs et/ou YTXs. Par exemple, en France c'est l'acide okadaïque ; en Italie ce sont les DSPs, les PTXs et les YTXs ; en Irlande ce sont les DSPs et les AZAs. Cependant, des variations saisonnières et régionales du profil toxinique peuvent être observées.

Les symptômes d'intoxication (gastro-entérites) apparaissent au bout de 30 minutes à 12 heures après consommation des coquillages contaminés (en moins de 4 heures dans 70 % des cas). Les douleurs abdominales durent environ trois jours. Aucune mortalité humaine n'a été rapportée pour le moment.

1.2. Réglementation

Les recommandations européennes régissant les procédures réglementaires de dépistage évoluent au fur et à mesure des données scientifiques acquises. Conformément à l'avis du comité vétérinaire permanent du 20 février 2002, la décision communautaire 2002/225/CE du 15 mars 2002 (JOCE du 16/03/02) a fixé les modalités d'application de la directive 91/492/CEE en ce qui concerne les limites maximales et les méthodes d'analyses dans les coquillages de ces différentes familles du complexe toxines diarrhéiques. C'est la première fois que la directive prévoit la possibilité d'utiliser des méthodes alternatives spécifiques pour le dépistage des toxines du complexe diarrhéique.



Puisqu'il est possible d'utiliser des méthodes spécifiques de dosage des toxines recherchées, des seuils réglementaires ont été fixés pour les différentes familles de toxines : pour les deux familles DSP/PTX, la limite maximale globale est exprimée en équivalent acide okadaïque « éq-AO » (160 microgrammes éq-AO par kg de chair), pour les YTX la limite maximale est de 1000 microgrammes éq-YTX par kg de chair et pour les AZA, elle est de 160 microgrammes éq-AZA par kg de chair.

Pour le moment en France, la méthode officielle de dépistage du complexe toxines diarrhéiques utilise le test biologique qui consiste en l'inoculation à des souris par voie intrapéritonéale d'extraits de glandes digestives de coquillages. Les coquillages sont considérés contaminés si on observe la mort d'au moins deux souris sur trois sur une période de 24 heures. La préparation des extraits de coquillages à tester peut se faire selon deux procédures d'extraction.

Extraction acétone (Yasumoto et al., 1978)

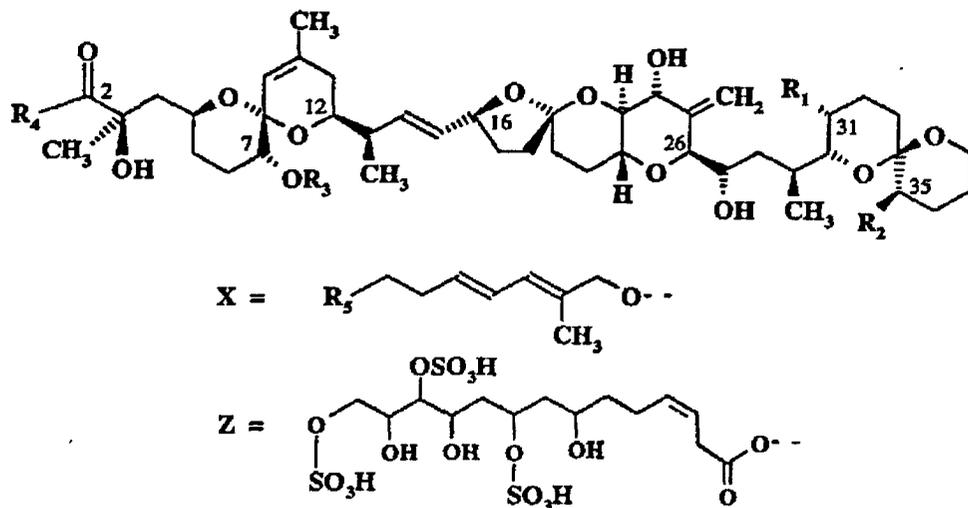
Si l'utilisation de l'acétone présente l'avantage d'évaluer la toxicité globale des extraits de coquillage sur souris, puisqu'elle permet d'extraire une large gamme de produits, l'inconvénient est qu'elle peut conduire à des résultats « faux positifs » dus à des interférences avec d'autres toxines comme les PSP. En effet, la présence de ces dernières à l'état de traces, sans danger pour le consommateur, peut entraîner une mort des souris (temps de survie entre 5 et 15 minutes) avec des symptômes neurologiques caractéristiques des PSP. Notons qu'il existe un test normalisé pour le dosage des PSP. Si ce cas de figure se produit, le test ne nous renseignera pas sur la présence des toxines diarrhéiques recherchées au départ puisque leur effet, différé dans le temps, sera masqué par celui des PSP. C'est pourquoi une recherche de toxines DSP doit passer par une autre extraction qui permet de séparer les deux types de toxines. Il s'agit de la procédure acétone / dichlorométhane (CH_2Cl_2) / eau.

Extraction acétone / CH_2Cl_2 / eau (Yasumoto et al., 1984 modifié)

Ce type de procédure commence par une extraction à l'acétone à partir d'hépatopancréas (HP). Après évaporation du solvant, l'extrait subit un partage liquide/liquide entre l'eau et le CH_2Cl_2 . Les DSP moyennement polaires passent dans la phase CH_2Cl_2 alors que les PSP restent dans la phase aqueuse. C'est l'extrait CH_2Cl_2 qui fera l'objet d'un test sur souris pour le dépistage des DSP.

Par ailleurs, en concertation avec le Laboratoire National de Référence (LNR-AFSSA) et avec la DPMA (Direction des Pêches Maritimes et de l'Aquaculture) et la DGAI (Direction Générale de l'Alimentation), Ifremer a mis en place en 1999 un protocole expérimental en vue de comparer les deux procédures (test acétone et test dichlorométhane) dans le cadre du REPHY. Les résultats obtenus ont confirmé que le choix du test CH_2Cl_2 pratiqué par le REPHY était cohérent pour les raisons évoquées ci-dessus : interférences avec PSP, faux positifs... (Amzil et Belin, 2000).





| | R_1 | R_2 | R_3 | R_4 | R_5 | Mol. Wt. | |
|---|-------------------------|-----------------|-------|-------|-------|-----------|-------------------|
| 1 | CH ₃ | H | H | OH | — | 804.5 | Okadaic acid (OA) |
| 2 | CH ₃ | CH ₃ | H | OH | — | 818.5 | DTX1 |
| 3 | H | CH ₃ | H | OH | — | 804.5 | DTX2 |
| 4 | (H or CH ₃) | Acyl | OH | — | — | 1014-1082 | DTX3 |
| 5 | CH ₃ | H | H | X | OH | 928.5 | OA diol ester |
| 6 | CH ₃ | H | H | X | Z | 1472.6 | DTX4 |

Principaux groupements acyls de la DTX-3 :

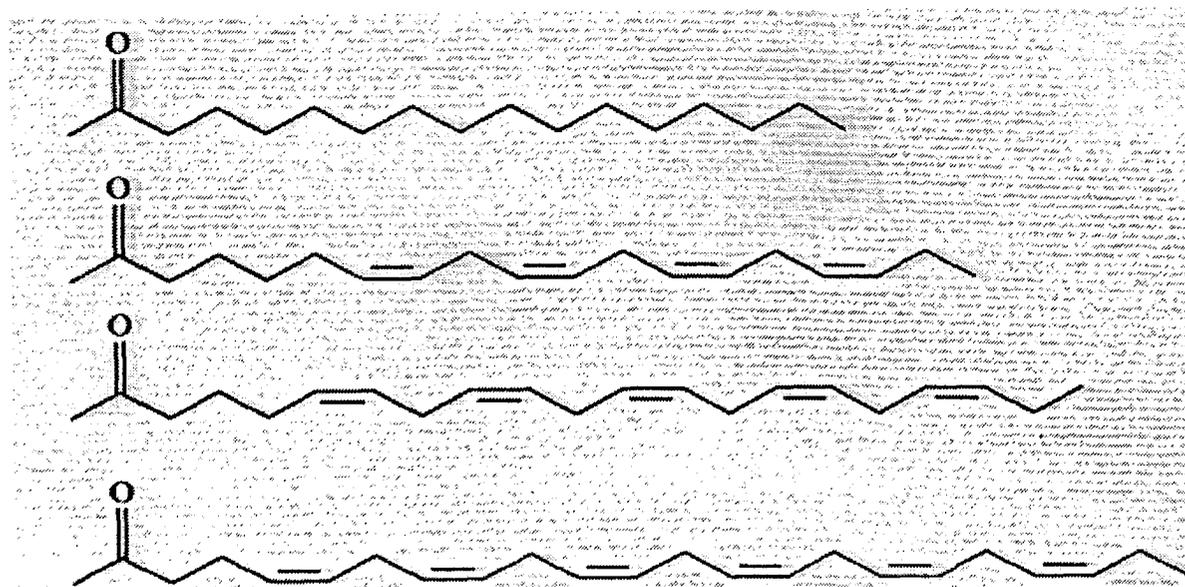


Figure 1 : Structures chimiques de l'acide okadaïque et de ses dérivés de la famille des dinophysistoxines.

De plus, d'après les résultats obtenus par tests-souris et par analyses chimiques dans le cadre de ce protocole expérimental sur le dépistage des DSP, certains échantillons de coquillages ont révélé, en plus de l'acide okadaïque (AO), la présence de dérivés acyls-esters de l'AO (DTX-3) (Houat, Ile Dumet, Groix) (Amzil, 2001).

1.3. Dinophysistoxines (AO/DTXs)

Les dinophysistoxines sont des polyéthers cycliques à fonction acide carboxylique dont la principale est l'acide okadaïque (fig. 1). Les phycotoxines diarrhéiques recensées en France sont représentées principalement par l'AO. En effet, une partie importante du littoral français est régulièrement affectée, à des périodes variables selon la latitude, par des développements de *Dinophysis*, généralement associés à une contamination DSP des coquillages (Lassus *et al.*, 1988 ; Sournia *et al.*, 1992). L'espèce incriminée ayant été identifiée comme étant *Dinophysis cf. acuminata* productrice de l'AO (Masselin *et al.*, 1992). Les régions les plus fréquemment touchées sont la Bretagne, la Normandie, le Languedoc-Roussillon et la Corse (Belin et Raffin, 1998). Les coquillages concernés sont surtout les moules, mais aussi d'autres coquillages tels que palourdes, coques, amandes, donax. Les informations relatives à la surveillance du phytoplancton et des phycotoxines sont accessibles en ligne sur le site web environnement littoral (<http://www.ifremer.fr/envlit>).

Dans d'autres pays, ce sont d'autres dinophysistoxines qui sont majoritaires : la DTX-1 au Japon et sur les continents américains, la DTX-2 en Irlande et au Portugal. De plus, une fois accumulée dans les coquillages, une partie plus ou moins importante, soit de l'acide okadaïque, soit de la DTX-1, soit de la DTX-2, peut faire l'objet d'une acylation au niveau de l'hydroxyle du carbone 7 de la molécule, ce qui se traduit par la fixation de chaînes d'acides gras saturés ou insaturés (acyles) et conduit à la formation d'un groupe de dérivés toxiques appelés les acyls-esters de l'AO (DTX-3) (fig. 1). La toxicité de ces derniers dépend du degré de saturation de l'acide gras impliqué dans l'acylation (Yanagi *et al.*, 1989). Ces dérivés DTX-3 ont été isolés uniquement à partir des glandes digestives de coquillages contaminés et n'ont pas été détectés dans le phytoplancton.

D'ailleurs, dans le cas du test biologique, le seuil sanitaire a été porté depuis janvier 2002 à un temps de survie de 24 H des souris traitées (au lieu de 5 H) afin de tenir également compte de la toxicité des dérivés DTX-3, lorsqu'ils sont présents, et dont le délai d'action *in vivo* est différé dans le temps par rapport à celui de l'acide okadaïque.

2. Procédure d'analyse chimique des DTXs par CLHP/Fluorimétrie

La première méthode de détection de l'AO par Chromatographie Liquide Haute Performance/Fluorimétrie (CLHP/FL) a été mise au point par Lee et *al.* (1987). Depuis, des modifications ont été apportées pour améliorer la méthode et l'utiliser comme un outil de soutien analytique pour les projets de recherche du laboratoire Phycotoxines et Nuisances portant sur l'AO.

2.1. Rappel de la méthode existante pour le dosage de l'acide okadaïque

La procédure analytique est basée sur le protocole de référence utilisé pour les échantillons de moules certifiés MUS-2 (annexe 1) pour le dosage de l'AO et son dérivé méthylé DTX-1. Elle commence par une étape de préparation des extraits de coquillages à partir desquels l'analyse chimique AO/DTX-1 est effectuée : dérivation des toxines, purification et analyse CLHP/FL.

2.1.1. Protocole de préparation des extraits

Comme les toxines recherchées s'accumulent principalement dans les hépatopancréas (HP) de coquillages, la préparation des extraits se fait à partir de ces organes :

- Extraction des toxines (AO/DTX-1) à partir des HP avec un mélange méthanol/eau (MeOH/H₂O : 80/20). L'opération est réalisée trois fois.
- Partage liquide-liquide de la phase MeOH 80 % avec l'hexane pour éliminer les produits apolaires (acides gras, pigments, ...). L'opération est répétée deux fois.
- Partage liquide-liquide de la phase MeOH 70 % avec le chloroforme dans lequel les toxines diarrhéiques sont solubles. Les composés hydrosolubles resteront dans la phase MeOH 70 %. L'opération est réalisée trois fois. La phase totale chloroforme est mise à sec puis l'extrait est repris dans le MeOH. Ainsi, la fraction méthanolique contenant les toxines sera le point de départ pour l'analyse chimique.

2.1.2. Analyse chimique AO / DTX-1 par CLHP/FL

L'analyse chimique comprend trois étapes : réaction de dérivation avec le réactif ADAM (9-anthryldiazométhane), purification sur cartouche de silice, et analyse par CLHP/FL.

Etape de dérivation de l'AO / DTX-1

Le principe de cette étape est de rendre les toxines fluorescentes afin de les détecter par fluorimétrie. Pour cela, à l'abri de la lumière, le réactif de dérivation (ADAM) est ajouté à un aliquote de la fraction méthanolique.



Le réactif de dérivation est un composé naturellement fluorescent et contient des impuretés de dégradation qui se traduisent par une forêt de pics chromatographiques, ce qui entraîne un encombrement du chromatogramme rendant toute interprétation très difficile. Il est alors indispensable d'effectuer une étape de purification sur silice pour éliminer l'excès d'ADAM et les impuretés dues à ce dernier (réaction de dérivation ...).

Etape de purification sur cartouche de silice

L'étape de purification est réalisée sur des cartouches de silice qui sont conditionnées successivement avec du CHCl_3 puis avec le mélange CHCl_3 /hexane (1/1). Après le dépôt de l'échantillon, une élution avec le CHCl_3 /hexane (1/1) suivie d'une élution avec CHCl_3 permet d'éliminer l'excès d'ADAM. Enfin, les toxines dérivées sont éluées avec le mélange CHCl_3 /MeOH (9/1). Ce dernier éluat fera l'objet d'une analyse par CLHP/FL.

Etape d'analyse par CLHP/FL

Après évaporation de la fraction contenant les toxines dérivées obtenue à la fin de l'étape de purification sur silice, l'extrait sec est repris dans du MeOH et sera analysé par CLHP en utilisant une phase stationnaire de silice greffée C_{18} (250 x 4,6 mm) placée dans un four thermostaté à 40 °C. Les substances seront éluées par la phase mobile acétonitrile/eau (MeCN/ H_2O : 80/20), à un débit de 1 mL/min, et détectées au fur et à mesure en fonction de leur temps de rétention sur la colonne. La détection se fait aux longueurs d'ondes d'excitation et d'émission de 254 nm et de 412 nm respectivement.

En fait, la procédure d'analyse chimique par CLHP/FL, rappelée ici, est peu adaptée pour mener une étude comparative entre le test-souris et l'analyse chimique puisque la préparation des extraits de coquillages est différente, à savoir, d'une part, acétone / H_2O / CH_2Cl_2 et, d'autre part, hexane / CHCl_3 / MeOH 80 %. En effet, la fraction (CH_2Cl_2) testée sur souris peut contenir à la fois l'AO et ses dérivés DTX-3 alors que celle (CHCl_3) analysée par CLHP contient principalement l'AO étant donné que les dérivés DTX-3 (apolaires) sont éliminés lors du partage avec hexane. C'est pourquoi, nous avons cherché à adapter le protocole de préparation des extraits pratiqué actuellement dans le cadre du REPHY (test-souris) à l'analyse chimique par CLHP/FL.

De plus, l'adaptation du protocole d'extraction REPHY est justifiée dans le cas d'un remplacement éventuel du test-souris par les analyses chimiques multitoxines qui doivent se faire à partir de l'extrait préparé selon la procédure d'extraction officielle REPHY qui permet de récupérer l'ensemble des familles du complexe toxines diarrhéiques. C'est ce point que nous allons traiter maintenant.



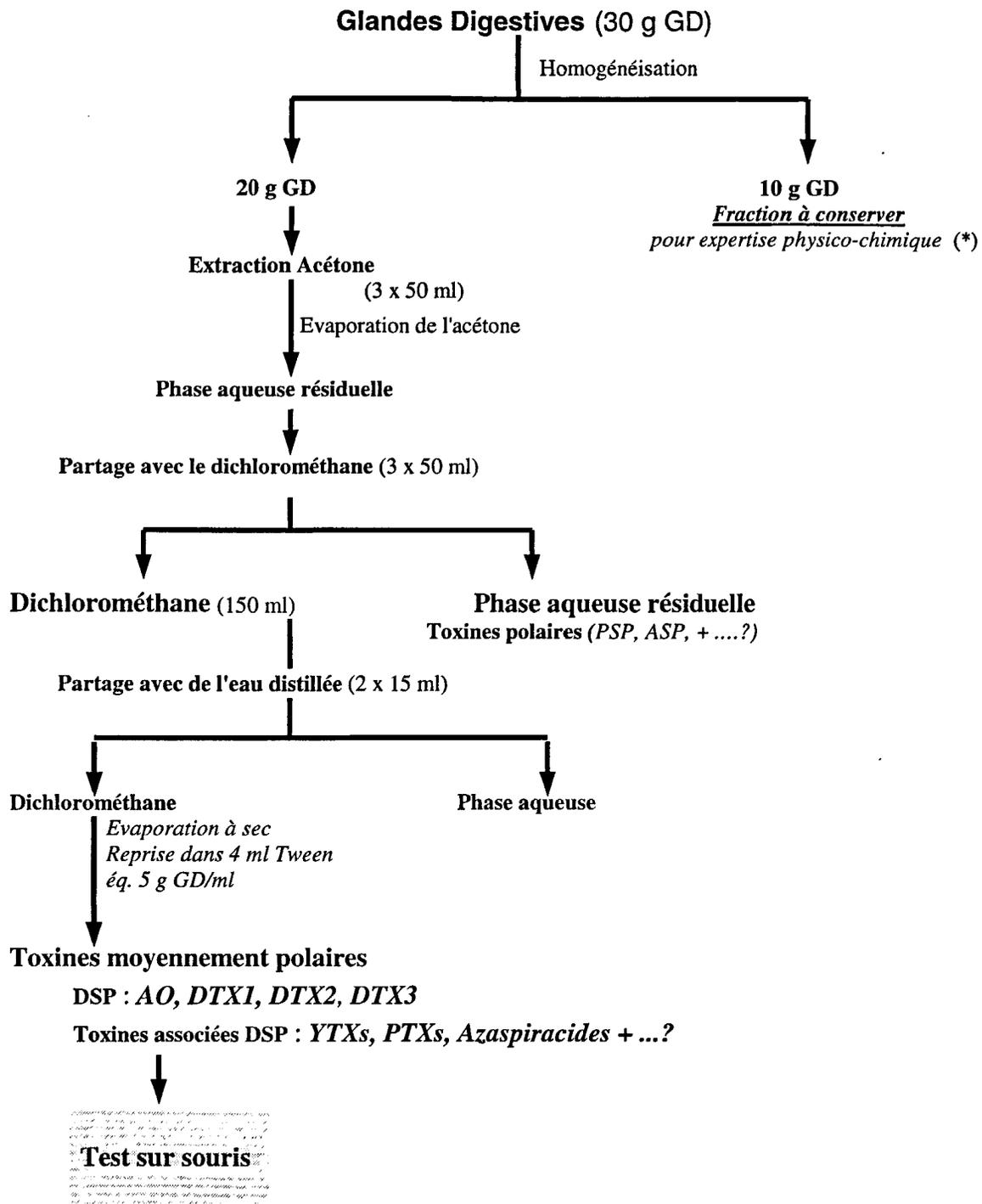


Figure 2 : Protocole de dépistage des toxines diarrhéiques DSP et associées, selon le manuel REPHY - DSP (Amzil, 2002).

(*)

Nota : Si les symptômes observés ne sont pas typiques des toxines diarrhéiques, une expertise physico-chimique est réalisée au laboratoire DEL/MP/PN à partir des 10 g de GD conservés.

2.2. Adaptation du protocole d'extraction DSP – REPHY à l'analyse chimique de l'AO et ses dérivés DTXs

Contexte

Jusqu'à la mise en évidence de DTX-3 dans les moules, la préparation des extraits de coquillages à tester sur souris était pratiquement la même que celle utilisée pour le dosage de l'AO par CLHP : hexane / CH_2Cl_2 ou CHCl_3 / MeOH 80 %. C'est la fraction moyennement polaire (CH_2Cl_2 ou CHCl_3) qui faisait l'objet d'un test sur souris et d'une analyse CLHP. Par conséquent, les dérivés acyles DTX-3 n'étaient pas pris en compte puisqu'ils sont éliminés dans la phase hexane.

C'est pourquoi, depuis 1999, la préparation des extraits de coquillages à tester sur souris ne comprend plus le lavage à l'hexane afin de prendre en compte la présence éventuelle de DTX-3 qui sont également toxiques, et donc faire une évaluation de la toxicité globale d'extraits de coquillages contaminés, à savoir : l'AO (produit par *Dinophysis*) et les dérivés DTX-3 (formés dans les coquillages à partir de l'AO). Par contre, dans le cas de l'analyse CLHP, dont la procédure d'extraction est restée inchangée, une étape d'hydrolyse alcaline des DTX-3 éventuellement contenus dans la phase hexane est nécessaire pour libérer l'AO puis le doser.

La recherche de DTX-3 par analyse chimique est devenue fastidieuse depuis la mise en évidence d'autres dérivés DTX-3 plus polaires (en plus de ceux de la phase hexane) solubles dans les phases CH_2Cl_2 et MeOH- H_2O (Vale *et al.*, 1998 ; 1999). Cela rend la procédure de préparation des échantillons inadaptée pour cerner l'activité sur souris des extraits contaminés DSP puisqu'il faudra doser (en plus de l'AO) indirectement l'ensemble des dérivés DTX-3. Ce dosage nécessiterait une hydrolyse alcaline sur les trois fractions : hexane, CH_2Cl_2 et MeOH- H_2O . De plus, l'analyse des DTX-3 dans trois fractions différentes serait une source d'erreur dans leur évaluation puisqu'il risque d'y avoir des pertes lors des partages liquide/liquide successifs.

Il serait alors plus judicieux d'effectuer le dosage chimique de l'ensemble des dinophysistoxines (AO, DTXs) à partir du seul et même extrait préparé selon le protocole d'extraction officiel. C'est pourquoi, nous avons cherché à optimiser et adapter le protocole d'extraction REPHY à l'analyse physico-chimique afin de quantifier la totalité des DTXs en équivalent AO (AO libre et sous forme de DTX-3) dans les échantillons de coquillages.

Nous devons toujours garder à l'esprit que les éventuelles modifications apportées à ce protocole ne doivent pas en changer le rendement en AO, auquel cas cette nouvelle méthode ne serait plus valable pour l'étude comparative entre la teneur en équivalent total AO dans les extraits de l'HP de moules déterminée par CLHP et l'activité de ces extraits sur souris.

Dans un premier temps, nous allons rappeler brièvement la procédure utilisée pour le dépistage sur souris des toxines DSP dans le cadre du réseau REPHY (fig. 2). A partir de 30 g d'homogénat de glandes digestives (GD), 20 g sont



utilisés pour réaliser le test-souris et 10 g environ sont conservés pour expertise physico-chimique.

Les vingt grammes de GD subissent une triple extraction acétonique, puis un partage eau - CH_2Cl_2 afin de récupérer l'ensemble des toxines classées DSP lorsqu'elles sont présentes : PTXs, YTXs, AZPs et DTXs (AO, DTX-1, DTX-2, DTX-3) dans la phase chlorée et les PSP et ASP éventuellement présentes dans la phase aqueuse.

Les dix grammes du même homogénat de GD sont conservés à - 20 °C pour les analyses physico-chimiques de confirmation et d'expertise.

Ce sont ces 10 g d'homogénat de GD qui ont servi comme point de départ pour la quantification de l'AO (libre et sous forme DTX-3) par analyse CLHP/FL en vue de la comparer avec les résultats des tests-souris.

Avant l'adaptation du protocole d'extraction des échantillons REPHY à l'analyse physico-chimique, nous avons vérifié, dans un premier temps, la faisabilité du dosage de l'AO/DTX-1 à partir d'un extrait préparé selon ce protocole REPHY.

2.2.1. Etude de faisabilité du dosage de l'AO dans les extraits REPHY

La préparation des extraits de coquillages, pour le dépistage des DSP sur souris, passe par une extraction à l'acétone pour récupérer l'ensemble des toxines DSP, en particulier les dérivés DTX-3. L'extrait acétonique évaporé à sec, puis repris dans l'eau, subit directement un partage avec le CH_2Cl_2 sans lavage à l'hexane. La fraction CH_2Cl_2 contenant les toxines sera le point de départ pour l'analyse CLHP.

Vu la différence de préparation des extraits à analyser par CLHP, par rapport à la méthode de référence utilisant l'hexane/ CHCl_3 /MeOH 80%, il était indispensable d'étudier, dans un premier temps, la faisabilité de l'analyse CLHP à partir des extraits REPHY sans le lavage hexane. En effet, l'hexane éliminant les acides gras pouvant interférer dans la réaction de dérivation avec l'ADAM, nous devons nous assurer de la bonne résolution chromatographique (pas de chromatogramme encombré).

Echantillon certifié de moules contaminées en AO/DTX-1 (MUS-2)

Dans un premier temps, nous avons appliqué la méthode d'extraction REPHY pour nous assurer de l'absence de pics pouvant interférer avec celui de l'AO. Les volumes sont adaptés à la prise d'essai, c'est-à-dire 2 g de GD provenant de l'échantillon de moule de référence contaminé (MUS-2) au lieu de 20 g de GD utilisés dans le cas de dépistage sur souris. L'extrait CH_2Cl_2 obtenu en fin d'extraction a fait l'objet d'une analyse chimique. Comme le montre le chromatogramme de la fraction CH_2Cl_2 analysée par CLHP/FL (fig. 3), on peut noter l'absence de pics au voisinage de ceux de l'AO et de la DTX-1. Ceci



montre que nous pouvons utiliser le protocole REPHY de préparation des extraits de coquillages pour le dosage de l'AO/DTX-1 par CLHP/FL.

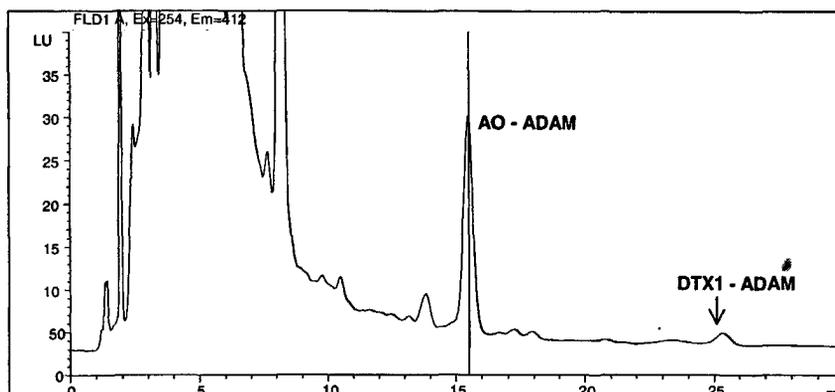


Figure 3 : Analyse CLHP/FL d'un extrait de MUS-2 préparé selon le protocole d'extraction REPHY.

Nous avons ensuite procédé à une série d'essais pour adapter et optimiser la préparation des extraits pour l'analyse de l'AO par CLHP/FL.

Echantillon de coquillage naturel témoin (moules / huîtres)

De la même manière, nous avons vérifié l'absence de substances présentes naturellement dans les matrices de coquillages et pouvant interférer avec l'AO et/ou la DTX-1. Pour cela, une comparaison des chromatogrammes de coquillages (moules et huîtres en provenance du Croisic "Grand Trait", 11/03/2002) ne contenant pas d'AO et des échantillons certifiés MUS-2 a montré l'absence de pic au voisinage des toxines recherchées dans le chromatogramme des coquillages sains (fig. 4).

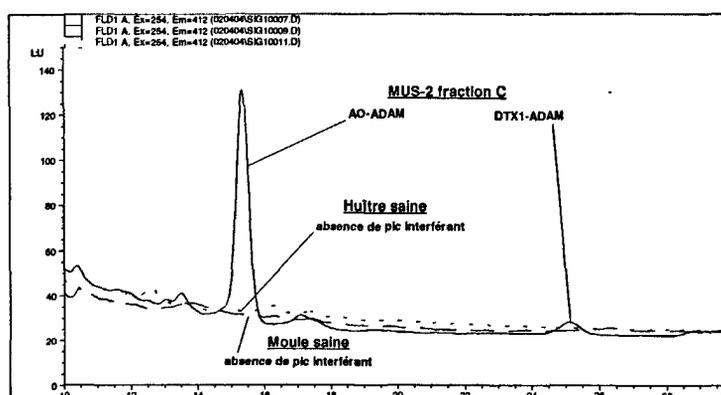


Figure 4 : Comparaison de chromatogrammes de MUS-2 (AO, DTX-1) et de coquillages sains (moules, huîtres).

Nota : Nous considérerons tout au long de cette étude que l'échantillon de moule saine analysé est représentatif de la matrice de toutes les moules présentes sur les côtes françaises. Ce postulat permet de considérer la méthode comme applicable à l'expertise de tous les échantillons de moules français. Ceci dit, l'analyse de GD de moules saines de différentes origines devrait être effectuée afin de confirmer cette hypothèse.

Stabilité du temps de rétention

Dans nos conditions opératoires, nous avons vérifié la stabilité du temps de rétention de l'AO et celui de la DTX-1 ainsi que leur rapport. L'incertitude est exprimée en compilant les résultats de plusieurs analyses :

- ✓ Temps de rétention moyen de l'AO (tr. en min) : $15,44 \pm 0,13$
- ✓ Temps de rétention moyen de la DTX-1 (tr. en min) : $25,05 \pm 0,22$
- ✓ Rapport $tr_{(AO)} / tr_{(DTX-1)}$: $0,612 \pm 0,001$

Nota : intérêt du rapport $tr_{(AO)} / tr_{(DTX-1)}$

Afin de quantifier la toxicité globale due à l'AO et ses dérivés, il nous faut analyser chaque toxine séparément. A défaut de standards de DTX-1, nous avons utilisé l'échantillon de référence MUS-2 pour repérer la DTX-1. Pour déterminer le temps de rétention de la DTX-1 dans un échantillon de coquillages français, il suffit de calculer le rapport : $tr(AO) / tr(DTX-1)$ pour le MUS-2 ($0,612 \pm 0,001$) et le comparer à celui calculé pour l'échantillon supposé contenir à la fois l'AO et la DTX-1.

Linéarité du détecteur

La réponse du détecteur a été testée en fonction de la quantité d'AO injectée. A partir des solutions standards d'acide okadaïque (AOCS-1) de concentration $25,3 \mu\text{g/mL}$, une gamme d'étalonnage externe a été préparée par dilution dans le méthanol. Chaque gamme contient cinq concentrations d'AO : 1 - 2,5 - 5 - 10 - $12,5 \mu\text{g/mL}$. D'après les résultats obtenus, la réponse du détecteur est linéaire puisque le coefficient de corrélation est proche de 1 ($r^2 > 0,99$).

Nota : La procédure analytique comprend une réaction de dérivation et une étape de purification qui peuvent être sources d'erreurs et donc entraîner des variations de réponse. C'est pourquoi, à défaut d'étalon interne, nous avons utilisé systématiquement une gamme d'étalonnage externe pour chaque analyse.



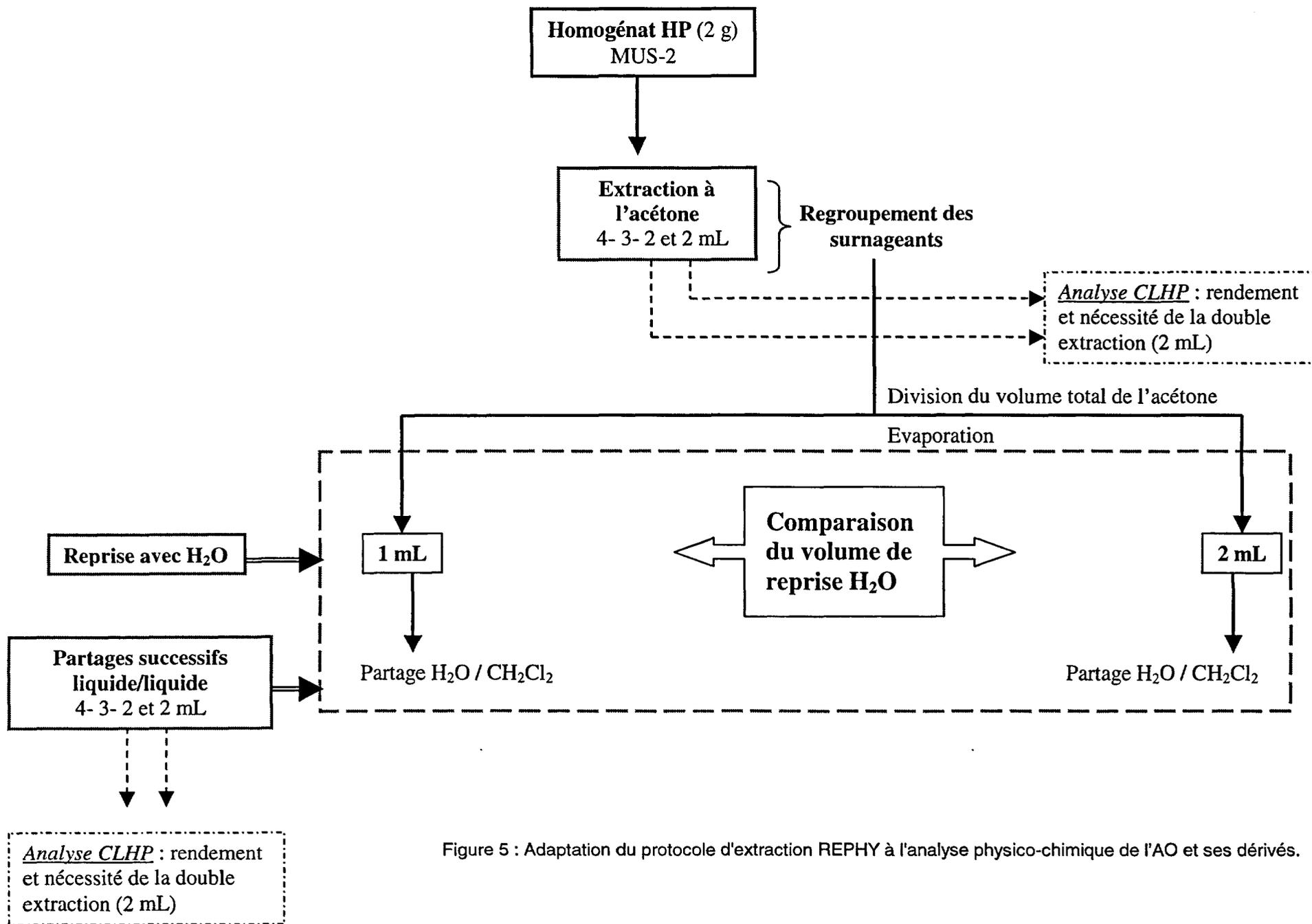


Figure 5 : Adaptation du protocole d'extraction REPHY à l'analyse physico-chimique de l'AO et ses dérivés.

Sensibilité du détecteur

Nous avons utilisé l'échantillon de moules de référence (MUS-2) pour déterminer les critères de la sensibilité de la méthode :

- la limite de détection (pour un rapport signal sur bruit "S/N" égal à 3) est de 73 ng d'AO/g de GD ;
- la limite de quantification (pour un rapport S/N égal à 10) est de 219 ng d'AO/g de GD. Notons que cette valeur est largement inférieure au seuil de sécurité sanitaire (800 ng / g de GD).

2.2.2. Optimisation et adaptation du protocole d'extraction DSP du REPHY

De manière plus pragmatique, l'adaptation et l'amélioration du protocole REPHY doivent nous permettre de réduire les volumes et/ou le nombre d'étapes afin de gagner du temps au niveau des évaporations de solvant. De petites modifications, même mineures, peuvent être source d'un grand gain de temps, en particulier dans le cas du traitement par CLHP de nombreux échantillons en contrôle de routine. La figure 5 regroupe les différents essais réalisés pour déterminer à la fois le nombre d'extractions et le volume d'eau nécessaire pour le partage avec le CH_2Cl_2 .

L'optimisation de la méthode a été réalisée en utilisant les échantillons de moules contaminés certifiés MUS-2 contenant à la fois l'AO (11 $\mu\text{g/g}$ GD) et la DTX-1 (1 $\mu\text{g/g}$ GD). De plus, l'échantillon MUS-2 servira à déterminer le temps de rétention de la DTX-1 en vue de chercher sa présence éventuelle dans les échantillons naturels français.

Etape de préparation des extraits bruts de coquillages

Deux grammes de MUS-2 sont broyés dans 4 mL d'acétone, puis centrifugés à 3000 g pendant dix minutes. Le surnageant est récupéré. L'opération est répétée successivement avec 3 et 2 mL d'acétone.

Nous avons testé le nombre d'extractions à l'acétone : est-il nécessaire et suffisant pour récupérer la quasi totalité de l'AO ? Nous avons rajouté pour cela une quatrième extraction effectuée avec le même volume d'acétone que lors de la troisième extraction. Nous avons dosé la quantité d'AO contenue dans la troisième et la quatrième fraction.

D'après les résultats (tabl. 1 a), on détecte 0,034 μg d'AO/g d'HP dans la troisième fraction et 0,05 $\mu\text{g/g}$ dans la quatrième, ce qui représente dans les deux cas moins de 0,5 % de la quantité de départ (11 $\mu\text{g/g}$). Notons que la quantité d'AO dans la quatrième fraction est légèrement supérieure à celle trouvée dans la troisième. Cette contradiction peut être attribuée aux incertitudes de la mesure sur les faibles quantités car les erreurs sont proportionnellement plus grandes. Etant donné qu'il reste moins de 0,5 % d'AO dans le résidu après les deux premières extractions (4 et 3 mL d'acétone), nous



pouvons considérer que nous avons atteint le rendement maximum sachant que le rendement d'extraction d'une substance à partir d'une matrice chargée n'est pratiquement jamais de 100 %. Par mesure de précaution, nous décidons de garder la troisième extraction et jugeons inutile l'ajout d'une quatrième extraction.

L'extrait brut d'HP de coquillages à analyser sera obtenu en effectuant une triple extraction avec successivement avec 4, 3 et 2 mL d'acétone.

Etape de partage liquide-liquide CH₂Cl₂ / eau

La solution acétone contenant l'extrait a été divisée en deux fractions pour l'optimisation du rendement d'extraction de l'AO : volume d'eau de reprise à ajouter (1 mL et 2 mL) pour le partage liquide/liquide avec le CH₂Cl₂ (fig. 5). Chacune des deux fractions subira quatre partages avec le CH₂Cl₂ afin de comparer les rendements en AO des deux types de partage (2 mL H₂O/CH₂Cl₂ et 1 mL H₂O/CH₂Cl₂).

Pour chacune des fractions, le dosage de l'AO a été effectué dans les phases CH₂Cl₂ après le troisième et le quatrième partage (tabl. 1 b). La première constatation est que, quel que soit le solvant organique utilisé et le volume d'eau de reprise (1 mL ou 2 mL), le quatrième partage est inutile puisque la phase organique ne contient aucune trace quantifiable d'AO.

| Extraction acétone | | Rendement de l'extraction | |
|----------------------------|--|---|-------------|
| 1 a) | Extraction | Concentration moyenne (µg/g d'HP) (n = 6) | |
| | 3 ^{ème} | 0,034 ± 0,004 | |
| | 4 ^{ème} | 0,05 ± 0,002 | |
| Partages successifs | | Comparaison du volume de reprise H₂O | |
| 1 b) | Partages CH ₂ Cl ₂ | 1 mL | 2 mL |
| | | Concentration AO dans CH ₂ Cl ₂ (µg/g d'HP) (n = 6) | |
| | 3 ^{ème} | 0,48 ± 0,04 | 0,35 ± 0,02 |
| | 4 ^{ème} | < LD * | < LD * |

* LD : limite de détection

Tableau 1 : Résultats des essais d'optimisation du protocole d'extraction REPHY pour l'adapter à l'analyse chimique CLHP (cf fig. 5).



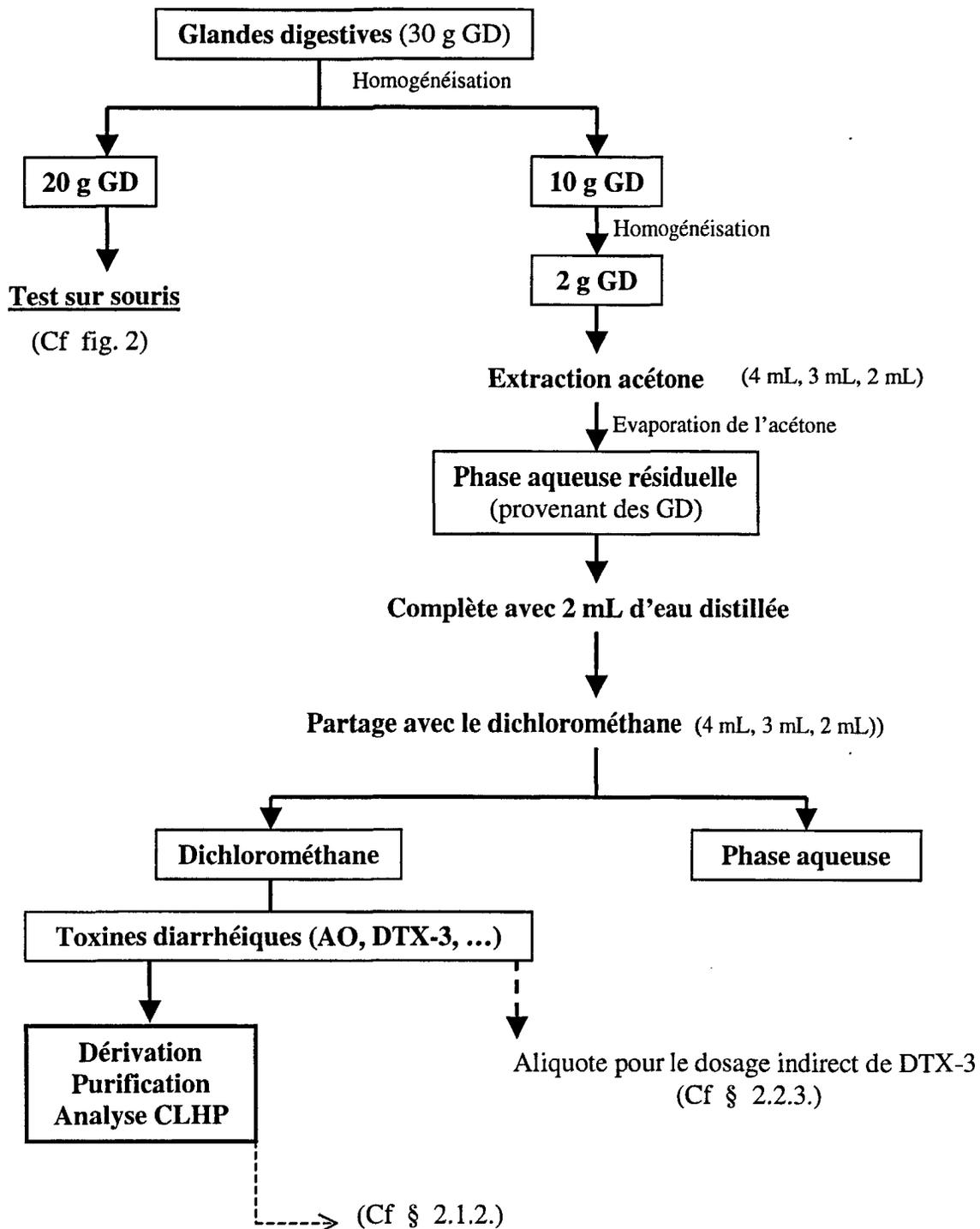


Figure 6 : Préparation des extraits de coquillages pour l'analyse chimique (CLHP)/FL de l'AO et ses dérivés.

L'analyse des fractions CH_2Cl_2 correspondant au troisième partage avec 1 et 2 mL, montre que le partage avec un volume d'eau de reprise de 2 mL est légèrement meilleur puisqu'il reste moins d'AO dans le résidu à extraire après le 2^{ème} partage (0,35 au lieu de 0,48 μg d'AO). On peut remarquer que cette augmentation n'est pas très significative et on ne peut pas l'attribuer de manière certaine à l'augmentation du volume d'eau. Il faudrait répéter l'opération plusieurs fois pour vérifier que cette tendance se confirme. Nous choisirons tout de même de travailler avec 2 mL d'eau par mesure de précaution. Compte tenu de la quantité d'AO non négligeable retrouvée, nous pouvons également en conclure que ce troisième partage au CH_2Cl_2 est nécessaire.

L'extrait acétonique évaporé à sec recevra 2 mL d'eau suivi d'un partage liquide/liquide au CH_2Cl_2 avec successivement 4, 3 puis 2 mL.

La procédure retenue pour la préparation des extraits de coquillages collectés dans le cadre du REPHY en vue d'être analysés par CLHP/FL est la suivante (fig. 6) :

- extraction à l'acétone : 4 - 3 - 2 mL
- reprise dans 2 mL d' H_2O
- partage avec le CH_2Cl_2 : 4 - 3 - 2 mL.

Après évaporation de la phase totale de CH_2Cl_2 , le résidu final est repris dans le MeOH et sera le point de départ de l'analyse physico-chimique tel que décrit précédemment (§ 2.1.2.) : réaction de dérivation, purification puis analyse CLHP/FL.

L'analyse de l'AO libre ne suffit pas à évaluer la toxicité globale des DTXs des échantillons de moules contaminés, en particulier la toxicité due aux dérivés DTX-3. A défaut de standard de ces derniers, leur évaluation doit passer par une phase d'hydrolyse libérant l'AO qui est ensuite dosé. Ainsi, le dosage indirect des dérivés DTX-3 sera exprimé en équivalent AO.

2.2.3. Evaluation des dérivés DTX-3 en équivalent AO : dosage indirect

Pour quantifier directement les dérivés acyls-esters de l'AO formés dans les coquillages à partir de l'AO, l'idéal serait de disposer de standard pour chaque DTX-3. Or, il n'existe actuellement aucun standard de ces dérivés. Puisqu'il s'agit d'acyls esters, leur dosage indirect est toujours possible en effectuant une hydrolyse alcaline libérant l'AO qui est ensuite dosé par CLHP/FL.

2.2.3.1. Choix de la procédure d'hydrolyse des DTX-3

Rappelons que le dosage des dinophysistoxines dans les extraits REPHY passe tout d'abord par une extraction acétonique suivie d'un partage liquide/liquide avec le dichlorométhane dans lequel les toxines de la famille de l'AO (DTX-1, DTX-2, DTX-3) sont solubles. L'hydrolyse alcaline sur un aliquote



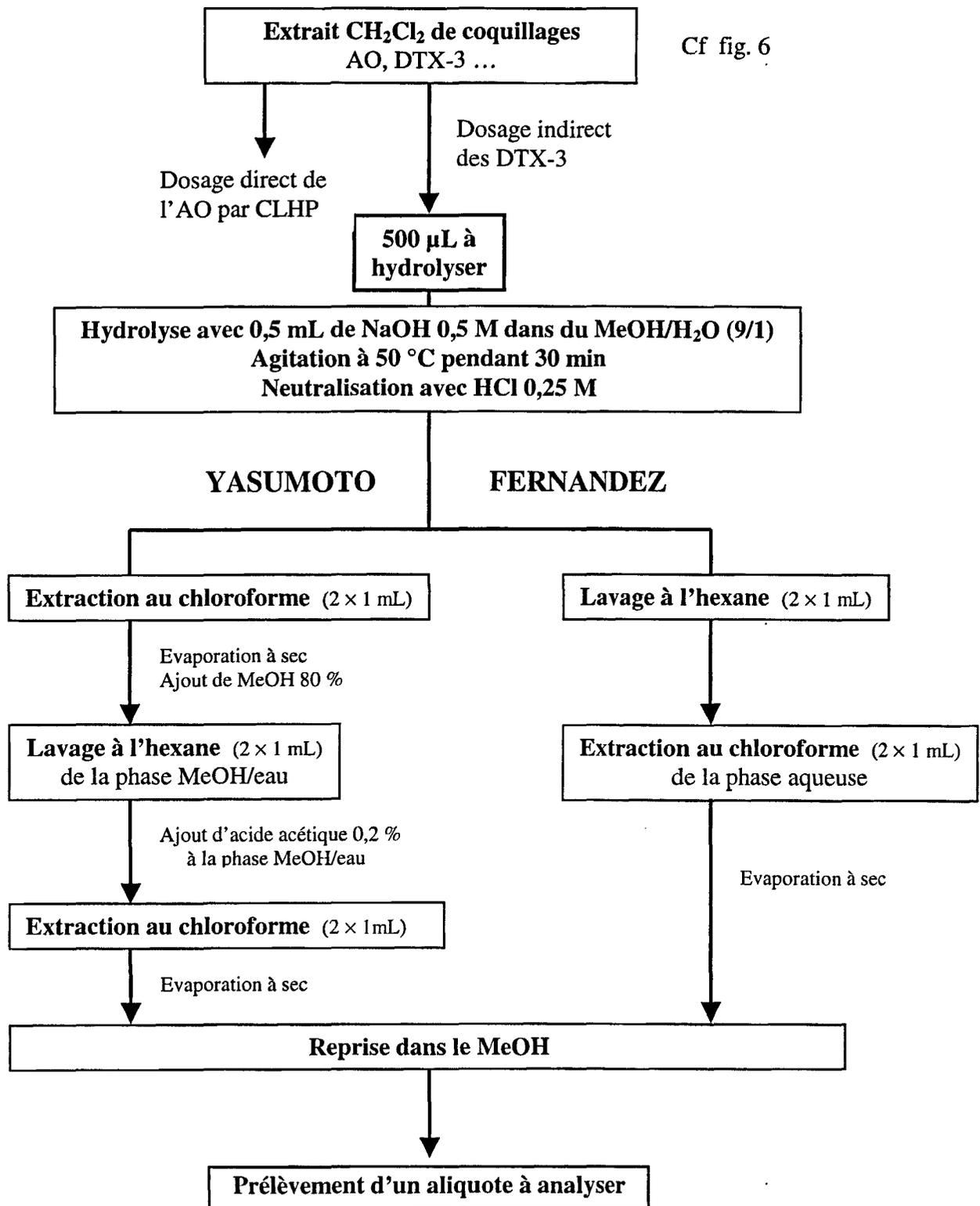


Figure 7 : Protocoles d'hydrolyse des dérivés acyles de l'AO (DTX-3) selon Yasumoto (2000) et Fernandez (1996).

de cette dernière fraction sera le point de départ pour la recherche de la DTX-3. La méthode d'hydrolyse a été développée en 1996 par Fernandez et *al.*, et a ensuite été améliorée par Yasumoto et *al.* en 2000. Les deux protocoles sont donnés dans la figure 7.

Dans un premier temps, une étude critique a été menée sur les deux protocoles :

- La méthode de Fernandez utilise un lavage à l'hexane de la phase aqueuse d'hydrolyse pour éliminer les chaînes d'acides gras libérées (acyls), ce qui risque d'entraîner également une perte d'AO dans la phase hexane au cours de ce partage phase organique / phase aqueuse. La phase aqueuse subit ensuite un partage avec du CHCl_3 pour récupérer l'AO.
- La technique de Yasumoto commence avec un partage de la phase aqueuse d'hydrolyse au CHCl_3 qui permet de récupérer la quasi-totalité de l'AO ainsi que les acyles. Ensuite, ces derniers sont éliminés dans la phase hexane en effectuant un partage hexane / MeOH 80 %. La phase MeOH 80 % est acidifiée en vue d'extraire l'AO avec du CHCl_3 . En effet, l'ajout de cet acide favorise la forme non-ionisée de l'AO ce qui lui permet un recouvrement maximum sous sa forme organique dans le CHCl_3 .

Bien qu'un rendement plus faible en AO était prévisible avec la méthode de Fernandez, les deux phases CHCl_3 et H_2O ont été analysées. En effet, au cas où les pertes en AO s'avèreraient très faibles, cette technique permettrait un gain de temps d'analyse important puisqu'elle compte deux opérations en moins (une évaporation et un partage), surtout dans le cas d'une utilisation en routine.

Les deux protocoles ont été testés en parallèle sur deux échantillons de moules REPHY 2001 en provenance de Bretagne sud testés dans le cadre du contrôle de routine : un fortement toxique et un non toxique.

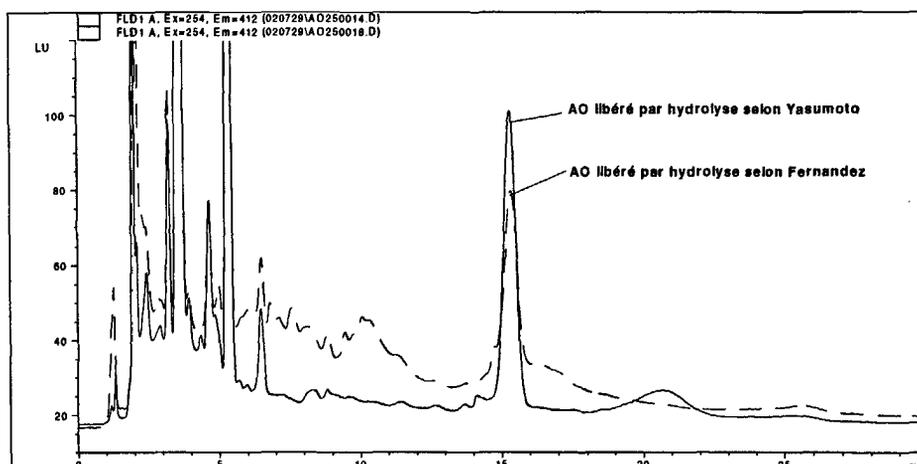


Figure 8 : Comparaison des deux méthodes d'hydrolyse des dérivés DTX-3 (Fernandez, 1996 ; Yasumoto, 2000). Echantillon de moules contaminées 2001 (Bretagne sud).

Dans un premier temps, la comparaison des chromatogrammes des fractions CHCl_3 , présentés en figure 8, révèle un pic d'AO dans le cas de l'hydrolyse selon Fernandez plus délicat à quantifier de par la moins bonne résolution chromatographique. De plus, les résultats présentés dans le tableau 2 montrent, tout d'abord, que les deux échantillons contenaient de l'AO sous forme DTX-3 en proportion beaucoup plus importante que l'AO libre. Ces résultats corroborent l'étude de Vale (1999) montrant que 80 à 90 % de l'AO contenu dans les moules portugaises est présent sous forme de DTX-3. Cependant, le recouvrement en AO est moins bon en utilisant la méthode de Fernandez. En effet, on observe pour l'hydrolyse, selon Fernandez, une baisse de recouvrement de 31 % pour le premier échantillon et de 40 % pour le deuxième par rapport à la méthode de Yasumoto. Ces pertes peuvent être attribuées au partage hexane/phase aqueuse comme expliqué précédemment.

| Echantillon 1 (MeR020501) | Concentration moyenne (n=2) (μg d'AO/g d'HP) | | Echantillon 2 (MeR050601) | Concentration moyenne (n=2) (μg d'AO/g d'HP) | |
|--------------------------------|---|----------|--------------------------------|---|----------|
| | Fernandez | Yasumoto | | Fernandez | Yasumoto |
| phase CHCl_3 | 0,7 | 1,02 | phase CHCl_3 | 1,26 | 2,09 |
| Différence de recouvrement (%) | 31 | | Différence de recouvrement (%) | 40 | |

Tableau 2 : Résultats obtenus avec l'hydrolyse selon Fernandez (1996) et selon Yasumoto (2000).

C'est l'hydrolyse selon Yasumoto *et al.* (2000) qui a été retenue pour la recherche de dérivés DTX-3.

Toutefois, le choix de cette méthode d'hydrolyse sera validée (s'assurer de la récupération quasi-totale de l'AO après hydrolyse, en particulier pour les échantillons très contaminés) dans le cadre de l'étude prévue en 2003 sur la validation de la quantification des dinophysistoxines par CLHP couplée à un spectromètre de masse (au lieu d'un fluorimètre) qui permet une détection directe des toxines recherchées sans réaction de dérivation ni de purification, en vue de remplacer à terme le test sur souris en contrôle de routine.

Hydrolyse d'échantillon de moules témoin

L'hydrolyse d'un échantillon de moules non contaminées (même échantillon témoin utilisé précédemment, page 11) est nécessaire puisqu'elle permet de vérifier l'absence de pic(s) interférant avec celui de l'AO. Le chromatogramme obtenu en figure 9 permet de confirmer qu'aucun pic ne se trouve dans l'intervalle du temps de rétention de l'AO.

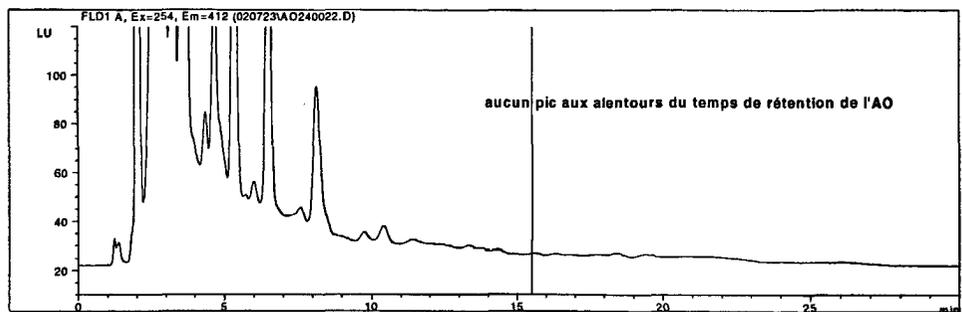


Figure 9 : Chromatogramme obtenu après hydrolyse d'un échantillon de moules saines.

2.2.3.2. Calcul de la quantité d'AO sous forme de DTX-3

Nous avons effectué l'hydrolyse sur un échantillon de coquillages en provenance de Bretagne sud prélevé en 2001 montrant une forte toxicité sur souris malgré une faible quantité d'AO libre retrouvée. Pour un même échantillon, la superposition des deux chromatogrammes, avec et sans hydrolyse, montre la présence de DTX-3. En effet, l'aire du pic de l'AO a augmenté dans la fraction hydrolysée qui correspond à la quantité totale d'AO (AO libre et sous forme DTX-3) (figure 10). Pour connaître la quantité d'équivalent AO libéré à partir des DTX3, il suffit de déduire de la surface totale l'aire du pic de l'AO dosé dans la fraction non hydrolysée (AO libre).

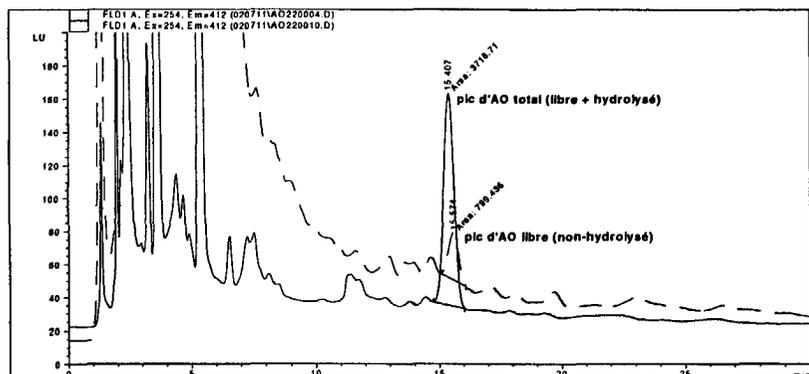


Figure 10 : Détermination de la quantité d'AO libérée par l'hydrolyse des DTX-3.

3. Relation : analyse chimique / tests-souris / *Dinophysis*

La procédure d'analyse chimique des DTXs (AO, DTX-1, DTX-3) étant optimisée, nous l'avons appliquée sur des échantillons REPHY 2001 en provenance de trois zones de Bretagne sud : les résultats obtenus ont été comparés à ceux obtenus par des tests-souris en relation avec la présence d'espèces de *Dinophysis* (*D. acuminata* dominant) dans l'eau de mer.

Disposant de ces données, il serait intéressant d'étudier la cohérence entre les résultats du test-souris DSP, la concentration de *Dinophysis* dans l'eau de mer et la quantité en équivalent AO dans les bivalves (AO produit par *Dinophysis* + DTX-3 formées dans les coquillages à partir de l'AO).

Nota : La procédure d'analyse chimique comporte certaines étapes délicates qui peuvent être source de variation de réponse, en particulier la réaction de dérivation. Afin de minimiser ces variations et en vue de mener cette étude comparative, nous avons jugé préférable de traiter en parallèle tous les échantillons de coquillages

Rappelons que dès l'apparition des espèces de *Dinophysis* dans les zones de production conchylicoles, le REPHY procède à des prélèvements de coquillages pour contrôler leur salubrité en réalisant des tests biologiques sur souris selon la méthode officielle de dépistage des DSP : extraction des toxines à l'acétone suivie d'un partage liquide/liquide H₂O/CH₂Cl₂. Après évaporation du solvant, la fraction CH₂Cl₂ pouvant contenir les toxines lorsqu'elles sont présentes, fera l'objet d'un test sur un lot de trois souris. Chacune des souris reçoit par voie intrapéritonéale 1 mL de la solution d'extrait dans le Tween 1 % correspondant à l'équivalent de 5 g de glandes digestives (GD). Ce test est considéré comme positif s'il y a mort d'au moins 2/3 des souris dans les 24 heures, ce qui correspond en théorie à une concentration en équivalent AO d'au moins 0,8 µg AO/g HP.

Les résultats de ces tests sont saisis dans la base de données Quadrigé. Les concentrations des cellules de *Dinophysis* des échantillons d'eau de mer correspondant aux échantillons de coquillages testés sont également saisis dans Quadrigé. Ceci concerne tous les points de prélèvement (coquillages, *Dinophysis*) répartis sur le littoral.

Le test-souris ne permettant pas d'identifier la nature des dinophysistoxines mises en cause ni de les quantifier, nous avons procédé aux analyses chimiques afin d'évaluer la quantité totale d'AO (AO + DTX-3) dans les extraits testés sur souris.

L'analyse chimique de tous les échantillons du littoral français n'étant pas réaliste, nous avons sélectionné la zone « Bretagne sud » habituellement la plus touchée par *Dinophysis*. Trois points représentatifs ont été traités (fig. 11) : l'île de Groix (Lorient, site 23), Men er Roue (baie de Quiberon, site 25), l'île



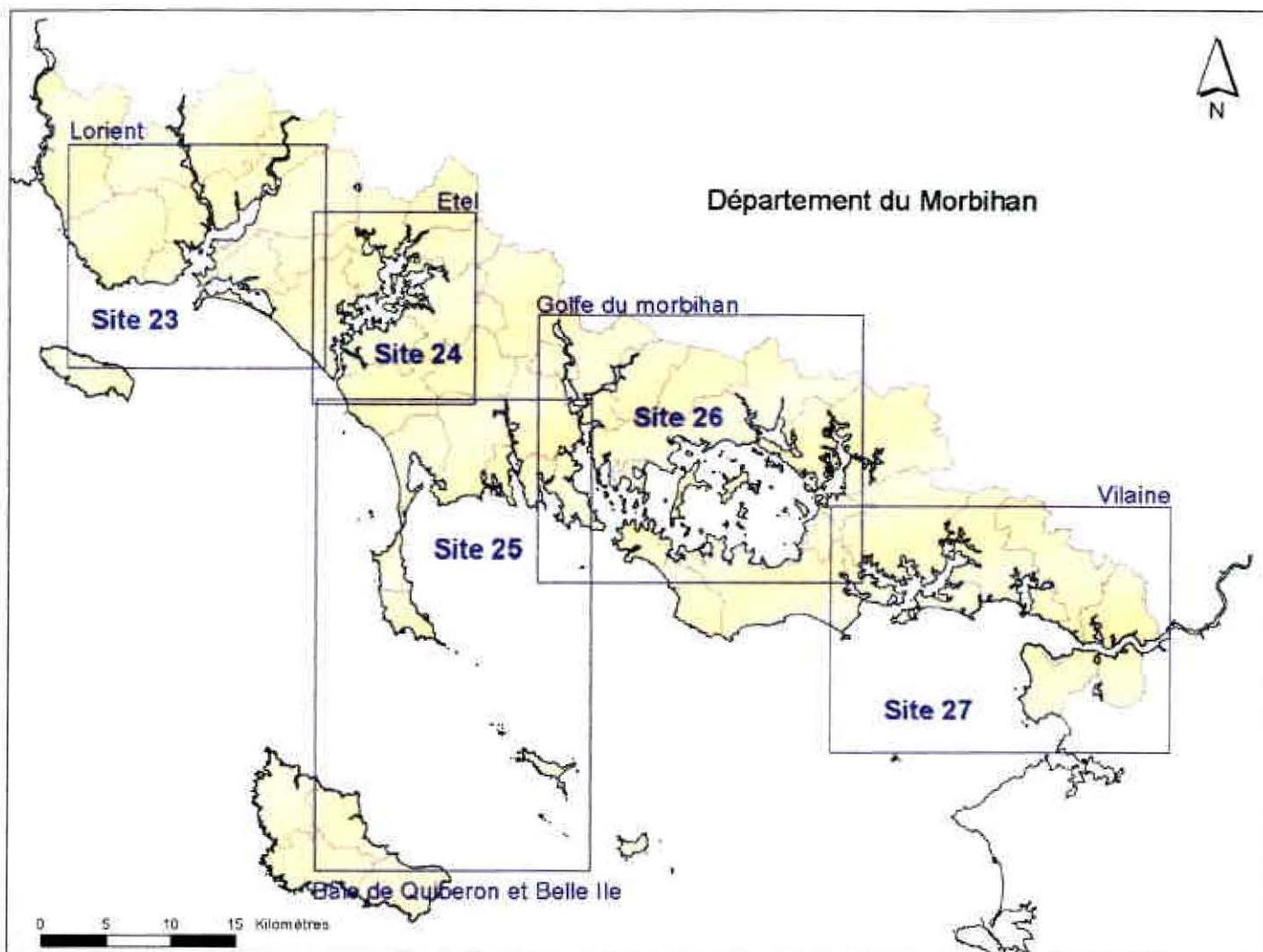


Figure 11 : Localisation générale des sites de prélèvement de coquillages.

Site 23 : île de Groix
Site 25 : Men er Roue
Site 27 : île Dumet

Dumet (baie de Vilaine, site 27). Pour chaque point, l'étude a porté sur les échantillons de moules REPHY de l'année 2001 prélevés durant l'épisode *Dinophysis*.

3.1. Représentation des données

Pour chacun des trois points, l'ensemble des résultats est représenté par trois types de graphiques :

- ✓ le premier (a) représente la concentration en AO (libre + sous forme de DTX-3) déterminée par CLHP/FL dans les extraits d'HP de moules. Pour pouvoir comparer avec les résultats test-souris, nous avons schématisé le seuil de sécurité sanitaire DSP (0,8 µg/g HP).
- ✓ Le deuxième (b) donne l'activité sur souris de ces extraits, obtenue selon le test de dépistage DSP. Classiquement, l'effet toxique d'une substance sur souris est fonction du temps de survie (ts). Par souci de lisibilité du graphe, nous avons choisi de représenter l'activité sur souris qui est inversement proportionnelle au temps de survie ($A = 1/ts \times 1000$). Pour les extraits ayant donné un résultat test-souris négatif (souris survivantes au-delà de 24H ou 1440 min), l'activité de cet extrait est considérée comme nulle. Nous avons délimité une zone correspondant au seuil de sécurité sanitaire, c'est-à-dire un temps de survie supérieur à 1 440 minutes. Les extraits négatifs sur souris sont représentés dans cette zone.
- ✓ Le troisième graphique (c) représente la concentration cellulaire de *Dinophysis* dans l'eau de mer durant l'année 2001.

Le comptage du nombre de cellules de *Dinophysis* dans le milieu est effectué par observation au microscope photonique inversé sur 10 mL (à partir d'un prélèvement d'eau d'un à deux litres), puis le résultat est rapporté à un litre. Ainsi, la limite de détection est de 100 cellules/L, correspondant à l'observation d'une cellule dans 10 mL. C'est pourquoi les données ne mentionnant aucune cellule/L ne sont pas forcément représentatives de la concentration réelle. Pour rendre le graphe plus exploitable, nous avons représenté la zone de limite de détection (0-100 cellules/L) dans laquelle le comptage des cellules est aléatoire.



Figure 12a : Concentration en équivalent AO (AO + DTX-3)
Echantillons de moules Rephy 2001 (île de Groix)

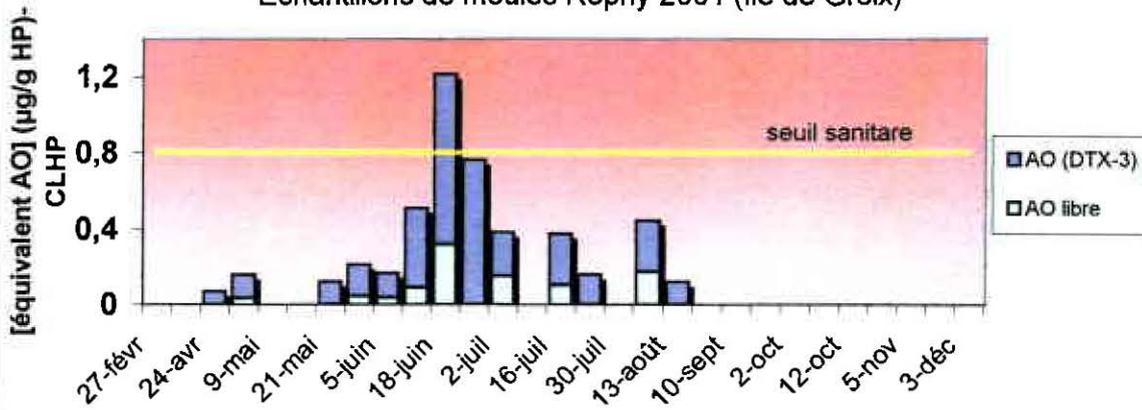


Figure 12b : Activité sur souris
Echantillons de moules Rephy 2001 (île de Groix)

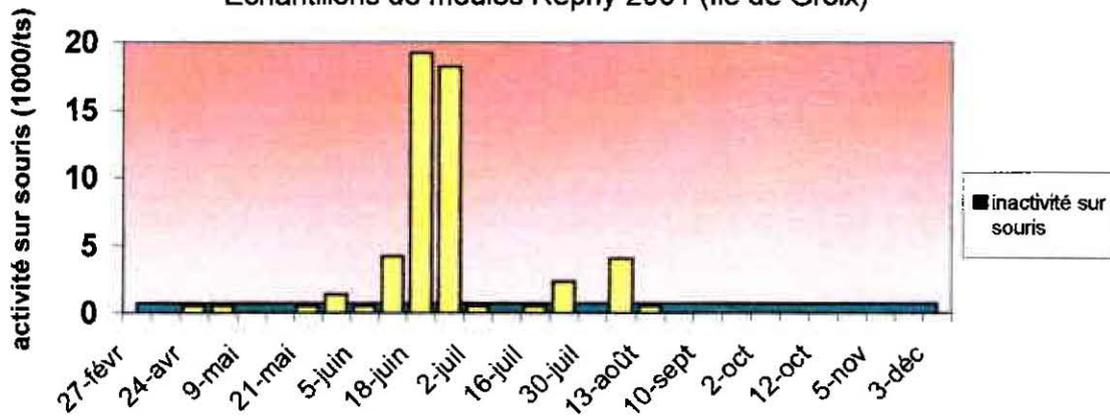


Figure 12c : Concentration des cellules de *Dinophysis*
Echantillons Rephy 2001 (île de Groix)

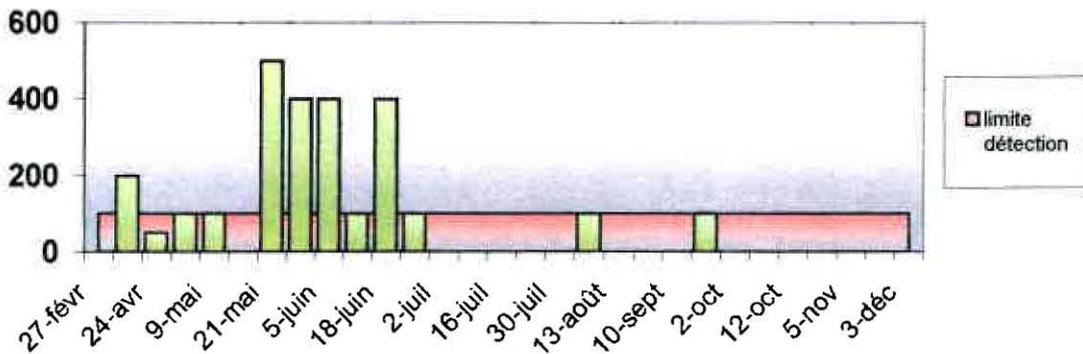


Figure 13a : Concentration en équivalent AO (AO + DTX-3)
Echantillons de moules Rephy 2001 (île Dumet)

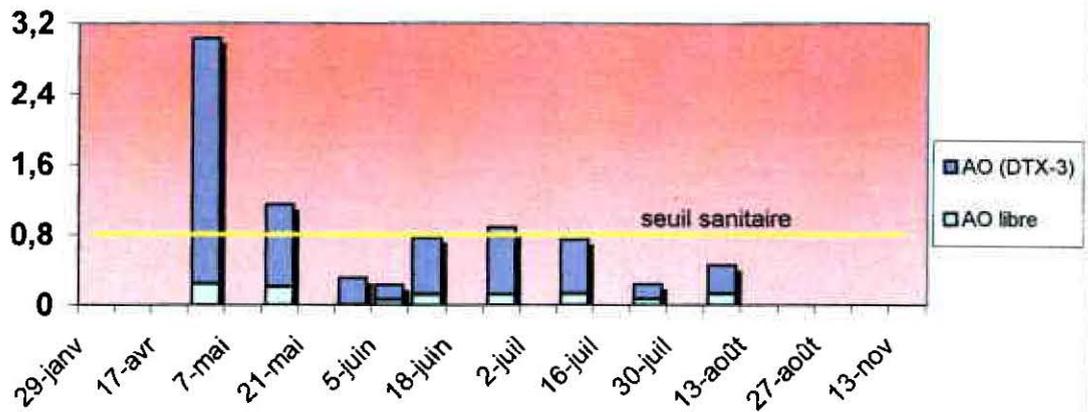


Figure 13b : Activité sur souris
Echantillons de moules Rephy 2001 (île Dumet)

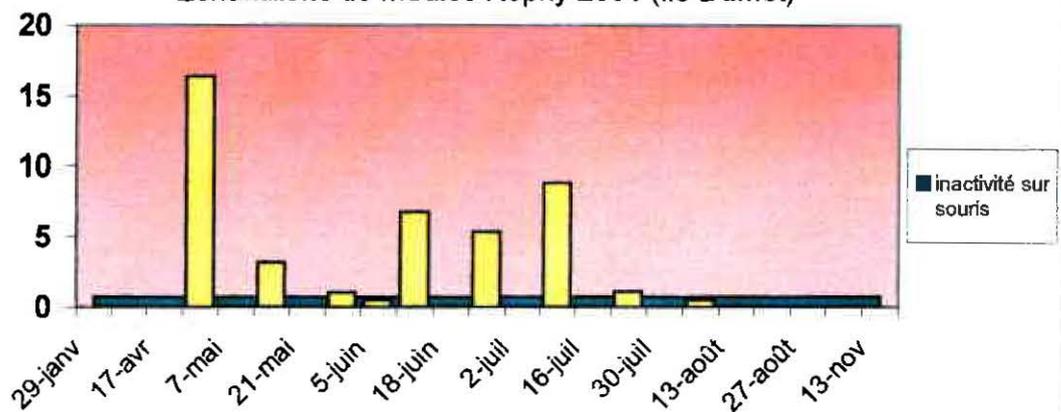


Figure 13c : Concentration des cellules de *Dinophysis*
Echantillons Rephy 2001 (île Dumet)

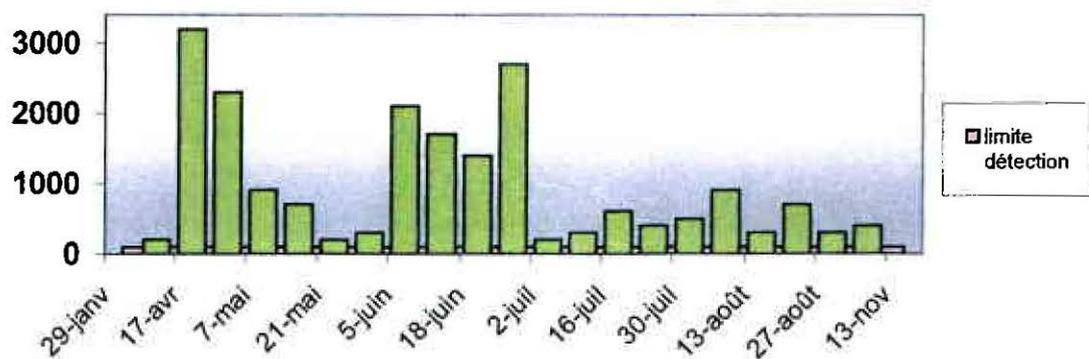


Figure 14a : Concentration équivalent AO (AO + DTX-3)
Echantillons de moules Rephy 2001 (Men er Roue)

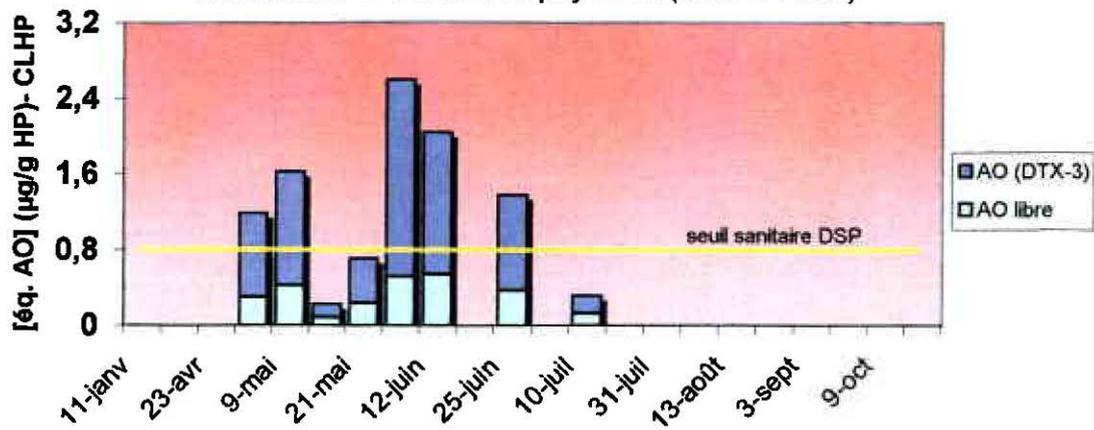


Figure 14b : Activité sur souris
Echantillons de moules Rephy 2001 (Men er Roue)

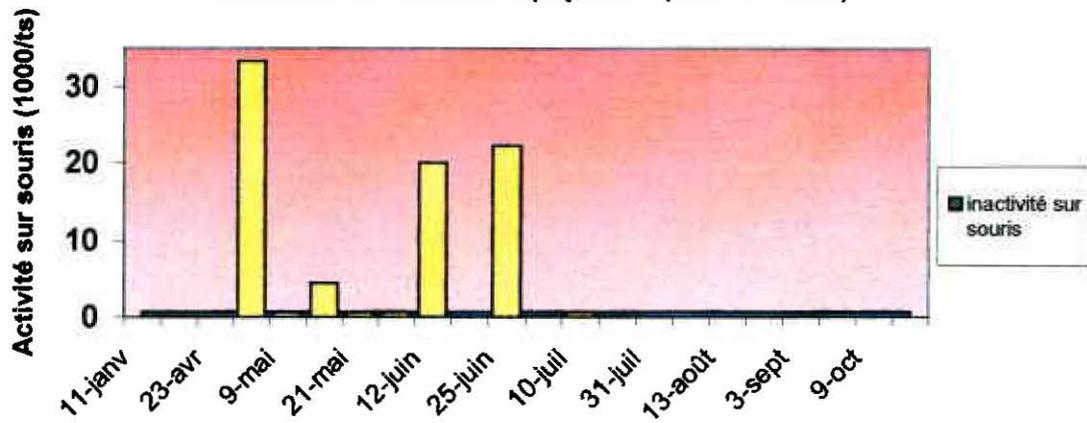
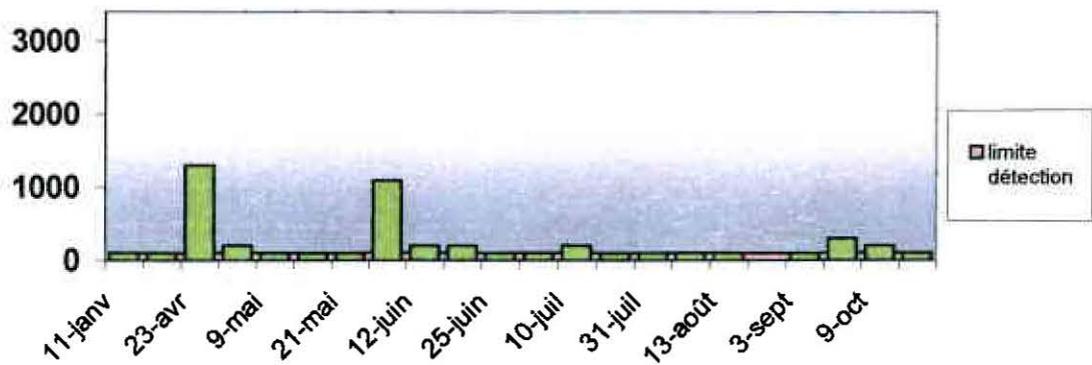


Figure 14c : Concentration des cellules de *Dinophysis* spp.
Echantillons Rephy 2001 (Men er Roue)



3.2. Interprétation des résultats

Avant une discussion générale commune aux trois points de prélèvements, nous donnerons d'abord pour chaque point les résultats représentés par les trois graphes et tenterons de les comparer pour vérifier s'il y a cohérence entre eux. La première constatation est que tous les échantillons de coquillages testés sur souris (positifs et négatifs) lors de l'épisode *Dinophysis* contiennent de l'AO et/ou de la DTX-3.

➤ *Ile de Groix (Lorient)*

L'analyse chimique de 13 échantillons a montré qu'ils contiennent tous de l'AO et/ou de la DTX-3 (fig. 12 a). Pour quatre échantillons, l'AO accumulé par les moules a été transformé totalement en DTX-3. Les échantillons les plus contaminés en équivalents AO correspondent à ceux présentant une forte activité sur souris (fig. 12 b). En se basant sur le seuil de sécurité sanitaire (24H positif / 0,8 µg éq AO/g GD), la comparaison des résultats tests-souris / analyses chimiques montre une incohérence pour 4 échantillons : test-souris positif / dose inférieure au seuil sanitaire. On peut noter que la forte activité relative des échantillons correspond à la concentration maximale de *Dinophysis* durant le mois de juin (500 cellules/L) (fig. 12 c).

➤ *Ile Dumet (Baie de Vilaine)*

Sur 10 échantillons analysés, la comparaison entre la quantité en équivalent AO (fig. 13a) et l'activité sur souris (fig. 13 b) montre une cohérence globale entre les résultats pour 8 échantillons. Notons que pour un échantillon (fin mai), l'AO a été totalement converti en DTX-3. Pour les 2 cas incohérents, on observe une très légère activité de deux échantillons sur souris (temps de survie proche de 24H) pour une dose largement inférieure au seuil sanitaire. D'après la figure 13 c, la période de développement intense de *Dinophysis* est comprise entre avril et juin avec une diminution au mois de mai. Cette observation est valable pour les résultats test-souris et pour l'analyse chimique. Enfin, nous pouvons dire que globalement l'évolution de la toxicité des coquillages suit celle de *Dinophysis*.

➤ *Men er Roue (Baie de Quiberon)*

Contrairement aux deux autres points, les huit échantillons analysés par CLHP contiennent à la fois l'AO libre et sous forme de DTX-3 (fig. 14 a). La comparaison avec l'activité de ces échantillons sur souris montre une cohérence pour cinq d'entre eux (fig. 14 a,b) : pour trois extraits toxiques sur souris, la quantité en équivalent AO (AO + DTX-3) dépasse le seuil de sécurité sanitaire (0,8 µg/g HP) et pour les deux autres inactifs, la teneur en AO est inférieure au seuil.

Cependant, deux types d'incohérences ont été observées, soit les extraits sont inactifs sur souris alors que la quantité d'AO totale dépassait le seuil sanitaire (deux échantillons), soit la quantité en AO n'expliquait pas l'activité chez la souris quoique cette dernière reste faible (échantillon du 21 mai).



Par ailleurs, quelle que soit la méthode de dépistage (souris, analyse chimique), l'évolution de la toxicité est marquée par une période de décontamination des coquillages (fin mai). Cette observation est en accord avec l'évolution de la concentration cellulaire de *Dinophysis* dans l'eau de mer (fig. 14 c).

3.3. Discussion et conclusion

Commentaires sur les cas incohérents observés

Concentration AO total > seuil sanitaire / Test-souris négatif

Ce genre d'incohérence est probablement dû aux variations de réponse inter-individuelles des souris puisque ce cas ne concerne que 2 échantillons "faux négatifs" (fig. 14a,b) sur un total de 12 échantillons contenant des doses en équivalent AO supérieures au seuil sanitaire et présentant donc un danger pour les consommateurs. Ce constat vient étayer l'intérêt d'utiliser les analyses chimiques pour le dosage des dinophysistoxines (en équivalent AO) dans le cadre du contrôle de routine afin de protéger les consommateurs puisque la quantité en équivalent AO trouvée est supérieure au seuil sanitaire alors que le test-souris est négatif.

Concentration AO total < seuil sanitaire / Test-souris positif

De la même manière, nous pouvons noter également l'incohérence inverse pour sept échantillons "faux positifs" sur un total de 18 extraits contenant des doses en éq AO inférieures au seuil sanitaire et qui n'expliquaient pas la positivité du test-souris. L'incohérence de la relation dose éq AO inférieure au seuil / activité sur souris peut-être due :

- soit aux variations du rendement de récupération de l'AO à la fois sous la forme libre et sous la forme DTX-3 après hydrolyse, en particulier quand il est présent en faible quantité. En effet, le rendement d'extraction d'une substance donnée dépend de sa concentration dans la prise d'essai du matériel biologique : les pertes sont en général plus grandes pour les faibles concentrations ;
- soit aux variations de réponse inter-individuelles des souris puisque pour les autres échantillons contenant des doses équivalentes en AO inférieures au seuil sanitaire, le test-souris était négatif (fig. 12,13,14a et b) ;
- soit à un phénomène de synergie entre les dinophysistoxines (AO, DTX-3) et une(d') autre(s) substance(s) présentes naturellement dans la matrice et qui ne présentent aucun danger pour les consommateurs (exemple de l'acide domoïque et l'acide glutamique dans le cas des toxines amnésiantes) ;



- soit à une autre substance indéterminée toxique chez la souris. Ceci dit, un produit peut être actif chez la souris par voie intrapéritonéale mais non toxique chez l'homme par voie orale (le cas des acides gras ...). Pour s'en assurer, il faudrait mener des études plus approfondies pour identifier le principe actif en cause, ce qui relève de la recherche à moyen terme. En effet, l'identification d'une substance toxique donnée doit passer par une phase de purification à partir d'une grande quantité de matière première contaminée afin d'isoler une quantité suffisante (au moins 1 mg pur) pour l'élucidation structurale de la molécule active par R.M.N. (Résonance Magnétique Nucléaire).

Conclusion

L'ensemble des résultats obtenus pour les trois points nous conduisent aux conclusions suivantes :

Sur les côtes atlantiques françaises, la période d'efflorescence de *Dinophysis* s'étend régulièrement d'avril à août. Les graphiques représentant la concentration de *Dinophysis* (fig. 12 c, 13 c, 14 c) montrent que la principale période d'efflorescence en Bretagne sud en 2001 s'étend du mois d'avril jusqu'au mois de juin. Les concentrations cellulaires de *Dinophysis* retrouvées au mois de juillet et août sont beaucoup plus faibles, voire nulles.

On peut remarquer de manière générale que les moules deviennent toxiques environ une semaine après le début des efflorescences. D'après les résultats des analyses chimiques, l'évolution de la quantité en équivalent AO dans les extraits de coquillages suit celle de la concentration de *Dinophysis*. Cela confirme que l'agent contaminant est bien *Dinophysis* (producteur d'AO). Par ailleurs, d'après la figure 12 c, on peut dire que 400 cellules/L de *Dinophysis* semble suffisant pour provoquer une accumulation de toxines rendant les moules insalubres.

Cependant, le mode de dénombrement des *Dinophysis* (10 mL d'eau de mer) peut engendrer des variations du nombre de cellules allant du simple au double. C'est pourquoi, par précaution, les tests de toxicité sur souris sont déclenchés dès la présence d'une cellule dans 10 mL (équivalent à 100 cellules/L).

Pour tous les échantillons des trois points traités, à part les deux cas incohérents "faux négatifs", l'analyse chimique des extraits inactifs (tests-souris négatifs) a révélé la présence d'AO à des concentrations inférieures au seuil sanitaire (0,8 µg AO/g HP). Ceci est dû à la limite de détection du test-souris qui est de 4 µg d'AO inoculés sur souris (dose létale, DL₅₀).

Par ailleurs, la recherche qualitative du dérivé méthylé de l'AO (DTX-1) en utilisant l'échantillon certifié (MUS-2) a confirmé encore une fois l'absence de DTX-1 dans tous les échantillons traités.



La recherche systématique des dérivés DTX-3 de tous les échantillons actifs et inactifs sur souris a mis en évidence la présence de DTX-3 dans des proportions au moins égales à 50 % de la concentration totale en équivalent AO. Cette proportion peut atteindre 90 % pour certains échantillons et jusqu'à 100 % pour les échantillons faiblement contaminés (fig. 12a et 13a), ce qui rend la recherche des DTX-3 indispensable. **Ces résultats justifient le seuil d'observation de 24 heures des souris afin de prendre en compte la toxicité des dérivés DTX-3 : l'action toxique des DTX-3 sur souris est différée dans le temps par rapport à celle de l'AO libre.**

Nous rappelons que tous les échantillons REPHY de l'année 2001, analysés ici, proviennent des zones d'élevage de moules en eaux profondes (île de Groix, Men er Roue, île Dumet). Les résultats des analyses chimiques montrent la présence de dérivés DTX-3 à des proportions très élevées par rapport à celle de l'acide okadaïque.

Afin de pouvoir extrapoler ces résultats aux zones d'élevage côtières, nous avons réalisé le même type d'étude, mais à petite échelle, sur quelques échantillons de moules REPHY de l'année 2002, en provenance du Morbihan et de Loire Atlantique (traicts du Croisic), correspondant une contamination DSP tardive des moules : fin octobre / début novembre 2002. Les résultats obtenus sont récapitulés dans l'étude complémentaire présentée ci-après.

Etude complémentaire sur des moules en provenance des zones côtières (Morbihan, Loire Atlantique)

Données Phytoplancton

Le tableau ci-dessous regroupe les concentrations cellulaires de *Dinophysis* observées dans les zones concernées durant les semaines précédant les prélèvements des échantillons de moules expertisées.



Morbihan

| Points code | Nombre de cellules <i>Dinophysis</i> par litre (année 2002) | | | | | |
|--------------------------|---|------------|------------|------------|--------------|------------|
| | Semaine 40 | Semaine 41 | Semaine 42 | Semaine 43 | Semaine 44 | Semaine 45 |
| | 30/09 - 6/10 | 7 - 13/10 | 14 - 20/10 | 21 - 27/10 | 28/10 - 3/11 | 4 - 10/11 |
| Bouréaux 52001 | // | // | // | // | // | // |
| Pointe er fosse 56001 | / | 1 400 | 200 | / | < 100 | < 100 |
| Pont Mahé 57018 | 3 100 | 100 | < 100 | / | < 100 | < 100 |

Loire Atlantique

| | | | | | | |
|---------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Ile Dumet 57008 | 1 800 | 5 200 | 3 500 | 800 | 200 | 100 |
| Le Croisic 59001 | 1 300 | / | 400 | < 100 | < 100 | < 100 |

// : ne constitue pas un point de prélèvement eau (phytoplancton)

/ : pas de prélèvement

< 100 : inférieure à la limite de détection

On peut noter que la concentration cellulaire de *Dinophysis* diminue nettement à partir de la semaine 42 (Morbihan) et la semaine 43 (Loire Atlantique) alors que les moules sont restées contaminées jusqu'à la semaine 45, période pendant laquelle la présence de *Dinophysis* était aux alentours du seuil de détection (100 cellules par litre). C'est pourquoi, une analyse chimique des échantillons de moules représentatifs a été menée en vue d'apporter des éléments de réponses sur la validité des résultats tests-souris DSP.

Résultats test-souris DSP / Analyse chimique

La préparation des extraits de glandes digestives de moules pour l'analyse chimique a été réalisée suivant le même protocole utilisé pour le test biologique sur souris : extraction acétone suivie d'un partage liquide-liquide entre une phase aqueuse et une phase dichlorométhane dans laquelle les toxines diarrhéiques recherchées (AO, DTX-3) sont solubles. Le tableau ci-dessous regroupe les résultats des tests-souris et des analyses chimiques effectuées sur les mêmes homogénats.

| Echantillons | | | Analyse chimique CLHP/FL ^a | |
|-----------------------|-----------------------|--|---|---------|
| Points | Date prélèvement 2002 | Test-souris DSP-24 H ^b (5 g éq. GD) | AO + DTX-3 μg éq. AO / 5 g GD ^c | % DTX-3 |
| 1. Bouréseaux | 21.10. | 190 min | 5,95 | 89 |
| 2. Bouréseaux | 04.11. | 180 min | 4,95 | 83 |
| 3. Pointe er fosse | 30.10. | négatif | 2,60 | 81 |
| 4. Pointe er fosse | 04.11. | 175 min | 4,60 | 85 |
| 5. Pont Mahé | 30.10. | négatif | 1,52 | 80 |
| 6. Pont Mahé | 04.11. | 585 min | 2,80 | 84 |
| 7. Ile Dumet | 04.11. | 180 min | 3,50 | 85 |
| 8. Traicts du Croisic | 04.11. | 930 min | 2,40 | 87 |

^a : la fidélité de l'analyse chimique présente une variation de 8,9 %.

^b : temps de survie médian des souris ayant reçu chacune par voie intrapéritonéale l'équivalent de 5 g de glandes digestives (GD).

^c : le seuil de sécurité sanitaire est de 4 μg éq. AO / 5 g GD (dose létale 24 H chez la souris).

Discussion

En se basant sur le seuil de sécurité sanitaire (24 H positif / 4 μg éq. AO), la comparaison des résultats tests-souris / analyse chimique montre :

- une cohérence indiscutable des résultats pour les cinq premiers échantillons (1 à 5) ;
- une cohérence limite pour l'échantillon 7 puisqu'il contient les toxines à une dose proche du seuil de sécurité sanitaire (3,50 au lieu de 4 μg éq. AO) ;
- une incohérence pour les échantillons 6 et 8 : test-souris positif / dose en éq AO inférieure au seuil sanitaire.

Par ailleurs, les résultats des analyses chimiques montrent que tous les échantillons de moules contiennent à la fois de l'acide okadaïque libre (minoritaire) et sous la forme acyls-esters (DTX-3) (majoritaire). Notons que la proportion des dérivés DTX-3 varie de 80 à 89 % de la concentration totale en équivalent acide okadaïque (AO + DTX-3) durant la phase finale de décontamination de moules (en effet, les échantillons analysés ici ont été prélevés en fin de période de développement de *Dinophysis*, semaines 44 / 45).

Ces observations laissent penser que le processus d'épuration de l'acide okadaïque dans les moules se déroule en deux phases successives : a) une phase de bioconversion de l'acide okadaïque en ses dérivés acyls-esters (DTX-3) qui sont également toxiques (ce qui explique la contamination tardive des coquillages puisque c'est l'équivalent d'une "recontamination"), b) une phase d'élimination des dérivés DTX-3. Ceci entraîne donc une période de décontamination des bivalves beaucoup plus longue (3 à 4 semaines) sachant que les tests-souris pratiqués la semaine 46 étaient négatifs.

L'ensemble des résultats obtenus (échantillons 2001 et 2002) mérite d'être complété par une étude *in situ*, durant le prochain épisode *Dinophysis*, afin de suivre la cinétique de bioconversion de l'AO en DTX-3, nécessaire pour la compréhension du processus de contamination / décontamination des coquillages.



4. Conclusion générale

Dans le cadre du contrôle de salubrité des coquillages susceptibles d'être contaminés par les toxines diarrhéiques (DSP), via les espèces de *Dinophysis* productrices d'acide okadaïque (AO), le réseau français de surveillance du phytoplancton et des phycotoxines (REPHY) utilise un test biologique sur souris à partir des glandes digestives (GD) de bivalves. Les travaux présentés ici ont consisté, d'une part, en l'identification, la quantification des toxines de la famille de l'AO par CLHP/FL à partir des extraits de coquillages testés sur souris et, d'autre part, de tenter de dégager une cohérence entre les analyses chimiques et les tests-souris en relation avec la concentration de *Dinophysis* dans l'eau de mer.

En vue de quantifier à la fois l'AO libre et les dinophysistoxines « DTXs » (DTX-1 DTX-3) dans les extraits de moules testés sur souris dans le cadre du REPHY, nous avons commencé par confirmer la faisabilité de l'analyse CLHP/FL à partir des extraits préparés selon la procédure REPHY : extraction acétone suivie d'un partage liquide/liquide avec le dichlorométhane. Dans ces conditions, le détecteur possède une très bonne linéarité ($r^2 > 0,99$) ; cependant, à défaut d'étalon interne, une gamme d'étalonnage est indispensable pour chaque procédure analytique (dérivation, purification, analyse CLHP) puisque des variations de l'ordre de 20 % peuvent être observées d'une gamme à l'autre à cause de la réaction de dérivation. En outre, la méthode est sensible puisque la limite de détection est de 73 ng AO/g HP et la limite de quantification est de 219 ng AO/g HP, ce qui est largement inférieur au seuil de sécurité sanitaire (0,8 µg AO/g HP).

Ensuite, une étude d'optimisation de la procédure d'extraction REPHY a été réalisée portant sur les volumes de solvants et le nombre d'étapes d'extraction et de partage nécessaire, afin de récupérer la quasi totalité des toxines (AO et ses dérivés DTXs) en un minimum d'opérations. Ne disposant pas de standards des dérivés DTX-3, une méthode d'hydrolyse alcaline de ces dernières a été adaptée afin de les quantifier en équivalent AO.

Le dosage de l'AO total (AO + DTX-3) a été effectué sur les échantillons naturels de coquillages prélevés en 2001 en provenance de trois sites de la Bretagne sud les plus touchées par *Dinophysis* (île de Groix, Men er Roue-baie de Quiberon et l'île Dumet-baie de Vilaine). La recherche systématique des dérivés DTX-3 dans tous les échantillons a mis en évidence leur présence dans des proportions au moins égales à 50 % de la concentration totale en équivalent AO. Cette proportion peut atteindre 90 % pour certains échantillons et jusqu'à 100 % pour les échantillons faiblement contaminés, ce qui rend la recherche des DTX-3 indispensable pour évaluer la toxicité réelle.

Comme les échantillons analysés proviennent tous de zones d'élevage de moules en eau profonde, nous avons complété ces résultats en cherchant la présence de dérivés DTX-3 dans les échantillons de l'année 2002 en



provenance des zones côtières d'élevage de moules sur bouchot (Morbihan et Loire Atlantique). Les résultats des analyses chimiques montrent que tous les échantillons de moules comprennent à la fois de l'acide okadaïque libre (minoritaire) et sous la forme acyles-esters (DTX-3) (majoritaire). La proportion des dérivés DTX-3 varie de 80 à 89 % de la concentration totale en équivalent AO (AO + DTX-3).

Par ailleurs, la recherche qualitative du dérivé méthylé de l'AO (DTX-1) en utilisant l'échantillon de référence le MUS-2 a confirmé encore une fois l'absence de DTX-1 dans tous les échantillon traités.

Notons que des échantillons de coquillages ayant donné une réponse négative sur souris contenait de l'AO et/ou de la DTX-3, mais à des doses en équivalent AO inférieures au seuil sanitaire, en particulier les échantillons de l'île de Groix. Ceci s'explique par la limite de détection du test-souris 24 H.

Enfin, l'étude comparative - quantité équivalent AO (AO + DTX-3) / concentration *Dinophysis* - montre pour l'ensemble des échantillons des trois sites une cohérence globale entre l'évolution des proliférations de *Dinophysis* dans l'eau de mer et l'évolution de la toxicité des extraits de moules sur souris. Par ailleurs, on peut remarquer de manière générale que les moules deviennent toxiques environ une semaine après le début des efflorescences de *Dinophysis*.

De plus, nous avons observé que 400 cellules/L de *Dinophysis* est une concentration suffisante pour provoquer une accumulation de toxines rendant les moules insalubres à l'île de Groix (site 23). Toutefois, cette observation ne peut pas être extrapoler à d'autres sites à cause de la variabilité géographique de la toxicité de *Dinophysis*. La concentration cellulaire en *Dinophysis* pouvant rendre les coquillages insalubres est fonction de la zone d'élevage touchée.

L'ensemble des résultats obtenus mérite d'être complété en réalisant le même type d'étude pour d'autres sites du littoral français. Cela permettrait de faire un état des lieux des toxines existantes appartenant à la famille de l'AO en relation avec la concentration cellulaire de *Dinophysis*.

Il serait également intéressant d'étudier la cinétique de formation des dérivés DTX-3 dans les coquillages à partir de l'AO puisque la proportion en DTX-3 trouvée peut atteindre 100 %, ce qui laisse penser que l'épuration par les coquillages de l'AO doit passer par sa bioconversion en dérivés DTX-3.

Par ailleurs, l'ensemble des travaux réalisés - 1) adaptation du protocole d'extraction REPHY à l'analyse physico-chimique, 2) mise en évidence de dérivés DTX-3 en quantité notable dans les échantillons de Bretagne sud - va contribuer à l'étude de validation de la quantification des dinophysistoxines par CLHP couplée à un spectromètre de masse (au lieu d'un fluorimètre) dans les échantillons de coquillages de Bretagne sud prévue sur deux épisodes de *Dinophysis* (2002 et 2003).



L'étude programmée a pour objectif d'étudier la possibilité d'utiliser les analyses physico-chimiques en complément du test-souris pour la gestion des réouvertures des zones de production de coquillages.

En effet, depuis janvier 2002 l'application du test-souris avec un seuil 24 H (au lieu de 5 H auparavant) a pour effet d'augmenter les durées de fermeture des zones de production conchyliques, ce qui conduit à un impact économique plus important et à une dégradation de l'image du produit.

5. Références bibliographiques

- Amzil Z., Belin C., 2000. Bilan du protocole expérimental Ifremer sur le dépistage des toxines diarrhéiques. Rapport interne Ifremer DEL/MP/RST/00/10/Nantes, 90 p.
- Amzil Z., Vernoux J.P., Pottier I., 2000. Les principales classes de phycotoxines. *In*: Toxines d'algues dans l'alimentation, Frémy J.-M. & Lassus P. (coord.). Ed. Ifremer, 159-188.
- Amzil Z., 2001. Synthèse et interprétation des résultats des tests-souris et analyses physico-chimiques. Addendum au Rapport interne Ifremer DEL/MP/RST/00/10/Nantes, 1-7.
- Amzil Z., 2002. Toxines diarrhéiques (DSP) et associées : Guide et Manuel. Document de prescription REPHY, 21 p.
- Belin C., Raffin B., 1998. Les espèces phytoplanctoniques toxiques et nuisibles sur le littoral français de 1984 à 1995, résultats du REPHY (réseau de surveillance du phytoplancton et des phycotoxines). Rapport Ifremer-DEL/MP-AO, 98-16, tome 1, 1-125.
- Fernandez M.L., Miguez A., Cacho E., Martinez A., 1996. Detection of okadaic acid esters in the hexane extracts of spanish mussels. *Toxicon*, 34, 3, 381-387.
- Lassus P., Bardouil M., Berthome J.P., Maggi P., Truquet P., Le Déan L., 1988. Seasonal occurrence of *Dinophysis* sp. along the french coast between 1983 and 1987. *Aquat. Living Resour.*, 1, 155-164.
- Lee J.S., Yanagi T., Kenma R., Yasumoto T., 1987. Fluorometric determination of diarrhetic shellfish toxins by high-performance liquid chromatography. *Agric. Biol. Chem.*, 51(3), 877-881.
- Masselin P., Lassus P., Bardouil M., 1992. High performance liquid chromatography analysis of diarrhoeic toxins in *Dinophysis* spp. from the French coast. *Journal of Applied Phycol.* 4, 385-389.
- Satake M., Ofuji K., James K., Furey A., Yasumoto T., 1998. New toxin event caused by Irish mussels. *In*: PROC. 8TH Int. Conf. Harmful algae, Vigo, Spain. Reguera B., Blanco J., Fernandez M.L., Wyatt T. (eds). Xunta de Galicia - IOC/Unesco, 468-469.

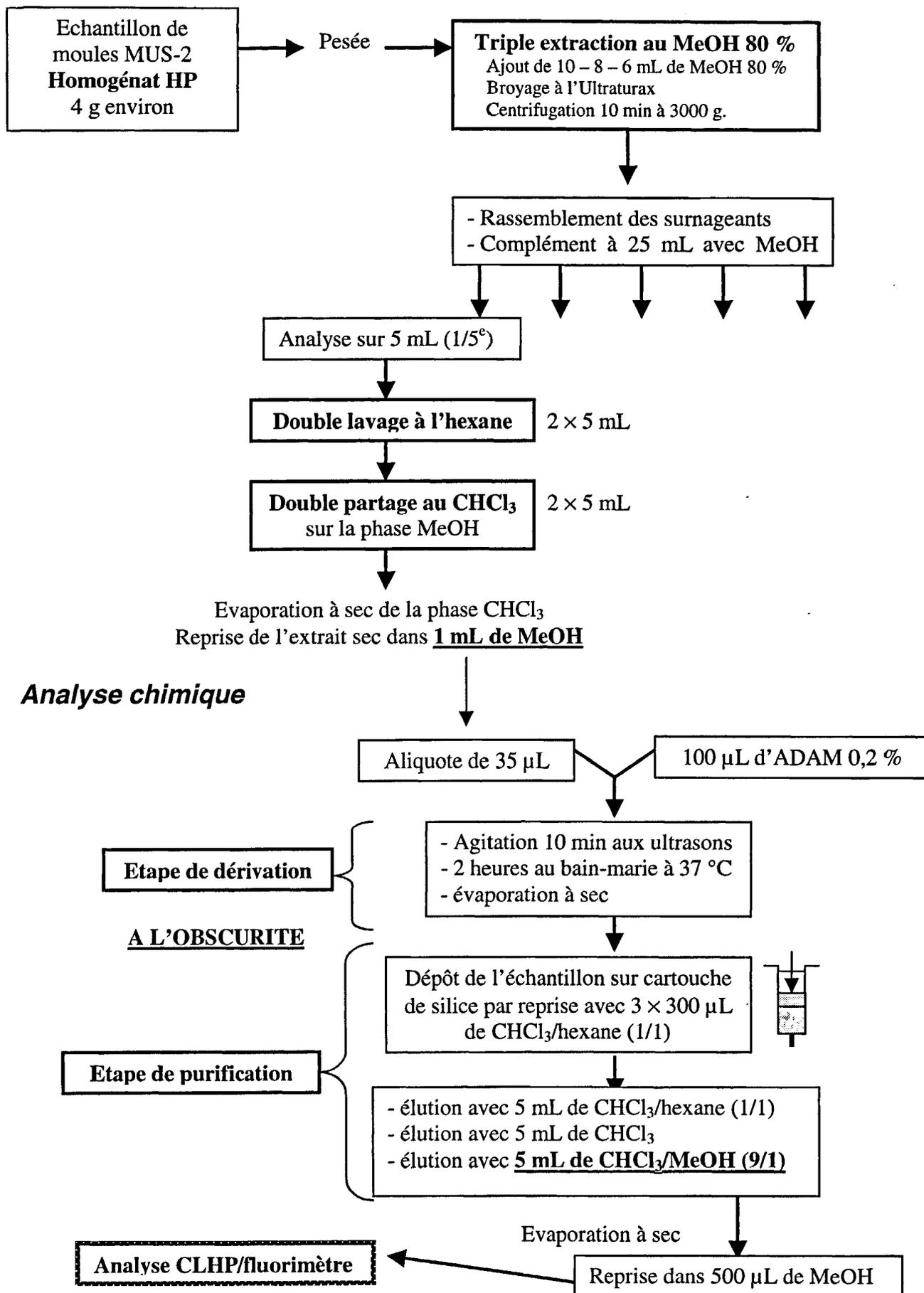


- Sournia A., Belin C., Berland B., Erard-Le Denn E., Gentien P., Grzebyk D., Marcaillou-Le Baut C., Lassus P., Paresky F., 1992 Le phytoplancton nuisibles des côtes de France. Presse Océan, Ed. Ifremer, Brest.
- Tubaro A., Sidari L., Della Loggia R., Yasumoto T., 1998. Occurrence of yessotoxin-like toxins in phytoplankton and mussels from northern Adriatic sea. *In: Proc. 8th Int. Conf. Harmful algae*, Vigo, Spain. Reguera B., Blanco J., Fernandez M.L., Wyatt T. (eds). Xunta de Galicia-IOC/Unesco, 470-472.
- Vale P., Antonia M., Sampayo M., 1998. Esters of okadaic acid related to human poisonings. *Toxicon*, 37, 1109-1121.
- Vale P., Sampayo M.A.M., 1999. Esters of okadaic acid and dinophysistoxin-2 in Portuguese bivalves related to human poisonings. *Toxicon*, 34, 1109-1121.
- Yanagi T., Murata M., Torigoe K., Yasumoto T., 1989. Biological activities of semisynthetic analogs of dinophysistoxin-3, the major diarrhetic shellfish toxin. *Agric. Biol. Chem.*, 53, 2, 525-529.
- Yasumoto T., Oshima Y., Yamaguchi M., 1978. Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the Tohoku. *District Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish*, 44, 11, 1249-1255.
- Yasumoto T., Murata M., Oshima Y., Matsumoto G.K., Clardy J., 1984. Diarrhetic Shellfish Poisoning. *In: Sea Food Toxins*, Ragelis E.P. (ed). ACS symposium series, n° 262, 208-214.
- Yasumoto T., Murata M., Lee J.S., Torigoe K., 1989. Polyether toxins produced by dinoflagellates. *In: Mycotoxins and phycotoxins*, 88. Natori S., Hashimoto K., VENO T. (eds). Elsevier, Amsterdam, 375-382.
- Yasumoto T., Satake M., 1998. New toxins and their toxicological evaluations. *In: Proc. 8th Int. Conf. Harmful algae*, Vigo, Spain. Reguera B., Blanco J., Fernandez M.L., Wyatt T. (eds). Xunta de Galicia and IOC/Unesco, 461-464.
- Yasumoto T., Suzuki T., 2000. Liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry of the diarrhetic shellfish-poisoning toxins okadaic acid, dinophysistoxin-1 and pectenotoxin-6 in bivalves. *Journal of Chromatography A*, 874, 199-206.



ANNEXE





λ excitation = 254 nm
 λ émission = 412 nm