

**DIRECTION DE L'ENVIRONNEMENT
ET DES RECHERCHES OCEANIQUES**

CINETIQUES DE DECONTAMINATION

EN MILIEU CONTROLÉ

**DE MOULES TOXIQUES
(Diarrheic Shellfish Poison)**

Premiers Résultats

M. BARDOUIL, P. MASSELIN, M. BOHEC



DERO-89-02-MR

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

DIRECTION DE L'ENVIRONNEMENT
ET DES RECHERCHES OCEANIQUES
DEPARTEMENT MILIEU ET RESSOURCES - NANTES

AUTEUR (S) : BARDOUIL M., MASSELIN P. et BOHEC M.		CODE : N° DERO-89-02-MR
TITRE CINETIQUES DE DECONTAMINATION EN MILIEU CONTROLE DE MOULES TOXIQUES (DIARRHEIC SHELLFISH POISON) PREMIERS RESULTATS		date : 9 février 1989 tirage nb : 50 ex. Nb pages : 28 Nb figures : Nb photos :
CONTRAT (intitulé) N° _____		DIFFUSION libre <input checked="" type="checkbox"/> restreinte <input type="checkbox"/> confidentielle <input type="checkbox"/>

RÉSUMÉ

Afin de mieux appréhender les cinétiques de décontamination de moules de bouchots contaminées par la toxine diarrhéique secrétée par Dinophysis (DSP), des essais en laboratoire ont été effectués à partir de moules provenant de la baie de Seine, de la baie de Douarnenez et de la baie de Vilaine. A partir de ces essais qui seront poursuivis en 1989, il se dégage deux cas : 1) quand la toxicité des moules est située autour de 0,5 US/gramme d'hépatopancréas (seuil de salubrité défini par les Japonais) la décontamination est non décelable sur 12 jours, 2) quand la toxicité est supérieure à 1 US, la décontamination est importante les huit premiers jours.

ABSTRACT

Laboratory assays have been performed, using mussels contaminated with Dinophysis, in order to assess potential depuration kinetics. Mussel samples from Seine bay, Douarnenez bay and Vilaine bay have been tested. From these assays, which are to be performed in 1989, two main results are stressed : 1) when the toxicity level is near 0,5 MU/g of hepatopancreas*, depuration is undetectable during twelve days, 2) when the toxicity level exceeds 1 MU/g, depuration is important during the first eight days.

* (quarantine level used by Japanese authorities).

mots-clés : moules - DSP - Dinophysis - décontamination

key words : blue mussels - DSP - Dinophysis - depuration

CINETIQUES DE DECONTAMINATION EN MILIEU CONTROLE
DE MOULES TOXIQUES (DIARRHEIC SHELLFISH POISON)

Premiers résultats

I - INTRODUCTION

II - DECONTAMINATION DSP

II.1. Conditions expérimentales

- II.1.a. Provenance des échantillons
- II.1.b. Acclimatation des coquillages
- II.1.c. Suivi de la décontamination
- II.1.d. Fréquence des extractions

II.2. Procédures analytiques

- II.2.a. Extractions
- II.2.b. Test-souris
- II.2.c. Analyse chimique de l'acide okadaïque

II.3. Résultats et interprétation

- II.3.a. Le Maresclé
- II.3.b. Morgat
- II.3.c. Antifer

III - DISCUSSION

IV - CONCLUSION

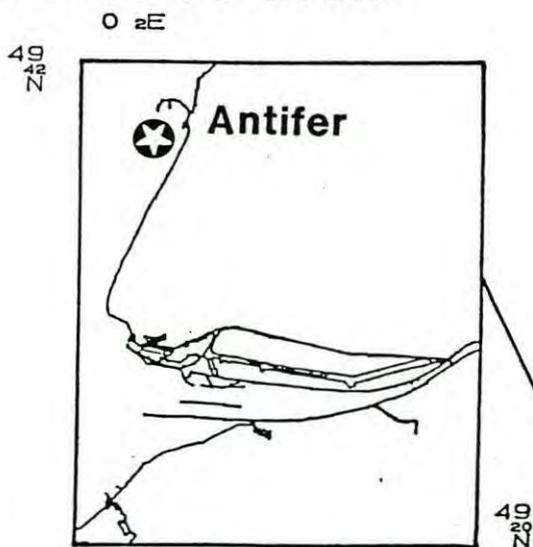
I - INTRODUCTION

Depuis 1983, l'apparition en France d'intoxications alimentaires du type DSP (1) a entraîné la mise en place par l'IFREMER d'un réseau de surveillance du littoral comprenant un suivi des populations phytoplanctoniques et des analyses toxicologiques sur les coquillages. En effet, la toxine diarrhéique produite par le dinoflagellé Dinophysis, peut s'accumuler dans la chair des bivalves filtreurs et contaminer ultérieurement les consommateurs. Trois zones se sont avérées particulièrement sensibles : le port pétrolier d'Antifer (Estuaire de Seine), la baie de Douarnenez et la baie de Vilaine (Bretagne). Selon l'année, la contamination de ces trois zones a été plus ou moins forte et la correspondance : nombre de cellules de Dinophysis dans l'eau/contamination des coquillages n'a pas toujours été systématiquement établie.

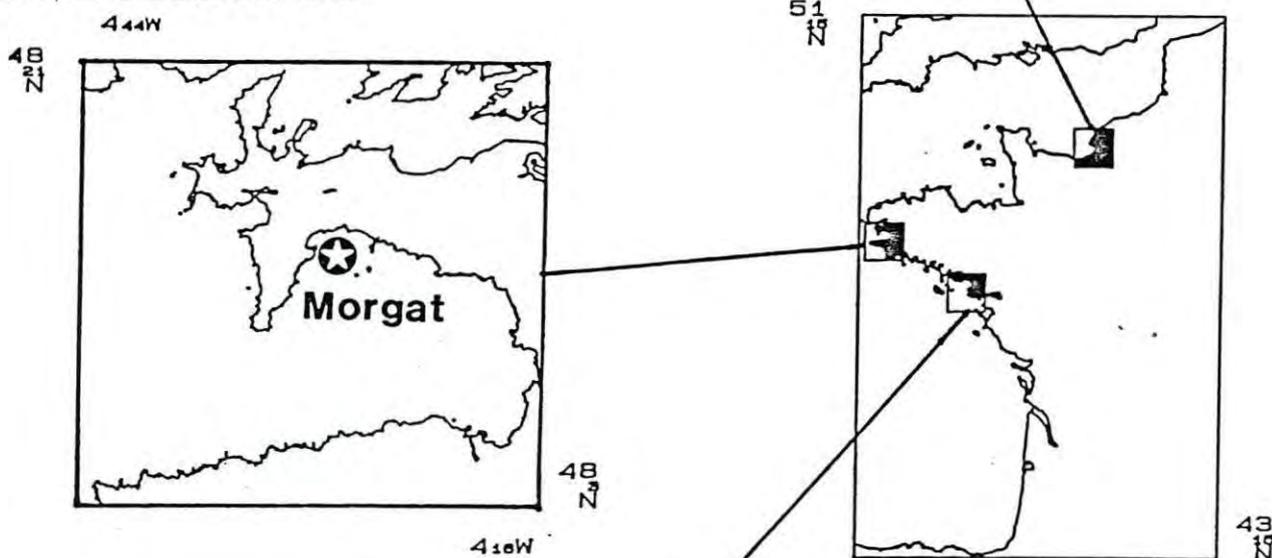
Parallèlement à ce réseau de surveillance, des essais de mise en culture de Dinophysis ont été menés mais sans résultats et les essais de décontamination in situ ont été peu probants (Lassus et Berthomé, 1986). Il a donc été décidé en 1988 de suivre in vitro une décontamination expérimentale de moules provenant de zones contaminées. Six expériences ont été réalisées durant les mois de juin et juillet 1988 sur des moules provenant de la baie de Douarnenez (Morgat), de la baie de Vilaine (Le Maresclé) et de la baie de Seine (Antifer) (fig. 1). Ces essais ont bénéficié de l'aide technique d'une étudiante de l'IUT de Quimper, au titre d'un mémoire de stage de 1ère année.

(1) Diarrheic Shellfish Poison

Estuaire de Seine



Baie de Douarnenez



Baie de Vilaine

Figure 1 : Localisation des points de prélèvements.

II - DECONTAMINATION DSP

II.1. CONDITIONS EXPERIMENTALES

II.1.a. Provenance des échantillons

Les lots de moules provenaient de points suivis par le département "Contrôle et Suivi des Ressources et de leur Utilisation" (CSRU) :

- * trois lots ont été prélevés au Maresclé
 - le 6.06.88 (Le Maresclé 1)
 - le 19.06.88 (Le Maresclé 2)
 - le 27.06.88 (Le Maresclé 3)

- * deux lots ont été prélevés à Morgat
 - le 12.06.88 (Morgat 1)
 - le 26.06.88 (Morgat 2)

et d'un point suivi par le laboratoire "Effets Biologiques des Nuisances".

- * un lot a été prélevé à Antifer
 - le 18.07.88

En fonction des facilités d'expédition, les lots pouvaient avoir un jour ou deux de transport à sec.

II.1.b. Acclimatation des coquillages

A l'arrivée, les moules sont nettoyées et réparties dans des cristallisoirs de 2,5 l alimentés en continu en eau de mer à raison de 4,6 l/heure. L'eau de mer provient de citernes de stockage où elle a préalablement décanté puis est distribuée par gravité dans deux bacs de 160 l à partir desquels elle est répartie dans les cristallisoirs. Les coquillages sont maintenus pendant la durée de l'expérience à une température de 16°C, soumis à un rythme nyctéméral et le milieu est constamment aéré.

Certains lots de moules ont été nourris quotidiennement avec 0,5 l d'une culture monoalgale de Tetraselmis suecica (chlorophycée). Pour le Maresclé et Morgat, les lots nourris et non nourris étaient différents. Pour Antifer, à partir du même lot, nous avons nourri une partie et l'autre pas.

II.1.c. Le suivi de la décontamination

Il se fait par des extractions sur les hépatopancréas de moules. Selon l'origine de ces dernières, il faut 40 à 60 individus pour obtenir environ 20 g d'hépatopancréas. En début d'expérience (J = 0), deux extractions sont faites : l'une à l'Acétone (méthode de routine employée au CSRU) sur 30 g d'hépatopancréas et l'autre à l'Acétone et au Méthanol 80 % (méthode officielle japonaise simplifiée) sur 20 g d'hépatopancréas. Ensuite, tous les deux ou trois jours, une extraction à l'acétone et au méthanol 80 % est faite sur 20 g d'hépatopancréas et à chaque prélèvement 2 g d'hépatopancréas sont réservés en plus pour l'analyse chimique par chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

II.1.d. Fréquence des extractions

Lots du Maresclé

- Le Maresclé 1 : moules non nourries. Les extraits ont été faits à l'arrivée, au 2ème jour, au 6ème jour, au 8ème jour et au 12ème jour.
- Le Maresclé 2 : moules nourries. Les extraits ont été faits à l'arrivée, au 2ème jour, au 6ème jour et au 9ème jour.
- Le Maresclé 3 : moules nourries. Les extraits ont été faits à l'arrivée, au 2ème jour, au 6ème jour et au 10ème jour. Le 13ème jour, la quantité insuffisante d'hépatopancréas n'a permis de faire que l'analyse chimique.

Lot de Morgat

- Morgat 1 : moules non nourries. Les extraits ont été faits à l'arrivée, au 3ème jour et au 7ème jour.
- Morgat 2 : moules nourries. Les extraits ont été faits à l'arrivée, au 2ème jour, au 6ème jour et au 10ème jour. Le 13ème jour, la quantité insuffisante d'hépatopancréas n'a permis de faire que l'analyse chimique.

Lot d'Antifer

Il a été séparé en deux sous échantillons : l'un nourri, l'autre non.

Une extraction a été faite à l'arrivée, au 5ème jour et au 8ème jour sur chaque sous échantillon.

II.2. PROCEDURE ANALYTIQUE

II.2.a. Extractions

* Méthode à l'acétone

30 g d'hépatopancréas sont extraits deux fois de suite par 100 ml d'acétone. L'acétone et l'eau résiduelle sont ensuite évaporées. Le résidu sec est alors repris dans 6 ml de Tween. Un ml de cette solution, soit l'équivalent de 5 g d'hépatopancréas, est injecté à trois souris de 20 g. Le résultat est considéré comme positif quand les 3 souris meurent en moins de 5 heures.

* Méthode à l'acétone et au méthanol

20 g d'hépatopancréas sont extraits successivement en trois fois par 60 ml, 40 ml et 40 ml d'acétone.

Après évaporation de l'acétone, le résidu aqueux est repris par du méthanol 80 %. Après double lavage à l'hexane, la phase méthanol est exactement mesurée et fractionnée en trois parties, ainsi définies :

- 4/10 conservés pour le test souris
- 5/10 mis en réserve
- 1/10 conservé pour l'analyse par HPLC.

Cette méthode présente l'avantage de connaître immédiatement le résultat du test souris pour l'équivalent de 4 g d'hépatopancréas injecté tout en conservant la possibilité de calculer l'Unité Souris, c'est à dire la quantité d'hépatopancréas qui fait mourir deux souris sur trois en 24 heures, ceci en diluant ou en concentrant la fraction mise en réserve.

II.2.b. Test souris

Compte tenu de l'impossibilité de faire des extractions sur des quantités importantes d'hépatopancréas, nous avons adapté la méthode officielle japonaise simplifiée comme suit : 1 ml d'extrait pur (c'est à dire l'équivalent de 4 g d'hépatopancréas) est injecté à une souris mâle "Swiss"

de 20 g. En fonction du temps de survie de la souris, des dilutions ont été faites et injectées à une souris à chaque fois. En fonction des résultats obtenus, nous avons évalué l'Unité Souris correspondante à chaque échantillon extrait selon une approche empirique.

Nous avons pris respectivement la quantité d'hépatopancréas correspondant à une survie de 24 heures et celle correspondant au temps de survie le plus long inférieur à 24 heures. L'Unité Souris a été arbitrairement calculée à partir de la moyenne entre les deux valeurs ainsi définies.

II.2.c. Analyse chimique de l'acide okadaïque

L'analyse de l'acide okadaïque par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) avec détection par fluorescence a été décrite par Lee et Yasumoto (1987). C'est cette méthode que nous avons suivie au laboratoire en la modifiant sur quelques points, notamment la composition du solvant d'élution pour l'HPLC.

La manipulation se décompose en deux étapes : une extraction et une dérivation-purification.

Extraction de l'échantillon

1 g d'hépatopancréas de moules est extrait par du méthanol aqueux. Après centrifugation, une partie aliquote du surnageant est lavée en deux fois par de l'hexane. Les phases organiques, une fois centrifugées, sont éliminées. La phase aqueuse restante est extraite deux fois de suite par du chloroforme. Les centrifugations effectuées, les phases chlorées sont réunies et séchées sur sulfate de sodium.

Dérivation-purification de l'échantillon

L'extrait chloré est évaporé sous azote et repris par une solution méthanolique à 0,1 % d'Anthryldiazométhane (ADAM : Réactif de fluorescence utilisé pour le dosage des acides gras).

La réaction de dérivation s'effectue, à l'obscurité, pendant 1 heure et à température ambiante.

L'extrait est ensuite purifié par chromatographie liquide sur cartouche de silice. L'élution s'effectue successivement par 5 ml des mélanges de solvants suivants :

- hexane/chloroforme 50/50
- chloroforme
- chloroforme/méthanol 95/5

Les deux premières fractions qui contiennent les impuretés dues à l'échantillon et/ou à l'ADAM sont éliminées. La troisième qui contient l'ester de l'acide okadaïque est recueillie puis évaporée. Après reprise par 100 µl de méthanol, 10 µl sont élués par HPLC (annexe 1).

La variabilité de la méthode a été testée sur un même lot d'hépatopancréas sur lequel quatre dosages ont été effectués. Elle est de l'ordre de 14 %.

Pour Le Maresclé 3 au 10ème jour et au 13ème jour, les résultats utilisés correspondent aux analyses effectuées par le Laboratoire Central d'Hygiène Alimentaire (LCHA de Paris).

Suivi de la décontamination

A chaque fois qu'un lot de moules est prélevé pour analyses, les hépatopancréas recueillis sont conservés sous deux formes en vue de l'analyse chimique :

- . à l'état naturel, 2 g d'hépatopancréas sont ainsi congelés,
- . une partie aliquote de l'extrait méthanolique, utilisé pour le test souris, est également congelée jusqu'à analyse (voir II.2.a.).

On peut donc doser successivement l'acide okadaïque présent dans quelques hépatopancréas du lot (1 g représentant généralement 2 à 3 moules) et celui contenu dans l'extrait qui a été injecté aux souris (voir test souris).

II.3. RESULTATS ET INTERPRETATION

Les résultats sont regroupés dans les tableaux 1 à 6 et sont représentés par les figures 2, 3 et 4. L'Unité Souris a été estimée et exprimée en U.S. par gramme d'hépatopancréas. Les analyses chimiques en HPLC ont été effectuées en quatre séries :

- trois séries d'analyses sur les hépatopancréas : le 29 juin, le 23 juillet et le 15 décembre
- une série d'analyses sur toutes les phases méthanoliques le 15 décembre.

Plusieurs difficultés, rencontrées au cours des différents essais de décontamination, nuisent à l'interprétation des résultats. Ce sont par exemple :

- le changement de méthode en cours d'expérience (Le Maresclé 1) avec la mise en place d'une extraction au méthanol 80 %
- la prise en compte pour le test souris, au jour 0 du Maresclé 2 des résultats obtenus par le test de routine (méthode à l'Acétone), l'autre méthode ayant posé quelques problèmes
- l'absence de détermination de l'Unité Souris par insuffisance de matériel biologique en fin d'expérience. En effet, pour chaque test souris, 20 g d'hépatopancreas sont nécessaires et pour Le Maresclé 3 et Morgat 2 nous n'avons pas eu assez d'hépatopancreas pour réaliser le test souris au 13ème jour de décontamination
- l'impossibilité de calculer une valeur d'acide okadaïque dans la phase méthanolique du 2ème jour du Maresclé 3, les chromatogrammes étant ininterprétables.

II.3.a. Le Maresclé

Le Maresclé 1 (fig. 2 A, tabl. 1)

Avec une contamination initiale de 0,33 US/g d'hépatopancreas, nous n'observons pas de décontamination au bout de 12 jours par le test souris alors qu'elle semble décelable par analyse chimique. Cependant, comme il a déjà été dit, les Unités Souris du Jour 0 et du Jour 2 ont été estimées à partir des extraits acétoniques alors que les autres l'ont été à partir d'extraits méthanoliques.

Le Maresclé 2 (fig. 2 B, tabl. 2)

Avec une contamination initiale de 0,8 US/g d'hépatopancreas et 0,6 US/g d'hépatopancreas au 9ème jour, il semble difficile de déceler une décontamination significative en 9 jours.

Le Maresclé 3 (fig. 2 C, tabl. 3)

Avec une contamination initiale de 0,6 US/g d'hépatopancreas, le test souris ne permet pas de détecter aux 2ème et 6ème jours la présence de toxine, alors qu'au 10ème jour, nous avons 0,3 US/g d'hépatopancreas.

Les analyses HPLC montrent cependant la présence constante d'acide okadaïque pendant cette période.

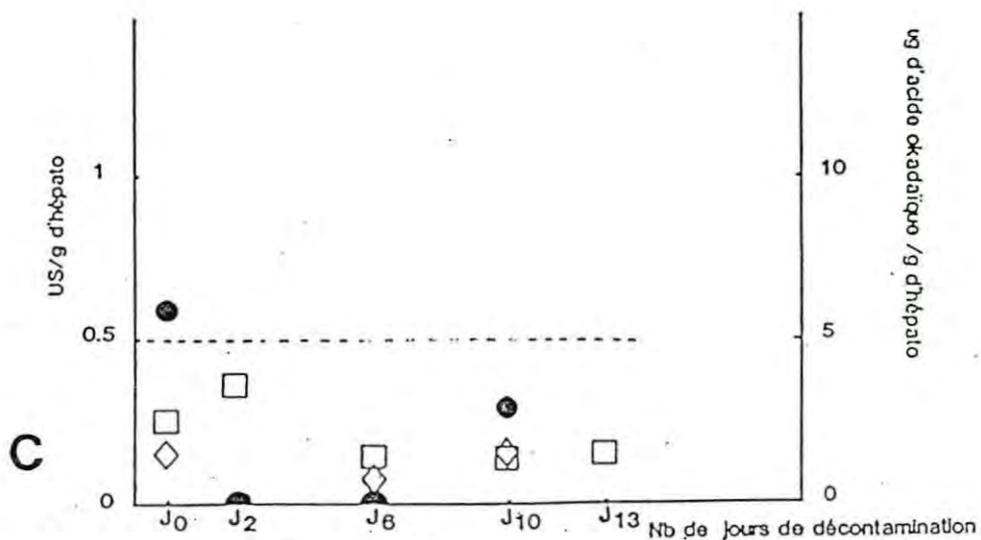
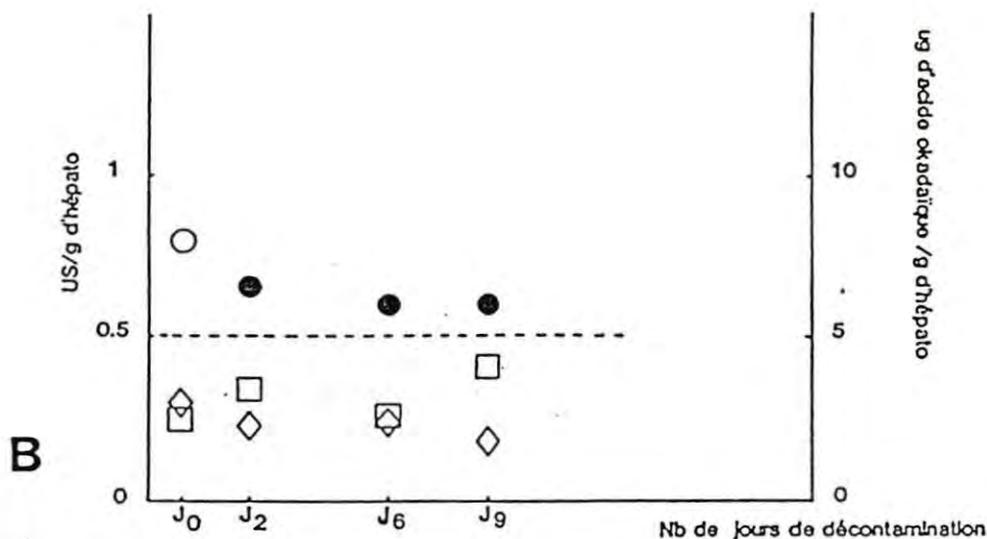
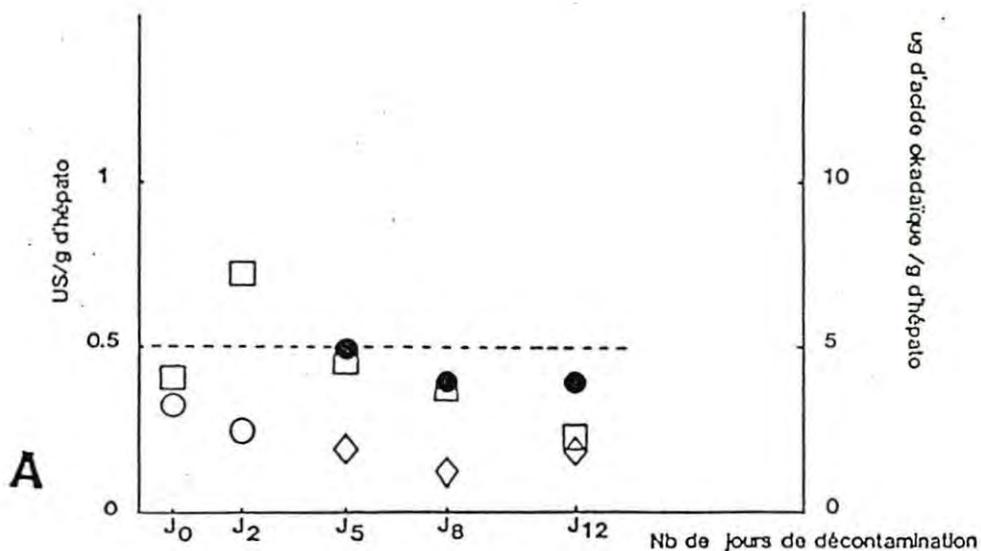
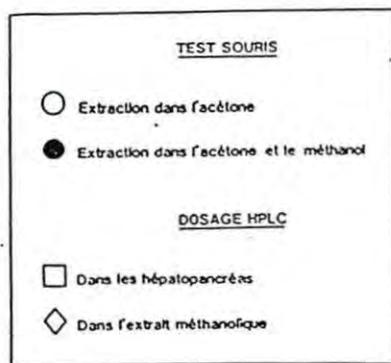


Figure 2 : Cinétiques de décontamination sur des moules de Maresclé

- A - Expérience avec des moules non nourries (du 8.06 au 20.06.88)
- B - Expérience avec des moules nourries (du 21.06 au 30.06.88)
- C - Expérience avec des moules nourries (du 28.06 au 11.07.88)

Les Unités Souris ont été estimées d'après la Méthode officielle Japonaise simplifiée et l'analyse chimique de l'acide okadaïque a été réalisée par HPLC

Nombre de jours de décontamination		J0	J2	J6	J8	J12
Solvants d'extraction		Acétone	Acétone	Acétone et Méthanol	Acétone et Méthanol	Acétone et Méthanol
Unité Souris par gramme d'hépatopancréas (estimée)		0,33	0,25	0,50	0,40	0,40
Quantité d'acide okadaïque en µg/g d'hépatopancréas	Dans les hépatopancréas	4,1	7,3	4,5	3,8	2,3
	Dans la phase méthanolique	Pas d'échantillon	Pas d'échantillon	2,0	1,3	1,9

Tableau 1 : Résultats de Maresclé 1 - expérience du 8.06 au 20.06.88.
Moules non nourries.

Nombre de jours de décontamination		J0	J2	J6	J9
Solvants d'extraction		Acétone	Acétone et Méthanol	Acétone et Méthanol	Acétone et Méthanol
Unité Souris par gramme d'hépatopancréas (estimée)		0,8	0,66	0,6	0,6
Quantité d'acide okadaïque en µg/g d'hépatopancréas	Dans les hépatopancréas	2,5	3,4	2,6	4,1
	Dans la phase méthanolique	3	2,3	2,4	1,8

Tableau 2 : Résultats de Maresclé 2 - expérience du 21.06 au 30.06.88.
Moules nourries.

Nombre de jours de décontamination		J0	J2	J6	J10	J13
Solvants d'extraction		Acétone et Méthanol	Acétone et Méthanol	Acétone et Méthanol	Acétone et Méthanol	
Unité Souris par gramme d'hépatopancréas (estimée)		0,6	Non détecté	Non détecté	0,3	Pas d'échantillon
Quantité d'acide okadaïque en µg/g d'hépatopancréas	Dans les hépatopancréas	2,6	3,7	1,5	1,4	1,6
	Dans la phase méthanolique	1,6	Σ	0,8	1,6	Pas d'échantillon

Tableau 3 : Résultats de Maresclé 3 - expérience du 28.06 au 11.07.88.
Moules nourries.

Les trois lots expérimentés de moules provenant du Maresclé ont été prélevés au cours d'une période de 20 jours (du 8 au 20 juin), tels que le premier et le second prélèvements correspondaient à une période de forte contamination et le troisième à la fin de la contamination. En effet, les résultats du CSRU sur cette période (Annexe 2) montrent que le test souris est positif (survie inférieure à 5 heures pour l'équivalent de 5 g injectés) avec un maximum le 30 mai et le 13 juin et que la concentration de cellules de Dinophysis est maximale le 24 mai et le 13 juin.

D'autre part, pour les trois expériences, les valeurs mesurées en Unité Souris sont proches, voire inférieures, au seuil de salubrité (0,5 US/g d'hépatopancréas) déterminé par les Japonais ce qui rend sans doute moins évident l'obtention d'une cinétique très rapide de décontamination.

II.3.b. Morgat

Morgat 1 (fig. 3 D, tabl. 4)

Au bout de 7 jours, avec une contamination initiale de 1,33 US, nous observons une décontamination significative, soit un abattement d'environ 35 % dans ce cas. Ce résultat est confirmé par l'analyse chimique sur les hépatopancréas.

Morgat 2 (fig. 3 E, tabl. 5)

Dans ce cas, la contamination initiale est moins importante et de ce fait, nous passons seulement de 0,66 US à JO à 0,4 US au bout de 10 jours tandis que les analyses HPLC voisinent le seuil de détection.

Les expériences sur le site de Morgat ont été effectuées sur une période de 15 jours, le premier lot étant plus toxique que le deuxième au niveau des Unités Souris et de l'acide okadaïque. Nous nous sommes référés aux résultats du CSRU couvrant cette période (Annexe 3). Ils montrent que la quantité de cellules de Dinophysis dans l'eau est maximale le 6 juin et que le test souris est positif avec un maximum le 6 juin et le 19 juin.

En revanche le 27 juin, les temps de survie ont augmenté (environ 4 h 00) et le taux de cellules est nul dans l'eau.

II.3.c. Antifer (fig. 4 F et G, tabl. 6).

Avec une contamination de 1,54 US par gramme d'hépatopancréas, nous avons le lot le plus contaminé des 6 lots suivis. Au bout de 5 jours, qu'elles soient nourries ou pas, les moules semblent se décontaminer légèrement : nous passons de 1,54 US à 1,2 US. Ceci est confirmé par l'analyse chimique de la phase méthanolique.

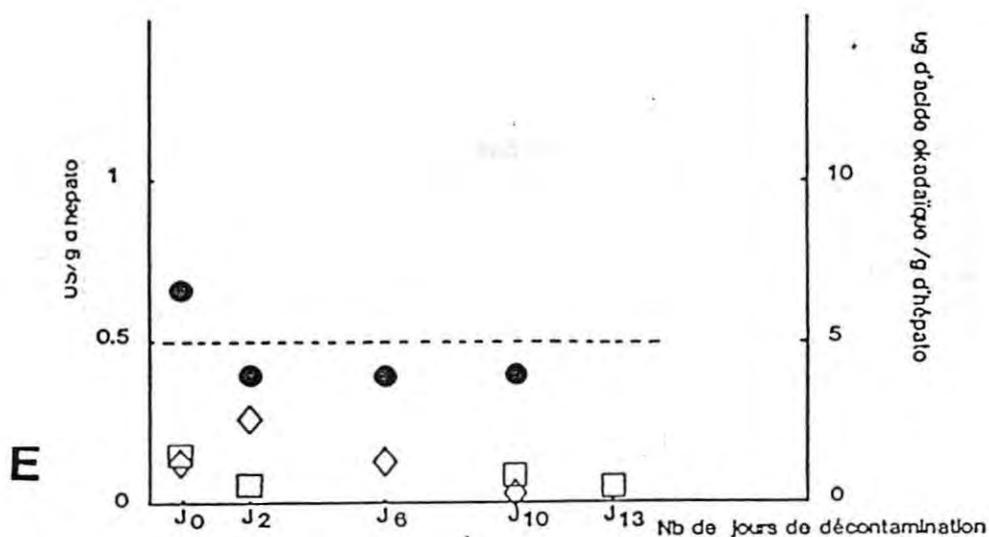
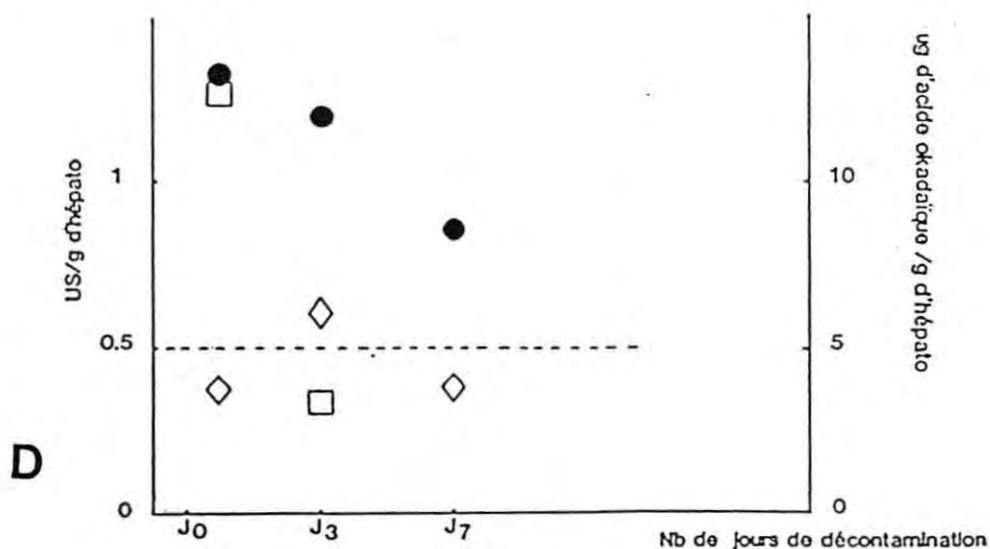
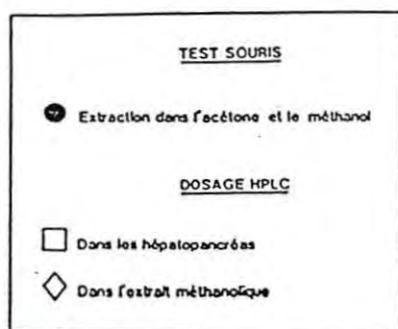


Figure 3 : Cinétiques de décontamination des moules de Morgat

D - Expérience sur des moules non nourries (du 14.06. au 21.06.88)
 E - Expérience sur des moules nourries (du 28.06 au 11.07.88)

Les Unités Souris ont été estimées d'après la méthode officielle Japonaise simplifiée et l'analyse chimique de l'acide okadaïque a été réalisée par HPLC.

Nombre de jours de décontamination		J0	J3	J7
Solvants d'extraction		Acétone et Méthanol	Acétone et Méthanol	Acétone et Méthanol
Unité Souris par gramme d'hépatopancréas (estimée)		1,33	1,2	0,86
Quantité d'acide okadaïque en µg/g d'hépatopancréas	Dans les hépatopancréas	12,7	3,4	Pas d'échantillon
	Dans la phase méthanolique	3,8	6,1	3,9

Tableau 4 : Résultats de Morgat 1 - expérience du 14.06 au 21.06.88.
Moules non nourries.

Nombre de jours de décontamination		J0	J2	J6	J10	J13
Solvants d'extraction		Acétone et Méthanol	Acétone et Méthanol	Acétone et Méthanol	Acétone et Méthanol	
Unité Souris par gramme d'hépatopancréas (estimée)		0,66	0,4	0,4	0,4	Pas d'échantillon
Quantité d'acide okadaïque en µg/g d'hépatopancréas	Dans les hépatopancréas	1,5	0,6	Non détecté	0,9	0,5
	Dans la phase méthanolique	1,3	2,7	1,3	0,3	Pas d'échantillon

Tableau 5 : Résultats de Morgat 2 - expérience du 28.06 au 11.07.88.
Moules nourries.

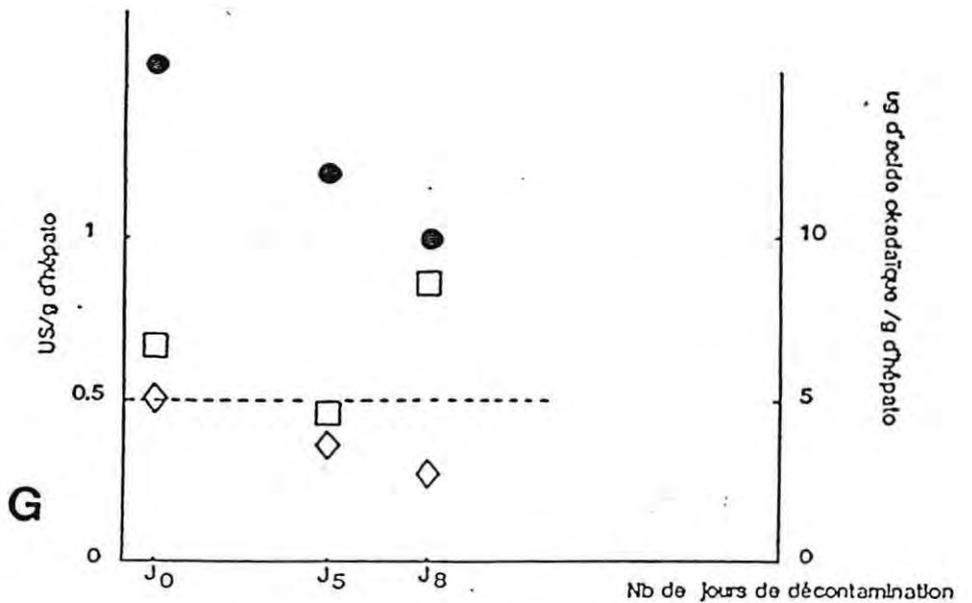
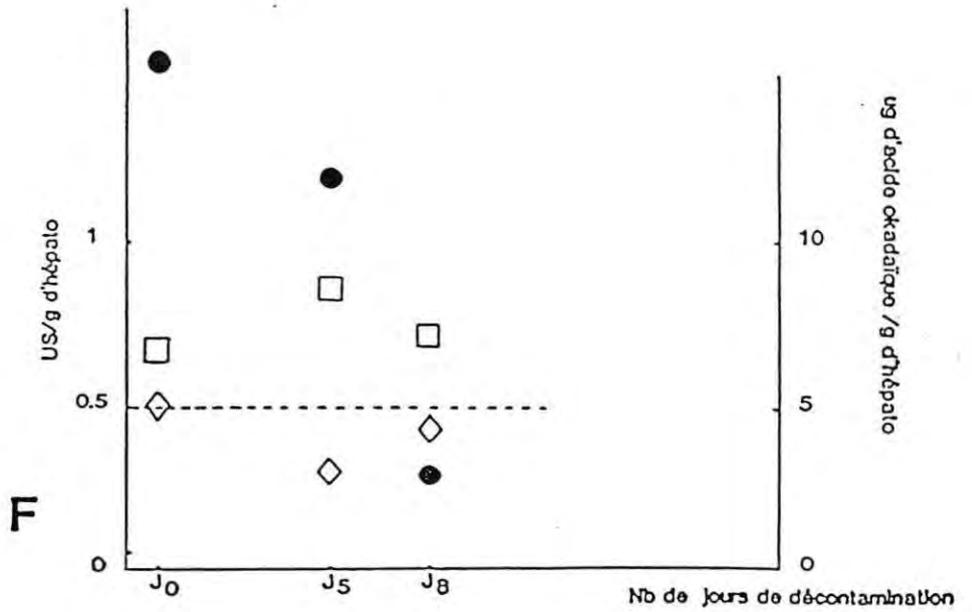
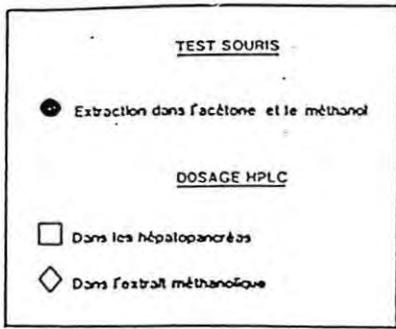


Figure 4 : Cinétiques de décontamination sur des moules d'Antifer du 20 au 28.07.88.

F - Expérience sur des moules non nourries

G - Expérience sur des moules nourries

Les Unités Souris ont été estimées selon la méthode officielle Japonaise simplifiée et l'analyse chimique de l'acide okadaïque a été réalisée par HPLC.

Nombre de jours de décontamination		J0	J5		J8	
Solvants d'extraction		Acétone et Méthanol	Acétone et Méthanol		Acétone et Méthanol	
			Moules non nourries	Moules nourries	Moules non nourries	Moules nourries
Unité Souris par gramme d'hépatopancréas (estimée)		1,54	1,2	1,2	0,3	1,0
Quantité d'acide okadaïque en µg/g d'hépatopancréas	Dans les hépatopancréas	6,8	8,6	4,7	7,2	8,6
	Dans la phase méthanolique	5,1	3,1	3,7	4,4	2,8

Tableau 6 : Résultats d'Antifer - expérience du 20.07 au 28.07.88.
1 lot de moules non nourries et 1 lot de moules nourries.

Au 8ème jour, la décontamination se poursuit : pour les moules nourries, nous ne détectons plus que 1 US soit 35 % de réduction de la toxicité initiale, tandis que pour les moules non alimentées, l'abattement est plus important : de l'ordre de 80 %.

L'analyse chimique de l'acide okadaïque ne corrobore de façon satisfaisante ces cinétiques que dans le cas des moules nourries et pour la phase méthanolique.

L'expérience sur les moules du site d'Antifer a été réalisée pendant une période de forte contamination de l'eau et des moules comme le montrent les résultats du Laboratoire Municipal du Havre qui a suivi quotidiennement la concentration de Dinophysis dans l'eau et ceux du Laboratoire EBN qui a fait un suivi mensuel de la contamination des moules (Annexe 4). Dans ce cas, les US par gramme d'hépatopancréas ont été estimées à partir de la méthode CSRU en faisant des dilutions.

III - DISCUSSION

Ces premiers résultats sur les essais de décontamination effectués en 1988 nous amènent aux remarques suivantes.

Pour les différents lots étudiés, la période d'expérimentation semblait la plus propice, les résultats du suivi du CSRU le confirment. Les périodes à déterminer en 1989 risquent d'être semblables et de la même durée, il faudra donc contrôler le début et la progression de la contamination des coquillages pour choisir au mieux les lots à expérimenter.

Malgré l'estimation faite sur les Unités Souris, il semble bien se dégager deux cas :

- 1) lorsque la toxicité initiale est proche de 0,5 US/g, ce qui est le cas pour Le Maresclé 1, 2, 3 et Morgat 2, il est difficile d'évaluer une décontamination significative puisque nous sommes déjà près du seuil de salubrité défini par les Japonais
- 2) lorsque la toxicité initiale est supérieur à 1 US/g, ce qui est le cas pour Morgat 1 et Antifer, nous observons une décontamination rapide (de 5 à 8 jours).

Il semble qu'un taux résiduel de contamination puisse persister entre 0 et 0,5 US/g et expliquer peut être la sensibilisation des coquillages à des recontaminations tardives sur les sites conchylicoles.

Si nous comparons nos résultats avec les expériences de décontamination en bassin et in situ sur des coquilles St Jacques réalisées par les Japonais (fig. 5) nous nous apercevons que les différents essais sur 5 jours ne donnent pas de résultats concluants avec ou sans nourriture ainsi que l'essai sur 17 jours, en ne les nourrissant pas (fig. 6).

Cependant, nous pouvons noter que le transfert des coquillages en zone salubre (fig. 7) donne un résultat significatif en 30 jours avec une contamination initiale comprise entre 1 et 2 US, une augmentation (3 à 4 US au bout de 7 jours) puis une décontamination effective au bout de 28 jours.

Enfin, en ce qui concerne l'analyse de l'acide okadaïque, les extraits méthanoliques semblent préférables aux hépatopancreas puisque c'est le même échantillon qui est injecté aux souris et analysé par HPLC.

L'obtention d'un ADAM de meilleure qualité doit permettre d'obtenir des chromatogrammes plus propres et, en conséquence, d'améliorer la lecture des résultats.

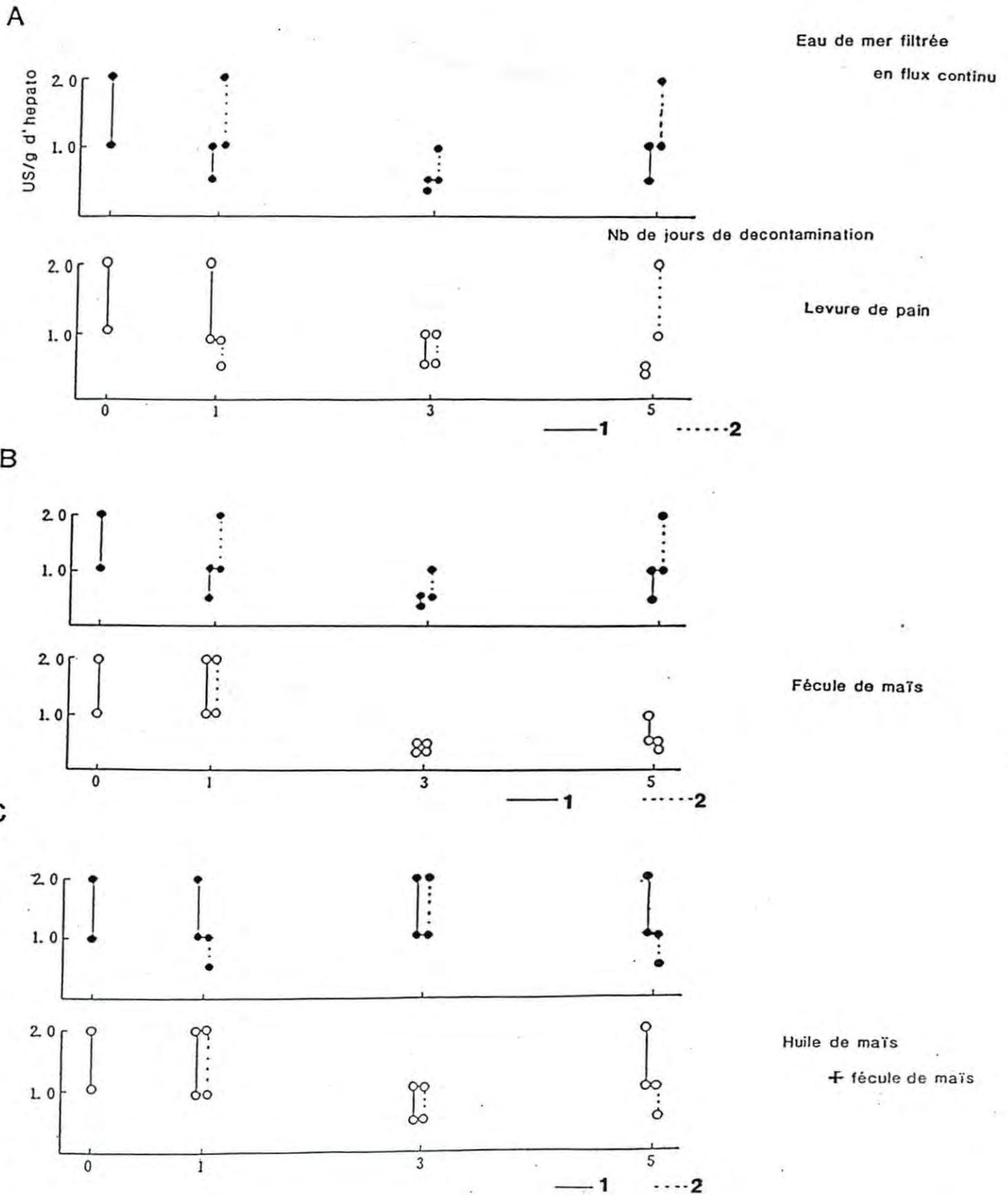


Figure 5 : Suivi de la décontamination en bassins de coquilles St Jacques nourries de différentes façons. Pour chaque expérience, 2 bassins 1 et 2 et prélèvements effectués en double. Les témoins sont représentés en noir (extraits des Rapports des préfectures de Miyagi et Aomori).

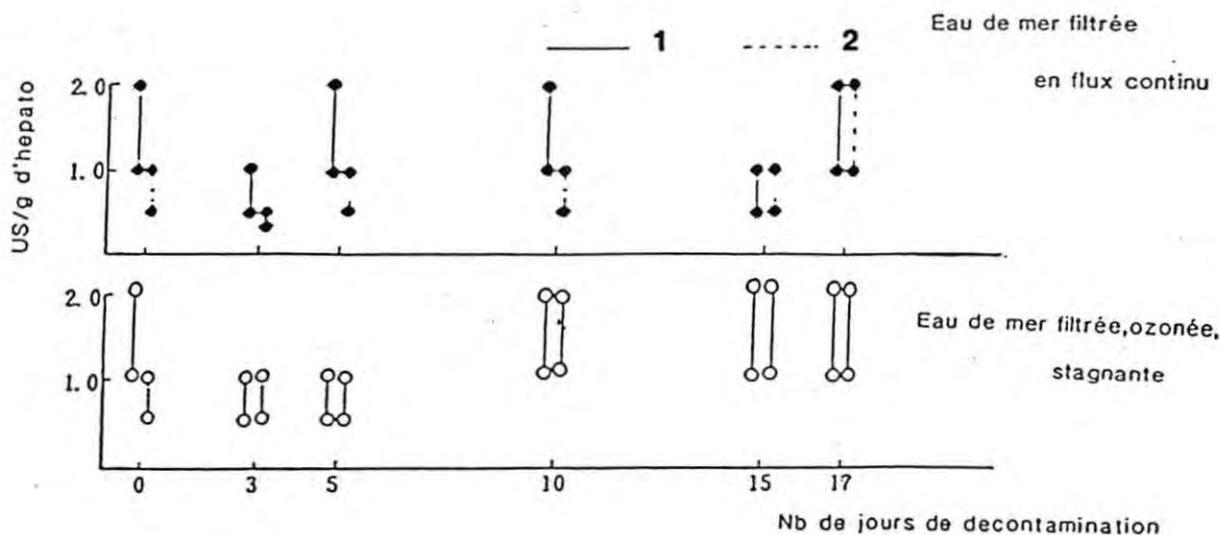


Figure 6 : Suivi de la décontamination en bassins de coquilles St Jacques non nourries. Pour chaque expérience, deux bassins 1 et 2 et prélèvements effectués en double. Les témoins sont représentés en noir (extrait des rapports des préfectures de Miyagi et Aomori).

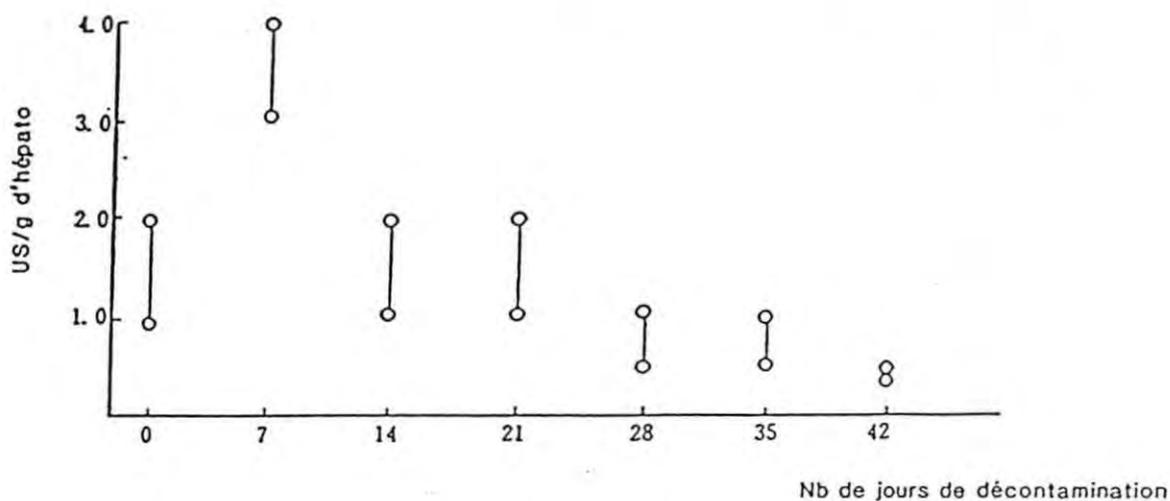


Figure 7 : Suivi de la décontamination de coquilles St Jacques transférées dans une zone salubre et mises en suspension dans des cages à (- 20 m) de profondeur. Chaque prélèvement est effectué en double (extrait des rapports des préfectures de Miyagi et Aomori).

IV - CONCLUSION

Ces six essais de décontamination DSP menés pendant les mois de juin et juillet 1988, c'est à dire pendant la période présumée de forte contamination, nous amènent aux conclusions suivantes.

- . Sur le site du Maresclé, la toxicité est proche de 0,5 US/g d'hépatopancréas pour les trois lots et il est très difficile d'obtenir une diminution significative pendant le temps d'expérience.
- . Sur le site de Morgat, la toxicité du premier lot (1,33 US/g d'hépatopancréas) diminue notablement au bout de 7 jours (0,86 US). En revanche, le second lot a le même comportement que les lots du Maresclé.
- . Sur le site d'Antifer, qui se révèle le plus intéressant en terme de toxicité initiale (1,54 US), nous obtenons une décontamination semblable à celle de Morgat 1.
- . Pour l'ensemble des sites étudiés, il y a une bonne corrélation entre les niveaux de toxicité des lots et les observations phytoplanctoniques et toxicologiques du CSRU, du Laboratoire Municipal du Havre et du laboratoire EBN.
- . Ces essais nécessitent d'être continués en 1989 en prenant des lots suffisamment contaminés (toxicité supérieure à 1 US/g d'hépatopancréas) pour pouvoir suivre plus longtemps la décontamination. Nous devons d'autre part travailler sur des quantités d'hépatopancréas plus importantes pour calculer le plus exactement possible les Unités Souris. Il sera également intéressant de suivre simultanément la décontamination in vitro et in situ (dans des bassins). Nous nous attacherons à vérifier quelques hypothèses qui peuvent être énoncées au vu de ces premiers résultats :
 - si la toxicité initiale est de l'ordre de 0,5 US/g, soit proche du seuil de salubrité, il n'y a pas de décontamination notable sur 12 jours.
 - si la toxicité initiale est supérieure à 1 US/g, nous pouvons observer une décontamination d'environ 35 % en 8 jours.

Il y a là quelques analogies avec les décontaminations PSP (Lassus et al., 1989) puisque dans le cas de coquillages concentrant fortement les gonyautoxines (moules et coquilles St Jacques) la décontamination est d'autant plus rapide que la toxicité initiale est élevée, alors que pour des contaminations lentes (huîtres, palourdes) et pour des toxicités initiales basses, la décontamination est très lente. Ces résultats sont également à rapprocher des cinétiques de contamination/décontamination in situ données par quelques travaux japonais (in : BERTHÔME et al., 1986).

BIBLIOGRAPHIE

- BERTHOME (J.P.), BELIN (C.), LASSUS (P.), LE BAUT (C.), 1986.- Eaux colorées, plancton toxique et cultures marines (1 et 2). Equinoxe n° 5 et 6 p. 9 à 1 et p. 10 à 17.
- LASSUS (P.) et BERTHOME (J.P.), 1986.- Toxicité des moules : étude de la décontamination PSP et DSP in vitro et in situ. Rapport IFREMER DERO-86.13-01-SR : 36 p.
- LASSUS (P.), FREMY (J.M.), LEDOUX (M.), BARDOUIL (M.) et BOHEC (M.), 1989.- Patterns of experimental contamination in some French Commercial shellfish, related to paralytic shellfish poisoning. Toxicon. A paraître.
- LEE (J.S.), YANAGI (T.), KENMA (R.), YASUMOTO (T.), 1987.- Fluorometric determination of Diarrheic Shellfish Toxins by High Performance liquid Chromatography. Agric. Biol. Chem., 51 (3), 877-881.
- RAPPORTS DES PREFECTURES DE MIYAGI ET AOMORI, 1987.- Recherches techniques pour développer l'utilisation des coquillages périssables (en Japonais).

ANNEXES

Phase stationnaire : Superspher RP 18 4 μm

Colonne : (250 x 4) mm

Eluant : $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 80/20

Débit - Pression : 1,1 ml/min., 170 bars

Température : 35°C

Volume d'injection : - 10 μl
- de 10 μl à 50 μl par pas de 10 μl

Fluorescence : λ exc : 365 nm, λ em : 412 nm
filtre : 10 nm

Vitesse de l'enregistreur : 3,3 mm/min.

Annexe 1 : Conditions chromatographiques de l'analyse de l'acide okadaïque en HPLC.

Date	Nombre de cellules de Dinophysis par litre d'eau de mer	Résultats du test souris - temps moyen de survie pour un équivalent de 5 g d'hépatopancréas
9 mai	100	survie > 24 heures
16 mai	300	11 h 50'
24 mai	4 100	1 h 43'
30 mai	300	0 h 47'
6 juin	200	1 h 01'
13 juin	5 500	0 h 43'
20 juin	3 000	1 h 26'
27 juin	300	1 h 57'
4 juillet	300	7 h

Annexe 2 : Résultats du suivi du CSRU sur le site du Maresclé sur la période du 9 mai au 4 juillet 1988.

Date	Nombre de cellules de Dinophysis par litre d'eau de mer	Résultats du test souris - temps moyen de survie pour un équivalent de 5 g d'hépatopancreas
30 mai	100	2 h 03'
6 juin	2 800	0 h 46'
12 juin	1 300	1 h 23'
19 juin	0	0 h 58'
27 juin	0	3 h 19'
4 juillet	0	20 h 20'

Annexe 3 : Résultats du suivi du CSRU sur le site de Morgat sur la période du 30 mai au 4 juillet 1988.

Dates	Dinophysis S cellules/litre	Dinophysis F cellules/litre	US estimées/g d'hépatopancreas
01-07	4 000	900	
02-07	11 400	2 500	
03-07	11 300	9 200	
04-07	23 500	5 600	
05-07	18 700	1 200	1 US
06-07	14 500	1 500	
07-07	30 400	2 300	
08-07	14 800	400	
09-07	17 400	100	
10-07	5 800	0	
11-07	4 900	200	
12-07	6 900	0	
13-07	5 600	300	
14-07	4 100	200	
15-07	2 100	800	
16-07	2 400	1 000	
17-07	1 200	800	
18-07	1 800	200	
19-07	100	0	
20-07	3 000	0	1,23 US
21-07	3 500	0	
22-07	4 800	0	
23-07	5 300	100	
24-07	6 100	100	
25-07	9 100	0	
26-07	900	100	
27-07	2 300	0	
28-07	2 500	0	
29-07	1 100	600	
30-07	800	100	
31-07	1 100	500	
01-08	600	100	
02.08	100	0	0,25 US

Annexe 4 : Résultats du suivi quotidien du Laboratoire Municipal du Havre*
[nombre de cellules de Dinophysis par litre d'eau de mer en
Surface (- 4 m) et au Fond (- 30 m)] et du suivi mensuel du
laboratoire EBN [Test souris- Méthode du CSRU] sur le site
d'Antifer du 1er juillet au 2 août 1988.

* Contrat d'Etude n° 88 544001 - Toxicité et variations saisonnières sur le
site d'Antifer pendant l'année 1988.