

Journées REPHY 1998
Nantes, 18 au 20 mars

2. Compte rendu des présentations

préparé par Catherine Belin

FICHE DOCUMENTAIRE

Résumé :

Ce document est le deuxième rapport de la synthèse des présentations faites au cours des journées REPHY 1998. Celles ci se sont déroulées à Nantes du 18 au 20 mars et ont réuni plus de 50 participants. Les sujets abordés dans ce deuxième rapport sont rattachés aux thèmes suivants : modélisation, taxonomie, traitement de données REPHY, kystes d'*Alexandrium*, toxines DSP (méthodes, cinétique de production), toxines PSP (méthodes, détoxification), surveillance ASP, QUADRIGE, assurance qualité.

Abstract :**Mots-clés :**

REPHY, réseau, surveillance, phytoplancton, toxines, QUADRIGE

Keywords :**Commentaire :**

Ce document ne concerne qu'une partie des présentations faites au cours des journées REPHY 1998. Les autres sujets abordés sont présentés dans le rapport « Beliaeff B. & Belin C., 1999. Journées REPHY 1998. 1. Gestion du risque *Dinophysis* / DSP. Seuils déclencheurs des tests de toxicité pour les différentes espèces toxiques. Rapport Ifremer RST.DEL/99.02/Nantes »

FICHE DOCUMENTAIRE

Type de rapport : RST							
Numéro d'identification du rapport : RST.DEL/99.03/Nantes Diffusion : libre <input checked="" type="checkbox"/> restreinte <input type="checkbox"/> interdite <input type="checkbox"/> Validé par : P. Lassus Adresse électronique : - chemin UNIX : - adresse WWW :	date de publication février 1999 nombre de pages 141 bibliographie Oui illustration(s) Oui langue du rapport français						
Titre et sous-titre du rapport : Journées REPHY 1998. 2. Compte rendu des présentations Titre traduit :							
Auteur(s) principal(aux) : nom, prénom BELIN Catherine	Organisme / Direction / Service, laboratoire Ifremer / Direction de l'Environnement et de l'Aménagement Littoral / Département Microbiologie et Phycotoxines						
Collaborateur(s) : nom, prénom	Organisme / Direction / Service, laboratoire						
Organisme commanditaire : nom développé, sigle, adresse							
Titre du contrat :	n° de contrat Ifremer						
Organisme(s) réalisateur(s) : nom(s) développé(s), sigle(s), adresse(s)							
Responsable scientifique :							
Cadre de la recherche : <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%;">Programme :</td> <td style="width: 50%;">Convention :</td> </tr> <tr> <td>Projet :</td> <td>Autres (préciser) :</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Campagne océanographique : (nom de campagne, année, nom du navire)</td> </tr> </table>		Programme :	Convention :	Projet :	Autres (préciser) :	Campagne océanographique : (nom de campagne, année, nom du navire)	
Programme :	Convention :						
Projet :	Autres (préciser) :						
Campagne océanographique : (nom de campagne, année, nom du navire)							

Liste des participants

Nom, prénom	Laboratoire	e-mail
ABADIE Eric	DEL/ST	eabadie
ALLENOU Jean-Pierre	DEL/NT	jpalleno
AMZIL Zouher	DEL/MP/PN	zamzil
BARNOUIN Bruno	DEL/D	barnouin
BAUD Dominique	DEL/NT	dbaud
BELIAEFF Benoît	DEL/AO	bbeliaef
BELIN Catherine	DEL/MP	cbelin
BERTHOME Jean-Paul	DEL/D	jpbertho
CAMUS Patrick	DEL/TN	pcamus
CANTIN Christian	DEL/AR	ccantin
CARRERAS Antoni	DEL/ST	carreras
CATHERINE Martial	DEL/MP	mcather
CHAUVIN Jacky	DEL/TN	jchauvin
CHIANTELLA Claude	DEL/ST	chiantel
CONVENANT Aliette	DEL/SM	aconvena
DUMAS Franck	DEL/AO	fdumas
DUMONT Françoise	DEL/NT	fdumont
ERARD-LE DENN Evelyne	DEL/EC/PP	eerard
FIANT Liliane	DEL/PB	lfiant
FORTUNE Mireille	DEL/NT	mfortune
FOUCHE Dominique	DEL/LT	dfouche
GROSSEL Hubert	DEL/NT	hgrossel
HITIER Benoît	DEL/BL	bhitier
JEANNERET Hélène	DEL/PB	hjeanner
LASSUS Patrick	DEL/MP	plassus
LAZURE Pascal	DEL/AO	plazure
LE BAUT Claire	DEL/MP/PN	clebaut
LE GAL Dominique	DEL/CC	dlegal
LE GRAND Jacqueline	DEL/EC/PP	jlegrand
LE MAGUERESSE Alain	DITI/D	alemag
LE MAO Patrick	DEL/SM	plemao
LEGUAY Didier	DEL/LR	dleguay
MARCO-MIRALLES Françoise	DEL/TL	fmarco
MARGAT Sylvie	DEL/LR	smargat
MASSELIN Pierre	DEL/MP/PN	pmasseli
MASSON-NEAUD Nadine	DEL/AR	nmasson
MATIGNON Frédéric	DEL/MP/PN	
MENANTEAU Chantal	DEL/NT	cmenante
MENESGUEN Alain	DEL/EC	amenesg
MONDEGUER Florence	DEL/MP/PN	fmondeg
MOUILLARD Gilbert	DEL/SM	gmouilla
OLIVESI René	DEL/BL	rolivesi
PELLIER Claude	DEL/AR	cpellier
PICLET Guy	DEL/CC	gpiclet
POGGI Robert	DEL/D	rpoggi
RAFFIN Bernard	DEL/AO	braffin
RAGUENES Pierre	DEL/CC	praguene
RATISKOL Gilles	DEL/NT	gratisko
RAVOUX Georges	DEL/D	gravoux
RYCKAERT Mireille	DEL/LR	mryckaer
SECHET Véronique	DEL/MP/PN	vsechet
THOMAS Gérard	DEL/LR	gerthom
TRONCZYNSKI Jacek	DEL/PC	jtronczy



Journées REPHY 1998



Journées REPHY 1994



Journées REPHY 1994



Réunion CSRU 1985

Sommaire

RAPPORT N° 1

1. Gestion du risque phytoplanctonique. Approches préliminaires	2
1.1. Objectif	2
1.2. Gestion des données et choix des méthodes	2
1.3. Analyse des résultats et discussion	6
1.4. Appréciation du risque et recommandations	10
1.4.1. Représentativité des prélèvements "eau"	10
1.4.2. Représentativité des prélèvements "coquillages"	12
1.4.3. La gestion du risque	13
Annexe 1 : Caractéristiques de la séquence des événements pour des temps de réaction positifs ou nuls par an et par bassin pour <i>Dinophysis</i>	15
Annexe 2 : Graphiques de séquence des événements <i>Dinophysis</i> / DSP	20
Annexe 3 : Paramètres de "seuillage" par bassin pour <i>Dinophysis</i>	41
Annexe 4 : Caractéristiques des doublons "toxicité" point/date pour un même coquillage....	43
2. Explications détaillées des extractions et traitements préliminaires (données <i>Dinophysis</i> / DSP et <i>Alexandrium minutum</i> / PSP)	50
2.1. Données <i>Dinophysis</i>	51
2.2. Données DSP	57
2.3. Synthèse <i>Dinophysis</i> / PSP	60
2.4. Données <i>Alexandrium minutum</i>	65
2.5. Données PSP	66
2.6. Synthèse <i>Alexandrium minutum</i> / PSP	67

RAPPORT N° 2

3. Circulation des masses d'eau sur le plateau continental atlantique, calculée par un modèle numérique 3D	3
3.1. Le modèle	3
3.2. Les processus physiques, échelles de temps et d'espace	3
3.3. Simulations de l'évolution saisonnière des structures hydrologiques	5
3.4. Validation du modèle	7
3.5. Perspectives	8
4. Les apports de la modélisation des cycles biogéochimiques dans la compréhension des grandes tendances spatio-temporelles du phytoplancton des côtes de Manche-Atlantique ..	9
4.1. Eutrophisation des écosystèmes côtiers	9

Sommaire

4.2.	Modélisation de l'eutrophisation côtière	10
4.3.	Conclusions	12
5.	Présentation de <i>PhytoQuiz 1</i>, CD-Rom d'auto-formation à l'identification du phytoplancton	21
6.	Variabilité de la composition des listes floristiques, induite par l'heure de prélèvement. Pertuis Breton, Octobre 1996	22
7.	Variations saisonnières et géographiques des données chlorophylle du REPHY sur le littoral du Morbihan. Relation avec la croissance des huîtres creuses	32
7.1.	Variations géographiques	32
7.2.	Variations inter-annuelles et saisonnières	33
7.3.	Relations avec les données REMORA	33
7.4.	Conclusions	33
8.	Localisation des zones littorales bretonnes contaminées par les kystes d'<i>Alexandrium minutum</i>	34
9.	Méthodes de détection des toxines DSP : spécificité, seuil de risque	43
10.	Avancement de l'étude pilote DRAME (Détermination Rapide de l'Acide Okadaïque dans les Moules après Extraction)	51
11.	Cinétiques de production intracellulaire des toxines diarrhéiques par <i>Prorocentrum lima</i> : mise en évidence d'un nouvel isomère de la dinophysistoxine 1 (DTX1)	61
12.	Résultats de l'intercalibration PSP (CNEVA / IFREMER), avril 1997.....	67
13.	Accumulation de PSP dans les coquillages en hiver en l'absence d'observation du phytoplancton toxique. Interférence des PSP dans le test de dépistage des DSP sur souris	75
14.	Détoxification PSP des coquillages. Recherche d'un modèle	87
14.1.	Expériences d'épuration PSP sur bivalves	87
14.2.	Détoxification PSP. Recherche d'un modèle	93
15.	Mise en place d'une surveillance ASP (toxines amnésiantes)	101
15.1.	L'A.S.P. (Amnesic Shellfish Poisoning)	101
15.2.	Pourquoi une surveillance A.S.P. ?	103
15.3.	Analyse des données <i>Pseudo-nitzschia</i> spp. stockées dans QUADRIGE	104
16.	Présence de phycotoxines en Europe	111
17.	QUADRIGE, mise au point concernant les données REPHY	113
17.1.	Mise à jour des points de prélèvements, programmes, stratégies	113
17.2.	Saisie des résultats	116
17.3.	Evénements	117

Sommaire

17.4. Validation	118
17.5. Extraction de résultats	119
18. Méthodes illustrées	120
19. Seuils déclencheurs des tests de toxicité pour les différentes espèces toxiques : notion de seuil régional	131
20. Avancement des travaux des Groupes Assurance Qualité	137
21. Gestion des établissements d'expédition en période de <i>Dinophysis</i>. Contractualisation SRC	138
22. Diffusion à l'extérieur de REPHY <i>info toxines</i>.....	140
Conclusion	141

3. Circulation des masses d'eau sur le plateau continental atlantique, calculée par un modèle numérique 3D.

Pascal LAZURE et Anne-Marie JEGOU

3.1. Le modèle

Les courants sur le plateau atlantique résultent des effets conjugués de la marée, du vent et des gradients de densité induits par les apports d'eau douce à la côte. Chacun de ces processus agit à des échelles de temps et d'espaces différentes. Un modèle hydrodynamique tridimensionnel a été construit pour décrire les courants, la température et la salinité à l'échelle annuelle. Ce modèle s'étend du Gouf de Capbreton au sud à la Bretagne au nord et de la côte au talus continental. Sa maille horizontale est de 5 km et il prend en compte 10 niveaux sur la verticale.

3.2. Les processus physiques, échelles de temps et d'espace

La première phase de l'étude a consisté à séparer autant que possible chacun des mécanismes pour en décrire l'action sur l'hydrologie. La marée induit un mouvement oscillatoire des masses d'eau mais n'a que peu d'influence sur leur transport, sauf très localement. Dans les zones de courants instantanés importants, le frottement du courant sur le fond crée des zones de mélange intense qui peuvent générer des fronts thermiques saisonniers tels qu'au voisinage d'Ouessant ou dans les pertuis Charentais. Toutefois, sur la majeure partie du plateau, les courants de marée sont faibles et les masses d'eau se stratifient sous l'action du réchauffement printanier ou celle des panaches fluviaux.

Le vent est apparu comme le principal moteur des masses d'eau. Près des côtes il induit des variations du niveau moyen et des mouvements verticaux. Ceux-ci provoquent des remontées d'eaux de fond, plus froides, et créent des fronts thermiques épisodiques notamment le long de la côte des Landes. L'action du vent sur l'hydrologie s'exerce également sur la turbulence générée en surface et sur la modification du bilan thermique à l'interface air - océan. De ce fait, la variabilité inter-annuelle de la force du vent induit des variations dans l'établissement de la thermocline saisonnière.

Le plateau atlantique est soumis à deux apports d'eau douce importants, la Loire et la Gironde. Les panaches fluviaux ont une tendance naturelle (sans vent) à se propager en surface vers le nord collés à la côte à cause de la rotation terrestre. L'influence de chacun de ces fleuves peut s'exercer à plusieurs centaines de km de leur estuaire respectif en période de crue. Certaines portions du littoral atlantique sont alors soumises à plusieurs panaches fluviaux dans des proportions variables au

cours du temps selon les séquences de vents et de débits. La baie de Vilaine se trouve par exemple sous l'influence de la Loire et de la Vilaine, de même, le bassin de Marennes Oléron reçoit les eaux de la Gironde et de la Charente. Le modèle numérique permet alors de calculer l'importance de chacune des sources en présence. La **figure 1** illustre par exemple les dessalures produites par la Loire et la Gironde devant les côtes de Vendée. Les rôles de chacun des deux principaux fleuves sont tour à tour dominants. En général, les eaux issues de la Gironde apparaissent plutôt en début d'année quand les vents de sud ouest poussent le panache de la Gironde vers le nord. Au printemps, ces eaux douces sont transportées vers le large et les eaux issues de la Loire atteignent le littoral vendéen.

Pour chaque processus, une validation partielle du modèle a été obtenue par comparaison des résultats avec des thermographies satellitales infra-rouge.

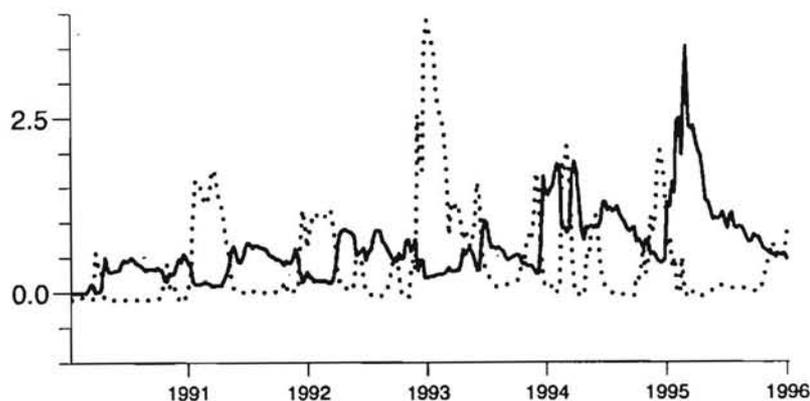


Figure 1 : Déficients de salinité induits par la Gironde (pointillés) et la Loire (trait plein). Résultats du modèle aux Sables d'Olonne.

En raison de la variabilité intrinsèque des processus dominants et de leurs interactions entre eux, il est particulièrement difficile de définir une année moyenne. De ce fait, des simulations réalistes des 8 dernières années ont été effectuées en forçant le modèle par la marée réelle, les vents et les débits des fleuves mesurés. Les évolutions saisonnières de la température et de la salinité sur le plateau et leur variabilité inter annuelle ont ainsi été mises en évidence. La comparaison entre les salinités calculées et mesurées ont permis de valider le modèle pour certaines périodes de l'année.

3.3. Simulations de l'évolution saisonnière des structures hydrologiques

Hiver

En hiver les vents soufflent majoritairement du sud ouest et créent des courants dirigés du sud vers le nord. Cette circulation accentue la tendance générale des eaux d'origine fluviale à se propager vers le Nord. L'agitation en surface et les vents perpendiculaires à la côte ont tendance à empêcher la stratification verticale des eaux et à limiter la dispersion vers le large des eaux douces. Du fait de leur plus faible contenu thermique, les eaux se refroidissent plus vite par petit fond.

Dans le sud de la zone on note parfois le long de la pente, une pénétration d'eau chaude sur le plateau issue des côtes nord espagnoles et transportées par un courant appelé 'navidad'. Cette caractéristique hydrodynamique ne pourra être correctement simulée que lorsque la force et la variabilité de ce courant seront connus avec précision.

Printemps

En général, les vents passent au secteur nord ouest au printemps alors que les débits des fleuves ont tendance à diminuer. La circulation induite par le vent s'inverse donc, les courants moyens sont plutôt dirigés vers le sud et vers le large dans les couches de surface. Il en résulte donc une dispersion des eaux fluviales qui se répandent sur tout le plateau sur une épaisseur d'environ 20 m. La variabilité inter-annuelle de cette dispersion est importante car elle dépend du régime des vents et de la quantité d'eau douce accumulée près des côtes durant les crues hivernales. La **figure 2** présente les salinités de surface calculées par le modèle au début du mois de mai pour 6 années différentes. La variabilité inter-annuelle de ces structures est particulièrement apparente. Aux années sèches (91 et 92) correspondent des panaches peu étendus alors que les années à forts débits (94 et 95) ont engendré des dessalures sur tout le plateau.

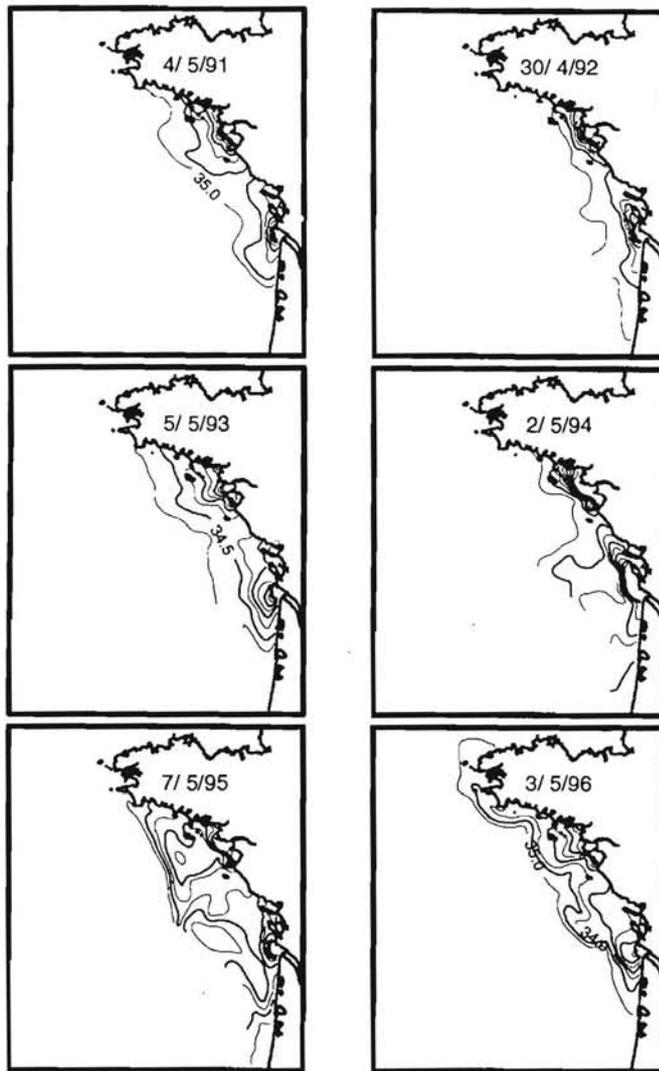


Figure 2 : salinités de surface calculées par le modèle

Eté

Les vents sont encore en moyenne du secteur nord ouest et les fleuves sont en étiage. Les courants de surface continuent à être dirigés en moyenne vers le sud. Les salinités des eaux de surface sur le plateau sont proches de celle de l'eau de mer car la dispersion vers le large des panaches n'est plus compensée par des apports d'eau douce à la côte. Du point de vue thermique, les masses d'eaux sont en général stratifiées, les différences de température entre les eaux de surface et celles de fond sont de l'ordre de 8°C. Sur la majeure partie du plateau, au-dessus de la grande vase, la faible turbulence induite par les courants de marée, limite les échanges thermiques et permettent la persistance d'une eau de fond froide appelée 'bourrelet froid' toute l'année d'une température d'environ 12°C.

Par vent de nord à nord est assez persistant, des remontées d'eaux de fond le long de la côte des Landes provoquent une baisse de température des eaux côtières. Le

mélange dû aux forts courants de marée au voisinage de Ouessant et Sein ou au nord des îles de Noirmoutier et d'Oléron crée une zone frontale entre des eaux mélangées verticalement et des eaux stratifiées chaudes en surface et froides au fond.

Automne

En automne, les vents repassent en général au sud ouest et annoncent les tempêtes hivernales. Les courants sur le plateau s'inversent à nouveau et les premières crues induisent une baisse des salinités au nord des principaux estuaires. La thermocline saisonnière disparaît peu à peu. Il apparaît parfois une langue d'eau chaude située devant les côtes de la Vendée, l'origine de cette langue semble due à des facteurs locaux, sa variabilité est importante.

3.4. Validation du modèle

La confrontation des résultats du modèle aux mesures *in situ* ou satellitales est indispensable pour apprécier la capacité du modèle à reproduire la réalité. Sur la façade atlantique, les mesures *in situ* de courants de longue durée sont très peu nombreuses en raison principalement des problèmes de tenue en mer de mouillages. De ce fait, la validation du modèle ne peut se faire qu'indirectement par la comparaison des évolutions des températures ou salinités.

La température n'est pas un paramètre conservatif et la fiabilité de son calcul dépend à la fois de la qualité de la simulation de la dynamique et des données météorologiques imposée au modèle. La comparaison des structures thermiques mises en évidence par thermographie infra rouge avec les résultats du modèle sont satisfaisantes.

Actuellement le modèle reproduit les températures avec une précision absolue de l'ordre de 1,5 à 2°C, due en particulier à des flux de chaleur à l'interface calculés de manière schématique. Dans un futur proche, l'emploi de données de modèle météo devrait très sensiblement améliorer ce calcul.

Les mesures disponibles sont principalement situées le long du littoral ou récoltées lors de campagnes ponctuelles. La comparaison des salinités calculées avec des mesures à la côte permet de valider la capacité du modèle à reproduire la variabilité inter-annuelle des panaches fluviaux. De ce fait, les mesures de salinités effectuées dans le cadre du REPHY ont été d'une grande utilité car elles constituent à ce jour, la seule base de données de mesures de salinité à l'échelle du littoral atlantique sur plusieurs années. La **figure 3** illustre une comparaison entre salinités calculées et mesurées.

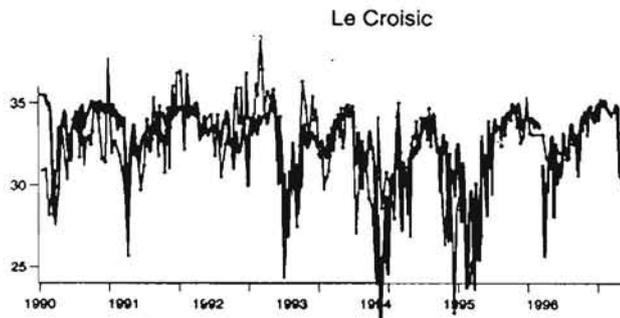


Figure 3 : Comparaison entre la salinité calculée par le modèle (trait épais) et les mesures (trait fin et cercles pleins)

En général l'accord est assez bon, sauf dans les zones sous l'influence directe d'une rivière de faible débit, que le modèle ne prend pas en compte.

3.5. Perspectives

Le modèle du plateau atlantique a permis de décrire l'évolution des structures hydrologiques de l'échelle journalière à l'échelle annuelle. Les résultats sont apparus actuellement assez réalistes pour que ce modèle puisse servir de base à la simulation de différentes hypothèses concernant l'apparition de plancton toxique et à l'élaboration d'un modèle de production primaire.

Parallèlement à cette application, des travaux sont actuellement engagés pour accroître la fiabilité du modèle par l'acquisition de mesures *in situ* et un meilleur forçage aux limites.

4. Les apports de la modélisation des cycles biogéochimiques dans la compréhension des grandes tendances spatio-temporelles du phytoplancton des côtes de Manche-Atlantique¹

Alain MÉNESGUEN

4.1. Eutrophisation des écosystèmes côtiers

Les rejets anthropiques croissants d'azote et de phosphore dans certaines eaux côtières ont induit, dans les vingt dernières années, d'importantes augmentations de la production végétale aquatique. Ce phénomène appelé eutrophisation a pour conséquence de déséquilibrer le fonctionnement normal des écosystèmes jusqu'à provoquer, dans les cas extrêmes, la mort de l'écosystème par asphyxie.

Deux grands types d'eutrophisation sont visibles dans nos eaux côtières :

- les proliférations de phytoplancton,
- les proliférations de macro-algues vertes.

Si ces dernières peuvent se produire de façon quasi-pure dans certains fonds de baies en mer macrotidale, elles peuvent également entrer en compétition avec le phytoplancton en lagune fortement enrichie.

Seul le premier type sera évoqué ici.

L'eutrophisation nécessite la conjonction de deux capacités de l'environnement physico-chimique côtier :

- permettre une production algale intense,
- empêcher l'évacuation rapide vers la haute mer de la biomasse produite, ce qui provoquera l'accumulation visible d'une importante biomasse algale sur le site.

La première condition implique d'abord l'accès des algues à une lumière suffisante pour qu'elles puissent effectuer une photosynthèse diurne intense. Pour les espèces non fixées comme les espèces phytoplanctoniques, la production est liée à la capacité du site à maintenir les algues en suspension dans la colonne d'eau : la turbulence naturelle due aux courants et au clapot est suffisante pour assurer un brassage efficace sur des colonnes de quelques dizaines de mètres.

¹ texte extrait en grande partie de : Ménesguen A., 1998. Eutrophisation des écosystèmes côtiers. Lettre PIGB-PMRC-France, janvier 1998, n°7.

Le maintien d'un taux de croissance élevé pour une importante biomasse algale en place nécessite aussi un apport continu des nutriments majeurs, ce qui explique que les sites eutrophisés soient nécessairement associés à des apports terrigènes de sels nutritifs.

4.2. Modélisation de l'eutrophisation côtière

L'eutrophisation étant avant tout un phénomène de prolifération végétale, donc de masse, un modèle d'eutrophisation doit d'abord s'attacher à simuler les flux de matière dans l'écosystème. Toutefois, la matière vivante étant constituée de nombreux éléments chimiques naturels, il convient de ne garder que ceux qui limitent éventuellement à un moment ou à un autre les flux de matière entrant dans le compartiment végétal. On est ainsi amené à négliger l'élément majeur de la matière vivante, le carbone, dont les formes inorganiques dissoutes assimilables par photosynthèse viennent rarement à manquer dans les eaux eutrophisées du fait du réapprovisionnement par l'atmosphère et par les phénomènes respiratoires. On retiendra par contre les éléments azote, phosphore et silicium comme potentiellement limitants de la production végétale, ainsi que l'oxygène pour son rôle dans le devenir des formes sédimentaires du phosphore et de l'azote (voir **fig. 1 et 2**). Dans les cycles naturels des trois premiers éléments, les études précédentes montrent qu'il est raisonnable de :

- scinder le compartiment végétal en quatre grands types : phytoplancton (siliceux ou non) et macro-algues (vertes ou rouges) pour pouvoir étudier les raisons de la quasi exclusion spatio-temporelle entre ces types d'eutrophisation,
- négliger le broutage de la matière algale par les herbivores,
- détailler des processus affectant les formes organiques et inorganiques des éléments dans le sédiment,
- prendre en compte la stratification éventuelle de la colonne d'eau, essentiellement d'origine haline dans les eaux côtières eutrophisées, car elle favorise le blocage des nutriments et du phytoplancton dans la zone éclairée,
- simuler l'évolution de la turbidité de la colonne d'eau, dans la mesure où elle conditionne la limitation de la photosynthèse par la lumière disponible.

Un modèle général a été construit sur ces hypothèses, grâce au logiciel "ELISE" de l'IFREMER. Quelques résultats relatifs à la Baie de Seine sont décrits ci-dessous.

Exemple de la baie de Seine

L'existence de longues séries temporelles de mesures sur la Seine permet d'apprécier la tendance pluriannuelle des concentrations : si **aucune tendance** n'a

pu être mise en évidence **pour le silicium** (indispensable aux diatomées phytoplanctoniques) car il est d'origine strictement naturelle, l'analyse de la période 1978-1992 a mis en évidence une **croissance continue des concentrations en azote inorganique** (+ 1,8 % par an) et une **décroissance continue des concentrations en phosphate** (- 2,7 % par an). Ces tendances opposées sont observées sur de nombreuses autres rivières et résultent de l'augmentation des fertilisations azotées des terres agricoles d'une part, de la réduction des rejets industriels de phosphate, ainsi que de la déphosphatation croissante des rejets urbains d'autre part. Il faut remarquer toutefois que pour l'azote, la part de la variabilité inter-annuelle des apports due aux activités humaines est inférieure d'un ordre de grandeur à celle due aux fluctuations climatiques.

La baie de Seine orientale est un exemple de zone de dilution en mer d'un apport important d'eau douce, se caractérisant par une stratification haline qui s'estompe progressivement vers le large (**fig. 3**). Cette stratification facilite le démarrage de la prolifération phytoplanctonique printanière en bloquant les cellules dans une couche de quelques mètres sous la surface, bien éclairée et riche en nutriments. La turbidité importante près de l'estuaire limite cependant cet effet propice à l'eutrophisation.

Pour le modèle, l'ensemble de la baie de Seine est divisé horizontalement en 42 boîtes, entre lesquelles sont calculés les flux advectifs résiduels et les flux dispersifs créés par la marée. Un modèle de stratification thermohaline à deux couches est couplé au schéma de circulation horizontale afin de prendre en compte la stratification variable de la colonne d'eau dans la zone proche de l'estuaire. Actuellement, le sous-modèle biologique considère en baie de Seine l'azote et le silicium, et partage le phytoplancton en diatomées et dinoflagellés. Calibré sur les données de 1978 (voir **fig. 4**), ce modèle a été validé sur les données de 1992 (**fig.5**).

Utilisé pour simuler les 20 années 1976-1995 en s'appuyant sur les données météorologiques journalières et les chroniques de débits-concentrations des principales rivières, ce modèle écologique met en évidence la **concordance géographique entre les zones de concentrations maximales du phytoplancton et l'aire d'extension du panache de la Seine dans la baie**. La production des dinoflagellés, contrairement à celle des diatomées, prend place essentiellement dans la partie est de la baie, en raison de la stratification haline des eaux dans l'embouchure. Le modèle écologique tridimensionnel actuellement développé par Philippe Cugier dans le cadre de sa thèse permet en outre de rendre compte plus finement de la répartition verticale de ces dinoflagellés (voir **fig. 6b**), dont les mesures *in situ* ont en général montré la plus grande abondance dans la couche de surface, voire au niveau de la pycnocline (Gentien, *comm. pers.*) : voir **fig. 6a**.

Les fluctuations interannuelles de la production des diatomées sur l'ensemble de la baie sont liées aux variations de l'insolation printanière, alors que, dans le panache,

elles dépendent du niveau des apports terrestres en silicium. La production estivale des dinoflagellés dans le panache est accrue par des températures élevées de l'eau et par de faibles valeurs du rapport Si/N qui apparaissent durant les années à étiage sévère. La tendance pluriannuelle à l'augmentation de la production des dinoflagellés est à rapprocher de l'évolution croissante des apports en azote depuis vingt ans, concomitante à une stabilité des apports en silicium (**fig.7**).

4.3. Conclusions

Un modèle écologique demande une longue phase de mise au point et de validation, car les processus à introduire sont complexes. Un tel modèle ne peut pas actuellement simuler une espèce phytoplanctonique particulière, mais seulement un groupe (par exemple les dinoflagellés).

La thèse menée actuellement à DEL/EC par Sophie Loyer (modélisation écologique du plateau atlantique et utilisation de données satellitales) devrait permettre à terme l'explication des tendances majeures visibles dans les séries d'observations, par exemple celles qui sont réalisées dans le cadre du REPHY.

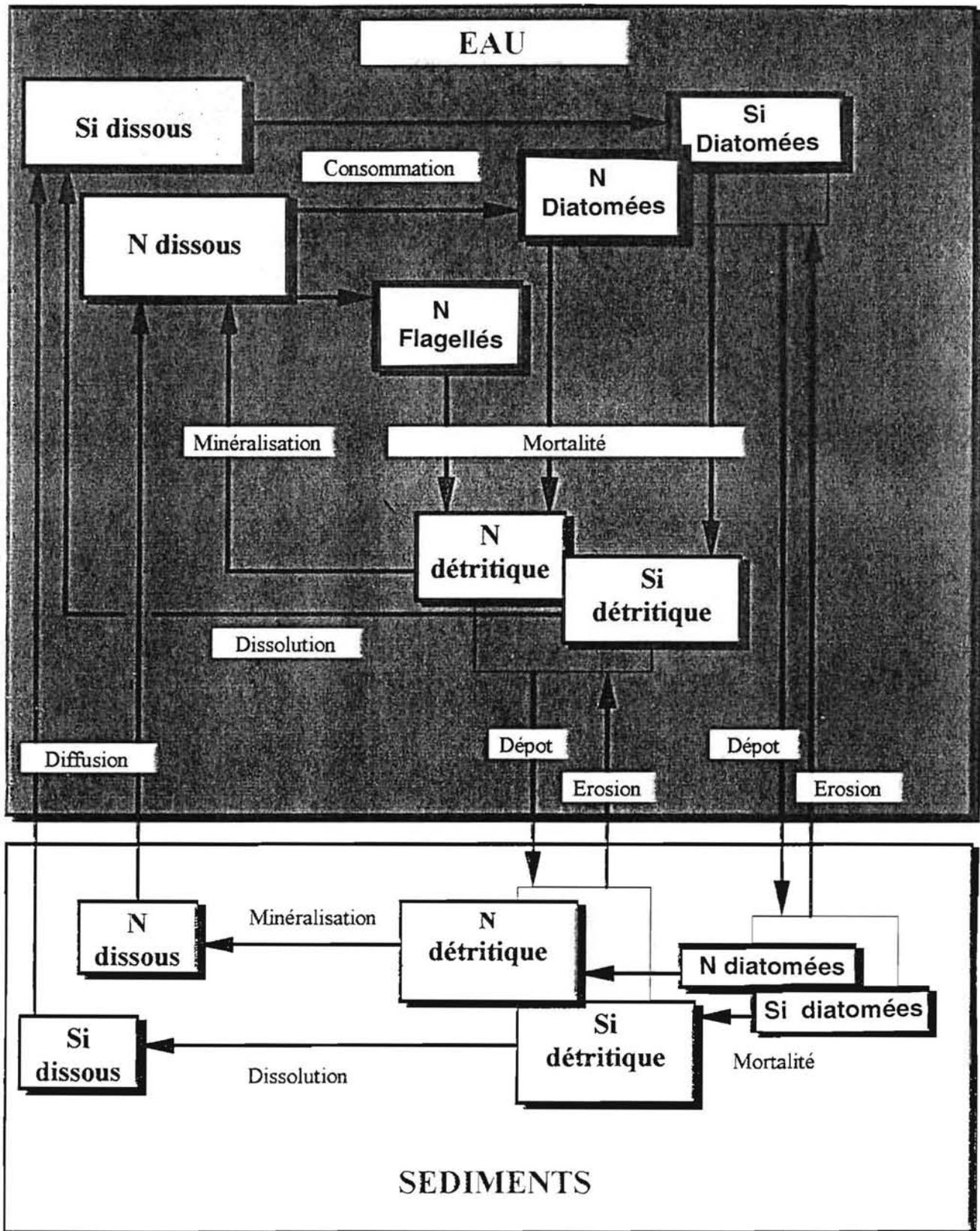


Figure 1

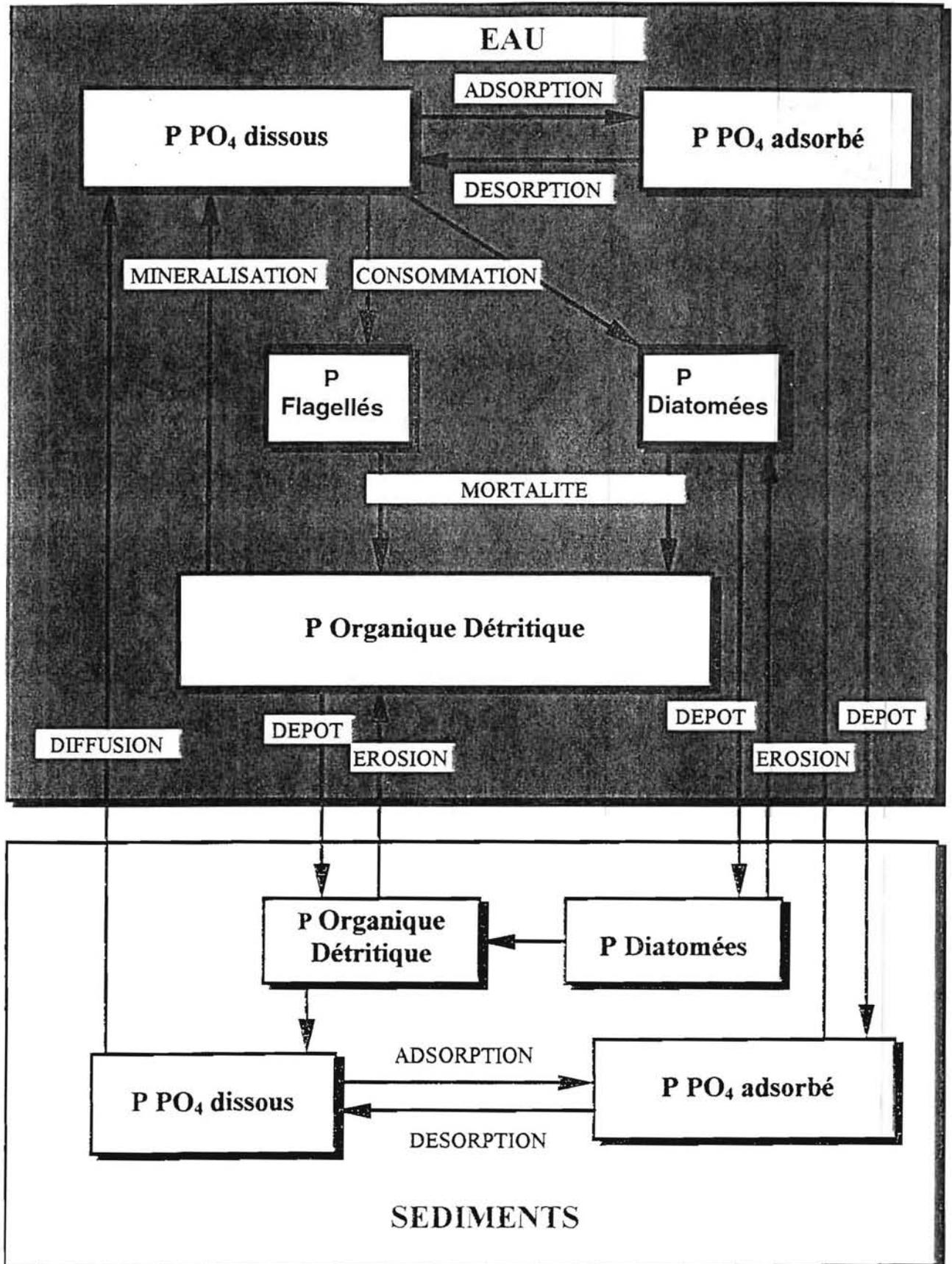


Figure 2

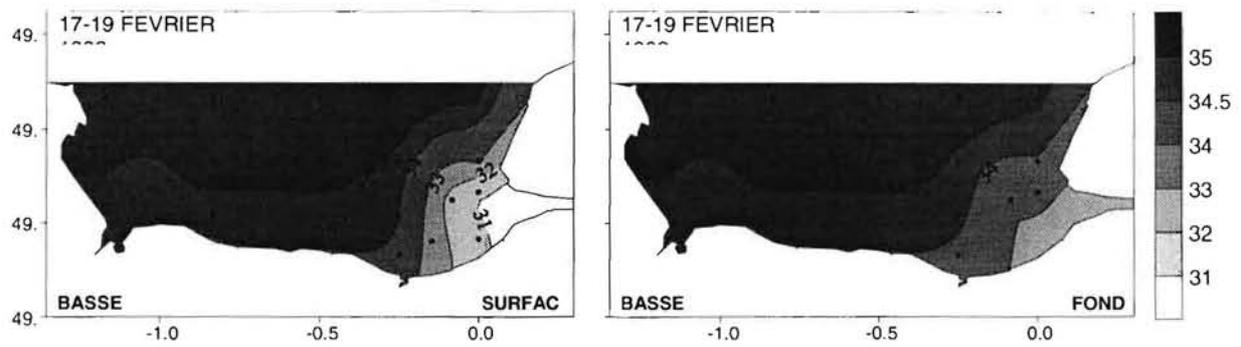
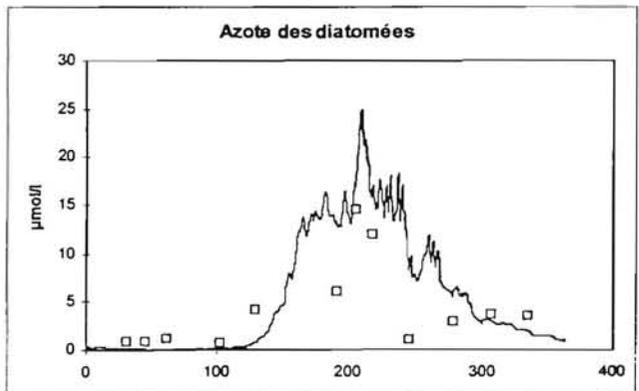
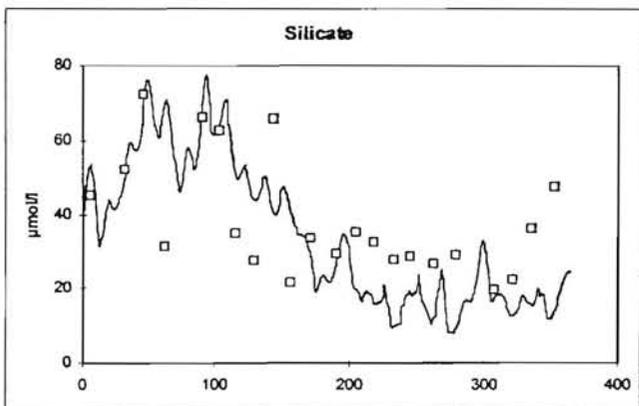
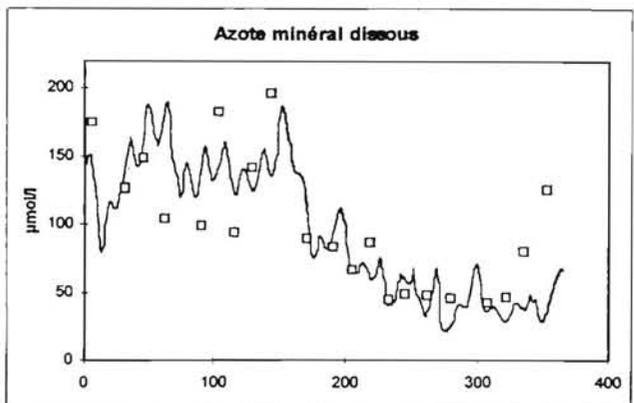


Figure 3 : Répartition observée de la salinité en surface et au fond en baie de Seine, en février 1992.

COMPARAISON MODELE-MESURES
(POINT RNO 2 - 1978)



COMPARAISON MODELE-MESURES
(POINT RNO 2 - 1978)

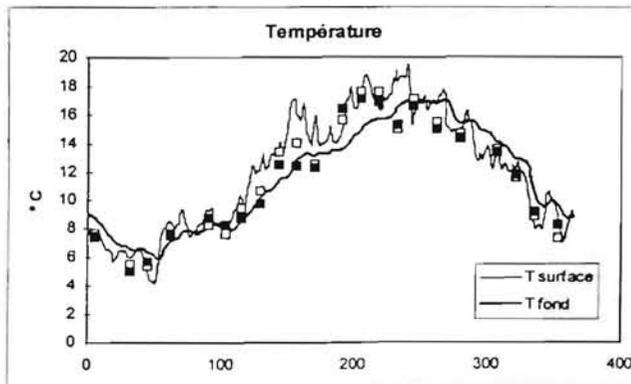
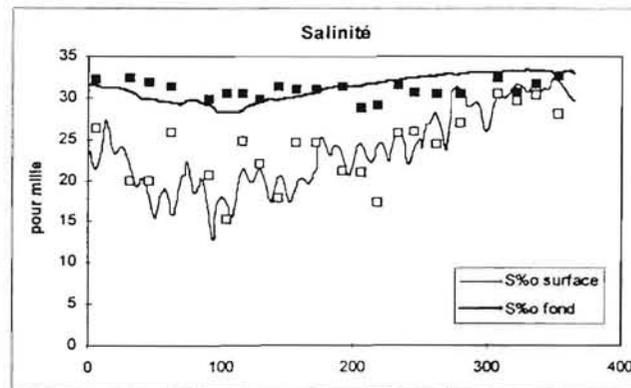
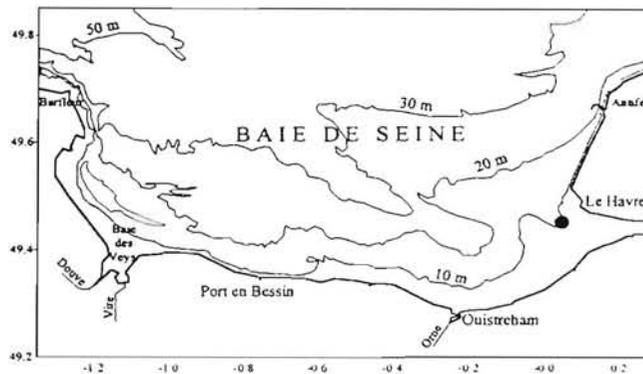


Figure 4

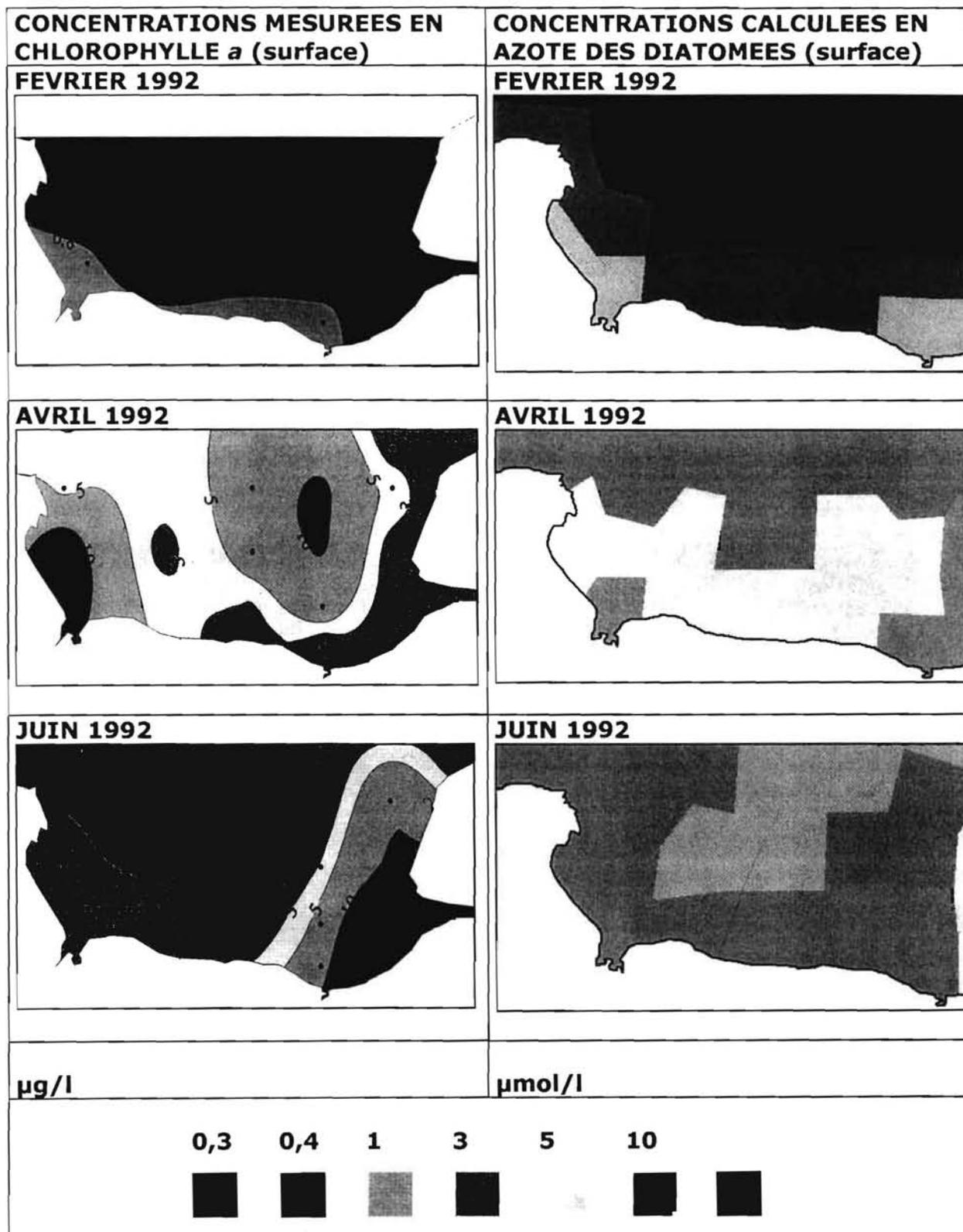


Figure 5 : Concentrations mesurées en chlorophylle *a* et concentrations calculées en azote des diatomées en surface dans la baie de Seine en février, en avril et en juin 92.

DINOSEINE 1 - Juillet 1994

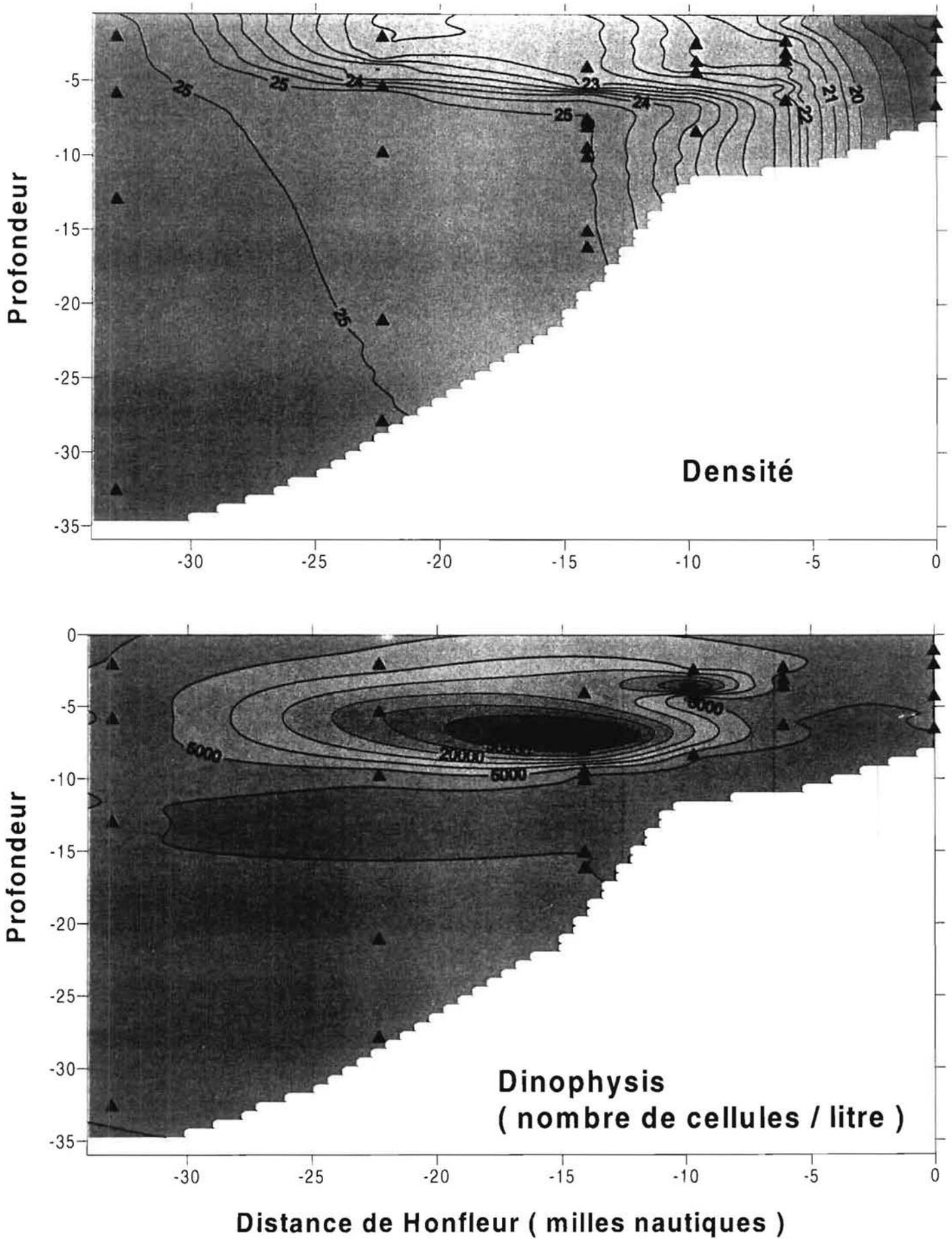


Figure 6 a : Profils mesurés dans le panache de la Seine (Gentien *et al.*, in press)

DINOSEINE 1 - juillet 94

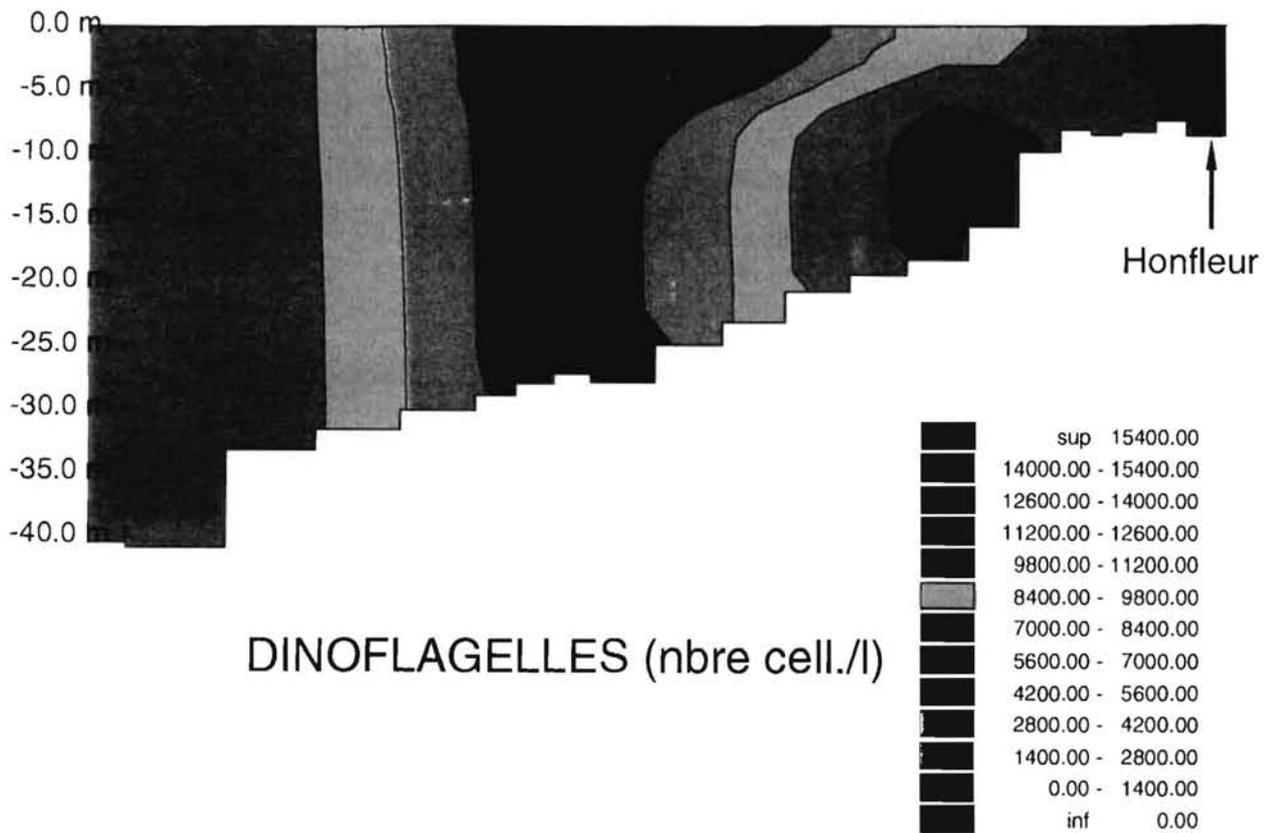
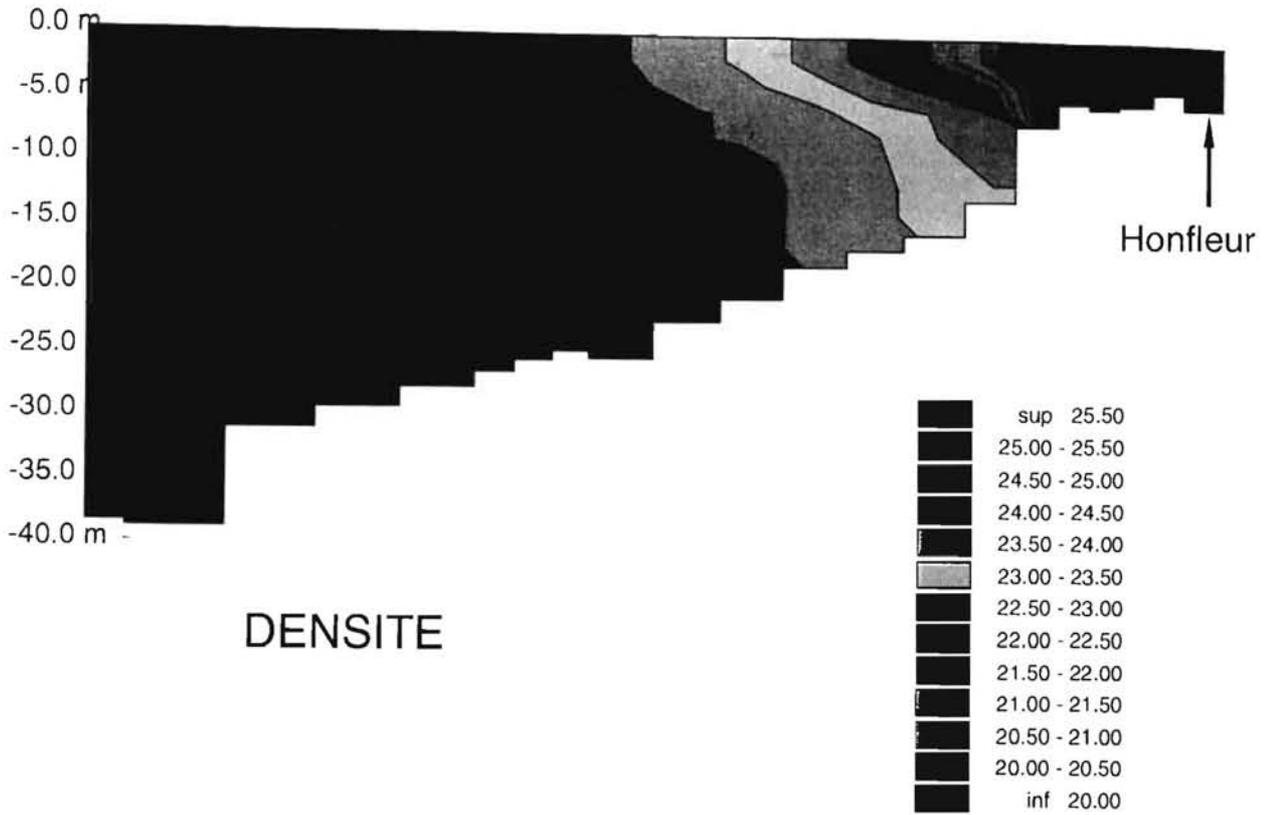


Figure 6 b : Résultat du modèle numérique 3D de la baie de Seine (Cugier, 1999)

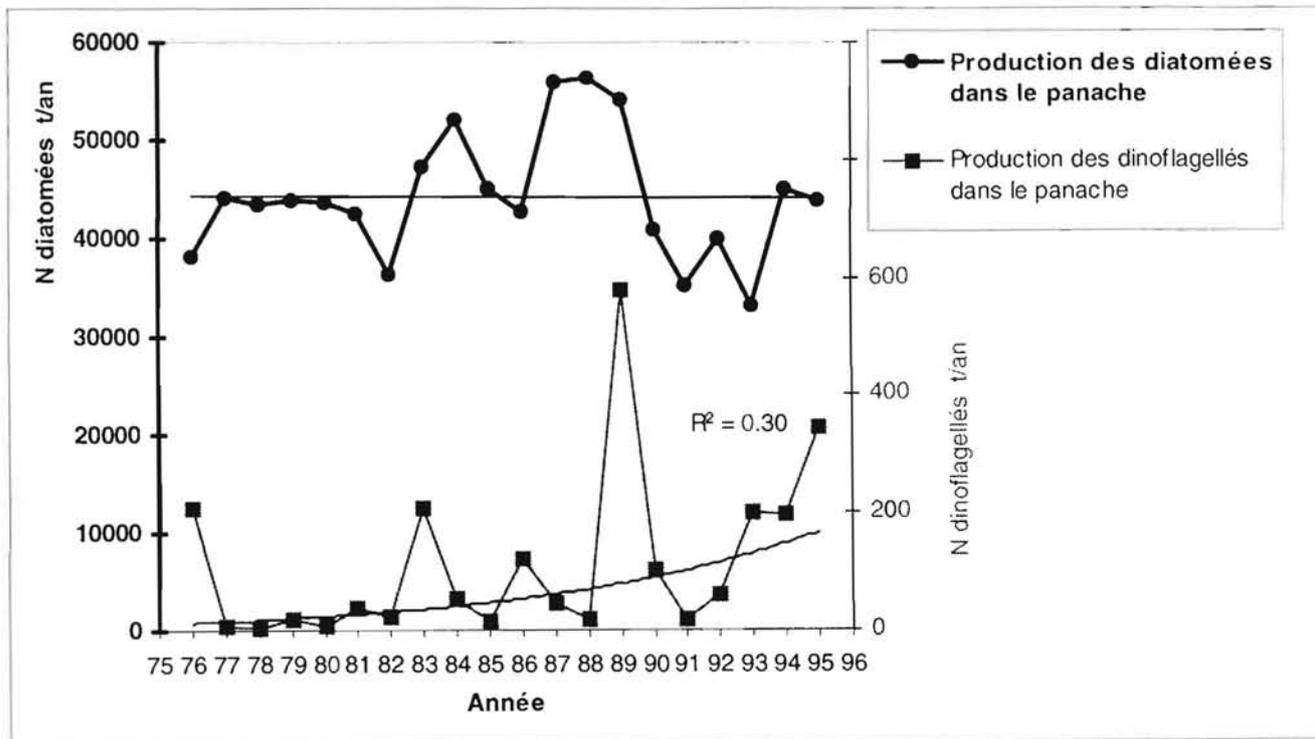


Figure 7 : Evolution pluriannuelle des productions calculées de diatomées et de dinoflagellés dans le panache de la Seine.

5. Présentation de *PhytoQuiz 1*, CD-Rom d'auto-formation à l'identification du phytoplancton.

Alain LE MAGUERESSE

Une démonstration du Cd-Rom *PhytoQuiz 1* est faite dans l'amphithéâtre. Celui ci est le premier d'une série de deux CD-Roms. Une description succincte en est faite ci dessous.²

PhytoQuiz est un outil d'auto-formation sur CD-Rom, destiné aux observateurs du phytoplancton : techniciens, aquaculteurs, étudiants. Il est particulièrement adapté aux observateurs impliqués dans les programmes de surveillance du milieu marin. *PhytoQuiz* simule une observation de phytoplancton en microscopie photonique. Conçu comme un jeu interactif et illustré, *Phytoquiz* aide l'utilisateur à améliorer ses connaissances en identification du phytoplancton, grâce à des documents essentiellement visuels et une technique basée sur l'auto-apprentissage.

PhytoQuiz 1 couvre le domaine des flagellés marins (Dinophycées, Prymnésiophycées, Raphidophycées, etc.). **PhytoQuiz 2** couvre le domaine des organismes non flagellés d'eaux marines ou saumâtres (Diatomophycées, Cyanobactéries). Il sera disponible en 1999.

Un **catalogue** présente l'ensemble des 312 photos à identifier sous forme d'**imassettes**. Chaque photo correspond à un taxon. Un clic sur une imasette enchaîne sur l'écran photo en définition standard plein écran. Une loupe permet une visualisation en haute définition, simulant un changement d'objectif. Il existe également 351 **documents complémentaires** pour faciliter l'identification : autres photos en microscopie photonique, photos en microscopie électronique, planches de dessins, séquences vidéo.

Une liste simple de **critères** visibles en microscopie photonique est affichée. Le choix des critères corrects est obligatoire pour accéder à la liste des taxons. Puis une liste déroulante présente les taxons du catalogue hiérarchisés. Un **taxon** est cliqué dans la liste déroulante. L'identification est alors terminée (bonne réponse) ou à reprendre. Dans ce dernier cas, la solution peut être demandée.

PhytoQuiz inverse

C'est une fonction complémentaire qui a été développée pour permettre l'accès aux photos d'un taxon déterminé. Un taxon cliqué dans la liste déroulante conduit à l'affichage de toutes les photos correspondant à ce taxon.

² extrait de la jaquette du CD-Rom

6. Variabilité de la composition des listes floristiques, induite par l'heure de prélèvement. Pertuis Breton, octobre 1996.

Thomas SARRAZIN, Dominique SOUDANT, Sylvie MARGAT et Benoît BELIAEFF

présenté par Mireille RYCKAERT

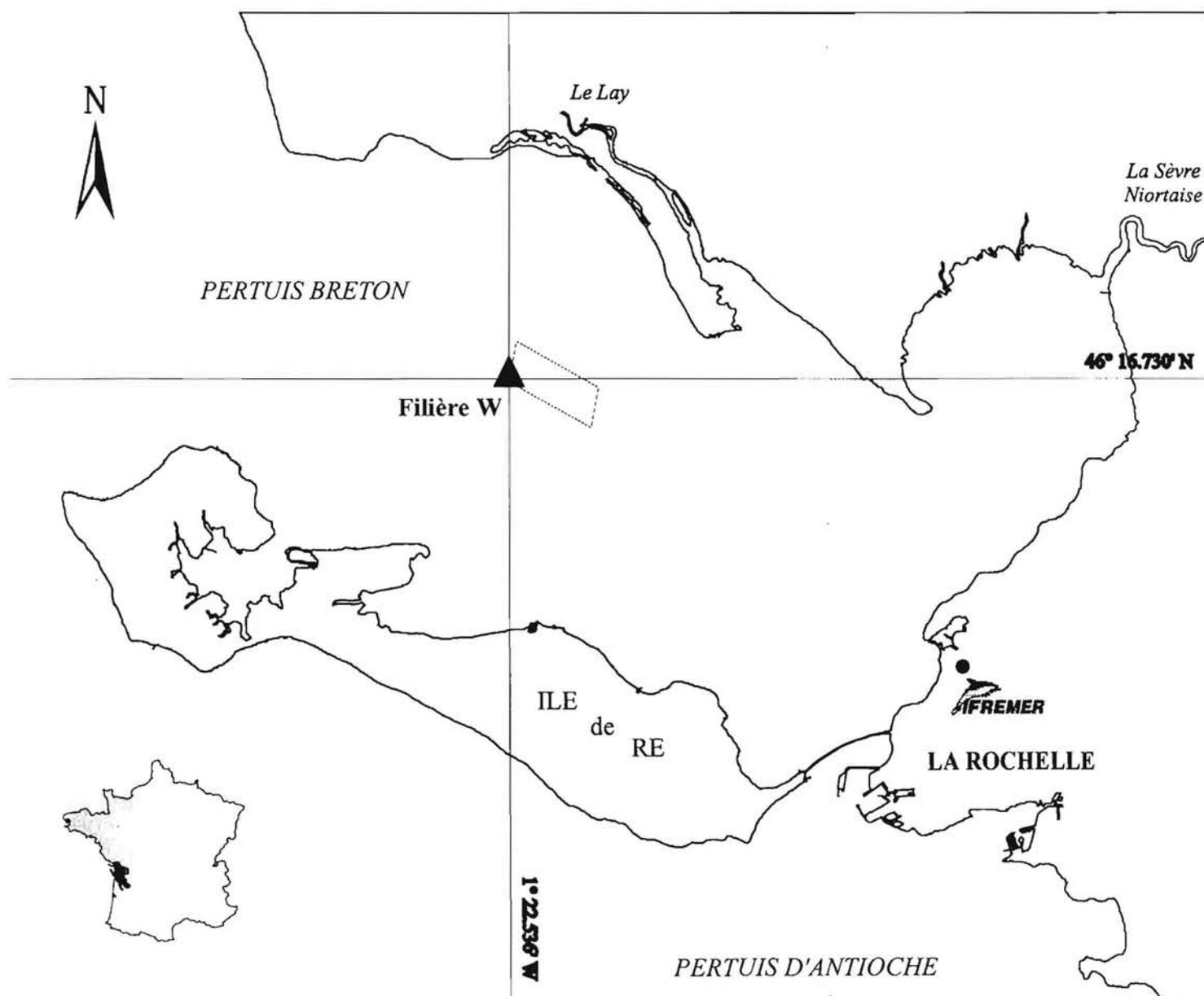
Les composantes de variance "heure" et "jour" sont significativement non nulles, contrairement à celle exprimée par la variabilité inter-échantillons. La contribution significative de la variabilité à l'échelle horaire illustre la dynamique des masses d'eaux sur un cycle de marée à rapprocher des variations spatiales à un moment donné des populations phytoplanctoniques. Cette hypothèse est renforcée par une contribution maximale obtenue pour le regroupement des heures d'échantillonnage de façon symétrique par rapport à la marée (par exemple, le regroupement des résultats de HM-2 et HM+2). La contribution la plus importante à la variabilité totale est imputable aux fluctuations inter-jours, autorisant, sur une fenêtre d'observation plus large, la détection d'éventuelles tendances.

Ces résultats amènent à deux conclusions opérationnelles, pour le cas qui nous intéresse :

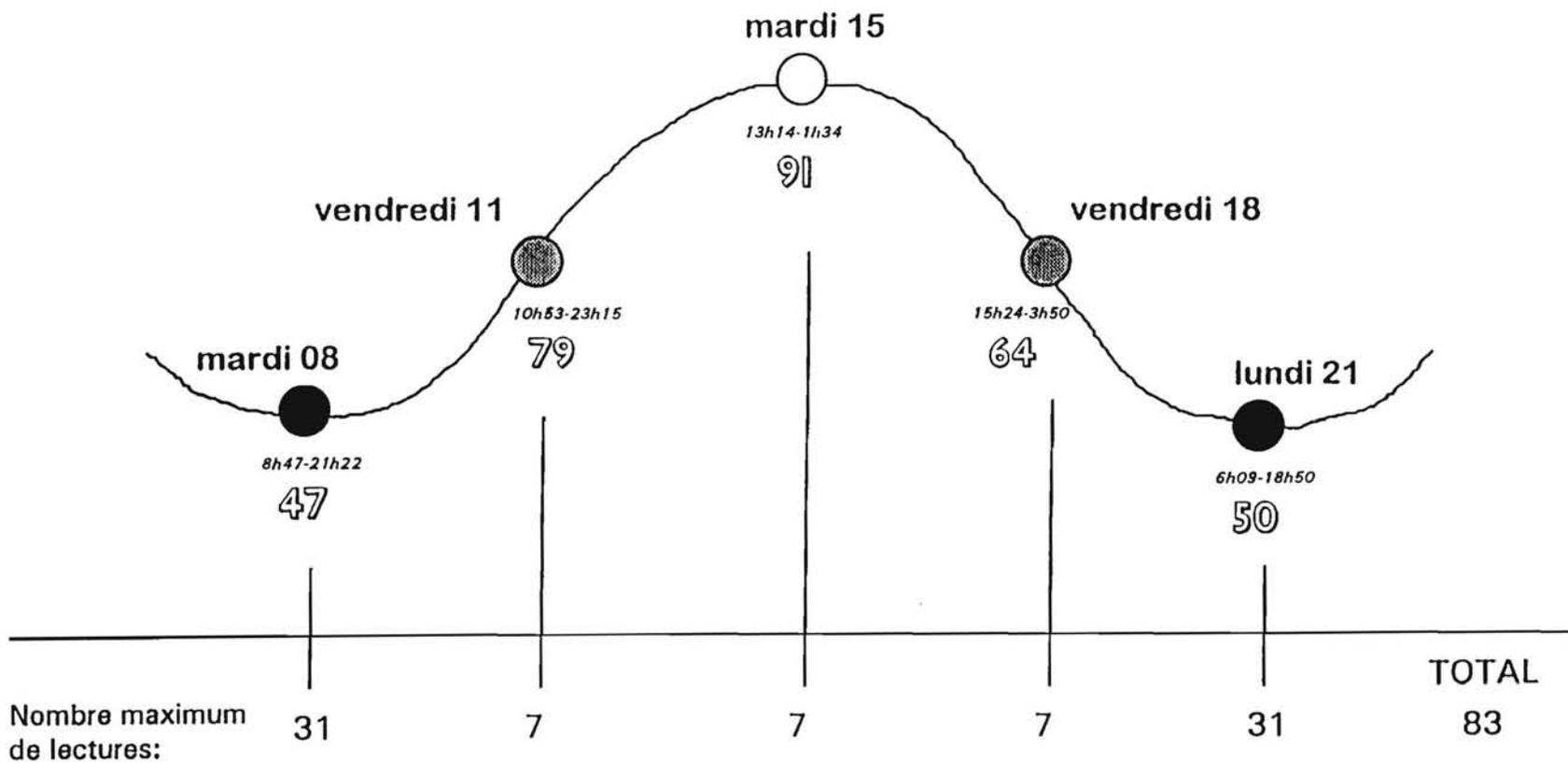
- dans le souci d'estimer avec justesse et précision l'abondance des différentes familles représentative d'une date donnée, il serait plus efficace d'échantillonner à différentes heures d'un cycle de marée plutôt que de réaliser des réplicats au même moment.
- dans le contexte du REPHY, l'heure de prélèvement n'est pas anodine et **il est préférable de s'en tenir au même moment par rapport aux heures de haute mer** (ou basse mer) **en valeur absolue**, c'est à dire indifféremment HM-2 ou HM+2.

Si ces résultats et conséquences pratiques apportent une réponse concrète au problème posé par le laboratoire de La Rochelle, ils ne sauraient être extrapolés à d'autres zones. En effet, on démontre une nouvelle fois le caractère déterminant du forçage hydrodynamique sur les variations de composition des flores phytoplanctoniques.

Position géographique du point REPHY 065019 "FILIERE W"



Etude PHYTOPOP aux filières, au cours du mois d'OCTOBRE 96



Le choix s'est porté sur l'analyse de variance hiérarchisée (ANOVAH), sur plusieurs variables :

- l'indice de diversité de Shannon H ,
- la régularité R ,
- le nombre de genre, n ,

H , R et n ont été calculés à partir de trois regroupements des taxons

- les genres (ou assimilés),
- les ordres, (diatomées pennales, centrales, dinoflagellés nus, cuirassés)
- les classes (diatomées, dinoflagellés, autres)

Le taxon espèce n'a pas été retenu, car il est difficile à déterminer pour tous les organismes observés.

Les hypothèses à vérifier sont :

- h_1 : la variabilité entre les jours est nulle,
- h_2 : la variabilité entre les heures au sein des jours est nulle,
- h_3 : la variabilité entre les échantillons au sein des heures est nulle

Un résultat de l'ANOVAH <5% entraîne un rejet de l'hypothèse considérée.

PROTOCOLE D'ECHANTILLONNAGE

DATE « JOUR » Coefficient	8/10/1996 1 47	11/10/1996 2 79	15/10/1996 3 91	18/10/1996 4 64	21/10/1996 5 50
BM	3 x 3	1	1	1	3 x 3
BM+2	1	1	1	1	1
PM-2	1	1	1	1	1
PM	3 x 3	1	1	1	3 x 3
PM+2	1	1	1	1	1
BM-2	1	1	1	1	1
BM	3 x 3	1	1	1	3 x 3

Résultats des tests éprouvant la validité des hypothèses h_1 , h_2 et h_3 pour les différents regroupements de taxons. « NS » signifie que les résultats sont non significatifs du risque de première espèce $\alpha = 0,05$

		JOUR	HEURE	ECHANTILLON
Genre	<i>H</i>	$p = 0,041$	$p = 6.10^{-4}$	NS
	<i>n</i>	$p = 0,046$	NS	NS
	<i>R</i>	$p = 0,030$	$p = 5.10^{-4}$	NS
Ordre	<i>H</i>	$p = 0,027$	$p = 10^{-3}$	NS
Classe	<i>H</i>	NS	$p = 6.10^{-4}$	NS

Résultats des tests éprouvant la validité des hypothèses h_1 , h_2 et h_3 pour les abondances (log) absolues des trois genres les plus représentés.

	<i>Leptocylindrus</i>	<i>Chaetoceros</i>	<i>Rhizosolenia</i>
Jour	$p = 0,040$	$p = 0,049$	$p = 0,033$
Heure	$p < 0,0001$	$p = 0,0001$	$p < 0,0001$
Echantillon	NS	NS	NS

Indice de Shannon

$$H = - \sum_{i=1}^n P_i \cdot \log_2 P_i$$

avec n le nombre de genres pour le taxocène genre, le nombre de classes pour le taxocène classes etc., et

$$P_i = \frac{N_i}{N}$$

où N_i est le nombre d'individus de la catégorie i du taxocène considéré et N , l'effectif total de l'échantillon. Par conséquent,

$$N = \sum_{i=1}^n N_i$$

et la formule de diversité de Shannon devient :

$$H = - \frac{1}{N} \times \sum_{i=1}^n N_i \times \log_2 \frac{N_i}{N}$$

La régularité (ou équitabilité) s'exprime comme :

$$R = \frac{H}{\log_2 n}$$

REGROUPEMENT D'HEURES

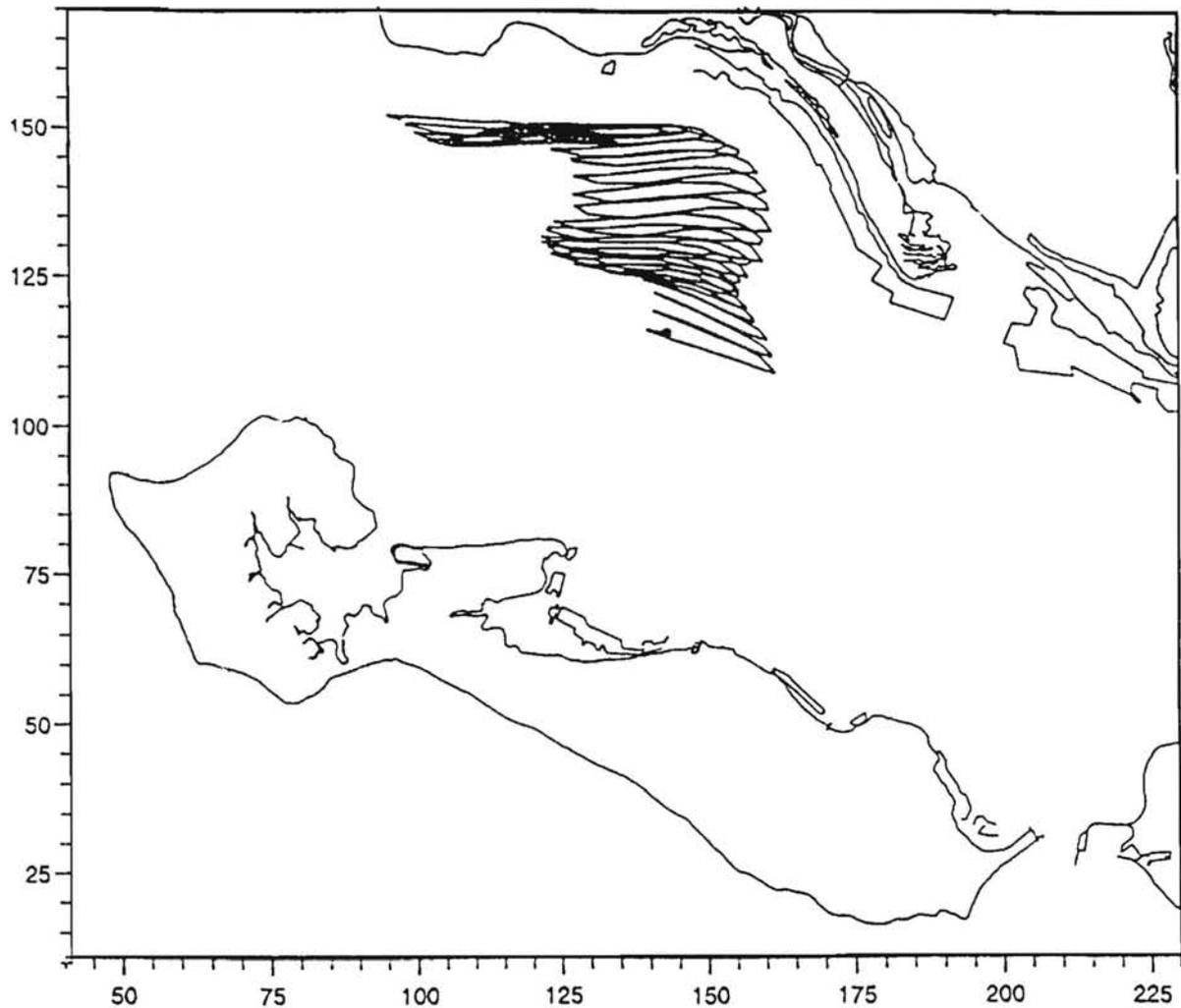
HEURE	BM	BM+2	PM-2	PM	PM+2	BM-2	BM
Groupe 1	1	2	3	X	3	2	1
Groupe 2	X	1	1	2	2	3	3
Groupe 3	1	1	2	2	3	3	X

RESULTATS Tests sur l'indice de diversité de Shannon

	GENRE	<i>Leptocylindrus</i>	<i>Chaetoceros</i>	<i>Rhizolenia</i>
Groupe 1	p = 0,013	p = 0,0001	NS	p = 0,0156
Groupe 2	NS	NS	NS	NS
Groupe 3	NS	NS.	NS	NS

RESULTATS SUR LA TEMPERATURE ET LA SALINITE

	TEMPERATURE	SALINITE
Groupe 1	p = 0,0001	p = 0,0012
Groupe 2	NS	NS
Groupe 3	NS	NS



Trajectoire d'une particule d'eau
ayant comme point de départ le point FILIERE W

Durée de la simulation : 336 heures (14 jours)

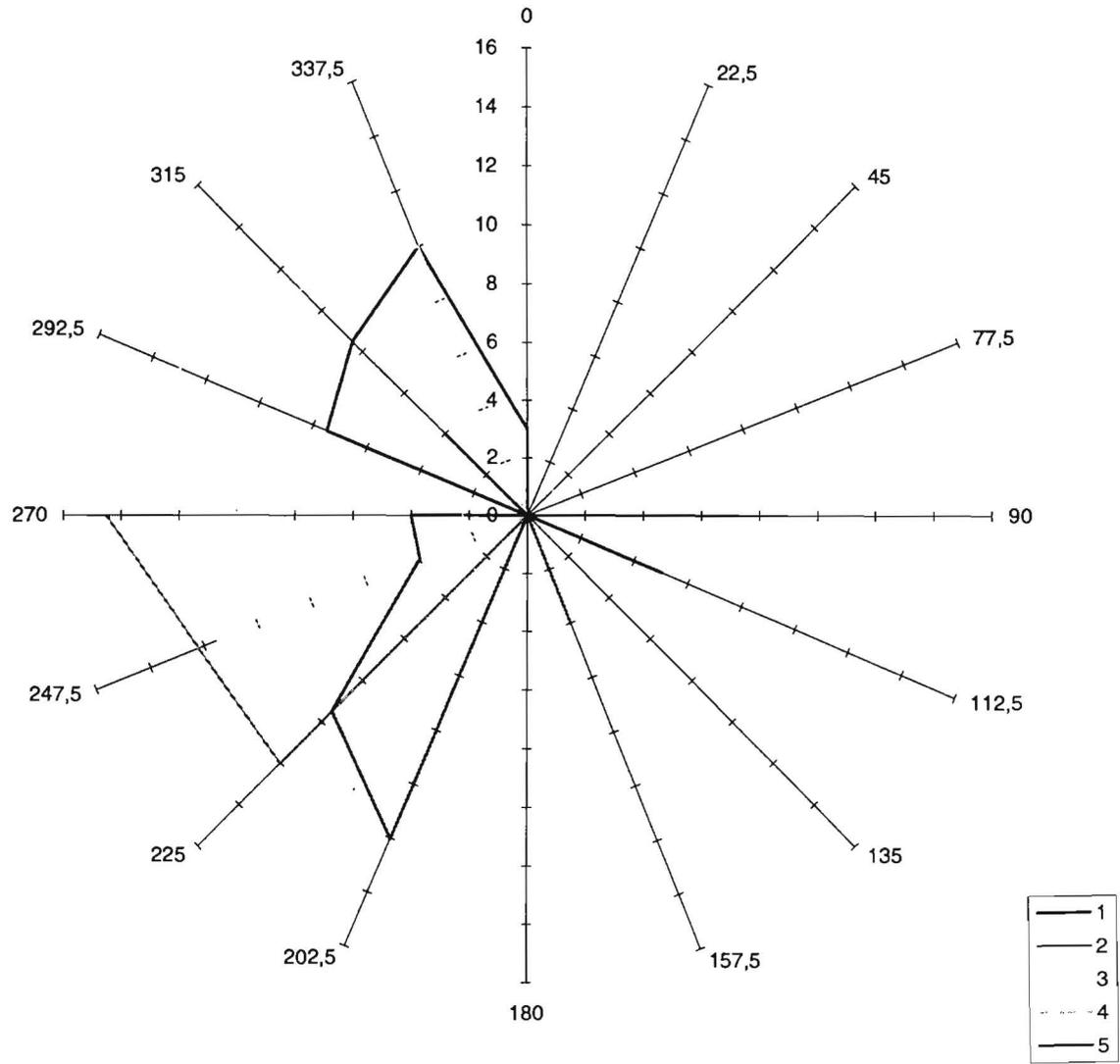
Débit de La Sèvre Niortaise : $12 \text{ m}^3/\text{s}$

Débit du Lay : $3 \text{ m}^3/\text{s}$

Coefficients : 64-91-70

ANNEXE 7

Simulation du modèle hydrodynamique bidimensionnel



TAXOCENES ET TAXONS REPERTORIES

Taxocène Classe	Taxocène Ordre	Taxocène Genre	Genre (ou assimilé) correspondant
DIATOMEES	DIATOMEES CENTRALES	BIDD	Biddulphia sp.
		CERA	Cerataulina sp.
		CHAE	Chaetoceros sp.
		COSC	Coscinodiscus sp.
		DIPL	Diploneis sp.
		DITY	Ditylum sp.
		EUCP	Eucampia sp.
		FMTHALA	Famille des Thalassiosiraceae
		GUIN	Guinardia sp.
		LAUD	Lauderia sp.
		LEPT	Leptocylinthus sp.
		LITH	Lithodesmium sp.
		MELO	Melosira sp.
		ODON	Odontella sp.
		ORCENTR	Ordre des Centrales
		RHIZ	Rhizosolenia sp.
		SKEL	Skeletonoma sp.
STRE	Streptotheca sp.		
THAL	Thalassiosira sp.		
DIATOMEES PENNALES	DIATOMEES PENNALES	AMPR	Amphiprora sp.
		ASTE	Asterionella sp.
		BACI	Bacillaria sp.
		FMFRAGI	Famille des Fragilariaceae
		GRAM	Grammatophora sp.
		NAVI	Navicula sp.
		NITZLON	Nitzschia sp.
		ORPENNA	Ordre des pennes
		PLEUGYR	Pleurosigma sp.
		PSNZ	Pseudonitzschia sp.
		RHAP	Raphoneis sp.
		STAU	Stauroneis sp.
		SYNE	Synedra sp.
THAA	Thalassionema sp.		
DINOFLAGELLES	DINOFLAGELLES CUIRASSES	AMPD	Amphidinium sp.
		CERI	Ceratium sp.
		COCO	Cochlodinium sp.
		DINO	Dinophysis sp.
		ORPERID	Ordre des péridinales
		OXYT	Oxytoxum sp.
		PROR	Procentrum sp.
		PROI	Protoperidinium sp.
		SCRI	Scripsiella sp.
		DINOFLAGELLES NUS	DINOFLAGELLES NUS
GYRO	Gyrodinium sp.		
NOCTSCI	Noctiluca sp.		
ORGYMNO	Ordre des gymnodinales		
POLY	Polykrikos sp.		
TORO	Torodinium sp.		
WARN	Warnowia sp.		
AUTRES	Non considéré	DICT	Dictyocha sp.
		CLEUGLE	Classe des Euglénophycées
		PYRA	Pyramimonas sp.
		FORA	Foraminifères
		MESO	Mésodinium rubrum

7. Variations saisonnières et géographiques des données chlorophylle du REPHY sur le littoral du Morbihan. Relation avec la croissance des huîtres creuses.

Patrick CAMUS

Historique

Depuis 1992 voire 1994 et avec des partenaires différents (U.B.O. Brest ; CISE-Auray ; Syndicat ostréicole SOBAIE - Locmariaquer ; S.R.C. Bretagne Sud, moyens propres du laboratoire...), des **prélèvements hebdomadaires à mensuels** (selon les saisons) ont été réalisés sur les points de suivi REPHY : Ouest-Loscolo / Baie de Vilaine et Men er Roué / Baie de Quiberon.

7.1. Variations géographiques

Stations

Prélevés dans des conditions analogues : pleine mer et 5 m (sous la surface) les séries 1994-1997 Ouest-Loscolo et Men er Roué montrent de manière patente des **niveaux plus élevés en chlorophylle en Vilaine par rapport à la baie de Quiberon** et ce quelles que soient les années d'observation.

Nous remarquons également des teneurs en chlorophylle plus persistantes sur les saisons, notamment l'été en Vilaine.

Niveaux d'observations

Sur Men er Roué, à deux exceptions près au printemps 1994 et 1995 pendant des blooms de *Mesodinium rubrum* et de *Gymnodinium*, les valeurs observées de chlorophylle en **surface** (-5 m) et au **fond** (généralement -10 m), sont **voisines** et ne justifient pas le maintien de 2 niveaux d'observations.

7.2. Variations inter-annuelles et saisonnières

Inter-annuelle

Aussi bien sur Ouest-Loscolo que Men er Roué nous pouvons observer de fortes variations inter-annuelles. Les années 1994 et 1995 correspondent à des fortes valeurs de concentration en chlorophylle au printemps alors que 1996 et 1997 sont des années peu productives. Une relation simple peut être établie avec la pluviométrie des six premiers mois de l'année et/ou avec les débits des fleuves Loire et Vilaine pendant la même période.

Saisonnaire

Sur Men er Roué, à l'exception d'une valeur pendant l'été 1994, les concentrations en chlorophylle s'effondrent dès le début du mois de juillet. En Vilaine les blooms estivaux et "regains" automnaux sont fréquents.

7.3. Relations avec les données REMORA

Sur le point Men er Roué (huîtres creuses en eaux profondes) en baie de Quiberon les données annuelles de croissance recueillies par le laboratoire RA de la Trinité sur Mer sont intéressantes à croiser avec nos données chlorophylle.

Nous constatons sur la période 1992 à 1997 qu'il semble exister, en premier examen, **une relation entre bonnes années en chlorophylle (1994 et 1995) et une bonne croissance des huîtres creuses.**

Si une relation stable peut être établie il deviendrait alors possible de prévoir en baie de Quiberon l'importance de la croissance des huîtres creuses d'eaux profondes dès le début de l'été.

7.4. Conclusions

Ces premières analyses soulignent tout l'intérêt que peuvent présenter des séries historiques de données chlorophylle. De plus ce premier travail doit permettre de valider les travaux de modélisation en cours sur le Golfe de Gascogne (S. Loyer, A. Ménesguen, P. Lazure) et à terme de permettre la mise en place d'un modèle de production conchylicole pour la baie de Quiberon à partir des principales données de débits et de concentration en sels nutritifs des fleuves Loire et Vilaine des réseaux terrestres (RNDE...).

8. Localisation des zones littorales bretonnes contaminées par les kystes d'*Alexandrium minutum*.

Evelyne ERARD-LE DENN et Jacqueline LE GRAND

Parmi les microalgues qui constituent le phytoplancton nuisible, *Alexandrium minutum* est une des algues les plus redoutables puisqu'elle peut provoquer chez l'homme des effets neurotoxiques après consommation de coquillages. En effet, cette espèce, comme la plupart des dinoflagellés du genre *Alexandrium*, produit des toxines paralysantes, responsables du syndrome "P.S.P." ou "Paralytic Shellfish Poisoning".

Signalée initialement en 1988 dans le Finistère Nord, *Alexandrium minutum* sévit régulièrement le long des côtes de la Bretagne, notamment dans les abers et en baie de Morlaix. Observée à des concentrations importantes, parfois supérieures à 40 millions de cellules par litre, l'espèce s'étend peu à peu à d'autres zones littorales comme la rivière de la Rance. Capable de se développer très rapidement, cette algue possède en plus un **moyen de résister sous forme enkystée** à des conditions environnementales défavorables et de survivre par ce fait pendant des mois, voire des années, dans les sédiments marins (sédiments fins et vaseux ; aucun kyste n'a été observé dans des sédiments sablo-vaseux). Les kystes formés peuvent ensuite germer pour donner des cellules végétatives lorsque le milieu est favorable.

En résumé, les kystes d'*Alexandrium minutum* se comportent comme des particules inertes piégées dans la colonne sédimentaire en hiver pour redonner des formes mobiles au printemps et en été. L'algue toxique est donc présente principalement sous sa forme enkystée 9 mois sur 12.

Les campagnes de prélèvement effectuées en **1990 et 1996** montrent que le **nombre de zones sensibles passe**, en six ans, **de 2 à 7** (en ne comptant que les zones échantillonnées lors des deux campagnes). C'est dans les abers que l'on trouve la plus forte concentration en kystes par gramme de sédiment.

La quantification des kystes d'*Alexandrium minutum* peut se révéler un bon indicateur biologique de la prévision des événements toxiques et de l'extension géographique du phénomène. Cependant, les méthodes de recherche des kystes sont très longues à mettre en œuvre, et ne sont donc pas utilisables en surveillance de routine.

Bibliographie

Erard-Le Denn E. & Boulay V., 1995. Resting cysts of *Alexandrium minutum* in marine sediments : quantification by three methods. Harmful Marine Algal Blooms. Lassus, Arzul, Erard-Le Denn, Gentien & Marcaillou-Le Baut. Eds. Lavoisier, 725-730.

Question posée ?

Est-ce que le kyste d'*Alexandrium minutum* est un indicateur des risques estivaux ?

Dans ce cas est-ce que l'on va pouvoir l'utiliser à la prévision des efflorescences

→ kyste = outils ?

Rappel :

Le kyste qu'est ce que c'est ?

- Comment se forme t-il ?
- Comment l'observer ?

Comment se forme t-il ?

Se forme au cours du cycle biologique

- petit, fragile
- considéré comme une particule sédimentaire
- quelques mois sous forme enkystée

Taille :

- env. 20 - 25 μm
- forme ovoïde (vue latérale)
- forme ronde (vue apicale)
- membrane lisse décollée du contenu cellulaire
- cytoplasme granuleux
- point rouge

Comment l'observer ?

- par prélèvement sédimentaire
- par dénombrement

Prélèvements sédimentaires

1990

- Cap Fréhel → Baie de Vilaine

30 sites

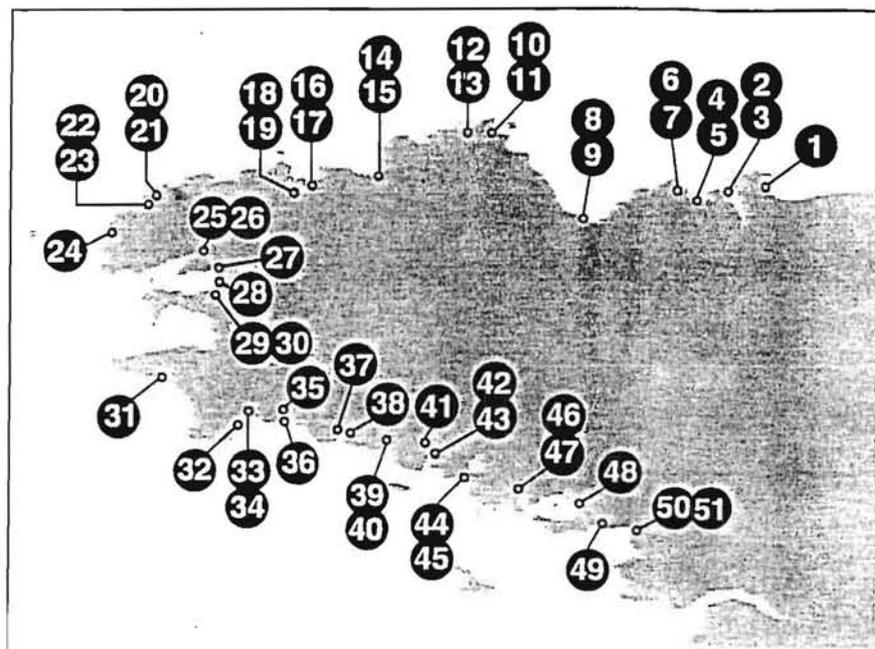
- Printemps
- Indépendamment de la nature du sédiment
- station aval ou amont
- 1 réplikat
- 30 stations
- prélèvement en surface
- 30 cm³
- 900 cm³ sédiment

1996

- Cancale → Baie de Vilaine

32 sites

- Automne
- Zone vaseuse
- station aval et amont
- 3 réplikats (1m²)
- 51 stations (153 sédiments)
- prélèvement sur prof 10 cm
- 300 cm³
- 45.900 cm³ sédiment



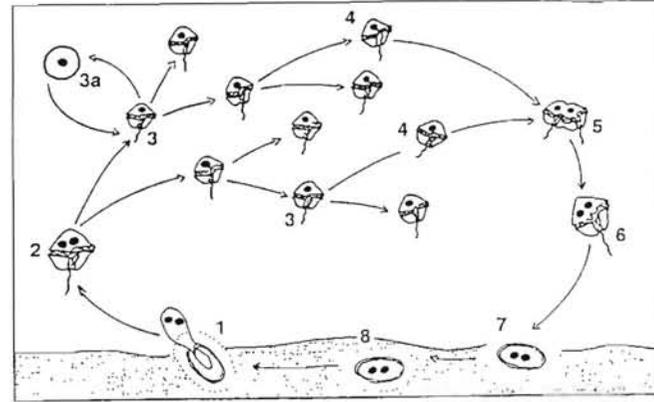
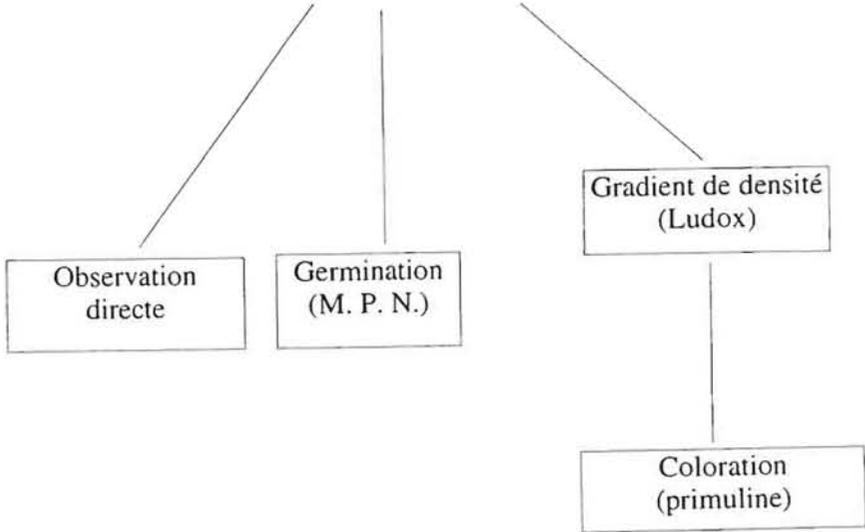
Localisation des prélèvements sédimentaires (32 sites étudiés - 51 stations)

Préparation des sédiments

Homogénéisation des réplicats

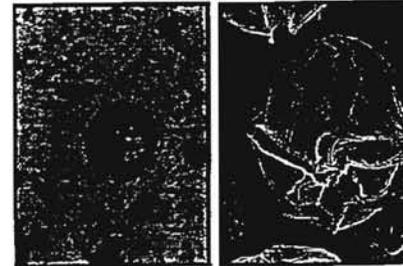
Séparation kyste-sédiment

Pesée - sonication - filtration - sonication



Cycle biologique d'*Alexandrium minutum*
 1) germination du kyste à la surface du sédiment. 2) planomeiocyte. 3) cellules végétatives en division. 4) gamètes. 5) fusion de gamètes. 6) planozygote. 7) kyste immature. 8) kyste mature dit de résistance

Alexandrium minutum



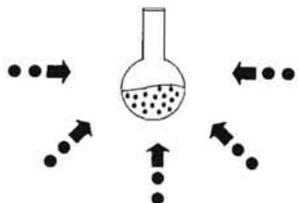
kyste de résistance

cellule végétative

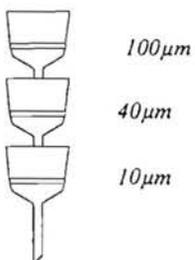
Séparation kystes-sédiment



Pesée de 3 fois 1g de sédiment



Sédiment + 50ml d'eau distillée
Ultra-sons 2 minutes



filtration par pompage



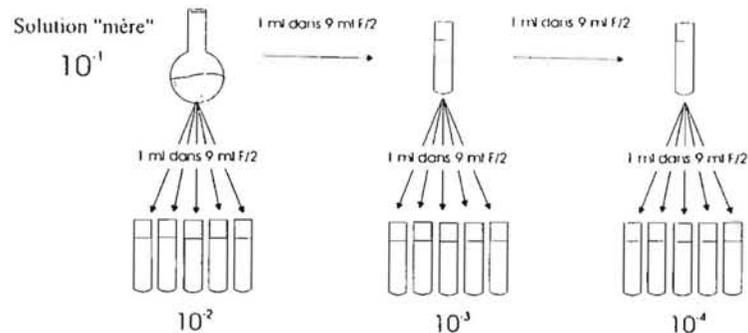
5 ml d'eau distillée
+ soie de 10 µm

Ultra-sons
2 minutes



Fraction fine
du sédiment

ESTIMATION DU NOMBRE DE KYSTES PAR LA METHODE DU NPP



INCUBATION : 5 jours , T° : 22°C , I = 60Ems , Photopériode : 18L:6D

Séparation kystes-sédiment par méthode du LUDOX



fraction fine + 5ml d'eau distillée
ludox 50% 5ml
ludox 100% 5ml



centrifugation 30 mn / 3000 tr/7°C



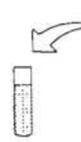
récupération des phases au dessus du culot
par filtration (par pompage) sur soie de 10µm
rinçage abondant à l'eau distillée



Ultra-sons
2 minutes
•••➔



Fixation des kystes en vue de la coloration (méthode de Yamaguchi (1995) modifiée)



5ml de glutaraldéhyde 1%



5ml de suspension contenant les kystes
(fraction 10µm)

attendre 30 mn



filtration par pompage sur soie de 10µm



Ultra-sons
2 minutes
•••➔



10ml de MeOH
+ soie de 10µm



mettre 2 jours
au réfrigérateur

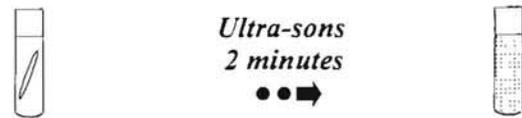
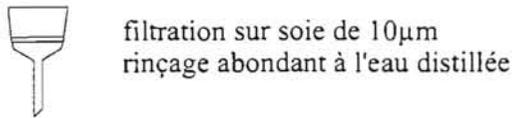
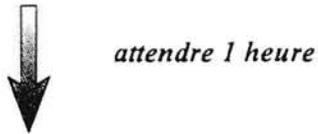
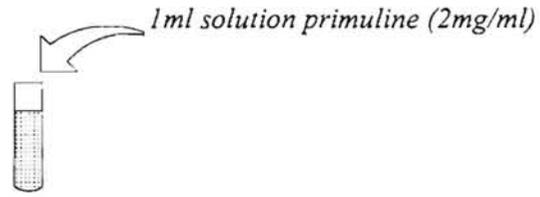


filtration
sur soie de 10µm



10ml d'eau distillée
+ soie de 10µm

**Coloration des kystes par la primuline
(méthode de Yamaguchi (1995) modifiée)**



5ml d'eau distillée
+ soie de 10µm

observation en fluorescence
(lumière bleue : 420-490 nm)



1990

Germination



2 zones sensibles

- Morlaix
- Lannion

1996

Germination



8 zones sensibles

- La Rance
- Le Trieux
- Le Jaudy
- Lannion
- Morlaix
- Penzé
- Aber Wrac'h
- Aber Benoît

kystes *Alexandrium*

Liste des stations du littoral breton "contaminées" par le kyste d'*Alexandrium minutum*

N°	Site		Présence
1	CANCALE : La Houle		-
2	RANCE : St-Jouan des G., le Vallion	Aval	+
3	RANCE : Ville de ger	Amont	-
4	ARGUENON : St-Jacut	Aval	-
5	ARGUENON : Ntre-Dame du Guido	Amont	-
6	FRESNAYE : Port Nieux	Aval	-
7	FRESNAYE : Port à la duc	Amont	-
8	ST-BRIEUC : Sous la tour	Aval	-
9	ST-BRIEUC : Iffiniac, Bout de ville	Amont	-
10	TRIEUX : Coz Castel	Aval	+
11	TRIEUX : La Roche Jagu	Amont	+
12	JAUDY : La Roche Jaune	Aval	-
13	JAUDY : Treguier, DDE	Amont	+
14	LANNION : Yaudet	Aval	+
15	LANNION : Lannion, Loguivy	Amont	+
16	MORLAIX : Dourduff	Aval	+
17	MORLAIX : Couvent	Amont	+
18	PENZE : Pont de la corde	Aval	+
19	PENZE : Penzé	Amont	-
20	ABER WRACH : Paluden	Aval	+
21	ABER WRACH : Pont Crac'h (pont du diable)	Amont	+
22	ABER BENOIT : Tréglonou	Aval	+
23	ABER BENOIT : Tariec	Amont	+
24	ABER ILDUT : Aber Ildut		-
25	ELORN : Guern	Aval	-
26	ELORN : Verman	Amont	-
27	DAOULAS : Daoulas, rive gauche		-
28	LE FAOU : Cale		-
29	AULNE : Tregarvan	Aval	-
30	AULNE : Moulin de Rozarnou	Amont	-
31	PONT CROIX : Centre équestre		-
32	ILE CHEVALIER : à gauche du pont		-
33	OJET : Porz guen	Aval	-
34	OJET : Pont de Poulguinan	Amont	-
35	La FORET FOUESNANT : La cale		-
36	CONCARNEAU : port ville close (côté plaisance)		-
37	AVEN : port du Rosbraz		-
38	BELON : Lanneguy		-
39	LAITA : St-Maurice	Aval	-
40	LAITA : Rocher royal	Amont	-
41	SCORFF : Pont-Scorff, Kerdayo		-
42	BLAVET : Sterbouest	Aval	-
43	BLAVET : Hennebont, Ty mor	Amont	-
44	RIV. ETEL : St-Cado	Aval	-
45	RIV. ETEL : Nostang, St Ernan	Amont	-
46	RIV.AURAY : Larmor-baden, emb.gavrinis	Aval	-
47	RIV.AURAY : Kerplouz	Amont	-
48	GOLFE MORBIHAN : Le Hezo		-
49	RIV.PENERF : Port-Croix		-
50	VILAINE : bar.d'Arzal, cale la vieille roche	Aval	-
51	VILAINE : Bourgerel, Pte du moustoir	Amont	-

Méthode par Germination

Intérêt

- nécessite pas de matériel spécifique
- « rapide » si positif
- indicateur du risque (kyste viable)

Inconvénients

- dépendante de la période de prélèvement
- dépendante des conditions de culture
 - * interaction entre espèces → sélectivité
 - * influence des fortes dilutions (Concentration minimale en kyste)



Méthode semi-quantitative intéressante

Résumé

Kyste = indicateur

⇓ SI

Stratégie d'échantillonnage des sédiments

- zone de prélèvements (amont - aval)
- période de prélèvement (dormance du kyste)
- nature sédimentaire (vase/teneur en eau)
- surface sédimentaire
- colonne sédimentaire

9. Méthodes de détection des toxines DSP : spécificité, seuil de risque.

Catherine BELIN

Exposé des faits

La méthode utilisée dans le cadre du REPHY pour la détection, dans les coquillages, de toxines diarrhéiques (DSP), produites par des espèces phytoplanctoniques du genre *Dinophysis*, est un test-souris adapté d'une méthode japonaise.

Les adaptations, décrites par MARCAILLOU-LE BAUT en **1985**, avaient conduit à une **modification de la définition du seuil de décision, ramené à 5 heures** en terme de temps de survie des souris, au lieu de 24 heures dans la méthode initiale. Ainsi, depuis cette date, une interdiction de commercialisation et de ramassage des coquillages est prononcée quand le résultat des tests (moyenne des temps de survie de trois souris) est inférieur ou égal à 5 heures. Si le résultat est compris entre 5 et 24 heures, les coquillages sont considérés comme non dangereux pour le consommateur, et laissés à la vente.

Ce seuil de décision avait été jugé acceptable en terme de protection de la santé humaine, compte tenu des données disponibles à l'époque. En effet, une concentration **de 2 µg d'acide okadaïque (AO)³ par gramme de glande digestive (GD)** était un seuil couramment admis il y a quelques années dans la communauté internationale. Or, une estimation, effectuée lors d'une étude expérimentale au laboratoire PN⁴, avait conclu que, pour un résultat compris entre 5 heures et 24 heures, les coquillages pouvaient contenir jusqu'à **1.6 µg d'AO par gramme de GD**.

Jusqu'en 1992

L'extraction des toxines pour le test-souris DSP a été systématiquement réalisée selon la méthode initiale japonaise (extraction à l'acétone), en raison de sa simplicité et de sa rapidité.

³ L'acide okadaïque (AO) est le principal composé des toxines DSP présentes dans les coquillages du littoral français

⁴ Laboratoire Phycotoxines et Nuisances

De 1992 à 1994

La mise en évidence, pendant cette période, de toxines " atypiques " dans les coquillages de certaines régions, a eu pour conséquence une modification importante de la méthode d'extraction : en effet, l'acétone s'est avéré être un solvant de nombreuses toxines, interférant avec les toxines à activité strictement diarrhéique. **Le test-souris dit " DSP " s'est donc révélé être un test de toxicité globale et non spécifique.**

En l'absence d'instructions concernant la conduite à tenir en cas de détection de toxines atypiques dans les coquillages⁵, **une extraction plus sélective (méthanol / hexane / dichlorométhane) a été proposée en 1995, afin que le test désormais utilisé pour REPHY soit spécifique des toxines diarrhéiques⁶.** Cette modification de la méthode a conduit à une marge de sécurité plus grande, en terme de protection de la santé humaine : la nouvelle extraction permet en effet une meilleure purification de l'AO, ce qui se traduit par des temps de survie plus courts que ceux obtenus avec des extraits acétoniques. La concentration résiduelle d'AO qui peut être présente dans les coquillages, lorsque le résultat du test est compris entre 5 et 24 heures, n'a cependant pas été quantifiée.

Entre 1992 et 1996

De nombreux pays ont modifié leur seuil de risque relatif aux toxines DSP. Les raisons en sont multiples, parmi elles :

- la suspicion existant sur l'acide okadaïque, comme facteur de promotion tumorale lors d'expositions chroniques à de faibles doses,
- la présence potentielle de toxines DSP, autres que les Dinophysistoxines (AO et dérivés) : il existe en effet deux autres familles de toxines, dont les effets hépatotoxiques (pour les Pectenotoxines) et cardiotoxiques (pour les Yessotoxines) ont été mis en évidence.
- la mise en évidence d'un puissant pouvoir mutagène de l'AO.

Le seuil de risque de 5 heures, toujours en vigueur en France, est ainsi devenu le moins strict de l'ensemble des pays européens (à titre d'exemple, le seuil de risque défini en Hollande pour le test-rat, est équivalent à une concentration en AO comprise entre 0.2 et 0.4 µg par g. de GD).

⁵ cf. impact des recommandations du CSTS, gestion des épisodes toxiques dits « atypiques », in Bilan d'activité du CSTS 1993-1996

⁶ BELIN C., MARCAILLOU-LE BAUT C., AMZIL Z. & LEDOUX M., 1996. - REPHY (Réseau de Surveillance du Phytoplancton et des Phycotoxines). Méthodes de détection des phycotoxines diarrhéiques (DSP) et paralysantes (PSP). Méthodes biologiques sur souris. - Rapport interne IFREMER / DEL / 96.17 / Nantes : 28p.

En 1996

Une réunion des **Laboratoires Nationaux de Référence (LNR) de l'Union Européenne** pour les phycotoxines, a fait, en mars 1996 à Vigo (Espagne), le point sur les méthodes et les critères de toxicité utilisés par chaque pays. Parmi les nombreuses recommandations de ce groupe de travail, trois étaient particulièrement critiques pour le sujet qui nous occupe :

- étant donné l'augmentation de la fréquence d'apparition de toxines d'origine inconnue, il est **fortement recommandé d'utiliser un test de toxicité globale**, à large spectre, couvrant l'ensemble des toxines connues et inconnues. Il s'agit en fait du test-souris décrit par les Japonais en 1978, qui est *de facto* le test de référence en cas de litige entre pays (il n'existe cependant, aucune donnée sur l'éventuelle toxicité pour l'homme des toxines atypiques),
- le test ne devrait plus être effectué sur la seule glande digestive, mais sur la chair entière des coquillages,
- un " seuil de travail provisoire ", pour la définition du seuil de risque DSP a été fixé à 80-160 µg d'équivalent AO par kg de chair, c'est à dire **0.8 µg d'AO par g. de GD** (la glande digestive représentant entre 10 et 20% de la chair totale).

Conclusions

REPHY a réorienté sa stratégie en faisant le choix d'une méthode spécifique des toxines diarrhéiques, à la suite des épisodes de toxines atypiques. Ceci étant, **la France se trouve en contradiction avec les orientations européennes, qui recommandent le maintien d'un test à large spectre.**

La France est en outre considérée comme laxiste, vis-à-vis de la gestion des épisodes DSP, puisque le seuil retenu il y a dix ans n'a pas évolué : des coquillages partent ainsi à la consommation avec une concentration en toxines qui peut être largement supérieure à celle définie par les LNR. Ceci n'est pas sans poser de problèmes vis-à-vis des exportations de coquillages. Or, si REPHY n'est pas directement concerné par le problème des coquillages d'exportation, il est nécessaire que les deux organismes concernés par les phycotoxines en France, c'est-à-dire l'IFREMER et le CNEVA (qui est le représentant français des LNR), adoptent une position unique.

Enfin, le problème de la **concentration en toxines DSP dans les coquillages, lorsque ceux-ci ne sont pas encore interdits à la vente** (résultats des tests compris entre 5 et 24 heures) ne peut être négligé, eu égard à la potentialité carcinogène des Dinophysistoxines et à la toxicité d'éventuelles autres toxines DSP.

Questions adressées au CSTS en juin 1998

Détection des seules toxines DSP ou mise en évidence d'une toxicité globale ?

- **Si l'on s'en tient à l'extraction préconisée** (MHD⁷), ce qui se justifie d'un point de vue stratégique (on cherche dans un réseau de surveillance à obtenir le maximum de précision sur le résultat attendu) :
 - **la signification du test utilisé doit être largement expliquée** : en effet, des laboratoires extérieurs à IFREMER peuvent réaliser des tests souris avec extraction acétone, donnant parfois des résultats qui semblent contradictoires avec ceux obtenus par REPHY⁸
 - Est il possible d'envisager un **aménagement de la méthode** ? par exemple :
 - ✓ extraction acétone en début de phénomène, pour gagner du temps (**l'extraction MHD est beaucoup plus longue** – deux à trois fois plus – que l'extraction acétone),
 - ✓ puis extraction MHD, dès que la toxicité DSP est avérée.

La question est posée par plusieurs laboratoires côtiers. Le problème reste de la comparabilité des résultats entre eux (voir ci dessous)

- **Si l'on revenait à un test de toxicité globale** :
 - Comment devrait on aborder la gestion du problème des toxines atypiques, qui ne manquerait pas de réapparaître?
 - Les résultats DSP *stricto sensu* obtenus avec une extraction acétone, sont minimisés par rapport à ceux obtenus avec une extraction MHD, d'où un problème de comparabilité.

Seuil de décision

Le seuil de décision a été défini par Ifremer, et n'a, pour le moment, jamais été contesté par l'administration en charge des décisions relatives à la vente et au ramassage des coquillages. Au vu des éléments rappelés ci dessus, Ifremer doit il proposer une révision du seuil, en anticipant sur une éventuelle demande de l'administration française, ou européenne?

⁷ méthanol / hexane / dichlorométhane

⁸ assertion confirmée lors des épisodes PSP à Thau en décembre 1998 (ce texte a été envoyé au CSTS en 1996 puis mi-1998)

Une analyse des données existantes dans la base de données QUADRIGE depuis 1987, a été effectuée pour évaluer les conséquences qu'un changement du seuil de décision (par exemple de 5 à 24 heures) pourrait avoir sur les durées d'interdiction de commercialisation des coquillages (voir graphiques et tableaux suivants).

Ces questions ont été adressées au CSTS en juin 1998, et les recommandations émises par ce comité sont inscrites au compte rendu de la réunion des 22 et 23 juin à l'Houmeau. En résumé, le comité recommande :

- de conserver le test spécifique (MHD),
- de se préparer aux conséquences d'une éventuelle directive européenne,
- de continuer la recherche sur les toxines « atypiques ».

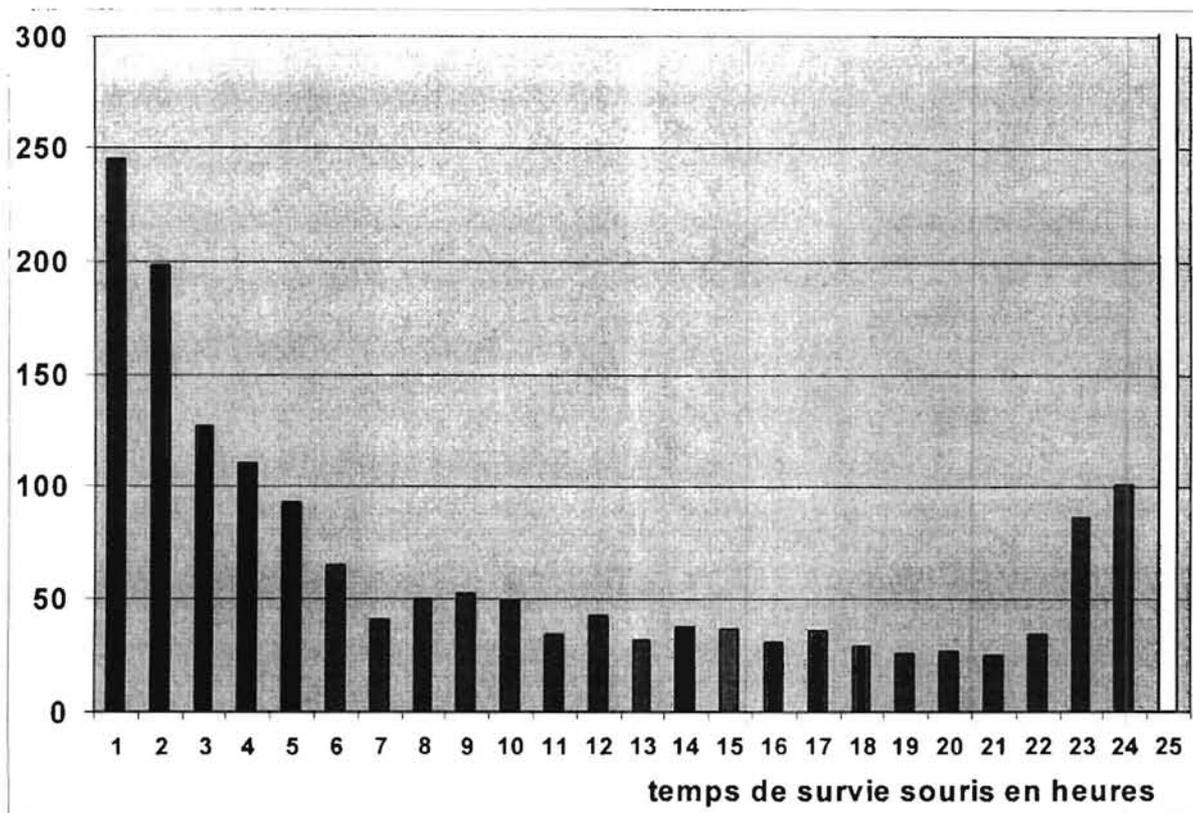
Lors des épisodes PSP à Thau en décembre 1998, compte tenu des résultats contradictoires obtenus par Ifremer et les Services Vétérinaires à cause des choix différents de méthodes, il a été décidé qu'un protocole expérimental serait mis en place en 1999, pour comparer les résultats obtenus par la méthode spécifique utilisée par Ifremer et la méthode globale (acétone) utilisée par les SV. **Cette étude fera l'objet d'un protocole écrit, après accord entre le CNEVA et Ifremer. En attendant ce protocole écrit, la méthode utilisée dans REPHY reste exclusivement la méthode spécifique.**

Le **graphique 1** montre la répartition des résultats des tests-souris DSP, stockés dans QUADRIGE de 1987 à 1995.

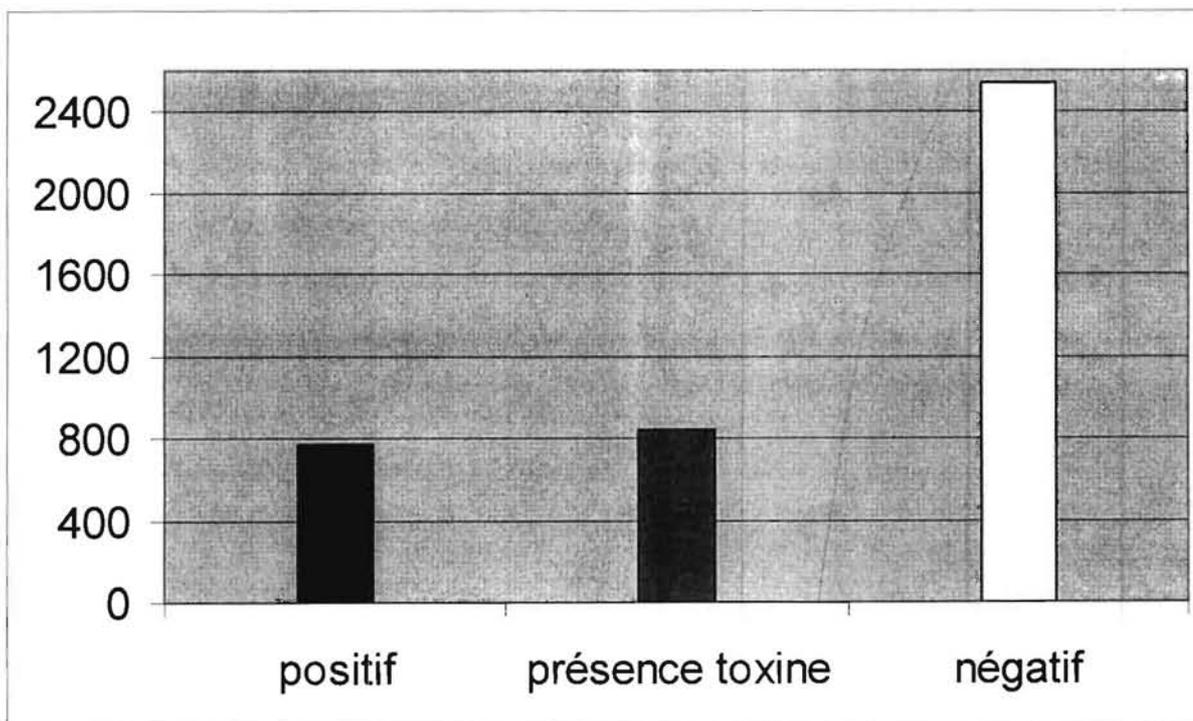
Le **graphique 2** synthétise les résultats du premier graphique en regroupant les résultats selon la catégorisation utilisée pour les interdictions de vente des coquillages :

- **positif** : toxines présentes en quantité dangereuse, interdiction prononcée
- **présence toxines** : en quantité dite « non dangereuse », pas d'interdiction
- **négatif** : toxines non détectées

Il en ressort que le nombre de résultats intermédiaires est extrêmement important eu égard aux risques potentiels liés à la présence de faibles quantités de toxines DSP dans les coquillages.



Graphique 1 : répartition détaillée du nombre de résultats tests-souris (1987-1995)



Graphique 2 : répartition du nombre de résultats tests-souris (1987-1995)

Le **tableau 1** qui détaille la répartition des trois groupes de résultats (positif, présence toxines, négatif) en nombre de semaines par bassin, montre clairement qu'un changement du seuil de décision de 5 à 24 **heures augmenterait de façon non négligeable les durées de fermeture**. Le nombre de semaines supplémentaires de fermeture ne peut toutefois être directement déduit de ce tableau, dans la mesure où la fermeture réelle englobe non seulement les semaines avec tests positifs, mais aussi parfois les semaines avec présence de toxines : c'est le cas, par exemple, des deux dernières semaines de fermeture pendant lesquelles les coquillages restent interdits, selon la règle des deux tests non positifs successifs à une semaine d'intervalle.

Le **tableau 2** donne un **exemple réel** de l'augmentation de la durée de fermeture sur trois zones (le commentaire « au moins » indique que des réouvertures ont été effectuées pendant des périodes avec « présence de toxines en faible quantité », et que la durée réelle de décontamination complète n'est pas connue).

		positif	présence toxines	négatif			positif	présence toxines	négatif
007	Le Tréport - Dieppe	1		7	054	Golfe du Morbihan	2	6	10
009	Fécamp - Etrétat	16	7	31	055	Plateau de la Recherche	9	12	9
010	Antifer	33	14	24	056	Rivière de Penerf	1	15	14
011	Estuaire de la Seine	10	11	17	057	Baie de Vilaine	20	69	91
012	Baie de l'Orne	1	2	17	059	Traicts du Croisic	7	10	54
013	Courseulles - Port Bessin	5	3	52	060	Estuaire de la Loire	3	4	28
014	Baie des Veys	1	2	5	061	Baie de Bourgneuf		1	5
015	Ravenoville - Saint Vaast	2	3	64	062	Vendée Nord	15	5	30
020	Pirou - Agon			6	063	Olonne	7	1	12
021	Hauteville - Granville			5	064	Les Sables - Le Payre	1		4
022	Iles Chausey			1	065	Pertuis Breton	8		83
023	Baie du Mont Saint Michel			3	066	Baie de l'Aiguillon		2	24
027	Baie de Saint Briec			9	068	Chatelaillon - Ile d'Aix	3	5	39
032	Lannion - Locquirec			2	069	Estuaire de la Charente		1	8
033	Baie de Morlaix			4	070	Nord Marennes Oléron	5	2	55
035	Les Abers	5	9	3	071	Sud Marennes Oléron			19
036	Iroise	23	49	18	072	Seudre			24
037	Elorn	5	2	13	076	Côte Océane	1		2
038	Aulne	7	7	14	077	Bassin d'Arcachon	13	5	58
039	Baie de Douarnenez	68	70	30	078	Côte Landaise	1		1
040	Baie d'Audierne	7	11	7	079	Côte Basque	3	1	3
041	Iles de Glénan	1	10	44	080	Côte Catalane	16	3	4
042	Bénodet		2	10	081	Côte Audoise	29		17
043	Concarneau	31	41	98	083	Etang de Salses-Leucate	43	19	58
044	Aven, Belon et Laïta	6	26	66	085	Etang de Bages et Sigean	2	2	1
045	Rade de Lorient	18	63	68	087	Etang de Thau		2	25
047	Rivière d'Étel	7	13	20	088	Côte Languedocienne	34	9	39
048	Courreaux de Belle Ile	8	11	21	089	Etangs Palavasiens	8	1	7
049	Baie de Quiberon	23	22	37	093	Côte Camarguaise	17	4	20
050	Le Pô		1	5	094	Golfe de Fos	21	12	56
051	Rivière de Crach		2	7	100	Rade de Toulon	31	1	34
052	St Philibert-Le Breneguy	2	6	9	105	Golfe de Saint Tropez		3	1
053	Rivière d'Auray	4	1	5	114	Etangs de Diana - Urbino	37	15	37

Tableau 1 : répartition des résultats des tests souris DSP en nombre de semaines par bassin (1987-1995)

année	durée réelle de fermeture en semaines	durée totale si seuil = 24 H	durée réelle de fermeture en semaines	durée totale si seuil = 24 H	durée réelle de fermeture en semaines	durée totale si seuil = 24 H
	039 Baie de Douarnenez		043 Baie de Concarneau		114 Etangs de Diana Urbino	
1987	17	24	2	10	0	0
1988	6	14	2	12	2	2
1989	9	20	0	10	0	0
1990	6	15 au moins	5	7	4	11 au moins
1991	12	15	0	8	0	5 au moins
1992	4	6	7	10 au moins	13	18 au moins
1993	17	23 au moins	12	14	14	16 au moins
1994	10	13 au moins	7	14	4	10
1995	5	5	9	11	15	18

Tableau 2 : conséquences d'un changement du seuil test souris DSP 5 heures → 24 heures (exemples)

10. Avancement de l'étude pilote DRAME (Détermination Rapide de l'Acide Okadaïque dans les Moules après Extraction).

Dominique LE GAL et Claire LE BAUT

Il s'agit d'une méthode alternative au test biologique sur souris pour le dépistage des toxines DSP. Dans le cadre du réseau REPHY, un travail de collaboration a été mené entre plusieurs intervenants sur le programme « DRAME ». Cette technique déjà utilisée au SMAB à la Faculté de pharmacie de Nantes et à Ifremer / DEL / Concarneau, a fait l'objet de modifications d'ordre technique et d'un premier essai d'inter-comparaison portant sur quatre opérateurs.

Soixante quatre échantillons de bivalves d'espèces différentes (moules, coques, palourdes roses, tellines, amandes de mer) ont fait l'objet d'une extraction (DEL/CC) et de tests souris (méthode dichlorométhane) . Des fractions aliquotes de ces extractions ont été adressées à DEL / PN / Nantes pour analyses par chromatographie (CLHP), ainsi qu'aux quatre opérateurs retenus pour cet essai d'inter-comparaison. Deux opérateurs récemment initiés aux techniques d'entretien des cultures cellulaires n'avaient jamais pratiqué ce type de test de cytotoxicité.

Le but de cette manipulation était de mettre en évidence, dans un premier temps, les fluctuations de réponse et d'en tirer les premières recommandations techniques.

Il ressort que d'un point de vue lecture stricte la cohérence des réponses fluctue de 92 à 73 % selon que les opérateurs sont plus ou moins entraînés à cette nouvelle technique sur culture cellulaire. Ce travail doit se poursuivre sur d'autres échantillons après avoir recalé le principe de lecture.

DRAME

Détermination Rapide de l'Acide okadaïque dans les Moules après Extraction

URM 11

Collaboration IFREMER DEL PN - SMAB FAC Pharmacie NANTES



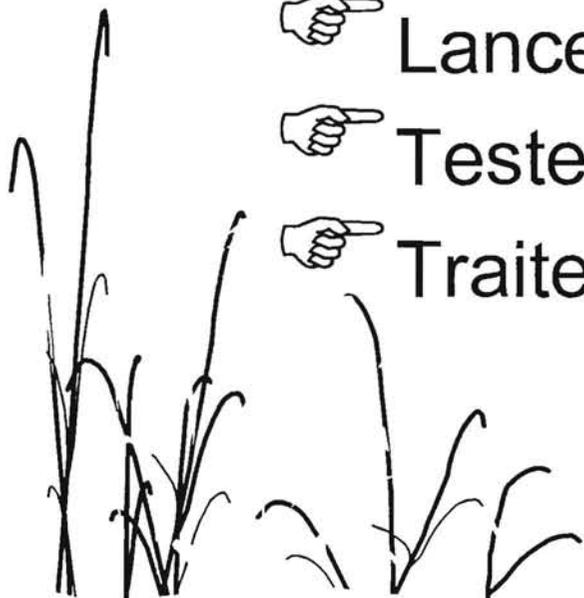
Objectifs 1997
Travaux réalisés
Résultats
Conclusions
Perspectives



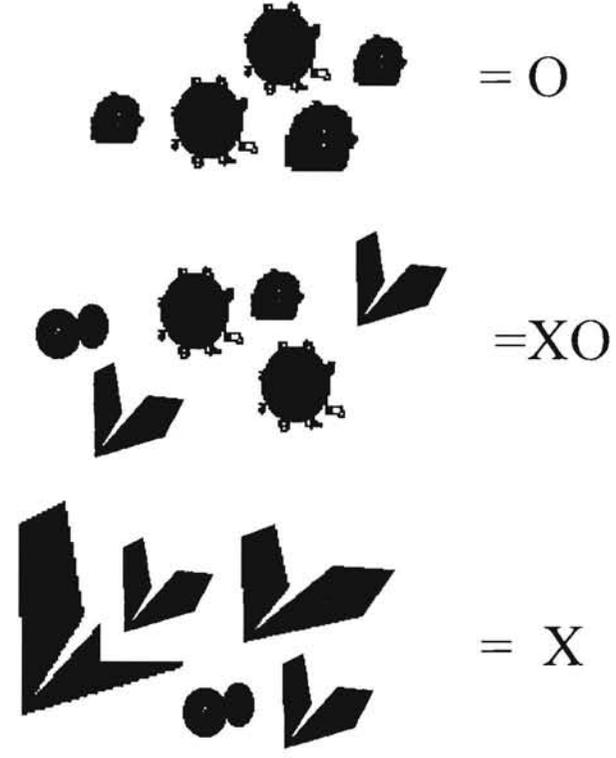
Domgal/Mars98/Drame.ppt

OBJECTIFS 1997

-  Relancer le programme
-  Lancer les cultures sur Nantes
-  Tester les opérateurs
-  Traiter les premiers résultats



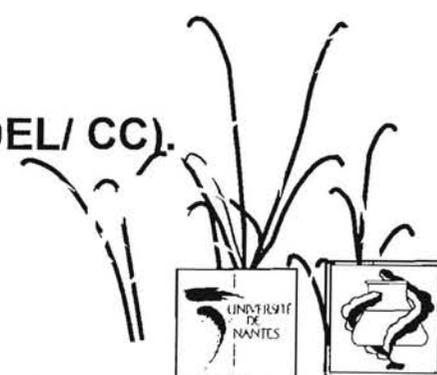
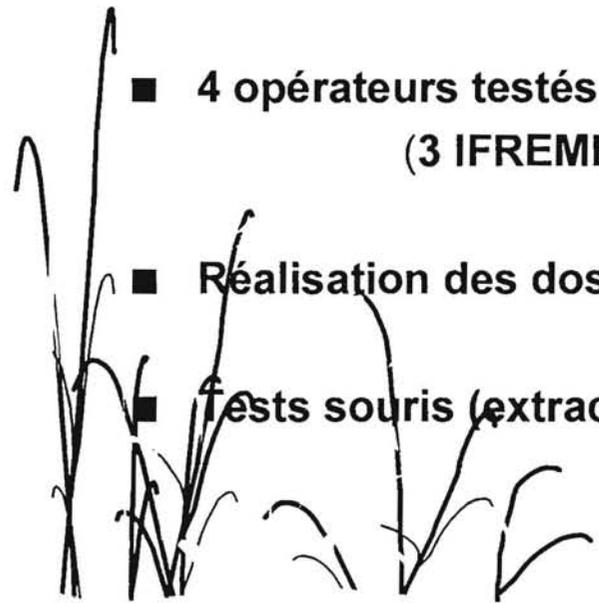
N	T	1	1	2	2	T	3	3	T	4	4	T
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
B	X	O	O	O	O	X	O	O	X	O	O	X
C	X	O	O	O	O	X	O	O	X	O	O	X
D	X	O	O	O	O	X	XO	XO	X	O	O	X
E	X	XO	XO	X	X	X	XO	XO	X	O	O	X
F	X	X	X	X	X	X	X	X	X	O	O	X
G	X	X	X	X	X	X	X	X	X	O	O	X
H	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X



La comparaison avec les témoins et la bonne connaissance des différents états des KB sont essentielles à la bonne interprétation

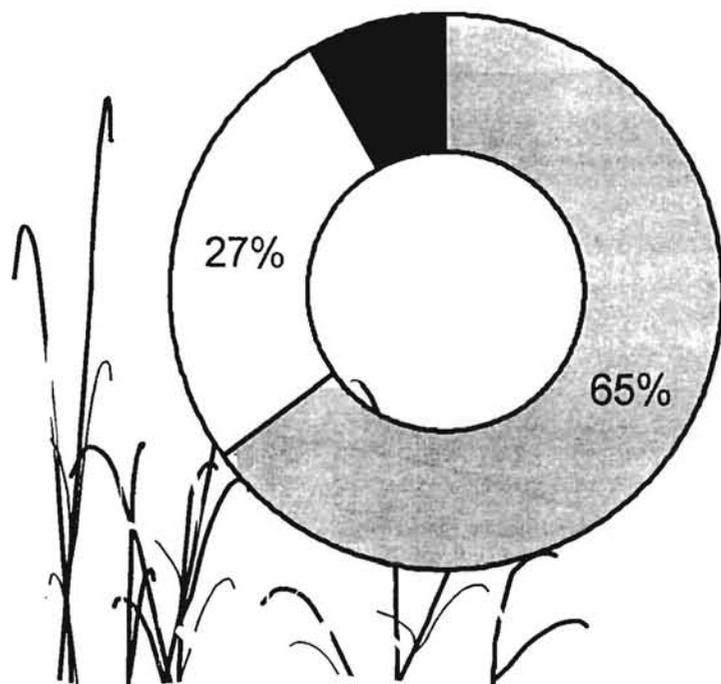
TRAVAUX REALISES

- 64 échantillons + ou - Toxiques (Del CC)
- 5 espèces testées (Moules, Tellines, Coques, Amandes, Palourdes roses)
- 4 opérateurs testés en aveugle
(3 IFREMER + 1 Fac de pharmacie NANTES)
- Réalisation des dosages CLHP.(DEL/PN)
- Tests souris (extraction MEOH/HEXANE/DICHLORO) (DEL/ CC).



Manipulateurs "expérimentés"

B O N	4 2	6 5 %
A c c e p t a b l e	1 7	2 7 %



Domgal/Mars98/Drame.ppt



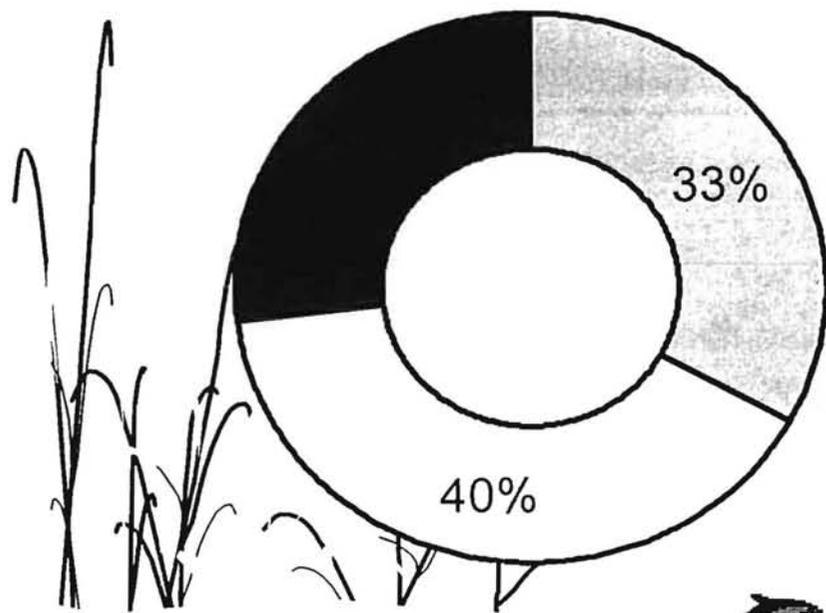
Cohérence = 92%

- ➔ Expérience
- ➔ Qualité des Plaques
- ➔ Bonne connaissance des KB



Manipulateurs "novices"

B O N	2 1	3 3 %
A c c e p t a b l e	2 6	4 0 %



Cohérence = 73%

- ➔doute à la lecture
- ➔difficulté d'appréciation
- ➔qualité des plaques
- ☺ne pas se décourager

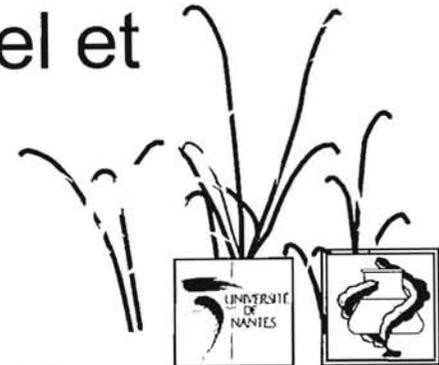


Conclusions

- ➔ entretien des cultures maîtrisé
- ➔ test direct = facilité d'exécution
- ➔ cohérence avec test souris (Sauf pour les amandes).
- ➔ absence de faux négatifs
- ➔ veiller à la qualité du matériel et des milieux utilisés.



Domgal/Mars98/Drame.ppt



Perspectives

- Confirmation des résultats par un deuxième examen sur certains échantillons. (stabilité-répétitivité).
- Effectuer une deuxième manip. sur autres échantillons des côtes françaises.
- Prévoir la collecte des échantillons pour 1998.
- Réduire les sources de variabilité.



Domgal/Mars98/Drame.ppt



Drame, dramons, dramez.....



Nous pas aimer
seringues!!!!

11. Cinétiques de production intracellulaire des toxines diarrhéiques par *Prorocentrum lima* : mise en évidence d'un nouvel isomère de la dinophysistoxine 1 (DTX1)

Véronique SÉCHET, Grégory ROCHER & Michael QUILLIAM

Les recherches sur la toxinogénèse de *Prorocentrum lima* se sont heurtées aux limites de détection des méthodes analytiques disponibles. La conséquence majeure a été la caractérisation incomplète des analogues de ces toxines DSP ; en effet les analyses en chromatographie liquide avec détection fluorimétrique limite la détection des toxines DSP aux formes possédant un groupe carboxyle libre. Le développement de la spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide a permis d'identifier que les produits de biosynthèse cellulaire étaient des composés sulfatés solubles dans l'eau (les formes de type DTX4 et DTX5) (HU *et al.*, 1995), (**fig. 1**).

Dans cette étude un suivi de la toxinogénèse par spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide a été réalisé sur trois différentes souches de *Prorocentrum lima* (l'une provenant de la côte de l'Atlantique Nord : Vigo, Espagne, et les deux autres de mers tropicales : Saint Barthélemy et Nouvelle Calédonie). Chaque isolat fut cultivé en présence et en l'absence de la microflore bactérienne associée. Deux méthodes d'extraction furent réalisées (Quilliam *et al.*, 1996) : la première, par chauffage, a permis de détruire les enzymes avant l'extraction (et donc de préserver les DTX4) la seconde, par congélation/ décongélation, favorisa au contraire l'hydrolyse des composés sulfatés en AO et en DTX1.

Les analyses LC/MS en mode négatif des échantillons traités par la chaleur ont montré que pour deux des souches la majorité de la toxine était présente sous formes conjuguées de la famille des DTX4. Les analyses en LC/MS réalisées en mode positif ont permis la quantification de l'acide okadaïque de la DTX1 et d'un nouvel isomère de la DTX1 dans les cellules de *P. lima* originaires de Saint-Barthélemy (**fig. 2, 3, 4**). Le traitement aux antibiotiques des trois souches de *P. lima* n'a pas eu de conséquences sur le profil toxinique mais a par contre augmenté le taux de production intracellulaire.

Les connaissances des formes de production intracellulaire (DTX4 : forme qui protège de l'autotoxicité) et des mécanismes de conversion en esters (formes préférentielles de passage membranaire) puis en acide okadaïque et en DTX1 ou DTX2 (formes toxiques) sont nécessaires à la compréhension du mode d'action allélopathique (**fig. 5**) de ces toxines DSP et à l'analyse du mode d'action de ces composés le long de la chaîne alimentaire (plancton - coquillages - consommateurs).

Bibliographie

T. Hu, J. M. Curtis, J. A. Walter and J. L. C. Wright, in: J. Chem. Soc., Chem. Commun., 597-599 (1995).

M. A. Quilliam, W. R. Hardstaff, N. Ishida, J. L. McLachlan, A. Reeves, N. W. Ross and A. J. Windust, in: Harmful and Toxic Algal Blooms, T. Yasumoto, Y. Oshima and Y. Fukuyo, eds. (IOC- UNESCO, Paris), pp. 289-292 (1996).

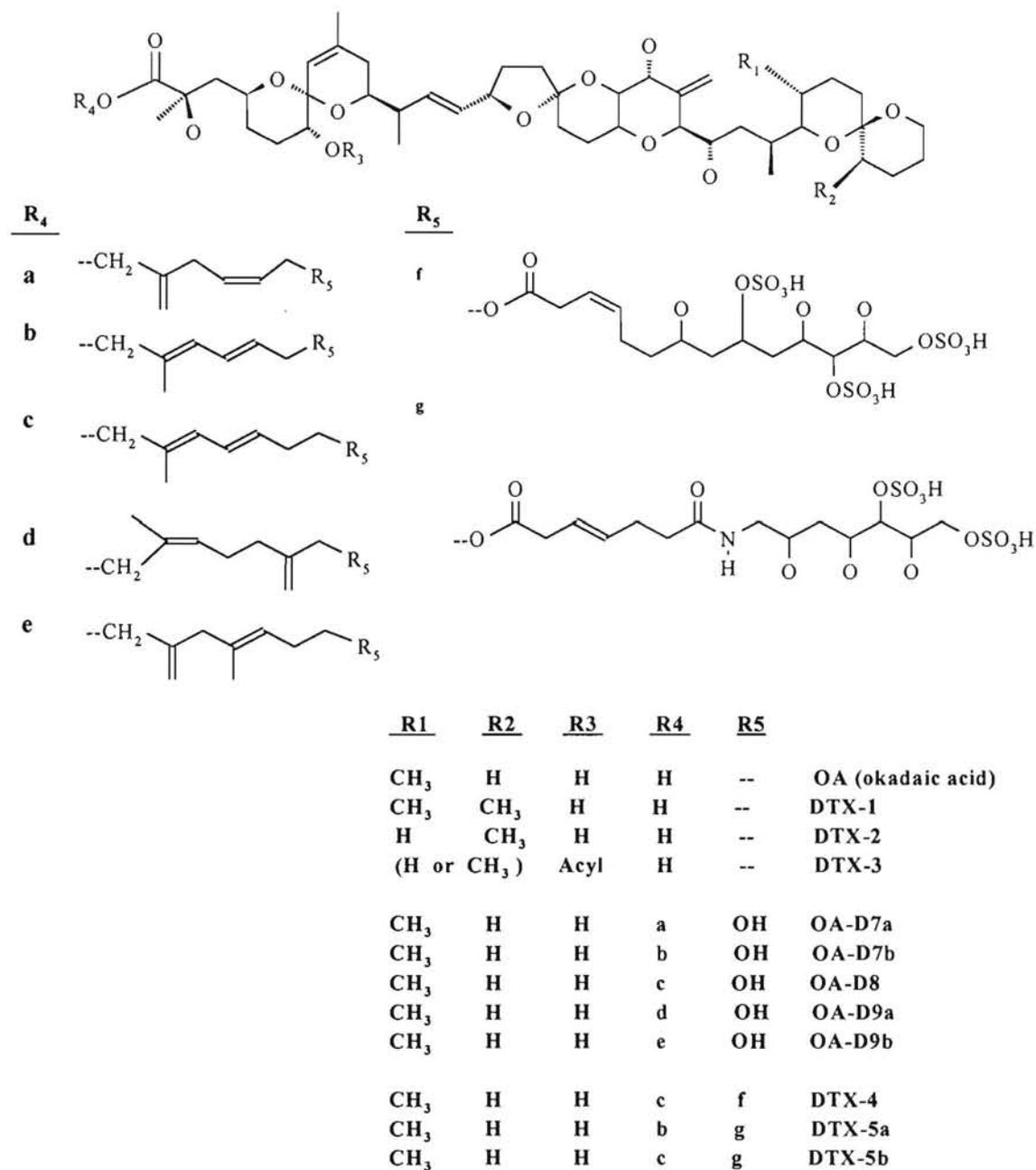


Figure 1 : Structure des principales toxines diarrhéiques (DSP)

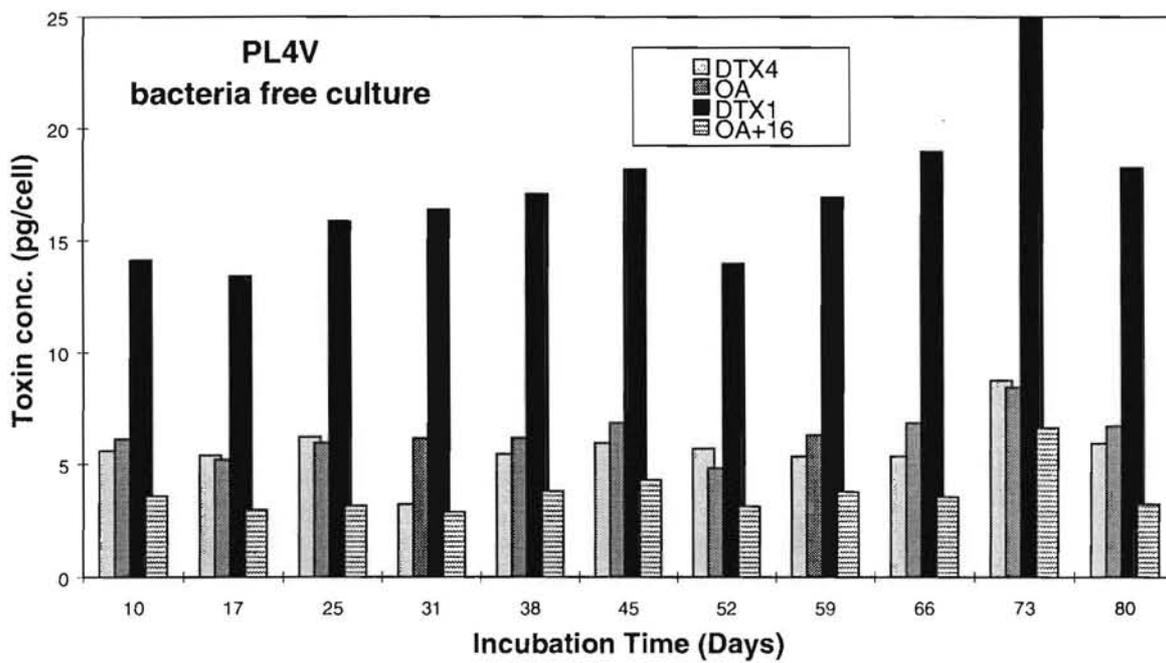
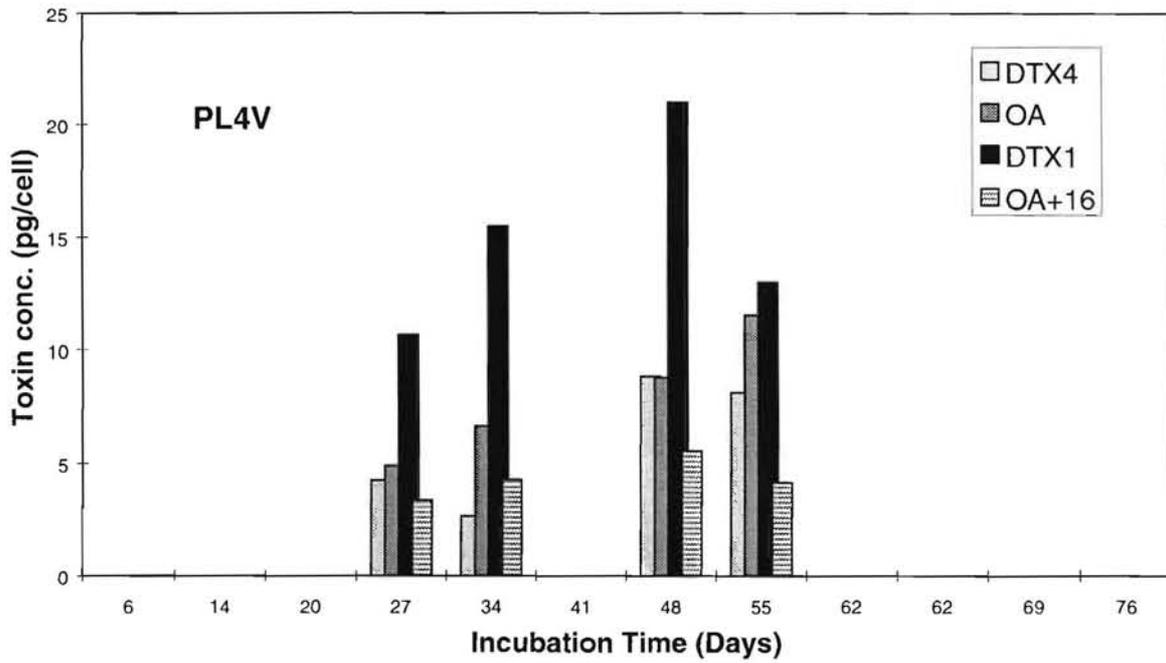


Figure 2 : production intra-cellulaire de toxines par *Prorocentrum lima* (Vigo, Espagne)

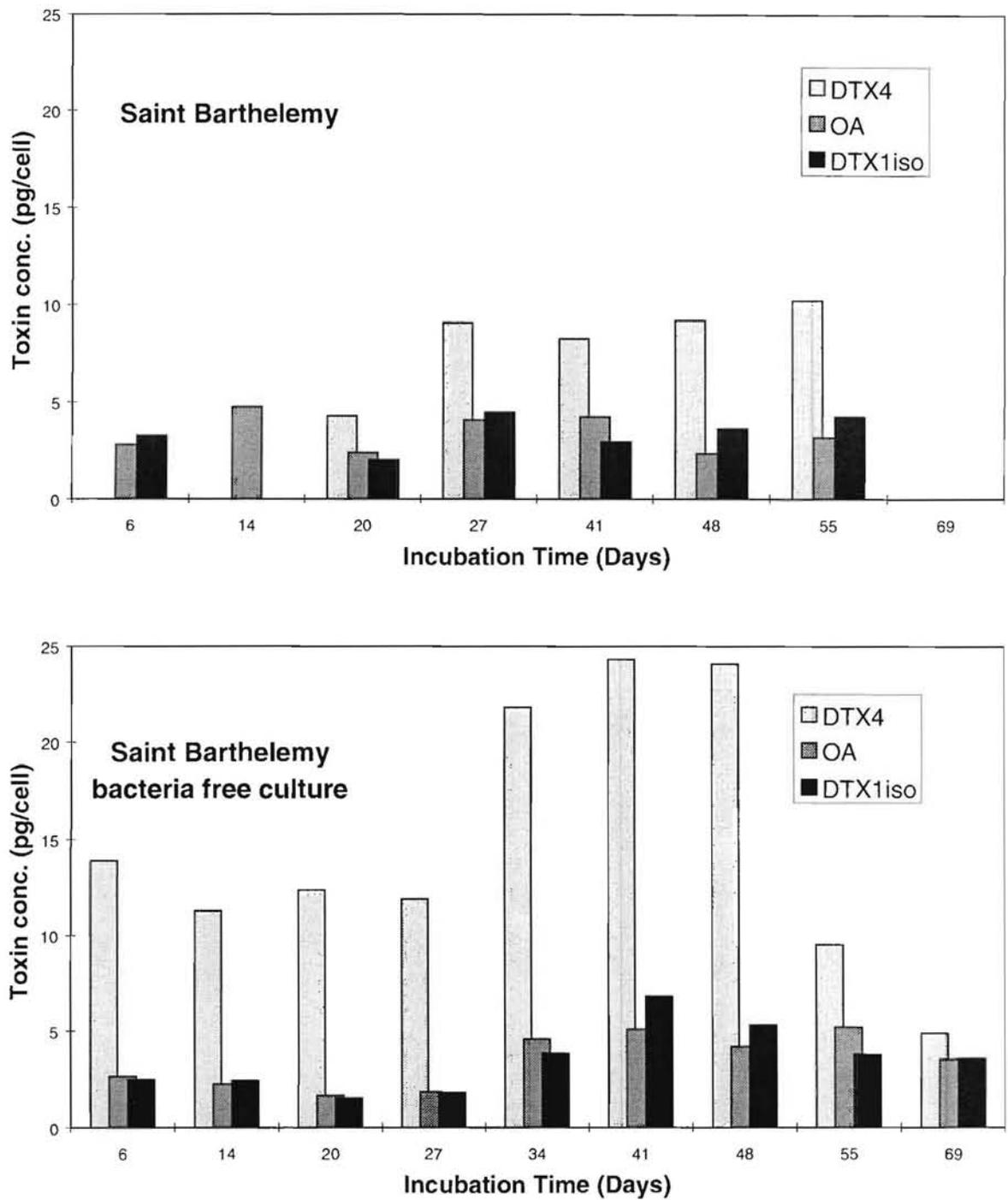


Figure 3 : production intra-cellulaire de toxines par *Prorocentrum lima* (Saint -Barthélemy):
détECTION d'un nouvel isomère de la dinophysistoxine -1

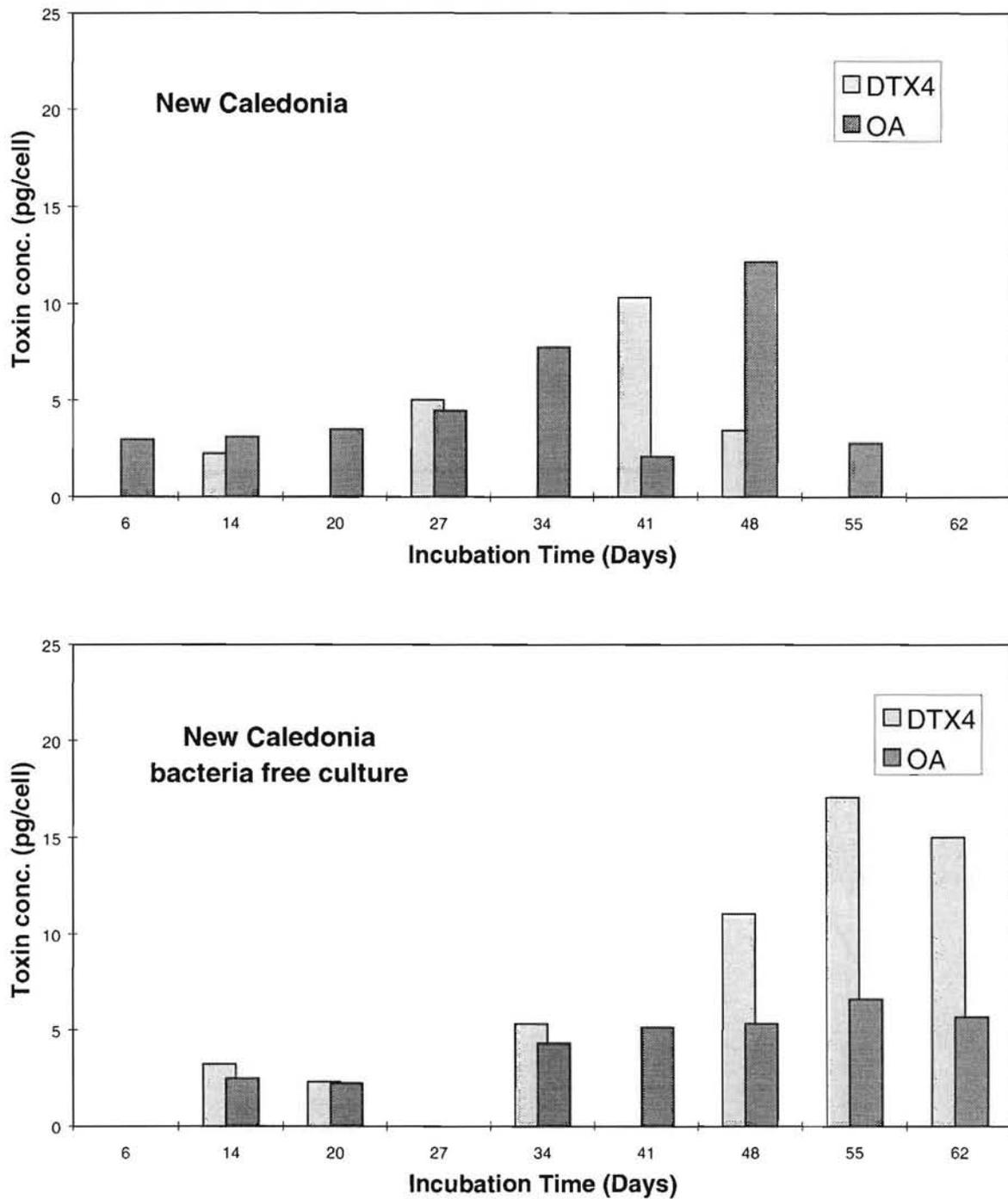
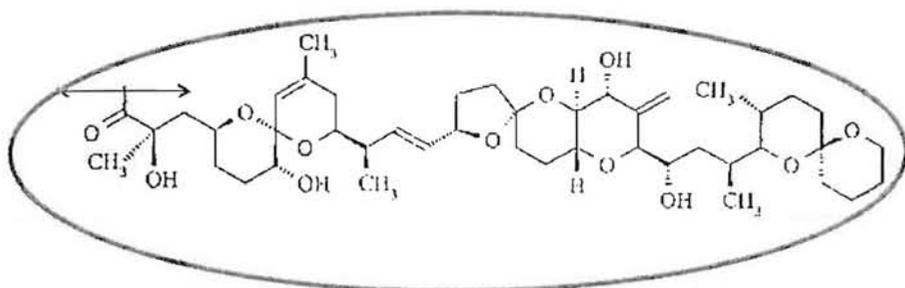
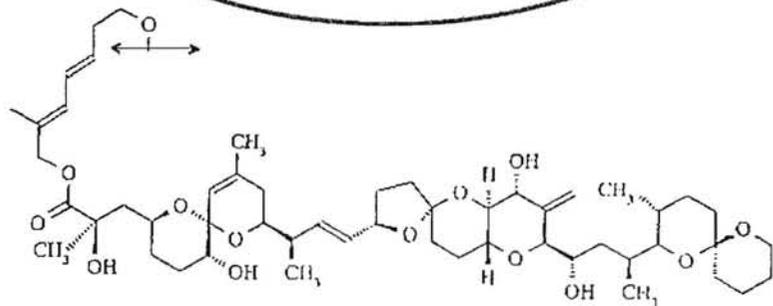
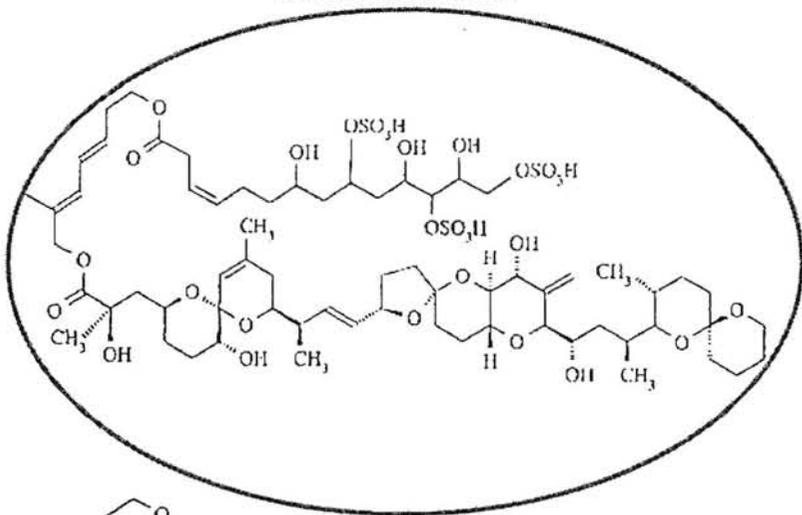


Figure 4 : production intra-cellulaire de toxines par *Prorocentrum lima* (Nouvelle- Calédonie)

Cellule de *P. lima*



Cellule phytoplanctonique non productrice de DSP

DTX₄

forme de production cellulaire :
protège de l'autotoxicité

hydrolyse en
ESTERS : forme préférentielle
du passage membranaire

hydrolyse en
AO et DTXs : toxicité par
hyperphosphorilation

Toxines DSP / DTX1

Figure 5 : Mode d'action allélopathique des toxines DSP.

12. Résultats de l'intercalibration PSP (CNEVA/IFREMER), avril 1997

Dominique LE GAL

Deux laboratoires d'Ifremer (DEL/PN et DEL/CC) ont participé avec six laboratoires vétérinaires (dont deux du CNEVA : laboratoire de référence pour le dosage des phycotoxines) à un essai d'aptitude au dosage des toxines de type PSP dans les coquillages. Cette inter-comparaison, dirigée par le CNEVA avec la participation de la FDA, avait pour but, d'une part de **réévaluer le Facteur de Conversion (FC)** pour chaque laboratoire et de vérifier si ce facteur était bien compatible avec les recommandations de l'AOAC.

Plusieurs échantillons d'huîtres commercialisées, d'huîtres naturellement contaminées, d'huîtres supplémentées en Saxitoxine (STX), ont été adressés à chacun des laboratoires. La technique utilisée et les résultats sont présentés dans les transparents ci-dessous. Une des premières conclusions de l'étude est, **qu'en cas de doute, il est préférable d'utiliser 5 souris plutôt que 3.**

Les deux laboratoires Ifremer qui ont participé à cet essai ont obtenu des FC de 0.18 et 0.19, ce qui cadre avec la bibliographie et les observations de l'AOAC (0.16-0.22).

La recommandation REPHY est de **continuer à utiliser un FC=0.22, jusqu'à modification éventuelle du protocole PSP.**

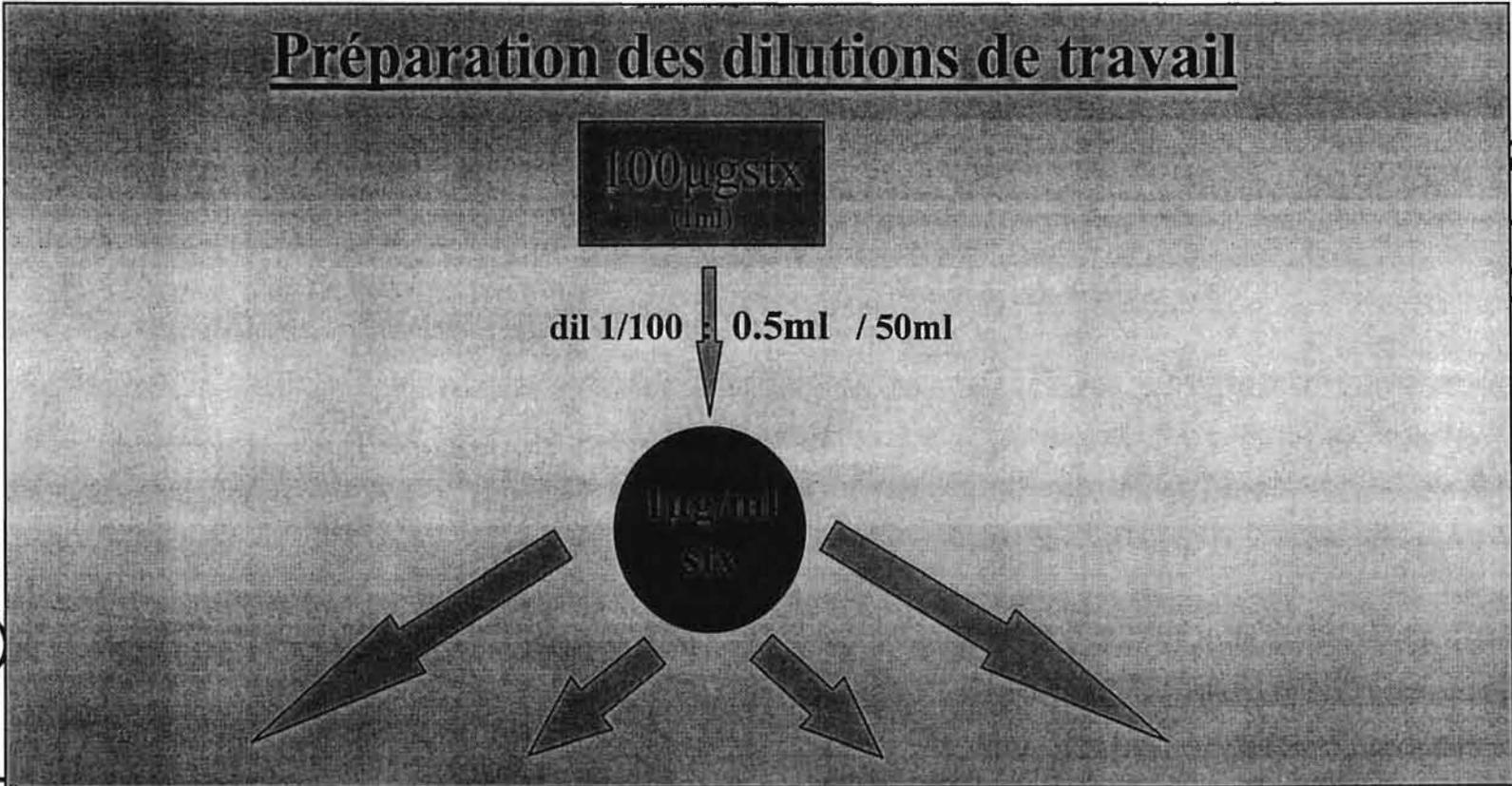


Essai d'aptitude Dosage des Phycotoxines Paralysantes dans les Fruits de Mer

- ↪ **Martial LEDOUX CNEVA PARIS**
Laboratoire Français de Référence pour le dosage des Phycotoxines
- ↪ **Sherwood HALL F.D.A.**
Division of Research, Office of Seafood, WASHINGTON - U.S.A.

- **Laboratoire Services vétérinaires RUNGIS -94**
- **Laboratoires Vétérinaires Départementaux : 13,35,44,76**
- **CNEVA PARIS**
- **IFREMER : DEL PN / DEL CC**

INTERCALIBRATION PSP



100 µg/ml

0.333 µg/ml

0.286 µg/ml

0.25 µg/ml

2ml STX + 3ml H2O

2ml STX + 4ml H2O

2ml STX + 5ml H2O

2ml STX + 6ml H2O

Mesures Préliminaires du FC

0.333 μ g/ml

0.286 μ g/ml

0.25 μ g/ml

Injections des dilutions sur 2 ou 3 souris (1ml en IP)



Détermination de la Concentration pour temps de survie médian compris entre 5 et 7 mn

x μ g/ml
Vh2o

x μ g/ml
Vh2o-0.2ml

x μ g/ml
Vh2o+0.2ml

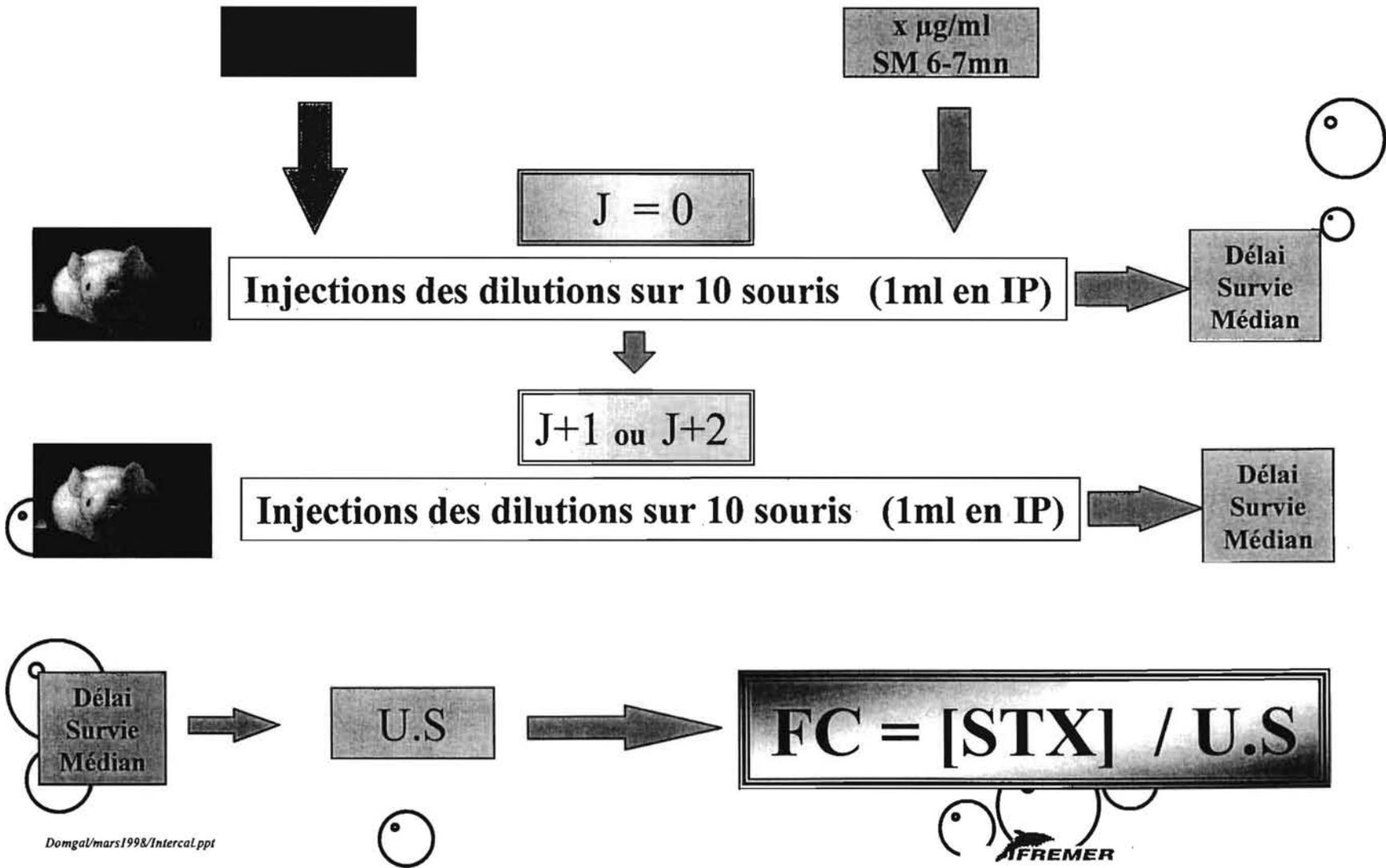
Injections des dilutions sur 2 ou 3 souris (1ml en IP)



Sélectionner les dilutions pour survies médianes 5-6mn et 6-7mn

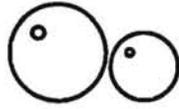
Calculer les concentrations en STX de ces dilutions

Détermination du FC



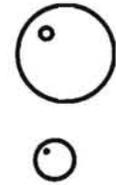
Domgal/mars1998/Intercal.ppt

IFREMER

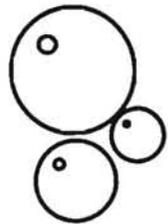


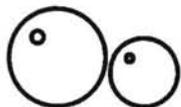
Essais de dosage des P.S.P.

Tests biologiques sur souris (méthode A.O.A.C.)



- Etalon Saxitoxine (F.D.A. 100 μ gSTX/ml).
- Solution de titre inconnu (F.D.A. 1.135 μ gSTX/ml) .
- 4 échantillons d'huîtres :
 - ⇒ HTN (Huîtres commercialisées)
 - ⇒ HNC (Huîtres naturellement contaminées)
 - ⇒ HS1 (Huîtres supplémentées 152.8 μ gSTX/100g)
 - ⇒ HS2 (Huîtres supplémentées 334.7 μ gSTX/100g)





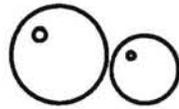
RESULTATS

Nature	FC	W-STX µgSTX/ml	HTN µgéquivalSTX/100g	HCN -a µgéquivalSTX/100g	HCN-b µgéquivalSTX/100g	HS1-a µgéquivalSTX/100g	HS1-b µgéquivalSTX/100g	HS2-a µgéquivalSTX/100g	HS2-b µgéquivalSTX/100g
Ajout	0	1.135	0	0	0	152.8		334.7	
Homogénéité*			<33.3	52.4(18)		56.4(20)		144.6(20)	
CPL		1.209(6)	N.D.	/		153.4(6)		305.7(6)	
Laboratoire								[FD]	[FD]
1	0.2	0.91	<35.0	58	58	55.6	63.4	155.2[2]	170.9[2]
2	0.18	1.21	<31.5	62.1	57.4	61.1	51.5	273.9[4]	230.1[4]
3	0.19	1.15	<33.3	/	52.6	49.5	51	157.6[3]	157.3[3]
4	0.19	1.04	<33.3	56.3	56.4	50.1	49.3	118.6[2]	121.7[2]
5	0.22	1.12	<38.5	49.3	50.2	46.4	47.3	85.8[1.3]	99.0[1.3]
6	0.2	1.21/1.12	<35.9	65.1	56.8	54.5	60.4	112.7[1.5]	116.7[1.5]
7	0.16	1.03	<28.0	56.6	50.4	50.4	43.5	99.7[2]	111.8[2]
8	0.2	1.17	<35.0	57.7	58.6	69.5	55.3	221.4[4]	256.5[5]
MOYENNE	0.19	1.107		56.4		53.7		155.6	
Ecart-type	0.02	0.098		1.3		6.9		59.6	

*testée par bioessai

()=Nbre d'essais

[FD] =Facteur de Dilution



Résultats et discussion

AOAC

FC Mini
0.16

DEL CONCARNEAU
FC = 0.18

DEL PN NANTES
FC = 0.19

FC MAXI
0.22

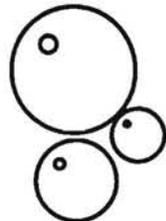
Le test souris peut sous estimer la toxicité réelle
(jusqu'à 60% : effet de sel)

Pour des raisons de protection de la Santé Publique appliquer
FC = 0.22 μg STX / unité souris (U.S.)

Suite à cet essai, à IFREMER on peut raisonnablement appliquer :

FC = 0.20 μg STX /unité souris (U.S.)

US = Mort souris en 15 mn



13. Accumulation de PSP dans les coquillages en hiver en l'absence d'observation du phytoplancton toxique. Interférence des PSP dans le test de dépistage des DSP sur souris

Zouher AMZIL

Résumé

Depuis janvier 1993, des épisodes de forte toxicité de coquillages sur souris (test DSP), avec des symptômes neurologiques suivis d'une mort rapide (5 à 10 minutes) ont été observés à Arcachon et à Toulon. La recherche de toxines paralysantes à la fois par CLHP/Fluorimétrie et par le test-souris (méthode de référence AOAC sur la chair totale des moules) s'est révélée négative. Les travaux de purification entrepris à partir des moules toxiques ont montré une accumulation pour la première fois de **toxines paralysantes** (GTX-2,3 à Arcachon et GTX-1,4 et GTX-2,3 à Toulon) dans les glandes **digestives alors qu'aucune espèce phytoplanctonique toxique connue n'avait été observée dans l'eau** lors de ces épisodes. Les concentrations de GTXs trouvées ne présentaient pas de danger pour les consommateurs. L'origine de ces gonyautoxines n'est pas encore déterminée et plusieurs hypothèses sont actuellement à l'étude. Par ailleurs, nous avons **confirmé l'interférence des PSP, lorsqu'elles sont présentes, dans le test de dépistage des DSP sur souris.**

Contexte de l'étude

Dans le cadre du réseau de surveillance REPHY, des épisodes de forte toxicité des extraits acétoniques des glandes digestives de coquillages sur souris (test DSP), avec des symptômes neurologiques suivis d'une mort rapide (5 à 10 minutes) ont été mis en évidence en hiver à Toulon et à Arcachon sans que l'on ait pu en expliquer la cause. Ces événements se produisent régulièrement depuis 1993 à la même période (décembre, janvier et février), ce qui laisse penser qu'il s'agit probablement d'un phénomène biologique naturel. La recherche de toxines paralysantes par le test-souris de référence AOAC sur la chair totale des moules s'est révélée négative (Amzil *et al.*, 1996).

Afin d'identifier les toxines impliquées, des grandes quantités de moules ont été récoltées en janvier 93 et en janvier 94 à Toulon (baie du Lazaret) d'une part, et d'autre part en janvier 94 et janvier 97 dans le bassin d'Arcachon (banc d'Arguin).

Cas des moules de Toulon

Les **figures 1 et 2** montrent respectivement les chromatogrammes analytiques, obtenus par CLHP couplée à la spectrométrie de masse, des standards de gonyautoxines (GTXs) et ceux de la fraction purifiée à partir des glandes digestives des moules de Toulon. Nous obtenons des pics de même caractéristique que ceux des gonyautoxines témoins : GTX-2,3 et GTX-1,4. Les fractions purifiées contiennent principalement les GTX-2 et GTX-3. Les GTX-1 et GTX-4 qui sont minoritaires ont été détectées pour la première fois dans les moules en France.

Par ailleurs, nous avons cherché à savoir si la toxicité des glandes digestives sur souris était due uniquement aux gonyautoxines détectées. Pour cela, à partir d'une grande quantité homogène de glandes digestives, nous avons procédé, dans un premier temps, à une concentration des échantillons afin d'obtenir une fraction riche en toxines. Une évaluation des toxines paralysantes a été réalisée à partir de cette fraction à la fois par le test-souris de référence AOAC et par CLHP/Fluorimétrie. Afin de comparer les résultats du dosage CLHP par rapport au test-souris, les quantités de GTX-2 et de GTX-3 trouvées sont transformées en équivalent saxitoxine (éq. STX) en prenant en compte la toxicité spécifique de chaque gonyautoxine (AOAC, 1990) (**tableau 1**).

Dosage par CLHP/Fluorimétrie

	Teneur ($\mu\text{g/ml}$)	Toxicité spécifique	éq. STX $\mu\text{g/ml}$
GTX-2	1,205	0,36	0,44
GTX-3	0,214	0,64	0,14
Total			0,58

Test-souris AOAC

Dose injectée	temps de survie	U.S	F.C.	éq.STX $\mu\text{g/ml}$
1 ml	4min12	2,3	0,2	0,46

Tableau 1 : Comparaison des teneurs en GTXs dans les glandes digestives de moules de Toulon, déterminées par CLHP/Fluorimétrie et par test-souris AOAC

Comme le montre ce tableau, les teneurs en toxines exprimées en éq. μg STX/ml trouvées par les deux méthodes sont équivalentes. Ce résultat indique que **les quantités de gonyautoxines accumulées dans les glandes digestives expliquaient largement la toxicité des moules sur souris** et donc l'absence de toute autre substance neurotoxique.

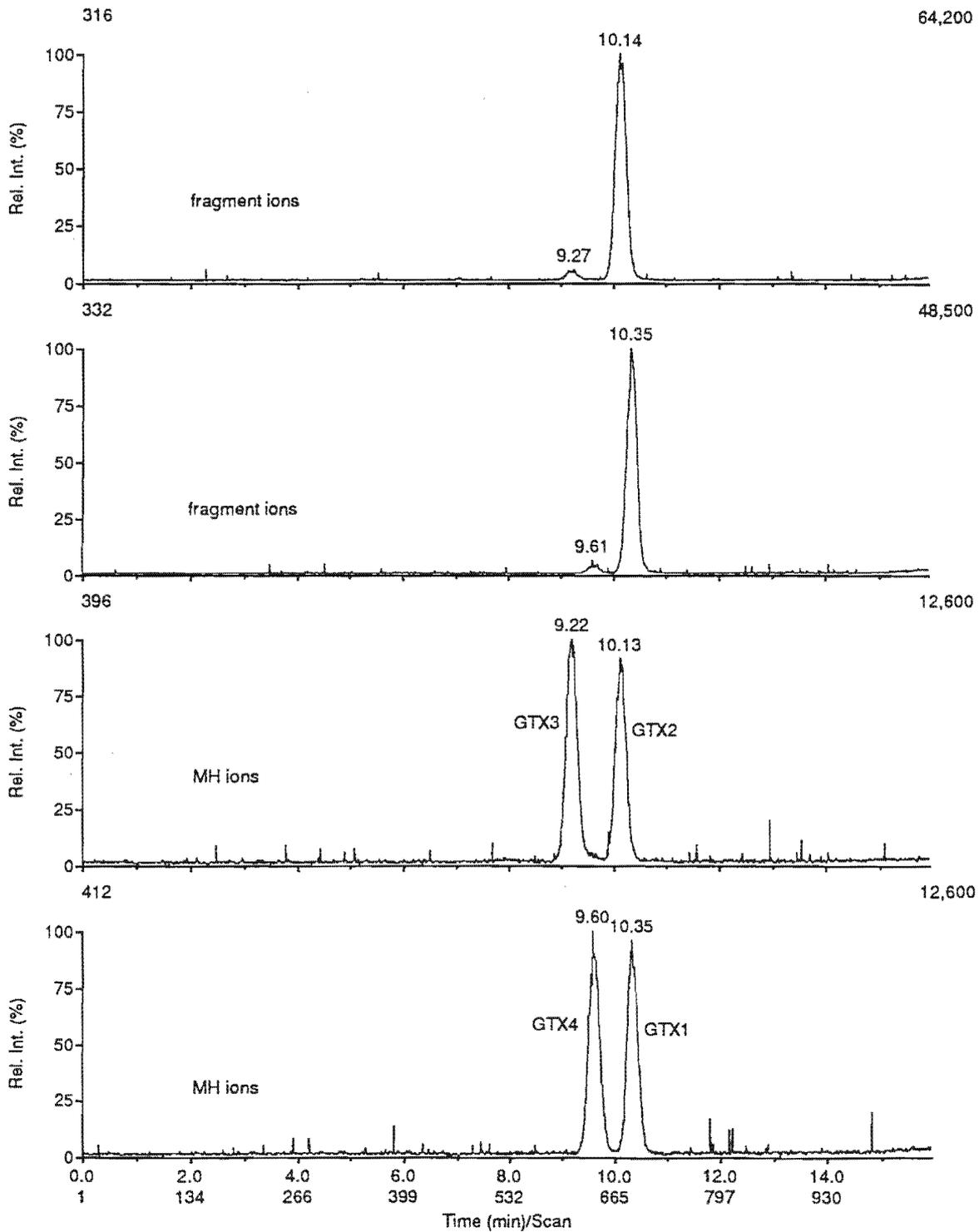


Figure 1 : LC/MS analysis of GTX-1, 2, 3, 4 standart mixture

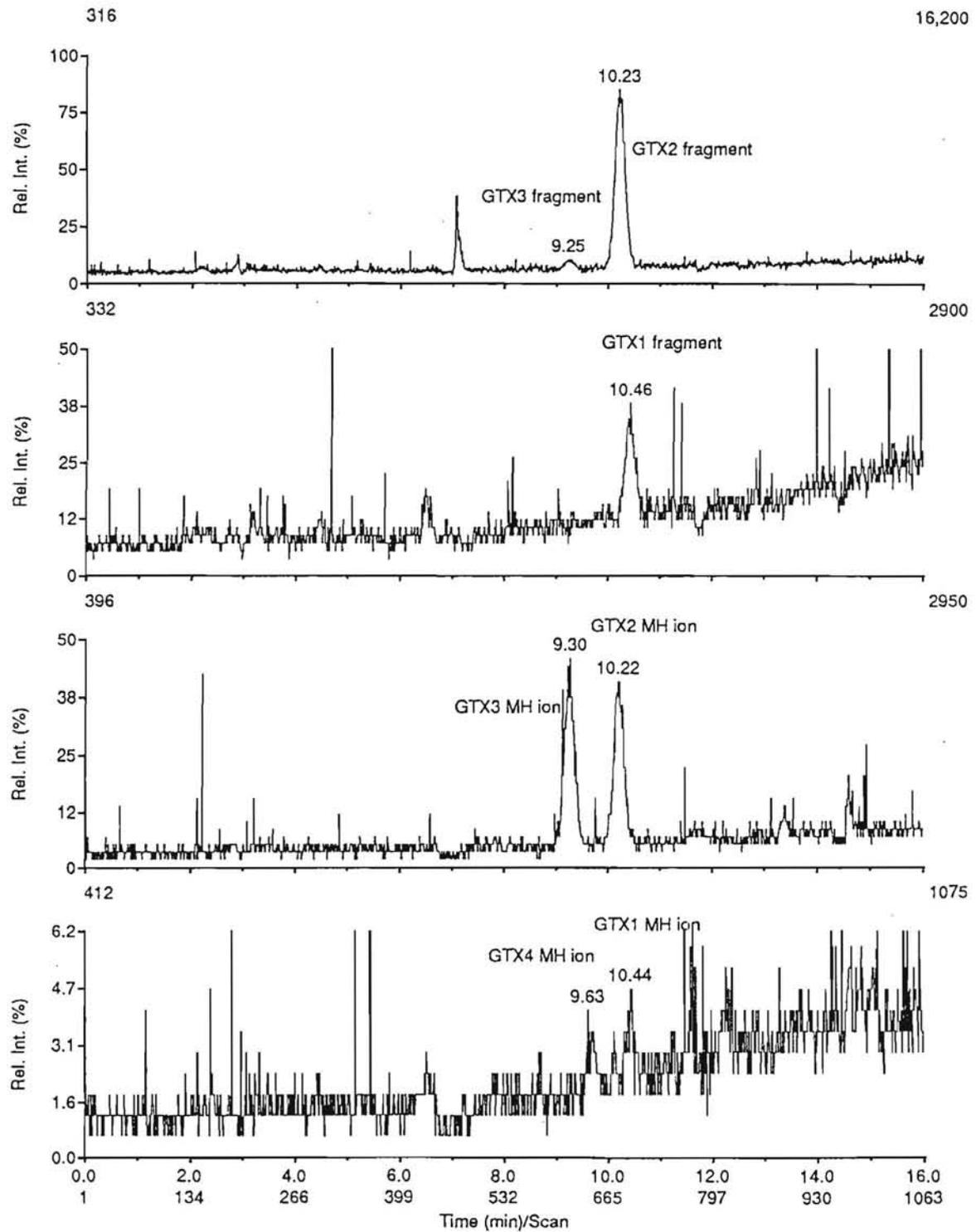


Figure 2 : LC/MS analysis of GTX-1, 2, 3, 4 of the fraction purified from gigestive glands of Toulon mussels

Cas des moules d'Arcachon

La **figure 3** montre le chromatogramme des gonyautoxines témoins et celui de la fraction purifiée à partir des glandes digestives des moules d'Arcachon. La comparaison des deux chromatogrammes nous confirme l'implication des GTX-2 et GTX-3 dans la toxicité des glandes digestives des moules sur souris.

Comme dans le cas des moules de Toulon, nous avons cherché la présence éventuelle d'une autre substance toxique. Le **tableau 2** regroupe les quantités équivalentes saxitoxine obtenues à la fois par la CLHP et le test-souris. L'étude comparative a montré une grande corrélation des résultats entre le test-souris et le dosage physico-chimique. Nous pouvons donc dire que **la toxicité des moules d'Arcachon a été due uniquement à la présence des gonyautoxines 2 et 3.**

Dosage par CLHP/Fluorimétrie

	Teneur ($\mu\text{g/ml}$)	Toxicité spécifique	éq. STX $\mu\text{g/ml}$
GTX-2	0,681	0,41	0,28
GTX-3	0,191	0,67	0,13
Total			0,41

Test-souris AOAC

Dose injectée	temps de survie	U.S	F.C.	éq.STX $\mu\text{g/ml}$
1 ml	3min52	2,446	0,2	0,49

Tableau 2: Comparaison des teneurs en GTXs dans les glandes digestives de moules d'Arcachon, déterminées par CLHP/Fluorimétrie et par test-souris AOAC

Que ce soit dans le cas d'Arcachon ou de Toulon, les teneurs en gonyautoxines trouvées dans les fractions purifiées à partir des glandes digestives, une fois rapportées à la chair totale, étaient inférieures au seuil d'intoxication des consommateurs ($80 \mu\text{g}$ eq STX/100 g chair). Ce qui explique pourquoi nous ne pouvions pas les détecter dans les extraits bruts de coquillages par le test-souris de référence AOAC. Vu les très faibles teneurs en GTXs trouvées, il a donc fallu procéder à leur purification pour pouvoir les détecter.

C'est pourquoi, le test-souris de référence AOAC pour les PSP était négatif car on injectait seulement 0,5 g équivalent de chair totale de coquillages. Au contraire, avec le test-souris pour les DSP, on injectait 5 g équivalent de glandes digestives, soit au moins dix fois la dose de référence utilisée pour les PSP puisque les phycotoxines se concentrent principalement dans les glandes digestives.

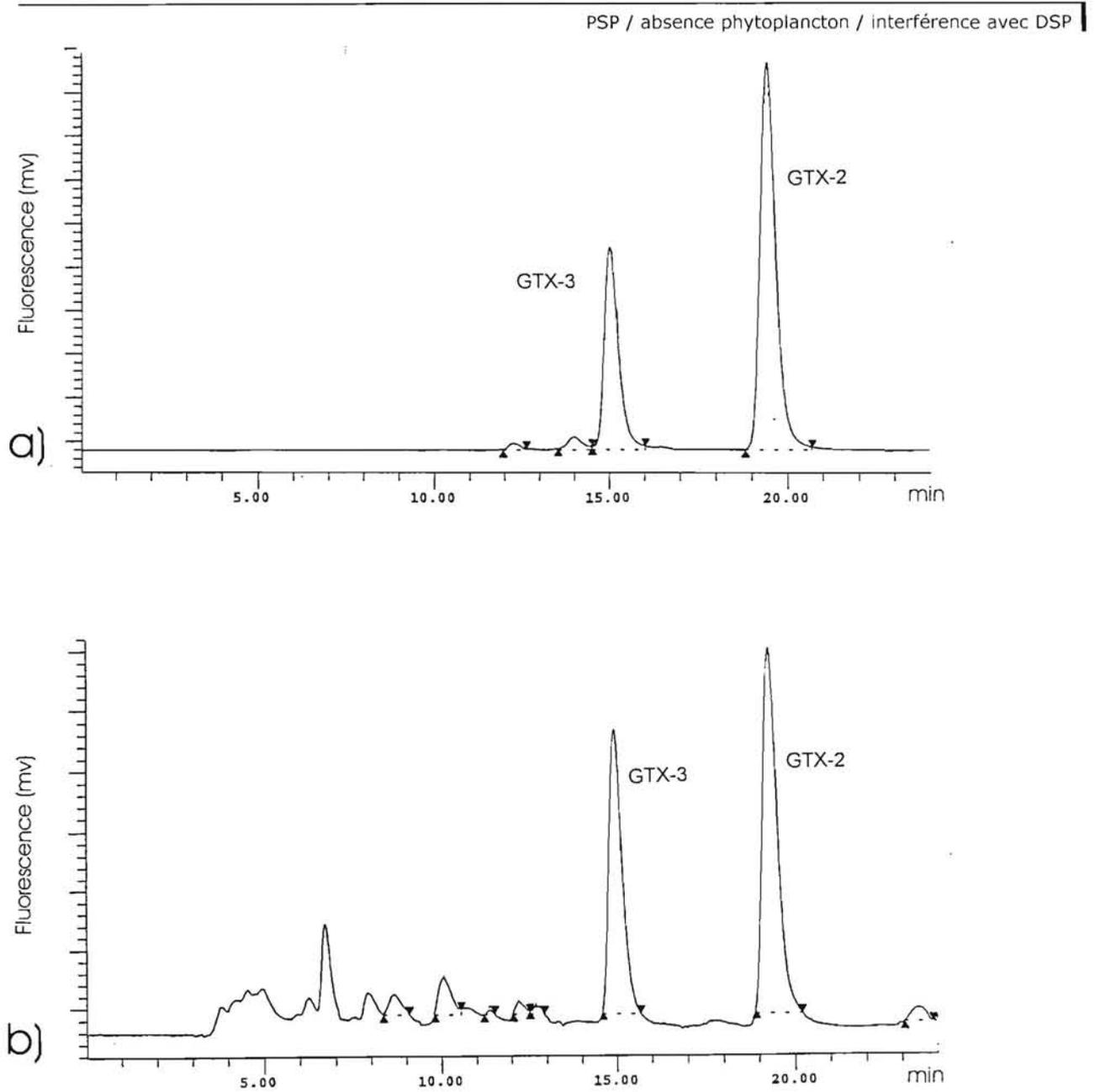


Figure 3 : HPLC/FD analysis of GTX-2 and GTX-3
a : Purified standards of GTX-2 and GTX-3
b : Fraction purified from digestive glands of Arcachon mussels.

Origine des GTXs détectées dans les moules d'Arcachon et de Toulon

Jusqu'à présent, en France, on détectait seulement les GTX-2,3 en été dans la baie de Morlaix en corrélation avec une efflorescence de l'espèce *Alexandrium minutum* productrice de ces toxines (Fremy *et al.* 1989), tandis que dans le cas d'Arcachon et de Toulon, aucune espèce phytoplanctonique neurotoxique connue n'a été observée dans l'eau. De plus, c'est la première fois qu'on détecte des GTXs dans les coquillages en hiver, période non favorable pour les proliférations phytoplanctoniques. L'origine de GTXs n'est probablement pas la même dans les deux cas puisque le profil toxinique n'est pas exactement le même : GTX-2,3 à Arcachon et GTX-1,2,3,4 à Toulon.

La question qui se pose maintenant est de savoir d'où viennent ces gonyautoxines. Il est possible que leur accumulation dans les glandes digestives à des faibles concentrations soit :

- due à une prolifération trop brève de phytoplancton toxigène classique pour que l'on ait pu l'observer,
- due à des espèces introduites sous forme de kystes via les transports maritimes (ballast waters),
- liée à la présence de bactéries productrices de toxines paralysantes dans la colonne d'eau,
- due à une remise en suspension de kystes d'*Alexandrium minutum* présents dans le sédiment.

Toutes ces hypothèses sont actuellement à l'étude afin de déterminer l'origine des GTXs accumulées dans les glandes digestives de moules en l'absence d'observation de phytoplancton toxique.

Interférence des PSP dans le test de dépistage des DSP sur souris

Comme nous venons de le montrer, la présence de gonyautoxines dans les moules d'Arcachon et de Toulon a été mise en évidence à la suite de l'extraction acétonique utilisée pour les DSP donnant ainsi un test-souris positif avec des symptômes de type PSP suivi d'une mort rapide. Les toxines paralysantes sont également solubles dans l'acétone et posent donc un problème d'interférence dans le test de dépistage des DSP. Pour le confirmer, nous avons comparé deux méthodes d'extraction à partir des glandes digestives : une extraction acide selon le test de référence AOAC et l'extraction utilisée pour les DSP (acétone ou méthanol/eau).

Les extraits obtenus ont été ensuite testés selon la procédure habituelle du test-souris. Parallèlement, ces mêmes extraits ont fait l'objet d'une purification sur une colonne Sep Pack C18 suivie d'une analyse quantitative des GTXs par

CLHP/Fluorimétrie (**figure 4**). Le **tableau 3** regroupe les doses injectées aux souris (exprimées en gramme équivalent glandes digestives "g éq GD"), les temps de survie correspondants et la teneur en GTX-2 et GTX-3 déterminée par CLHP/Fluorimétrie.

	100 g GD	100 g GD
Méthode	extraction acide - AOAC	MeOH/H₂O
Dose en g éq GD	1,5 - 3	1,5 - 3
Temps de survie (min)	4,00 - 3,2	4,2 - 3,3
GTX-2, 3 µg/g GD	0,83	0,78

Tableau 3 : comparaison des méthodes d'extraction des GTX-2 et GTX-3

Nous pouvons remarquer que pour les mêmes doses d'extraits injectées aux souris, nous obtenons des temps de survie similaires. De plus, le dosage par CLHP a révélé une teneur équivalente en GTX-2,3 pour les deux types d'extraction. Ce qui signifie que les toxines paralysantes sont également extraites par les solvants organiques aqueux : méthanol/eau ou acétone/eau. Dans le cas de l'extraction acétonique, l'eau provenant des glandes digestives, miscible avec l'acétone, conduit à une augmentation de la polarité du mélange permettant ainsi d'extraire les gonyautoxines.

A la lumière de ces résultats nous pouvons dire que :

- la méthode de référence AOAC est plutôt calibrée pour les PSP dans la chair totale pour la mise en évidence d'un risque pour les consommateurs,
- l'extraction acétonique utilisée pour la détection des DSP est remise en cause car elle met en évidence une toxicité globale des extraits de coquillages en permettant d'extraire d'autres toxines comme les toxines paralysantes, ce qui peut être considéré comme un avantage. Mais **l'extraction acétonique peut également être un inconvénient dans le cas des PSP lorsqu'elles sont présentes en très faibles quantité** : en effet, l'extraction acétonique utilisée pour les DSP donnerait un test-souris positif et conduirait automatiquement à la non commercialisation des coquillages et donc à une pénalisation non conforme des producteurs puisque selon la méthode AOAC, le test est considéré négatif pour des doses inférieures à 80 µg eq STX/100 g de chair.

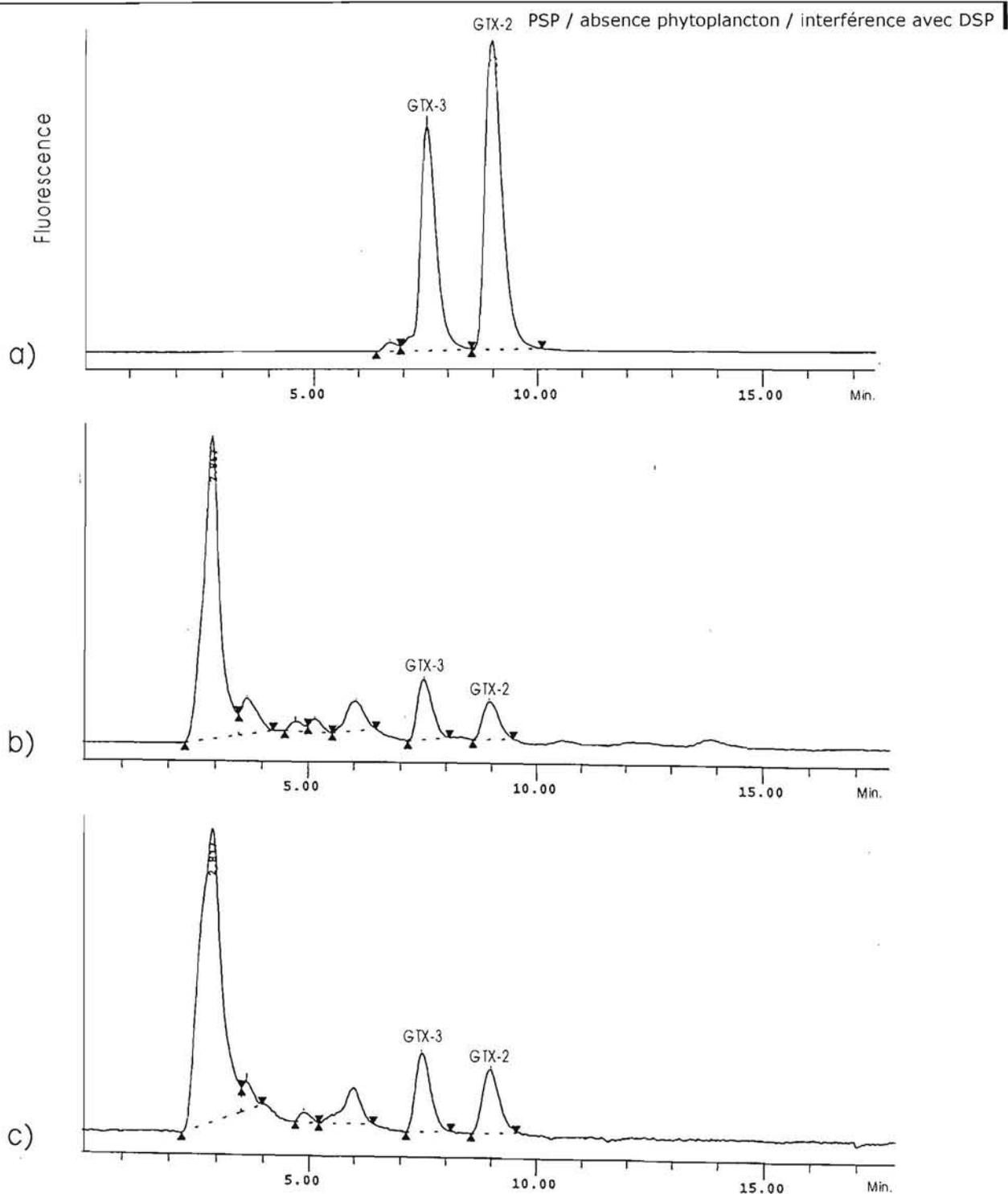


Figure 4: HPLC/FD analysis of GTX-2 and GTX-3 in French mussels extracts :

a: purified standards of GTX-2 and GTX-3

b: acid extraction in accordance with the AOAC reference method

c : extraction used for DSP detection (MeOH/H₂O)

Méthode recommandée pour déterminer à la fois la toxicité globale des coquillages sur souris et le type de toxines en cause

Afin d'éviter toute interférence avec les PSP dans le test de dépistage des DSP en contrôle de routine d'une part, et de pouvoir détecter d'éventuelles neurotoxines polaires d'autre part, nous recommandons le protocole détaillé dans la **figure 5**.

Au lieu de travailler sur 20 g de glandes digestives, en prélever 40 g et procéder à une extraction avec de l'acétone (3 x 100 ml). Diviser l'extrait acétonique en 2 volumes équivalents (2 x 150 ml) correspondant à deux fois 20 g de glandes digestives puis évaporer à sec. Un des deux extraits est repris dans le Tween 60 à 1 % en vue de le tester sur souris selon le test classique de dépistage des DSP.

Si les souris traitées présentent des **symptômes de type neurologique** suivis d'une **mort rapide** :

- pratiquer un test-souris sur la chair totale des coquillages selon la méthode de référence AOAC pour la détection des toxines paralysantes afin de mettre en évidence un éventuel risque pour les consommateurs du à ces toxines,
- pratiquer un partage liquide/liquide sur l'autre extrait acétonique restant des glandes digestives (équivalent 20 g) afin de séparer les différents principes actifs en fonction de leur polarité. Ce partage comporterait tout d'abord une reprise de l'extrait avec un mélange méthanol/eau 70/30 (100 ml), puis une extraction avec le dichlorométhane dans lequel sont solubles d'une part :
 - les toxines diarrhéiques (acide okadaïque AO ; Dinophysistoxines DTX-1, DTX-2, DTX-3),
 - les autres toxines classées dans la même catégorie (DSP) à cause de leurs propriétés physico-chimiques voisines (les Yessotoxines YTXs, les Pectenotoxines PTXs, l'Azaspiracid).

Les toxines polaires (la Saxitoxine et ses dérivés « PSP »; l'acide domoïque et ses dérivés « ASP »; les spirolides) et éventuellement d'autres toxines à action rapide resteront dans la phase aqueuse.

Les deux fractions obtenues (CH_2Cl_2 et $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$) sont évaporées à sec puis testées sur un lot de 3 souris par fraction afin de cerner le type de toxines responsables de la forte toxicité de départ des coquillages sur souris. Pour cela, l'équivalent de 5 g de glandes digestives est dissous dans 1 ml de solvant approprié, puis injecté à chacune des souris :

- la fraction chlorométhylénique est reprise dans le Tween 60 à 1 % pour le dépistage des principes actifs moyennement polaires,
- la fraction $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ mise à sec est reprise dans le méthanol seul dans lequel précipitent les sels minéraux provenant de l'eau de mer. Les sels sont ensuite éliminés après centrifugation à 3 000 tours/minute pendant 10 minutes, l'opération est répétée 2 à 3 fois en fonction de la quantité de sels à éliminer. Les surnageants sont combinés et évaporés à sec puis le résidu est repris dans l'eau distillée afin de dépister les neurotoxines polaires.

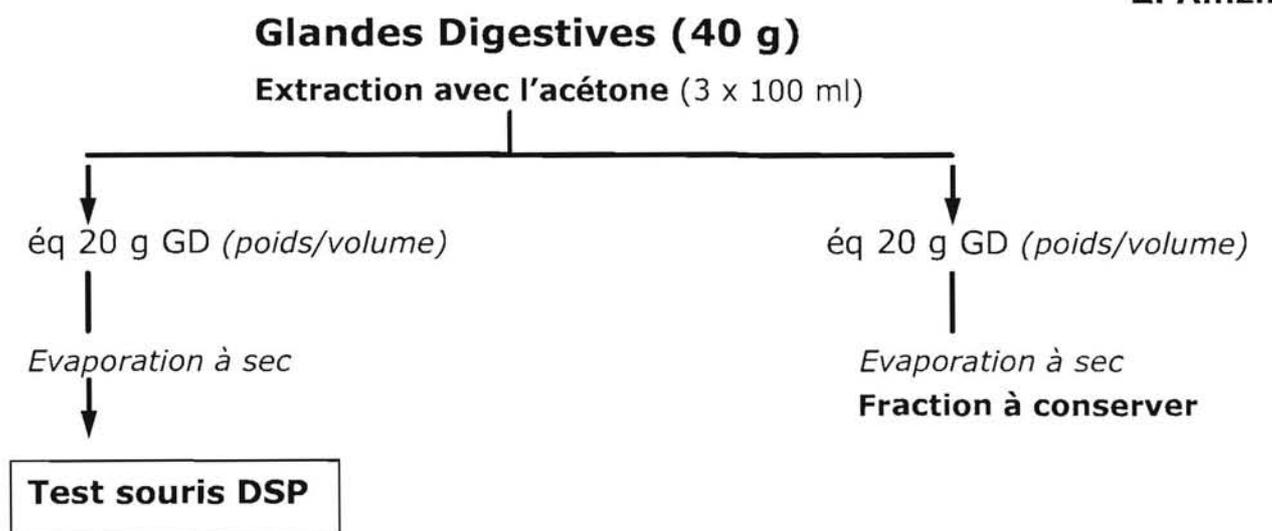
En cas de doute sur la nature des toxines en cause, le laboratoire Phycotoxines et Nuisances (DEL/MP-PN) procède à une expertise physico-chimique par CLHP/fluorimétrie et/ou par CLHP/Spectrométrie de masse.

Bibliographie

- Amzil Z., Marcaillou-Le Baut C. and Bohec M. (1996a). Unexplained toxicity in molluscs gathered during phytoplankton monitoring. In Harmful and Toxic Algal Blooms. Yasumoto T., Oshima Y. and Fukuyo Y. (Eds). *Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO*, 543-546.
- A.O.A.C., official method of analysis Paralytic Shellfish Poisoning biological method (1990). 15th ed. 959-08, *Association of Official Analytical Chemists*. Ed. Kenneth Helrich, Arlington, USA, 881-882.
- Fremy J.M., Le Doux M., Nezan E., Piclet G., Belvez H. (1989). Evolution de la présence des toxines paralysantes dans les coquillages lors de l'épisode toxique en Aber Wrach (1988). *Toxicorama* 1 (1), 23-28.
- Takagi T., Hayashi K., Itabashi Y. (1984). Toxic effect of free unsaturated fattyacids in the mousses assay of Dinophysistoxin by intraperitoneal injection. *Bul. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 50 (8), 1413-1418.

Fig. 5 : procédure analytique pour déterminer à la fois la toxicité globale des coquillages sur souris et le type de toxines en cause

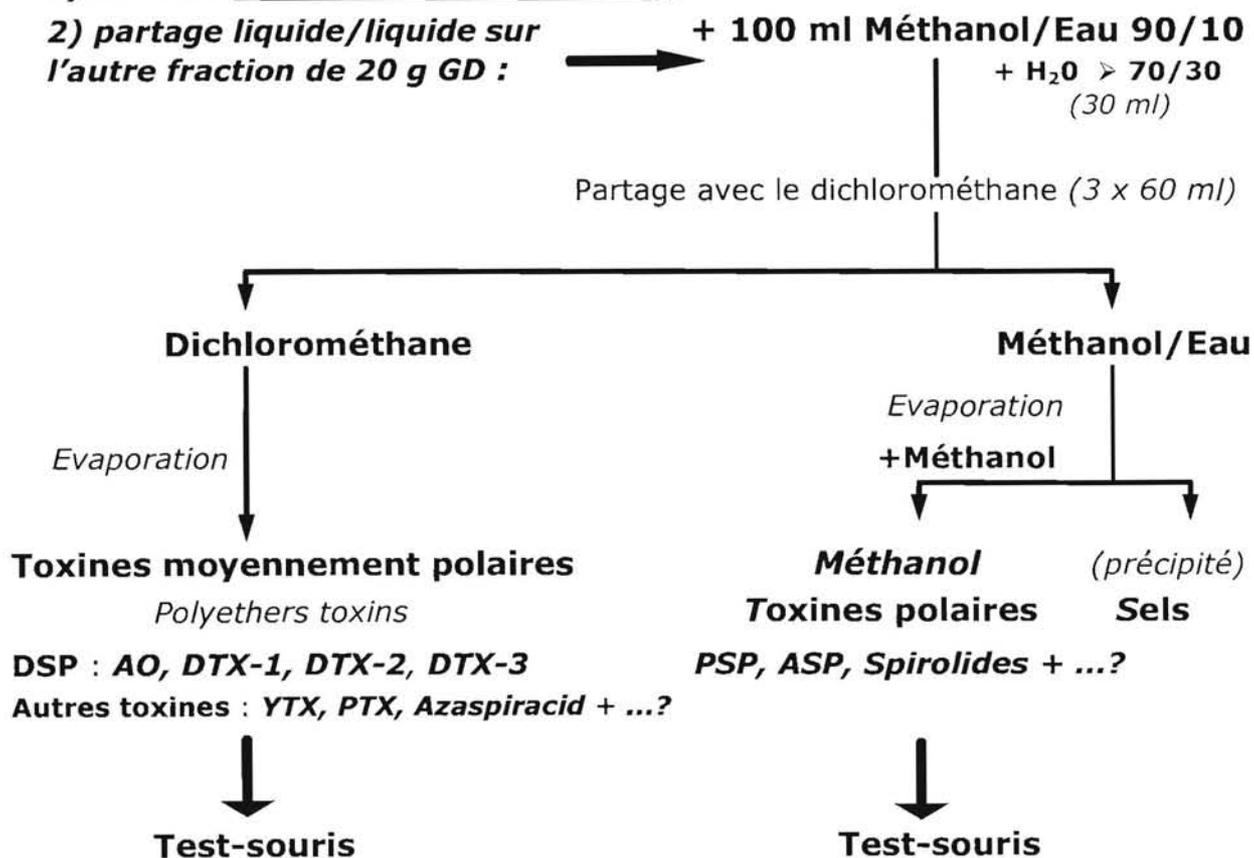
Z. Amzil



Si les souris présentent des symptômes neurologiques suivis d'une mort rapide :

1) faire un test PSP AOAC chair totale,

2) partage liquide/liquide sur l'autre fraction de 20 g GD :



Expertise : CLHP/Fluorimétrie et/ou CLHP/Spectrométrie de masse

14. Détoxification PSP des coquillages. Recherche d'un modèle

Patrick LASSUS

14.1. Expériences d'épuration PSP sur bivalves

Objectifs

- Mettre en évidence des différences de comportement entre espèces de bivalves.
- Rechercher le régime microalgal permettant une épuration optimale.
- Evaluer le rôle de la valeur nutritive et de la concentration en algues non toxiques dans les performances d'épuration.
- Etudier la distribution des toxines dans chaque organe.
- Elucider la part relative des processus de biotransformation / dégradation des toxines dans la toxicité globale.
- Etablir un modèle de transfert / élimination des toxines dans les compartiments eau / chair des bivalves / biodépôts.

Expérimentations menées par le laboratoire PN

Contamination / décontamination d'huîtres par *Alexandrium minutum*

Résultats écophysiologicals et toxicologiques

- Activité valvaire réduite de 40 à 50 % lors d'une exposition avec *A. minutum*, sans "récupération" au cours du temps (voir **fig. 1**, 1^{ère} et 2^{ème} courbes, la 1^{ère} courbe concerne deux flagellés, la 2^{ème} concerne deux diatomées). Après disparition d'*Alexandrium minutum*, l'activité valvaire augmente significativement dans deux cas, excepté avec *Tetraselmis*, ce qui reste inexplicé.
- Taux de filtration, consommation et production de biodépôts réduits par rapport à *S. trochoidea*, qui a sensiblement la même taille qu'*Alexandrium minutum* (voir fig. 1, 3^{ème} courbe).
- Il n'y a pas de différence significative entre les décontaminations réalisées avec deux nourritures différentes d'algues non toxiques (voir **fig. 2**, 1^{er} et 2^{ème} graphiques), le 3^{ème} graphique de la fig. 2 montre également que moins les huîtres filtrent, moins elles contiennent de toxines.
- Lorsqu'on passe à un régime non toxique juste après contamination, l'augmentation de production des biodépôts ne dure que quelques jours puis redevient basse. Seuls les régimes à base de diatomées paraissent entraîner une augmentation des taux de filtration et de consommation.
- Les toxines B (GTX 2/3) sont majoritaires dans les tissus des huîtres comme dans le dinoflagellé.

- Les concentrations en toxines B décroissent régulièrement, selon une fonction comparable à celle de la détoxification des moules, sans influence apparente du régime non toxique utilisé.
- Un suivi individuel de l'activité valvaire et/ou de la filtration est nécessaire pour corriger les variations observées sur la toxicité initiale.

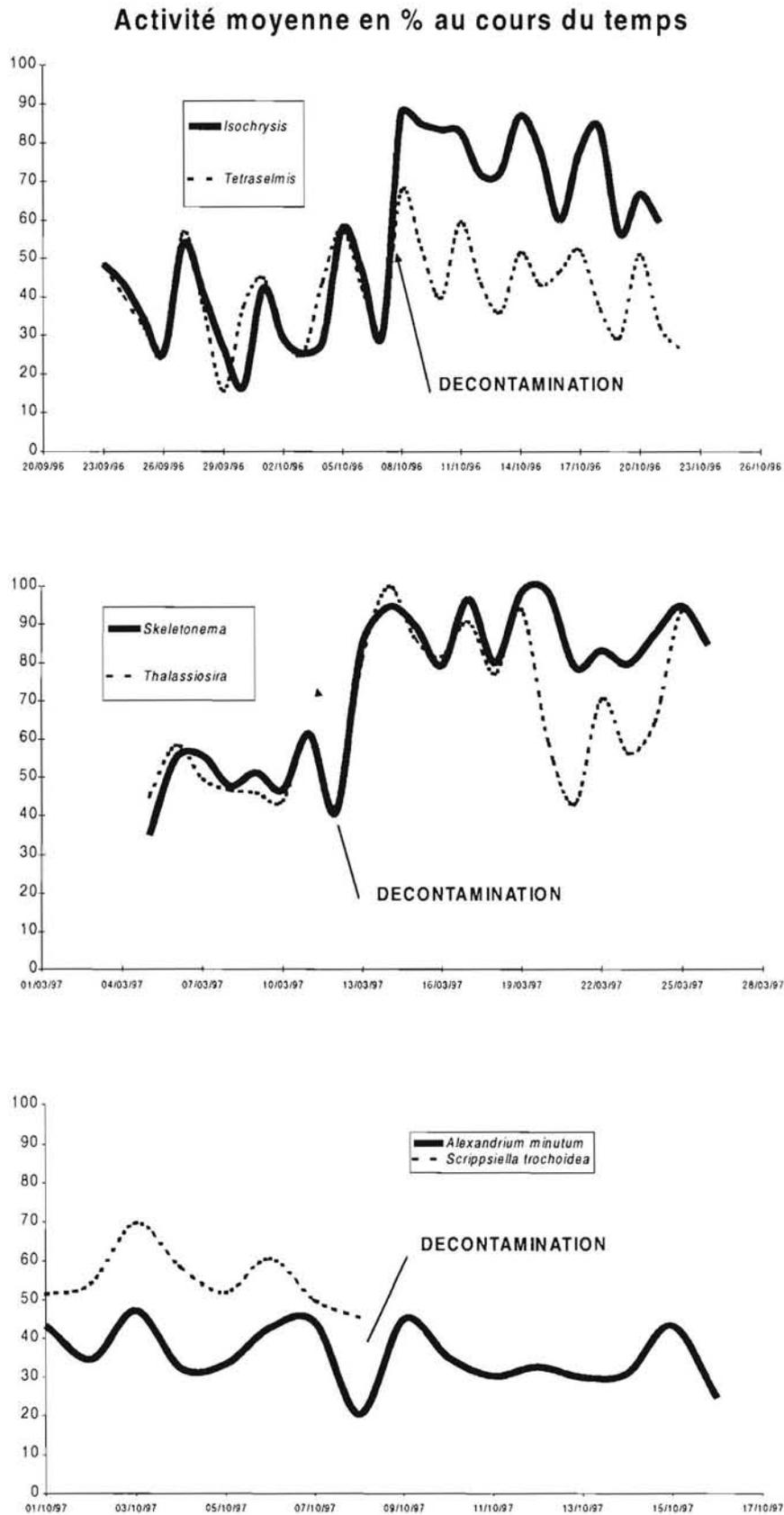
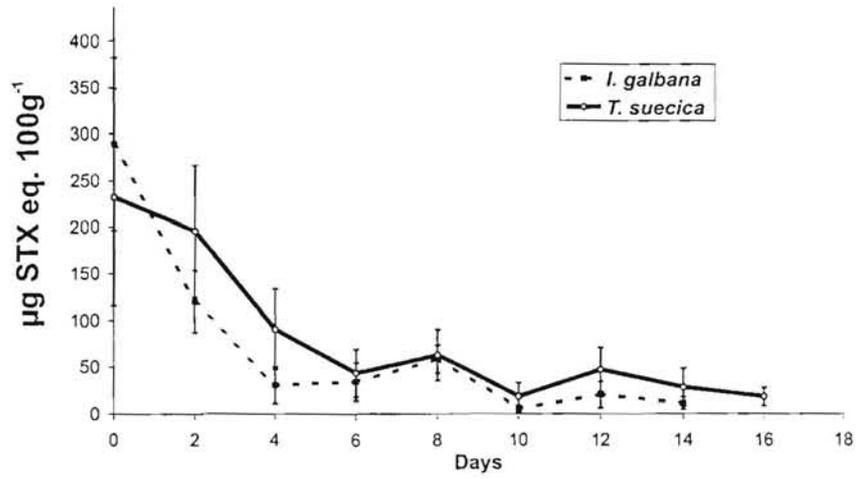
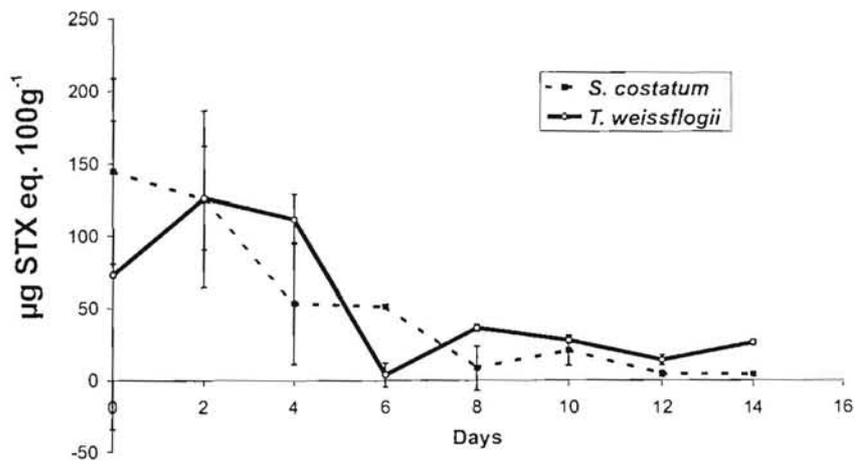


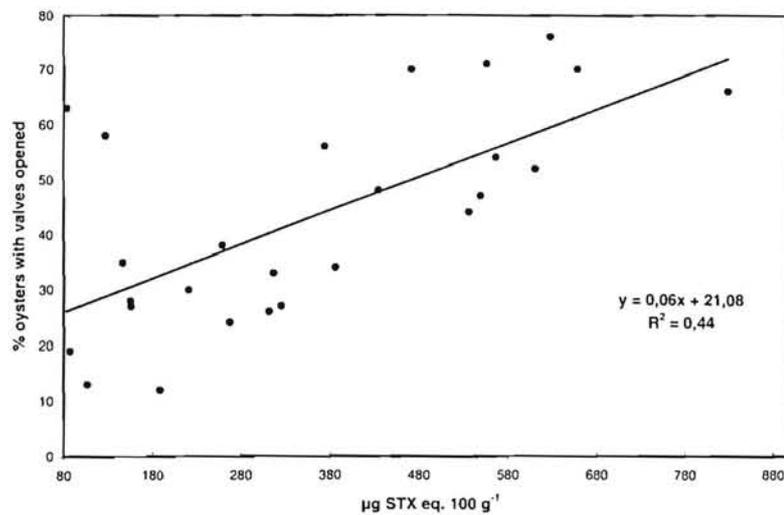
Figure 1 : Activités valvaires moyennes de trois lots d'huîtres (*Crassostrea gigas*) nourries avec un régime toxique (*Alexandrium minutum*) puis non toxique (*Isochrysis*, *Tetraselmis*, *Skeletonema*, *Thalassiosira*). Comparaison (graphique du bas) des activités valvaires en réponse à un régime toxique (*A. minutum*) ou non-toxique (*S. trochoidea*) de même valeur alimentaire.



A



B



C

Figure 2 : Cinétique de détoxification de *C. gigas* nourries avec deux régimes de flagellés (A) et deux régimes de diatomées (B). Relation entre le contenu toxinique et l'activité valvaire individuels en fin de période de contamination (C).

Importance des résultats obtenus sur les huîtres pour les expériences 1998

- Il est important d'augmenter la précision sur la mesure de la toxicité initiale, donc d'affiner la relation taux de filtration / toxicité pour l'ensemble des individus.
- Il faut rechercher le modèle décrivant le plus précisément la cinétique de détoxification des bivalves commerciaux non pris en compte par le modèle de Bricelj.
- Il est nécessaire de rechercher les voies métaboliques de détoxification des toxines liées aux tissus.

Contamination PSP par organe dans les coquilles St Jacques

Tous les organes ne sont pas contaminés de la même façon. Du plus contaminé au moins contaminé :

rein → glande digestive → gonade → muscle

Il n'y a pas le même ensemble de toxines dans les reins et dans la glande digestive (voir Fig. 3).

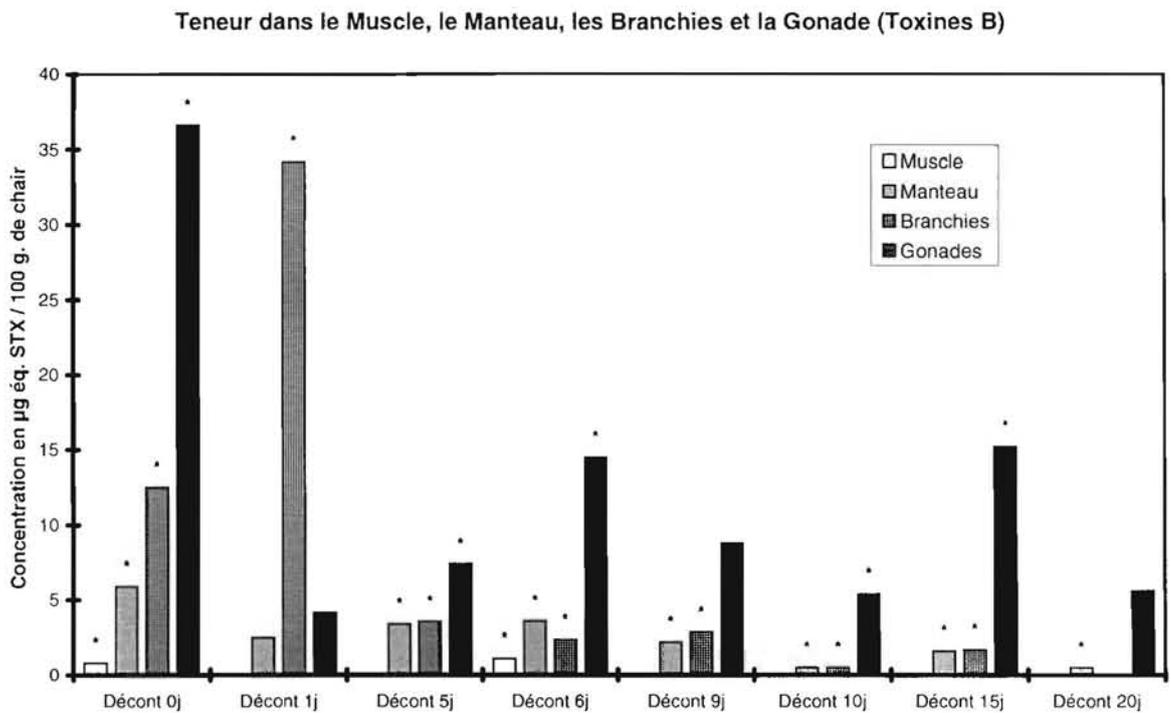
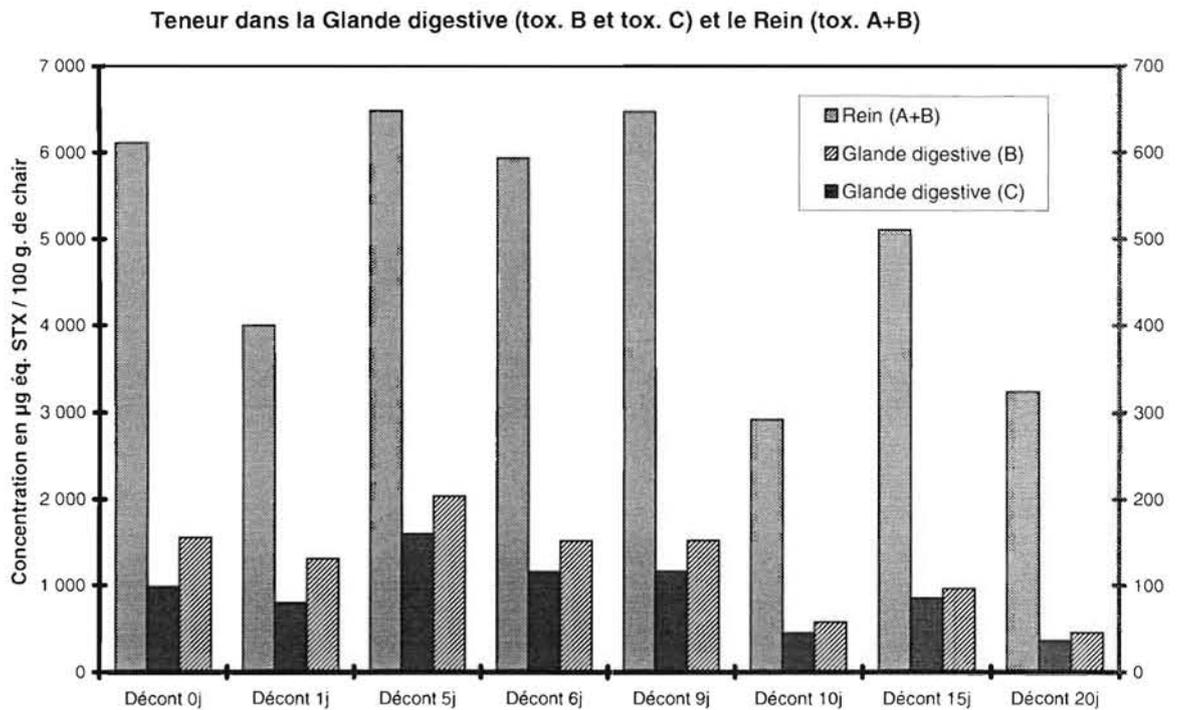


Figure 3 : Distribution des toxines paralysantes A, B et C dans les différents organes de la coquille Saint-Jacques (*Pecten maximus*) au cours d'une détoxification de 20 jours assurée par un régime à base de *T. suecica*.

14.2. Détoxification PSP. Recherche d'un modèle

Avantages d'un modèle

- Au niveau expérimental, optimiser le nombre et la fréquence des prélèvements pour analyse.
- Au niveau prédictif, augmenter la précision de l'évaluation du délai nécessaire au retour au seuil sanitaire.
- Au niveau physiologique, comparer les différentes espèces de coquillage en matière de comportement alimentaire.

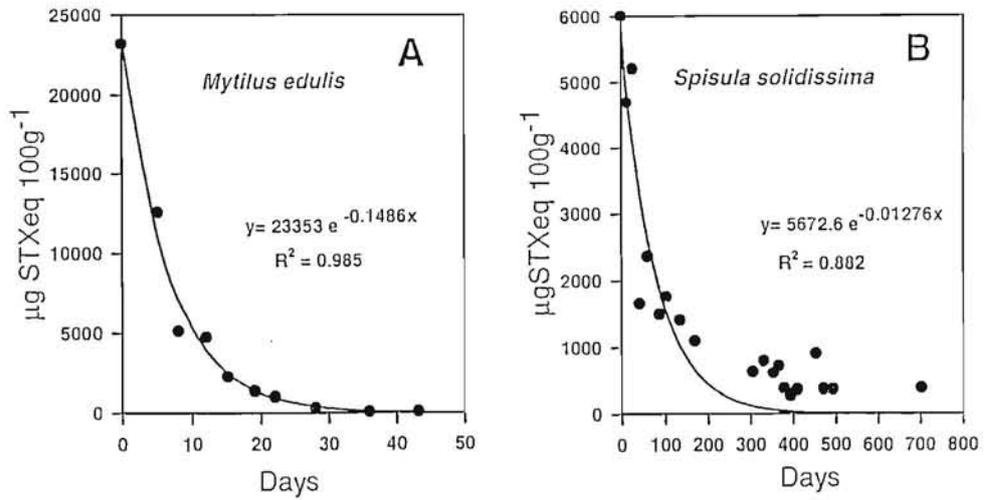
Modèle de Bricelj

Chez certains coquillages comme les spisules, les myes, les pectinidés, les procédures de détoxification semblent plus complexes que chez les moules ou les huîtres.

En effet, les courbes de Bricelj et Shumway (Fig. 4) montrent que, si l'équation choisie pour le modèle marche très bien pour la moule (*Mytilus edulis*), elle ne marche pas pour la spisule (*Spisula solidissima*). La spisule serait une des espèces de coquillages qui métaboliserait le mieux les toxines.

Un classement des coquillages en détoxifieurs lents et détoxifieurs rapides (Fig. 4) devrait aboutir à une gestion différente des épisodes toxiques selon les espèces en cause.

$$y = y_0 e^{-kt}$$



	FAST / MODERATE DETOXIFIERS	SLOW - DETOXIFIERS
CLAMS	<i>Mercenaria mercenaria</i>	<i>Saxidomus giganteus</i>
	<i>Meretrix casta</i>	<i>Saxidomus nuttalli</i>
	<i>Mya arenaria</i>	<i>Spisula solidissima</i>
SCALLOPS	<i>Pecten maximus</i>	<i>Placopecten magellanicus</i>
		<i>Patinopecten yessoensis</i>
MUSSELS	<i>Mytilus edulis</i>	
	<i>Mytilus californianus</i>	
	<i>Choromytilus palliopunctatus</i>	
	<i>Perna viridis</i>	
OYSTERS	<i>Modiolus modiolus</i>	
	<i>Crassostrea gigas</i>	
	<i>Crassostrea iridescens</i>	
	<i>Crassostrea cucullata</i>	
	<i>Ostrea edulis</i>	

Figure 4 : Modèles simples de détoxification PSP des moules (A) et des spisules (B) selon Bricelj et Shumway (1998). Classement de quelques espèces de bivalves selon leur capacité à se détoxifier rapidement des toxines paralysantes.

Application du modèle de Bricelj et Shumway

Le modèle a été appliqué à huit expériences de contamination PSP, réalisées au laboratoire PN sur la moule (*Mytilus edulis*).

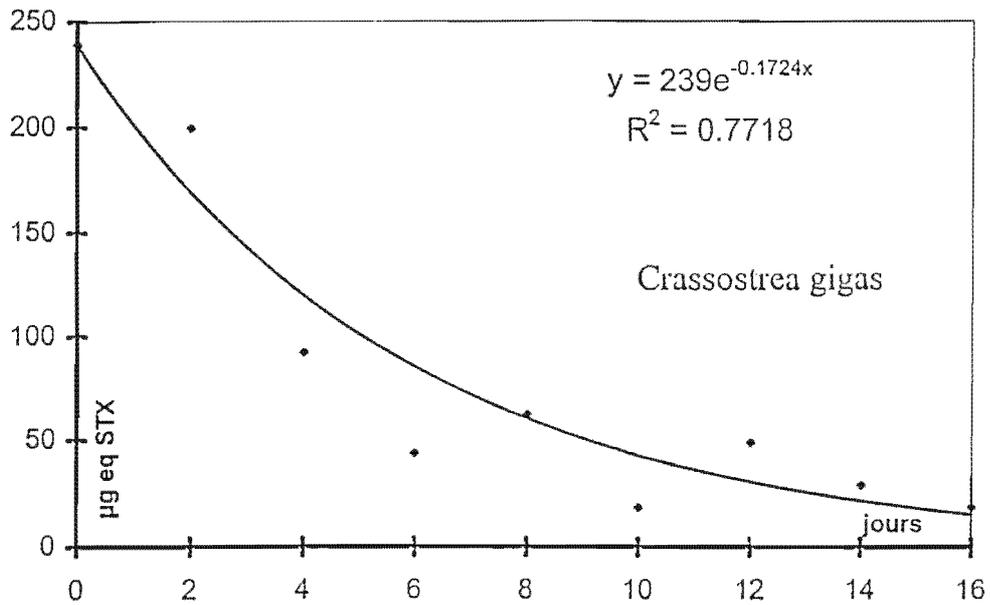
Comparaison (test d'analyse de variance) entre les pentes des droites de régression résultant de la transformation log des fonctions $y = y_0 e^{-kt}$ décrivant :

- le modèle général de Bricelj,
- les huit expériences de contamination réalisées au laboratoire.

Résultats

- Il y a une relation significative entre les variables "concentration toxinique" et "jours" au seuil de 1 %.
- Le modèle explique 98.3 % de la variabilité de y .
- Il n'y a pas de différence significative entre les pentes des droites de régression.
- Un ajustement d'un modèle non linéaire du type $y = y_0 e^{-kt}$ sur l'ensemble des 8 séries d'observations montre que l'intervalle de confiance du paramètre $-k$ inclut la valeur donnée par le modèle de Bricelj et Shumway.

La figure 5 montre que sur d'autres coquillages que la moule, à savoir l'huître et la coquille Saint-Jacques, le modèle de Bricelj marche globalement sur l'huître, mais avec une valeur de $-k$ différente ; dans le cas de la coquille Saint-Jacques, le modèle n'est pas du tout adapté.

Détoxification avec *Tetraselmis*

adultes

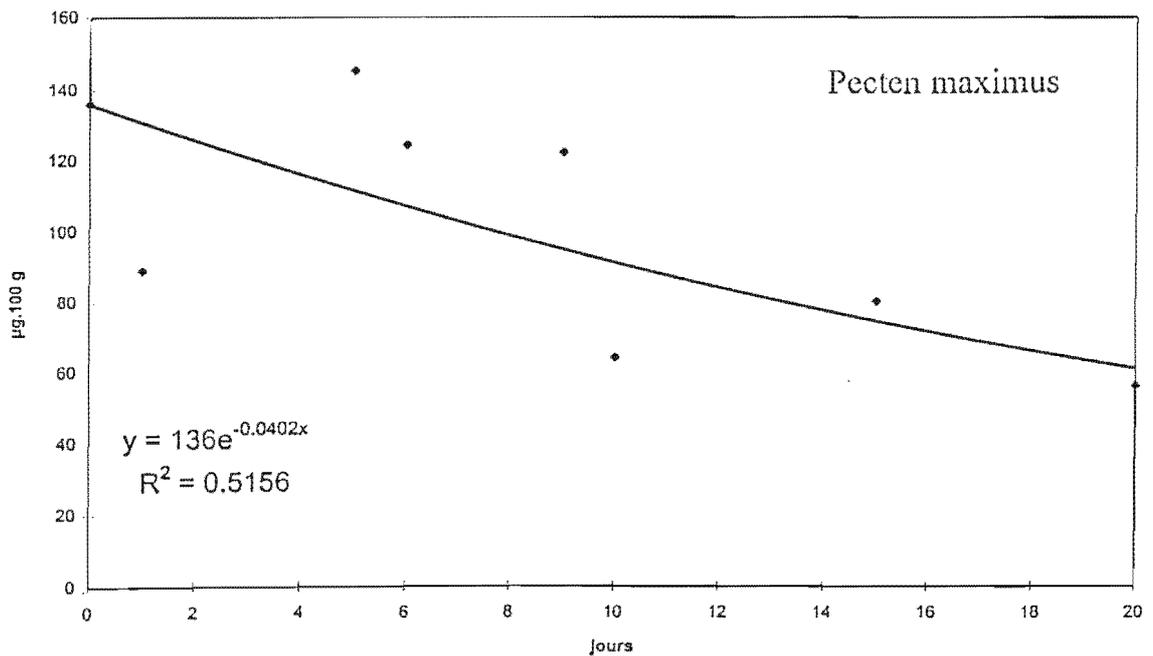


Figure 5 : Possibilités d'application du modèle du type fonction exponentielle aux résultats obtenus avec la détoxification des huîtres ou des coquilles Saint-Jacques par *Tetraselmis*.

Modèle de Blanco

Le modèle a été établi à partir de *Gymnodinium catenatum*. (Fig. 6).

Le modèle 1 est un modèle simple : la toxicité par cellule est constante, ainsi que le taux de filtration (FR) et le taux d'accumulation (AE). Le délai = 0.

Les toxicités observées sont nettement supérieures aux résultats du modèle.

Dans les modèles 2, 3 et 4, la toxicité par cellule est variable, et les autres paramètres sont constants ou variables. Le modèle 4 explique 89 % des variations observées (Fig. 7)

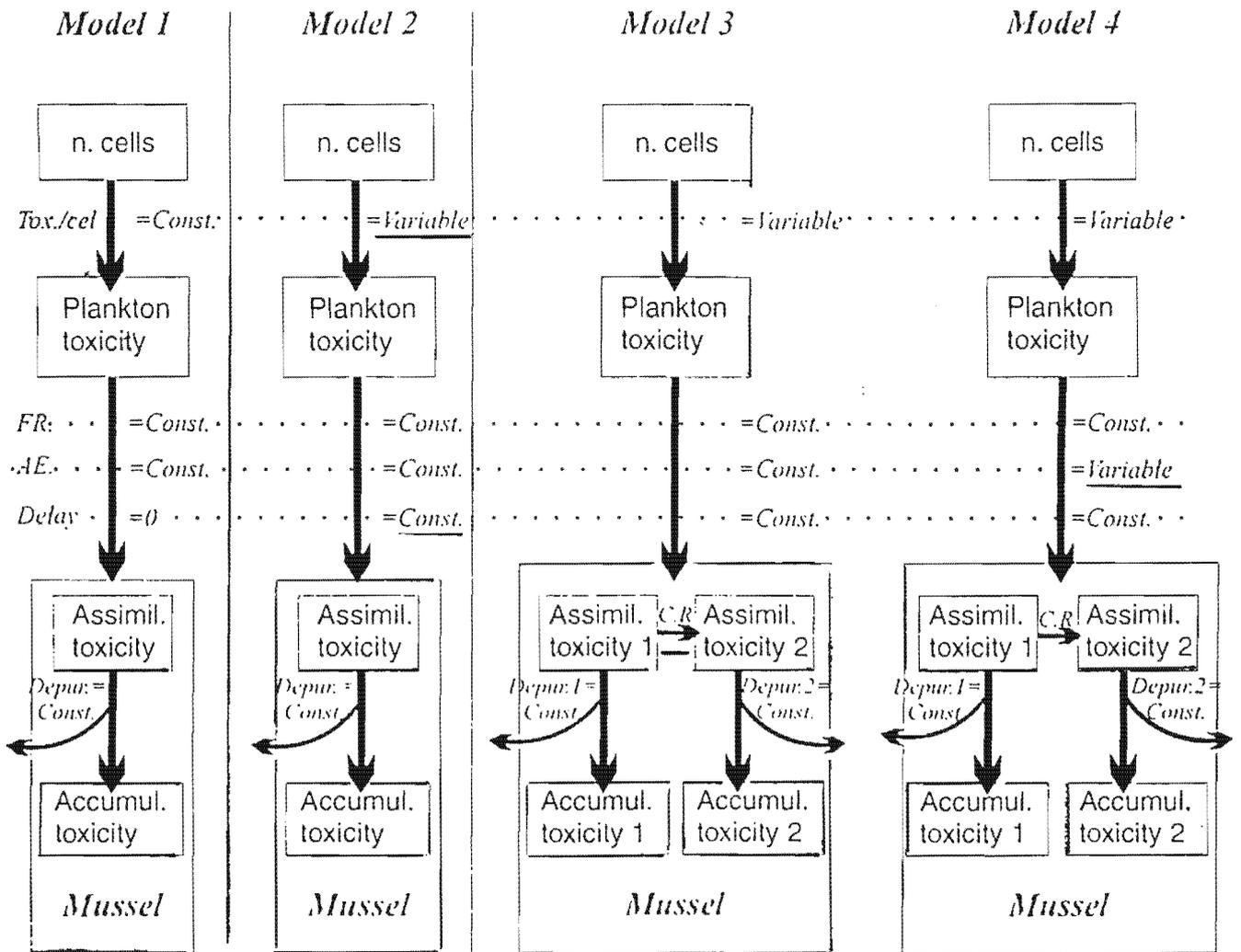


Figure 6: Modèles biologiques utilisés par Morono *et al.* (1998) pour simuler la contamination PSP des moules cultivées dans les Rias de Galice.

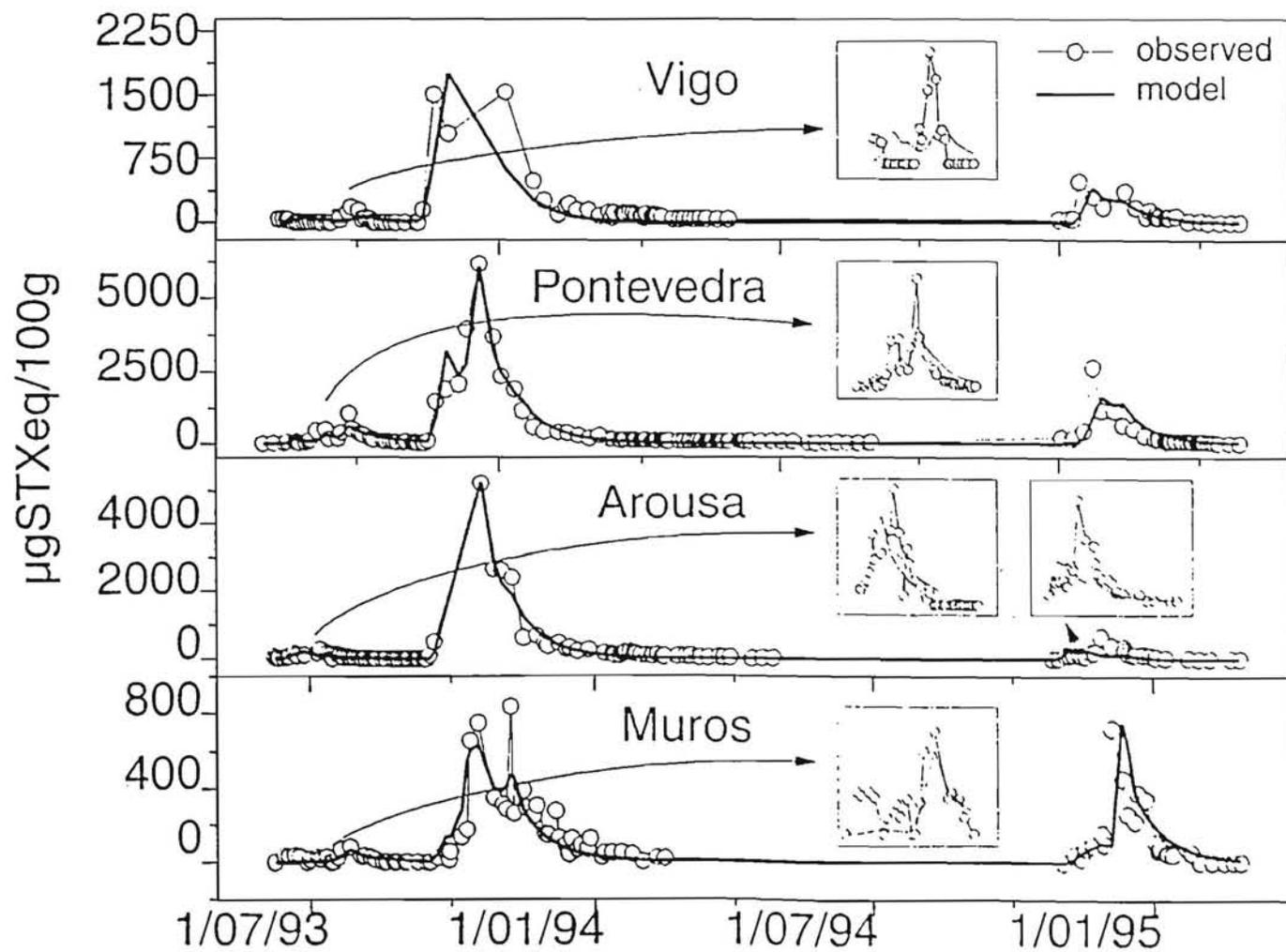


Figure 7 : Résultats du modèle à deux compartiments de Morono *et al.* (1998) : comparaison entre les données "terrain" et les données du modèle sur 4 Rias.

15. Mise en place d'une surveillance ASP (toxines amnésiantes)

Catherine BELIN et Patrick LASSUS

15.1. L'A.S.P. (Amnesic Shellfish Poisoning)

Historique - Symptômes - Toxicologie

En 1987, 153 personnes sont intoxiquées après consommation de moules provenant de l'Ile du Prince Edward (Canada). On dénombre trois décès et plusieurs dizaines de patients souffrant de troubles neurologiques persistants (plusieurs mois pour les plus de 40 ans). Les symptômes sont : vomissements, diarrhées (après 24 heures), confusion, **perte de mémoire**, désorientation, coma (après 48 heures).

L'acide domoïque (AD) est un stimulant du système nerveux central, du type acide kaïnique. Le composé se lie spécifiquement avec des récepteurs glutamate du cerveau, produisant des stimulations continues des neurones et la formation de lésions irréversibles. Un effet synergique entre l'acide domoïque et d'autres aminoacides neurotoxiques présents naturellement dans les moules est possible.

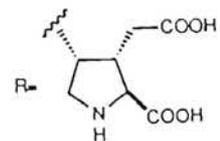
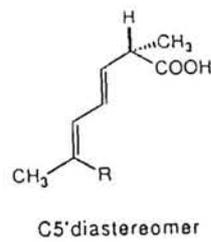
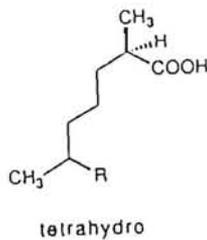
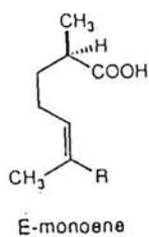
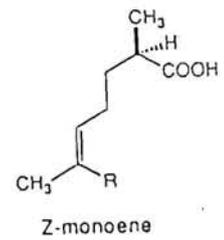
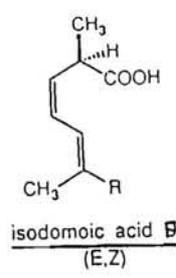
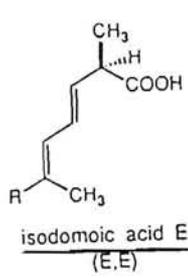
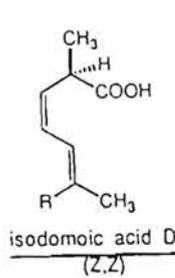
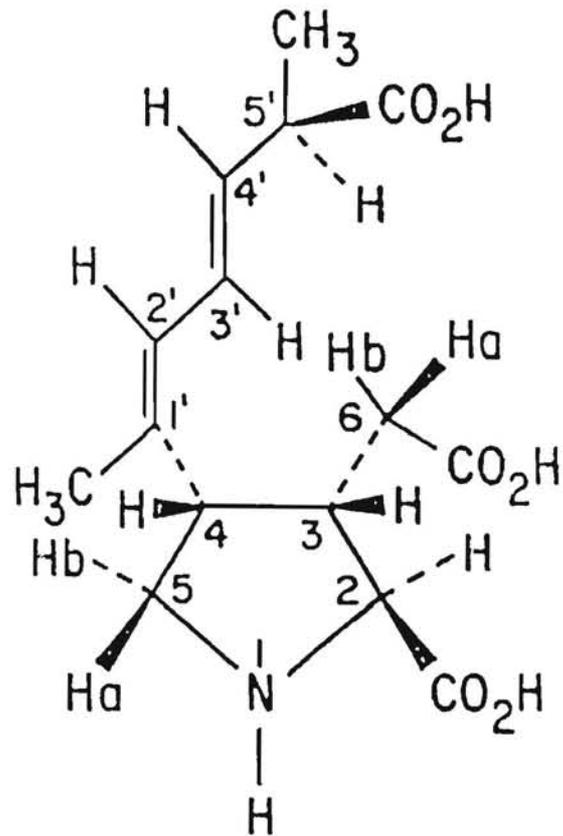
Sources

L'acide domoïque a été d'abord isolé à partir de l'algue rouge *Chondria armata*, puis a été identifié en 1975 chez *Alsidium corallinum*. Depuis les événements toxiques survenus au Canada, plusieurs espèces de micro-algues se sont révélées produire de l'A.S.P. Cependant, on ne trouve pas d'AD dans les cultures de *Pseudo-nitzschia pungens* f. *pungens*, et la production d'AD chez les autres *Pseudo-nitzschia* toxiques en culture ne se produit qu'en fin de phase de plateau.

Espèces de micro-algues (diatomées)	Références
<i>Pseudo-nitzschia pungens</i> f. <i>multiseries</i> (<i>Nitzschia pungens</i> f. <i>multiseries</i>)	Subba Rao (1988) ; Bates <i>et al.</i> (1989) ; Dickey <i>et al.</i> (1992)
<i>Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima</i> (<i>Nitzschia pseudodelicatissima</i>)	Martin <i>et al.</i> (1990)
<i>Pseudo-nitzschia australis</i> (<i>Nitzschia pseudoseriata</i>)	Buck <i>et al.</i> (1992) ; Garrison <i>et al.</i> (1992)
<i>Nitzschia actydrophila</i>	Worms <i>et al.</i> (1991)
<i>Pseudo-nitzschia seriata</i>	Lundholm <i>et al.</i> (1994)
<i>Amphora coffaeiformis</i> Cl. (Culture)	Shimizu <i>et al.</i> (1989) ; Maranda <i>et al.</i> (1990)

Espèces de macro-algues (algues rouges)	Références
<i>Chondria armata</i>	Takemoto & Daigo (1958) ; Daigo (1959°)
<i>Chondria baileyana</i>	Takemoto & Daigo (1958) ; Todd (1990)
<i>Alsidium corallinum</i>	Impellizzeri <i>et al.</i> (1975)

Domoic Acid



Structure de l'acide domoïque

Détection

Méthode de Lawrence

L'AD est extrait selon la procédure AOAC pour le PSP, et analysé par chromatographie liquide en mode isocratique avec détection UV à 242 nm.

Avantages :

- procédure d'extraction identique PSP et ASP,
- sensibilité jusqu'à 1 µg/g,
- validation AOAC.

Désavantages :

- rendement de 75 à 85 %,
- décomposition partielle de l'AD lors de l'extraction (surtout au niveau des traces),
- pas de stockage aisé de l'échantillon du fait d'une décomposition rapide de l'AD,
- durée de vie courte des colonnes chromatographiques par manque d'étape de purification préalable.

Méthode de Quilliam

Extraction en une étape avec un mélange éthanol-eau 50/50, une purification sélective et une préconcentration. Détection dans les mêmes conditions que la méthode de Lawrence.

Avantages :

- rendement de 93 %,
- extrait plus propre (pas d'interférence avec le tryptophane),
- stabilité,
- sensibilité jusqu'à 20-30 ng/g.

15.2. Pourquoi une surveillance A.S.P. ?

Extrait de la Directive 97/61/CE du Conseil du 20 octobre 1997, modifiant l'annexe de la directive 91/492/CEE fixant les règles sanitaires régissant la production et la mise sur le marché des mollusques bivalves vivants :

« 5) Au chapitre V, le point 7 *bis* suivant est inséré :
 7 *bis*) le taux de "**Amnesic Shellfish Poisoning**" (**ASP**) dans les parties comestibles des mollusques (corps entier ou toute partie consommable séparément) **ne doit pas dépasser 20 µg** d'acide domoïque par gramme **d'après la méthode d'analyse HPLC** ».

Suite à une sollicitation de la DPCM⁹ sur l'application de cette modification de la directive, **Ifremer a proposé de prendre en charge la surveillance des toxines ASP, dans le cadre du REPHY** (courrier PDG du 23 janvier 1998). Opérationnellement, la mise en œuvre de la surveillance ASP devrait se dérouler selon les étapes suivantes :

fin 1998 – début 1999 :

- mise au point des méthodes de détection par le laboratoire DEL/MP/PN (responsable : Zouher Amzil),
- récolte, par les laboratoires côtiers, et envoi d'échantillons de coquillages au laboratoire PN, lors des proliférations à *Pseudo-nitzschia* spp.

en 1999 :

- formation du personnel d'un laboratoire côtier à la méthode de détection (et équipement du laboratoire en CLHP-UV). **Le laboratoire côtier retenu est celui de Concarneau, qui a déjà développé un pôle d'expertise "phycotoxines"** en la personne de Dominique Le Gal,
- démarrage de la surveillance proprement dite avec :
 - **prélèvement de coquillages dès que le seuil de 100 000 cellules par litre de *Pseudo-nitzschia* spp. est dépassé**, et envoi au laboratoire côtier de Concarneau pour analyse CLHP-UV,
 - diffusion des résultats d'analyse selon les mêmes procédures que pour DSP et PSP.

15.3. Analyse des données *Pseudo-nitzschia* spp. stockées dans QUADRIGE

Sur 4062 échantillons comprenant un taxon du genre *Pseudonitzschia* (au 13/01/98), la répartition par espèce est la suivante :

PSNZ	<i>Pseudo-nitzschia</i> sp.	2060
PSNZDEL	<i>Pseudo-nitzschia delicatissima</i> (= <i>Nitzschia delicatissima</i>)	878
PSNZPSE	<i>Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima</i> (= <i>Nitzschia pseudodelicatissima</i>)	8
PSNZPUN	<i>Pseudo-nitzschia pungens</i> (= <i>Nitzschia pungens</i>)	14
PSNZSER	<i>Pseudo-nitzschia seriata</i> (= <i>Nitzschia seriata</i>)	1515
	total:	4062

⁹ Direction des Pêches et des Cultures Marines

Toutes ces espèces sont réputées toxiques¹⁰. En réalité, la détermination de l'espèce n'est pas possible dans les conditions d'observation du REPHY : seule l'identification par microscopie électronique (dans le cadre du PNEAT, par C. Billard ou MJ Chrétiennot-Dinet) peut être prise en compte. Ceci n'étant pas le cas pour tous les échantillons spécifiquement identifiés ci dessus, **l'analyse a été faite sur le cumul de tous les *Pseudo-nitzschia*** par échantillon.

Le **tableau 1** synthétise les maxima observés de *Pseudo-nitzschia* spp. par bassin hydrologique et par année. Les maxima supérieurs à 100 000 cellules par litre sont ombrés : il s'agit en effet de la valeur minimale retenue par les pays effectuant une surveillance ASP, pour déclencher des tests de toxicité¹⁰.

Toutes les façades du littoral français sont touchées par des efflorescences de *Pseudo-nitzschia*.

Le **tableau 2** indique le nombre d'échantillons pour lesquels une concentration supérieure à la valeur de référence de 100 000 cellules par litre a été observée, **par année** (voir **graphique 1** pour les années 1996 et 1997). Il donne ainsi une bonne **estimation du nombre de tests de toxicité** qui auraient pu être effectués chaque année. L'augmentation du nombre de résultats en 1996 et 1997 reflète sans doute en partie une augmentation de la capacité à reconnaître ces espèces, mais s'explique surtout par une sous estimation des données *Pseudo-nitzschia* sp. sur la période antérieure à la mise en service de QUADRIGE (1996).

En effet, lors du transfert des données REPHY de l'ancienne base dans QUADRIGE, certaines espèces de Nitzschia ont été recodées en espèces de Pseudo-nitzschia, conformément à l'évolution de la taxonomie (par exemple Nitzschia seriata, recodé en Pseudonitzschia seriata).

Par contre d'autres espèces de Nitzschia sont restées Nitzschia (par exemple Nitzschia longissima), et ce fut également le cas de Nitzschia sp., ce qui était légitime, puisqu'on ne pouvait a posteriori différencier ce qui pouvait être aussi bien une espèce de Nitzschia non identifiée, qu'une espèce de Pseudo-nitzschia non identifiée.

*Or, le nouveau référentiel des taxons mis en place dans QUADRIGE permet cette différenciation : **les données 1996 – 1997 sont donc beaucoup plus proches de la réalité que les données antérieures.***

On peut donc **estimer le nombre annuel de tests ASP à environ 60**, sur l'ensemble de la France.

Le **tableau 3** et le **graphique 2** indiquent le nombre d'échantillons pour lesquels une concentration supérieure à 100 000 cellules par litre a été observée, **par mois, toutes années confondues.**

Les blooms se répartissent sur six mois de l'année, avec un pic au printemps (avril-mai).

¹⁰ Design and Implementation of some Harmful Algal Monitoring Systems.- IOC technical series n°44, UNESCO, 1996

Tableau 1 : *Pseudo-nitzschia* spp., concentration maximum par bassin et par année (en cellules par litre)

Bassin hydrologique	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997
001 Dunkerque - Calais									200	46200	87150
002 Baie de Wissant			3500	12600							
003 Boulonnais			2100	16800	2152700	37500	28000	36750	48300	262500	562800
006 Baie de Somme		28000	3900	503400	285625	10000	140625	400	165000	832500	1506250
010 Antifer			1000								52600
012 Baie de l'Orne											40800
013 Courseulles - Port Bessin			115000	2900	1200						23600
014 Baie des Veys			9800		34800	800				41600	4300
015 Ravenoville - Saint Vaast			1500	500	100	600					
018 Flamanville			8000	4400	400					3400	
020 Pirou - Agon											3700
021 Hauteville - Granville			300	800		300				32000	30000
023 Baie du Mont Saint Michel	2000	7600	121600	22600	1800	8600	30200	141400		70000	
024 Rance		20400									
025 Arguenon - Fresnaye	600	6900	14400	233800	6000	13600	13600	8800	42800	6400	2800
027 Baie de Saint Briec			8800	133000	52800	12200	565500	43600			
029 Paimpol - Trieux - Bréhat	1200	105600	6000	42600	8600	4400	22000	30400	48400	12200	7600
030 Jaudy			800		7200	3000					
032 Lannion - Locquirec						65600		159000	0	0	786000
033 Baie de Morlaix	13000	4500	3400	280000	58000	28000	26600	26400	288400	39400	75800
035 Les Abers		5100									88200
036 Irolse					200						10000
037 Elorn	800	300	3200	1600	9800	8800	27000	20200	28600	28600	49800
038 Aulne	10000	106000							31600	125600	70800
039 Baie de Douarnenez	75000	21000	5600	31200	12400	51000	145200	215200	67000	76800	46200
040 Baie d'Audierne					800					2256000	825000
041 Iles de Glénan	15200	14600	45200	1600000	106200	16100	1339900	250200	349200	1880000	314200
042 Bénodet											52900
043 Concarneau		400		25000	600				280800	1032000	33800
044 Aven, Belon et Laita		200			100						133000
045 Rade de Lorient							9200			78000	400000
047 Rivière d'Étel	4100					15400	300			300000	4200
049 Baie de Quiberon	14700							7800	520000	900000	350000
050 Le Pô										0	4200
052 St Philibert-Le Breneguy											40600
054 Golfe du Morbihan										0	0
055 Plateau de la Recherche										0	16400
056 Rivière de Peneuf										32000	400
057 Baie de Vilaine	5500	23600	312400	216600	19200	37400	55500	28300	42000	1200000	465000
059 Traicts du Croisic		46000	353000	260000	72600	189300	38200	32300	548800	198800	166600
060 Estuaire de la Loire						29500				170500	392000
061 Baie de Bourgneuf	1800	48800	50400	2600	3600	7100	35100	22000	73600	38000	33500
062 Vendée Nord						200	1600		143800	1200	76000
063 Olonne											13900
064 Les Sables - Le Payre										400	15800
065 Pertuis Breton							4600	800	32600	63000	25000
066 Baie de l'Aiguillon	11000						400	1600		82000	7500
068 Chatelaillon - Ile d'Aix	1000						1000		3000	6200	17000
070 Nord Marennes Oléron			8100			97000	60000	90800	23800	28600	23800
071 Sud Marennes Oléron		53000	7500			66000	45000	58200	29600	81000	282600
075 Estuaire amont Gironde											1600
076 Côte Océane					142100	7400		4184000			
077 Bassin d'Arcachon	13300	746100	50400	122300	37900	52300	64600	112500	70200	150300	515000
078 Côte Landaise				45000	6600						5600
079 Côte Basque								4300			
081 Côte Audoise			1100	20800	300000	13000	98000	44600	2600	112400	200000
083 Etang de Salses-Leucate	600	2100	1200	78600	16900	4900000	11100	19800	785000	16800	110000
087 Etang de Thau	9400	18000	24000	12000	180000	63000	46400	1800	64200	1120000	2250000
088 Côte Languedocienne		1802900	40800	40600	569600	120500	106000	55800		337000	10000000
089 Etangs Palavasiens				1800							0
093 Côte Camarguaise						71800	596400		287400	890000	171000
094 Golfe de Fos	17400	15000				112800	13800	5000	67400	423800	2540000
095 Berre - Vaine									6000	874000	1683000
100 Rade de Toulon	1000	1800				4400	3400		48200	219400	591600
105 Golfe de Saint Tropez									135400		
109 Baie des Anges									0	3800	7600
114 Etangs de Diana - Urbino	6200	1000				160000	1636000		58000		

Tableau 2 : *Pseudo-nitzschia* spp., nombre de résultats pour lesquels une concentration > 100 000 cellules par litre a été observée, par année

Laboratoire côtier	Bassin hydrologique	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997
Boulogne	003 Boulonnais			3						3	1
	006 Baie de Somme			5	3		1		1	1	3
Port en Bessin	013 Courseulles - Port Bessin		1								
St Malo	023 Baie du Mont Saint Michel		1					1			
	025 Arguenon - Fresnaye			1							
	027 Baie de Saint Brieuc			1			1				
	029 Paimpol - Trieux - Bréhat	1									
	032 Lannion - Locquirec							1			2
Concarneau	033 Baie de Morlaix			1					1		
	038 Aulne	1								1	
	039 Baie de Douarnenez						3	2			
	040 Baie d'Audierne									2	1
	041 Iles de Glénan			4	1		5	1	3	2	3
	043 Concarneau								1	1	
044 Aven, Belon et Laita										1	
La Trinité	045 Rade de Lorient										2
	047 Rivière d'Étel									1	
	049 Baie de Quiberon								3	7	4
Nantes	057 Baie de Vilaine		1	1						13	4
	059 Traicts du Croisic		2	3		1			2	2	2
	060 Estuaire de la Loire									1	3
	062 Vendée Nord								1		
La Tremblade	071 Sud Marennes Oléron										2
Arcachon	076 Côte Océane				1			1			
	077 Bassin d'Arcachon	2		1				1		1	4
Sète	081 Côte Audoise				1					1	2
	083 Etang de Salses-Leucate					1			1		1
	087 Etang de Thau				2					4	4
	088 Côte Languedocienne	1			2	1	1			3	3
Toulon	093 Côte Camarguaise						2		1	5	1
	094 Golfe de Fos					1				4	9
	095 Berre - Vaine									3	4
	100 Rade de Toulon									2	1
	105 Golfe de Saint Tropez								1		
Corse	114 Etangs de Diana - Urbino					1	5				
Total par année		5	5	17	13	5	18	7	15	57	57

voir le graphique 1 pour les années 1996 et 1997

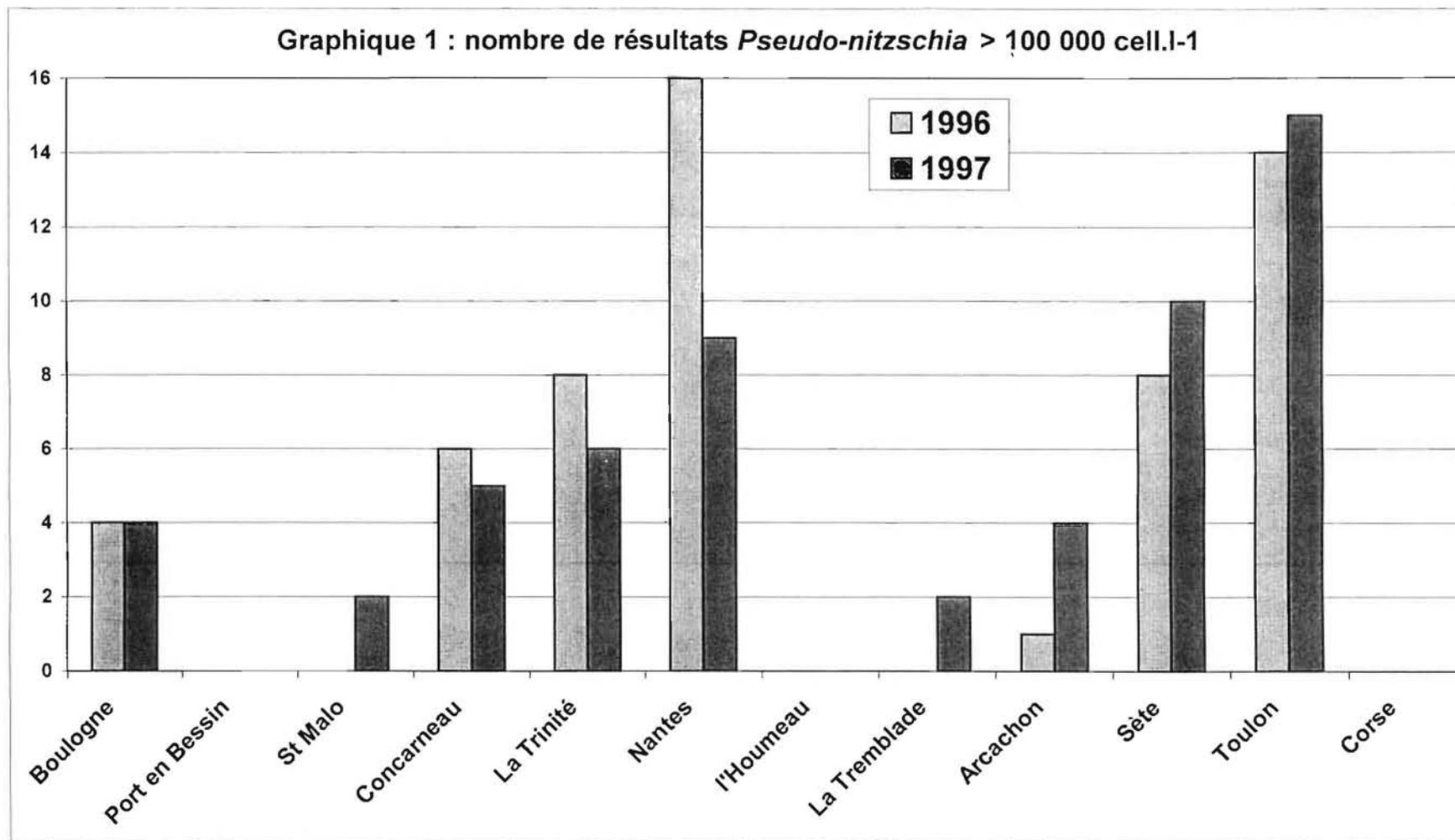
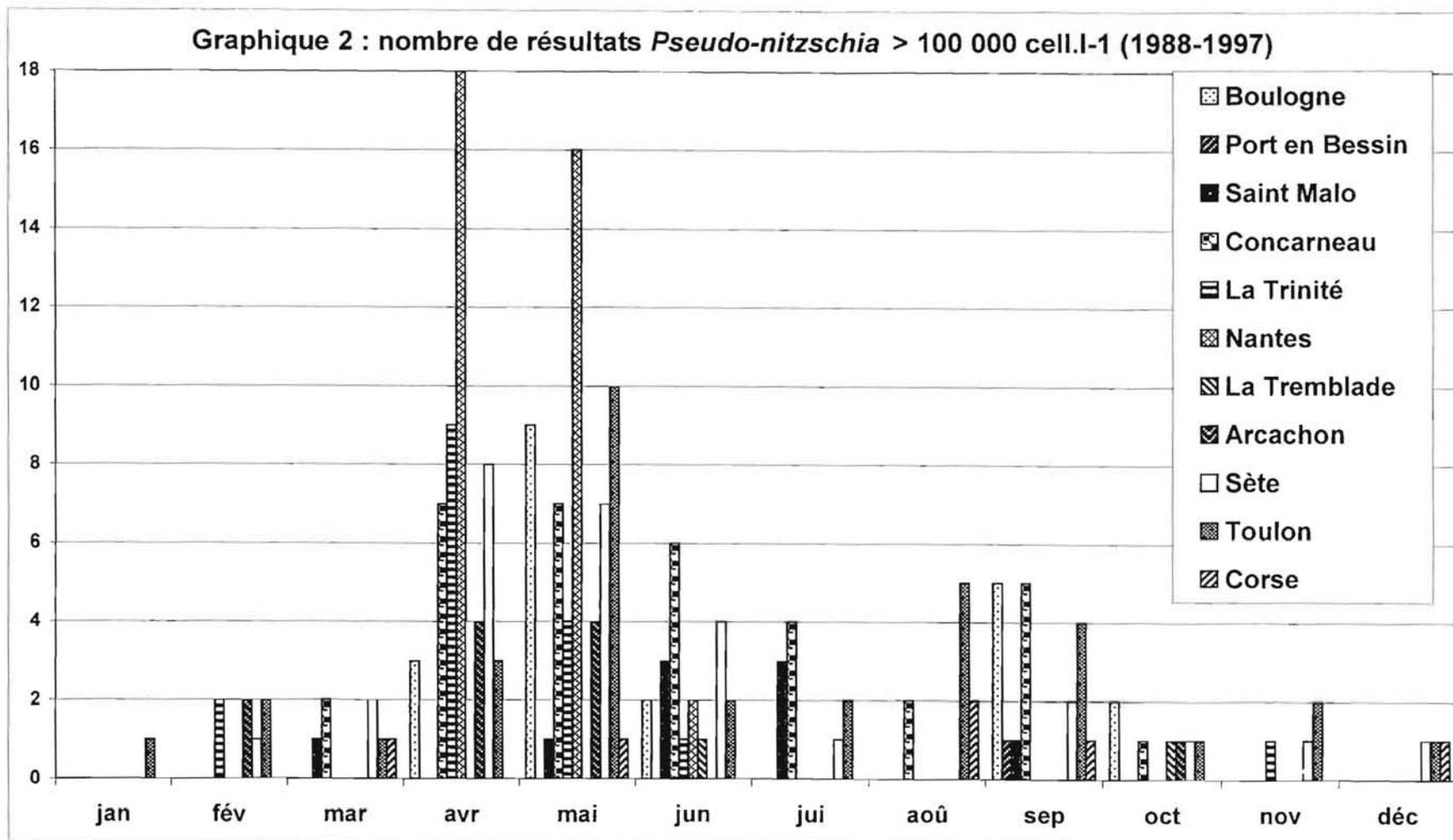


Tableau 3 : *Pseudo-nitzschia* spp., nombre de résultats pour lesquels une concentration > 100 000 cellules par litre a été observée, par mois (1988-1997)

Laboratoire côtier	Bassin hydrologique	jan	fév	mar	avr	mai	jun	jui	aoû	sep	oct	nov	déc
Boulogne	003 Boulonnais				2	3	1				1		
	006 Baie de Somme				1	6	1			5	1		
Port en Bessin	013 Courseulles - Port Bessin									1			
St Malo	023 Baie du Mont Saint Michel						1	1					
	025 Arguenon - Fresnaye						1						
	027 Baie de Saint Briec			1			1						
	029 Paimpol - Trieux - Bréhat					1							
	032 Lannion - Locquirec							2		1			
Concarneau	033 Baie de Morlaix						1	1					
	038 Aulne					1	1						
	039 Baie de Douarnenez				1	1	1		2				
	040 Baie d'Audierne				1			2					
	041 Iles de Glénan			2	4	4	3	1		4	1		
	043 Concarneau				1	1							
	044 Aven, Belon et Lâita									1			
La Trinité	045 Rade de Lorient				1	1							
	047 Rivière d'Étel						1						
	049 Baie de Quiberon		2		8	3						1	
Nantes	057 Baie de Vilaine				10	9							
	059 Traicts du Croisic				4	6	2						
	060 Estuaire de la Loire				3	1							
	062 Vendée Nord				1								
La Tremblade	071 Sud Marennes Oléron						1				1		
Arcachon	076 Côte Océane					2							
	077 Bassin d'Arcachon		2		4	2					1		
Sète	081 Côte Audoise				3								1
	083 Etang de Salses-Leucate		1			1		1					
	087 Etang de Thau				1	3	4			2			
	088 Côte Languedocienne			2	4	3					1	1	
Toulon	093 Côte Camarguaise		1		1	4	2		1				
	094 Golfe de Fos			1	1	6		1	2	2	1		
	095 Berre - Vaine	1			1					2		2	1
	100 Rade de Toulon							1	2				
	105 Golfe de Saint Tropez		1										
Corse	114 Etangs de Diana - Urbino			1		1			2	1			1
Total par mois sur 10 ans		1	7	7	52	59	21	10	9	19	7	4	3

voir le graphique 2



16. Présence de phycotoxines en Europe

Catherine BELIN

Une cartographie des épisodes toxiques associés à des efflorescences phytoplanctoniques est réalisé tous les ans par le Groupe de Travail CIEM « ICES / IOC **WG on Harmful Algal Blooms Dynamics** » (WG HABD).

Le but de cette cartographie est d'obtenir une vision globale et synthétique de ces épisodes sur la période des dix dernières années. Les données proviennent des différents pays CIEM qui fournissent les résultats sur cartes. La mise en forme finale est faite à Ifremer / Nantes avec ArcInfo.

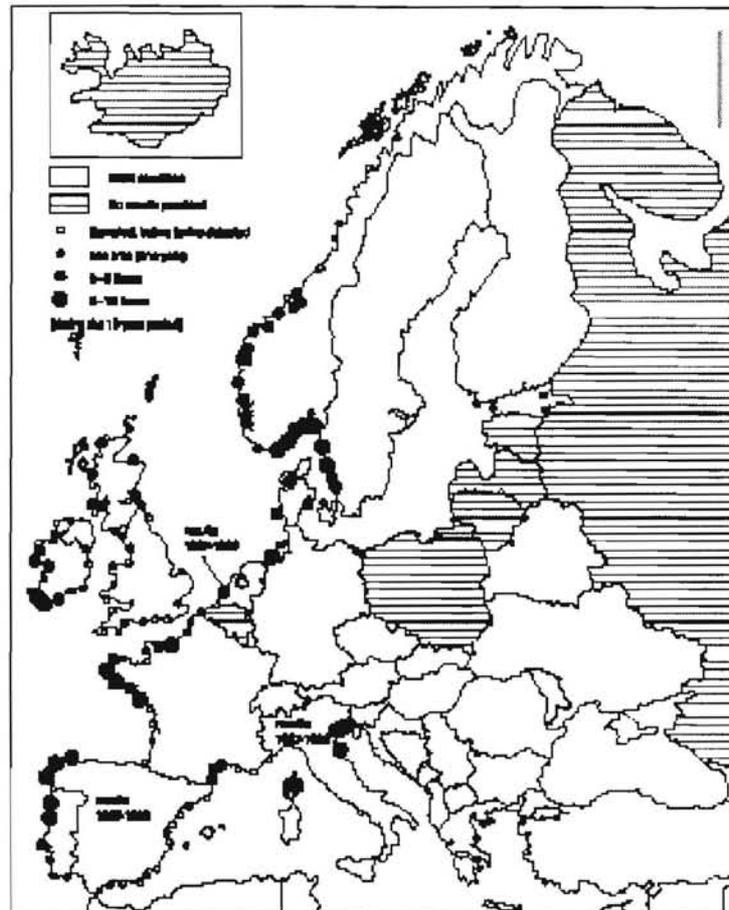
Les informations portées sur les cartes concernent la fréquence sur dix ans des événements : **présence de toxines**, ou **observation de mortalités** animales et végétales, sans tenir compte du niveau de toxicité. Les différents types d'événements sont : DSP, PSP, ASP, NSP, CFP, mortalités animales et végétales, autres (cyanobactéries...). Chaque type d'événement est présenté sur des cartes séparées, l'Europe et l'Amérique du Nord faisant également l'objet de cartes différentes.

Ces cartes seront mises à disposition sur le serveur surveillance de l'Ifremer. Elles seront révisées tous les ans. Les cartes actuellement disponibles sont relatives à la période 1988-1997 :

- Carte 1 : pays membres du CIEM en Europe, zones de surveillance régulière
- Carte 2 : présence de DSP (Diarrhetic Shellfish Poison) en Europe
- Carte 3 : présence de PSP (Paralytic Shellfish Poison) en Europe
- Carte 4 : présence d'ASP (Amnesic Shellfish Poison) en Europe
- Carte 5 : observation de mortalités animales ou végétales en Europe
- Carte 6 : observation d'autres effets toxiques (cyanobactéries...), en Europe
- Carte 7 : pays membres du CIEM en Amérique du Nord, zones de surveillance régulière
- Carte 8 : présence de PSP (Paralytic Shellfish Poison) en Amérique du Nord
- Carte 9 : présence d'ASP (Amnesic Shellfish Poison) en Amérique du Nord
- Carte 10 : présence de NSP (Neurotoxic Shellfish Poison) en Amérique du Nord
- Carte 11 : observation de mortalités animales ou végétales en Amérique du Nord
- Carte 12 : présence de CFP (Ciguatera Fish Poison) en Amérique du Nord

Un exemple de carte (carte 2) est donné ci dessous.

Présence de DSP (1988-1997)



17. QUADRIGE, mise au point concernant les données REPHY

Catherine BELIN

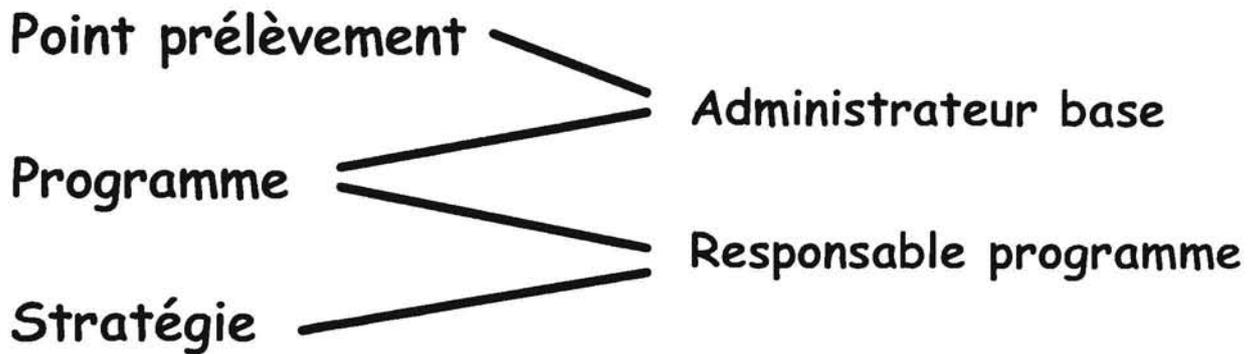
Une mise au point est faite sur : demandes de mises à jour (points de prélèvement, programmes, stratégies), saisie, validation, extraction, événements.

17.1. Mise à jour des points de prélèvements, programmes, stratégies

Voir les deux pages suivantes pour la **description des responsabilités** relatives aux points, programmes et stratégies.

Les fiches modèles pour les échanges entre la coordination REPHY et les laboratoires côtiers, concernant les mises à jour (création d'un point, rattachement d'un point au programme REPHY, modification d'un point, modification d'une stratégie...) font l'objet d'**annexes au Plan Qualité REPHY** envoyé en juillet 1998 à tous les laboratoires côtiers.

QUADRIGE



Modification des informations d'un point de prélèvement

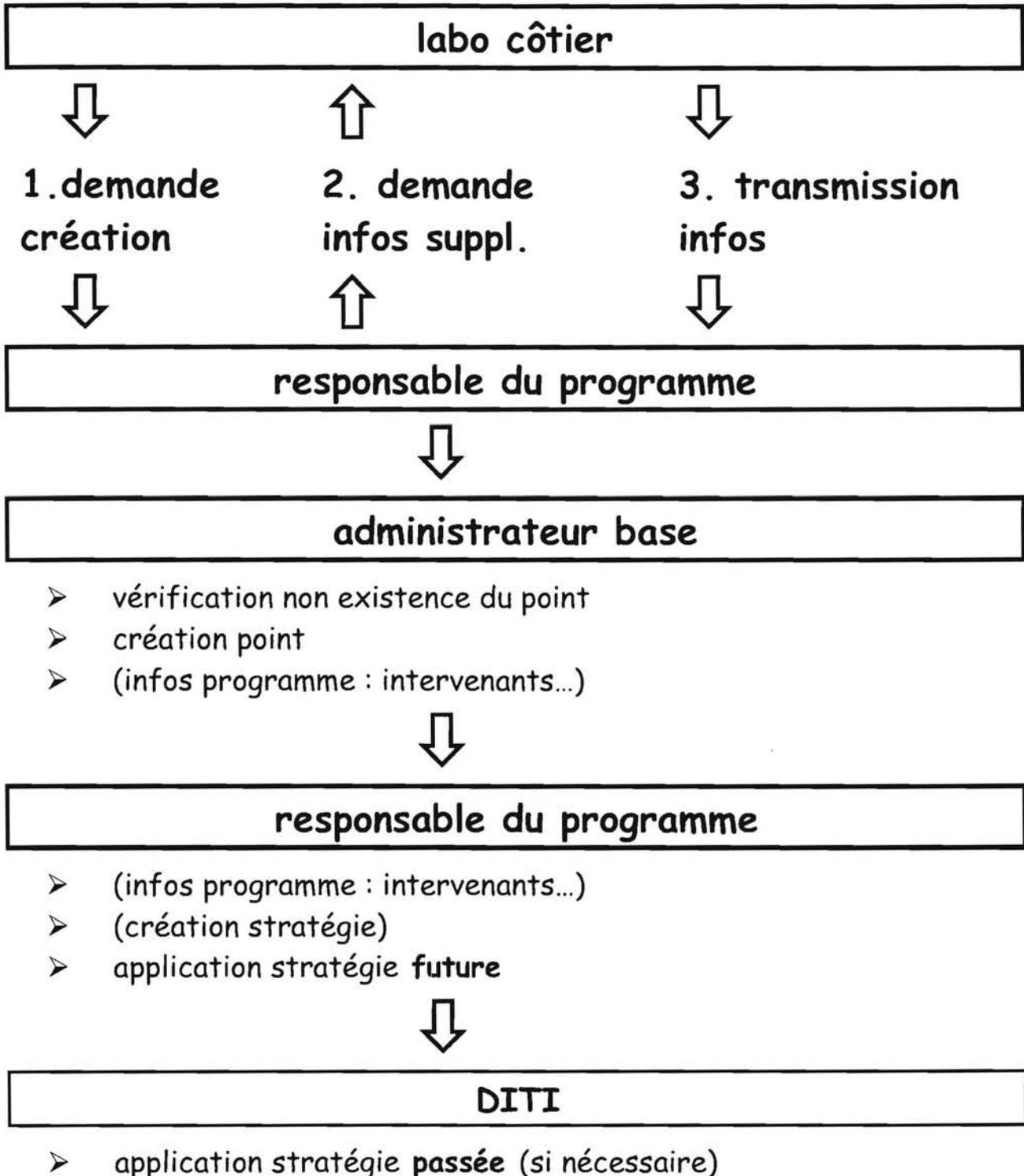
nom, taxons présents, type ressource...

⇒ accord demandé à tous les responsables de programmes auxquels est rattaché le point

Rattachement d'un point existant à un autre programme



responsable du nouveau programme

Création d'un point de prélèvement

17.2. Saisie des résultats

Rappel de quelques définitions

dans les informations du **point** :

bathymétrie = mesure de la profondeur marine, à trouver sur les cartes marines. Permet de séparer, entre autres, les points qui émergent et ceux qui n'émergent jamais.

dans les informations de la **station** :

sonde = hauteur d'eau au moment du prélèvement.

dans les informations du **prélèvement**

immersion = profondeur du prélèvement

☞ saisir immersion (prélèvement ponctuel) **OU** immersion mini + immersion maxi (prélèvement d'une colonne d'eau)

niveau = appréciation de la profondeur du prélèvement. C'est la même chose que l'immersion, mais en moins précis.

par exemple : émergé, surface (0-1m), mi-profondeur, fond/sonde-1m, colonne d'eau, 2 mètres, 5 mètres...

la **surface** est la tranche d'eau comprise entre la surface et -1m

le **fond** est la tranche d'eau comprise entre le fond et le fond-1m

Pour REPHY, l'information importante est l'immersion.

Ecrans de saisie station, prélèvement, échantillon, résultat

Tous les écrans sont revus un par un, ainsi que les consignes de saisie pour REPHY : **toutes ces consignes sont décrites dans le manuel utilisateur QUADRIGE**. Des fichiers d'erreurs relevées dans la base sont fournis à tous les laboratoires côtiers pour correction. En particulier :

- ne jamais saisir de résultats sur la station, ni sur le prélèvement : tous les résultats sont saisis au niveau de l'échantillon,
- dans l'écran échantillon, attention au « support » et au « taxon support »,
- dans l'écran résultats de mesures, attention aux changements de méthodes, à la fraction ; tenir compte du seuil de détection et de la précision affichés de la méthode, pour saisir les résultats,
- dans l'écran résultats de dénombrements, attention aux taxons non phytoplancton, et aux taxons en double dans une même liste.

17.3. Événements

Pour REPHY, un événement doit être décrit quand l'information ne peut pas être saisie en tant que résultat : c'est le cas des **eaux colorées**, et des **mortalités d'animaux marins**, qui demandent une description en texte (couleur de l'eau, étendue géographique, conséquences, animaux touchés, etc)

L'observation d'une espèce toxique ne doit pas faire l'objet d'un événement, car le résultat saisi dans la liste floristique suffit en soi. Il en est de même pour les blooms, quand ils ne conduisent pas à une eau colorée : l'information quantité de cellules est incluse dans le résultat.

Différents types d'événements peuvent être actuellement documentés dans QUADRIGE :

- Eau colorée
 - Mortalités d'animaux marins
 - Météorologie
 - Pollution
 - Prélèvements supplémentaires → **ne pas utiliser pour REPHY**
- seuls ces types d'événements
doivent être renseignés pour REPHY**

En effet, les critères d'extraction des événements (bassin, date, type d'événements) ne permettent pas de sélectionner le contexte à l'intérieur d'un type d'événement : les prélèvements supplémentaires associés aux différents réseaux sont ainsi mélangés.

Ont été fournis à chaque laboratoire côtier :

- les différentes descriptions rencontrées pour chacun des types d'événements ne concernant pas REPHY, pour information ; en effet il y a quelques problèmes d'homogénéité dans les formats des descriptions (majuscules/minuscules, blancs en trop...)
- **la liste complète de tous les événements** saisis dans QUADRIGE (état mars 1998), **relatifs aux deux types « eau colorée » et « mortalités »**, pour correction éventuelle (corrections de forme ou problèmes de rattachement de bassins...),

Un exemple de cette dernière liste est donnée ci dessous.

Exemples d'événements « eau colorée »

Description	début	fin	bassins
De Biarritz à la pointe de Fontarrabie.	14/05/89	21/05/89	079
Trainés à 2500m au large, en progression vers la côte.			
Couleur ocre à orangé			
Coloration orangée dans le chenal d'accès au port et au lac.	13/06/89		078
Eaux brun-rouge sombre, nappes d'environ 200 m de large s'étirant parallèlement à la côte et dérivant du Nord vers le Sud.	06/09/89		076 078
Eaux rouges.	03/09/90		078
Perturbation terminée le 18/09/90			
Eaux rouges , nappe d'environ 12 km de long.	10/05/94		076
Eaux rouges , plusieurs nappes sur secteur très large.	21/06/94		076 077 078
Eaux rouges.	14/04/95	18/04/95	078 079
Eaux rouges.	11/05/95	12/05/95	079
Espèce responsable: Noctiluca scintillans			

17.4. Validation

Les résultats non validés ne sont accessibles qu'à un très petit nombre de personnes : généralement l'accès en est limité au personnel du laboratoire saisisseur et au responsable du programme. C'est pourquoi il est important de lancer régulièrement l'opération de validation.

Les résultats validés ne sont plus accessibles en modification : il est donc nécessaire de vérifier toutes les saisies avant validation. Les demandes de dévalidation doivent rester exceptionnelles (la procédure de dévalidation ne peut être mise en œuvre que par l'administrateur QUADRIGE).

17.5. Extraction de résultats

Voir dans le **chapitre 1** des **exemples de sélections pour extraction de données REPHY**. Des exemples d'utilisation des fichiers obtenus, ainsi que des **traitements simples du type tableau croisé (EXCEL)**, ou **analyse croisée (ACCESS)**, y sont également donnés.

Le **n° d'échantillon est très important** dans la sélection pour l'extraction de résultats de dénombrement (listes floristiques). En effet, la saisie des résultats dans l'ancienne base les premières années, a souvent conduit à la saisie de plusieurs échantillons pour un même point/date : il est donc nécessaire de les différencier.

Le produit d'extraction nouvellement mis en service permet une **sélection fine des taxons, lors de l'extraction de résultats de dénombrement** : il permet en effet, de choisir un taxon **avec ou sans ses descendants** dans la liste hiérarchisée des taxons. Par exemple, dans la liste ci dessous :

```

.....
CLA  Dinophyceae
      ORD Dinophysales
            FAM Dinophysaceae
                  GEN Amphisolenia
                  GEN Dinophysis
                        SP Dinophysis acuminata + D. cf. acuminata
                        SP Dinophysis acuta
                        .....
                  GEN Metaphalacroma
                        .....
      ORD Ebriales
.....
ORD Gymnodiniales
      FAM Gymnodiniaceae
            GEN Amphidinium
                  SP Amphidinium carterae + A. klebsii
                  SP Amphidinium crassum
            GEN Gymnodinium
                  SP Gymnodinium breve + G. cf. breve
                  SP Gymnodinium catenatum
                  SP Gymnodinium cf. nagasakiense (= G. mikimotoi = ....)
                  SP Gymnodinium chlorophorum (= G. 'sp.1982')
                  SP Gymnodinium splendens (= G. sanguineum)
            GEN Gyrodinium
.....

```

le choix :

- CLA *Dinophyceae* + descendants, conduira à l'extraction des résultats relatifs à TOUS les taxons situés au niveau, et en dessous de *Dinophyceae*,
- GEN *Dinophysis* **sans** descendants : seulement les résultats saisis sous le genre *Dinophysis*, mais pas ceux relatifs aux espèces de *Dinophysis*,
- GEN *Gymnodinium* + descendants : les résultats du genre et des différentes espèces de *Gymnodinium*.

18. Méthodes illustrées

Antoni CARRERAS

Quelques exemples de méthodes illustrées (CorelDraw) sont données ci dessous : réglage d'un microscope, utilisation d'un oxymètre, mesure de la chlorophylle (du prélèvement à l'analyse), prélèvement pour l'analyse de sels nutritifs.

MICROSCOPE INVERSÉ OLYMPUS INT-2

Réglages

**IFREMER**
A.C. DEL / ST SETE
27/08/96

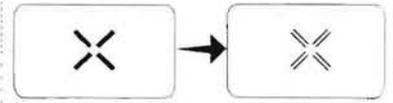
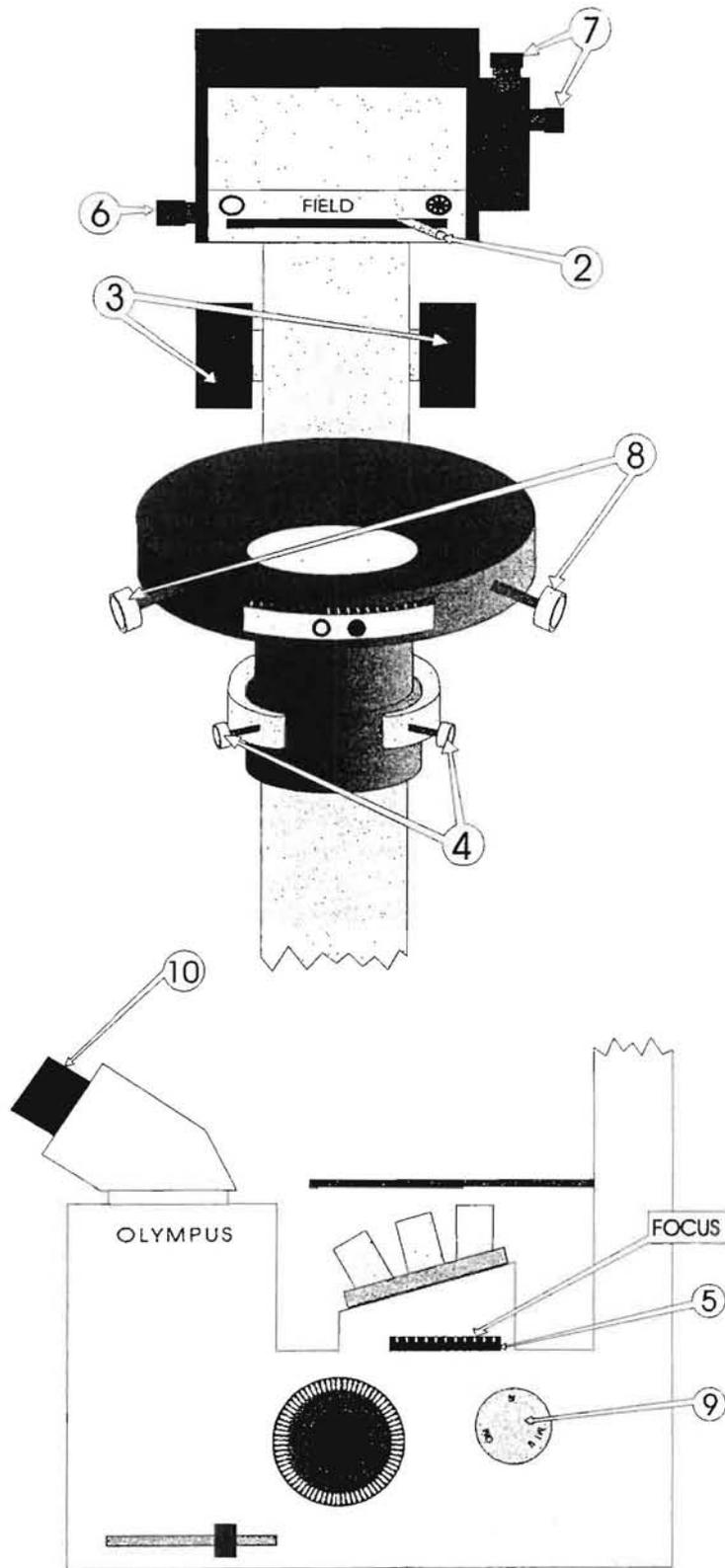


Fig A

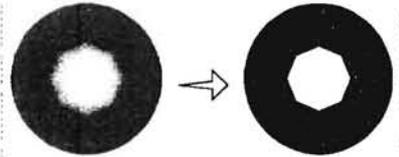


Fig B

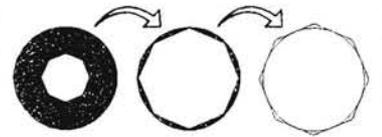


Fig C

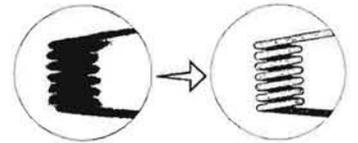


Fig D

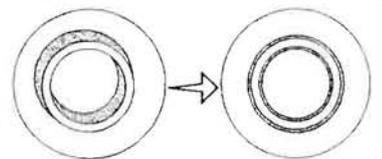


Fig E

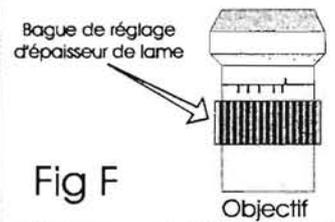


Fig F

IFREMER
A.C. DEL / ST SETE
27/08/96

Microscope

CORRECTION BINOCULAIRE

- ★ Tout en observant dans le tube binoculaire, faire coulisser les montures des oculaires jusqu'à obtention d'une vision binoculaire parfaite. On peut noter son écartement pupillaire sur l'échelle située entre les oculaires pour ne pas avoir à répéter l'opération

CORRECTION DIOPTRIQUE

- ★ Placer le sélecteur de lumière ☉ sur la position **OM**
- ★ En regardant par l'oculaire de mise au point (**le droit**) on observe la **figure A**
- ★ Sans changer d'oculaire, faire la netteté sur le rectangle
- ★ Regarder ensuite par l'oculaire gauche (ou les deux) et tourner la bague de correction dioptrique ⑩ afin de séparer parfaitement les doubles lignes de la croix placée au centre du rectangle

CENTRAGE DU CONDENSEUR

- ★ Enlever les filtres
- ★ Placer la tourelle ① en position ○⊗
- ★ Faire la mise au point sur un échantillon
- ★ Fermer le diaphragme de champ **FIELD** (levier ②)
- ★ Régler la hauteur du condenseur à l'aide des boutons ③ jusqu'à obtenir l'image de l'octogone nette (**Fig B**)
- ★ Amener cette image au centre à l'aide des boutons de centrage ④
- ★ Rouvrir le diaphragme de champ ② pour vérifier que l'octogone s'inscrive exactement dans le cercle du champ puis continuer afin de le faire sortir juste en dehors du cercle(côtés de l'octogone tangents) (**Fig C**)

CENTRAGE DE L'AMPOULE

- ★ Tourner le changeur de grossissement ⑤ en position **CT**
- ★ Régler le diaphragme d'ouverture de la tourelle ① de façon à voir l'anneau
- ★ Faire la netteté sur l'anneau à l'aide de la molette **FOCUS** située sur le changeur ⑤
- ★ Desserrer la vis de fixation du boîtier lampe ⑥ et coulisser ce dernier jusqu'à obtention d'une image nette du filament (opération difficile)
- ★ Le centrer si nécessaire avec les boutons ⑦ (**Fig D**)
Remettre le filtre dépoli

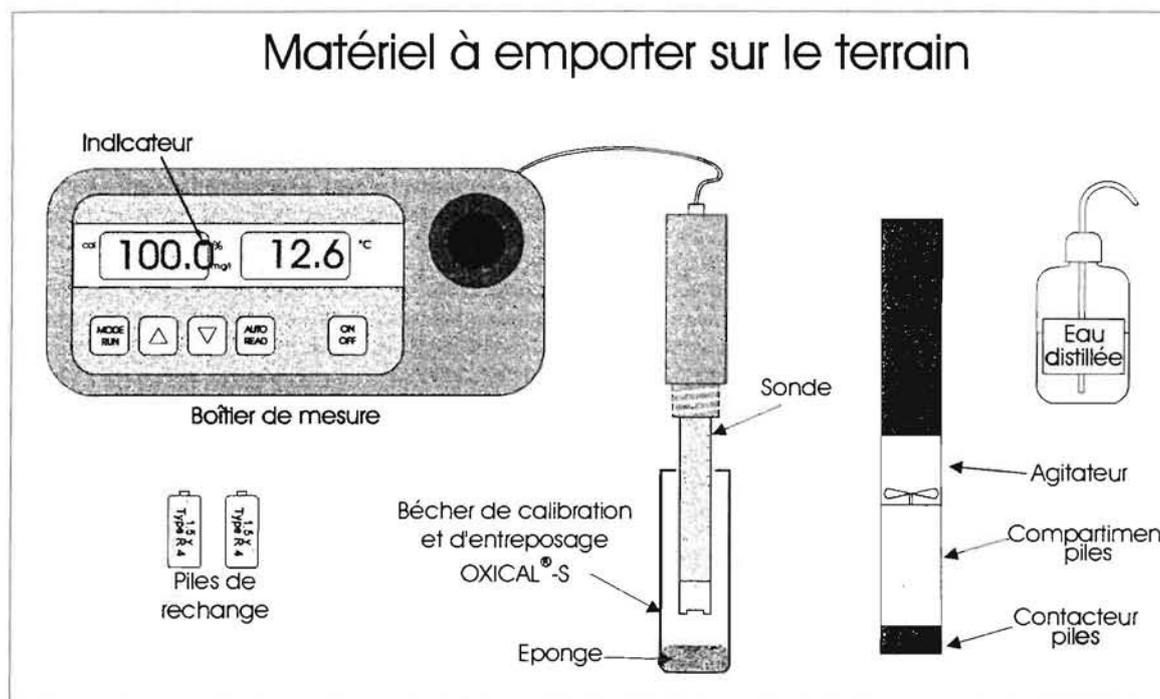
CENTRAGE DE L'ANNEAU DE PHASE CLAIR

- ★ Choisir l'objectif voulu et faire la mise au point sur un échantillon
- ★ Remettre le changeur de grossissement sur **CT**, et faire la netteté sur l'anneau à l'aide de la molette **FOCUS**
- ★ Tourner la tourelle ① dans la position correspondant à l'objectif utilisé
- ★ Centrer l'anneau clair par rapport au foncé à l'aide des boutons ⑧ (il faut être très doux) (**Fig E**)
- ★ Répéter ces opérations pour chaque objectif

IMPORTANT

- ★ Penser à régler l'épaisseur de lame (objectifs 20 et 40). Les fonds de cuves font de 0.13 à 0.17 mm (**Fig F**)

Utilisation de l'Oxymètre WTW LF 196



CALIBRATION

Mettre la sonde dans le bécher de calibration

Allumer l'appareil avec le bouton On-Off

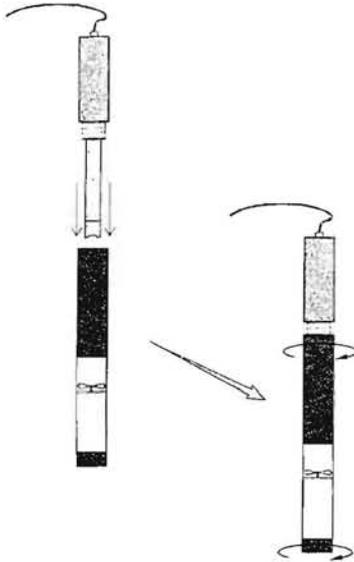
En maintenant le bouton Mode-Run appuyé, amener l'indicateur sur "Cal". L'afficheur indique CAL.

Appuyer à nouveau (brièvement) sur le bouton Mode-Run. L'afficheur indique SAL, puis affiche la dernière valeur de salinité qui a été mémorisée. Ajuster, si nécessaire à la valeur de l'échantillon avec les boutons **s** ou **t**.

Appuyer à nouveau (brièvement) sur le bouton Mode-Run. Trois tirets s'affichent. Après quelques instants apparaît la pente caractéristique de l'électrode.

En maintenant le bouton Mode-Run appuyé, amener l'indicateur sur "%". Si la calibration est correcte l'afficheur doit indiquer 100.

MESURE



Sortir la sonde du bécher de calibration et la visser (délicatement) dans l'agitateur.

Mettre l'agitateur en marche en vissant le contacteur des piles.

Tremper la sonde dans l'échantillon.

Pour procéder à la mesure, appuyer et maintenir le bouton Mode-Run jusqu'à ce que l'indicateur soit sur la position voulue (mg/l ou %).

Attendre la stabilisation de la mesure pour noter le résultat.

RECOMMANDATIONS

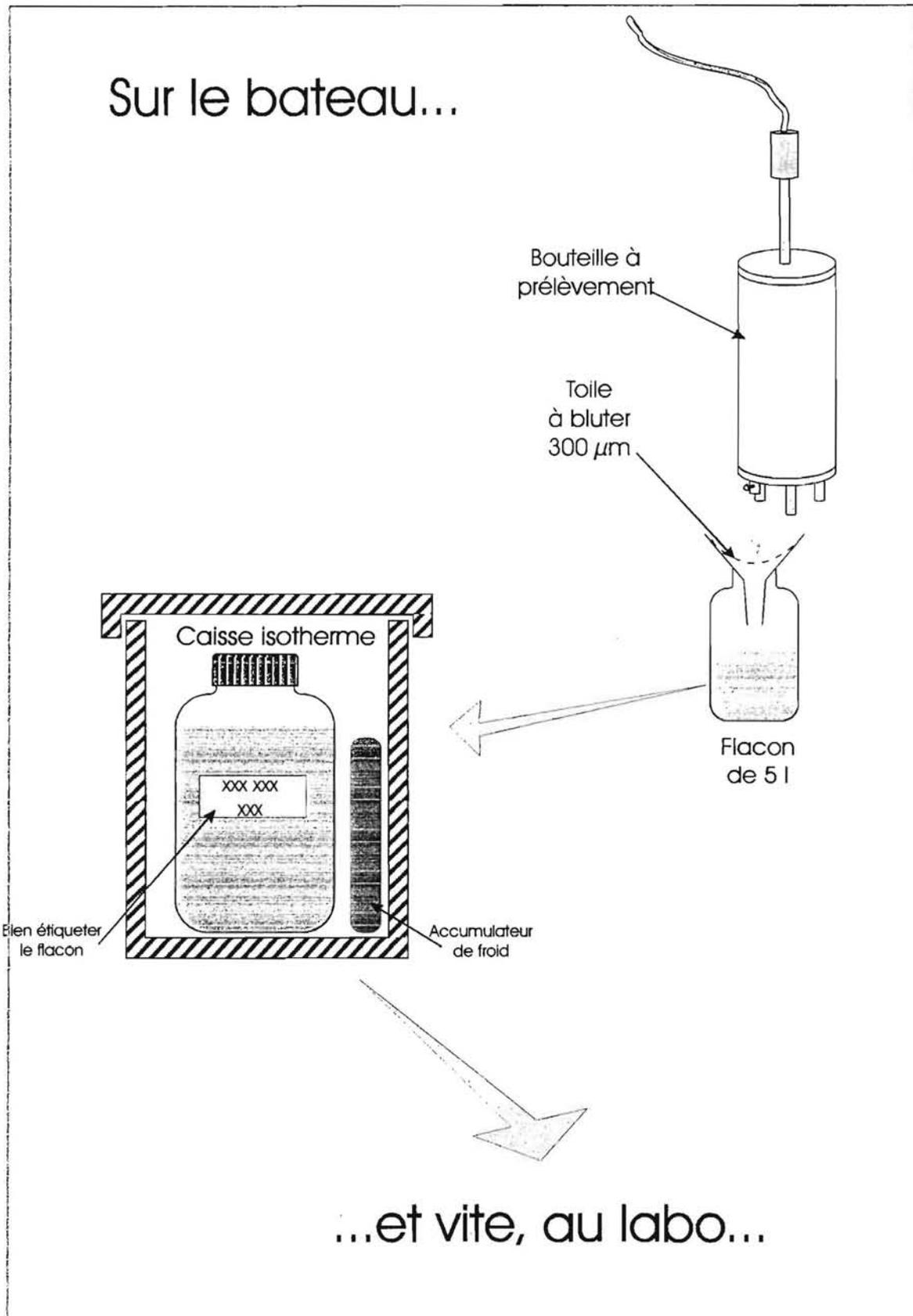
Rincer la sonde à l'eau distillée après les mesures.

Veiller à ce que l'éponge au fond du bécher d'entreposage soit toujours humide (jet d'eau distillée et jeter le surplus).

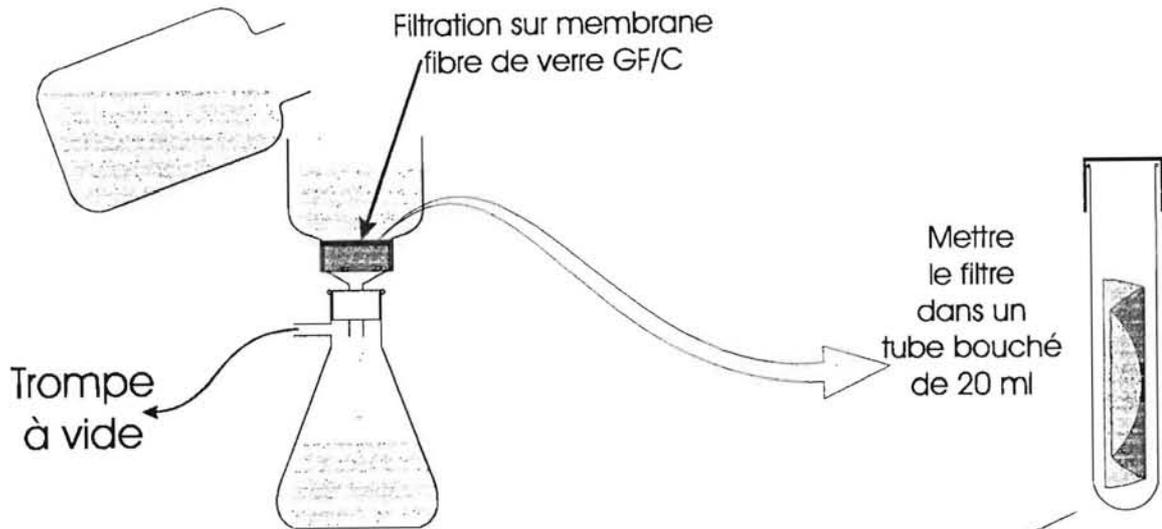
Ne pas toucher la membrane avec les doigts, ni la devisser.

Ne pas oublier de régler la salinité lorsque l'on change de secteur (l'oxygène dissous étant fonction de celle-ci).

La membrane ne peut pas être changée sur le terrain (la repolarisation prend de 45 mn à 2 h). Si un dysfonctionnement apparaît (incohérence de la mesure, stabilisation impossible), prévenir le technicien responsable à l'arrivée au labo.

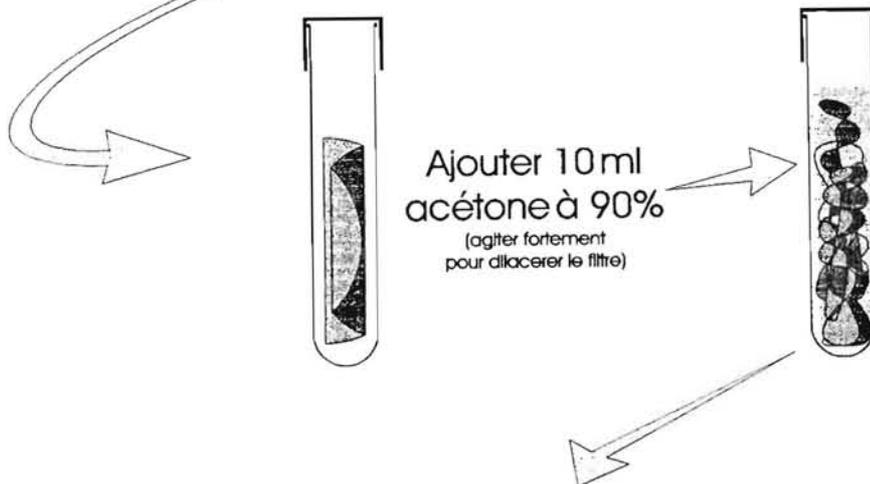


...et au labo...



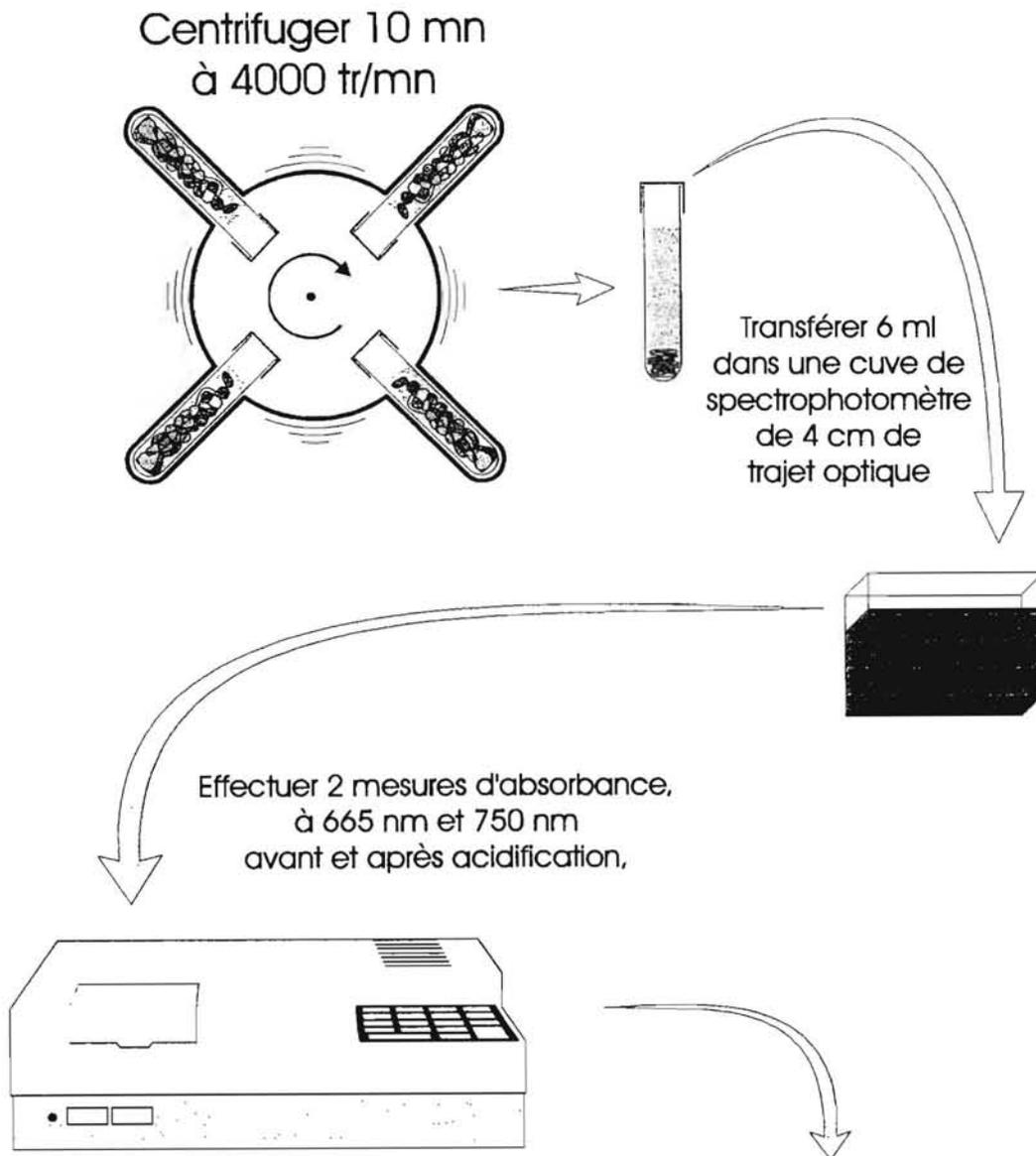
Congélation

(veiller à conserver le tube
à l'abri de la lumière)



une nuit au réfrigérateur...

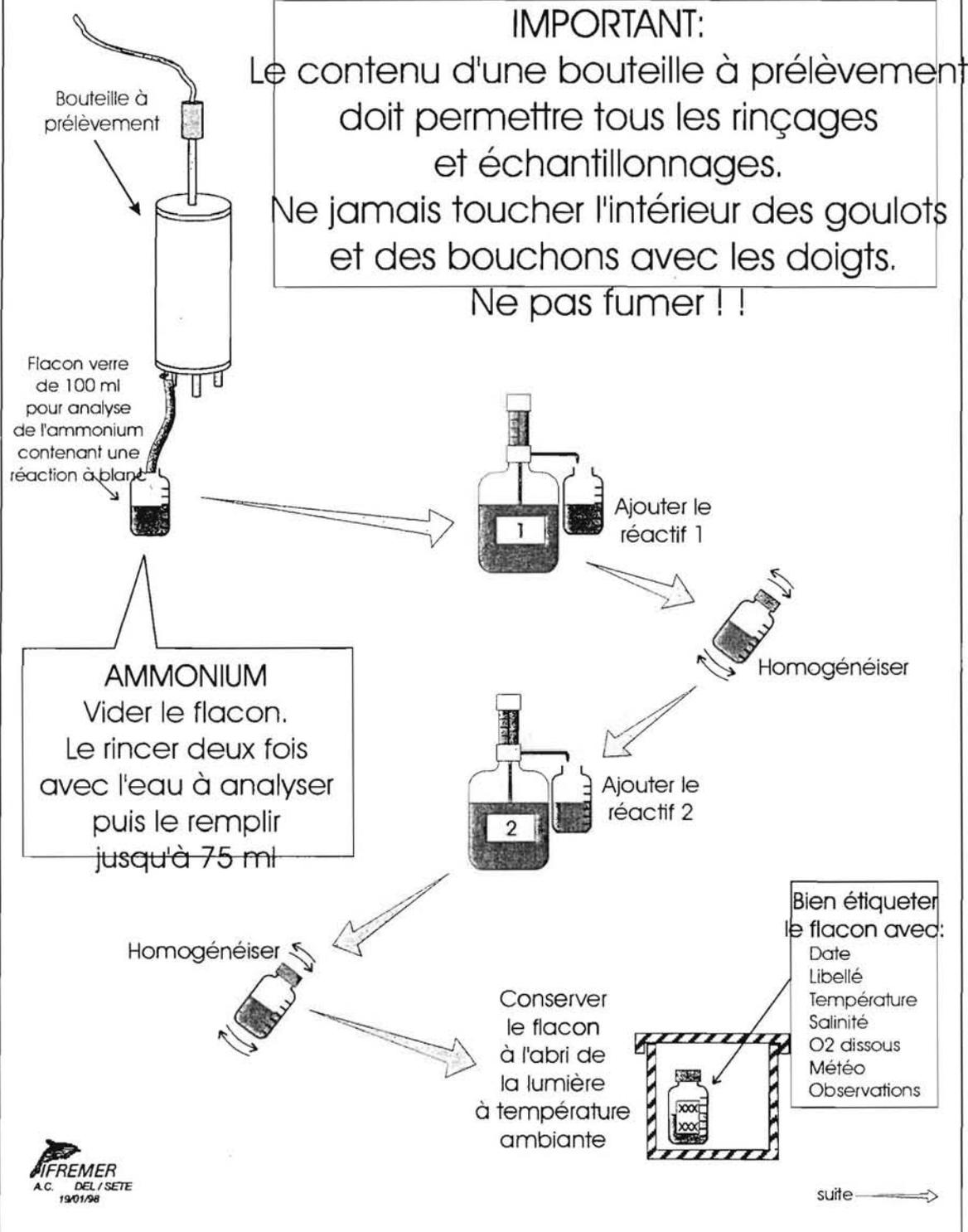
...et le lendemain...

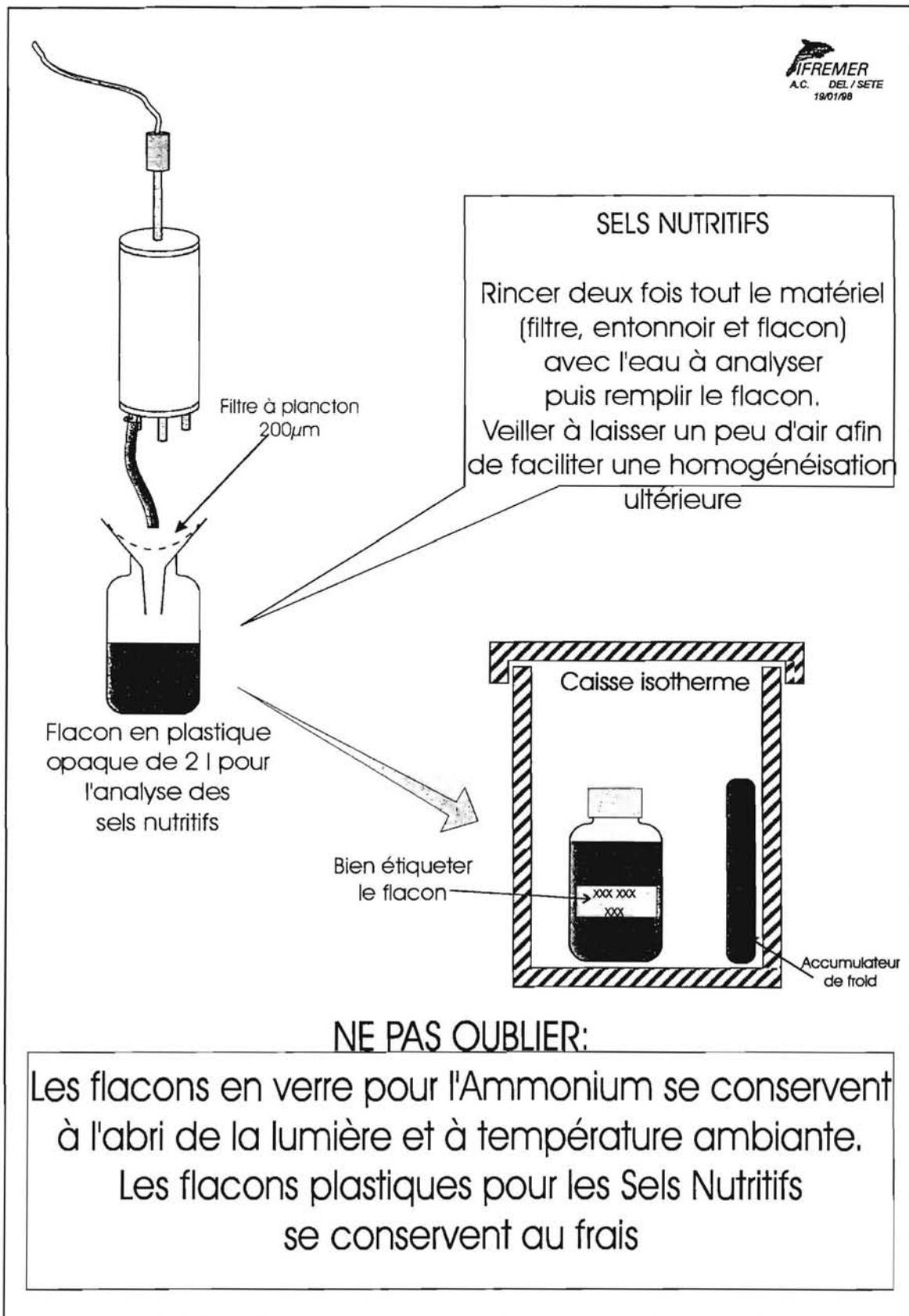


...et après la lecture, reste le calcul...

→ Chlorophylle en $\mu\text{g.l}^{-1} = \frac{26.7 * (A_{665} - A_{750}) * v}{V * l}$

Prélèvements pour l'analyse des Sels Nutritifs





19. Seuils déclencheurs des tests de toxicité pour les différentes espèces toxiques : notion de « seuil régional »

Catherine BELIN

Le seuil national de 200 cellules par litre qui avait été défini lors de la création du réseau comme « seuil d'alerte » pour *Dinophysis*, s'est très vite révélé inutilisable, puisque que :

- dans certaines zones (baie de Douarnenez, par exemple), des concentrations bien inférieures conduisent régulièrement à des tests positifs dans les coquillages,
- alors que dans d'autres zones (baie de Vilaine, par exemple), des concentrations de plusieurs centaines de cellules par litre, voire plus, sont nécessaires pour que les coquillages soient toxiques.

C'est ainsi que depuis quelques années, le déclenchement des tests de toxicité n'obéit pas à une règle unique nationale, mais est laissé à l'appréciation de chaque laboratoire, en fonction des connaissances acquises sur sa région les années précédentes. Après plusieurs années de ce mode de fonctionnement, il était intéressant de formaliser ces différentes expériences et de **tenter de définir des seuils régionaux par zone géographique, pour les différentes espèces toxiques**. Des interviews des laboratoires côtiers réalisées en 1997 et début 1998 avaient donné les résultats synthétisés dans le tableau suivant : **ceux ci ne sont qu'indicatifs et ont été largement nuancés par la suite.**

***Dinophysis* / DSP**

Laboratoire	Phénomènes observés simultanément au développement de <i>Dinophysis</i>	Déclenchement des tests de toxicité DSP
Boulogne		(Absence de <i>Dinophysis</i>)
Port en Bessin		Barfleur : dès l'ouverture du gisement (pas de prélèvement d'eau) Autres zones : présence <i>Dinophysis</i> 2 semaines consécutives -> test la 3 ^{ème} semaine
St Malo		(<i>Dinophysis</i> rare) Baie de Lannion, seuil = 100
Concarneau		Pas de seuil, mais prise en compte de : - la concentration en <i>Dinophysis</i> par rapport au nombre total de cellules - de la période (toxicité plus forte en début de saison) - de la zone (sud / nord) - de la couleur des cellules (rouge / vert) : au début : grosses cellules rouges (<i>D. norvegica</i>) puis réduction taille (autres espèces) puis de moins en moins de cellules rouges
La Trinité		Filières Houat et Groix, dès apparition de <i>Dinophysis</i> (ou dès début mai ?) Ailleurs, seuil = 1000 en début de période (en fin de saison, aucun risque avec 1000) si < 1000 : échantillonnage de tous les points coquillages, mais tests seulement sur certains points si > 1000 : tests sur tous les points
Nantes	Ile d'Yeu : arrivée des sargasses	Ile d'Yeu : dès apparition Sud baie de Vilaine : dépend des résultats au nord (La Trinité) Autres zones : présence <i>Dinophysis</i> sur plusieurs points -> tests
L'Houmeau	Présence importante de méduses Blooms de <i>Prorocentrum micans</i>	Présence <i>Dinophysis</i> à 200-300 cellules deux semaines consécutives Dépend des résultats des labos adjacents Glandes digestives des moules noires et bien gonflées
La Tremblade		Seuil = 400
Arcachon		Seuil = 200
Sète		Leucate, seuil = 2000 Autres zones : présence 2 semaines consécutives : test la 3 ^{ème} semaine
Toulon		seuil = 200 à 300
Corse		Dès apparition

***Alexandrium minutum* / PSP**

Concarneau	seuil = 50 000 cellules prise en compte de la population totale
Saint Malo	seuil = 50 000 cellules

Etant donné :

- les conclusions de l'étude « gestion du risque » détaillée dans le chapitre 1 du rapport n°1 :

il est recommandé que les tests de toxicité DSP s'effectuent dès détection de l'apparition du genre *Dinophysis*, aux nuances près suivantes :

- cas particulier de seuil bien identifié,
 - en période connue de risque de toxicité les prélèvements de coquillages doivent être systématiques, même si antérieurs à la survenue du genre,
 - à ceci se rajoute naturellement le cas des bassins où seuls des prélèvements de coquillages sont effectués.
- les disparités parfois importantes observées entre les laboratoires pour le déclenchement des alertes DSP,
 - les arguments tout à fait justifiés sous tendant ces disparités,

il est proposé qu'une règle nationale soit définie pour chacune des espèces toxiques. La dérogation à cette règle nationale serait possible, par la définition d'un seuil régional, et en fonction des connaissances acquises sur la région concernée.

Les documents suivants reprennent les propositions telles qu'elles avaient été présentées en réunion. Tous ces documents ont été fournis aux laboratoires côtiers le même jour, pour commentaires et avis ultérieurs.

Il est apparu en réunion qu'une majorité de laboratoires souhaitait qu'une règle nationale soit définie, même si elle devait être plus contraignante que la règle appliquée jusqu'ici pour la région. Aucun commentaire écrit n'a été retourné.

Commentaire février 1999 :

Suite à l'apparition d'une nouvelle espèce d'*Alexandrium* fin 1998 en Méditerranée, et compte tenu de la mise en place d'une surveillance ASP en 1999, il est urgent de **formaliser les règles nationales** pour toutes les espèces toxiques : c'est ce qui sera fait dans le **Cahier des Procédures REPHY**, en cours de rédaction. **La notion de seuil régional reste à valider.**

Exemples de concentrations « seuils » dans différents pays¹¹

Espèce Pays	Concentration (cellules par litre)	Action
Alexandrium minutum Espagne, Baléares	1000	surveillance intensifiée / fermeture
Alexandrium sp. Danemark	500	surveillance intensifiée / fermeture
Alexandrium spp. Pays Bas Norvège Espagne, Baléares	1000 à 10 000 présence dans filets 1000	restrictions-alerte / fermeture ? restrictions / fermeture restrictions / fermeture ?
Dinophysis acuminata Danemark Portugal Espagne, Baléares Espagne, Valence	500 200 1000 20.10 ⁶ à 50.10 ⁶	surveillance intensifiée / fermeture restrictions restrictions / fermeture ? tests de toxicité ?
Dinophysis norvegica Danemark	1000	surveillance intensifiée / fermeture
Dinophysis rotundata Danemark	1000	surveillance intensifiée / fermeture
Dinophysis sacculus Espagne, Valence	20.10 ⁶ à 50.10 ⁶	tests de toxicité ?
Dinophysis non identifiés Italie Pays Bas Norvège Irlande du Nord Ecosse Espagne, Andalousie	1000 100 1000 > 100 > 100 ?	restrictions ? restrictions = alerte fermeture restrictions ? restrictions ? restrictions ?
Total Dinophysis spp. Danemark Italie Norvège	1200 1000 et DSP dans moules 500 à 1200	surveillance intensifiée / fermeture restrictions / fermeture (dépend des espèces)
Pseudonitzschia seriata-groupe Danemark	200 000	surveillance intensifiée / fermeture
P. delicatissima-groupe Danemark	200 000	surveillance intensifiée / fermeture
P. multiseriis Canada	50 000	surveillance des coquillages
P. pseudodelicatissima Canada	100 000	tests de toxicité
P. pungens Irlande du Nord	> 1000	restrictions ?
Pseudonitzschia spp. Pays Bas	10 000 à 100 000	restrictions-alerte/ fermeture ?

¹¹ in Design and Implementation of some Harmful Algal Monitoring Systems. IOC technical series n°44, UNESCO, 1996.

Concentrations en espèces toxiques pour le déclenchement de tests de toxicité : les propositions faites en mars 1998.

La définition de seuils nationaux pour chaque catégorie d'espèces toxiques est basée sur la règle du maximum de sécurité.

Dinophysis spp. > 0

⇒ **test souris DSP**

Ce seuil national repose sur l'observation des données REPHY sur onze années : dans certaines zones, des toxines DSP sont observées dans les coquillages dès apparition de *Dinophysis*.

Mais cette règle générale peut se révéler trop restrictive pour d'autres zones, pour lesquelles des seuils plus élevés sont observés depuis de nombreuses années. La dérogation à cette règle nationale est donc laissée à l'appréciation de chaque laboratoire, en fonction des connaissances acquises sur sa région les années précédentes.

Les seuils régionaux ainsi définis sont formalisés dans un tableau, qui sera actualisé en fonction de l'évolution de la situation.

Alexandrium minutum > 10 000

⇒ **test souris PSP**

Ce seuil national repose sur les constatations suivantes :

- l'observation des données REPHY en baie de Morlaix sur dix années montre que la concentration nécessaire pour observer une toxicité PSP est d'environ 100 000 cellules par litre,
 - néanmoins, la présence de toxines (< 80 µg) a été observée pour des concentrations comprises entre 1000 et 10 000
 - ⇒ par sécurité, le seuil retenu sur toute la Bretagne nord, est de 50 000
- les seuils retenus pour les espèces *Alexandrium minutum*, *A. sp.* et *A. spp.* dans d'autres pays européens sont compris entre 500 et 10 000
- l'observation de plus en plus fréquente d'*Alexandrium minutum* à des concentrations de 10 à 20 000, sur le littoral atlantique, et la probabilité non négligeable qu'une souche possède une toxicité plus importante que celle de la baie de Morlaix

Etant donné l'état des connaissances acquises sur la baie de Morlaix, la dérogation à cette règle nationale est laissée à l'appréciation du laboratoire, et sera actualisée en fonction de l'évolution de la situation.

***Pseudonitzschia* spp. > 100 000**⇒ **analyse ASP**

Ce seuil national repose sur les constatations suivantes :

- les seuils retenus pour différentes espèces de *Pseudonitzschia* dans d'autres pays européens sont compris entre 1000 et 200 000,
- les espèces présentes en France ne sont actuellement *a priori* pas toxiques, malgré l'observation régulière de blooms :
 - ☞ une étude réalisée en 1995 sur des coquillages soumis *in situ* à des concentrations importantes, n'a pas révélé la présence de toxines ASP.

Commentaire février 1999 :

Cette dernière assertion n'est plus vraie, puisque **des concentrations importantes d'une espèce toxique** de *Pseudo-nitzschia* (*P. pseudodelicatissima*) ont été observées sur le littoral des Côtes d'Armor en 1998. Les analyses de toxines réalisées sur les coquillages ont mis en évidence des **traces de toxines ASP**.

20. Avancement des travaux des Groupes Assurance Qualité

Une présentation des documents en cours de réalisation dans les groupes de travail AQ Prélèvements & Phytoplancton / Phycotoxines est faite pour tout ce qui concerne le REPHY, afin que tous ceux qui n'ont pas participé aux travaux des groupes puissent s'exprimer.

Les principales remarques concernant les documents ont été prises en compte dans la réalisation de la **première version du Plan Qualité REPHY envoyé aux laboratoires côtiers fin juillet 1998** (fiches modèles mises en annexe du Plan). Il apparaît que pour certains types de documents, tels que les bordereaux de saisie des listes phytoplanctoniques ou des tests souris, il n'est pas facile d'élaborer un modèle unique satisfaisant tout le monde.

21. Gestion des établissements d'expédition en période de *Dinophysis*. Contractualisation SRC.

Hubert GROSSEL

Problème posé : quand *Dinophysis* est présent en milieu ouvert, est-il obligatoirement présent dans les bassins des établissements conchylicoles ?

Préalable de la démarche : ne pas remettre en cause le positionnement des points du REPHY, ni leur représentativité, qui ressort d'un phénomène à grande échelle, n'ayant rien à voir avec ce qui se passe dans les établissements.

Une réunion a été organisée le 5 février 1998 à Nantes par Ifremer pour faire suite à une demande de la SRC Ré-Centre-Ouest. Le caractère technico-réglementaire des questions posées sur la problématique de la gestion des établissements d'expédition en période de *Dinophysis* a justifié la représentation des différents services concernés. La demande de la profession nécessite que plusieurs niveaux soient évalués :

- une recherche technique qui doit être réalisée et validée, afin de proposer aux professionnels un ou des moyens techniquement fiables et financièrement acceptables,
- cette recherche ne sera entreprise qu'après accord de l'Administration sur le principe de la démarche. Un cahier des charges présentera les modalités des tests de la ou des solutions techniques, et les critères retenus pour attester de leur efficacité,
- parallèlement les services compétents auront procédé à une analyse de tous les aspects technico-réglementaires induits,
- les modalités du suivi ultérieur (auto-contrôle) seront précisées, en cas de réponse favorable à la mise en service du système par les services compétents.

Pour la mise en oeuvre de cette opération, il a été proposé une répartition des actions selon le schéma suivant :

• Phase 1

- **Action S.R.C.** : courrier au Préfet de la Vendée
 - en vue de solliciter une autorisation de principe sur le retrempage et la commercialisation des coquillages dans les bassins d'un établissement situé en zone affectée par le plancton toxique, sous réserve que la garantie soit apportée que l'eau utilisée est indemne de plancton toxique,
 - en précisant que cette autorisation serait assortie de contraintes :
 - mise en service d'un dispositif d'emploi simple et fiable, pour lequel un cahier des charges (avec un contrat de maintenance éventuel), pourrait être élaboré entre un industriel et IFREMER,

- mise en place par l'Administration d'un auto-contrôle agréé, à la charge des professionnels concernés.
- **Action D.S.V. et S.R.C.:** enquête sur un établissement en Vendée et sur deux établissements en Loire-Atlantique, afin d'en connaître la typologie des activités en période à *Dinophysis*, et d'apporter toutes précisions utiles sur le fonctionnement hydraulique de l'établissement (volume de la réserve, des bassins, volume d'eau nécessaire par jour, possibilité de recyclage de l'eau, débit maximum de pompage, horaires de pompage en fonction de la marée....).
- **Action IFREMER** (à préciser avec la S.R.C.) :
 - enquête préliminaire sur des solutions alternatives (eau souterraine, filtration sous estran sableux...),
 - prise de contact préalable avec d'éventuels partenaires industriels, en vue de préparer un protocole d'étude expérimentale dans un établissement choisi.
- **Phase 2**
 - **Action IFREMER et S.R.C. :** en cas de réponse favorable de l'Administration, montage d'une proposition d'étude dans un établissement test, en partenariat avec un industriel, dans le respect d'un cahier des charges et sous contrôle d'Ifremer (suivi de la qualité de l'eau, et contrôle toxinique des coquillages). Réalisation de l'étude dans l'établissement (action Ifremer à convenir avec la S.R.C.).
 - **Action D.S.V. :** élaboration du cahier des charges de l'auto-contrôle de l'établissement.
- **Phase 3**

Si les résultats de l'étude sont favorables à la reconnaissance par l'Administration du principe de fonctionnement, celle-ci autoriserait les établissements équipés de systèmes équivalents à avoir, en cas de *Dinophysis*, une gestion spécifique sous auto-contrôle adapté et agréé.

22. Diffusion à l'extérieur de REPHY *info toxines*

Catherine BELIN

La forme actuelle de REPHY *info toxines* n'est pas adaptée à une diffusion large à l'extérieur d'Ifremer.

Les **informations sur les secteurs fermés** devraient cependant être disponibles à très court terme sur le **serveur surveillance**. Ces informations seront nécessairement accompagnées d'une carte pouvant être mise à jour en temps réel. Rappelons que le **module secteurs fermés de QUADRIGE** (pour la saisie détaillée des fermetures) a été structuré de façon à pouvoir en extraire facilement une information lisible par tous : référencement aux bassins QUADRIGE, zone texte permettant une description générale de l'ensemble de la zone touchée, etc.

Conclusion

Bruno BARNOUIN

Ces journées REPHY, au cours desquelles on a pu observer une excellente qualité des présentations, ont été l'occasion de révéler trois effets marquants :

- un effet **qualité** : l'effort entrepris sur ce sujet est d'ores et déjà visible,
- un effet **QUADRIGE** : il est maintenant possible de tirer les bénéfices du travail réalisé par l'équipe QUADRIGE, et de la saisie laborieuse effectuée par les laboratoires côtiers,
- un effet **analyse du risque** : ce point de vue est en effet envisagé avec plus de recul.

