

53813

110-AMZ-1

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

Zouher AMZIL  
Lydie MOTTEAU

RST.DEL/00.07/Nantes

**ifremer**

## Toxines amnésiantes en France

Analyse par CLHP de l'acide domoïque et ses isomères

Bilan 1999 de la surveillance des toxines amnésiantes  
lié aux efflorescences à *Pseudo-nitzschia* toxiques

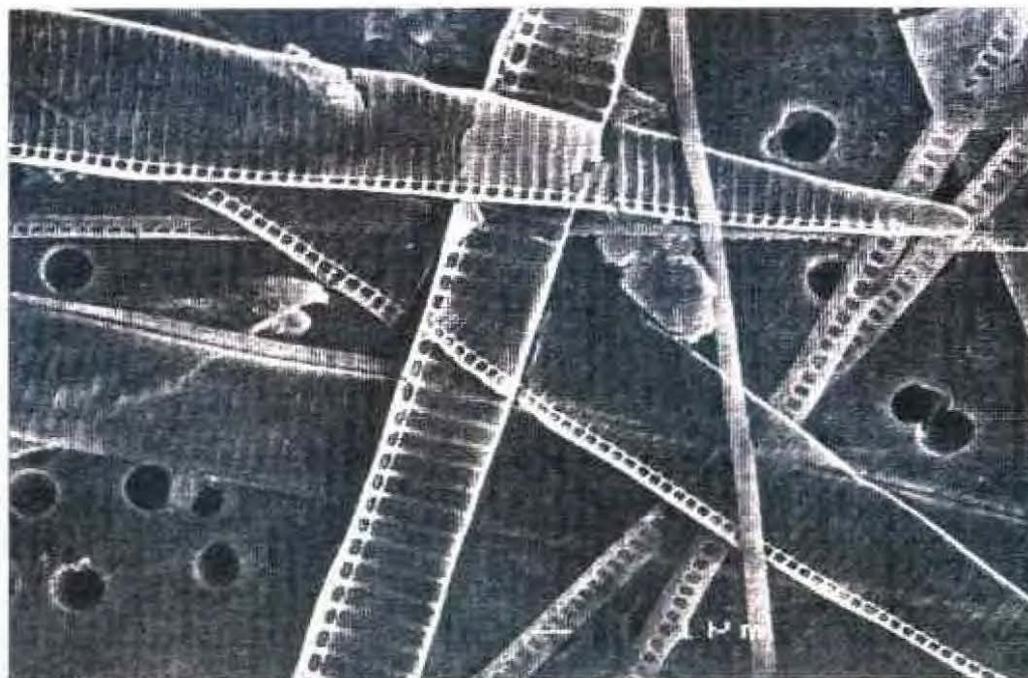


Photo C. Billard, Université de Caen.

IFREMER Bibliothèque de BREST



OEL10536

**FICHE DOCUMENTAIRE**

<b>Numéro d'identification du rapport :</b> DEL/MP/RST/00/07/Nantes <b>Diffusion :</b> libre <input checked="" type="checkbox"/> restreinte <input type="checkbox"/> interdite <input type="checkbox"/> <b>Validé par :</b> Secrétaire Comité de lecture des RST <b>Version du document :</b>		<b>date de publication :</b> juillet 2000 <b>nombre de pages :</b> 40 <b>bibliographie :</b> oui <b>illustration :</b> Non <b>langue du rapport :</b> français
<b>Titre et sous-titre du rapport :</b> <p align="center">                     Toxines amnésiantes en France                      Analyse par CLHP de l'acide domoïque et ses isomères                      Bilan 1999 de la surveillance des toxines amnésiantes lié aux efflorescences                      à <i>Pseudo-nitzschia</i> toxiques                 </p>		
<b>Auteur(s) principal(aux) :</b> nom, prénom Zouher AMZIL et Lydie MOTTEAU (*) (*) stagiaire en 1999 au laboratoire PN	<b>Organisme / Direction / Service, laboratoire</b> Ifremer / DEL / MP / PN Centre de Nantes	
<b>Collaborateur(s) :</b> nom, prénom	<b>Organisme / Direction / Service, laboratoire</b>	
<b>Travaux universitaires :</b> diplôme : _____ discipline : _____ établissement de soutenance : _____ année de soutenance : _____		
<b>Titre du contrat de recherche :</b>	n° de contrat IFREMER	
<b>Organisme commanditaire :</b> nom développé, sigle, adresse <b>Organisme(s) réalisateur(s) :</b> nom(s) développé(s), sigle(s), adresse(s)  <b>Responsable scientifique :</b>		
<b>Cadre de la recherche :</b> Programme : _____ Convention : _____ Projet : _____ Autres (préciser) : _____ Campagne océanographique : (nom de campagne, année, nom du navire)		

## FICHE DOCUMENTAIRE

### Résumé :

Dans le cadre du réseau de surveillance français en matière de toxines amnésiantes, l'acide domoïque a été détecté pour la première fois dans des échantillons de coquillages. En effet, le dosage de l'acide domoïque (AD) par Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à un détecteur Ultra Violet (CLHP/UV), méthode officielle, dans la partie comestible des bivalves est effectué dès que le seuil de  $10^5$  cellules par litre de diatomée du genre *Pseudo-nitzschia spp.* est dépassé. Les analyses réalisées pendant l'année 1999 ont révélé la présence de l'acide domoïque dans des bivalves prélevés en différents points des côtes françaises. Toutefois, la quantité maximale de toxine trouvée ne dépassait pas  $3,2 \mu\text{g}$  d'AD par g de chair totale de coquillages, ce qui est largement en dessous du seuil sanitaire autorisé ( $20 \mu\text{g}$  AD/g chair). Les examens phytoplanctoniques réalisés par Microscopie Electronique à Balayage (MEB) à partir des prélèvements d'eau de mer ont confirmé la présence de deux espèces de *Pseudo-nitzschia* répertoriées comme étant toxiques : *P. pseudodelicatissima* et *P. multiseriis*. A partir des extraits de culture de cette dernière espèce, nous avons confirmé sa toxicité et donc son implication dans l'accumulation de l'acide domoïque dans les bivalves en France.

### Abstract :

As part as French phytoplankton monitoring network, domoic acid (DA), the toxin responsible for Amnesic Shellfish Poisoning (ASP), was detected for the first time in shellfish samples in 1998. Analyses of this toxin by Liquid Chromatography with Diode Array Detector (LC/DAD) official method were done when *Pseudo-nitzschia* cell concentration exceeded  $1.0 \times 10^5$  cells  $\text{L}^{-1}$ . LC/DAD results obtained during 1999 revealed DA accumulation in bivalves sampled from different sites of French coasts. Nevertheless, toxin maxima found didn't exceed  $3,2 \mu\text{g}$  DA per g whole tissue with levels below the sanitary threshold ( $20 \mu\text{g}$  DA/g tissue). Phytoplankton samples collected during the bloom were observed by both light and scanning electron microscopy (SEM). Phytoplankton species identification using SEM analyses has confirmed the presence of two known DA producer species: *P. pseudodelicatissima* and *P. multiseriis*. The mastery of mass culture of the latter confirmed, using LC/DAD results, that *P. multiseriis* was the causative organism in DA accumulation in Shellfish in France.

### Mots-clés :

*Pseudo-nitzschia multiseriis*, Toxines amnésiantes, CLHP/UV

### Keywords :

*Pseudo-nitzschia multiseriis*, Amnesic Shellfish Poisoning, LC/DAD.

<b>Introduction</b> .....	1
<b>1. Les efflorescences phytoplanctoniques productrices de toxines</b> .....	2
<b>2. Les intoxications amnésiantes par les fruits de mer (IAFM, ASP)</b> .....	6
<b>3. Mise en place de la méthode d'analyse des toxines amnésiantes</b> .....	8
<b>3.1. Procédure d'extraction</b> .....	8
<b>3.1.1. Matériel</b> .....	9
<b>3.1.2. Préparation des extraits</b> .....	10
- <i>Echantillons de coquillages</i> .....	10
- <i>Echantillons de phytoplancton</i> .....	10
<b>3.2. Détection de l'acide domoïque par CLHP / UV</b> .....	10
<b>3.2.1. Etude qualitative</b> .....	10
3.2.1.1. Longueur d'onde optimale d'absorption de l'acide domoïque .....	13
3.2.1.2. Optimisation des paramètres d'analyse chromatographiques .....	13
- <i>Variation de la température</i> .....	13
- <i>Variation du débit</i> .....	13
- <i>Variation de la composition du solvant d'élution</i> ....	15
3.2.1.3. Détermination de la limite de détection .....	18
- <i>Solution standard d'acide domoïque</i> .....	18
- <i>Extrait aqueux de moules brut</i> .....	18
3.2.1.4. Caractéristiques "techniques" de la méthode .....	18
- <i>Stabilité du temps de rétention</i> .....	18
- <i>Linéarité de l'injecteur automatique</i> .....	18
- <i>Répétabilité de la méthode</i> .....	19
<b>3.2.2. Etude quantitative</b> .....	19
3.2.2.1. Linéarité du détecteur .....	19
3.2.2.2. Rendement d'extraction .....	20

## Sommaire

3.3. <u>Mise en évidence des isomères de l'acide domoïque</u> .....	20
3.3.1. Etape de purification sur cartouche échangeuse d'anions	20
3.3.2. Détection des isomères de l'acide domoïque par CLHP ..	22
<b>4. Dépistage des toxines amnésiantes en 1999</b> .....	<b>25</b>
4.1. <u>Echantillonnage</u> .....	25
4.2. <u>Détection de l'acide domoïque</u> .....	27
<i>Coquillages</i> .....	27
<i>Extraits de culture de P. multiseriis</i> .....	32
<b>Conclusion</b> .....	<b>33</b>
<b>Références</b> .....	<b>35</b>
Annexe 1 .....	38
Annexe 2 .....	39
Annexe 3 .....	40

## Introduction

En France, jusqu'à 1998, deux genres de dinoflagellés toxiques ont été particulièrement suivis : *Dinophysis* et *Alexandrium*. En cas de présence de ces algues, le réseau de surveillance du phytoplancton et des phycotoxines REPHY procède à des tests de toxicité aiguë sur souris à partir des extraits de coquillages exposés. Par des extractions sélectives, ces tests permettent de révéler les deux familles de toxines correspondantes : les toxines diarrhéiques (acide okadaïque et dérivés) et les toxines paralysantes (saxitoxine et dérivés) (Belin *et al.*, 1996).

Or, depuis 1999, en application de la directive européenne (97/61/CE du 20 octobre 1997) concernant les intoxications amnésiantes, le REPHY a été amené à intégrer le dépistage dans les coquillages de l'acide domoïque, le principe responsable de ces intoxications. Cette surveillance est liée au suivi des concentrations en *Pseudo-nitzschia spp.*, le genre de diatomée comprenant la majorité des espèces productrices d'acide domoïque.

Comme pour les toxines diarrhéiques et paralysantes, le dépistage de l'acide domoïque (AD) aurait pu également se faire à l'aide du test biologique sur souris. En effet, la procédure utilisée est celle servant à détecter les toxines paralysantes. Cependant, le seuil de détection de cette méthode est d'environ 40 µg AD/g de chair et, selon la directive européenne, le taux en toxines amnésiantes dans les parties comestibles des mollusques ne doit pas dépasser 20 µg d'acide domoïque par gramme de chair. Au-delà, la consommation de coquillages est interdite. Ce test biologique n'est donc pas adapté en contrôle de routine à cause de son seuil de détection trop élevé.

C'est pourquoi, c'est une autre méthode, utilisant la Chromatographie Liquide Haute Pression (CLHP) qui a été imposée par la Directive Européenne pour la détection de l'acide domoïque du fait de sa spécificité et de sa sensibilité. Dans un premier temps, nous avons cherché à optimiser cette technique en vue d'un transfert au niveau des laboratoires côtiers chargés de la surveillance. Après validation de la méthode, le dépistage de l'AD a été réalisé dans les conditions opératoires retenues à partir des extraits de coquillages et de culture de *Pseudo-nitzschia* prélevés en 1999 dans le cadre du réseau de surveillance REPHY.

La première année de surveillance a donc été prise en charge par le laboratoire DEL/MP-PN. Les analyses des échantillons de coquillages et des extraits de culture de *Pseudo-nitzschia* toxiques ont été réalisées dès que le nombre de cellules de *Pseudo-nitzschia spp.* dépasse le seuil de 10<sup>5</sup> cellules/Litre. Dans ce rapport, nous présenterons l'étude qualitative et quantitative de la méthode de détection de l'acide domoïque par CLHP couplée à un détecteur Ultra Violet (UV) à l'aide des échantillons de référence : un standard d'acide domoïque et un échantillon de moules contaminé certifié. Nous donnerons également un bilan sur la mise en place de cette surveillance en France en matière 1) d'espèces potentiellement toxiques identifiées lors des efflorescences à *Pseudo-nitzschia* ; 2) d'accumulation de l'acide domoïque, produit par ces dernières, dans les coquillages.

Mais tout d'abord, nous procéderons à un bref rappel sur les efflorescences phytoplanctoniques productrices de toxines répertoriées à ce jour dans le monde.

## 1. Les efflorescences phytoplanctoniques productrices de toxines

Depuis quelques années, les phénomènes de toxicité des coquillages, dus à des efflorescences algales, se développent en divers points du globe (France, Japon, Canada, Norvège, Espagne...). Certaines espèces sont à l'origine de plusieurs milliers d'intoxications alimentaires. C'est un phénomène qui se produit spontanément à la suite de conditions climatiques particulières et qui entraîne des risques pour la santé des consommateurs et des pertes économiques importantes pour les conchyliculteurs et les aquaculteurs.

Sur 1200 espèces de dinoflagellés connues, seule une vingtaine d'entre elles sont actuellement tenues pour toxigènes. Concernant les diatomées, il existe également des espèces potentiellement toxiques du genre *Pseudo-nitzschia*. Leurs efflorescences peuvent être soit directement toxiques pour la faune marine, soit toxiques pour l'homme via les coquillages, mais sans effet sur ces derniers. Dans ce dernier cas, le processus d'intoxication est toujours le même, à savoir : il y a efflorescence d'algues toxiques et celles-ci sont consommées par les poissons phytoplanctonophages ou par les coquillages filtreurs. La consommation de ces organismes contaminés provoque ainsi des intoxications alimentaires.

Les principaux syndromes de toxicité (tableau 1, figure 1) dus à des efflorescences d'algues toxigènes ont été regroupés en cinq classes suivant leurs signes cliniques et les toxines responsables. Pour chacune de ces classes, un nom et une abréviation française, ainsi qu'une appellation anglo-saxonne internationale ont été données :

- les Intoxications Neurologiques par les Fruits de Mer (I.N.F.M.) ou Neurologic Shellfish Poisoning (N.S.P.) sont causées par des brevetoxines produites par un dinoflagellé du genre *Gymnodinium* (Steindinger, 1979 ; Baden *et al.*, 1984 ; Shimizu *et al.*, 1986).
- les Intoxications de type "Ciguatériques" ou Ciguateric Fish Poisoning (C.F.P.) correspondent à la fois à une intoxication neurologique et gastro-intestinale. Les toxines impliquées sont la maïtotoxine et les ciguatoxines et sont sécrétées par un dinoflagellé du genre *Gambierdiscus* (Bagnis *et al.*, 1980 ; Murata *et al.*, 1989, 1993 ; Le Grand, 1991).

- les Intoxications Paralysantes par les Fruits de Mer (I.P.F.M) ou Paralytic Shellfish Poisoning (P.S.P.) sont provoquées par la saxitoxine et ses dérivés (néosaxitoxine et gonyautoxines), produites principalement par des dinoflagellés du genre *Alexandrium* (Shimizu *et al.*, 1985 ; Shumway, 1989 ; Lassus *et al.*, 1994 ; Masselin *et al.*, 1996).

- les Intoxications Diarrhéiques par les Fruits de Mer (I.D.F.M.) ou Diarrhetic Shellfish Poisoning (D.S.P.) sont provoquées par des toxines de type acide okadaïque (AO) et ses dérivés (dinophysistoxines, DTXs), produites par des dinoflagellés du genre *Dinophysis* et *Prorocentrum* (Yasumoto *et al.*, 1978 ; Lassus *et al.*, 1988 ; Murata *et al.*, 1982 ; Sournia *et al.*, 1991 ; Masselin *et al.*, 1992 ; Amzil, 1993 ; Barbier *et al.*, 1998).

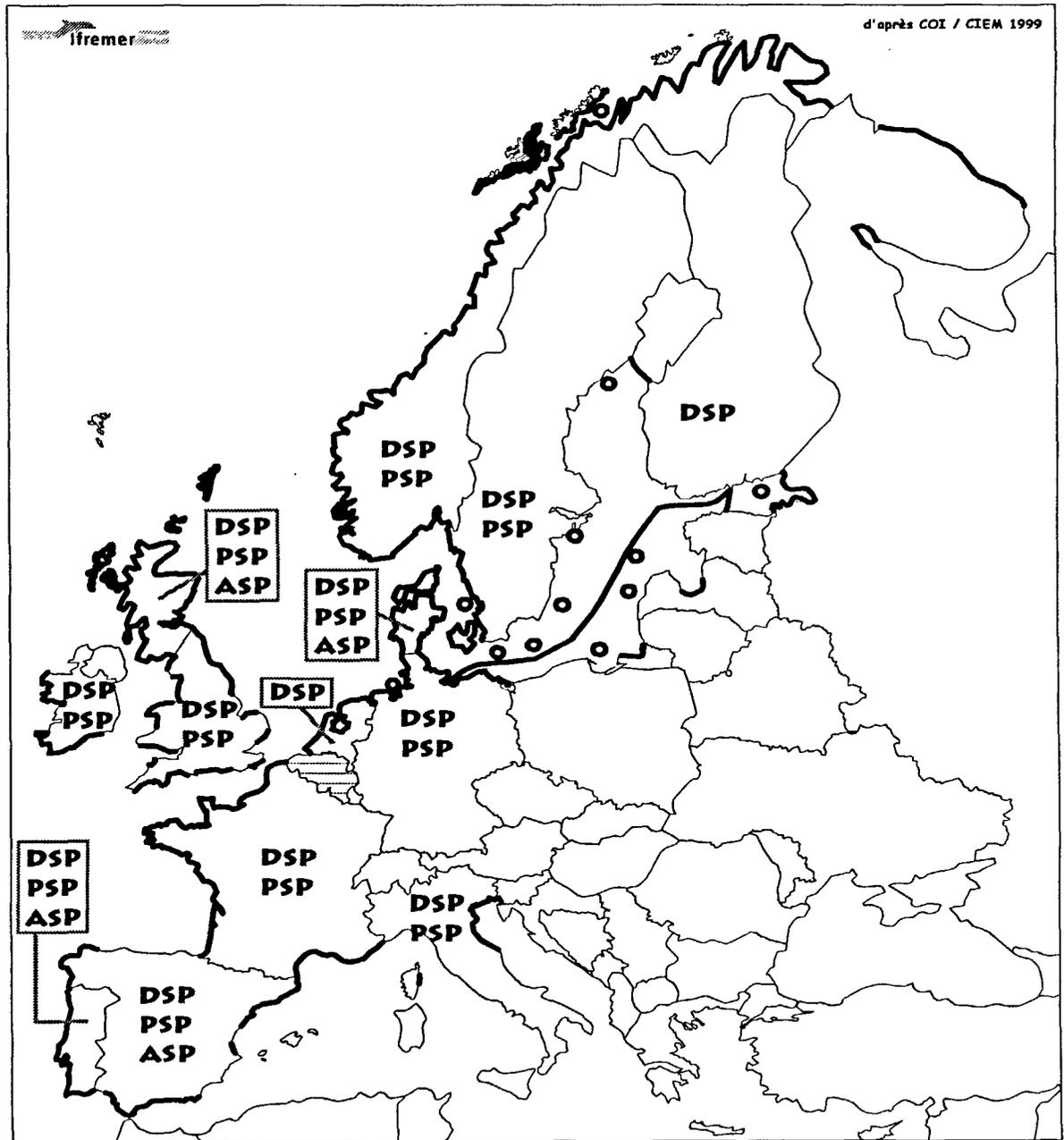
- les Intoxications Amnésiantes par les Fruits de Mer (I.A.F.M.) ou Amnesic Shellfish Poisoning (A.S.P.) sont dues à une neurotoxine, l'acide domoïque (AD), synthétisée essentiellement par des diatomées du genre *Pseudo-nitzschia* (Bates, 1989 ; Wright *et al.*, 1989 ; Perl *et al.*, 1990 ; Teitelbaum *et al.*, 1990 ; Worms *et al.*, 1991 ; Smith 1993).

Afin de protéger les consommateurs de ces différentes intoxications, des réseaux de surveillance des eaux littorales et des zones conchylicoles ont été créés dans de nombreux pays. Ces réseaux sont chargés de détecter l'apparition d'espèces phytoplanctoniques toxigènes dans l'eau et d'effectuer des contrôles de salubrité des coquillages sur les lieux de production. Les résultats sont transmis aux autorités administratives qui peuvent prendre les mesures préventives nécessaires pour la protection de la santé publique.

Intoxication	I.P.F.M.	I.A.F.M.	I.N.F.M.	I.D.F.M.	Ciguatéra
Toxines	Saxitoxine Néosaxitoxine Gonyautoxines	Acide domoïque	Brevetoxines	Acide okadaïque Dinophysistoxines Yessotoxines Pectenotoxines	Maitotoxine Ciguatoxines
Sources des phycotoxines	- <i>Alexandrium</i> spp - <i>Gymnodinium catenatum</i> - <i>Pyrodinium bahamense</i> var. <i>Compressa</i>	<i>Nitzschia pungens</i> ( <i>Pseudonitzschia</i> spp.)	<i>Gymnodinium breve</i>	<i>Dinophysis</i> spp. <i>Prorocentrum</i> spp.	<i>Gambierdiscus toxicus</i>
Vecteurs de l'intoxication	- mollusques bivalves (moules, palourdes, huîtres, coquilles Saint-Jacques) - certains gastéropodes - certains crustacés	- mollusques bivalves (moules, couteaux)	- mollusques bivalves (clams, huîtres)	- mollusques bivalves (moules, palourdes, praires, coquilles Saint-Jacques).	- poissons des zones tropicales et subtropicales - poissons herbivores (poisson-perroquet, poisson-chirurgien) - poissons carnivores (murènes, mérours, barracudas)
Distribution géographique des cas	Sur tous les continents (zones tempérées et tropicales)	- Canada - Littoral Nord-Ouest des États-Unis.	- États-Unis Golfe du Mexique Caroline du Nord - Nouvelle-Zélande	- Europe - Asie - Amérique (Chili, Canada)	Zones tropicales et subtropicales
Délai d'apparition des symptômes	5 à 30 min. après consommation des coquillages toxiques	5 à 6 h.	30 min. à 3h.	30 min. à 12 h. (dans 70 % des cas, inférieur à 4 h.)	Quelques heures (1 à 6 h.)
Signes cliniques	- premiers signes : paresthésies péri-buccales, puis engourdissement des extrémités progressant vers les bras et les jambes ; - paralysie respiratoire pouvant survenir dans les douze premières heures	- syndrome digestif survenant dans les 24 premières heures ; - syndrome neurologique dans les 48 premières heures : céphalées, troubles de la mémoire - dans les cas graves : convulsions, confusion mentale, coma	- syndrome digestif (douleurs abdominales, vomissements, diarrhée) - syndrome neurologique avec paresthésies péri-buccales atteignant peu à peu le tronc, les membres. Incoordination motrice Sensation paradoxale de chaud et de froid. Pas de paralysie respiratoire	- diarrhée (92% des cas) - vomissements (80 % des cas) - douleurs abdominales Absence de fièvre Parfois céphalées, vertiges	- signes digestifs initiaux syndrome neurologique engourdissement et dysesthésies, sensation paradoxale de chaud et de froid, ataxie, faiblesse générale, - syndrome cardiovasculaire : bradycardie hypotension artérielle. État de choc dans les cas graves

Tableau 1 : Caractéristiques des intoxications liées aux efflorescences phytoplanctoniques toxiques répertoriées à ce jour (Treguer, 1998).

Figure 1 : Episodes toxiques 1989 – 1998.



### **Cas de la France**

La France est touchée principalement par deux genres de dinoflagellés : *Dinophysis* et *Alexandrium* (Belin et Raffin, 1998). Afin de détecter l'apparition éventuelle de prolifération du phytoplancton, le Réseau de surveillance du PHYtoplancton (REPHY) dispose de stations de prélèvements, de suivi et d'alerte, réparties sur tout le littoral. Dans les zones susceptibles d'efflorescences, les prélèvements sont effectués deux fois par mois (de septembre à avril) et une fois par semaine (de mai à août), période favorable au développement massif du phytoplancton ou selon les événements toxiques. Lorsqu'une efflorescence d'une microalgue donnée dépasse le seuil estimé critique, les laboratoires côtiers procèdent à 1) des prélèvements d'eau de mer pour l'identification et la quantification des espèces 2) des prélèvements de coquillages pour le dépistage des toxines correspondantes (IDFM, IPFM, IAFM).

Concernant les toxines amnésiantes, un premier bilan avait déjà été fait en 1995 (Le Doux et al., 1996) lors de proliférations des espèces du genre *Pseudo-nitzschia spp.* Aucune trace d'acide domoïque n'a été trouvée dans les coquillages prélevés sur les littoraux atlantique et méditerranéen. Ce qui a permis de dire qu'il ne s'agissait pas d'espèces toxiques. En effet, toutes les espèces du genre *Pseudo-nitzschia* ne sont pas toxiques, seulement quelques-unes ont été reconnues comme toxigènes : *P. australis*, *P. pseudodelicatissima*, *P. multiseriis*.

## **2. Les intoxications amnésiantes par les fruits de mer (IAFM, ASP)**

Fin 1987, de graves cas d'empoisonnements alimentaires alarmèrent la population canadienne. 145 personnes, ayant consommé des moules récoltées dans l'Île-du-Prince Edouard (Cardigan Bay), présentèrent des troubles digestifs, neurologiques et surtout une perte de mémoire d'où le nom de toxines amnésiantes. Parmi ces victimes, quatre personnes sont mortes et d'autres ont présenté des séquelles neurologiques permanentes (Bates, 1989). Ce nouveau syndrome est connu sous la dénomination anglo-saxonne : Amnesic Shellfish Poisoning (ASP) = I.A.F.M..

Les premiers symptômes, de type gastro-intestinal (vomissements, diarrhées...) surviennent dans un délai de 2 à 24 heures après consommation des moules contaminées. Entre 24 et 48 heures, ce sont des symptômes neurologiques qui sont observés (maux de tête persistants, troubles à court terme de l'équilibre ou de la vue...). Dans les cas les plus graves, il apparaît une perte de mémoire, des altérations de la conscience et parfois des convulsions et un coma.

Ce type d'intoxication atteint surtout les enfants et les personnes âgées. Il est à noter que la gravité des signes neurologiques est en relation avec l'âge des patients. Plus le sujet est âgé, plus les signes cliniques sont marqués. Les fruits de mer intervenant dans les premiers cas d'intoxications de 1987 au Canada, étaient des moules, mais la toxine mise en cause a également été retrouvée dans d'autres bivalves (coques, palourdes, couteaux...).

C'est après des recherches intensives que la phycotoxine responsable de l'I.A.F.M. a été identifiée comme étant l'acide domoïque (Wright *et al.*, 1989). En fait, ce composé fut isolé pour la première fois, au Japon, à partir de l'algue rouge *Chondria armata domoi*. (Ravn, 1995).

L'acide domoïque est un acide aminé secondaire tricarboxylique comprenant 15 atomes de carbone et dont la chaîne latérale possède deux liaisons éthyléniques. Il est structurellement proche de l'acide glutamique (neurotransmetteur) et de l'acide kaïnique (principe actif). Actuellement, sept isomères de l'acide domoïque sont identifiés. Seuls les structures isodomoïque D, E et F sont impliqués dans les intoxications amnésiantes. La figure 2 donne la structure chimique de l'acide domoïque et de ses isomères.

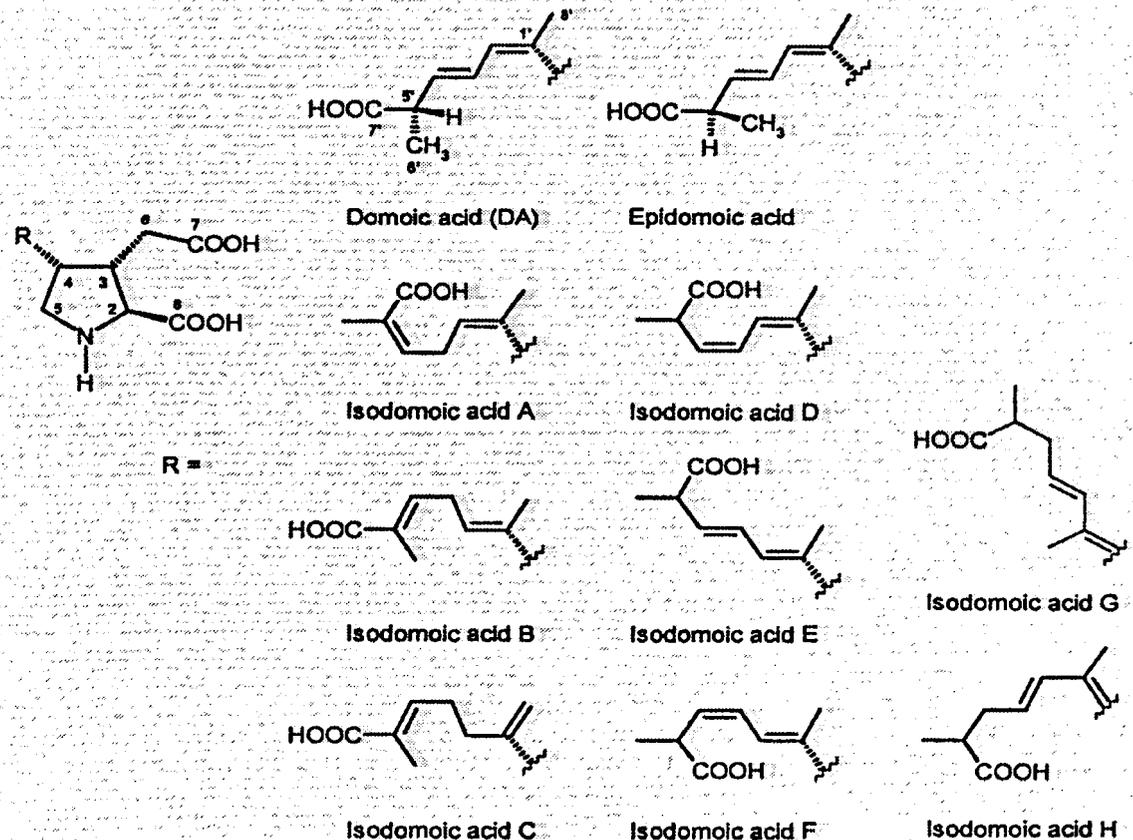


Figure 2 : Structure chimique de l'acide domoïque et ses isomères.

### - Mécanisme d'action de l'acide domoïque

L'acide domoïque est un acide aminé neuro-excitateur. En effet, il se fixe sur un des récepteurs synaptiques de l'acide glutamique, connu sous le nom de récepteur de l'acide kaïnique. Il y a alors entrée des ions sodium dans la membrane post-synaptique induisant une dépolarisation, ce qui provoque une augmentation de la perméabilité des ions calcium entraînant un dysfonctionnement des cellules ou leur mort.

### - Espèces responsables

L'espèce responsable de cette intoxication a été identifiée comme étant la diatomée *Pseudo-nitzschia pungens f. multiseries* (Bates, 1989). Depuis, elle a été détectée dans d'autres sites géographiques (Nouvelle Zélande, côtes californiennes), tandis que d'autres espèces de *Pseudo-nitzschia*, susceptibles d'être toxiques, ont ensuite été décelées en Europe (Danemark, Espagne, Portugal, Italie... ) (Bates *et al.*, 1998).

La France n'était pas non plus à l'abri de la dissémination mondiale de ces toxines (via les eaux de ballast, transfert de coquillages...). D'autant plus que les espèces de *Pseudo-nitzschia*, supposées toxiques, sont présentes depuis longtemps dans la liste floristique du REPHY. En 1998, des traces d'acide domoïque ont été détectées dans les glandes digestives de moules en provenance des Côtes d'Armor liées à la présence locale de *P. pseudodelicatissima* (clone producteur d'AD au Canada). Cependant, ces coquillages ne présentaient aucun danger pour les consommateurs puisque la teneur en acide domoïque trouvée (0,5 µg AD/g chair) était largement en dessous du seuil sanitaire (20 µg AD/g chair). De ce fait, en application de la transcription en droit français de la directive européenne en 1998, le dosage de l'acide domoïque dans les coquillages est devenu effectif en France depuis 1999. Il est appliqué dès que la concentration en *Pseudo-nitzschia spp.* dépasse 10<sup>5</sup> cellules / litre.

## 3. Mise en place de la méthode d'analyse des toxines amnésiantes

### 3.1. Procédure d'extraction

Il existe deux méthodes d'extraction pour la mise en évidence de l'acide domoïque :

- ◆ la première, dérive de la méthode de Lawrence *et al.* (1991) et est validée par l'AOAC (Association of Official Analytic Chemists, 1995) ; elle consiste en une extraction acide suivie d'une analyse CLHP/UV ;
- ◆ la seconde technique, correspond à la méthode de Quilliam *et al.* (1995), en cours de validation. L'extraction se fait à l'aide d'un solvant organique aqueux suivie d'une étape de purification sur cartouche échangeuse d'anions et d'une analyse par CLHP/UV.

Cependant, la première méthode présente quelques inconvénients, à savoir : 1) instabilité de l'acide domoïque en milieu acide, 2) problème d'interférence des isomères de l'acide domoïque avec le Tryptophane, acide aminé présent naturellement dans les coquillages, 3) technique beaucoup moins sensible que la seconde puisque cette dernière comprend une étape de purification de l'extrait brut, ce qui permet d'augmenter la limite de détection pour les échantillons peu contaminés mais surtout cette étape est indispensable pour l'identification des isomères de l'acide domoïque.

C'est pourquoi, dans le cadre de la surveillance des toxines amnésiantes, IFREMER a retenu la méthode utilisant l'extraction aqueuse des toxines recherchées puisque la directive européenne impose uniquement l'outil analytique (CLHP). Mais dans un premier temps, une étude d'optimisation des différents paramètres chromatographiques a été menée à l'aide d'un standard d'AD et d'un échantillon de moules contaminé de référence.

### 3.1.1. Matériel

Pour l'ensemble des travaux, les échantillons de référence utilisés, pour valider la méthode de détection des toxines amnésiantes, proviennent de l'Institut des Biosciences Marines à Halifax (IBM, CNRC, Canada). Il s'agit :

- d'un standard de toxines (DACS-1B) correspondant à une solution témoin contenant principalement l'acide domoïque et quelques isomères présents à l'état de traces ;
- d'un échantillon de moules de référence naturellement contaminé (MUS-1B) correspondant à la chair de moules homogénéisée, contenant une quantité connue d'acide domoïque certifiée. Le MUS-1B permet de savoir si les conditions expérimentales utilisées sont adaptées, en particulier la procédure d'extraction en calculant son rendement.

Les analyses ont été effectuées sur des coquillages prélevés en différents points des côtes françaises, lors de blooms à *Pseudo-nitzschia* et parfois sur des extraits de cultures des espèces de *Pseudo-nitzschia* suspectes provenant de ces blooms. Des moules saines sont aussi utilisées en guise de témoin.

Selon la méthode officielle, le dosage de l'acide domoïque est réalisé à partir de la chair totale des coquillages (moules, palourdes, olives "tellines"...). Ceci correspond au produit consommé et donc à la véritable dose de l'acide domoïque ingérée. Néanmoins, pour la première année de surveillance des toxines amnésiantes, la présence de traces de l'acide domoïque a été également recherchée dans les glandes digestives (hépatopancréas : HP) car les toxines se concentrent principalement dans cet organe. Ceci a donc permis de mettre en évidence l'acide domoïque lorsqu'il était présent à l'état de traces comme ce fut le cas en 1998 dans les Côtes d'Armor (Saint-Malo).

### 3.1.2. Préparation des extraits

#### - Echantillons de coquillages

Afin d'avoir un échantillon représentatif, l'extraction s'effectue à partir de 100 g de chair totale. Les échantillons sont broyés à l'aide d'un ultra-turrax (8000 tr/min), la prise d'essai est de 4 g pesés avec précision dans un tube gradué pour centrifugeuse auxquels on ajoute 16 ml de solvant d'extraction : MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1). L'échantillon est homogénéisé en utilisant l'ultra-turrax (10000 tr/min) pendant 3 min suivi d'une centrifugation à 4000 tr/min pendant 10 min. 10 ml de surnageant sont ensuite filtrés sur un filtre pour seringue compatible avec le MeOH de 0,2 µm (le protocole est détaillé dans l'annexe 1).

Parallèlement, le dépistage de l'acide domoïque a été également réalisé dans les hépatopancréas (30 g) selon le même protocole.

Pour l'échantillon de moules certifié (MUS-1B), la procédure d'extraction est pratiquement la même et démarre directement à partir d'une prise d'essai de 4 g puisqu'il s'agit d'un échantillon de référence provenant d'un homogénat (le protocole est donné dans l'annexe 2).

#### - Echantillons de phytoplancton

Les espèces de *Pseudo-nitzschia* potentiellement toxiques isolées lors des efflorescences sont mises en culture afin de confirmer leur toxicité par leur teneur éventuelle en acide domoïque. Pour cela, les cellules algales, récoltées en phase de sénescence, sont éclatées par sonication (ultrasons pendant 5 min) suivi d'une centrifugation à 4000 tr/min pendant 15 min. Le surnageant récupéré puis filtré sur 0.2 µm pour être analysé par CLHP/UV.

## 3.2. Détection de l'acide domoïque par CLHP /UV

### 3.2.1. Etude qualitative

Une mise au point d'une méthode passe, tout d'abord, par la disposition d'un protocole fiable pour détecter la substance recherchée. Nous avons donc commencé par confirmer la longueur d'onde d'absorption optimale de l'acide domoïque puis nous avons cherché à optimiser la détection en modifiant les paramètres d'analyses chromatographiques. Nous pouvons alors vérifier les caractéristiques de la méthode dans les conditions opératoires retenues, à savoir : reproductibilité du temps de rétention de l'acide domoïque, linéarité de l'injecteur automatique, répétabilité de la méthode.

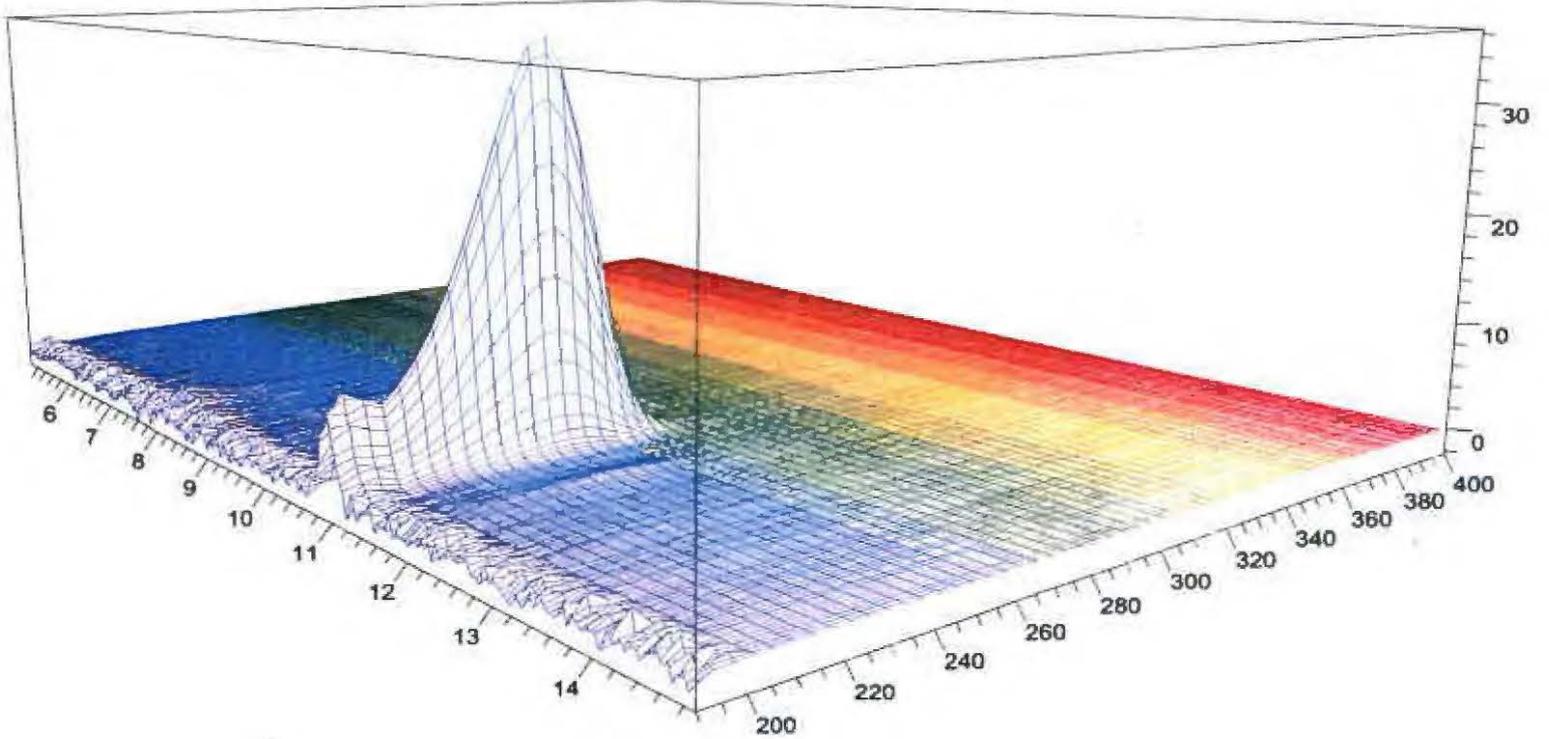


Figure 3 : Longueur d'onde d'absorption optimale de l'acide domoïque ( $\lambda = 242$  nm).

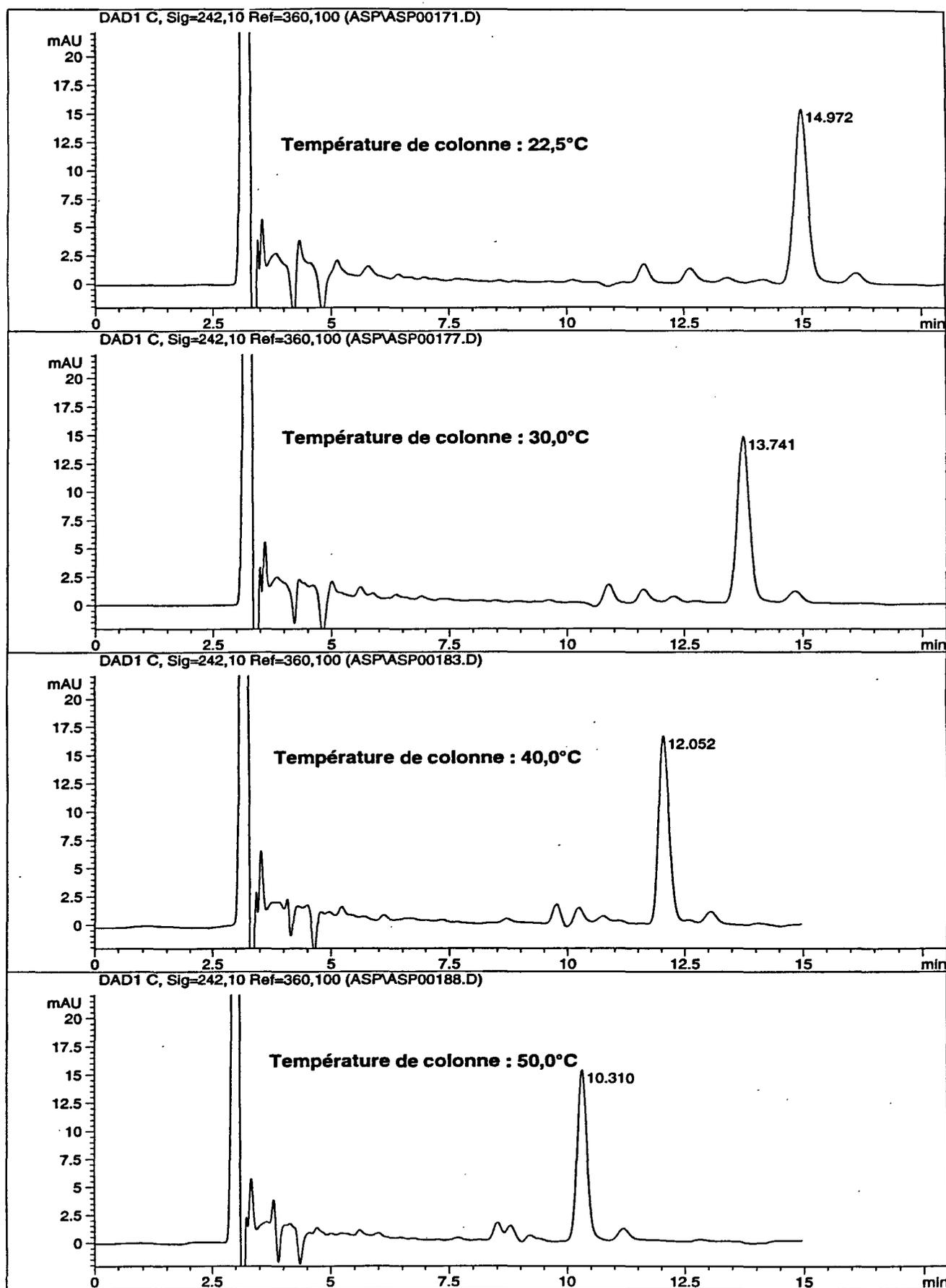


Figure 4 : Variation du temps de rétention de l'acide domoïque en fonction de la température de la colonne.

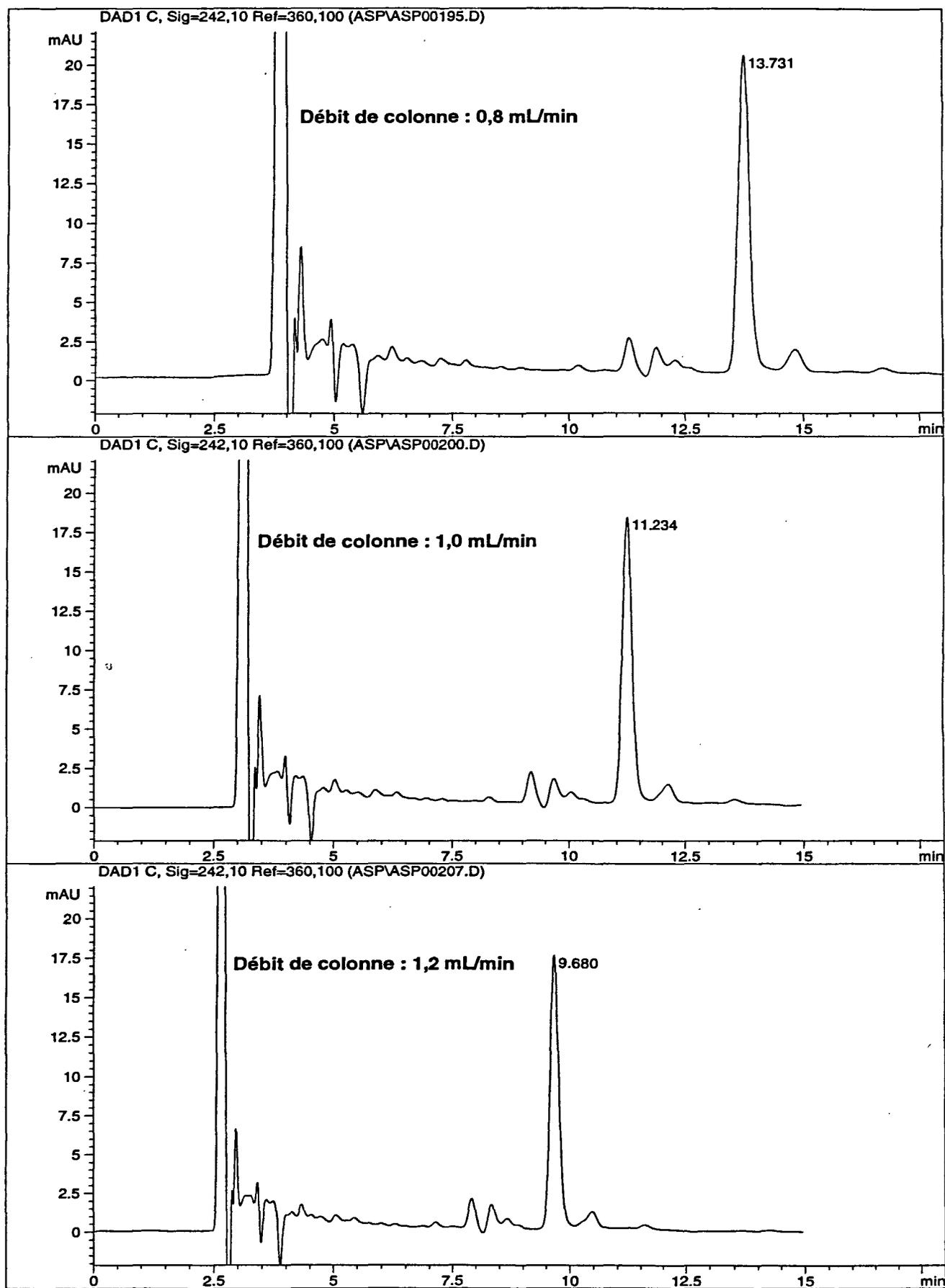


Figure 5 : Variation du temps de rétention de l'acide domoïque en fonction du débit du solvant d'éluion.

### 3.2.1.1. Longueur d'onde optimale d'absorption de l'acide domoïque

A l'aide du détecteur à barrette de diode, nous pouvons réaliser un balayage de toutes les longueurs d'onde, ce qui permet de déterminer la longueur d'onde d'absorption optimale pour une molécule donnée. Ainsi, comme le montre la figure 3 (page 11), la longueur d'onde maximale pour la détection de l'acide domoïque est de 242 nm.

### 3.2.1.2. Optimisation des paramètres d'analyses chromatographiques

Au cours d'une analyse par CLHP, en dehors de la phase stationnaire utilisée, trois paramètres interviennent : la température, le débit, et la composition du solvant d'élution. Pour optimiser une méthode, il faut donc varier ces paramètres, l'un après l'autre. Comme il s'agit d'une méthode destinée à un contrôle de routine, le choix des paramètres d'analyse est basé sur un compromis entre le temps d'analyse et la qualité de la résolution chromatographique.

Ces différentes recherches ont été effectuées à la fois à partir de solution standard d'acide domoïque et d'échantillons de moules certifiés non purifiés. En effet, ces derniers permettront de tenir compte de l'effet matrice.

#### - Variation de la température

Les analyses ont été réalisées à différentes températures ( $T^\circ$ ) : ambiante ( $22.5^\circ\text{C}$ ) -  $30^\circ\text{C}$  -  $40^\circ\text{C}$  et  $50^\circ\text{C}$ , et ce en gardant un débit de 1 ml/min avec un pourcentage de solvants :  $\text{H}_2\text{O}$  0,1% acide trifluoroacétique (TFA) / Acétonitrile ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) (90:10).

En comparant les différents chromatogrammes regroupés dans la figure 4, nous pouvons remarquer qu'une résolution correcte est observée entre 22 et  $50^\circ\text{C}$ . Cependant, les temps de rétention à  $T^\circ = 22,5$  et  $30^\circ\text{C}$  sont respectivement 14,97 et 13,74 min ; il n'est que de 10 min à  $50^\circ\text{C}$ , mais à cette température, la résolution est moins bonne. Par contre, à  $40^\circ\text{C}$ , la résolution et le temps de rétention sont satisfaisants. Nous avons donc retenu la température de  **$40^\circ\text{C}$**  pour la suite des analyses.

#### - Variation du débit

La température est fixée à  $40^\circ\text{C}$  ainsi que la composition du solvant d'élution :  $\text{H}_2\text{O}$  0,1% TFA/ $\text{CH}_3\text{CN}$  (90:10). Différents débits sont alors appliqués : 0,8 - 1,0 - 1,2 ml/min.

Comme pour le facteur température, entre les différents débits, il y a peu de variation au niveau de la résolution des pics. Seuls les temps de rétention changent (figure 5).

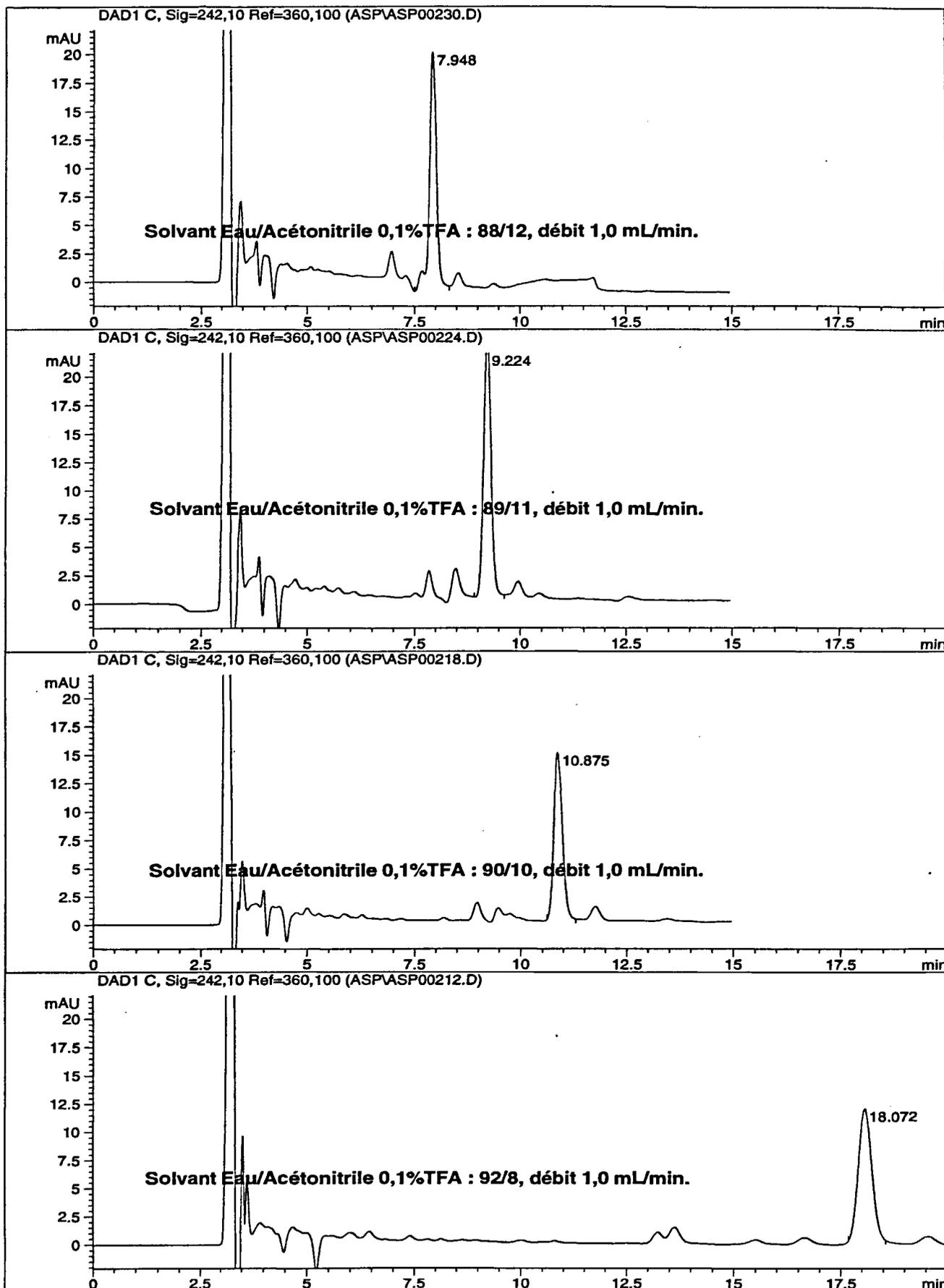


Figure 6 a) : Influence de la composition du solvant d'éluion sur la résolution chromatographique, débit : 1 ml/min.

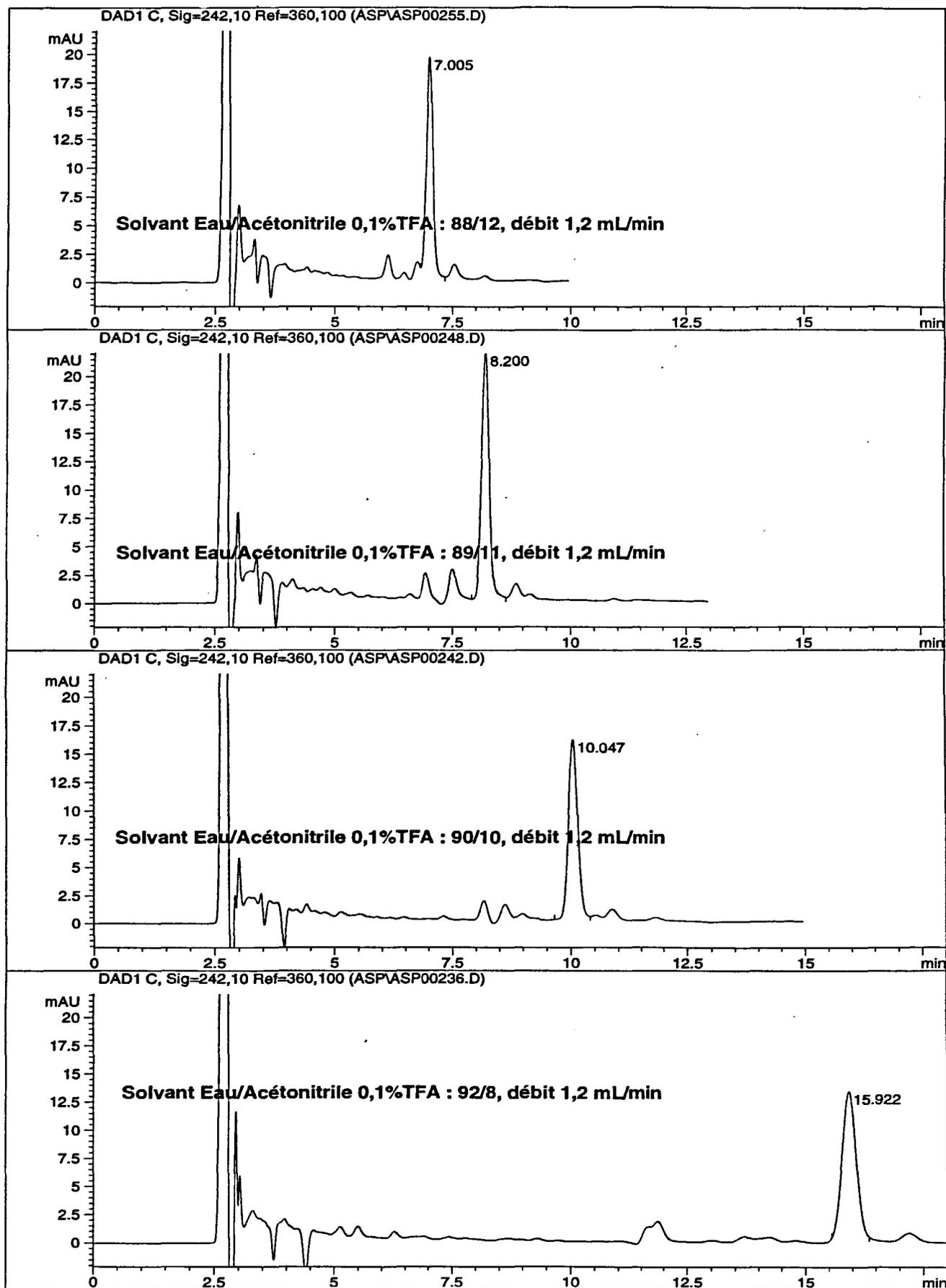


Figure 6 b) : Influence de la composition du solvant d'élution sur la résolution chromatographique, débit : 1,2 ml/min.

Le débit de 0,8 ml/min n'est pas intéressant car le temps de rétention de l'acide domoïque est d'environ 13,7 min, ce qui est trop long. Par contre, entre les débits 1,0 ml/min et 1,2 ml/min, le temps de rétention de l'acide domoïque ne diffère que d'un peu plus d'une minute (11,2 et 9,6). Par conséquent, il serait peut-être plus avantageux d'utiliser le débit de 1,2 ml/min afin de réduire légèrement le temps d'analyse.

Cependant, avant de fixer définitivement le débit, il faut varier la composition du solvant d'élution afin de déterminer quel est le débit (**1,0 ml/min ou 1,2 ml/min**) qui permet d'obtenir à la fois un temps d'analyse court et une résolution chromatographique satisfaisante.

#### - Variation de la composition du solvant d'élution

Différentes compositions de solvants d'élution sont testées (H<sub>2</sub>O 0,1% TFA/CH<sub>3</sub>CN) : 92:8 - 90:10 - 89:11 - 88:12. Elles ont été appliquées aux débits suivants : 1,0 ml/min puis 1,2 ml/min.

Pour le débit 1,0 ml/min, la résolution des pics ainsi que le temps de rétention de l'AD sont satisfaisants pour le pourcentage 90:10, comme le montrent les chromatogrammes de la figure 6 (a, b). En effet, avec le mélange (92:8), le temps de rétention de l'AD est trop long (TR ≈ 18 min au lieu de 10) pour être utilisé en contrôle de routine, tandis que pour les pourcentages (89:11) et (88:12), ce sont les résolutions des pics qui sont de moins en moins bonnes, de même pour le débit 1,2 ml/min. C'est avec le pourcentage (90:10) que la méthode est définie comme étant convenable (TR ≈ 10 min), quel que soit le débit.

A priori, il n'y a pas d'intérêt à choisir le débit de 1,0 ml/min plutôt que celui de 1,2 ml/min. Etant donné que l'AD sort un peu avant avec le débit 1,2 ml/min (TR ≈ 10 min au lieu de TR ≈ 11 min pour 1,0 ml/min), on aurait tendance à penser que ce dernier est plus approprié à l'analyse de routine. Cependant, avant de retenir définitivement les conditions opératoires obtenues pour un standard pur, celles-ci doivent être également testées sur un échantillon de coquillages non contaminés afin d'en apprécier l'éventuel effet matrice.

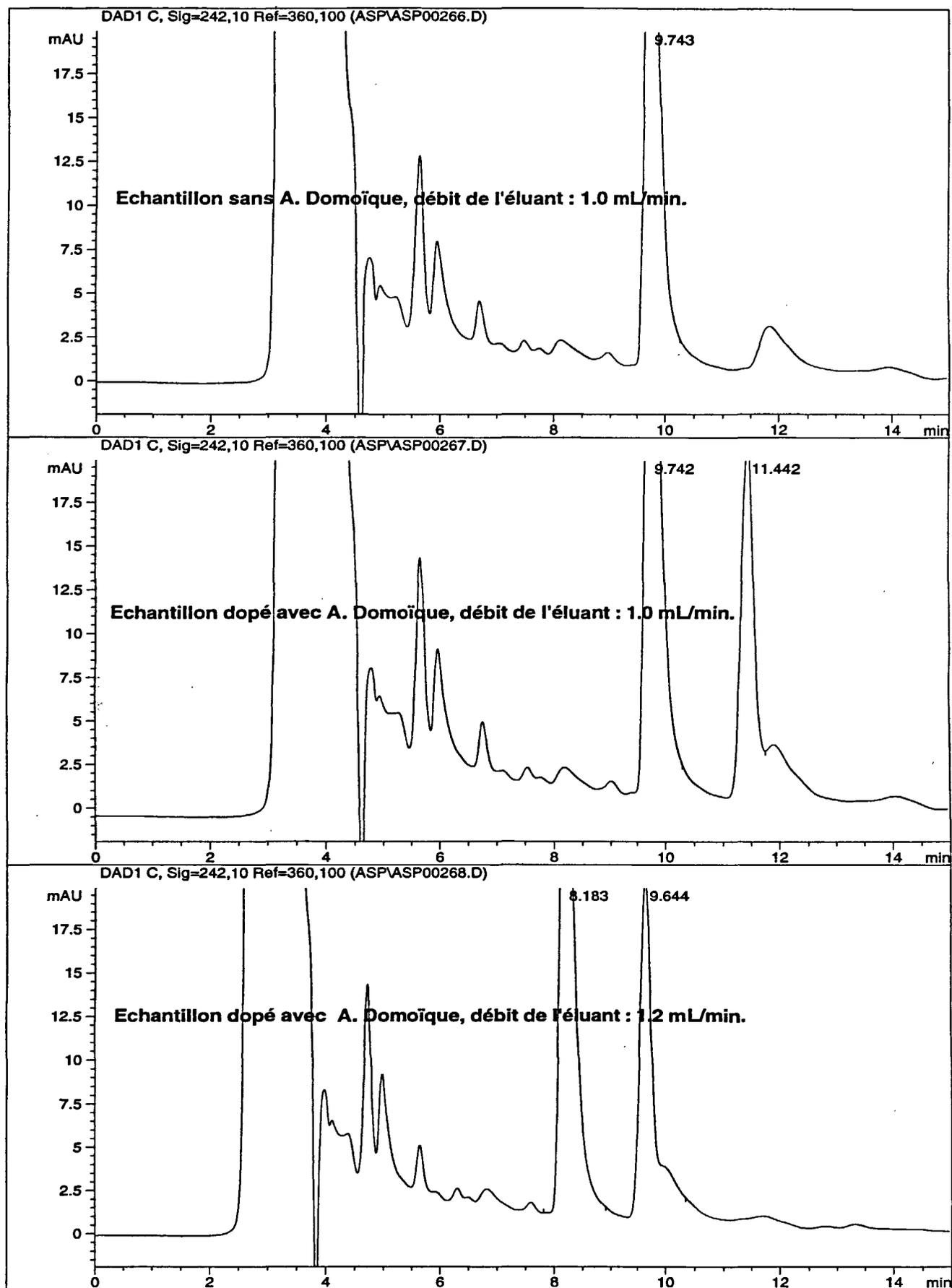


Figure 7 : Résolution chromatographique en fonction du débit d'éluant.

Pour cela, un extrait de moules, en provenance d'Arcachon, dopé avec de l'acide domoïque puis analysé aux débits 1 et 1,2 ml/min, est injecté dans ces conditions. Comme le montrent les chromatogrammes de la figure 7, nous pouvons discerner deux pics très proches : l'un correspondant à l'AD et l'autre à une substance présente dans l'extrait. Ceci est observé avec un débit de 1,0 ml/min. Par contre, en utilisant un débit de 1,2 ml/min, les deux pics ont tendance à se confondre rendant ainsi l'intégration du pic de l'AD difficile, ce qui peut engendrer des erreurs d'estimation lors des dosages. Afin d'éviter cette interférence due à l'effet matrice, le débit retenu est 1,0 ml/min. Les analyses seront donc effectuées avec un débit de 1 ml/min et la composition de solvants sera la suivante : H<sub>2</sub>O 0,1% TFA /CH<sub>3</sub>CN (90:10).

#### Conditions chromatographiques retenues (CLHP/UV)

Les conditions expérimentales retenues pour le dosage de l'acide domoïque par CLHP/UV sont : une colonne de dimension 4,6 mm x 250 mm, remplie d'une phase stationnaire de silice greffée C<sub>18</sub> (Vydac 201 TP 54) placée dans un four thermostaté à 40°C. Le solvant d'éluion est un mélange H<sub>2</sub>O 0,1 % TFA/CH<sub>3</sub>CN (90:10) avec un débit de 1 ml/min. Le volume maximal injecté sera en général de 40 µl en fonction de l'état de contamination des échantillons à tester. La détection de l'AD sera effectuée à la longueur d'onde  $\lambda = 242$  nm. Le temps d'analyse maximal par échantillon sera de 15 min. L'AD présent dans les extraits est quantifié en duplicat à l'aide d'un étalon externe.

Pour déterminer la concentration de l'acide domoïque dans les échantillons, une gamme de solution standard est préparée et injectée dans les mêmes conditions. De plus, au cours de l'analyse des échantillons, un standard est injecté afin de suivre une éventuelle fluctuation du temps de rétention de l'acide domoïque due à l'effet matrice.

La quantité d'acide domoïque (en µg AD/g de chair), dans chaque échantillon, se calcule selon la formule suivante :

$$[AD] (\mu\text{g/g}) = (A_s/A_c) \times (C_s/p) \times F$$

A<sub>s</sub> = moyenne des surfaces du pic d'acide domoïque dans l'échantillon injecté en double

A<sub>c</sub> = moyenne des surfaces du pic d'acide domoïque du standard proche de celle de l'échantillon

C<sub>s</sub> = concentration du standard (en µg/ml) proche de celle de l'échantillon

p = poids de la prise d'essai (ici ≈ 4 g)

F = facteur de dilution (F = 20 car volume total : 4g de prise d'essai + 16 ml MeOH/H<sub>2</sub>O)

### 3.2.1.3. Détermination de la limite de détection

#### - Solution standard d'acide domoïque

La recherche du seuil de détection se fait par dilution de la solution standard d'acide domoïque dans le solvant : H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN (90:10) sans le TFA car la toxine n'est pas stable en milieu acide. La limite de détection de l'acide domoïque obtenue est de 31,25 ng AD/ml (rapport signal/bruit = 3) pour une injection de 20 µl.

#### - Extrait aqueux de moules brut

Du fait de l'effet matrice, il est indispensable de déterminer la limite de détection de la méthode à partir des échantillons naturels de coquillages non purifiés. Ainsi, nous avons obtenu un seuil de détection de 0,148 µg AD/g de chair (rapport signal/bruit = 3).

Nous pouvons donc conclure que cette méthode d'analyse peut être utilisée en contrôle de routine de la salubrité des coquillages, étant donné que la limite de détection est largement en dessous du seuil autorisé (20 µgAD/g de chair).

### 3.2.1.4. Caractéristiques "techniques" de la méthode

La vérification des caractéristiques techniques d'une méthode est essentielle car elle permet de contrôler le bon fonctionnement de l'appareillage. Nous avons donc vérifié la stabilité du temps de rétention, la linéarité de l'injecteur automatique, la répétabilité de la méthode et la linéarité du détecteur.

#### - Stabilité du temps de rétention

La stabilité du temps de rétention a été testée en utilisant une concentration du standard d'AD de 2,5 µg/ml. 20 µl de solution sont injectés toutes les heures et ceci pendant 7 heures. Les temps de rétention de l'acide domoïque enregistrés montrent une très bonne stabilité puisqu'ils varient de 11,27 à 11,5 min, soit un intervalle de :  $11,41 \pm 0,14$ .

#### - Linéarité de l'injecteur automatique

Elle permet de vérifier si l'injecteur prélève toujours le même volume et ceci grâce à la reproductibilité de la valeur de la surface du pic de l'acide domoïque. Nous avons donc utilisé les surfaces obtenues (n = 8) lors du contrôle de la stabilité du temps de rétention. Le coefficient de variation calculé est de 5,56 %, ce qui indique que les conditions d'analyse sont répétitives au cours d'une journée.

### - Répétabilité de la méthode

Normalement, pour vérifier la reproductibilité d'une méthode, il faut que cette dernière soit réalisée par différents laboratoires (différents manipulateurs, différents appareils). C'est pourquoi, nous parlons ici de répétabilité puisque nous ne pouvons faire appel à d'autres laboratoires. Des injections de l'échantillon de moules certifié ont été réalisées à des jours différents (n = 6). D'après les résultats obtenus, le coefficient de variation est de 0,54 %. La répétabilité de la méthode est donc convenable puisque le coefficient de variation est largement en dessous de 15 % qui est la limite de validation.

L'ensemble des résultats obtenu nous permet de dire que les conditions opératoires retenues respectent les critères de validation de méthodes d'analyses par CLHP. La technique est donc au point pour analyser les échantillons naturels pour la mise en évidence de l'acide domoïque.

## 3.2.2. Etude quantitative

### 3.2.2.1. Linéarité du détecteur

La réponse du détecteur a été testée en fonction de la quantité d'AD injectée. A partir du standard, de concentration 100 µg AD/ml, deux séries de dilution sont préparées : [1-2,5-5-10-15-25 µg/ml] puis [1-2-5-10-20 µg /ml] qui serviront de gammes étalons externes. D'après la figure 8, donnant la courbe d'étalonnage, nous pouvons dire qu'une très bonne linéarité est obtenue puisque le coefficient de corrélation ( $r^2$ ) est de 0,9983.

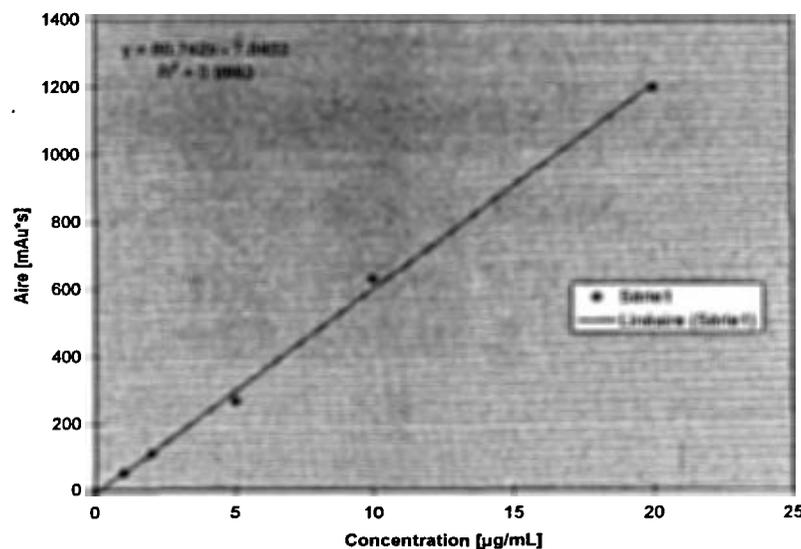


Figure 8 : Linéarité du détecteur

### 3.2.2.2. Rendement d'extraction

Cette étape permet de s'assurer qu'il n'y a pas de perte notable de l'acide domoïque lors de l'extraction. Pour cela, l'échantillon de moules de référence MUS-1B est utilisé puisque la quantité de départ de l'acide domoïque est connue (38,3 µg AD/g de chair), on peut donc calculer le rendement d'extraction. Celui-ci n'atteint jamais 100 % mais doit se situer aux alentours de 85 - 95 %.

Deux échantillons de moules saines subissent le même protocole et serviront de témoins afin de détecter d'éventuelles substances pouvant interférer avec l'acide domoïque.

Le rendement d'extraction obtenu sur l'échantillon de moules certifié indique qu'il n'y a pas de perte notable d'acide domoïque puisque le rendement est d'environ 93 %.

## 3.3. Mise en évidence des isomères de l'acide domoïque

Avant de procéder à la mise en évidence des isomères de l'acide domoïque, une étape de purification sur cartouche échangeuse d'anions est réalisée à partir d'extraits bruts de coquillages.

### 3.3.1. Etape de purification sur cartouche échangeuse d'anions

Cette étape permet de purifier l'extrait méthanolique brut (MeOH/H<sub>2</sub>O) obtenu à partir des coquillages à tester conduisant à l'obtention d'une fraction concentrée en AD. Elle est réalisée d'une part pour les échantillons peu toxiques, et d'autre part, elle est indispensable pour mettre en évidence les isomères de l'AD présents à l'état de traces.

Comme l'acide domoïque possède une structure similaire à un acide aminé, il peut donc facilement perdre un proton du groupement carboxylique et ainsi passer à une forme chargée négativement. La présence de groupes anioniques est une propriété fondamentale de l'échangeur d'anions. Par conséquent, l'acide domoïque peut se fixer aisément sur les groupements cationiques de la phase stationnaire de la cartouche. Après le dépôt de l'extrait à purifier, le passage du tampon citrate provoque le décrochage des molécules de l'acide domoïque. L'efficacité de cette étape est testée sur l'échantillon de moules de référence contenant l'AD et ses isomères.

Le protocole de purification sur les cartouches échangeuses d'anions SAX est donné dans l'annexe 3. La qualité de la purification est vérifiée en dosant l'AD à la fois dans les trois éluats (destinés à être jetés) et dans le quatrième qui doit contenir uniquement les toxines recherchées.

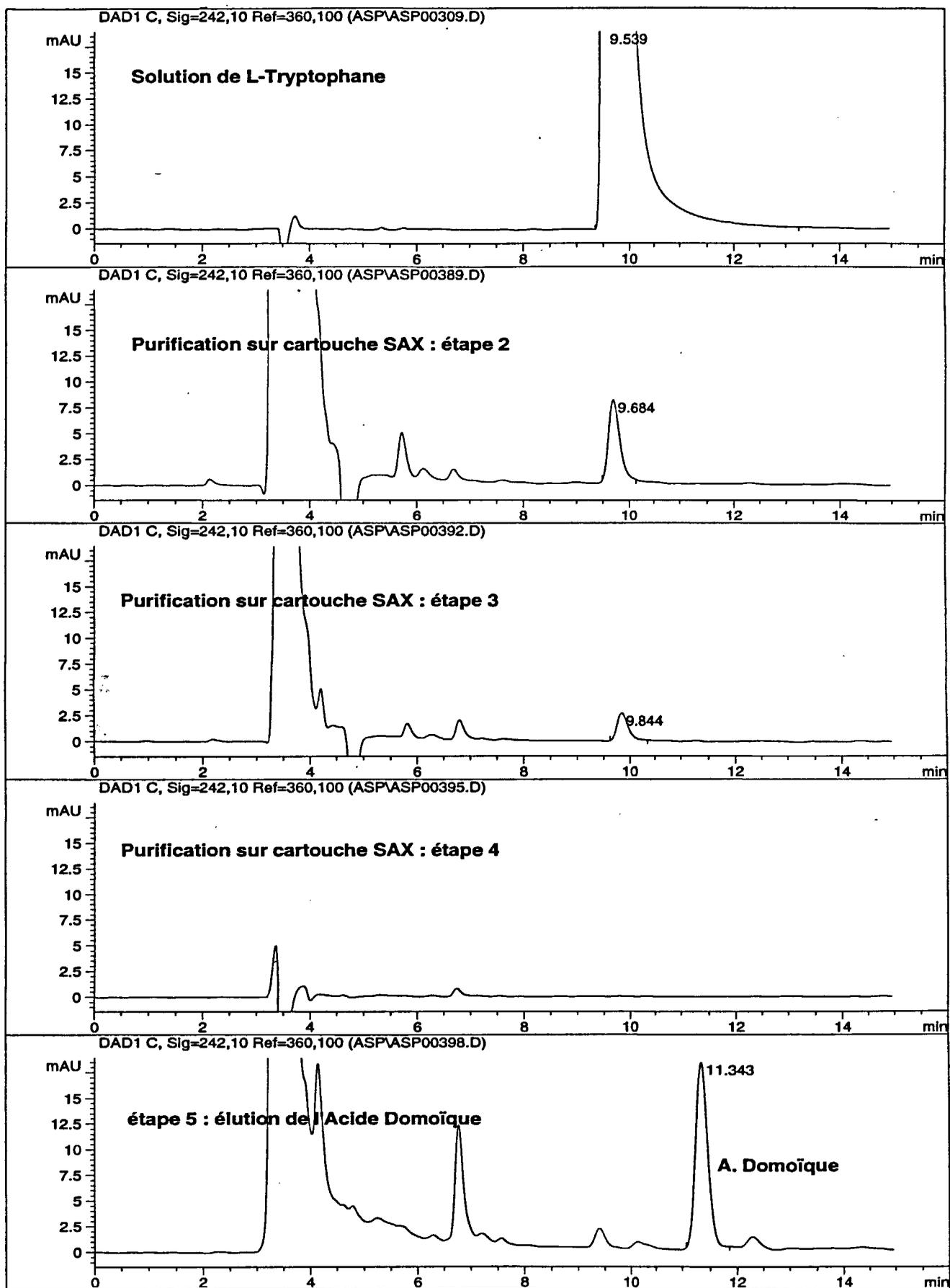


Figure 9 : Etapes de purification sur cartouche échangeuse d'anions SAX.

Parallèlement, un "échantillon" blanc subit la même procédure pour s'assurer que les cartouches ne produisent pas de pics "fantômes". Pour cela, 5 ml de solvant d'extraction [MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1)] sont déposés à la place des 5 ml de l'extrait.

L'analyse chromatographique des différents éluats (figure 9) montre que l'acide domoïque se trouve dans une seule fraction (quatrième éluat), ce qui traduit la bonne qualité de la purification. Nous pouvons donc conserver ces conditions de purification. Par conséquent, pour les purifications ultérieures, on gardera seulement le dernier éluat contenant l'AD et ses isomères.

Par ailleurs, il a été démontré que les échantillons de coquillages renferment, entre autre, du Tryptophane (Trp). Celui-ci ayant un temps de rétention très proche de celui de l'acide domoïque, il peut provoquer des interférences dans l'analyse. L'absence de Tryptophane dans le chromatogramme de l'acide domoïque montre l'efficacité de cette étape qui permet de l'éliminer et donc d'éviter toute interférence avec les isomères de l'acide domoïque (*voir partie 3.3.2.*).

### **Limite de détection après purification**

Après l'étape de purification, le seuil de détection de l'AD est de 54,84 ng AD/g de chair au lieu de 148 ng dans l'extrait non purifié (rapport signal/bruit = 3).

La purification des échantillons sur cartouches SAX permet d'obtenir une limite de détection encore meilleure puisque la toxine recherchée se retrouve dans une matrice beaucoup moins chargée que l'extrait brut et elle peut donc être plus facilement décelée.

Cependant, l'étape de purification n'est pas nécessaire pour évaluer la toxicité globale d'un échantillon de coquillages étant donné que la limite de détection obtenue sur un extrait brut est largement en dessous du seuil autorisé (20 µg AD/g chair), d'autant plus que les échantillons à tester sont nombreux dans le cadre de la surveillance.

Par contre cette étape sera nécessaire pour la mise en évidence des isomères de l'acide domoïque comme nous le verrons maintenant.

### **3.3.2. Détection des isomères de l'acide domoïque par CLHP**

Les conditions opératoires retenues en CLHP en isocratique permettaient de doser à la fois l'acide domoïque et ses isomères sans pouvoir de séparation de ces derniers. En effet, les isomères ayant une structure chimique voisine de celle de l'acide domoïque sont élués en même temps que ce dernier (même temps de rétention). Ce qui permet de prendre en compte également la toxicité des isomères actifs et donc une évaluation de la toxicité globale des coquillages dans le cadre de la surveillance.

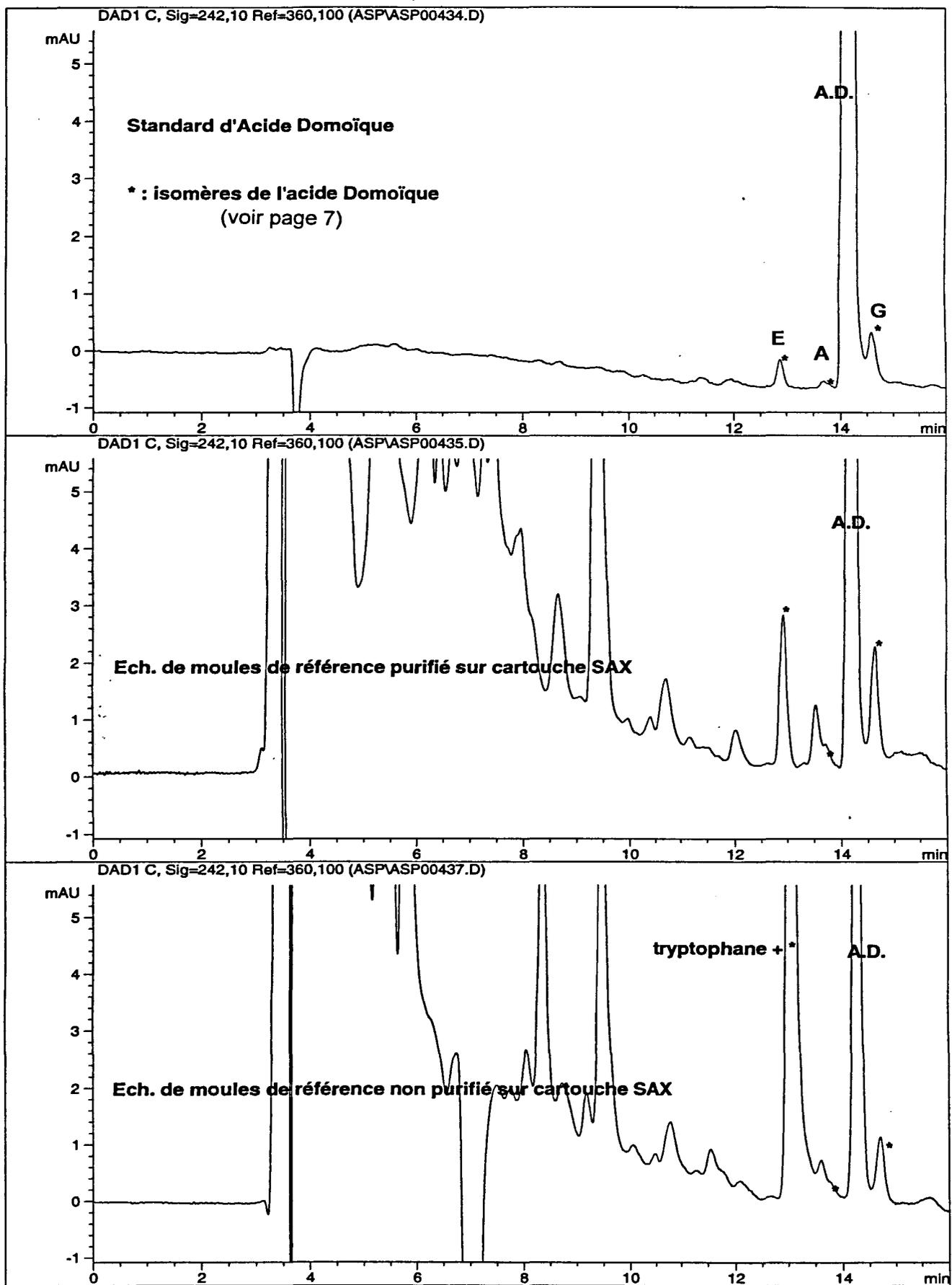


Figure 10 : Mise en évidence des isomères de l'acide domoïque par CLHP.

Par contre, dans le cas de la recherche du profil toxinique d'un extrait de phytoplancton et de coquillages, il est indispensable de disposer d'une méthode d'analyse chromatographique permettant leur résolution afin de les identifier. C'est pourquoi, nous appliquons un gradient linéaire de solvant, ce qui entraînera la séparation de ces isomères qui formeront chacun un pic en plus de celui de l'AD.

#### Conditions opératoires

Dans un premier temps, nous avons cherché les conditions opératoires optimales pour séparer les différents isomères en essayant plusieurs gradients de solvants. Nous avons obtenu une résolution satisfaisante en appliquant le gradient linéaire de solvant suivant : de 5 à 25 % de CH<sub>3</sub>CN (complété avec H<sub>2</sub>O 0,1 % TFA) pendant 25 min suivi de 25 % de CH<sub>3</sub>CN pendant 5 min.

#### Résultats

La figure 10 regroupe le chromatogramme d'une solution standard contenant l'AD et quelques isomères et ceux de l'échantillon de moules de référence purifié sur cartouche SAX et le même échantillon non purifié. Nous pouvons observer sur le chromatogramme de la solution standard l'apparition de trois pics au voisinage de celui de l'acide domoïque correspondant à ses isomères (A, G, E, voir page 7). Ces derniers sont également présents dans les deux échantillons de référence.

Cependant, pour l'échantillon non purifié nous pouvons observer un chevauchement du pic du Tryptophane (Trp) avec celui d'un des isomères. En effet, le Trp est éliminé lors de l'étape de purification, ce qui n'est pas le cas dans l'extrait brut dans lequel il est présent et interfère donc avec l'isomère de l'AD. Le temps de rétention du Trp est obtenu en injectant une solution de Trp seul et un échantillon de moules saines.

Afin d'éviter ce problème d'interférence du tryptophane avec l'isomère E de l'AD, il est donc indispensable de procéder à l'étape de purification sur cartouche échangeuse d'anions. Ceci permettra l'identification des isomères de l'acide domoïque en vue de déterminer le profil toxinique des espèces de *Pseudo-nitzschia* et des coquillages contaminés.

## 4. Dépistage des toxines amnésiantes en 1999

Le dépistage des toxines amnésiantes dans les coquillages est conduit lors de la période estivale (avril-août) durant laquelle des proliférations de *Pseudo-nitzschia spp.* toxiques sont susceptibles d'apparaître. Pour l'année 1999, l'analyse des échantillons a été centralisée au laboratoire DEL/MP-PN. L'identification des espèces toxiques, qui nécessite la microscopie électronique à balayage, est centralisée au laboratoire de Biologie et Biotechnologie Marine à l'Université de Caen.

### 4.1. Echantillonnage

#### **Coquillages**

Le contrôle de la salubrité des coquillages (moules, coques, olives, palourdes) a été réalisé à partir des prélèvements REPHY provenant de différents points des côtes françaises touchées par une prolifération de *Pseudo-nitzschia spp.* dépassant  $10^5$  cellules/Litre. L'échantillonnage a été pris en charge par le laboratoire côtier du secteur touché :

*Port en Bessin* : Bréville, Grand Camp Ouest ;  
*Saint Malo* : La Houssaie, Le Valais, Dahouet, Morieux ;  
*Concarneau* : Tronoen, Kervel, Glénan ;  
*Arcachon* : Banc d'Arguin ;  
*Nantes* : Ile d'Yeu ;  
*Sète* : Marseillan plage, Aresquiers ;  
*Toulon* : Carteau, Courbe ;  
*La Rochelle* : Ile d'Aix, Filière W (Pertuis Breton) ;  
*La Trinité-sur-Mer* : Houat, Groix ;  
*La Tremblade* : Galon d'Or, Petite Chette.

De plus, comme c'était la première année de surveillance, dans le cas d'échantillons douteux, nous avons également testé les hépatopancréas (HP) (organe dans lequel se concentrent principalement les phycotoxines) pour mettre en évidence des traces d'acide domoïque. Ceci a permis de répertorier des zones qui peuvent présenter ultérieurement un risque et donc à surveiller de plus près.

La préparation des extraits de la chair des bivalves à tester se fait selon le protocole d'extraction décrit dans l'annexe 1. Les analyses chromatographiques se font dans les conditions expérimentales définies (voir encadré page 17).

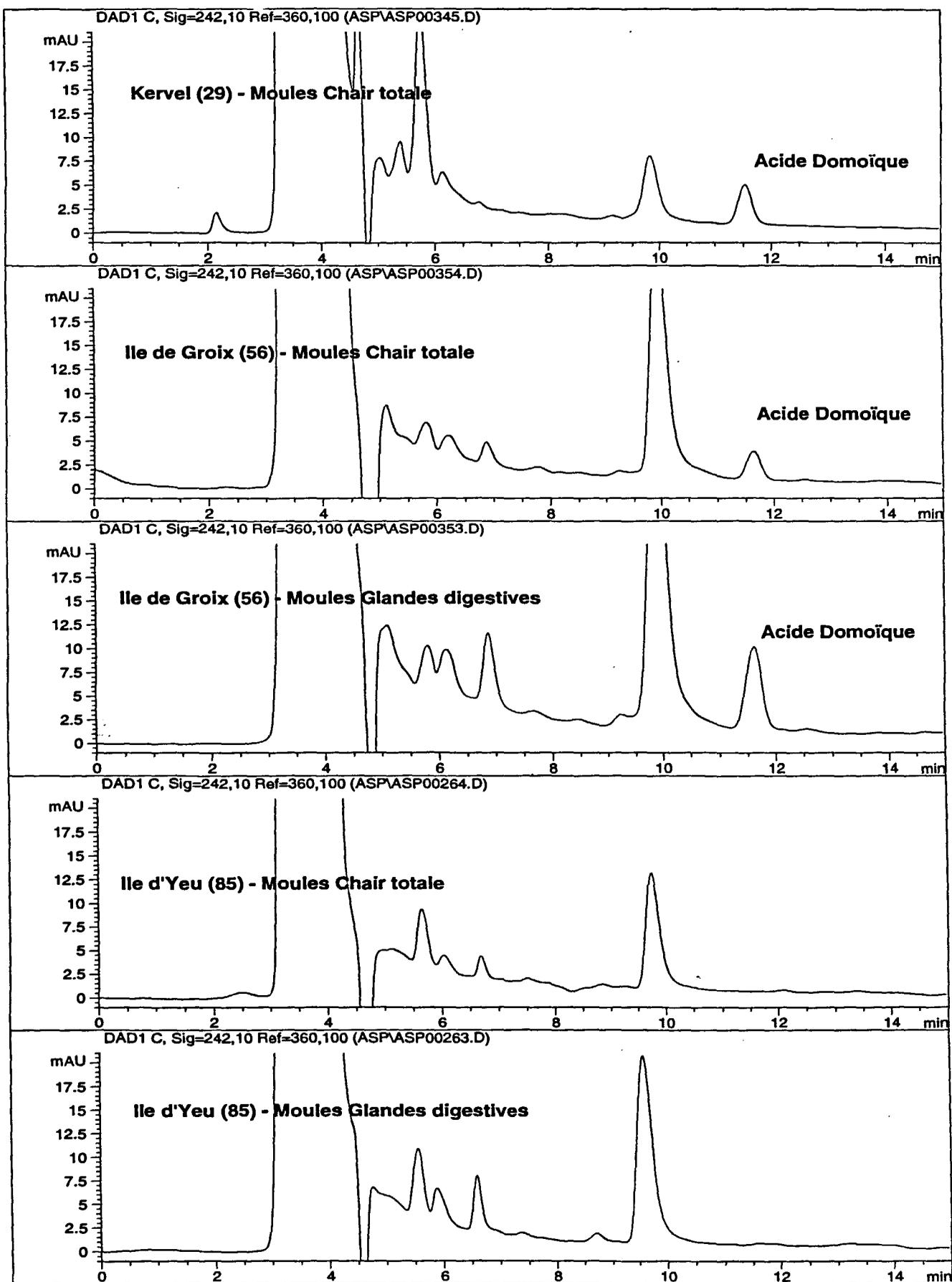


Figure 11 : Exemples de chromatogrammes montrant la présence ou l'absence de l'acide domoïque (AD) dans les échantillons de coquillages analysés.

### **Phytoplancton**

Contrairement aux espèces toxiques du genre *Dinophysis* et *Alexandrium* dont l'identification se fait directement au microscope photonique inversé, celle des espèces de *Pseudo-nitzschia* nécessite l'utilisation de la microscopie électronique à balayage (MEB). En cas de détection des espèces suspectes, celles-ci sont isolées et mises en culture en vue de déterminer son profil toxinique, ce qui permettra d'établir une liaison entre la présence de l'espèce de *Pseudo-nitzschia* productrice de toxines et l'accumulation de ces dernières dans les coquillages.

Comme l'identification des espèces de *Pseudo-nitzschia* toxiques se fait par MEB, nous ne pouvons pas disposer des résultats de l'expertise immédiatement étant donné la lourdeur de la manipulation. De plus, ces examens microscopiques sont pratiqués sur un grand nombre de prélèvements de phytoplancton. Par conséquent, en respectant le principe de précaution maximale, tous les échantillons de coquillages font l'objet d'une analyse systématique par CLHP/UV afin de garantir à temps la salubrité des coquillages.

#### **4.2. Détection de l'acide domoïque**

##### **Coquillages**

Le tableau 2 regroupe les résultats des analyses des échantillons de coquillages prélevés pendant les périodes de proliférations de diatomées du genre *Pseudo-nitzschia*, du mois d'avril au mois d'août. D'après les résultats obtenus, l'acide domoïque a été mis en évidence dans les coquillages en provenance de sites suivants : La Bretagne (Keruel, Iles Glénan, Houat, Groix), Charente Maritime (Ile d'Aix, Galon d'Or, Petite Chette), Méditerranée (Marseillan plage, Sète). Les teneurs maximales trouvées (3,2 µg AD/g Chair et 7,8 µg AD/g HP) ne présentaient aucun danger pour les consommateurs puisqu'elles sont largement en dessous du seuil autorisé (20 µg/g de chair).

La figure 11 regroupe quelques exemples de chromatogrammes montrant la présence ou l'absence de l'acide domoïque dans les échantillons de coquillages analysés.

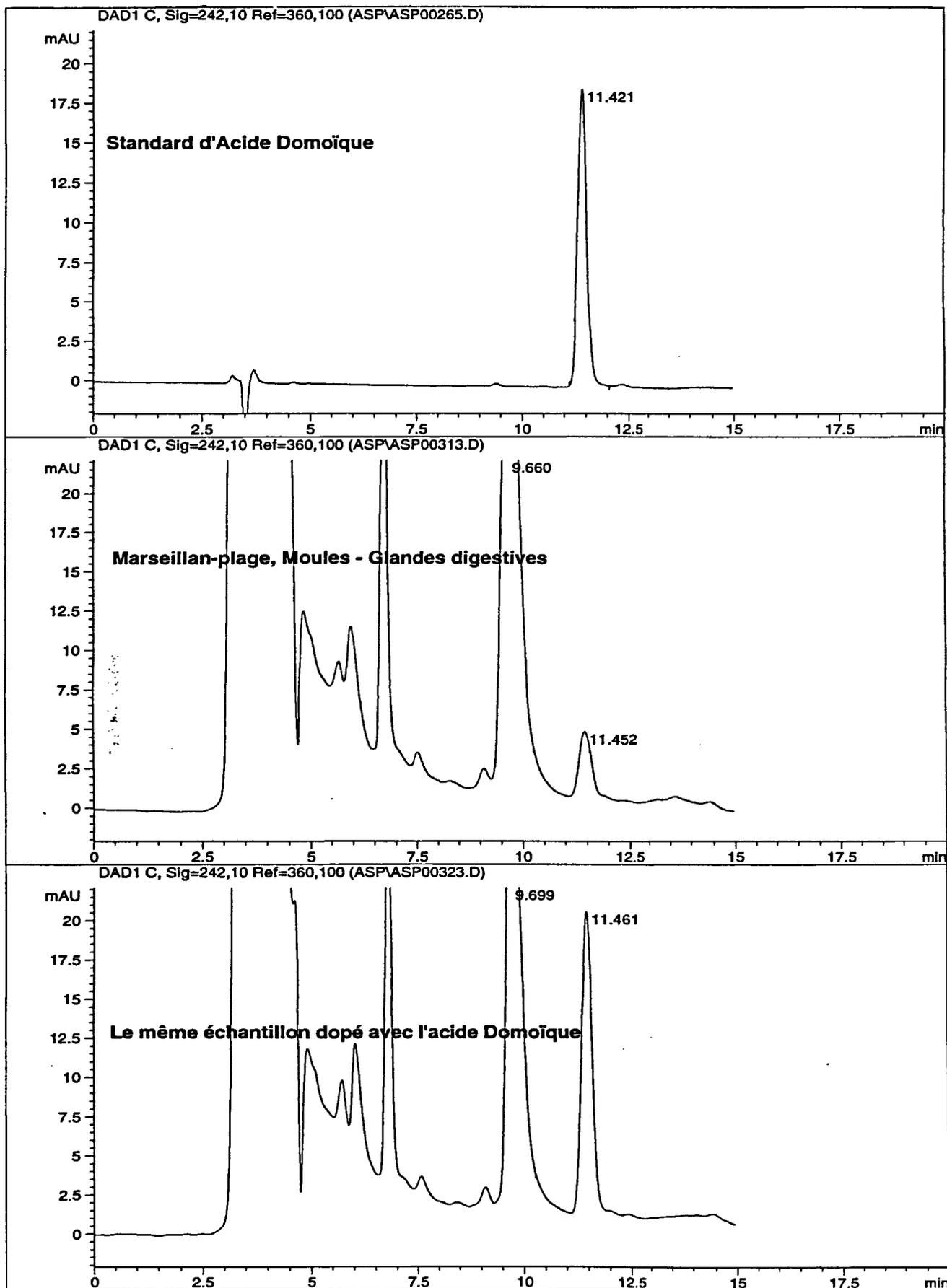


Figure 12 : Confirmation de la présence de l'acide domoïque par la méthode d'ajout dosé sur un échantillon douteux.

Lieu de prélèvement Code point (site)	Date	Nature échantillon	[AD] en µg AD/g de chair	[AD] en µg AD/g d'HP
13027014 (Saint Briec)	23/03/99	moules	N.D.	N.D.
13027030 (Saint Briec)	23/03/99	moules	N.D.	N.D.
09021001 (ouest Cotentin)	28/04/99	moules	N.D.	N.D.
29062002 (Vendée)	10/05/99	moules	N.D.	N.D.
34077054 (Arcachon))	12/05/99	moules	N.D.	N.D.
13026007 (Saint Briec)	23/05/99	moules	N.D.	N.D.
13027027 (Saint Briec)	24/05/99	coques	N.D.	N.D.
19039001 (Douarnenez))	26/05/99	olives	3,2	N.A.
19039001 (Douarnenez))	31/05/99	olives	N.A.	7,5
07014007 (Baie des Veys)	01/06/99	moules	N.D.	N.D.
37088001 (Languedoc)	01/06/99	moules	N.D.	N.A.
37088002 (Languedoc)	01/06/99	moules	N.A.	3,93
38094001 (Golfe de Fos)	07/06/99	moules	N.D.	N.D.
31068002 (Pertuis d'Antioche)	10/06/99	moules	N.D.	1,15
25049007 (Baie de Quiberon et Belle Ile)	14/06/99	moules	0,24	0,34
30065019 (Pertuis Breton)	14/06/99	moules	N.D.	N.D.
32070041 (Marennes)	15/06/99	moules	0,31	N.A.
32071019 (Marennes)	15/06/99	moules	0,69	N.A.
21041001 (Concarneau)	17/06/99	palourdes	1,55	N.A.
23045001 (Lorient)	17/06/99	moules	2,6	7,8
20040001 (Audierne)	23/06/99	moules	N.D.	N.D.

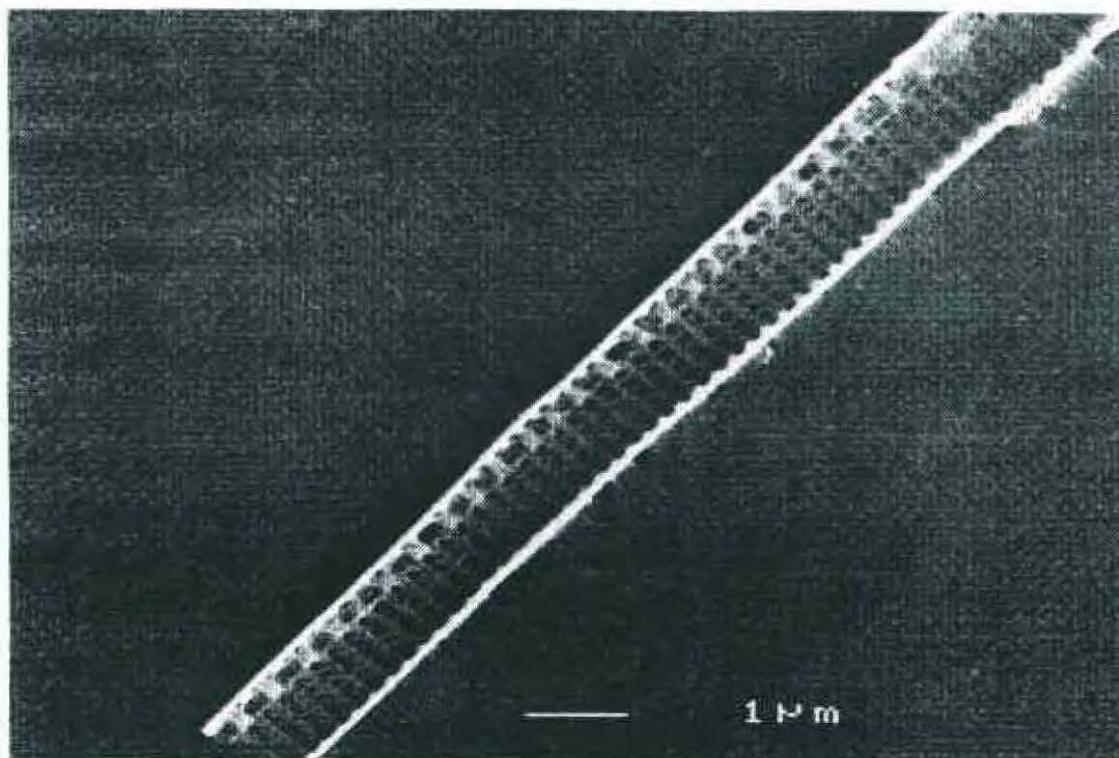
Tableau 2 : Teneurs en acide domoïque dans les coquillages

N.D. : non détecté < 0,15 µg/g chair (limite de détection)

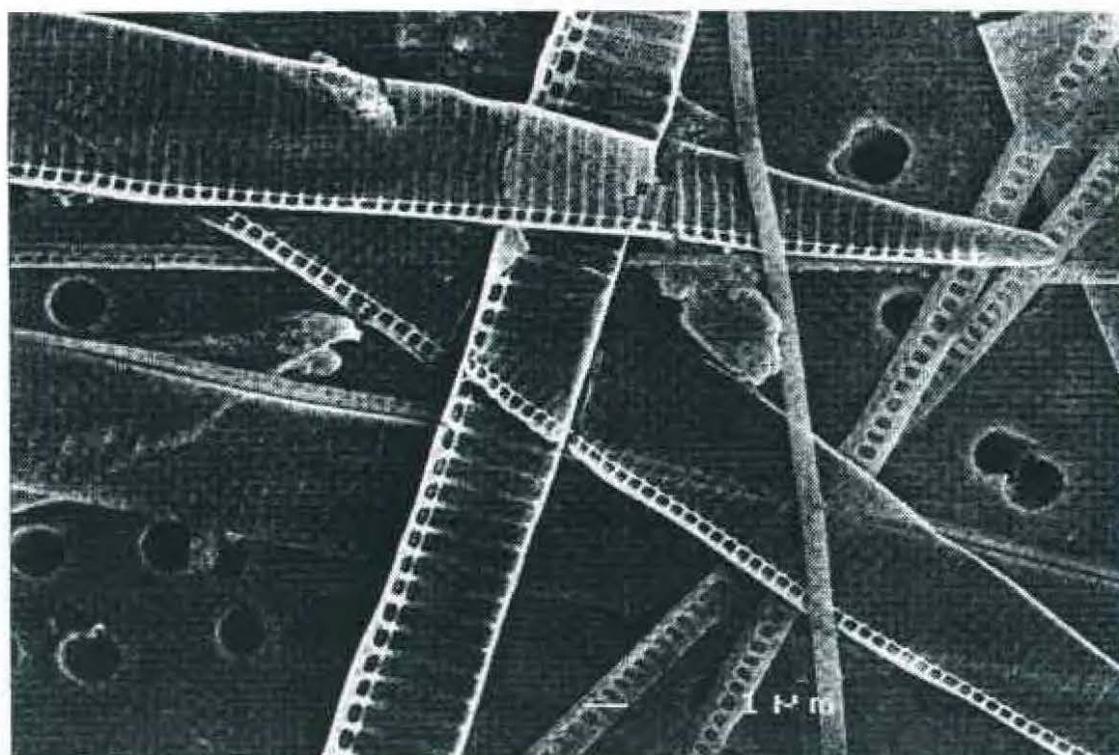
N.A. : non analysé

Dans les cas douteux, une méthode d'ajout dosé a aussi été utilisée afin de confirmer la présence de la toxine recherchée. Elle consiste en un mélange contenant l'échantillon suspect et un standard d'AD en quantité égale. Si l'échantillon contient réellement de l'acide domoïque, le pic de ce dernier augmente de surface correspondant à l'addition des deux pics (celui de l'échantillon et celui de l'AD ajouté). Connaissant les surfaces du pic de l'échantillon et celui du standard avant le mélange, la comparaison de ces surfaces avec celle obtenue correspondant aux deux pics, permet de déduire si le pic suspect de l'échantillon correspond ou non à l'acide domoïque. Un exemple de ce type de technique est donné dans la figure 12 sur l'échantillon de Marseillan plage (Sète).

La détection de l'acide domoïque dans les coquillages de certaines zones est corrélée avec les résultats de l'expertise par MEB des prélèvements phytoplanctoniques lors des efflorescences à *Pseudo-nitzschia spp.*. En effet, les examens microscopiques ont permis d'identifier les espèces de *Pseudo-nitzschia* connues toxiques (figure 13) : *P. pseudodelicatissima* (Pertuis breton, Kervel) et *P. multiseriis* en Bretagne (Houat, Meaban, Groix, Iles Glénan). D'ailleurs, l'espèce *P. multiseriis* a pu être mise en culture afin de vérifier sa toxicité.



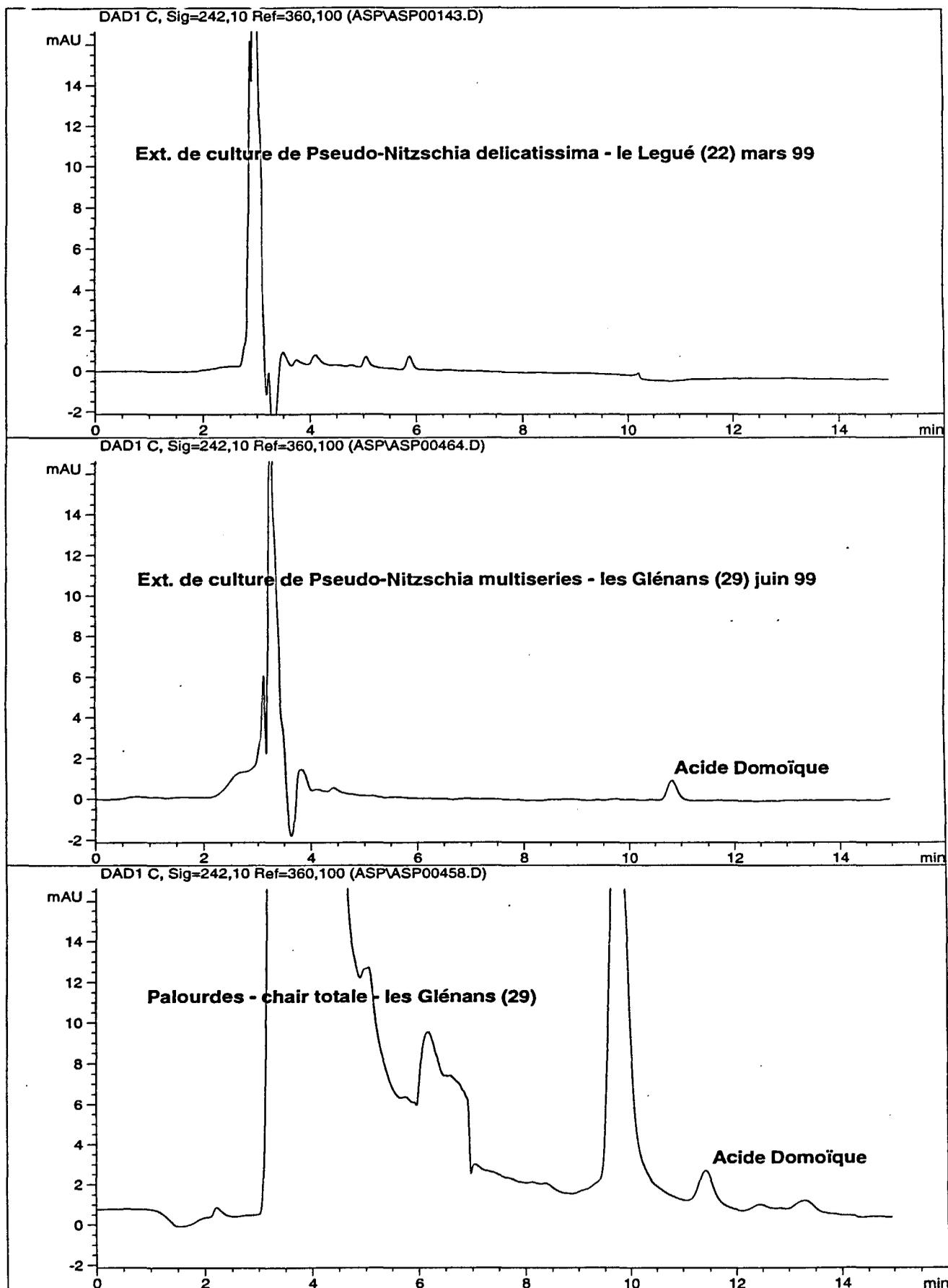
*Pseudo-nitzschia pseudo-delicatissima*



*Pseudo-nitzschia frandulenta* (dominante)  
+ *Pseudo-nitzschia multiseriata* (au milieu et en haut à droite)

Réalisation : Chantal Billard, Université de Caen

Figure 13 : Examen des prélèvements de *Pseudo-nitzschia* spp. au microscope électronique à balayage (MEB).



Figures 14 : Analyses chromatographiques des extraits de culture de *Pseudo-nitzschia*.

### **Extraits de culture de *P. multiseriis***

L'analyse des extraits de culture de *Pseudo-nitzschia spp.*, isolée à partir de prélèvements d'eau de mer, va permettre de vérifier l'implication de l'espèce suspecte dans la toxicité des coquillages. Les analyses se font sur des cultures de cellules algales en phase de sénescence durant laquelle l'acide domoïque est produit.

La recherche de l'acide domoïque a été effectuée sur deux extraits de cultures de *Pseudo-nitzschia* :

- *P. delicatissima* (différente de *P. pseudodelicatissima* connu toxique) en provenance de Saint-Malo lors des blooms (mars 99),
- *P. multiseriis* identifiée dans différents prélèvements en provenance de Bretagne (juin 99).

Dans l'extrait de culture de *P. delicatissima*, aucune trace d'acide domoïque n'a été décelée. Son absence est cohérente avec les résultats négatifs des échantillons de coquillages en provenance de Saint-Malo prélevés à la même époque. Par contre, la toxicité de *P. multiseriis* a été confirmée puisque nous avons détecté l'acide domoïque. Ce qui est corrélé avec les résultats des analyses des coquillages prélevés en Bretagne puisque cette espèce a été présente dans les prélèvements phytoplanctoniques. La figure 14 donne les résultats des analyses chromatographiques réalisées à partir de l'extrait de culture de *Pseudo-nitzschia* et un exemple d'échantillon de coquillages prélevé dans la même zone (Les Glénan).

Par ailleurs, le chromatogramme donnant le profil toxinique de *P. multiseriis* est très propre, en particulier au voisinage du pic de l'acide domoïque. Par conséquent, cet échantillon pourra être utilisé comme témoin. De plus, des cultures en masse de *P. multiseriis* pourront être conduites en vue d'obtention de standard d'acide domoïque.

## Conclusion

En application de la transcription en droit français de la directive européenne (97/61/CE du 20 octobre 1997) en matière de salubrité des coquillages, le dépistage des toxines amnésiantes (acide domoïque, AD) est devenu effectif en France en 1999. Il est déclenché dès que le nombre de cellules de *Pseudo-nitzschia spp.*, productrice de ces toxines, dépasse le seuil de  $10^5$  cellules/Litre. En fait, le suivi des espèces du genre *Pseudo-nitzschia* existait déjà dans le cadre du réseau de surveillance. Un premier bilan a été fait en 1995 lors des efflorescences à *Pseudo-nitzschia*, aucune trace d'acide domoïque n'avait été trouvée dans les coquillages.

Comme le test sur souris n'est pas adapté pour la mise en évidence de l'acide domoïque, du fait de son seuil de détection trop élevé, sa détection doit se faire par Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à un détecteur Ultra Violet (CLHP/UV). Afin de mettre en place cette technique dans le cadre du réseau de surveillance, nous avons entrepris une étude de faisabilité et de validation de cette méthode. Pour cela, nous avons utilisé des échantillons de référence : solution standard d'acide domoïque et un échantillon de moules certifié. Le choix définitif des paramètres d'analyses est basé sur un compromis entre le temps d'analyse et la qualité de la résolution chromatographique.

Le dosage de l'AD par CLHP/UV se fait à partir des extraits aqueux de coquillages et/ou de culture de *Pseudo-nitzschia spp.*. L'analyse est effectuée sur une phase stationnaire de silice greffée  $C_{18}$  (4,6 mm x 250 mm) à 40°C. Le solvant d'élution est un mélange  $CH_3CN / H_2O$  0,1% TFA (10:90) avec un débit de 1 ml/min. La détection de l'AD est effectuée à la longueur d'onde  $\lambda = 242$  nm. La limite de détection de l'acide domoïque est de 31,25 ng AD/ml à partir d'une solution standard et de 148 ng AD/g de chair à partir d'un échantillon de moules de référence.

D'après les analyses des échantillons de coquillages prélevés lors des efflorescences à *Pseudo-nitzschia spp.*, du mois d'avril au mois d'août 1999, l'acide domoïque a été mis en évidence dans les bivalves en provenance de différents sites de Bretagne, de Charente Maritime et de Méditerranée. Les teneurs maximales trouvées (3,2  $\mu g$  AD/g Chair et 7,8  $\mu g$  AD/g HP) ne présentaient aucun danger pour les consommateurs puisqu'elles sont largement au-dessous du seuil autorisé (20  $\mu g$ /g de chair).

De plus, l'accumulation de l'acide domoïque dans les coquillages a été corrélée avec la présence des espèces de *Pseudo-nitzschia* identifiées par Microscopie Electronique à Balayage (MEB) comme étant potentiellement toxiques : *P. pseudodelicatissima* et *P. multiseriis*. A partir des extraits de culture de cette dernière, nous avons confirmé sa toxicité et donc son implication dans l'accumulation de l'acide domoïque dans les bivalves.

L'ensemble des résultats obtenus nous permet de dire que la méthode est adaptée pour être utilisée en contrôle de routine pour la détection de l'acide domoïque à partir d'extraits de coquillages et de cultures de *Pseudo-Nitzschia* puisqu'elle est spécifique, sensible et reproductible. De plus, elle est relativement rapide car le dosage global des toxines amnésiantes (AD et ses isomères) ne nécessite pas une étape supplémentaire de purification des extraits à tester. Cette technique a donc été transférée au laboratoire côtier de Concarneau (DEL/CC) qui a été retenue pour prendre en charge la surveillance des toxines amnésiantes.

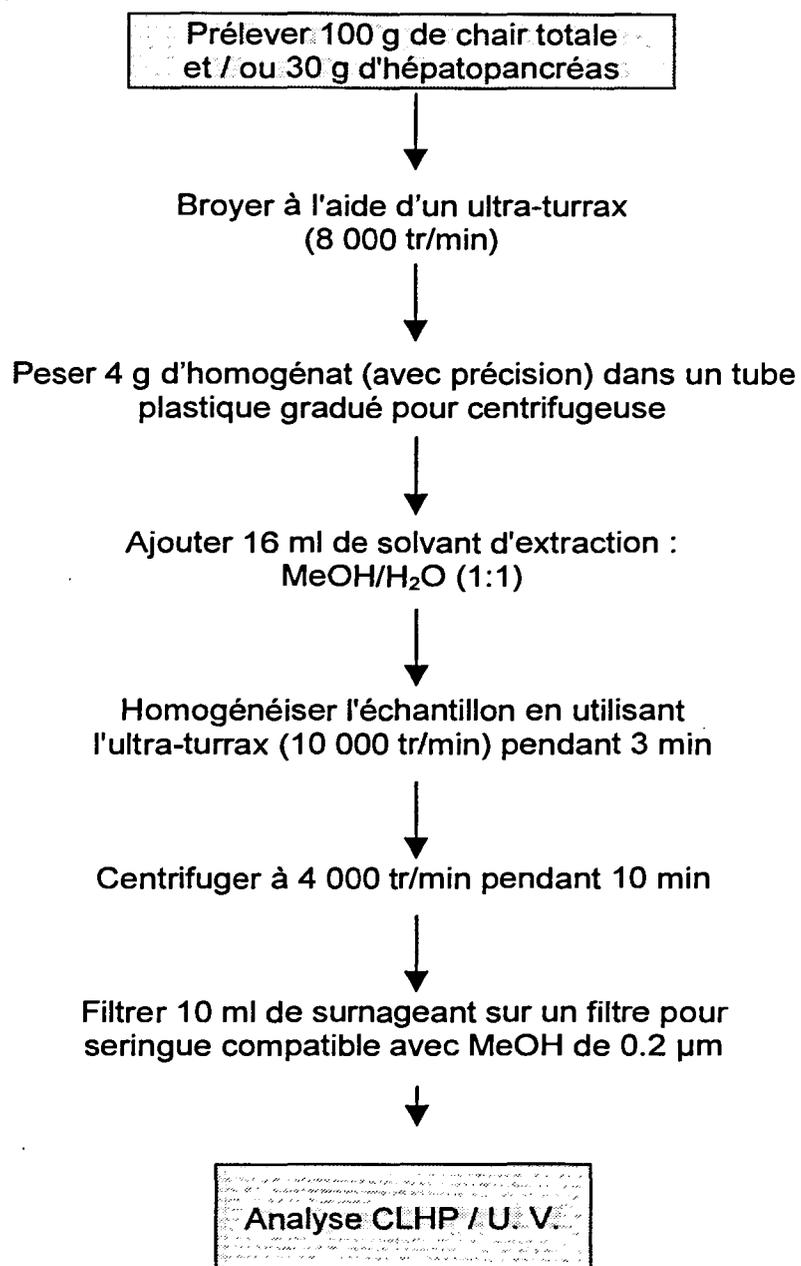
Par contre la mise en évidence des isomères de l'acide domoïque, présents à l'état de trace, passe par une étape de purification sur cartouche échangeuse d'anions qui permet d'éliminer le Tryptophane, présent naturellement dans les coquillages, pouvant interférer avec l'un des isomères. La séparation de ces derniers par CLHP est obtenue en appliquant un gradient linéaire de solvant d'élution, ce qui permet de déterminer précisément le profil toxinique des espèces de *Pseudo-nitzschia* et des coquillages contaminés.

## Références

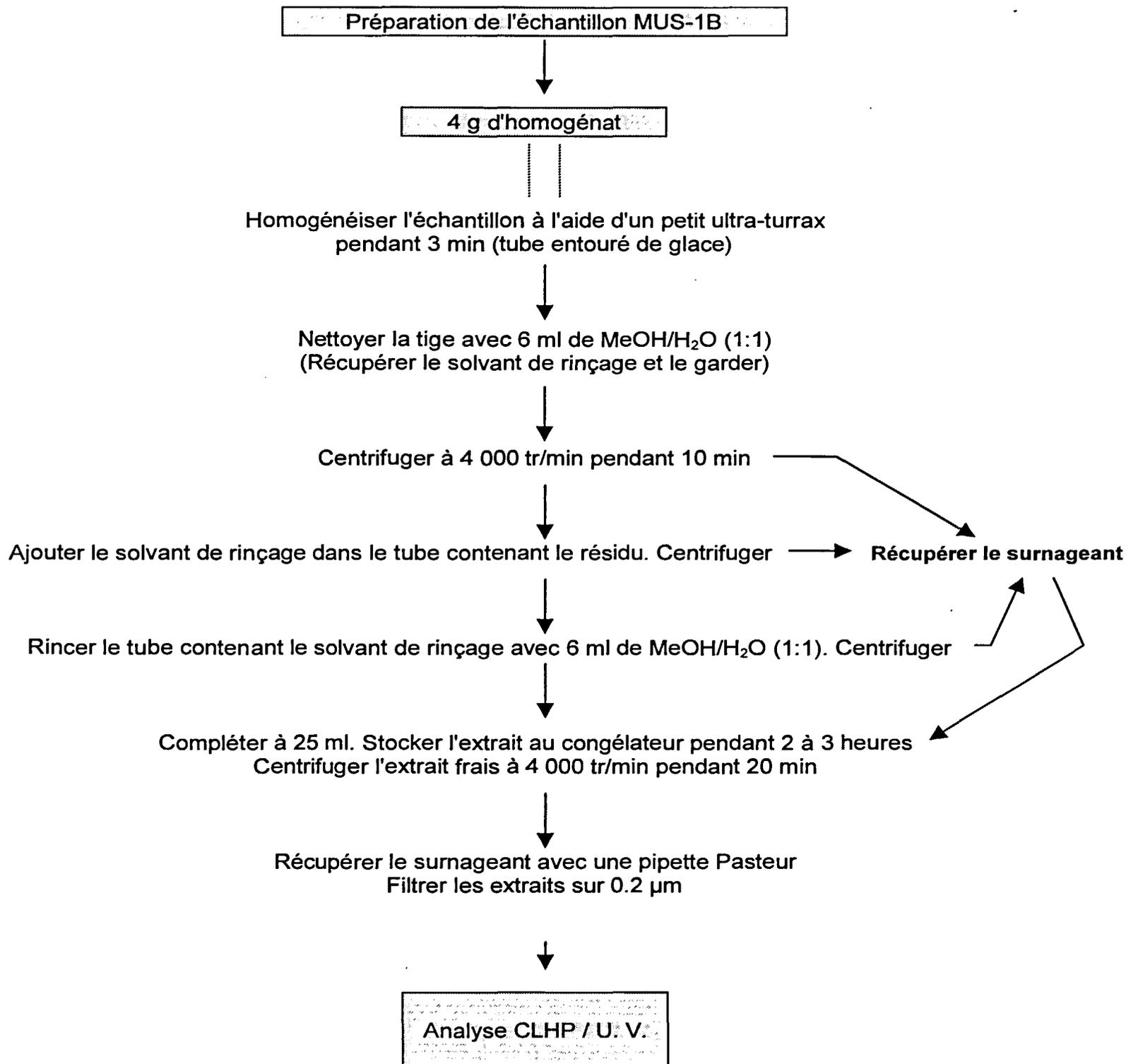
- AMZIL Z. (1993). Phycotoxines des efflorescences algales, l'acide okadaïque : optimisation de la purification - nouvelle méthode de détection biologique. *Thèse de Doctorat de l'Université de Nantes, Ecole doctorale Chimie-Biologie.*
- AOAC International (1995). AOAC Official Method 959.08: paralytic shellfish poison, biological method. In: *Official Methods of Analysis, 14th Edition*, AOAC International, Arlington, VA, Chapter 35, pp. 21-22.
- BADEN D., MENDE T., POLI M., BLOCK R. (1984). Toxins from Florida's red tide dinoflagellate *Ptychodiscus brevis*. In *Seafood Toxins, ACS Series 262*, Washington, pp.359-367.
- BAGNIS R., CHANTREAU S., CHUNGUE E., YASUMOTO T., (1980). Origins of ciguatera fish poisoning: a new dinoflagellate, *Gambierdiscus toxicus* definitively involved as a causal agent. *Toxicon.*, 18, 199-208.
- BARBIER M., AMZIL Z., MONDEGUER F., BHAUD Y., SOYER-GOBILLARD M.O., LASSUS P. (1998). Okadaic acid and PP2A cellular immunolocalization in *Prorocentrum lima* (Dinophyceae). *Phycologia*, 38(1), pp. 41-46.
- BATES S. (1989). Pennate diatom *Nitzschia pungens* as the primary source of domoic acid, a toxin in shellfish from eastern Prince Edward Island, Canada. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, n° 46, pp. 1203-1215.
- BATES S.S., GARRISON D.L., HORNER R.A. (1998). Bloom Dynamics and Physiology of Domoic-Acid-Producing Pseudo-nitzschia Species. In *Nato AS1 Series*, vol. G 41, pp. 267-292.
- BELIN C., RAFFIN B. (1998). Les espèces phytoplanctoniques toxiques et nuisibles sur le littoral français de 1984 à 1995, résultats du REPHY (réseau de surveillance du phytoplancton et des phycotoxines). *RST, DEL/MP - AO*, 98-16, tome 1, pp. 1-125.
- BELIN C., MARCAILLOU - LE BAUT C., AMZIL Z., LE DOUX M. (1996). Manuel des méthodes de détection des phycotoxines DSP et PSP pour le REPHY. Rapport interne DEL- IFREMER, avril 96.
- LASSUS P., BARDOUIL M., BERTHOME J.P., MAGGI P., TRUQUET P., LE DEAN L. (1988). Seasonal occurrence of *Dinophysis sp.* along the French coast between 1983 and 1987. *Aquat. Living Ressour.*, n°1, pp. 159-164.

- LASSUS P., LE DOUX M., BARDOUIL M., BOHEC M., ERARD-LE DENN E. (1994). Kinetics of *Alexandrium minimum* Halim toxin accumulation in mussels and clam. *Natural toxins*, 2, pp. 329-333.
- LAWRENCE J.F., CHARBONNEAU C.F., MENARD C. (1991). Liquid chromatography determination of domoïc acid in mussels, using AOAC paralytic shellfish poison extraction procedure : collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 74, 68-72.
- LE DOUX M., BELIN C., LOTFI Y., LASSUS P., FREMY J.M. (1996). Domoic acid : state of contamination of shellfish in France. Preliminary study. *In Harmful and Toxic Algal Blooms*. Yasumoto T., Oshima Y. and Fukuyo Y. (eds). IOC of UNESCO, pp. 135-137.
- LE GRAND A. (1991). Les toxines de la ciguatéra. *In Proceedings of symposium on marine biotoxins*, Fremy J.M. Ed. CNEVA, Paris, pp. 53-59.
- MASSELIN P., LASSUS P., BARDOUIL M., (1992). High performance liquid chromatography analysis of diarrhoeic toxins in *Dinophysis* spp. from the French coast. *Journal of Applied Phycol.* 4 : 385-389.
- MASSELIN P., LE SAUX J.C., LE GAL D., LASSUS P. (1996). Dosage par C.L.H.P. des toxines paralysantes de coquillages contaminés par *Alexandrium minutum* en rivières de Morlaix et de la Penzé en 1994. *Rapport interne IFREMER DEL / Nantes*, pp. 1-27.
- MURATA M., SHIMATANI M., SUGITANI H., OSHIMA Y., YASUMOTO T. (1982). isolation and structural elucidation of the causative toxin of diarrheic shellfish poisoning. *Bull. Jap. Soc., Fish.*, 48 (4), pp.549-552.
- MURATA M., LE GRAND A.M., ISHASBASHI Y., YASUMOTO T., (1989). Structure of ciguatoxin and its congener. *J. Am. Chem. Soc.*, 111, 8929-8931.
- MURATA M. NAOKI H., IWASHITA T., MATSUNAGA S., SASAKI M., YOKOYAMA A., YASUMOTO T., (1993). Structure of Maitotoxin. *J. American Chemical Society*, 115, 2060-2062.
- PERL T.M., BEDARD L., KOSATSKY T., HOCHIN J.C., TODE E., REMIS R.S., (1990). An outbreak of toxic encephalopathy caused by eating mussels contaminated with domoic acid. *New England J. Med.*, 322, 1775-1780.
- QUILLIAM M.A., XIE M., HARDSTAFF W.R. (1995). Rapid extraction and clean up for liquid chromatographic determination of domoïc acid in unsalted seafood. *J. AOAC Int.* 78 : 543-554.

- RAVN H. (1995). Amnesic Shellfish Poisoning (ASP). Manuals and Guides n°31, vol. 1, pp. 1-15. IOC (Intergovernmental Oceanographic Commission), *HAB Publication* series volume 1.
- SHIMIZU Y., GUPTA S., NORTE M., HORI A., GENENAH A., KOBAYASHI M. (1985). Biosynthesis of paralytic shellfish toxins. *In Toxic Dinoflagellates*, Elsevier, Amsterdam, pp. 271-274.
- SHIMIZU Y., CHOU H., BANDON H. (1986). Structure of brevetoxin A (GB-1 toxin), the most potent toxin in the Florida red tide organism *Gymnodinium breve* (*Ptychodiscus brevis*). *J. Am. Chem. Soc.*, 108, 514-515.
- SHUMWAY S.E., (1989). Toxic algae : a serious threat to shellfish aquaculture. *World aquaculture* 20 (4), 65-74.
- SMITH J. (1993). Toxicity and Pseudo-nitzschia pungens in Prince Edward Island, 1987-1992. *Harmful Algal News*, n°6, pp. 1-8.
- SOURNIA A., BELIN C., BERLAND B., ERARD-LE DENN E., GENTEN P., GRZEBYK D., MARCAILLOU-LE BAUT C., LASSUS P., PARTENSKY F. (1991). Le phytoplancton nuisible des côtes de France. Ed. IFREMER/CNRS, Brest, 154 p.
- STEINDINGER K., (1979). Collection, enumeration and identification of free-living dinoflagellates. In *Toxic dinoflagellate blooms*. Taylor, Seliger, Ed. Elsevier, North Holland, New York, 435-442.
- TEITELBAUM J.S., ZATORRE R.J., CARPENTER S., GENDRON D., EVANS A.C., GJEDDE A., CASHMAN N.R., (1990). Neurologic sequelae of domoic acid intoxication due to the injection of contaminated mussels. *New Engl. J. Med.*, 322, 1781-1787.
- TREGUER P.-Y. (1998). Les intoxications alimentaires humaines causées par les algues phytoplanctoniques toxiques. *Médecine et nutrition*, n°4 et n°5, pp. 145-159 et pp. 181-192.
- WORMS J., BATES S., SMITH J.C., CORMIER P., LEGER C., PAULEY K., (1991). Domoic acid, a neurotoxin produced by the Pennate diatom *Nitzschia pungens forma multiseries* : An overview of some recent ecological and physiological observation. In *Proceedings of Symposiums on marine biotoxins*. Freymy J.M. Ed. CNEVA, Paris, 35-42.
- WRIGHT J.L.C., BOYD R.K., DEFREITAS A.S.W., FALK M., FOXALL R.A., JAMIESON W.D., LAYCOCK M.V., MC MULLOCH A.W., MC INNES A.G., ODENSE P., PATHAK V., QUILLIAM M.A., RAGEN M., SIM P.G.,



**Protocole d'extraction pour les échantillons de coquillages**



**Protocole d'extraction pour l'échantillon de référence (MUS-1B)**

**Conditionnement de la cartouche**

Conditionner la cartouche successivement avec :

- 6 ml de MeOH
- 3 ml d'H<sub>2</sub>O distillée
- 3 ml MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1)

Veiller à ne pas assécher la phase stationnaire entre deux rinçages

**Appliquer 5 ml d'extrait filtré (sur 0,2 µm)  
sur la cartouche**

Laisser couler doucement (1 goutte/seconde)

→ Jeter l'éluat

Laver la cartouche avec 5 ml de solution de lavage  
CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (1:9)

→ Jeter l'éluat

Ajouter 0,5 ml de tampon citrate sur la phase

→ Jeter l'éluat

Placer un tube gradué, d'un volume de 5 ml,  
sous la cartouche

Eluer l'acide domoïque avec 2 ml du tampon citrate  
(débit : 1 goutte/seconde)

Récupérer 2 ml d'éluat  
(bien l'homogénéiser avant de prendre un aliquot)

**Analyse CLHP / U.V.**

**Protocole de l'étape de purification sur cartouche SAX**