

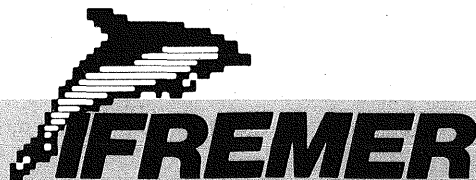
PROGRAMME NATIONAL PHYCOTOXINES

DETECTION DE L'ACIDE OKADAÏQUE DANS LES MOULES TOXIQUES : COMPARAISONS DE BIOESSAIS

Claire MARCAILLOU-LE BAUT, Pierre MASSELIN, Madeleine BOHEC & Philippe TRUQUET

Zouher AMZIL, Yves-François POUCHUS, Jean LE BOTERFF & Jean-François VERBIST

*Jean-Paul VERNOUX, Chantal MARAIS, Jean-François SIMON, Gabrielle NIZARD,
Géraldine MERCIER, Roxelan CHOUMILOFF & Bruno BARON*



PROGRAMME NATIONAL PHYCOTOXINES

Opération 2.2.2

**DETECTION DE L'ACIDE OKADAIQUE DANS LES MOULES TOXIQUES :
COMPARAISONS DE BIOESSAIS**

Cette étude a bénéficié d'une aide financière du SRETIE

(Contrat n° 90260)

**DETECTION DE L'ACIDE OKADAIQUE DANS LES MOULES TOXIQUES :
COMPARAISON DE BIOESSAIS**

Claire MARCAILLOU-LE BAUT, Pierre MASSELIN, Madeleine BOHEC & Philippe TRUQUET

Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer
B.P. 1049
44037 NANTES CEDEX

Zouher AMZIL, Yves-François POUCHUS, Jean LE BOTERFF & Jean-François VERBIST

Groupe : Substances Marines à Activité Biologique
Université de Nantes, Faculté de Pharmacie
B.P. 1024
44035 NANTES CEDEX 01

Jean-Paul VERNOUX, Chantal MARAIS, Jean-François SIMON, Gabrielle NIZARD,
Géraldine MERCIER, Roxelan CHOUMILOFF & Bruno BARON

Groupe de Toxicologie du Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Moléculaire
Université de Caen
Esplanade de la Paix
14032 CAEN CEDEX

I – SITUATION DE L'ETUDE

En juin 1983 plusieurs milliers de cas d'intoxications diarrhéiques consécutives à l'absorption de moules furent observés en Bretagne Sud. La symptomatologie et les analyses microbiologiques infirmèrent l'hypothèse d'une contamination bactérienne alors que des examens des contenus stomacaux des coquillages montrèrent que leur toxicité était vraisemblablement due à un genre phytoplanctonique nommé *Dinophysis* qui se développe plus ou moins dans les eaux littorales en fonction des conditions environnementales.

A la fois par la nature des symptômes et le genre de l'algue en cause nous avons affaire à une intoxication de nature différente de celle connue sous le nom d'empoisonnement paralytique qui a été largement décrite surtout par les canadiens (Prakash *et al.*, 1971 ; Quayle 1969). Par contre, il y avait une analogie évidente entre nos observations et celles décrites par une équipe japonaise, en 1978 (Yasumoto *et al.*,) qui mentionnait déjà une relation entre la présence de toxines liposolubles dans les moules et celle de *Dinophysis* dans l'eau. Dans ces premiers travaux, la toxicité était détectée par un test biologique sur souris dont le principe est le même que le test AOAC, utilisé pour les toxines paralysantes, à savoir : on injecte à des souris de 20 g des solutions d'extraits toxiques pour rechercher la dose minimale qui tue les souris dans un temps donné (24 heures dans le cas des toxines diarrhéiques), appelée unité-souris.

Cependant, ce test n'a pu être calibré et normalisé comme le test AOAC (1965) car la relation dose/temps de survie présente une grande variabilité dans les faibles doses. Quand un réseau de surveillance a été mis en place dès 1984, pour garantir la santé publique, plusieurs laboratoires répartis le long de la côte ont dû assurer les prélèvements et les tests de toxicité en période de crise (Belin et Berthomé, 1988). Ce contrôle systématique impliquait la maîtrise par plusieurs équipes non spécialisées, d'une méthode de détection, simple, rapide et peu coûteuse. Pour illustrer les besoins, 750 tests ont été réalisés en 1987 et 1988 sur tout le littoral français (Belin C., 1991). Ceci nous a donc conduit à modifier la procédure du test souris pour satisfaire à ces contraintes (Marcaillou-Le Baut *et al.*, 1985) et en conséquence les résultats ne sont pas comparables à ceux obtenus par l'équipe japonaise.

Plus tard, quand la purification et la nomenclature des toxines ont pu être obtenues (Murata *et al.*, 1982) l'analyse chimique s'est développée et un dosage de l'acide okadaïque, la toxine diarrhéique principale (Kumagai *et al.*, 1986 ; Marcaillou-Le Baut *et al.*, 1991), a été mis au point par Lee *et al* en 1987. D'autres toxines ont été identifiées mais leur standard purifié n'étant pas disponible sur le marché, leur quantification systématique n'est pas possible. Bien que quelques modifications et/ou améliorations de la méthode aient été proposées (Stabell *et al.*, 1991), l'analyse chimique reste un outil lourd à mettre en oeuvre pour un contrôle de routine. Elle imposerait aussi la centralisation des dosages, ce qui retarderait la

décision éventuelle d'interdiction de vente. Elle est utilisée essentiellement comme outil de recherche et d'expertise.

Actuellement, le contrôle en France repose donc sur un test souris qui présente l'avantage de révéler une toxicité globale et de donner une réponse dans la journée mais il présente une grande variabilité et ne satisfait pas du point de vue l'éthique. D'ailleurs beaucoup de pays européens refusent de le pratiquer et l'utilisation d'animaux vivants est soumise à une réglementation de plus en plus contraignante.

Ceci nous a amené à rechercher des alternatives à ce test et cela a fait l'objet de l'action du programme national présentée ici.

Cette étude est le résultat d'un travail de trois équipes : elle porte sur la comparaison du test souris avec différents bioessais déjà pratiqués en routine dans les laboratoires participants. Ces bioessais sont :

- un test sur micro crustacé dont la méthodologie est normalisée et qui est très utilisé en écotoxicologie aquatique ;
- un test de cytotoxicité à court terme qui a été mis au point pour cette étude.

II - MATERIEL D'ETUDE

Le matériel qui a servi aux bioessais et sur lequel a porté la comparaison est constitué d'extraits d'hépatopancréas de moules récoltées sur le littoral français en période de prolifération de *Dinophysis* (Fig. 1).

Comme ce phénomène est saisonnier, la première étape a été de constituer une réserve d'échantillons en profitant des informations fournies par le réseau de surveillance de l'IFREMER. En 1991, les concentrations en *Dinophysis* ayant été relativement faibles sur toute la période favorable, la récolte de matériel toxique fut modeste, ce qui a justifié en partie la prolongation de ce contrat d'un an.

L'acide okadaïque pur a été acheté chez Diagnostic Chemicals ; il est fourni en ampoule scellée contenant 1 μg , dissous dans le N, diméthylformamide.

Préparation des extraits

Suivant les publications, les procédures d'extraction et la nature des solvants diffèrent quelque peu. Nous avons donc recherché dans une étude préliminaire le protocole d'extraction aboutissant à une concentration et une purification de l'acide okadaïque satisfaisante pour la réalisation des 3 bioessais et de l'analyse chimique.

Le protocole résultant de cette étude est le suivant. Par échantillon, un seul extrait est réalisé puis est divisé en quantités différentes suivant les besoins de chaque essai. Ceci a nécessité un poids de glandes digestives allant jusqu'à 100g quand l'échantillon était très peu toxique.

Après ouverture des moules, les glandes digestives sont disséquées et mises à égoutter. Puis elles sont broyées à l'ultra turax dans une solution méthanolique (à raison de 100 ml pour 50 g), l'opération est répétée 3 fois afin d'épuiser totalement la matière organique de son contenu toxinique. Les phases méthanoliques réunies sont lavées 3 fois à l'hexane pour les débarrasser des composés peu polaires puis, elles sont extraites 3 fois au dichlorométhane après avoir ajouté un volume d'eau dans les proportions : 1 pour 2,5 ml.

Les phases dichlorométhane sont réunies et partagées entre chaque participants pour subir un traitement ultérieur propre à chaque essai.

III – MATERIEL ET METHODES DES DIFFERENTS ESSAIS

1. L'analyse chimique

Rappelons qu'elle consiste à doser l'acide okadaïque (AO), principale toxine du poison diarrhéique rencontrée dans les coquillages en France par chromatographie liquide à haute pression (CLHP), selon un protocole décrit par Lee *et al* en 1987.

Principe : L'AO qui est un acide gras polyéthéré (formule brute $C_{44} H_{68} O_{13}$ de poids moléculaire 804) est estérifié par un réactif fluorescent (l'anthyldiazométhane ou ADAM). Après purification de l'ester, il est chromatographié et détecté par spectrofluorescence.

Mode opératoire : Un volume correspondant à 0.1 g de glande digestive de l'extrait dans le dichlorométhane, est séché sous courant d'azote puis le résidu sec est dissout dans 100 μ l d'une solution méthanolique à 0.1 % d'ADAM. L'extrait estérifié est purifié sur cartouche Sep pak au gel de silice. L'élution s'effectue successivement par 5ml de mélanges des solvants suivants :

- hexane/chloroforme 50/50 ;
- chloroforme pur ;
- chloroforme/ méthanol 95/5.

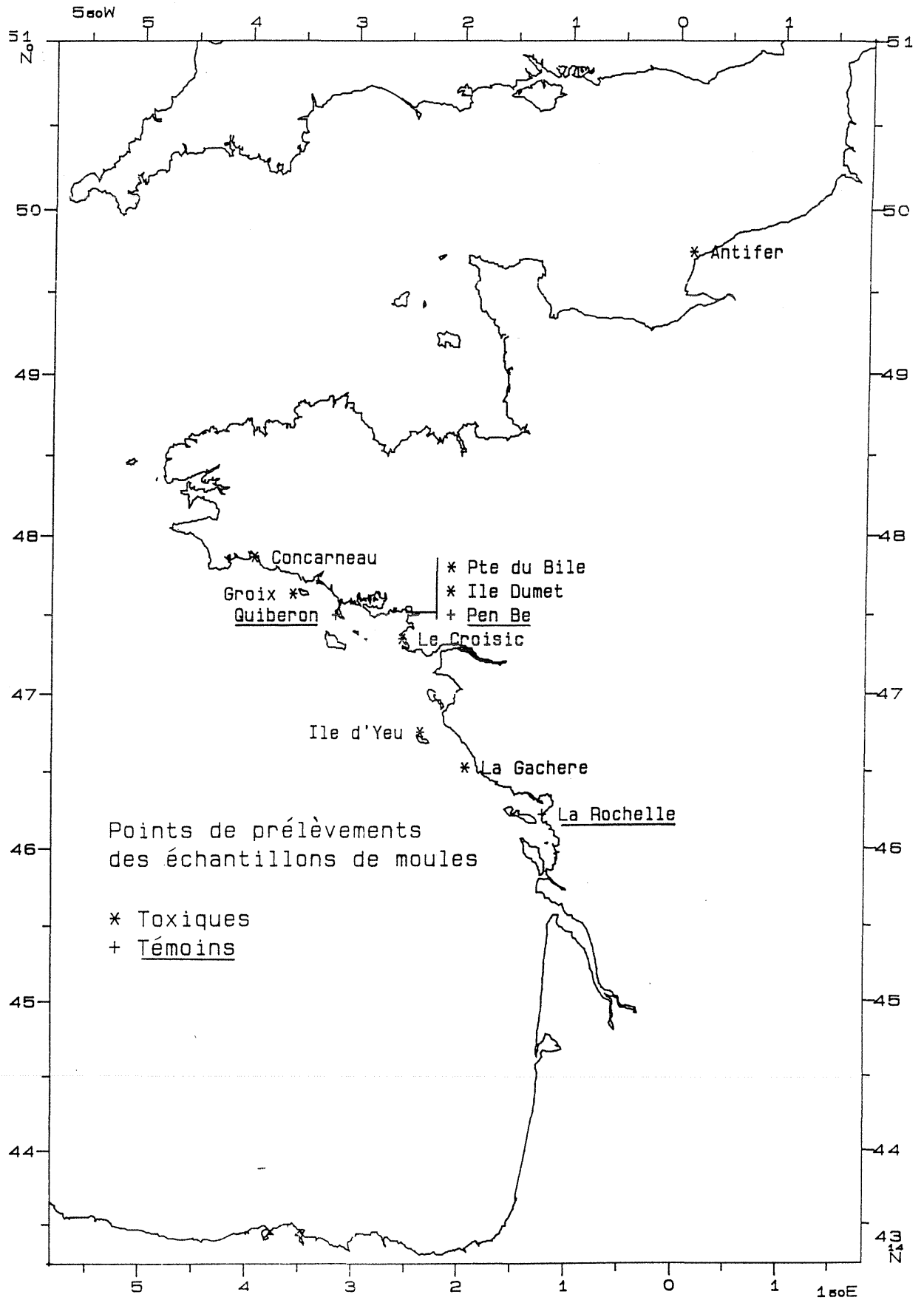


Figure 1 : Points de prélèvements des échantillons ayant servi à la comparaison.

La troisième fraction, contenant l'ester de la toxine, est recueillie ; après évaporation du solvant le résidu est repris par 100 μl de méthanol dont 10 μl sont injectés dans la colonne. Les conditions chromatographiques sont listées ci-dessous :

- Colonne Phase inverse (Lichrospher 4 μm ; 250.4 mm) ;
- Eluant $\text{CH}_3\text{CN} / \text{H}_2\text{O}$ (80/20) ;
- Débit-Pression 1.1 ml / mn, 170 bars ;
- Température 35° C ;
- Fluorescence exc : 365 nm ; em : 412 nm ; filtre : 10 nm ;

Le dosage s'effectue par étalonnage externe ; le seuil de détection est de 1 ng d'AO injecté et l'erreur relative de la mesure sur échantillon est de 14 %.

2. Le test souris

Il permet d'exprimer la toxicité de l'échantillon en nombre d'unités-souris contenu dans un gramme de glandes digestives. L'unité-souris (US) conventionnelle est la quantité de glandes digestives (sous forme d'extrait) qui tue deux souris sur trois en 24 heures. Pour l'AO la dose létale 24 heures est de 4 μg . La détermination de l'US pour chaque extrait est établie à partir d'au moins trois doses. A cet effet, on prélève, séparément, des volumes croissants de la solution de dichlorométhane, on évapore le solvant et le résidu est repris dans un volume de solution de tween 60 à 1 %, calculé de façon à pouvoir injecter un millilitre de la dose désirée à trois souris.

Pour chaque dose (X) on calcule la moyenne des inverses du temps de survie (Y). Il faut une corrélation d'au moins 0.9 entre X et Y pour déterminer correctement l'US, avec un risque d'erreur de 5%. L'inverse de l'unité-souris donne le nombre d'US par gramme de glande digestive.

Les souris utilisées sont des souris Zwiss mâles de 20 g, fournies par un centre d'élevage et maintenues au repos pendant 24 heures avant le test.

La quantité maximum injectée sans obtenir de mortalité fut l'équivalent de 8 g d'hépatopancréas, nous en avons déduit un seuil de détection de 0,1 US.g^{-1} pour les échantillons analysés ici.

3. L'essai sur daphnie

La daphnie (*Daphnia magna*) est un petit crustacé cladocère d'eau douce qui se reproduit par parthénogénèse dans des conditions d'élevage définies. La procédure pour déterminer la concentration efficace qui inhibe la mobilité de 50 % des individus en 24 heures ou C.E.I (50-24) est normalisée et précisément décrite dans la directive AFNOR : NF T.90-301 (Annexe). Cependant l'élevage est propre à chaque laboratoire.

Souche et élevage

La souche de *Daphnia magna* a été obtenue du laboratoire municipal d'hygiène du Havre (clone 5 de la souche de l'IRCHA*).

Un milieu d'élevage peu contraignant a été mis au point : la souche de daphnie accompagnée d'algues vertes filamenteuses et de petits ostracodes est mise dans un volume d'eau égal au quart du volume du récipient qui va les contenir. L'eau utilisée a des caractéristiques bien définies :

- dureté globale: 25 à 30 degrés (test Tétra GH/TH et KH),
- pH=8,
- température: 21°+2°C,
- éclairage continu,
- pas de bullage, récipient ouvert en atmosphère propre.

L'eau du robinet doit être déchlorée obligatoirement par décantation naturelle pendant trois jours au moins. L'eau permutée peut être utilisée comme diluant afin d'avoir une dureté convenable. L'évaporation naturelle est compensée par une eau de dureté et de ph plus faibles que ceux de l'eau d'élevage. La solution nutritive est composée de 0.75 g d'extrait de viande bactériologique (Prolabo, ref : 24379294) additionnée de 0.75 g de D (+) glucose anhydre (Prolabo, réf: 33861268) dissous dans 50 ml d'eau. Après partition en petits volumes cette solution est conservée congelée et est utilisée à la demande, à raison de 8 ml pour 15 litres d'eau d'élevage. La présence d'ostracodes est indispensable car ils éliminent les déchets organiques. Quant aux algues, elles assurent une partie de la nourriture et fournissent l'oxygène puisque la photosynthèse l'emporte sur la respiration dans nos conditions d'élevage. La présence d'un film bactérien en surface est très favorable à la reproduction des daphnies.

* IRCHA : Institut National de Recherche Chimique Appliquée.

Protocole pour la détermination de la C.E.I (50-24).

La norme correspondante est donnée en annexe. L'AO n'étant pas soluble dans l'eau, les solvants suivants : méthanol, diméthylsulfoxyde, acétone, diméthylformamide, peuvent être utilisés jusqu'à 50 μ l pour 10 ml de milieu d'essai sans dommage pour les daphnies.

Quelques modifications ont été apportées par rapport à la norme :

- récupération des daphnies par tamisage différentiel avec un jeu de deux passoires (560 et 800 μ m) et lavages avec une quantité suffisante de la solution d'essai pour bien éliminer toute trace de milieu d'élevage ;
- remplissage des tubes à essais avec 8 à 9 ml de milieu réactionnel auxquels est ajouté, à la micropipette, le volume souhaité de solution à tester ;
- addition de 5 daphnies au compte-gouttes ;
- complémentation à 10 ml avec le milieu réactionnel, et agitation manuelle par rotation.

L'essai comprend une gamme de 6 concentrations avec 4 répliquats par concentration et 4 témoins; les C.E.I. (50-24) sont calculées par la méthode de Litchfield et Wilcoxon (1949) ou par mesure graphique.

La C.E.I. (50-24) pour l'AO est 0.15 μ g \pm 0.02 pour 10 ml de milieu réactionnel.

4. Le test de cytotoxicité à court terme ou DRAME

Cet essai utilise les propriétés cytotoxiques de l'AO et des molécules substituées, comme la dinophysistoxine 1 (DTX1). Habituellement, la détermination de la concentration qui inhibe de 50 % la croissance des cellules ou C.I.50 nécessite au moins 72 heures. Ici, le test mis au point récemment par Amzil *et al* (1992) est basé sur l'observation de la modification rapide (3 à 4 heures) des cellules exposées à l'AO et permet de déterminer la concentration minimale active ou C.M.A. en μ g par millilitre d'où son nom : détection rapide de l'A.O. dans les moules après extraction ou DRAME.

Culture cellulaire

La lignée cellulaire KB provient d'un carcinome humain de nasopharynx (Eagle, 1955). La culture est maintenue à 37°C dans une atmosphère composée de 95 % d'air et 5 % de dioxyde de carbone, dans le milieu de Eagle auquel on ajoute 10 % (V/V) de sérum de veau foetal contenant 10 UI de pénicilline et 100 µg de streptomycine par millilitre. 50 µl d'une suspension cellulaire à 200000 cellules par millilitre sont distribués dans chaque puits d'une micro plaque puis, 50 µl de solution à tester sont ajoutés.

Détermination de la C.M.A

Une gamme de concentrations en progression géométrique est préparée à partir d'une solution mère, par dilution successive au demi et en tenant compte que le volume réactionnel final est de 100 µl. Trois ou quatre heures après l'introduction des solutions test, on procède à l'examen microscopique des microplaques qui permet de déterminer la concentration minimale pour laquelle on observe plus de 30 % de cellules modifiées.

Le seuil de détection de la méthode est de 1.25 µg d'AO par millilitre ou de 0.125 µg dans la totalité du volume réactionnel.

IV – RESULTATS

Ils sont présentés dans le tableau 1 où ils figurent dans l'expression habituelle du test et sous forme transformée pour aboutir à de meilleures corrélations.

1. Comparaison avec l'analyse chimique

Comme il était intéressant de comparer les résultats obtenus à partir de chaque test à ceux obtenus par CLHP, nous avons calculé les coefficients de corrélation correspondants (Tableau 2) à partir des résultats bruts.

	Test souris Nbre d'US.g ⁻¹	Test Daphnie CEI (50 - 24 h) mg.Hp/ml	Test DRAME Ln (CMA) mg Hp/ml
CLHP C en µg AO.g ⁻¹	n = 17 r = 0,91	n = 16 r = - 0,5	
CLHP log C en µg.g ⁻¹			n = 17 r = - 0,92

Tableau 1 : Coefficients de corrélation obtenus entre les résultats de l'analyse chimique et ceux de chaque bioessai (n = nombre de couples de valeurs).

N° d'échantillon	CLHP $\mu\text{g AO.g}^{-1}\text{ Hp}$	Test souris			Test daphnies		Test DRAME	
		Nbre d'US par g. Hp	US en g. Hp	Quantité AO en $\mu\text{g.g}^{-1}$	C.E.I (50 - 24 h) mg Hp.ml ⁻¹	Quantité AO $\mu\text{g.g}^{-1}$	C.M.A. mg Hp.ml ⁻¹	Quantité AO = C C = exp (4-Ln CMA)
9201	< 0,2 *	< 0,1 *	8	0,4	> 57 *	0,02	> 256,0 *	0,2
9202	< 0,2 *	< 0,1 *	8	0,4	> 57 *	0,02	> 256,0 *	0,2
9203	< 0,2 *	< 0,1 *	8	0,4	> 57 *	0,02	> 256,0 *	0,2
8816	0,2	0,1	8	0,4	12,2	1,23	59,8	0,9
9107	1,2	0,2	6	0,8	---	---	12,8	4,3
8829	2,0	0,4	2,20	1,6	6,1	2,46	56,1	1,0
9106	2,4	0,4	2,40	1,6	4,6	3,26	34,8	1,6
9205	2,5	0,8	1,20	3,2	4,6	3,26	21,9	2,5
9104	2,7	0,3	3,20	1,2	5,0	2,96	18,2	3,0
9029	3,4	0,3	3,40	1,2	6,6	2,25	14,3	3,8
9052	3,4	0,8	1,20	3,2	3,7	4,04	14,8	3,7
9207	3,6	1,4	0,70	5,6	1,2	1,20	9,7	5,6
9036	3,9	1,4	0,70	5,6	2,2	6,73	16,2	3,4
9206	4,7	1,3	0,77	5,2	2,0	7,54	14,7	3,7
9204	6,5	2,1	0,48	8,4	2,3	6,39	7,3	7,5
9003	7,4	1,3	0,75	5,2	3,5	4,28	5,1	10,7
9006	9,5	2,8	0,35	11,2	1,3	11,76	4,5	12,1

Tableau 1 : Résultats des analyses chimiques (CLHP) et des tests biologiques (souris, daphnies, DRAME)

Hp : hépatopancréas, AO = acide okadaïque.

* : Pour les échantillons non toxiques on a pris les valeurs inférieures au seuil de détection pour la CLHP et la dose maximum testée pour les bioessais.

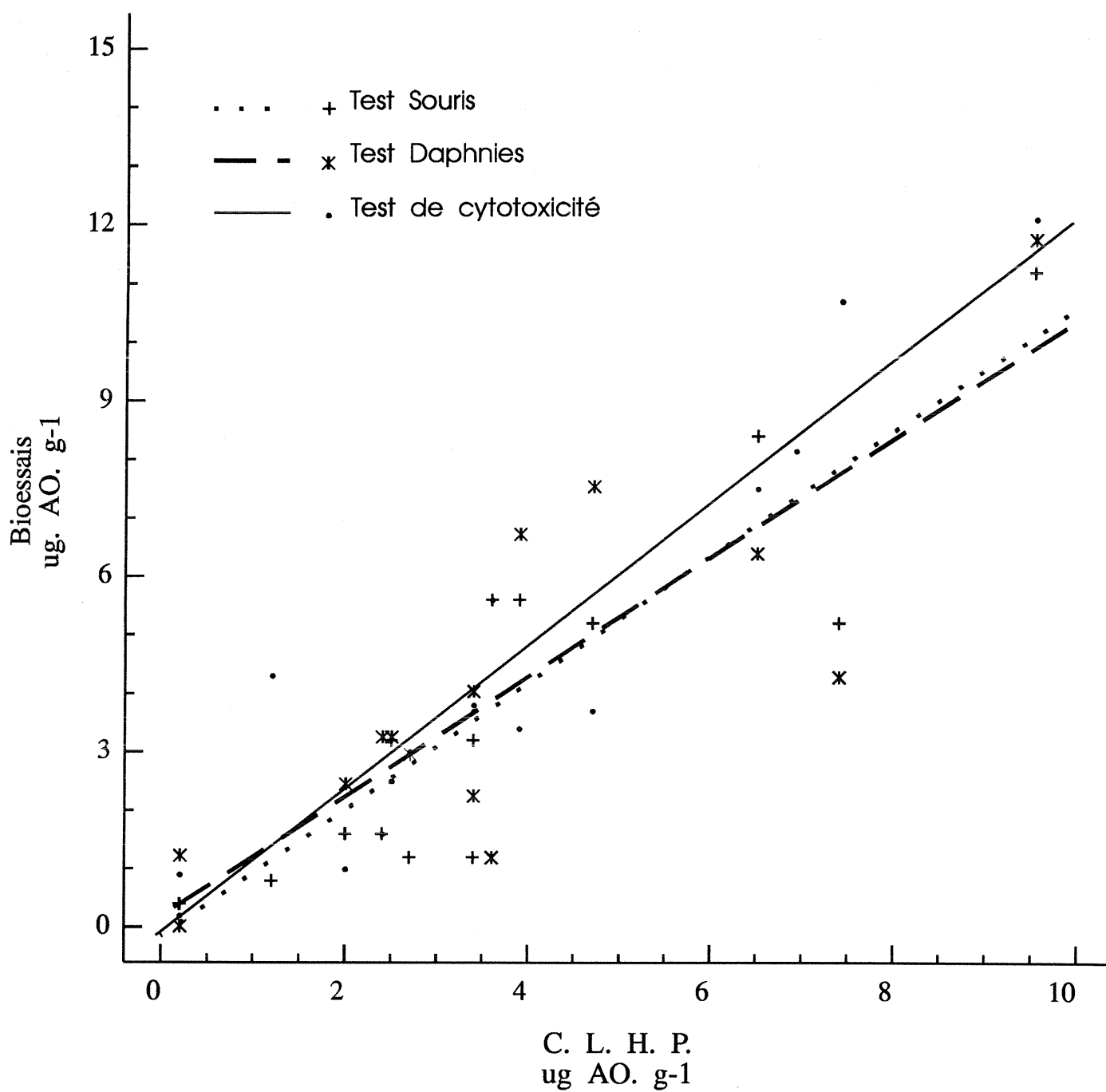


Figure 2 : Régressions linéaires représentant les relations entre l'analyse chimique et chacun des bioessais. Résultats exprimés en concentrations d'acide okadaïque (A.O.).

Il est cependant, plus logique de comparer des concentrations entre elles, ainsi, pour le test daphnie on peut obtenir une meilleure corrélation en transformant les CEI (50 – 24 h) en concentrations de toxine sachant que le CEI (50 – 24 h) de l'A.O. pur est de 0,015 $\mu\text{g/ml}$ ($r = 0,86$; $n = 16$).

De même, la dose minimum exprimée en g d'équivalent d'hépatopancréas pour tuer 2 souris sur 3 ou U.S., peut être convertie en concentration d'A.O. sachant que l'US pour l'A.O. pur est de 4 μg ($r = 0,91$, $n = 17$).

Pour le test de cytotoxicité, la relation linéaire établie dans une étude précédente (Amzil *et al.*, 1992) et qui a pour équation : $\text{Log } C = 4 - \text{Log } (\text{CMA})$ permet de calculer la concentration en A.O. contenue dans les échantillons ($r = 0,93$, $n = 17$).

Il est alors, possible de représenter sur le même graphique la relation entre les résultats obtenus par le dosage chimique et ceux obtenus avec chacun des bioessais, exprimés en $\mu\text{g AO.g}^{-1}$ (Figure 2).

2. Comparaison avec le test souris

L'étude de la relation a été réalisée sur les doses c'est-à-dire la quantité minimale d'hépatopancréas capable, suivant le test, de tuer les souris en 24 heures, d'immobiliser 50 % de daphnies ou d'agir sur au moins 30 % des cellules KB (Tableau 3).

	Test souris Ln US en g Hp
Test daphnies : Ln CIE (50 – 24 h) en mg HP	$r = 0,91$ $n = 16$
Test DRAME : Ln CMA en mg Hp	$r = 0,81$ $n = 16$

Tableau 3 : Coefficients de corrélation calculés entre les résultats du test souris et ceux des deux autres bioessais.

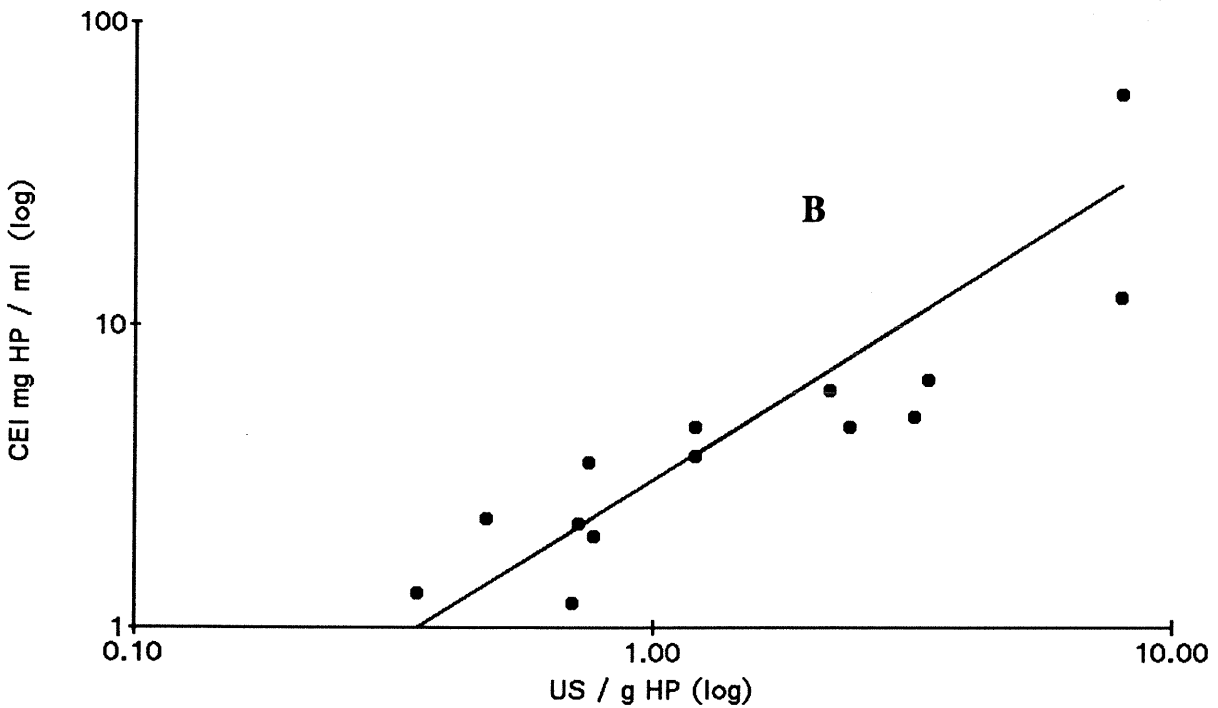
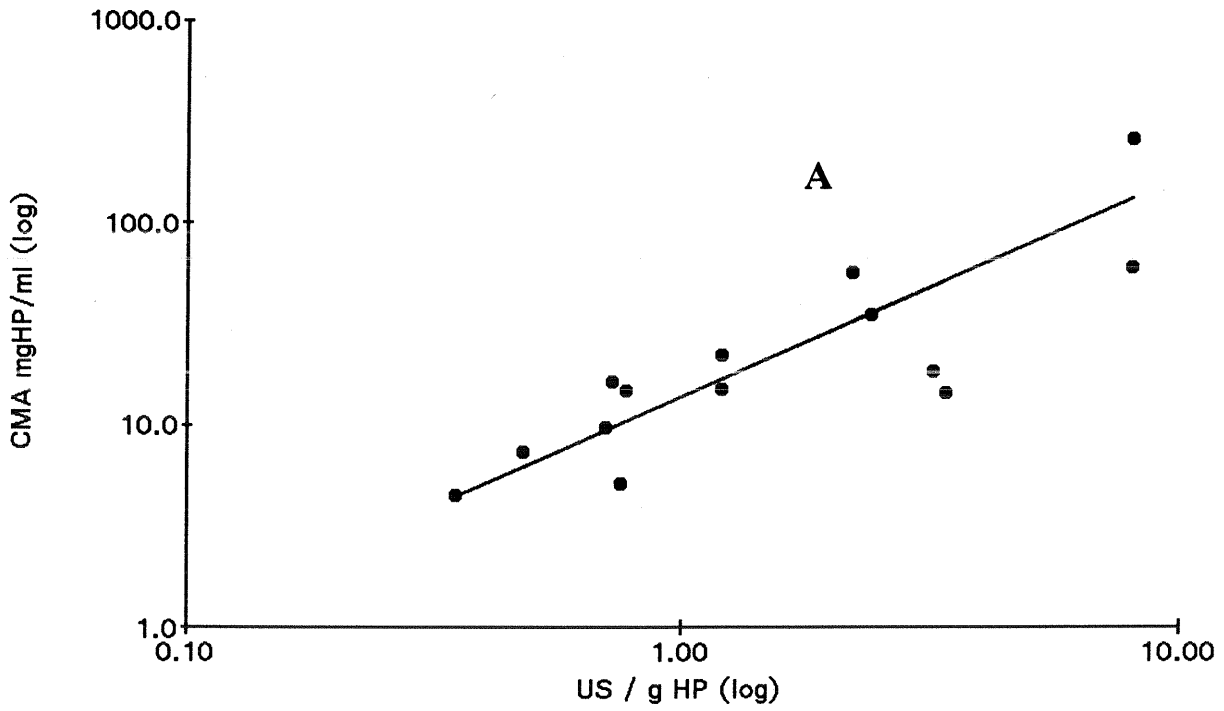


Figure 3 : Régressions linéaires représentant les relations entre test souris/test DRAME (A) et test souris/test daphnie (B).

V - DISCUSSION

Les résultats des 3 tests biologiques, une fois convertis en concentrations de toxine, présentent une très bonne corrélation avec ceux de l'analyse chimique (probabilité d'erreur inférieure à 1 %^{**}). La figure 2 suggère que les pentes des 3 droites ne diffèrent pas significativement étant donné la dispersion des points. Les échantillons témoins qui ne présentaient pas de toxine à l'analyse chimique n'ont pas montré de toxicité aux limites supérieures des doses utilisées dans les bioessais. Il ne semble pas y avoir d'interférence marquée avec la présence d'autres substances.

La comparaison avec le test souris montre aussi une relation satisfaisante avec les deux autres essais (Figure 3).

En conclusion, les deux tests proposés pour détecter les toxines diarrhéiques, à savoir la détermination de la CI (50 - 24 h) sur daphnies et la détermination de la CMA sur cellules KB pourraient être une alternative aux tests souris ; de plus ils sont suffisamment différents pour pouvoir satisfaire de nombreux laboratoires. Dans les deux cas, la procédure a été longuement éprouvée car ces deux essais sont pratiqués en routine par différentes équipes pour d'autres objectifs. Ils donnent une réponse fiable en 24 heures et ne nécessitent pas un matériel coûteux pour leur mise en oeuvre.

Leur contrainte réside dans l'entretien d'un élevage de daphnies dans un cas, d'une culture cellulaire dans l'autre, tout au long de l'année et dans des conditions de disponibilité immédiate en cas de besoin. Ce maintien nécessite probablement l'acquisition d'un certain savoir faire pour les laboratoires qui ont en charge le contrôle des coquillages, ainsi que l'utilisation d'une substance de référence afin de contrôler l'état de l'élevage ou de la culture et l'homogénéité des résultats d'une batterie de tests à l'autre.

BIBLIOGRAPHIE

- AMZIL Z., POUCHUS Y.F., LE BOTERFF J., ROUSSAKIS C., VERBIST J.F., MARCAILLOU-LE BAUT C. & MASSELIN P. (1992). Short-time cytotoxicity of mussel extracts : a new bioassay for okadaïc acid detection. *Toxicon*. 30, 11 : 1419-1425.
- ANON (1965). Official methods of analysis of the AOAC. In : *Natural poisons* p. 26 (HORWITZ H. Ed) Washington, D.C.
- BELIN C. & BERTHOME J.P. (1991). REPHY : Le réseau français de suivi du phytoplancton. In : Proceedings of symposium on marine biotoxins (FREMY J.M. Ed) C.N.E.V.A. Paris, 30-31 Janvier.
- BELIN C. (1991). Synthesis of harmful effects caused by humanly toxic phytoplankton species in France. In Rep C.I.E.M. C.M. 1991. Poll : 3 Ref E + L.
- EAGLE H. (1955). Propagation in a fluid medium of a human epidermoid carcinoma strain K.B. *Proc. Biol. Med.* 89 : 362-364.
- KUMAGAI M., YANAGI T., MURATA M., YASUMOTO T., KAT M., LASSUS P. & RODRIGUEZ-VAZQUEZ J.A. (1986). Okadaïc acid as the causative toxin of diarrhetic shellfish poisoning in Europe. *Agric. Biol. Chem.* 50 (11) =, 2853-2857.
- LEE J.S., YANAGI T., KENNA R. & YASUMOTO T. (1987). Fluorimetric determination of diarrhetic shellfish toxins by high-performance-liquid-chromatography. *Agric. Biol. Chem.*, 51, 3, pp. 877-881.
- LITCHFIELD J.T. & WILCOXON F. (1949). A simplified method of evaluating dose/effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 96 : 99-113.
- MARCAILLOU-LE BAUT C., LUCAS D. & LE DEAN L. (1985). *Dinophysis acuminata* toxin. Status of toxicity bioassays in France. In : Toxic dinoflagellates, Anderson D.M., White A.W. and Baden D.G. Edit. Elsevier, New-York. 485-488.
- MARCAILLOU-LE BAUT C., MASSELIN P. & BOHEC M. (1991). Comparaison des méthodes chimiques et biologiques pour la détermination des toxines diarrhéiques dans les moules. In : Proceedings of symposium on marine biotoxine (FREMY J.M. Ed) C.N.E.V.A. Paris, 30-31 janvier.

- MURATA M., SHIMATANI M., SUGITANI H., OSHIMA Y. & YASUMOTO T. (1982). Isolation and structural elucidation of the causative toxin of the diarrhetic shellfish poisoning. *Bull. Jap. Soc. Fish.* 48 (4) : 549-552.
- PRAKASH A., MEDCOF J.C. & TENNANT A.D. (1971). Paralytic shellfish poisoning in eastern Canada. *Fish. Res. Bd. Can. Bull.* n° 177. Ottawa.
- QUAYLE D.B. (1969). Paralytic shellfish poisoning in British Columbia. *Fish. Res. Bd. Can. Bull.* n° 168, Ottawa.
- STABELL O.B., HORMAZABAL V., STEFFENAK I. & PEDERSEN K. (1991). Diarrhetic shellfish toxins : improvement of sample clean-up for HPLC determination. *Toxicon*, 29, 1 : 21-29.
- YASUMOTO T., OSHIMA Y. & YAMAGUCHI M. (1978). Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the Tohoku district. *Bull. Jap. Soc. Scient. Fisheries* pp. 1249-1255.

ANNEXE

édité par l'association française de normalisation (afnor) - tour europe cédex 7 92080 paris la défense - tél. (1) 778-13-26

NORME FRANCAISE HOMOLOGUEE	ESSAIS DES EAUX DETERMINATION DE L'INHIBITION DE LA MOBILITE DE <i>DAPHNIA MAGNA</i>	NF T 90-301 Janvier 1983
<p>AVANT-PROPOS</p> <p><i>La présente norme, qui remplace la norme expérimentale de même indice d'avril 1974, est en concordance technique avec la norme ISO 6341 - Détermination de l'inhibition de la mobilité de Daphnia magna.</i></p> <p><i>C'est pourquoi certaines modifications ont été apportées à la norme expérimentale d'avril 1974, en particulier en ce qui concerne l'interprétation et l'expression des résultats.</i></p> <p><i>Cependant dans le cadre de l'application de cette norme aux eaux résiduaires et aux effluents, il a été estimé nécessaire d'une part de préciser, plus que ne le fait la norme ISO 6341, les modalités de traitement des échantillons d'eaux ou d'effluents soumis à l'essai, d'autre part de maintenir le pouvoir tampon du milieu de dilution tout en modifiant légèrement sa composition de façon à ce qu'elle réponde aux spécifications de la norme ISO 6341.</i></p> <p>1 OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION</p> <p>La présente norme a pour objet la description d'une méthode permettant la détermination de l'inhibition à court terme de la mobilité de <i>Daphnia magna</i> par :</p> <ul style="list-style-type: none">a) Des substances chimiques solubles dans les conditions de l'essai,b) Des effluents urbains ou industriels,c) Des eaux de surface et des eaux souterraines. <p>2 PRINCIPE</p> <p>Détermination, dans les conditions définies par la présente norme de la concentration initiale (c'est-à-dire la concentration présente au début de l'essai) qui, en 24 heures, immobilise 50 % des daphnies mises en expérimentation.</p> <p>Cette concentration, dite concentration efficace initiale inhibitrice est désignée par CE (I) 50 - 24 h.</p> <p>Note : Dans le cas de l'application de la norme aux substances, il est possible de déterminer également la concentration initiale qui en 48 heures immobilise 50 % des daphnies mises en expérimentation. Cette concentration est désignée par CE (I) 50 - 48 h.</p> <p>Lorsqu'il est impossible de déterminer la CE (I) 50 - 24 h, l'indication de la plus forte concentration utilisée qui n'immobilise aucune daphnie est souhaitable et constitue une information utile. L'indication de la plus faible concentration utilisée qui immobilise toutes les daphnies est également souhaitable lorsqu'elle existe.</p>		
Homologuée par arrêté du 1982-12-21 effet le 1983-01-21	La présente norme homologuée remplace la norme expérimentale de même indice publiée en avril 1974.	* afnor 1983 Droits de reproduction et de traduction réservés pour tous pays

Soregson, impr., 92300 Levallois

T 90-301 1^{er} TIRAGE 82-12

Testing water - Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna*.
Wasserprüfungen - Bestimmung der Beweglichkeitshemmung von *Daphnia magna*.

L'essai est conduit en deux étapes :

- Un essai préliminaire qui donne une indication approximative de la CE (I) 50 - 24 h et sert à déterminer la gamme des concentrations pour l'essai définitif.
- Un essai définitif dont seuls les résultats sont retenus pour déterminer la CE (II) 50 - 24 h, ou les concentrations correspondant à 0 et éventuellement à 100 % d'immobilisation.

3 ENVIRONNEMENT DE L'ESSAI

La préparation, la conservation du milieu d'essai et l'ensemble des manipulations décrites ci-après doivent être effectuées dans une enceinte climatisée à $20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ exempte de poussières ou de vapeurs toxiques vis-à-vis de *Daphnia magna*.

4 REACTIFS ET PRODUITS

4.1 Organismes pour essai

Daphnia magna, Straus, 1820 (Cladocera Crustacea) (1) de troisième génération au moins, obtenue par parthénogénèse dans des conditions d'élevage définies.

Utiliser des animaux, de taille telle qu'ils passent au travers d'un tamis d'ouverture de maille 800 μm , mais qu'ils soient retenus sur un tamis d'ouverture de maille 560 μm , (voir annexe A).

4.2 Milieu d'essai

Préparer le milieu d'essai à partir de quantités définies de réactifs de pureté analytique reconnue. Dissoudre ces réactifs dans de l'eau distillée dans un appareil en verre ou de l'eau déionisée de pureté au moins équivalente et de conductivité au plus égale à 10 $\mu\text{S/cm}$.

- Hydrogénocarbonate de sodium anhydre, NaHCO_3	0,200 g
- Chlorure de calcium anhydre, CaCl_2 ou $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,224 g 0,297 g
- Sulfate de potassium anhydre, K_2SO_4	0,026 g
- Chlorure de magnésium anhydre, MgCl_2 ou $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,078 g 0,167 g
- Eau q.s.p	1000 ml

Le milieu d'essai préparé a un pH de $8,0 \pm 0,2$, une dureté totale de 250 $\text{mg/l} \pm 25\text{ mg/l}$ (exprimée en CaCO_3), un rapport $\frac{\text{Ca}}{\text{Mg}}$ voisin de $\frac{4}{1}$.

Si nécessaire, le milieu d'essai doit être aéré jusqu'à ce que la concentration en oxygène dissous ait atteint la saturation et jusqu'à stabilisation du pH. Au besoin, ajuster le pH à $8,0 \pm 0,2$ par ajout d'hydroxyde de sodium (NaOH) ou d'acide chlorhydrique (HCl). Le milieu d'essai ainsi préparé ne doit plus être aéré avant emploi. La solution peut être conservée une dizaine de jours à 20 °C .

4.3 Dichromate de potassium ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) de pureté analytique reconnue.

(1) Des informations relatives à l'obtention des organismes pour essai peuvent être obtenues auprès de l'Afnor.

5 APPAREILLAGE

Matériel courant de laboratoire et notamment :

5.1 Appareil de mesurage de l'oxygène dissous

5.2 Récipients pour essai

Les récipients pour essai doivent être constitués de matériau chimiquement inerte et de capacité suffisante (par exemple, tubes à essai 18 × 180 mm ou 20 × 200 mm jaugés à 8 et 10 ml).

Avant emploi, les récipients pour essai doivent être soigneusement lavés puis rincés successivement avec de l'eau et le milieu d'essai (4.2).

6 TRAITEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

6.1 PRECAUTIONS PARTICULIERES CONCERNANT LE PRELEVEMENT, LE TRAITEMENT ET LE TRANSPORT DES ECHANTILLONS D'EAUX OU D'EFFLUENTS

6.1.1 Prélèvement

Tenir compte, pour effectuer les prélèvements, des indications contenues dans le fascicule de documentation T 90-100 «Essais des eaux-Echantillonnage. Précautions à prendre pour effectuer, conserver et traiter les prélèvements».

Utiliser de préférence des récipients en verre de 2 l pour prélever, transporter et conserver les échantillons. A défaut utiliser des flacons neufs en polyéthylène.

S'il s'agit de rejets, s'efforcer de réaliser un échantillon moyen pondéré sur 24 h. Dans ce cas, il est souvent souhaitable de maintenir, pendant la durée du prélèvement, le liquide à une température voisine de + 4 °C.

6.1.2 Décantation

Aussitôt après la fin du prélèvement, et obligatoirement avant la congélation si l'échantillon doit être congelé préalablement à son transport (voir 6.1.3), agiter l'échantillon à la main, le laisser décanter pendant deux heures dans une éprouvette (ou équivalent) et prélever par siphonnage 50 % du volume initial, en maintenant l'extrémité du tube de siphonnage au centre d'une section de l'éprouvette et à mi-distance entre la surface de la boue déposée et la surface du liquide. Le diamètre intérieur du tube de siphonnage doit être de 5 mm.

Si ces opérations ne peuvent être effectuées aussitôt après le prélèvement, elles devront l'être au laboratoire; dans ce cas également, elles devront précéder une éventuelle congélation.

6.1.3 Transport

Si l'intervalle de temps séparant la fin du prélèvement de son traitement au laboratoire d'analyse est :

- inférieur à 36 h : conserver l'échantillon à l'état liquide, à une température comprise entre 0 °C et 5 °C.
- supérieur à 36 h : congeler aussi rapidement que possible l'échantillon et le conserver à une température inférieure à - 15 °C

Avant l'essai préliminaire, décongeler le cas échéant les échantillons en les plaçant dans un bain d'eau tiède (40 °C environ). Veiller à ce que la température au sein des échantillons ne dépasse pas 25 °C en fin de décongélation.

Entre l'essai préliminaire et l'essai définitif, conserver (24 h) l'échantillon à une température comprise entre 0 °C et + 5 °C.

Homogénéiser l'échantillon immédiatement avant l'essai préliminaire et immédiatement avant l'essai définitif. Mesurer son pH, le noter; ne pas le modifier.

6.2 PREPARATION DES SOLUTIONS MÈRES DE SUBSTANCES A EXPERIMENTER

Les solutions mères des substances à expérimenter doivent être préparées par dissolution d'une quantité connue de la substance à expérimenter dans un volume défini du milieu d'essai (4.2), (éventuellement dans de l'eau déionisée ou de l'eau distillée en cas de difficultés à dissoudre dans le milieu d'essai). Elles doivent être préparées au moment de l'emploi à moins que la stabilité de la substance en solution ne soit connue, auquel cas la solution mère peut être préparée en quantité suffisante pour deux jours et conservée à 4 °C.

7 MODE OPERATOIRE

7.1 CONTROLE DE LA SENSIBILITE DU REACTIF ET DE LA CONFORMITE D'APPLICATION DU PROTOCOLE EXPERIMENTAL

De façon à contrôler le réactif biologique, déterminer parallèlement à l'essai définitif (7.4) la CE (I) 50^e - 24 h du dichromate de potassium (4.3). Indiquer la valeur obtenue au procès-verbal d'essai.

7.2 PREPARATION DES SOLUTIONS D'ESSAI

7.2.1 Cas des échantillons d'eaux ou d'effluents

A partir des échantillons d'eaux ou d'effluents (6.1), préparer des dilutions décimales en volume suffisant avec le milieu d'essai (4.2)

7.2.2 Cas des substances

A partir de la solution mère des substances à expérimenter (6.2), préparer des dilutions décimales au moyen du milieu d'essai (4.2) de façon à obtenir une gamme adéquate de concentrations (par exemple de 1 µg/l à 1 g/l).

Note : Lorsque les solutions mères sont préparées dans de l'eau déionisée ou distillée, il est recommandé de ne pas ajouter plus de 10 ml de solution mère par litre de milieu d'essai (4.2).

7.3 Essai préliminaire

Disposer d'un tube à essai (ou plus) par concentration d'échantillon d'eau ou d'effluent (1) ou par concentration de substance.

Dans chaque tube à essai, introduire successivement :

- le volume de la solution de substance ou de la dilution appropriée (au 1/10, au 1/100 ou au 1/1000) de l'eau ou de l'effluent à examiner, nécessaire à obtenir la concentration souhaitée. (voir exemple en annexe C)
- Le milieu d'essai jusqu'à obtenir un volume d'environ 8 ml.

(1) Dans le cas des échantillons d'eaux ou d'effluents, les concentrations (C) sont exprimées en pourcentage comme suit :

$$C\% = \frac{v \cdot d}{v + V} \cdot 100$$

où :

v = Volume d'eau à examiner ou volume de la dilution décimale préalablement effectuée en 7.2.1.

d = Taux de dilution (1/10, 1/100, 1/1000)

V = Volume de milieu d'essai (4.2).

Homogénéiser, introduire 5 daphnies et compléter à 10 ml avec le milieu d'essai (4.2).

Placer les tubes dans l'enceinte climatisée à $20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$, à l'obscurité.

Après 24 h, dénombrer dans chaque récipient les daphnies encore mobiles. Les daphnies qui sont incapables de se déplacer dans les 15 secondes qui suivent une légère agitation du récipient sont considérées comme étant immobilisées, même si elles agitent leurs antennes.

Déterminer l'intervalle de concentrations qui fait varier le pourcentage d'immobilisation de 0 % à 100 %.

Noter les deux concentrations encadrant le pourcentage d'immobilisation de 50 %. Mesurer le pH de la solution correspondant à la plus élevée de ces deux concentrations. Noter ce pH.

Note : Dans le cas où une coloration due aux substances examinées ne permettrait pas la détermination directe dans les tubes du nombre de daphnies immobilisées, il est possible de procéder à la détermination après avoir par exemple versé avec le maximum de précautions le contenu des tubes dans une boîte de Petri.

7.4 ESSAI DEFINITIF

Il permet de déterminer les pourcentages de daphnies immobilisées en 24 heures par différentes concentrations de l'eau ou de la substance à examiner et d'en déduire la CE (I) 50-24 h.

Choisir une gamme de concentrations (en général en progression géométrique) de façon d'une part à recouvrir et déborder de part et d'autre l'intervalle des concentrations qui lors de l'essai préliminaire faisaient passer le pourcentage d'immobilisation de 0 % à 100 % et d'autre part à obtenir au moins 3 concentrations pour lesquelles ce pourcentage est compris entre 10 % et 90 %.

Des exemples de gammes de concentrations sont donnés à l'annexe C.

Disposer de 4 tubes à essai par concentration et de 4 tubes témoins.

Poursuivre comme indiqué à l'essai préliminaire (7.3) et après 24 h, dénombrer dans chaque tube les daphnies encore mobiles.

Immédiatement après avoir dénombré les daphnies immobilisées, mesurer le pH et la concentration en oxygène dissous dans les tubes à essai correspondant à la plus faible concentration examinée pour laquelle toutes les daphnies ont été immobilisées.

8 INTERPRETATION ET VALIDITE DES RESULTATS

8.1 DETERMINATION DE LA CE (I) 50 - 24 H

A la fin de l'essai définitif, calculer pour chaque concentration les pourcentages d'immobilisation par rapport au nombre total de daphnies utilisées.

Déterminer la CE (I) 50 - 24 h et son intervalle de confiance à 95 % à l'aide d'une méthode graphique sur diagramme gaussien-logarithmique (1), de la méthode de Litchfield et Wilcoxon (2), de la méthode des Probits (3) ou de toute autre méthode de calcul statistique adéquate.

Si une détermination de la CE (I) 50 - 24 h ne peut être raisonnablement obtenue, en rechercher les causes et recommencer l'essai en diminuant par exemple la raison de la progression géométrique choisie pour la gamme de concentrations.

(1) Echelle logarithmique de base 10 en abscisses, échelle gaussienne de 1 à 99 en ordonnées.

(2) LITCHFIELD, (J.F.) et WILCOXON, (F.), (1949), A simplified method of evaluating dose effect experiments, J. Pharmacol, 1949, 96, 99-113.

(3) FINNEY (D.J). Probit analysis. Cambridge university Press, 1971 (3^e édition).

S'il demeure impossible de déterminer la CE (I) 50-24 h il est suffisant d'indiquer la concentration maximale utilisée correspondant à 0 % d'immobilisation et la concentration minimale utilisée correspondant à 100 % d'immobilisation.

8.2 VALIDITE DES RESULTATS

Considérer les résultats comme valables si les conditions suivantes sont satisfaites :

- a) la teneur en oxygène dissous mesurée en fin d'essai (comme indiqué en 7.4) est ≥ 2 mg/l.
- b) le pourcentage d'immobilisation observé dans les tubes témoins est ≤ 10 %.
- c) la CE (I) 50 - 24 h du dichromate de potassium est comprise entre 0,9 mg/l et 1,5 mg/l.

Si la condition a) n'est pas remplie, la méthode ne peut être appliquée à l'eau ou à la substance examinée.

Si les conditions b) et c) ne sont pas remplies, vérifier la stricte application du mode opératoire, les conditions d'élevage des daphnies et s'il y a lieu, recommencer l'essai avec un nouveau lot de *Daphnia magna*.

9 EXPRESSION DES RESULTATS

La CE (I) 50 - 24 h, ainsi que les limites correspondant à 0 % et à 100 % d'immobilisation doivent être exprimées :

- en pourcentage ou en millilitres par litre dans le cas des eaux ou des effluents
- en milligrammes par litre dans le cas des substances chimiques.

Note : Dans le cas des eaux ou des effluents, il peut être nécessaire pour certains usages d'employer un autre mode d'expression des résultats. Consulter à ce propos l'annexe B.

10 PROCES-VERBAL D'ESSAI

Le procès-verbal d'essai doit faire référence à la présente norme et comporter notamment :

- Toutes les données nécessaires à l'identification de l'échantillon ou de la substance expérimentée,
- Les méthodes de préparation des échantillons :
 - Pour les effluents, le mode et la durée de conservation des échantillons
 - Pour les substances chimiques, la méthode de préparation des solutions mères et des solutions d'essai.
- Toutes informations biologiques, chimiques et physiques relatives à l'essai et non spécifiées dans la présente norme, y compris les conditions d'élevage des daphnies
- Les résultats de l'essai sous forme de CE (I) 50 - 24 h, la méthode selon laquelle elle a été calculée, les limites de confiance à 95 % et la courbe concentration-réponse.
- Le résultat de CE (I) - 50 - 24 h du dichromate de potassium obtenu lors de l'essai de contrôle et les limites de confiance.
- La concentration minimale correspondant à 100 % d'immobilisation et la concentration maximale correspondant à 0 % d'immobilisation en 24 h.
- Tout comportement anormal des daphnies dans les conditions de l'essai.
- Tout détail opératoire non prévu dans la présente norme ou facultatif et les incidents susceptibles d'avoir agi sur les résultats.