

Cinétique de contamination de moules *Mytilus edulis* exposées à une population naturelle de Dinoflagellés *Dinophysis* spp.

CLAIRE MARCAILLOU-LE BAUT⁽¹⁾, DANIEL DELMAS⁽²⁾, ALAIN HERBLAND⁽²⁾, PATRICK GENTEN⁽³⁾, SERGE Y. MAESTRINI⁽²⁾, PATRICK LASSUS⁽¹⁾, PIERRE MASSELIN⁽¹⁾

⁽¹⁾ IFREMER, Centre de Nantes, B.P. 1049, 44037 Nantes Cedex 01, France.

⁽²⁾ CREMA- L'Houmeau, CNRS-IFREMER, B.P. 5, 17137 L'Houmeau, France.

⁽³⁾ IFREMER, Centre de Brest, B.P. 70, 29280 Plouzané, France.

Reprints : C. Marcaillou-Le Baut

*Contamination kinetics of mussels *Mytilus edulis* exposed to a natural population of Dinoflagellates *Dinophysis* spp.*

RÉSUMÉ

En juin 1992, deux lots de moules ont été immergés pendant dix jours à l'extérieur du pertuis d'Antioche, sur la côte atlantique française, respectivement : (1) dans les eaux de surface, dans lesquelles la densité des *Dinophysis* spp. est restée inférieure à 100 cellules.l⁻¹ pendant une semaine puis s'est rapidement accrue jusqu'à 3 000 cell.l⁻¹, et (2) dans la thermocline, où la densité des *Dinophysis* spp. a d'abord été comprise entre 100 et 1 000 cell.l⁻¹, pour atteindre ensuite la même concentration. La présence d'acide okadaïque n'a pas été détectée pendant une semaine dans les glandes digestives des individus du lot de surface, alors que ceux situés dans la thermocline en contenaient 2,7 µg.g⁻¹ (poids sec). En fin d'expérimentation, les moules des deux lots contenaient environ 6,3 µg.g⁻¹. Il en est conclu : (1) que la contamination des moules est très rapide, dès lors que la densité des *Dinophysis* spp. dépasse 1 000 cell.l⁻¹; (2) que le seuil de toxicité pour l'espèce humaine (6 µg.g⁻¹) peut être atteint en deux à trois jours; et (3) que l'analyse toxinique hebdomadaire prévue comme surveillance minimale en période d'alerte correspond à la fréquence limite pour une détection fiable des zones contaminées. ▲

ABSTRACT

In June 1992, two batches of mussels were submerged ten days off the Strait of Antioche, on the French Atlantic coast, respectively (1) in subsurface water where the concentration of *Dinophysis* spp. remained below 100 cells.l⁻¹ during the first week and then sharply increased up to near 3 000 cells.l⁻¹, and (2) in the thermocline where *Dinophysis* spp. concentration first ranged between 100 and 1 000 cells.l⁻¹ and then was slightly more than 3 000 cells.l⁻¹. The presence of okadaic acid (O.A.) was not detected during one week in mussels feeding in surface water, whereas those in the thermocline contained 2.7 µg.g⁻¹ O.A. in digestive gland (dry weight). At the end of the experiment, mussels of both batches contained circa 6.3 µg.g⁻¹. It is concluded (1) that mussel contamination is very fast as soon as *Dinophysis* spp. density is higher than 1 000 cell.l⁻¹, (2) that the toxicity threshold for human safety can be reached in two or three days, and (3) that the weekly toxin analysis stated as a minimum survey during warning periods meets the limit of frequency for a reliable detection of poisoned-mussel areas. ▲

Mots clés : *Mytilus edulis*, dinoflagellés, *Dinophysis* spp., cinétique, contamination.

Key words : *Mytilus edulis*, dinoflagellates, *Dinophysis* spp., kinetics, contamination.

ABRIDGED VERSION

In situ contamination kinetics has never been determined in mussels exposed to *Dinophysis* spp., mainly because of a lack of simultaneous daily recordings of toxic algal levels in

Note présentée par Lucien Laubier.

Note remise le 15 mai 1993, acceptée après révision le 24 août 1993.

the environment and toxin concentrations in the molluscs. To determine this kinetics, we performed a contamination experiment off the Strait of Antioche, on the French Atlantic coast, in an area where a *Dinophysis* spp. concentration of several thousand cells per liter was likely to be found in the thermocline layer in late spring. Two 30 - kg batches of 5 ± 1 cm - long (n = 150) mussels

submerged respectively between 3 and 5.5 m and 11 and 14 m were attached to wire mesh anchored dynamically with respect to the water mass by a drogue positioned in the thermocline. This dynamic mooring was followed for 10 days, in June 1992, by two oceanographic vessels from which mussel samples were collected once daily at *circa* 7 h am and phytoplankton samples 2 to 3 times per day at *circa* 7 h am, 4 h and 6 h pm, both in the thermocline and the subsurface layers. Contamination was measured by okadaic acid (O.A.) assay in shellfish digestive glands (method of Lee *et al.*, 1987), and the number of *Dinophysis* spp. per liter by the method of Utermöhl. Changes in *Dinophysis* spp. density showed two distinct phases. Between June 5 and 12, the number of *Dinophysis* spp. in the subsurface layer did not exceed 100 cells.l⁻¹ and mussel toxin concentration remained undetectable. In the thermocline, the number of *Dinophysis* spp. ranged between 90 and 1 000 cells.l⁻¹

Dans l'ensemble constitué par les îles de Ré et d'Oléron, le bassin de Marennes-Oléron et la baie de l'Aiguillon, l'accroissement de la densité des dinoflagellés toxiques *Dinophysis* spp. est essentiellement subordonné à la présence pendant au moins deux semaines consécutives d'une structure stratifiée de la colonne d'eau [1] ; les cellules sont abondantes dans la thermocline, peu nombreuses dans les eaux de surface et absentes près du fond. Cette stratification s'établissant plus précocement et plus intensément au large que près de la côte, c'est d'abord à l'extérieur des îles que des populations relativement denses (plusieurs milliers de cellules par litre) ont été observées. Ces organismes sont responsables de la toxicité diarrhéique transmise à l'homme par les moules [2-4]. La toxine, un acide gras polyéthéré, l'acide okadaïque (A.O.) [5-7], est accumulée dans la glande digestive par les bivalves. Un nombre relativement faible de *Dinophysis* spp. serait suffisant pour les contaminer ; malgré des variations saisonnières et régionales [8], un seuil de 200 cellules par litre a été souvent cité comme étant critique [4]. Cette densité peut être encore plus faible aux basses températures [9].

La cinétique de contamination des moules en fonction du nombre de cellules de *Dinophysis* spp. absorbées n'a, toutefois, jamais été suivie, faute d'une culture disponible de ces dinoflagellés. On ignorait donc si une concentration minimale de ces organismes est nécessaire pour que le processus d'accumulation de la toxine soit effectif et à quelle vitesse il se produit. Pour approcher cette connaissance, nous avons suivi simultanément : (1) l'évolution d'une population naturelle de *Dinophysis* spp. dans la couche thermocline, reconnue antérieurement comme étant favorable à leur développement et, à titre de comparaison, en surface, où généralement leur densité reste faible [1] ; et (2) l'évolution de la concentration en A.O. des glandes digestives de moules tests immergées dans les mêmes eaux.

Matériel et méthodes

Du 5 au 15 juin 1992, deux lots (30 kg chacun) de moules ayant une longueur moyenne de 5 cm ($\sigma=1$, $n=150$) ont été respectivement immergés entre 3 et 5,5 m et entre 11 et 14 m, à l'ouest du pertuis d'Antioche sur des fonds de 50 m. Ces lots étaient fixés sur une filière ancrée

and mussel O.A. concentrations reached up to 2.7 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ of digestive gland (dry weight) on June 10. After June 12, *Dinophysis* spp. density increased sharply both in the thermocline and the subsurface layer (respective mean values 3 299 ($\sigma=2 063$, $n=12$) and 2 955 ($\sigma=1 868$, $n=12$) cells.l⁻¹), and toxin concentrations became higher in all mussels. At the end of the experiment, O.A. concentration in both batches was 6.3 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ which corresponds to the public health threshold (*i.e.* 6.0 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$).

These findings indicate that mussel contamination is very rapid as soon as *Dinophysis* spp. density reaches several thousand cells per liter and that the toxicity threshold can be reached in 2 or 3 days, making the mussels unsuitable for human consumption. They indicate that the weekly toxin analysis stated as a minimum survey during warning periods meets the limit of frequency for a reliable detection of contaminated areas. ▲

d'une façon dynamique par une drogue placée dans la thermocline, entre 11 et 14 m (Fig. 1). Ce dispositif a été suivi au moyen des navires océanographiques Côte d'Aquitaine (CNRS) et Gwen-Drez (IFREMER).

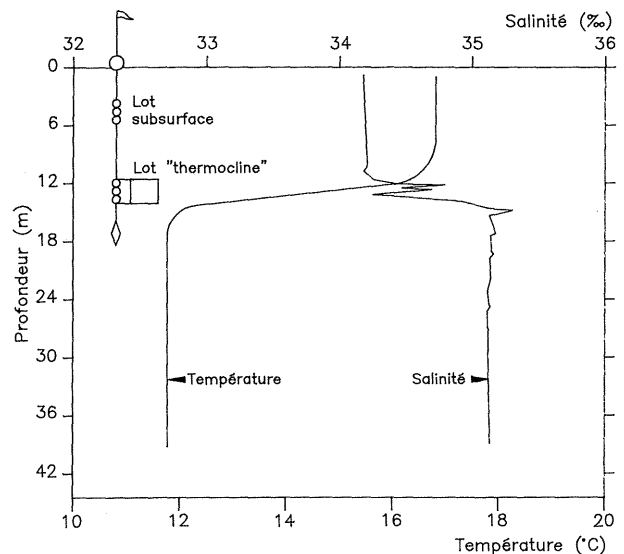


Figure 1. **Structure thermohaline type : exemple du 8 juin, 7 h 00 (heure locale) ; position des lots de moules.**

Au moins deux fois par jour, la structure thermohaline a été déterminée (sonde CTD) et des échantillons d'eau de mer ont été prélevés pour estimer la densité des *Dinophysis* spp. (méthode Utermöhl). Une fois par jour (le matin), la filière a été remontée à bord et 1 à 2 kg de moules ont été prélevés dans chacun des lots pour doser l'A.O. dans les glandes digestives [10].

Résultats et discussion

L'évolution de la densité de *Dinophysis* spp. montre clairement l'existence de deux séquences (Fig. 2) : (1) Entre le 5 et le 12 juin, sous réserve de l'interruption du 8 au 10 juin, les teneurs dans la couche superficielle, très faibles, sont toutes inférieures à 100 cell.l⁻¹ ($x=43$, $\sigma=34$, $n=12$) alors que dans la thermocline elles sont comprises entre 90 et 1 000 cell.l⁻¹ ($x=286$; $\sigma=284$; $n=12$). (2) Entre le 13

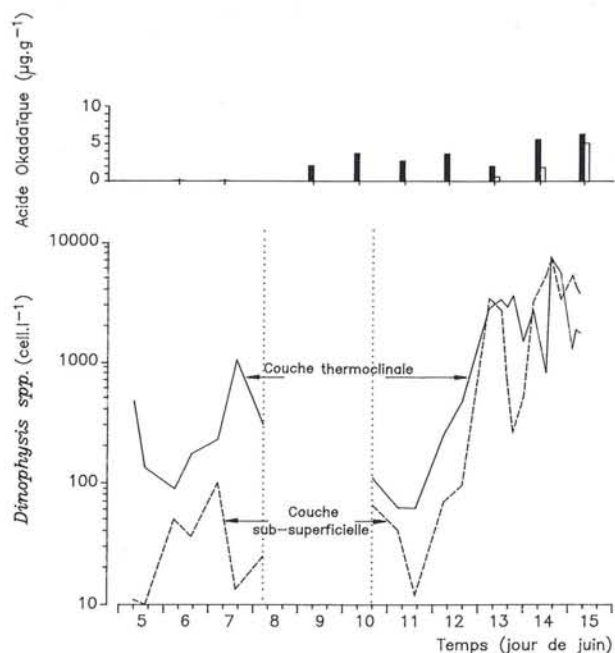


Figure 2. Évolutions, du 5 au 15 juin, de la concentration en toxine dans les glandes des moules immergées entre 3 et 5,5 m et entre 11 et 14 m, et des concentrations moyennes intégrées de *Dinophysis spp.* dans la couche superficielle (2-6,5 m) et la thermocline (10-15 m). Pour causes techniques, le 9 juin, il n'a pas été possible de prélever des échantillons pour les comptages phytoplanktoniques.

et le 15 juin, les teneurs ont brusquement et très fortement augmenté, aussi bien dans la couche subsuperficielle que dans la thermocline. A quelques exceptions près (3 valeurs dans la couche homogène et 2 valeurs dans la thermocline), les densités dépassent 1500 cell.l⁻¹ et les valeurs moyennes ne sont pas significativement différentes : 3299 cell.l⁻¹ ($\sigma=2063$, $n=12$) dans la couche homogène, contre 2955 cell.l⁻¹ ($\sigma=1868$, $n=12$)

RÉFÉRENCES

1. Delmas D., Herbland A., Maestrini S. Y. 1992. Environmental conditions which lead to increase in cell density of the toxic dinoflagellates *Dinophysis* spp. in nutrient-rich and nutrient-poor waters of the French Atlantic coast. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 89: 51-1.
2. Belin C., Berthome J. P. 1991. REPHY : le réseau français de suivi du phytoplancton. In : Frey J. M., ed. *Proceedings of Symposium on marine biotoxins*. Paris : CNEVA Publ., 189-94.
3. Yasumoto T., Oshima Y., Sugawara W., Fukuyo Y., Oguri H., Igarashi T., Fujita N. 1980. Identification of *Dinophysis fortii* as the causative organism of diarrhetic shellfish poisoning. *Bull. Jap. Soc. Scient. Fish.* 46 (11): 1405-11.
4. Lassus P., Martin A. G., Maggi P., Berthome J. P., Langlade A., Bachere E. 1983-1985. Extension du dinoflagellé *Dinophysis acuminata* en Bretagne sud et conséquences pour les cultures marines. *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.* 47 (3 et 4): 122-30.

dans la thermocline. Ce brusque changement pourrait avoir pour origine un changement de masse d'eau dès le 13 juin, bien que la rupture hydrologique ait été peu perceptible (résultats non mentionnés ici).

Dans la couche homogène, les teneurs des moules en acide okadaïque sont indétectables jusqu'au 12 juin inclus (fin de la première séquence) (Fig. 2). Dès le 13 juin, c'est-à-dire quelques heures après l'immersion dans des densités moyennes de 3000 cell.l⁻¹, la toxicité est détectable (0,6 µg A.O. par g de glande digestive sèche), pour atteindre 5,1 µg.g⁻¹ 2 jours plus tard (erreur relative de 14 %). Dans la thermocline, la contamination est plus précoce ; elle est décelable dès le 8 juin, c'est-à-dire trois jours après l'immersion dans des concentrations de quelques centaines de cellules de *Dinophysis* spp. par litre. Le seuil de santé publique (2,0 µg d'A.O. par g de glande digestive humide, soit approximativement 6,0 µg.g⁻¹ de glande sèche) a été atteint dans la journée du 14 juin, c'est-à-dire moins de deux jours après l'immersion dans des concentrations à 3000 cell.l⁻¹.

Conclusion

Les moules accumulent l'A.O. dans leur glande digestive même quand la densité des *Dinophysis* spp. est faible (moins de 300 cell.l⁻¹). Dès lors que cette densité atteint 3000 cell.l⁻¹, la contamination est fortement accélérée ; la concentration en A.O. nocive pour l'homme est atteinte en moins de trois jours. Faute d'une estimation exacte du nombre de *Dinophysis* spp. retenu par les moules, il n'a pas encore été possible de calculer la quantité moyenne de toxine apportée par cellule. Ces résultats confirment le bien-fondé de la stratégie du réseau de surveillance de l'IFREMER (REPHY) qui situe l'alerte à la concentration minimale détectable (100 cell.l⁻¹). Ils invitent néanmoins à la vigilance, car la fréquence hebdomadaire prévue comme minimum de surveillance en période d'alerte correspond à la fréquence limite pour une détection fiable des zones contaminées. ▼

5. Murata M., Shimatani M., Sugitani H., Oshima Y., Yasumoto T. 1982. Isolation and structural elucidation of the causative toxin of the diarrhetic shellfish poisoning. *Jap. Soc. Sci. Fish.* 48 (4): 549-52.
6. Kumagai M., Yanagi T., Murata M., Yasumoto T., Kat M., Lassus P., Rodriguez-Vasquez J. 1986. Okadaic acid as the causative toxin of diarrhetic shellfish poisoning in Europe. *Agric. Biol. Chem.* 50 (11): 2853-8.
7. Lee J. S., Igarashi T., Fraga S., Dahl E., Hovgaard P., Yasui T. 1989. Determination of diarrhetic shellfish toxins in various dinoflagellate species. *J. Appl. Phycol.* 1: 147-52.
8. Sournia A., Belin C., Berland B., Erard-Le Denn E., Gentien P., Grzebyk D., Marcaillou-Le Baut C., Lassus P., Partensky F. 1991. Le genre *Dinophysis* (Dinophycées). Paris : CNRS/IFREMER 1991, 11-61.
9. Kat M. 1989. Toxic and non-toxic dinoflagellate blooms on the Dutch coast. In : Okaichi T., Anderson D. M., Nemoto T., eds. *Red tides : biology, environmental science and toxicology*. Amsterdam : Elsevier Publ., 73-6.
10. Lee J. S., Yanagi T., Kenma R., Yasumoto T. 1987. Fluorimetric determination of diarrhetic shellfish toxins by high performance liquid chromatography. *Agric. Biol. Chem.* 51 (3): 877-81.