



Thèse

Présentée par

Rachid ABOUABDELLAH

Pour obtenir le
Doctorat en Sciences

URF : Ecosystèmes Marins et Dulçaquicoles
Environnement et Ressources Biologiques

Etude des phycotoxines paralytiques et lipophiles chez les mollusques bivalves de l'Atlantique sud marocain

Soutenue publiquement le 17 juillet 2012, devant le jury composé de :

Pr. M. A. MOUKRIM	Faculté des Sciences Ibnou-Zohr - AGADIR	Président
Pr. M. A. KAAYA	Faculté des Sciences Ibnou-Zohr – AGADIR	Rapporteur
Pr. M. RAMDANI	Institut Scientifique Université Mohamed V-Agdal,	Rapporteur
Pr. N. EL KHIATI	Faculté des Sciences – Hassan II- Casablanca	Examinateur
Pr. R. MIMOUNI	Faculté des Sciences Ibnou-Zohr -AGADIR	Examinateur

Dédicaces

A mon Père, qui a toujours cru en moi

A ma Mère,

A ma Femme Zahira,

A ma Sœur Sana et mes Frères : Adil et Hicham,

A ma belle princesse Hiba,

A Ma famille

A Mes amis

Remerciements

Je tiens à adresser mes sincères remerciements à tous ceux qui, de près ou de loin, se sont intéressés à cette thèse et m'ont apporté leur soutien.

En premier lieu, mes sincères et respectueux remerciements à Monsieur le Doyen de la faculté des sciences Ibnou Zohr Monsieur Yahya AIT ICHOU et à Monsieur Mostapha FAIK, Directeur Général de l'INRH.

Je tiens à remercier vivement mon Directeur de thèse, Professeur Abdelatif MOUKRIM, avec qui j'ai commencé mes premiers pas de recherche à la faculté des sciences Ibnou Zohr à Agadir. Je le remercie de m'avoir dirigé tout au long de mes études supérieures.

Je remercie Messieurs les Professeurs Mohammed RAMDANI et Abderrazak KAAYA ainsi que Madame Nadia GHARBI d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce manuscrit et d'avoir accepté de lire, d'évaluer et de commenter ce travail. Merci également à Mesdames les Professeurs Najat EL KHIATI et Rachida MIMOUNI, d'avoir pris part au jury de soutenance. J'espère que ce travail est à la hauteur de leurs attentes.

Aussi je tiens à remercier Monsieur Abdelhak LAHNIN, Chef du Centre Régional de l'INRH à Agadir ainsi qu'à l'ensemble du personnel scientifique et administratif pour leur convivialité et leur disponibilité.

J'adresse un merci tout particulier à Mesdames Ibtissam SETTI et Asmae BENNOUNA et à Monsieur Jaouad ELATTAR pour leurs conseils et discussions scientifiques fort intéressantes. Merci à mes collègues du laboratoire de biotoxines d'Agadir et ceux du Centre Régional pour leur encouragement.

Merci à Monsieur Samir Benbrahim, Chef de Département de Q.S.M.M de l'INRH pour ces encouragements et pour sa grande disponibilité. Je présente aussi mes remerciements à Monsieur Abdelatif BERRAHOU Ex- Directeur Général de l'INRH et à Messieurs Abdelghani Chafik et Hamid Taleb ainsi qu'à tout le staff du laboratoire de biotoxines de l'INRH (Casablanca)

et plus précisément à Mesdames SAGOU et BENHADOUCH et à Mr AMANHIR, pour leurs aides précieuses.

Mes remerciements et ma reconnaissance aux Professeurs Bernd Luckas et Katrin ERLER ainsi qu'à tout le staff de l'institut de Nutrition à Jena en Allemagne pour leur accueil et leur assistance dans les analyses chimiques par HPLC de mes échantillons lors de mon passage au sein de leur laboratoire en 2007.

Je voudrais aussi remercier tous les membres des Laboratoire SSL des Centres régionaux de l'INRH à Dakhla et à Laâyoune pour leur collaboration dans ce travail de recherche spécialement Mme Mina DELLAH et les membres du laboratoire de biotoxines marines.

SOMMAIRE

Dédicaces	
Remerciements	
Résumé	11
Abstract	12
Liste des acronymes, Liste des tableaux, liste des photos et liste des figures	13
Introduction générale	17
Chapitre 1 : « Synthèse bibliographique »	19
I. Introduction	20
II. Classification des toxines	20
1. Classification selon les symptômes	20
2. Classification selon les propriétés chimiques	22
2.1 Les phycotoxines hydrosolubles	22
2.1.1. Les phycotoxines paralytiques (PSP)	22
- Historique	22
- Propriétés physico-chimiques	23
- Espèces productrices de toxines paralysantes	
➤ <i>Alexandrium spp</i>	24
➤ <i>Gymnodinium catenatum</i>	24
➤ <i>Pyrodinium bahamense</i>	25
- Tableau clinique	26
- Mode d'action	27
- Situation dans le monde et au Maroc	27
2.1.2. Les phycotoxines amnésiques (ASP)	29
- Historique	29
- Propriétés physico chimiques	29
- Effets cliniques	30
- Mode d'action	30
- Espèces productrices de toxines Amnésiques	31
- Situation dans le monde et au Maroc	31
2.2 Les phycotoxines lipophiliques	32

2.2.1 Les phycotoxines diarrhéiques (DSP)	32
a. L'acide okadaïque (OA) et Les dinophysitoxines (DTXs)	32
- Historiques	32
- Propriétés physico chimiques	32
- Espèces productrices	33
➤ <i>Dinophysis sp</i>	33
➤ <i>Prorocentrum sp</i>	34
- Le tableau clinique	35
- Mécanisme d'action	36
b. Les pectenotoxines	36
- Historique	36
- Propriétés physico-chimiques	36
- Espèce productrice	37
- Mécanisme d'action et effet clinique	37
c. les yessotoxins (YTXs)	37
- Historique	37
- Propriétés physico-chimiques	37
- Espèces productrices	38
- Tableau clinique	39
- Mécanisme d'action	39
- Situation au Maroc des phycotoxines diarrhéiques	40
2.2.2 Les toxines à cycle imine	40
a. Les azasperacides (AZAs)	40
- Historique	40
- Propriétés physico chimiques	40
- Espèce productrice	41
- Mécanisme d'action et effet clinique	41
- Situation au Maroc des azasperacides	41
b. Les toxines à cycle imine autres que les AZAs	42
i. Les spirolides	42
- Historique	42
- Propriétés physico-chimiques	42
- Espèces productrices	44

-	Mécanisme d'action et Effet clinique	44
ii.	Les gymnodimines	44
-	Historique	44
-	Propriétés physico-chimiques	44
-	Espèces productrices	45
-	Mécanisme d'action et effet clinique	46
III.	Les méthodes de détection des phycotoxines	46
a.	Test biologique de toxicité	46
b.	Méthodes chimiques, Analyse par CLHP (chromatographie liquide à haute performance)	46
-	Dosage des toxines paralysantes	47
-	Dosage des toxines diarrhéiques	47
-	Méthodes immunologiques	47
Chapitre 2 : « Sites d'échantillonnage»		48
1.	Introduction	49
2.	Matériel échantillonné	49
3.	Régions étudiées	51
	Agadir	51
	Laâyoune	52
	Dakhla	53
4.	Toxines étudiées	55
Chapitre 3: « Etude des phycotoxines paralytiques dans les coquillages bivalves de l'Atlantique sud Marocain »		56
1.	Introduction	57
2.	Matériel et méthode	58
2.1.	Test biologique sur souris	58
•	Produits et matériel d'analyse	58
•	Extraction des toxines	59
•	Injection	59

• Calcul de la toxicité	59
• Calcul du coefficient de conversion (FC)	60
2.2. Test chimique par chromatographie liquide à haute performance (CLHP)	62
• Extraction des phycotoxines	62
• Conditions de la chromatographie	63
2.3 Analyses phytoplanctoniques	66
3. Résultats	66
3.1. Test biologique sur souris	66
i. Agadir	66
ii. Laâyoune	68
iii. Dakhla	68
3.2. Saisonnalité des phycotoxines paralytiques	73
3.3. Test chimique par CLHP	79
3.3.1. Toxicité totale	79
• Agadir	79
• Laâyoune	80
• Dakhla	80
3.3.2. Toxicité des organes des moules	82
3.3.3. Profil toxinique	82
• Agadir	82
• Laâyoune	83
• Dakhla	87
3.4. Espèces phytoplanctoniques productrice de la PSP	92
• Agadir	92
• Laâyoune	93
• Dakhla	93
3.5. Comparaison entre test biologique et test chimique	96
3.6. Incidence de la toxicité PSP dans les différents sites étudiés	97
3.7. Comparaison entre la toxicité PSP des différents bivalves étudiés	98
3.8. Toxicité PSP dans les bivalves des différents sites étudiés (2008-2011)	98
4. Discussion	99

Chapitre 4 : « Etude des phycotoxines lipophiliques dans les mollusques bivalves de l'Atlantique sud Marocain »	102
1. Introduction	103
2. Matériel et méthodes	104
2.1. Test biologique sur souris	104
• Produits et matériel d'analyse	104
• Extraction des toxines	105
• Injection	105
• Calcul de la toxicité	105
2.2 Test chimique par chromatographie liquide à haute performance (CLHP/MS)	105
• Extraction des phycotoxines	105
• Conditions de la chromatographie	106
• Expression des résultats	111
3. RESULTATS	113
3.1. Dakhla.	113
a. Toxicité et phytoplankton toxiques.	113
• Boutalha.	113
• Pk25	115
• N'tirift	116
b. Profiles toxiniques	118
• Pk25	118
• N'tirift.	120
• Boutalha	122
3.2. Agadir.	126
a. Toxicité et phytoplankton toxique.	126
• Tifnit.	126
• Cap Ghir	127
b. Profil toxinique..	129
3.3. Laâyoune	131
• Test biologiques	131

• Test chimique	131
3.4. Comparaison entre le test biologique sur souris et la chromatographie Liquide couplé à la spectrométrie de masse.	134
3.5. Incidence de la toxicité LSP dans les différents sites étudiés	135
3.6. Toxicité LSTs dans les moules des trois régions de 2008 jusqu' à 2011	135
4. Discussion	137
Conclusion générale	140
Références bibliographiques	142
Annexes	153

Résumé

Au cours de cette étude sur les toxines d'origine phytoplanctonique, dans les écosystèmes marins côtiers, menée durant la période 2003 – 2007 ; seules les biotoxines lipophiles (LSTs) et paralysantes (PSP) ont été identifiées le long du littoral entre Agadir et Dakhla. La toxicité a été détectée par le test-souris (MBA) et le contenu et la nature des composants toxiques ont été établis par chromatographie en phase liquide (LC) couplée à la spectrométrie (MS) et par HPLC-FD. Le groupe des phycotoxines diarrhéiques DSP, notamment l'acide okadaïque (OA) et les dinophysitoxines (DTXs), ainsi que leurs esters ont été détectés chez les mollusques bivalves du sud atlantique (moules, coques, huîtres et couteaux).

Les autres toxines lipophiles (les pecténotoxines, les yessotoxines et les gymnodimines) ainsi que les azaspiracides n'ont pas été détectées au cours de cette étude. Le suivi régulier de la surveillance des communautés phytoplanctoniques dans les sites des gisements coquilliers a révélé la présence sporadique dans le temps de quelques espèces potentiellement toxiques : *Dinophysis* spp. Les phycotoxines PSP, élaborées par *Alexandrium* spp, n'étaient pas connues dans la région auparavant et la bioaccumulation par les 4 espèces de bivalves a fait l'objet d'un suivi dans la chair totale de ces organismes.

Le profil chimique des phycotoxines PSP, obtenu par la méthode chimique, a révélé la prédominance des gonyautoxines GTX2 et GTX3 et une minorité de GTX1, GTX4 et la saxitoxine (STX). Ce profil explique que la toxicité a été principalement associée à l'espèce *Alexandrium minutum*.

La comparaison entre les concentrations de la STX, obtenue par les deux méthodes (test souris et HPLC-FD) a révélé que les résultats diffèrent d'une manière hautement significative $t = 5.12$ ($P < 0.001$) et la comparaison entre les résultats du test souris et de la LC-MS-MS a montré la présence une corrélation négative entre les concentrations de l'AO et le délai de la mort du test souris ($r = -0.78$).

La comparaison entre la toxicité chez les 4 espèces de bivalves à montré que le couteau (*Solen marginatus*) bioaccumule plus de biotoxines suivi par les moules, les coques et les huîtres.

Mots clés : PSP, LSTs, test souris, LC-MS, HPLC-FD, Phytoplancton, mollusques bivalves, sud marocain.

Abstract

During this study established from 2003 to 2007 in Agadir, Laâyoune and Dakhla, the PSP and LSTs were detected in four species of shellfish.

The method used for the detection of these algal toxins is mouse bioassay (MBA). The toxins profiles of toxic samples were obtained by LC-Ms and HPLC-FD.

The results showed a summery apparition of PSP toxins at Agadir and Laâyoune's shellfish and autumnal at Dakhla's shellfish, the majors toxins detected were carbamates toxins, mainly GTX1, 2, 3, 4 and a minority of STX.

The LSTs toxins detected were OA, DTX-1 and its associated esters; no seasonality of these DSP toxins was distinguished. The results obtained in a comparative study of PSP and DSP toxic shellfish using the two methods showed that some MBA negatives samples were positives by HPLC-FD for PSP and LC-Ms for DSP.

The comparison between the STX concentrations obtained by these two methods revealed a very highly significant difference was found between the results of MBA-PSP and HPLC/FD-PSP with $t = 5.12$ ($P < 0.001$) and a negative correlation between OA concentrations and death times of MBA ($r = -0.78$).

The comparison between the toxicity of different shellfish species revealed that especially *Solen marginatus* and cockles were more toxic than mussels and oysters.

The PSP shellfish's contaminations were mainly associated with the detection in seawater of *Alexandrium minutum* and the DSP contamination with a various species of *Dinophysis*.

Liste des acronymes

AOAC	Association of Official Analytical Chemists
GTx	Gonyautoxine
STX	Saxitoxine
GTx	Gonyautoxin
NeoSax	Neosaxitoxine
NSP	Neurologic Shellfish Poisoning
PSP	Paralytic Shellfish Poisoning
ASP	Amnesic Shellfish Poisoning
CFP	Ciguatorial Fish Poisoning
NSP	Neurologic Shellfish Poisoning
DSP	diarrhetic Shellfish Poisoning
LSTs	Lipophilic Shellfish Poisoning
US	Unité Souris
FC	Facteur de conversion
FCP	Facteur de corrélation pondérale
FD	Facteur de dilution
DTXs	Dinophisistoxines
RSSL	Réseau de surveillance et de salubrité littorale

Liste des photos et figures

Chapitre 1			
Photo1	<i>Alexandrium minutum</i>	Figure 1	Structure chimique des toxines PSP
Photo2	<i>Gymnodinium catenatum</i>	Figure 2	Répartition géographique des toxines PSP
Photo3	<i>Dinophysis acuminata et acuta</i>	Figure 3	Structure chimique des toxines ASP
Photo4	<i>Prorocentrum scutellum</i>	Figure 4	Structure chimique de l'AO et DTXs
Photo5	<i>Lingulodinium polyedra</i>	Figure 5	Structure chimique des pécténotoxines
		Figure 6	Structure chimique des yessotoxines
		Figure 7	Structure chimique des azaspiracides
		Figure 8	Structure chimique des spiroptides
		Figure 9	Structure chimique des gymnodimines

Chapitre 2			
Photo 1	<i>Perna perna</i>	Figure 1	Région côtière étudiée
Photo 2	<i>Solen marginatus</i>	Figure 2	Sites étudiés au niveau d'Agadir
Photo 3	<i>Crassostrea gigas</i>	Figure 3	Sites étudiés au niveau de Laâyoune
Photo 4	<i>Cerastoderma edule</i>	Figure 4	Sites étudiés au niveau de dakhla

Liste des figures

Chapitre 3	
Figure A	Chromatogramme d'une mixture de standard des toxines PSP
Figure 1	Les toxines PSP dans les glandes digestives et dans la chair totale de la moule de Tifnit
Figure 2	Les toxines PSP dans les glandes digestives et dans la chair totale de la moule de Capghir
Figure 3	Les toxines PSP dans les glandes digestives et dans la chair totale de la moule d'Akhfenir
Figure 4	Les toxines PSP dans les glandes digestives et dans la chair totale de la moule d'Oum labouir
Figure 5	Les toxines PSP dans les glandes digestives et dans la chair totale de la moule de Dunford
Figure 6	Les toxines PSP dans les glandes digestives et dans la chair totale de la moule de Hojallamira
Figure 7	Les toxines PSP dans les glandes digestives et dans la chair totale de la moule de Puertitto
Figure 8	Les toxines PSP dans les glandes digestives et dans la chair totale du couteau de Pk25
Figure 9	Les toxines PSP dans les glandes digestives et dans la chair totale des bivalves de Boutalha
Figure 10	Les toxines PSP dans les glandes digestives et dans la chair totale des bivalves de Duna blanca
Figure 11	<i>Alexandrium</i> spp et toxines PSP dans le littoral d'Agadir durant 4 saisons de 2004-2007
Figure 12	<i>Alexandrium</i> spp et toxines PSP dans le littoral et la baie de Dakhla durant 4 saisons : 2004-2006
Figure 13	<i>Alexandrium</i> spp et toxines PSP dans le littoral de Laâyoune durant 4 saisons de 2004-2007
Figure 14	Toxines PSP détecté par CLHP-FD dans les moules d'Agadir (2004, 2005 et 2006)
Figure 15	Toxines PSP détecté par CLHP-FD dans les moules de Laâyoune (2003 et 2005)
Figure 16	Toxines PSP détecté par CLHP-FD dans les bivalves de Dakhkla (2004 et 2006)
Figure 17	Accumulation des toxines PSP par les différents organes des moules des trois régions
Figure 18	Profil des toxines PSP dans les moules de Tifnit 2004-2006
Figure 19	Profil des toxines PSP dans les moules de Cap ghir 2004-2006
Figure 20	Profil des toxines PSP dans les moules d'Akhfenir 2003-2005
Figure 21	Profil des toxines PSP dans les moules d'Oum labouir 2004-2006
Figure 22	Profil des toxines PSP dans les coques de Boutalha 2004-2006
Figure 23	Profil des toxines PSP dans les huîtres de Duna blanca 2004
Figure 24	Profil des toxines PSP dans les couteaux de Pk25 2004, 2006 et 2007
Figure 25	Evolution mensuelle d' <i>Alexandrium</i> spp dans les eaux d'Agadir
Figure 26	Evolution mensuelle d' <i>Alexandrium</i> spp dans les eaux de laâyoune
Figure 27	Evolution mensuelle d' <i>Alexandrium</i> spp dans le littoral de Dakhla
Figure 28	Evolution mensuelle d' <i>Alexandrium</i> spp dans la baie de Dakhla
Figure 29	Incidence de la PSP dans les moules des différents sites étudiés
Figure 30	Toxicité PSP des différentes espèces de mollusques bivalves de la baie de Dakhla

Chapitre 4	
Figure 1	Chromatogramme CL-MS des standards de l'AO, DTX-1 et du PTX-2
Figure 2	Chromatogramme CL-MS des standards d'AZA-1 et GYM
Figure 3	Calibrage de CL-MS
Figure 4	Pourcentage des échantillons toxiques au niveau des 3 régions étudiées
Figure 5	Pourcentage de la toxicité des mollusques de la région Dakhla.
Figure 6	Résultats du test biologiques avec évolution mensuelle de Dinophysis spp dans le site de Boutalha
Figure 7	Résultats du test chimique dans les trois espèces de bivalves de Boutalha (toxicité 2006)
Figure 8	Résultats du test biologiques avec évolution mensuelle de Dinophysis spp dans le site de Pk25
Figure 9	Résultats du test chimique dans les couteaux de pk25 (toxicité 2005-2006)
Figure 10	Résultats du test biologiques avec évolution mensuelle de Dinophysis spp dans le site de N'tirift

Figure 11	Résultats du test chimique dans les moules de N'tirift (toxicité 2005-2006)
Figure 12	Chromatogramme Cl-MS des couteaux de Pk25 décembre 2005
Figure 13	Chromatogramme Cl-MS des moules de N'tirift décembre 2005
Figure 14	Chromatogramme Cl-MS des huîtres de Boutalha février 2006
Figure 15	Chromatogramme Cl-MS des coques de Boutalha février 2006
Figure 16	Chromatogramme Cl-MS des couteaux de Boutalha février 2006
Figure 17	Résultats du test biologiques avec évolution mensuelle de <i>Dinophysis</i> spp dans le site de Tifnit
Figure 18	Résultats du test biologiques avec évolution mensuelle de <i>Dinophysis</i> spp dans le site de Cap ghir
Figure 19	Toxicité totale par CL-MS, des moules de Cap Ghir (toxicité 2004)
Figure 20	Chromatogramme Cl-MS des moules de Cap Ghir septembre 2004
Figure 21	Résultats du test biologiques avec évolution mensuelle de <i>Dinophysis</i> spp dans le site d'Akhfenir
Figure 22	Toxicité totale par CL-MS, des moules d'Akhfenir (toxicité 2003 et 2005)
Figure 23	Chromatogramme Cl-MS des moules d' Akhfenir septembre 2005
Figure 24	Comparaison entre le test biologique sur souris et la CL-MS
Figure 25	Incidence de la toxicité LSTs dans les moules des différent sites étudiés

Liste des tableaux

Tableaux du chapitre 1	
Tableau 1	Synthèse de l'information concernant les différents types d'intoxication dus à l'ingestion de toxines marines. Selon Baden <i>et al.</i> (1995).
	Nature des radicaux des phycotoxines PSP
Tableaux du chapitre 2	
Tableau 1	Les points de prélèvement du littoral de Dakhla
Tableau 2	Les points de prélèvement de la baie de Dakhla
Tableaux du chapitre 3	
Tableau 1	Tableau de Sommer
Tableau 2	Calcul du facteur de conversion
Tableau 3	Comparaison entre les résultats du test souris et de CLHP-FD
Tableaux du chapitre 4	
Tableau 1	Parameters de la CL-MS pour la détection des phycotoxines lipophiles
Tableau 2	Profil des toxines DSP des Couteaus prélevés à Pk25 (Dakhla), periods de toxicités de 2005 et 2006
Tableau 3	Profil des toxines DSP des moules prélevés à N'tirift (Dakhla), periods de toxicité de 2005 et 2006
Tableau 4	Profil des toxines DSP des bivalves prélevés à Boutalha (Dakhla), période de toxicité de 2006
Tableau 5	Profil des toxines DSP des moules prélevées à Agadir (Cap ghir), période de toxicité 2004
Tableau 6	Profil des toxines DSP des moules de laâyoune (Akhfenir), période de toxicité 2005 et 2006
Tableau 7	Comparaison entre le test souris et LC-MS

INTRODUCTION GENERALE

Les écosystèmes marins littoraux offrent à la population riveraine de nombreux avantages socioéconomiques basés sur l'exploitation de sel et des ressources biologiques (mollusques bivalves et céphalopodes, oursins, algues, poissons, ...) à valeur nutritionnelle de haute qualité : acides gras, protéines et sels minéraux. Toutefois, certains organismes marins filtreurs bioaccumulent des toxines dans leurs tissus adipeux et se transforment en une source d'intoxication alimentaire suite à leur consommation (Hallegraeff, 1993 ; Pruss, 1998).

Parmi les facteurs qui ont globalisé ce phénomène d'intoxication, le déplacement des populations vers les zones côtières, l'expansion des échanges commerciaux entre le nord et le sud dans le domaine des pêcheries et du tourisme.

Au Maroc, le premier cas d'intoxication due à l'ingestion des coquillages accumulant des toxines d'origine algale a été enregistré en 1961. Les années 1971, 1975, 1981 et 1994 ont été marquées par plusieurs épisodes d'intoxication alimentaire par les phycotoxines (Bourhili, 1982; Tber, 1983). De 1998 jusqu'à présent, plusieurs épisodes de toxicité ont été relevés dans les bivalves des côtes marocaines, dans la Méditerranée et dans celles et de l'Atlantique mais aucun cas d'intoxications graves n'a été enregistré durant cette période.

Les investigations sont orientées sur les phycotoxines paralytiques et lipophiles qui s'accumulent dans les mollusques bivalves d'intérêt socio-économique, et qui peuvent représenter un sérieux risque sanitaire pour le consommateur. Les symptômes peuvent conduire à la mort, ou entraîner de sérieuses séquelles chez les sujets intoxiqués. L'arrêt des activités des fermes aquacoles et des collectes dans les gisements coquilliers durant les périodes d'apparition des biotoxines génèrent des pertes socioéconomiques non négligeables à cause des interdictions de la commercialisation des bivalves.

Dans le but de faire face aux risques sanitaires causés par les biotoxines, l'Institut National de Recherche Halieutique (INRH) a mis en place à partir de 1992, un programme de suivi des biotoxines marines dans le cadre du réseau de surveillance de la salubrité du milieu littoral. La surveillance bimensuelle à hebdomadaire des biotoxines dans les gisements coquilliers est assurée tout au long de l'année au niveau des zones conchyliocles classées, dans le but de protéger le consommateur de ces denrées marines.

Ainsi, cette étude entre dans le cadre du suivi des biotoxines dans les gisements coquilliers exploitables le long du littoral sud atlantique marocain, allant d'Agadir au nord à Dakhla au sud. Ce travail a pour objectif principal de faire le tour d'horizon sur les phycotoxines touchant quatre bivalves de l'Atlantique sud marocain et de comparer les différentes méthodes utilisées dans la détection de ces biotoxines marines : le test biologique sur souris et le test chimique par chromatographie liquide. Plus précisément, cette thèse fait une caractérisation des profils toxiniques en émergence qui sont associés aux espèces phytoplanctoniques nuisibles dans les régions sud de l'Atlantique marocain d'Agadir à Dakhla.

Chapitre 1

Synthèse bibliographique

I. Introduction

Les phycotoxines marines sont des métabolites secondaires produites par le phytoplancton : phycos vient du grec: algues et plancton constitue l'ensemble des organismes vivants qui flottent passivement à l'opposé du necton qui nage.

Ces microalgues fréquentent particulièrement les couches d'eau superficielles de la mer (entre 0 et 50 mètres de profondeur). Elles absorbent les sels minéraux et du CO₂ pour accomplir les réactions de la photosynthèse. Le phytoplancton représente le premier maillon de la chaîne alimentaire dans l'écosystème marin.

Selon les travaux réalisés sur le phytoplancton, 4000 espèces environ de microalgues sont répertoriées dans le monde, dont seules 70 sont capables de synthétiser des biotoxines selon des conditions écologiques encore mal définies. Pour prévoir et mettre en place des mesures de prévention visant la protection de la santé des consommateurs des produits de la mer contaminés, les travaux sont en cours dans les différentes régions du globe et les résultats sont encore loin de cerner la prévention.

Les phycotoxines élaborées par ces micro-algues sont souvent accumulées chez les espèces à régime filtreurs comme les moules, les couteaux, les huîtres.... La consommation des organismes marins ayant bioaccumulés ces phycotoxines représentent de sérieux problèmes sanitaires pour l'homme. Les symptômes associés à ces dangers sont essentiellement d'ordre digestif et/ou neurologique selon la nature chimique de chaque toxine élaborée.

II. Classification des toxines

Les phycotoxines marines peuvent êtres classées selon leurs propriétés chimiques et selon les symptômes provoquées chez l'Homme :

1. Classification selon les symptômes

Selon les symptômes, les phycotoxines sont classées en cinq catégories:

- Les phycotoxines paralytiques (PSP) ;
- Les phycotoxines diarrhéiques DSP (toxines lipophiles et les cycliques imines) ;
- Les phycotoxines Neurologiques (NSP) ;
- Les phycotoxines Amnésiques (ASP) ;
- La Ciguatera (CFP), (spécifique aux poissons).

En 1995, Baden *et al.* ont présenté une synthèse de l'information concernant les différents types d'intoxication dus à l'ingestion des produits de la mer contenant des produits toxiques pour l'homme).

Type d'intoxication	Toxine	Vecteur	Distribution géographique	Taux de mortalité	Principaux symptômes
Intoxication amnésique par les Fruits de Mer (IAFM)	Acide domoïque	Fruits de mer	Canada États-Unis	3 %	aiguës : N, v, d, a, p, r chroniques : a
Intoxication diarrhéique par les fruits de mer (IDFM)	Acide okadaïque Dinophysiotoxine Pectenotoxine Yessotoxine	Fruits de mer	Japon, Europe, Golfe du Mexique	0 %	aiguës : d, n, v chroniques : N R
Intoxication neurologique par les fruits de mer (INFM)	Brévétoxine	Fruits de mer	Floride, Golfe du Mexique, Nouvelle-Zélande	0 %	aiguës : N, v, d, b, t, p chroniques : NR
Intoxication paralysante par les fruits de mer (IPFM)	Saxitoxine Gonyautoxine	Poisson	Régions tempérées à tropicales	1-14 %	aiguës : N, v, d, p, r chroniques : NR
Intoxication à l'histamine	Histamine	Poisson	Non définis	Non détecté	aiguës : N, v, d, p, chroniques : NR
Intoxication à la tétrodotoxine «Fugu»	Tétrodotoxine	Poisson Probablement crustacé	Japon; Brésil	60 %	aiguës : N, v, d, p, r, b, chroniques : NR
Ciguatera	Ciguatoxine Maitotoxine Palytoxine Carchatoxine	Poisson Fruits de mer (rare)	Océan Pacifique, Caraïbes, Australie	< 0.1 %	aiguës : N, v, d, t, p; chroniques : p
Syndrome associé aux pfiesteria	Non détecté	Exposition aéroportées	États-Unis	Non détecté	aiguës : N, a,pc,v chroniques : inconnu

Tableau1 : Synthèse de l'information concernant les différents types d'intoxication dus à l'ingestion de toxines marines (Selon Baden *et al.*, 1995).

Légende : a : amnésie, b : broncho-constriction, d : diarrhée, n : nausée, pc : changement de personnalité, p : paresthésie, r : détresse respiratoire, t : trouble de la thermo sensibilité, v : vomissement, nd : non déterminé MU/ml : 1 MU (Unité souris est la dose nécessaire pour tuer une souris de 20g en 15 minutes).

2. Classification selon les propriétés chimiques

Selon leur solubilité, ces phycotoxines peuvent être classées en deux catégories. Les toxines hydrosolubles (PSP et ASP) et les toxines lipophiles (DSP) ; les toxines à cycle imine (NSP et CFP).

Cette propriété chimique détermine la méthode adéquate pour l'isolation et la détection de ces toxines algales.

2.1. Les phycotoxines hydrosolubles (paralytiques (PSP) et amnésiques (ASP).

Deux types de phycotoxines sont classés dans cette catégorie :

Les phycotoxines paralytiques et les phycotoxines amnésiques.

2.1.1. Les phycotoxines paralytiques (PSP)

L'intoxication appelée Intoxication Paralysante par les Fruits de Mer (IPFM) ou PSP (*Paralytic Shellfish Poisoning*) est la plus étudiée.

D'une part, il s'agit de la plus ancienne des intoxications ayant pour origine des toxines d'algues. Elle a été décrite pour la première fois dans les années 60. D'autre part, les conséquences de cette intoxication peuvent être particulièrement sérieuses chez le consommateur. Le seuil sanitaire établi et adopté par les organismes chargés de la surveillance de la salubrité des coquillages est de 80 µg d'équivalent saxitoxine par 100 grammes de chair totale.

Ces toxines ont un fort pouvoir毒ique neuromusculaire et dans les cas d'intoxication les plus extrêmes, il a été possible d'observer des paralysies musculaires, des difficultés respiratoires entraînant parfois la mort des sujets intoxiqués (Krys et Fremy, 2002). Le taux de mortalité pour ces intoxications varie de 8 à 10 % (Sierra-Beltran *et al.*, 1998) et chaque année, 2000 cas d'intoxications sont recensés dans le monde (Van Dolah, 2000).

L'IPFM est une intoxication qui se déclenche chez l'Homme suite à la consommation de plusieurs espèces de coquillages contaminées comme les moules, palourdes, coques, huîtres, coquilles Saint-Jacques, etc., mais d'autres invertébrés marins peuvent être vecteurs, comme les crabes.

- Historique**

En 1793, l'équipage d'un bateau à Vancouver au Canada a été intoxiqué suite à la consommation de coquillages contaminés. D'après les symptômes décrits dans le rapport datant de 1798, ces intoxications correspondraient à une IPFM. C'est avec Halstead (1965),

que cette intoxication a été pour la première fois précisément décrite. Il a recensé, entre 1689 et 1962, 957 cas d'empoisonnement dans le monde, dont 200 cas mortels.

• Propriétés physico-chimiques

Les phycotoxines paralysantes sont hydrosolubles, thermostables, actives en milieu acide (pH de 2 à 4) et oxydées en milieu alcalin. Elles forment une famille de plus de 20 molécules, chimiquement proches les unes des autres, toutes dérivées de la Saxitoxine par substitution de divers radicaux de la molécule mère. Cette molécule a été isolée pour la première fois en 1957 à partir de l'espèce *Saxidomus giganteus* d'où vient son nom. Selon la nature du radical substitué, on distingue quatre groupes de phycotoxines (Figure 1) :

- les carbamates : STX, neoSTX, GTX1, GTX2, GTX3, GTX4. Ces composés présentent un groupement carbamate.
- les sulfocarbamates : GTX5, GTX6, C1, C2, C3, C4. Le groupement carbamate de ces composés est soufré.
- les décarbamates : dcSTX, dcneoSTX, dcGTX1, dcGTX2, dcGTX3, dcGTX4. Ces composés sont dépourvus du groupement carbamate.
- les déoxydécarbamates: se compose de doSTX, doGTX2, doGTX3. Ces composés sont dépourvus d'un groupement carbamate et d'un groupement hydroxyle.

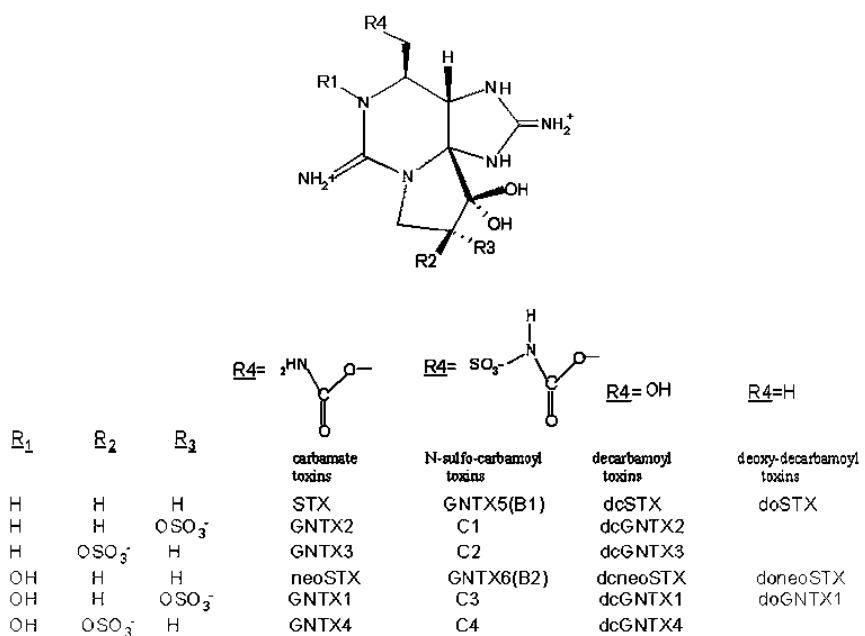


Figure 1 : structure chimique des phycotoxines paralytiques.

Source: Mons *et al.*, 1998; Quilliam *et al.*, 2001

Tableau 2 : Nature des radicaux des phycotoxines PSP

R1	R2	R3	Carbamate toxins	N-sulpho-carbamoyl toxins	Decarbomoyl toxins	Deoxy-decarbamoyl toxins
H	H	H	STX	GTX5(B1)	dcSTX	DoSTX
H	H	OSO_3^-	GTX2	C1	DcGTX2	DoGTX2
H	OSO_3^-	H	GTX3	C2	DcGTX3	DoGTX3
OH	H	H	neoSTX	GTX6(B2)	DcneoSTX	DoneoSTX
OH	H	OSO_3^-	GTX1	C3	DcGTX1	DoGTX1
OH	OSO_3^-	H	GTX4	C4	DcGTX4	

- Espèces productrices des phycotoxines PSP.**

Les principaux agents de l'IPFM sont des microalgues appartenant toutes à la classe des Dinoflagellés.

➤ *Alexandrium spp*

Position systématique : O/ Gonyaulacales

F/ Goniodomacées

G/ *Alexandrium* : ce genre est constitué par d'un ensemble d'espèces difficilement identifiables à cause de leurs caractères morphologiques très proches. Il regroupe environ 30 espèces qui habitent généralement les écosystèmes marins côtiers et produisent parfois des kystes qui se déposent dans les sédiments (Balech, 1995). Toutes les espèces d'*Alexandrium* sont considérées productrices des phycotoxines. Parmi les espèces répertoriées en Méditerranée et en Atlantique marocain et européen, on cite :

Alexandrium minutum (=*A. lusitanicum*, Zardoya *et al.*, 1995), *Alexandrium ostenfeldii*,

Alexandrium tamarensis (produit la tétridotoxine), *Alexandrium andersonii* (récemment reconnu toxique en Adriatique, Ciminiello *et al.*, 2000), *Alexandrium catenella*, *Alexandrium acatenella*; *Alexandrium fundyense*.

On souligne l'existence de clones toxiques ou non chez certaines de ces espèces qui seraient différents selon les zones géographiques.

➤ *Gymnodinium catenatum*

Position systématique : O/ Gymnodiniales

F/ Gymnodiniacees

G/ *Gymnodinium*. *Gymnodinium catenatum* a récemment été renommée *Karenia selliformis*.

Ce genre comprend plus de 200 espèces (Litaker *et al.*, 1999). On distingue deux principales espèces toxiques pour l'Homme (*G. catenatum* et *G. breve*, espèce productrice de toxines neurologiques).

G. catenatum forme des chainettes d'individus (4 à 64), et ne passe donc pas inaperçu. Ses cellules sont oviformes (à noyau central et à hypothèque plus allongée que l'épithèque).

Concernant sa reconnaissance, la plus grande difficulté repose sur sa ressemblance avec *Gyrodinium impudicum* qui est une espèce inoffensive, également coloniale, mais appartenant à un genre différent (Billard *et al.*, 2001). Le déplacement plus ou moins important du cingulum est un critère important pour différencier entre les deux genres voisins, *Gymnodinium* et *Gyrodinium*.

Au sein du genre *Gymnodinium*, les différences entre *G. catenatum*, *G. mikimotoi* et *G. breve* sont les suivantes :

- les caroténoïdes synthétisés sont différents ;
- *G. catenatum* est dépourvu du sillon linéaire apical caractérisant les espèces des complexes *G. mikimotoi* et *G. breve* ;
- *G. catenatum* ne synthétise pas de toxines polyéther comme *G. breve*, mais des composés azotés ;
- *G. catenatum* possède des kystes bruns sphériques à la surface microréticulée très caractéristiques.

Deux autres espèces non toxiques de *Gymnodinium* solitaires, *G. nollerii* et *G. microreticulatum* possèdent le même type de kystes (Bolch *et al.*, 1999). Les trois espèces, *G. catenatum*, *G. nollerii* et *G. microreticulatum*, forment donc un autre complexe au sein du genre *Gymnodinium*. Au sein de ce complexe, *G. catenatum* est la seule espèce la productrice des toxines paralysantes.

➤ ***Pyrodinium bahamense*.**

Le Genre *Pyrodinium* appartient à l'Ordre des Gonyaulacales et à la Famille des Goniodomacees dans ce genre deux variétés de *P. bahamense* ont été décrites : L'une, *P. bahamense var. bahamense* est présente dans l'Atlantique tropical, et l'autre, *P. bahamense var. compressum* dans les eaux tropicales du Pacifique. Seule la deuxième produit les toxines paralysantes de type IPFM (Streidinger, 1993). Cette espèce, très toxique, semble actuellement en pleine extension (Hallegraeff, 1993) et elle peut former des kystes.

- **Tableau clinique**

Les intoxications paralysantes sont les plus graves au sein des intoxications par les phycotoxines. Elles peuvent provoquer chez le consommateur de coquillages contaminés des intoxications bénignes, des intoxications sévères et d'autres plus graves.

- Les intoxications bénignes sont caractérisées par l'apparition de paresthésies péri-buccales et périphériques (fourmillement, picotement, engourdissement des lèvres s'étendant progressivement au visage, au cou puis aux extrémités des membres), des maux de tête, des vertiges et des nausées.
- Les intoxications sévères caractérisées par l'extension des paresthésies aux bras et aux jambes, la rigidité des membres associée à une incoordination motrice et une faiblesse générale. Le pouls devient rapide et filant.

Quand les intoxications sont fortes, l'ensemble des symptômes précédents s'aggravent rapidement avec une paralysie musculaire progressive atteignant le diaphragme et entraînant des difficultés respiratoires très importantes.

Les symptômes neurologiques peuvent persister pendant près de deux semaines, mais rarement plus longtemps. Les signes cliniques initiaux des IPFM sont de nature gastro-intestinale et apparaissent dans les 30 à 60 minutes après l'ingestion.

Il y a des différences de sensibilité chez l'Homme puisque, selon certains auteurs, des doses de 400 à 800 µg de saxitoxine par voie orale entraînent les premiers symptômes, tandis que des doses de 1 à 3 mg sont à l'origine du décès d'un Homme adulte (E.F.S.A, 2009).

A l'échelle internationale, les mollusques bivalves destinés à une consommation humaine directe ne doivent pas dépasser le seuil critique de 80 µg équivalent saxitoxine /100 g de chair.

Jusqu'à présent aucun antidote des toxines PSP n'est actuellement disponible, seul des traitements palliatifs en support spécifique du système respiratoire sont utilisés, c'est pourquoi la prévention de ce type d'intoxication est si importante (Clark et al., 1999). Une assistance respiratoire artificielle est la seule conduite à tenir accompagnée par les mesures habituelles en cas d'empoisonnement : Administration d'un émétique associé à un lavage gastrique.

- **Mode d'action**

Les toxines PSP sont des neurotoxines potentielles qui spécifiquement bloquent le passage du flux nerveux vers les nerfs et les cellules musculaires. Dans une cellule normale la variation du rapport des ions de sodium et potassium de part et d'autre de la membrane cellulaire donne naissance au potentiel d'action dans les membranes excitables. L'excitation provoque l'ouverture des canaux sodium ce qui permet aux ions de sodium d'entrer dans la cellule. Cependant les toxines PSP se collent aux récepteurs sur membrane de la cellule ce qui interrompt l'entrée des ions sodium à l'intérieur de la cellule empêchant ainsi la formation du potentiel d'action et par conséquent l'interruption du flux d'excitation ce qui conduit à la paralysie. (Shimizu, 1989).

- **Situation dans le monde et au Maroc**

L'intoxication paralytique par les fruits de mer est mondialement rapportée avec cependant une concentration des cas dans les zones tempérées (Figure 2). Généralement, ces intoxications sont associées aux ramassages clandestins des coquillages.

Au Maroc, l'IPFM ou «PSP» est une intoxication alimentaire qui se déclenche chez l'Homme suite à la consommation des espèces de bivalves ayant filtrés et accumulés des phycotoxines : moules (*Mitlylus galloprovincialis*, *Perna perna*, *Perna africana*), palourdes (*Ruditapes decussatus*), coques (*Cerastoderma edule*) ; huitres : (*Crassostrea gigas*), couteaux (*Solen marginatus*), mais d'autres invertébrés marins peuvent être vecteurs, comme les oursins et certains crabes.

Sur les côtes marocaines, 64 cas d'intoxications ont été déclarés en 1994, 23 ont été hospitalisés et 4 sont décédés suite à l'ingestion des bivalves empoisonnés par la PSP (Tagmouti, 2001). De 1998 à 2007, ce type de phycotoxines a été détecté avec des concentrations variables dans plusieurs espèces de bivalves des côtes marocaines (Taleb et al., 2001, 2003 ; Sagou et al., 2006 ; Abouabdellah et al., 2008).

Alexandrium minutum est l'espèce incriminée dans ces intoxications (Bennouna et al., 2005a, Dellal et al., 2007) (photo 1). *Gymnodinium catenatum* (photo 2) a été impliquée en permanence dans la toxicité PSP des bivalves de la Méditerranée marocaine (Taleb et al., 2001, 2003).

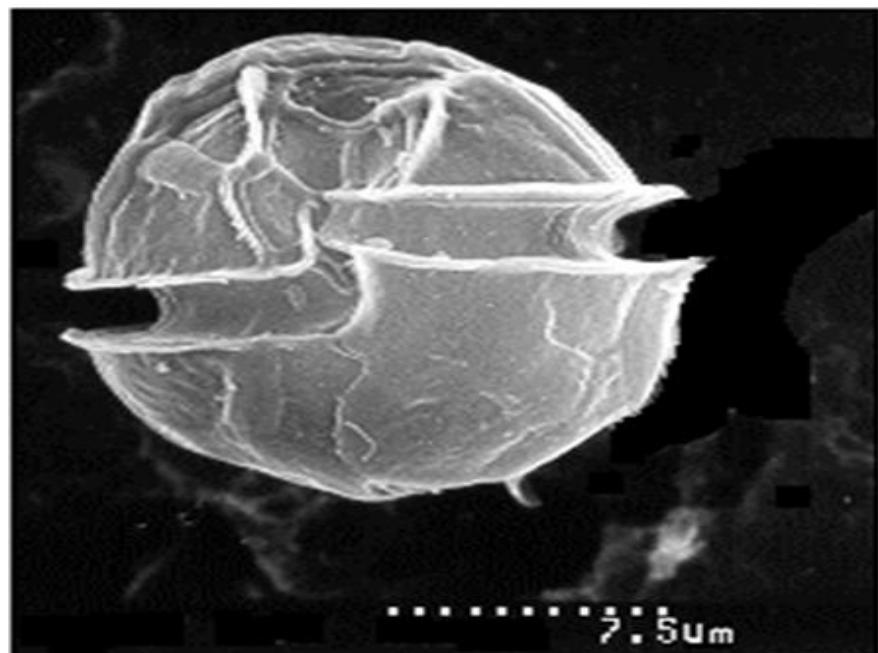


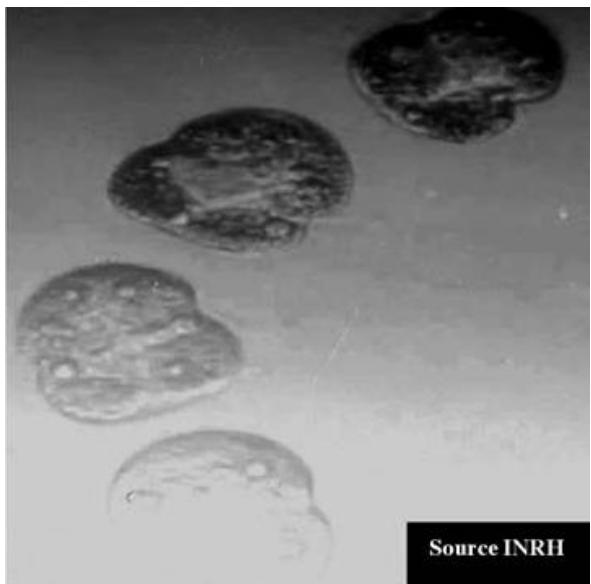
Photo 1 : *Alexandrium minutum* détectée dans les eaux de l'Atlantique marocain

Source : (Bennouna, 2008)



Figure 2 : Répartition géographique mondiale des phycotoxines paralytiques

Source : Site web du HARMFUL ALGAE



Source INRH

Photo 2 : *Gymnodinium catenatum* détectée dans les eaux de la Méditerrané

2.1.2. Les phycotoxines Amnésiques (ASP)

- Historique**

L'Acide domoïque (AD) est le chef de file des toxines amnésiques, il a été mise en évidence à la fin des années 1980, suite une intoxication collective de consommateurs de la moule de l'estuaire de l'Ile-du-Prince Edouard au Canada en 1987. Des intoxications amnésiques ont affecté 145 personnes, dont certaines de manière très grave, et ont provoqué le décès de quatre patients et d'autres ont présenté des séquelles neurologiques permanentes. Ces phycotoxines ont aussi posé de graves problèmes en Californie, où des mortalités massives d'oiseaux de mer qui ont consommé des anchois contaminés par cette toxine. De graves incidents ont aussi été signalés dans le secteur coquillier sur la côte du Pacifique Nord-Ouest des États-Unis (Bates 1989 ; Smith 1993; Peng et al. 1997).

- Propriétés physico chimiques**

L'AD a été isolé pour la première fois au Japon, à partir de l'algue rouge *Chondria armata domoi* (Takemoto et Daigo, 1958). Structurellement l'AD se présente comme un acide aminé secondaire tricarboxylique de formule C₁₅H₂₁NO₆ avec une chaîne latérale possède deux liaisons éthyléniques et un poids moléculaire de 311. Cet acide est thermostable, hydrosoluble et instable en milieu acide. Dix isomères ont été identifiés : sept iso-AD, deux domoilactones et le 5-epi AD (quilliam 2003). Seuls l'acide épdomoïque et les acides isodomooïque D, E et F sont impliqués dans les intoxications amnésiques (Figure 3).

Ces toxines touchent presque tous les bivalves mais leur taux d'accumulation et d'élimination se diffèrent d'une espèce à une autre. Le degré d'élimination varie selon la température de l'eau de mer (élimination plus rapides dans les eaux plus froides) et la concentration dans les organes de coquillages (les glandes digestives se décontaminent plus vite que les autres organes) (Van Apeldoorn et al.1999).

- **Effets cliniques**

Les toxines amnésiques se sont des toxines qui induisent des troubles du système nerveux central, (Kerr et al. 2002), ces symptômes s'accompagnent avec des malaises gastro-intestinaux. Ces signes diarrhéiques (vomissements, diarrhées et nausées) apparaissent généralement dès les premières heures après l'ingestion du produit contaminé. Plus grave encore les symptômes neurologiques qui apparaissent entre 24 et 48 heures (maux de tête persistants, désorientation, une confusion et dans les cas les plus graves, des pertes de mémoire sont dus à des dommages cérébraux. ces troubles neurologiques peuvent persister plusieurs semaines après l'intoxication et pouvant conduire à la mort (Olney, 1994).

- **Mode d'action**

L'acide domoïque cause des lésions dans le système nerveux central et plus précisément dans la région de l'hippocampe (Kerr et al. 2002). Cette toxine se fixe sur un des récepteurs synaptique de l'acide glutamique (récepteur de l'acide kaïnique) grâce à sa structure qui est proche de celle de l'acide glutamique. Cette fixation provoque une perméabilité des ions calcium et par conséquent la mort de la cellule. (Teitelbaum et al., 1990 ; Hampson et al., 1992) (Cendes et al. 1995, Sari et Kerr 2001).

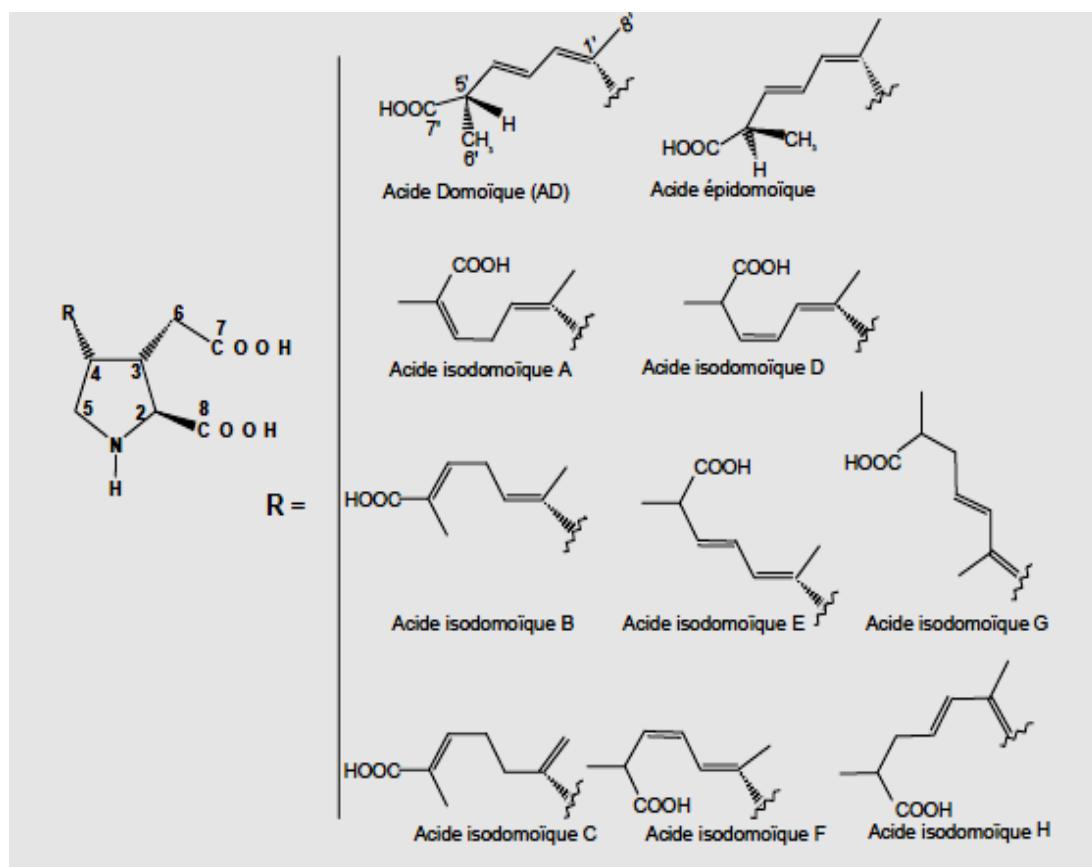


Figure 3 : Structure chimique des phycotoxines Amnésiques (Wright and Quilliam, 1995)

- **Espèces productrices de toxines Amnésiques**

Les espèces responsables de la production de l'acide domoïque est *Pseudonitzschia pungens f. multiseries* (Bates, 1989) elle appartient à la classe des diatomées ou diatomophycées et non aux dinoflagellés comme pour les autres intoxications et au genre *Nitzschia* ou *Pseudo-nitzschia*. Cette espèce est capable de se proliférer en milieu côtier en provoquant des efflorescences.

Cette toxine pourrait être produite par d'autres espèces, mais ces microorganismes phytoplanctoniques ne prolifèrent pas sur les côtes. C'est le cas par exemple d'une espèce de phytoplancton appartenant au genre *Amphora*. C'est une diatomée pennée productrice d'acide domoïque, mais qui appartient aux espèces benthiques du genre non proliférantes (Billard *et al.*, 2001).

- **Situation dans le monde et au Maroc**

Les phycotoxines amnésiques ont été décelées dans les bivalves des côtes marocaines depuis 2003. Ces toxines sont surveillées hebdomadairement dans les bivalves en provenance de la

méditerranée et de l'Atlantiques. La surveillance rigoureuse de ces toxines algales à permis de protéger le consommateur contre ce type d'intoxications.

2.2. Les phycotoxines lipophiles

Les phycotoxines lipophiles comprennent à la fois les toxines classées diarrhéiques : les dinophysitoxines (DTXs), de l'acide okadaïque (OA), des pecténotoxines (PTXs), des yessotoxines (YTX) et Les toxines à cycle imine qui sont des neurotoxines à action rapide, les plus connues sont les spirolides, les gymnodimines (GYMs) et les azasperacides (AZAs)

Le risque de la toxicité peut se mesurer par rapport à la concentration des toxines dans les coquillages et par la densité du phytoplancton毒ique. Ce type intoxication peut résulter suite à la consommation de coquillages contaminés par un ou une combinaison de l'AO, des DTXs, des PTXs, des YTXs ou des AZAs. L'effet diarrhéique de l'AO, des DTXs et des AZAs a été démontré, mais celui des PTXs et les YTXs reste à prouver.

Selon les nouvelles mesures, la limite maximale globale pour l'acide okadaïque, les dinophysitoxines et les pecténotoxines, corps entier ou toute partie consommable séparément, est de 160 microgramme en équivalent acide okadaïque par kilogramme et pour les yessotoxines de 1 milligramme en équivalent yessotoxine par kilogramme. Tous les mollusques bivalves sont concernés, ainsi que les échinodermes, les tuniciers, les gastéropodes marins et même certain crustacés. Au Maroc, au stade actuel de connaissance, sont essentiellement concernés, les moules, les huîtres ainsi que les fouisseurs comme les palourdes, les couteaux et les coques).

2.2.1 Les phycotoxines diarrhéiques (DSP)

a. L'acide okadaïque (OA) et Les dinophysitoxines (DTXs)

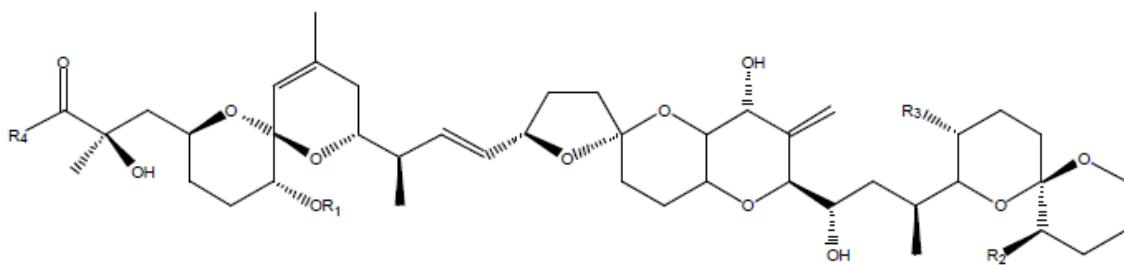
• Historiques

Les premières références liées à ces toxines avaient lieu aux Pays-Bas dans les années 60 (Kat, 1979) au nord-est du Japon en 1976, quand un cas d'empoisonnement par moule s'est produit (Yasumoto et autres, 1980), ces incidents ont été corrélées avec l'apparition du dinoflagellé *Dinophysis fortii*. La DTX1 a été la molécule responsable de ces intoxications.

• Propriétés physico chimiques

Toutes les toxines appartenant à cette classe sont liposolubles. L'AO est le chef de file de ces phycotoxines diarrhéiques (Figure 4). C'est un polyéther d'un acide gras de 38 carbones, Ce dernier a été isolé à partir d'une éponge appelée *Halichondria okadai* (dont il a garde le nom), (Tachibana et al 1981) et d'un dinoflagellé *Prorocentrum lima* (Murakami et al 1982).

Les DTXs se sont des polyéthers linéaires, et non pas des polyéthers macrocycliques, ils sont caractérisés par leurs caractères acides. Elles sont issues de la substitution des radicaux de l'acide okadaïque. La DTX-1 (dérivée méthylée de l'AO) a été la première toxine diarrhéique à être isolée à partir des coquillages (Yasumoto et al., 1978 ; 1980). La DTX-2 (un isomère de l'AO) a été mise en évidence bien plus tard, dans les années 90 en Irlande. En effet, elle a été isolée à partir des coquillages contaminés par *Dinophysis acuta*. Quand à la DTX-3, elle a été découverte en 1985 par YASUMOTO et ses collaborateurs. Ce composé est un groupe de dérivés toxiques appelés les acyles-esters issus d'une acylation au niveau de l'hydroxyle du carbone 7 de l'AO, de la DTX-1 et de la DTX-2 (7-O-AO/DTXs). L'AO, la DTX-1, la DTX-2 et la DTX-3 ont été isolés dans les coquillages, par contre les DTX-4 et les DTX-5, qui ne semblent pas être directement toxiques, ont seulement été retrouvées dans le phytoplancton (Amzil et al., 2001a).



Toxin	R1	R2	R3	R4
OA	CH ₃	H	H	OH
DTX-1	CH ₃	CH ₃	H	OH
DTX-2	H	CH ₃	H	OH
DTX-3	Acyl	H or CH ₃	H or CH ₃	OH
DTX-4	H	H	CH ₃	H

Figure 4 : structures chimiques de l'acide okadaïque et des dinophysitoxines

- Espèces productrices des toxines diarrhéiques

D'après Billard et al. (2001), les principales espèces toxiques appartiennent aux genres *Dinophysis*, *Prorocentrum*.

➤ **Dinophysis sp :**

Les espèces qui sont liées aux intoxications diarrhéiques par les fruits de mer sont *Dinophysis acuminata* (= *D. lachmanii*, *D. skagii*); *D. acuta* (= *D. dens*); *D. caudata* (= *D. diegensis*); *D. fortii*; *D. norvegica*; *D. tripos*; et *D. sacculus* (= *D. pavillardii*), ces espèces appartiennent toutes à la classe des Dinoflagelles (= Dinophycées), à l'ordre des Dinophysiales, à la famille des Dinophysacées et au genre *Dinophysis* (photo 3).

Le risque potentiel pour le consommateur apparaît pour une faible densité de Dinophysis dans un litre d'eau de mer (Viviani et al. (1995). Cependant l'activité toxique varie selon l'état physiologique des cellules et les conditions du milieu (Pavela-Vrancic et al. 2002). De plus de la démarcation au Maroc du réseau de surveillance de la salubrité du littoral, Dinophysis a été identifiée tout le long de l'année dans l'eau de mer des côtes marocaines (Bennouna et al., 2005b ; Abouandellah et al., 2011)

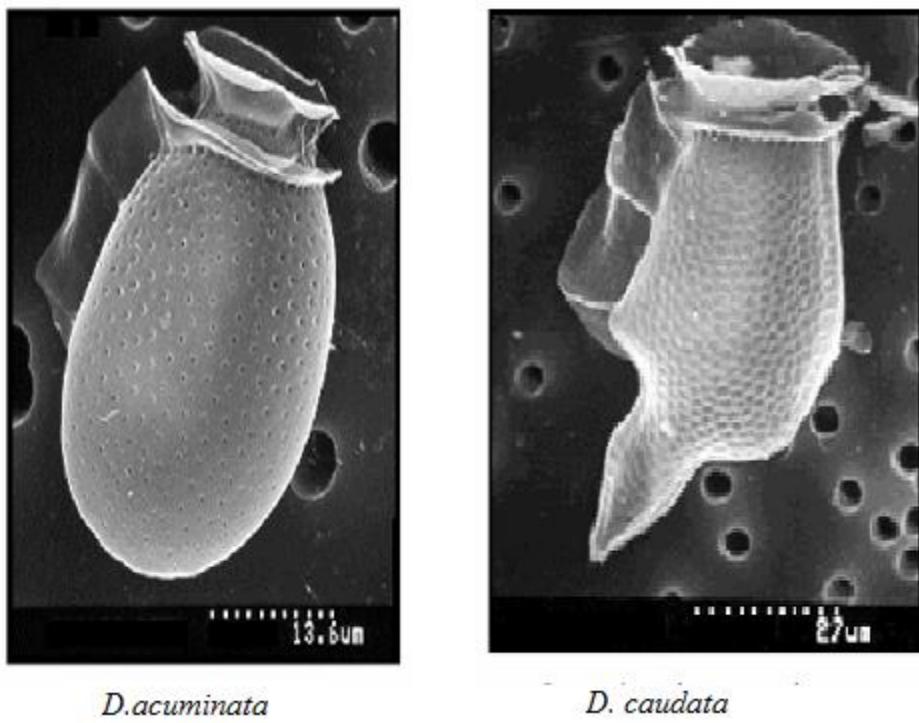


Photo 3 : *Dinophysis acuminata* et *D. caudata* identifiées dans les côtes nord de l'Atlantique Marocain (Benoouna, 2008)

➤ **Prorocentrum sp :**

Parmi les espèces toxiques de *Prorocentrum* (Ten-Hage et al., 2000), on peut distinguer des espèces majoritairement benthiques et productrices de toxines diarrhéiques : *P.arenarium*, *P. belizeanum*, *P. faustiae*, *P. hoffmannianum*, *P. lima* et *P. maculosum*. Les espèces *P.lima*, *P. hoffmannianum* et *P. maculosum* sont à la fois producteurs de toxines diarrhéiques et de neurotoxines à action rapide (prorocentrolides). D'autres espèces de *Prorocentrum* planctoniques, telles que *P. mexicanum* et *P. minimum* ne synthétisent ni acide okadaïque ni dinophysistoxines mais produisent des composés hémolytiques ou cytotoxiques (Billard et al., 2001) (photo 4).



Photo 4 : *Prorocentrum micans* et *Prorocentrum scutellum* (espèces rencontrées dans les eaux d'Agadir) (Bennouna, 2008)

- **Tableau clinique**

La gravité de ces intoxications est proportionnelle à la dose ingérée, une dose 10 à 15 unité souris est suffisante pour déclencher une intoxication moyenne (Underdal et al 1985). Des signes cliniques liés à ces intoxications telles a été décrits dans la littérature nous indique qu'ils apparaissent en moyenne quatre heures après l'ingestion des coquillages contaminés (Daranas et al. 2001). Ces symptômes varient d'une gastro-entérite bénigne à des cas de diarrhée forte avec des vomissements et des déshydratations sévères, des frissons et des fièvres (klopper et al., 2003). Cependant, l'acide okadaïque et les dinophysitoxines provoquent, en plus du syndrome diarrhéique, des effets cancérigènes qui ont été étudiés par Fugiki en 1988 et démontrés expérimentalement par Suganuma en 1988. En général, Les symptômes disparaissent en trois jours sans nécessiter d'intervention médicale particulière et la guérison est totale, sans séquelles et, jusqu'à présent, aucun décès n'a été signalé.

- **Mécanisme d'action**

Les phycotoxines diarrhéiques inhibent l'enzyme responsable de la déphosphorylation des protéines c'est à dire du départ du groupement phosphate d'une manière analogue à la toxine

cholérique, ce phénomène influence la fonction de ces protéines. Cette inhibition perturbe le flux des ions sodium dans les cellules intestinales, ce qui augmente le flux d'eau et entraîner la diarrhée (Takai et al 1987).

b. Les pecténotoxines (PTXs)

- **Historique**

Les pecténotoxines ont été découvertes dans des pectinidés au Japon dans les années 80 lors de la prolifération de *Dinophysis*. Des intoxications diarrhéiques ont été enregistrées en 1997 en Australie chez des personnes ayant consommé des coquillages (*Plebidonax sp.*), les investigations menées ont révélé la présence de la PTX-2 dans le phytoplancton et dans les mollusques bivalves de cette région (Eaglesham *et al.*, 2000).

- **Propriétés physico-chimiques**

Comme les DTXs, les PTXs sont des polyéthers liposolubles et chimiquement sont neutres et ont un squelette de base commun. Les pecténotoxines sont des polyéthers cycliques, contrairement aux toxines du type acide okadaïque et ses dérivés (dinophysistoxines) qui sont des polyéthers linéaires (Figure 5) (Yasumoto *et al.*, 1989). Parmi toutes les PTXs, seule la PTX2 a été retrouvée dans les microalgues dans l'espèce *Dinophysis fortii* en plus de la DTX1. Ces toxines ont été identifiées au Japon et en Italie (Draisci *et al.*, 1996).

D'après Suzuki *et al.*, 1998, les autres PTXs sont métabolisées par les coquillages. Elles proviennent d'oxydations successives et rapides du groupement méthylé situé en C43.

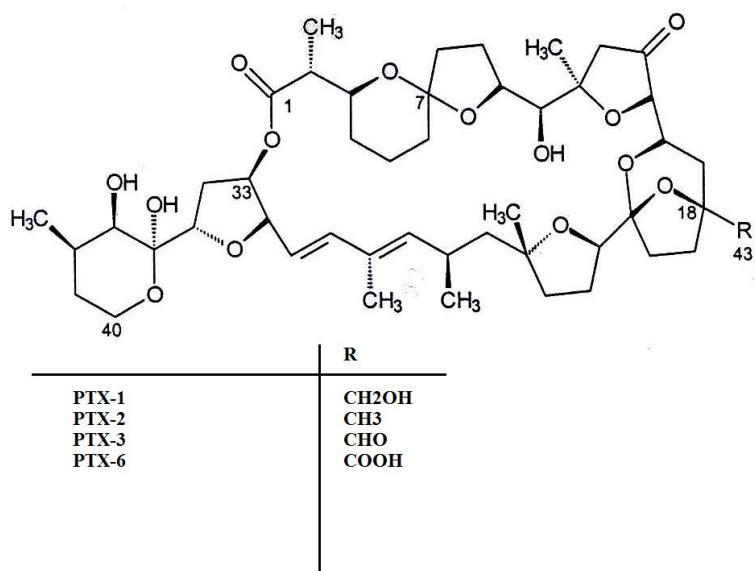


Figure 5 : structures chimiques des pecténotoxines.

- **Espèces productrices**

L'espèce responsable de la production de ces toxines est *D. fortii*. Comme tout les Dinophysis cette espèce appartient à la classe des Dinophycées, à l'ordre des Dinophysiales, à la famille des Dinophysacées.

- **Mécanisme d'action et effet clinique**

Les PTXs sont classées dans le groupe des toxines diarrhéiques. Comme les DTXs, AO, elles sont des inhibiteurs des protéines phosphatases. Les intoxications diarrhéiques liées à ces phycotoxines se manifestent par des symptômes gastro-intestinaux (nausées, vomissements, diarrhées). La gravité de l'empoisonnement est en relation avec l'âge, le sexe et la quantité de toxines présente dans la denrée consommée.

c. les yessotoxines (YTXs)

- **Historique**

Les yessotoxines ont été isolées au Japon en 1986, suite à une simple extraction acétonique de l'hépatopancréas du mollusque *Palinopecten yessoensis*. Ces toxines ont été retrouvées dans les bivalves en Nouvelle-Zélande (Satake et al. 1997), en Italie, (Draisci et al. 1999), au Japon, en Norvège, au Chili et en mer Adriatique (Amzil et al., 2001a).

- **Propriétés physico-chimiques**

Les YTXs sont des polyéthers lipophiles de 55 carbones. En effet, contrairement aux DTXs qui sont des polyéthers linéaires et qui ont une structure architecturale en chaîne, ils sont constitués d'hétérocycles oxygénés accolés souvent substitués par des groupements méthyle. Ils possèdent une structure rigide en échelle. Les toxines sont formées de 10 ou 11 cycles contigus (Figure 6).

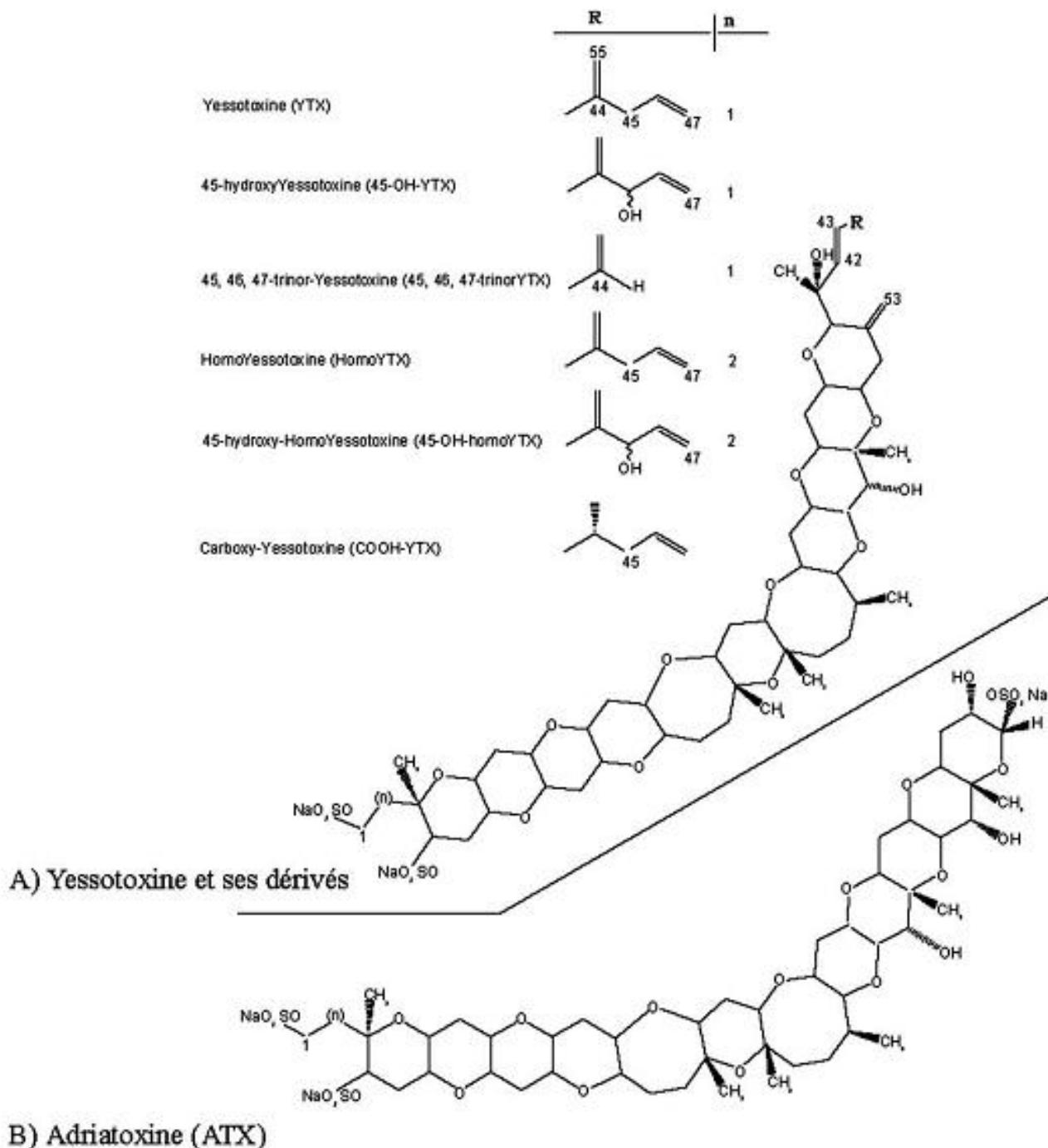


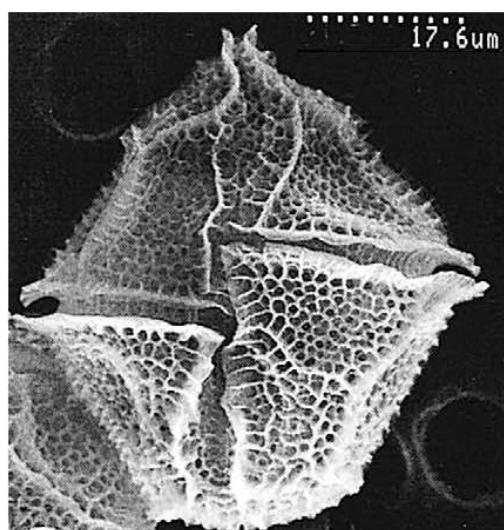
Figure 6 : Structures chimiques des yessotoxines (Amzil et al., 2007)

- **Espèces productrices**

Les principales espèces phytoplanctoniques responsables de la synthèse des YTXs sont *Protoceratium reticulatum* (*Gonyaulax grindleyi*) et *Lingulodinium polyedrum* (*Gonyaulax*

polyedra). Cette dernière a été l'agent causal des eaux colorées qui ont été touchées les côtes de l'Atlantique Marocain en été 1999 (Bennouna et al., 2002).

Ces espèces toxiques possèdent une thèque robuste avec un sulcus s'élargissant vers l'extrémité de l'hypothèque. On peut les différencier grâce à leurs tabulations respectives. Elles appartiennent toutes les deux à la classe des Dinophycées et à l'ordre des Gonyaulacales à cause de la présence d'une thèque apparente caractérisée par son type de tabulation.



**Photo 5 : *Lingulodinium polyedra* détectée dans les côtes de l'atlantique marocain.
(Bennouna, 2008)**

- **Tableau clinique**

Les YTXs sont peu toxiques et ne provoquent aucun effet diarrhéique ni de lésion intestinale chez l'animal ; elles entraînent en revanche des dommages cardiaques et hépatiques (hépatotoxines) (Van Egmond et al., 1993).

- **Mécanisme d'action**

Les yessotoxines sont classées dans le groupe des toxines diarrhéiques. Pourtant, elles ne provoquent pas de diarrhées et ne sont pas des inhibiteurs des protéines phosphatases comme les DTXs, AO et les PTXs. Le mécanisme d'action de ces toxines n'est pas connu. En dépit de leur ressemblance structurale avec d'autres phycotoxines (ciguatoxines et brevetoxine), les YTXs n'induisent pas d'activation des canaux sodium membranaires. Par contre, Alfonso *et al.* (2000) décrivent une augmentation du calcium intracellulaire provenant à la fois des réservoirs intracytoplasmiques et du milieu extracellulaire.

- **Situation au Maroc des phycotoxines diarrhéiques**

Au Maroc, les derniers travaux réalisés ont montré la détection de ces toxines au nord et au sud du pays (Taleb et al., 2006 ; Elgarch et al., 2008; Abouabdellah et al., 2011), les principales toxines identifiées étaient la DTX-2, l'AO, la DTX-1 ainsi que les formes estérifiées de l'AO et du DTX1.

En 1998, Les analyses biologiques sur test souris ont révélé la présence des toxines diarrhéiques dans les bivalves cette région. L'analyse d'eau de mer de cette région a montré l'efflorescence de l'espèce *Lingulodinium polyedrum* dans la région d'El-Jadida en causant une coloration rouge brique d'eau de mer (marrée rouge). Cette espèce a été accompagnée avec les espèces *Dinophysis acuta* et *Dinophysis accuminata* (Bennouna et al, 2002).

Les cas d'empoisonnement liés à ces toxines sont très difficiles à enregistrer ceci est du à la nature des symptômes causé par la DSP qui sont principalement digestifs et peuvent donc se confondre avec des affections d'origine bactérienne ou virale.

2.2.2 Les toxines à cycle imine

a. Les azasperacides (AZAs)

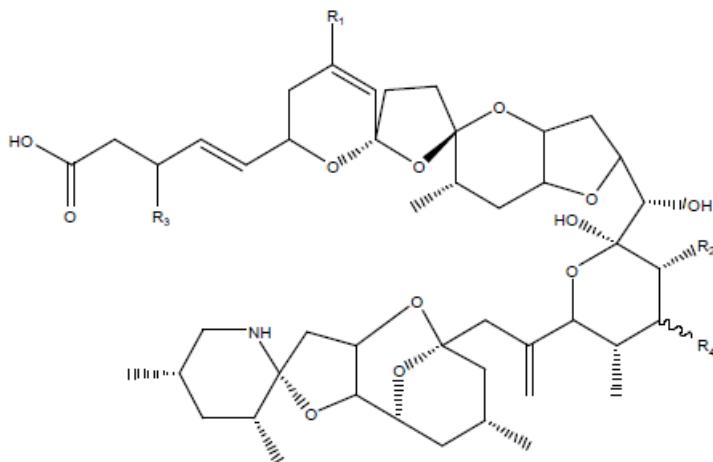
- **Historique**

Les azasperacides ont été découvertes en 1995 suite à des intoxications de plusieurs consommateurs irlandais de moules. Depuis, d'autres cas ont été signalés en Irlande (1997), en Italie (1998), et en France (1998 et 2000) (Marcaillou-Le Baut et al., 2001). La présence de la DTX2 et l'AO ont été retrouvées à l'état de trace, des travaux plus poussés de purification ont conduit à l'isolement des ces toxines.

- **Propriétés physico-chimiques**

Les azaspiracides 1, 2 et 3 sont des molécules à squelette polycyclique oxygénée à 40 carbones diversement méthylés, de type polyéther, à chaîne carbonée terminale porteuse d'une fonction acide carboxylique et d'une fonction imine cyclique. (Ofuji et al., 1999) (Figure 7).

A la différence des autres toxines diarrhéiques, la contamination des huîtres se fait à des niveaux équivalents à ceux des moules et la détoxication des coquillages est très longue (8 mois environ). De plus, l'azaspiracide est présent de façon uniforme dans l'ensemble du corps des coquillages et non pas concentré dans l'hépatopancréas (Marcaillou-Le Baut et al., 2001).



Toxin	R1	R2	R3	R4
AZA-1	H	CH ₃	H	H
AZA-2	CH ₃	CH ₃	H	H
AZA-3	H	H	H	H
AZA-4	H	H	H	OH
AZA-5	H	H	OH	H

Figure 7 : Structures chimiques des azaspiracides. Source : Satake et al. (1998b)

- **Espèce productrice**

L'espèce *Protoperidinium crassipes* est soupçonnée dans la production des AZAs, mais cette hypothèse n'a pas été démontrée à ce jour. Cette espèce appartiendrait à la classe des dinoflagellés et au genre de *protoperidinium*. Cembella et al., 2000.

- **Mécanisme d'action et effet clinique**

Malgré le fait que les AZAs entraînent des symptômes de type diarrhéique chez l'Homme, ils n'ont pas été classés dans la catégorie des toxines diarrhéiques, car ils ne possèdent pas le même mécanisme d'action.

Outre l'intestin, les AZAs affectent d'autres organes tel que le système immunitaire, ce qui constituerait un risque plus important pour l'Homme (Ito et al., 2000).

- **Situation au Maroc des azasperacides**

L'AZA-2 a été identifié pour la première fois au Maroc dans les bivalves de l'atlantique nord marocain par Taleb et al en 2006. Par contre les analyses chimiques par HPLC dans les bivalves de l'Atlantique Sud Marocain ont révélé l'absence totale de ces toxines durant la période de 2004 jusqu'à 2007. Comme toutes les phycotoxines lipophiles, ces toxines sont surveillées d'une

manière hebdomadaire dans les mollusques bivalves de tout le littoral marocain par RSSL de l'INRH.

b. Les toxines à cycle imine autres que les AZAs

Ces toxines algales sont des neurotoxines à action rapides. Ces toxines ont été isolées à partir de coquillages pour la première fois dans les années quatre-vingts. Ces neurotoxines provoquent une toxicité aigüe sur souris avec des symptômes de type neurologique, les plus connues sont les spirolides et les gymnodimines.

i- Les spirolides

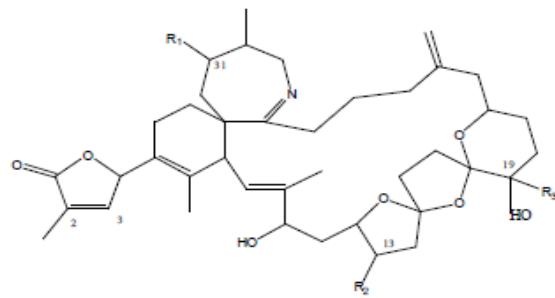
- Historique**

Les spirolides ont été mises en évidence en 1991 dans les coquillages (moules, coquilles Saint-Jacques) en Nouvelle-Ecosse (Canada) lors des contrôles de routine pour le dépistage des toxines diarrhéiques (Hu *et al.*, 1995). Elles ont été mises en évidence en France lors de l'épisode de toxicité qui a eu lieu en avril mai 2005 en baie d'Arcachon et qui a entraîné la fermeture de cette zone pendant plusieurs semaines.

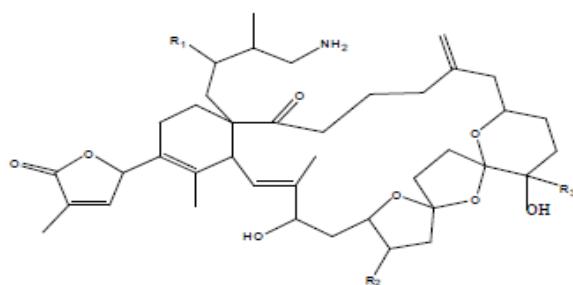
- Propriétés physico-chimiques**

Les spirolides (A à F) constituent, comme les PTXs, une famille de polyéthers macrocycliques ou macrolides. Les structures des formes actives A, B, C, D et les structures inactives E, F n'ont pas été identifiées qu'en 1995. La structure de base des formes actives est C₄₂H₆₃NO₇ (PM : 693,5), chaque forme diffère des autres par la substitution d'un hydrogène par un méthyle (Hu *et al.*, 1996) (Figure 8).

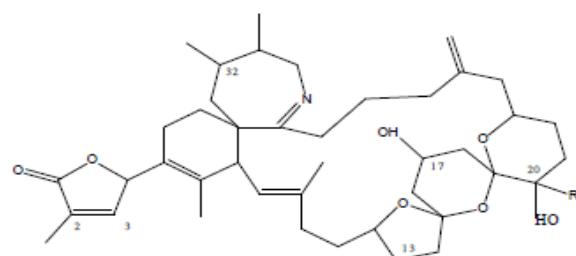
La dégradation des formes actives des spirolides lors de leur métabolisme dans les coquillages pourraient donner lieu à des formes inactives de ces toxines. Donc il semblerait que cette activité des formes A, B, C et D est due à la présence du cycle imine puisqu'il est absent dans les formes inactives.



R1	R2	R3	$\Delta_{2,3}$	[M+H] ⁺	Spirolide
H	CH ₃	CH ₃	✓	692.5	A
H	CH ₃	CH ₃	-	694.5	B
CH ₃	CH ₃	CH ₃	✓	706.5	C
CH ₃	CH ₃	CH ₃	-	708.5	D
CH ₃	H	CH ₃	✓	692.5	13-desMe-C
CH ₃	H	H	✓	678.5	13,19-didesMe-C



R1	R2	R3	$\Delta_{2,3}$	[M+H] ⁺	Spirolide
H	CH ₃	CH ₃	✓	710.5	E
H	CH ₃	CH ₃	-	712.5	F



R	MW	Spirolide
H	692.5	G
CH ₃	706.5	20-Me-G

$\Delta_{2,3}$: Double liaison entre les carbones 2 et 3

Figure 8 : Structures chimiques des spiroles. Source : (Hu et al, 1995)

- **Espèces productrices**

Le dinoflagellé *Alexandrium ostenfeldii*, a été lié à ces toxines en 1989. Cette espèce est une Gymnodiniale qui produit également des toxines paralysantes. D'après, la production de spirolides a été mis en évidence par Cembella *et al.*, 2000 après culture des souches Canadiennes et autres du Danemark.

- **Mécanisme d'action et Effet clinique**

Les spirolides provoquent des symptômes neurologiques chez la souris, en agissant sur le système nerveux central (Hu *et al.*, 1996). Jusqu'à ce jour les spirolides n'ont été incriminés dans aucune toxicité pour l'homme.

Leur mode d'action au niveau cellulaire reste jusqu'à ce jour là non élucidé. Aucun effet n'a été détecté que ce soit sur les récepteur membranaire (comme la PSP) ou sur les protéines phosphatase 1 et 2 (comme la DSP). La seule activité qui a été remarqué est une faible activation des canaux calcium dans les membranes cellulaire.

ii- **Les gymnodimines**

- **Historique**

Ces toxines ont la propriété de s'accumuler dans des coquillages, sans provoquer jusqu'à présent d'intoxication alimentaire.

En 1993, dans le cadre de la surveillance de la salubrité du milieu littoral en Nouvelle-Zélande, les huîtres de ce pays ont présenté une forte toxicité sur souris avec des symptômes neurologiques, sans qu'aucune intoxication humaine ne soit signalée. Ces toxines ont été isolées a partir ces bivalves contaminées (Seki *et al.*, 1995).

La gymnodimine a été aussi identifiée en Tunisie et au Canada (Munday *et al.*, 2004).

- **Propriétés physico-chimiques**

La GYM est un polyéther pentacyclique complexe à cycle imine avec 32 carbones (C₃₂H₄₅NO₄) et un poids moléculaire de 507 (Seki *et al.*, 1995). Ces neurtoxines se sont des toxines à action rapide (Figure 9).

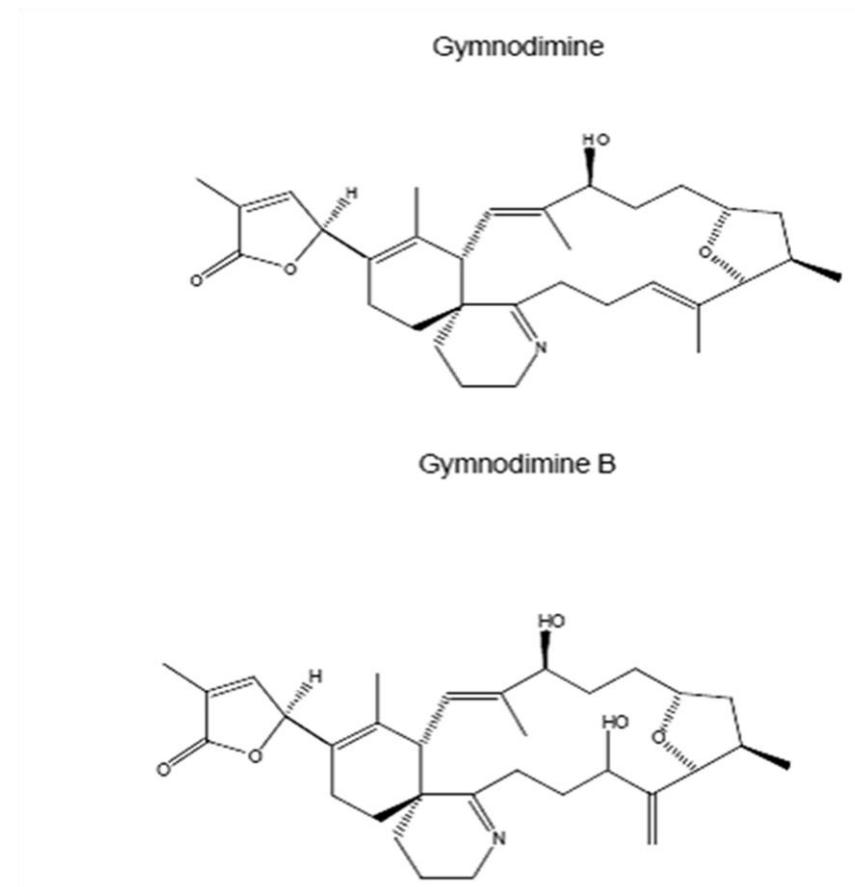


Figure 9 : Structure chimiques des gymnodimines. Source : (Miles et al., 2003).

- **Espèce productrice**

Plusieurs preuves ont rendu responsable *Gymnodinium cf. mikimotoi* l'espèce productrice de ces toxines. En plus de la coïncidence de la toxicité du coquillage avec l'efflorescence de cette espèce, cette toxine a été isolée à partir de la culture ce phytoplancton. Actuellement, *Gymnodinium mikimotoi* est appelée *Karenia selliformis* (Krys et Fremy, 2002).

- **Mécanisme d'action et effet clinique**

Suite à la présence de cette toxine dans l'ensemble des organes des bivalves et à sa très lente détoxification, la gymnodimine est considérée comme dangereuse pour la santé humaines.

Les gymnodimines causent des troubles neurologiques chez les souris (queue incurvée, hyperactivité, paralysie et de tresse respiratoire) conduisant à la mort de l'animal en 3 à 15 minutes (Puiseux-Dao et al., 2001). Jusqu'à présent la gymnodimine n'induit aucun symptôme chez l'homme, en plus elle n'est ni hémolytique ni cytotoxique.

Les études menées sur cette toxine n'ont pas permis de préciser son mode d'action au niveau cellulaire et plus exactement sur l'activation de canaux ioniques.

III. Les méthodes de détection des phycotoxines

Plusieurs méthodes ont été mises au point pour la détection des phycotoxines marines. Les plus adoptées sont les méthodes biologiques, chimiques et immunologiques.

a. Test biologique de toxicité

Avant que les toxines n'aient pu être isolées, les tests biologiques ont été les seuls utilisés pour la détection des toxines dans les produits de mer. Ce type de test a été mis en évidence par Sommer en 1937. Actuellement, ce test est utilisé par plusieurs pays, dont le Maroc, pour la surveillance des phycotoxines paralytiques (AOAC, 1995 et 2000). Ce test fut adapté aussi pour la détection des toxines diarrhéiques par Yasumoto et son équipe en 1978 et modifié en 1984.

Bien que le test biologique soit la méthode officielle, il présente quelques inconvénients:

- Sacrifice d'un stock important d'animaux et la lenteur du test (1 heure pour test PSP et 24 heures pour le test DSP).
- Test peu précis (problème des faux positifs).
- Test qualitatif (pour certaines toxines).
- La limite de détection varie en fonction de la souche de souris utilisées, approximativement entre 32 et 58 µg STXéqui. /100g de chair. La précision du test est de ±20% (Fernandez et al. 2002).

Mais malgré ces inconvénients, le test biologique sur souris reste suffisant pour la surveillance de certaine phycotoxines marines et plus précisément pour les PSP.

b. Les méthodes chimiques Analyse par CLHP (Chromatographie liquide à haute performance)

Au fur et à mesure que l'identification et la purification de ces toxines ont progressé, les analyses chimiques se sont perfectionnées et ont permis une caractérisation quantitative des toxines ainsi qu'une calibration des tests biologiques. La détection est faite grâce aux propriétés de solubilité

des toxines, ainsi que sur leur comportement chromatographique. Dans la détection chimique, les toxines se couplent à un marqueur ou s'oxydent, afin de les rendre fluorescentes.

- **Le dosage des toxines paralysantes**

La méthode consiste à extraire les toxines dans un milieu acide, à les séparer par chromatographie liquide à phase inversée, puis à faire une dérivation par oxydation post colonne en milieu alcalin et une quantification par fluorimétrie. Cette méthode est applicable sur tous les coquillages bivalves.

- **Le dosage des toxines diarrhéiques**

Le principe de l'analyse des toxines diarrhéiques (Acide okadaïque ou la DTX1). S'inspire de la méthode du dosage des acides gras par fluorescence (CLHP). C'est un test précis ($\pm 10\%$). Il est plus sensible que la méthode biologique, et permet d'obtenir le profil toxinique des phycotoxines étudiées. sa difficulté réside dans la disponibilité limitée du standard à l'état pur et aussi dans la complexité et la diversité des phycotoxines.

- **Les méthodes immunologiques**

Ces méthodes sont très prometteuses, car permettent d'analyser un grand nombre d'échantillons dans un laps de temps très court (20 minutes). Ces analyses se basent sur l'utilisation des anticorps spécifiques à ces phycotoxines (Saxitoxine et Acide Okadaïque).

Le test utilisé est l'E.L.I.S.A (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Le développement de ces méthodes est la perspective actuelle pour déboucher sur un test rapide et peu onéreux.

Chapitre 2 : Sites d'échantillonnage

1. Introduction

Dans le but de répondre aux objectifs de cette étude qui vise la surveillance des gisements coquilliers du littoral entre Imessouane et Dakhla, un échantillonnage des bivalves et du phytoplancton a été réalisé régulièrement entre 2003 et 2007 dans 11 sites.

Ces gisements coquilliers naturels et aquacoles sont répartis dans l'ensemble des trois régions de l'Atlantique sud marocain : Agadir, Laâyoune et Dakhla ; avec une fréquence bimensuelle dans la majorité des cas et hebdomadaire lors de la détection des indices de toxicité (apparition des toxines et/ ou des espèces toxiques).

Durant l'année 2007, les prélèvements sont en totalité hebdomadaires dans l'ensemble des stations. Les points de prélèvement ont été sélectionnés selon l'importance socio-économique du gisement coquiller, l'accessibilité du site et selon les espèces de bivalves commercialisées (Figure1).

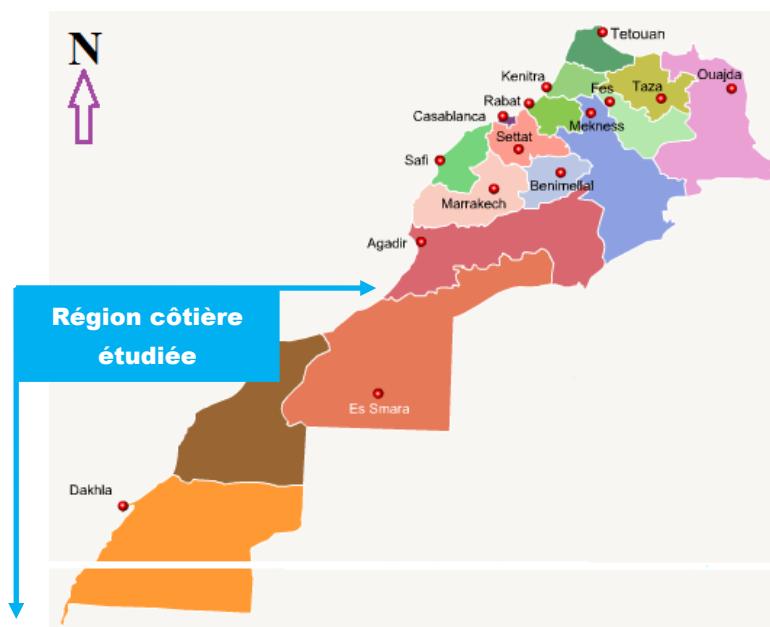


Figure 1 : Localisation géographique de la zone côtière étudiée (Agadir-Dakhla)

2. Matériel échantillonné

La collecte des bivalves a été effectuée en totalité à marées basses. Les individus sont ramassés à la main pour la moule *Perna perna* (photo 1), le couteau *Solen marginatus* (photo 2) et l'huître *Crassostrea gigas* (photo 3). La coque *Cerastoderma edule* (photo 4) a été prélevée en utilisant un râteau qui racle le fond et facilite la collecte des individus.

Les échantillons des eaux de surface de la mer, destinés à l'identification et au comptage des espèces phytoplanctoniques, ont été réalisés à marées hautes, à l'aide un flacon d'un litre en polyéthylène. Le matériel à analyser a été transporté au laboratoire dans des conditions réfrigérées dans des glacières à une température voisine de +4°C.



Photo 1 : La moule africaine *Perna perna* prélevée dans les côtes de l'Atlantique sud marocain



Photo 2 : Le couteau *Solen marginatus* prélevé au niveau de la baie de Dakhla.



Photo 3 : L'huître creuse *Crassostrea gigas* prélevée au niveau de la baie de Dakhla.



Photo 4 : La coque *Cerastoderma edule* collectée dans la baie de Dakhla.

3. Sites d'échantillonnage

- **Agadir**

Dans la région administrative d'Agadir, deux sites ont été retenus pour cette étude : Cap Ghir au Nord et la côte de Tifnit au Sud. Il s'agit de deux sites conchyliologiques riches en moule africaine *Perna perna* (Figure 2).

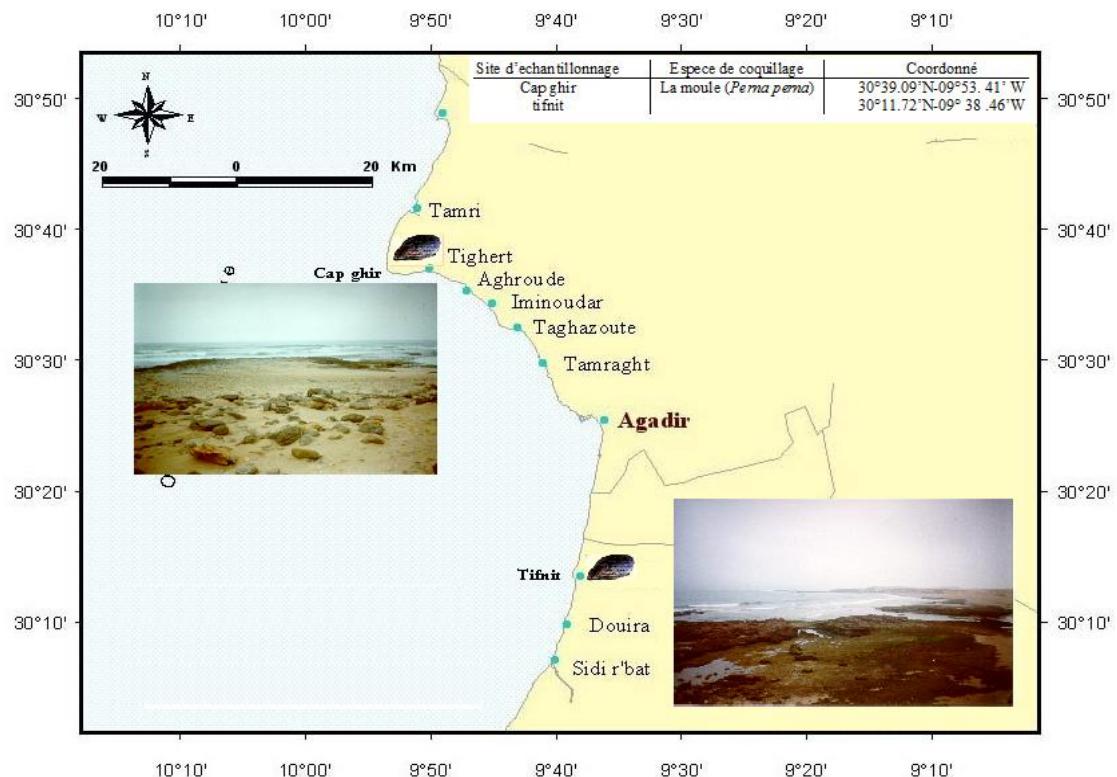


Figure 2 : Positionnement des sites étudiés au niveau de la région d'Agadir

Source: Laboratoire de Biotoxines INRH- Agadir et laboratoire de Cartographie INRH- Casablanca

- **Laâyoune**

Dans la région de lâayoune, l'étude a été faite dans un seul site correspond à la zone rocheuse d'Akhfenir au nord est de Tarfaya. L'espèce de bivalve analysée dans cette zone correspond à la moule africaine *Perna perna*.

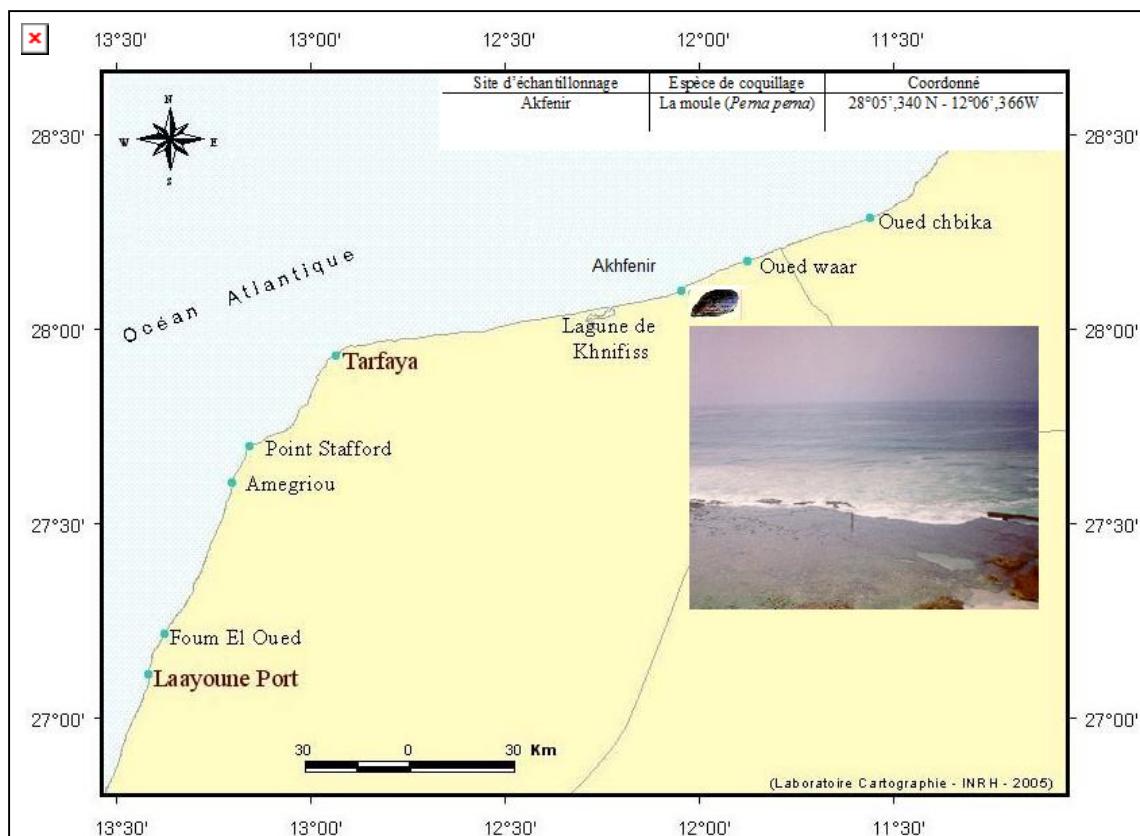


Figure 3 : Positionnement du site étudié au niveau de la région de Laâyoune

Source: Laboratoire de Biotoxines INRH- Agadir et laboratoire de Cartographie INRH- Casablanca

- **Dakhla**

A Dakhla, le suivi a concerné deux stations : le littoral et la baie (Figure 4). Une seule espèce (la moule) est étudiée au niveau du littoral de Dakhla, car ce bivalve se trouve en gisements naturels très importants à Dunford, à Oumlabouir et à N'tirift (Tableau 1). Par contre au niveau de la baie, quatre espèces de bivalves ont été ciblées, l'huître (espèce d'élevage), la coque, le couteau à Boutalha et à Dunablanca et la moule à Puertitto et à Hojalamira. Au pk 25, le couteau qui se trouve en gisement naturel important, est la seule espèce prélevée (Table 2).

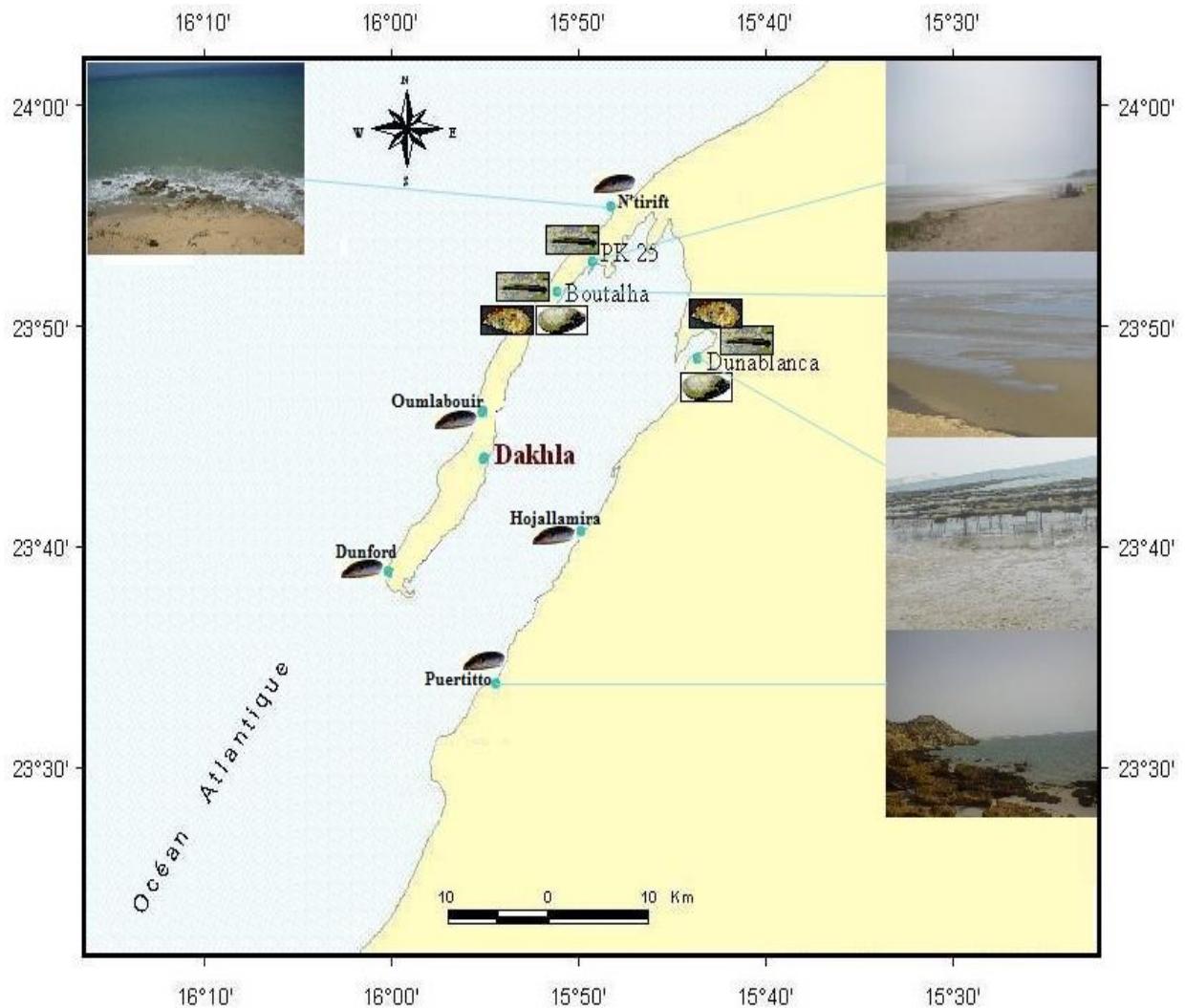


Fig.4 : Positionnement des sites étudiés au niveau de la région Dakhla

Source: Laboratoire de Biotoxines INRH- Agadir et laboratoire de Cartographie INRH- Casablanca

Table 1 : Les points de prélèvement au niveau du littoral et de la mer ouverte de Dakhla.

Site d'échantillonnage	Espèce de coquillage	Coordonnées
N'tirift	Moule (<i>Perna perna</i>)	24°04',512N – 15°34',410W
Oumlabouir	Moule (<i>Perna perna</i>)	23°46',092N – 15°55',590W
Dunford	Moule (<i>Perna perna</i>)	23°38',520N – 16°00',450W

Table 2 : Les points de prélèvement de la baie de Dakhla

Site d'échantillonnage	Espèce de coquillage	Coordonnées
PK25	Couteau (<i>Solen marginatus</i>)	23°53',598 N - 15°46',452 W
Boutalha	Couteau (<i>Solen marginatus</i>)	23°51', 431N – 15° 50',671W
	Coque (<i>Cerastoderma edule</i>)	23°51', 314N – 15° 50',290W
	Huitre (<i>Crassostrea gigas</i>)	23°51', 123N – 15° 50',013W
Dunablanca	Couteau (<i>Solen marginatus</i>)	23°47', 645N – 15° 44',486W
	Coque (<i>Cerastoderma edule</i>)	23°47', 677N – 15° 44',489W
	Huitre (<i>Crassostrea gigas</i>)	23°47', 605N – 15° 44',492W
Hojallamira	Moule (<i>Perna perna</i>)	23°41',526 N - 15°48',912 W
Puertitto	Moule (<i>Perna perna</i>)	23°34',464 N - 15°54',078 W

4. Phycotoxines étudiées

Deux types de phycotoxines ont été étudiées sur tous les sites :

- Les phycotoxines paralytiques (PSP);
- Les phycotoxines lipophiles (LSTs).

Chapitre 3:

« Etude des phycotoxines paralytiques dans les coquillages bivalves de l'Atlantique sud Marocain »

1. Introduction

Durant cette l'étude, les phycotoxines paralytiques ainsi que le phytoplancton producteur de ces toxines ont été suivis au niveau de trois régions de l'Atlantique sud Marocain à Agadir, à Laâyoune et à Dakhla. La fréquence de ce suivi a été bimensuel à hebdomadaire depuis Mai 2003 jusqu'à décembre 2007. La toxicité totale ainsi que celle de chaque organe ont été décelées par méthode biologique sur souris. La composition en toxines PSP dans la chair totale et dans chaque organe des quatre espèces de mollusque bivalves a été établie par méthode chimique CLHP/FD. L'identification des cellules toxinogènes du phytoplancton a été menée par microscopie.

Parmi les objectifs fixés dans cette étude :

Suivi de l'évolution spatio-temporelle de la toxicité PSP dans les coquillages bivalves des trois régions;

Comparaison de la toxicité totale des quatre bivalves étudiés ainsi que celle de chaque organe;

Détermination du profil des toxines PSP de la chair totale et des organes des bivalves de l'atlantique Sud marocain ;

Identification de l'espèce phytoplanctonique responsable de cette toxicité au niveau de trois régions étudiées ;

Comparaison entre les résultats de la méthode biologique et celles de la méthode chimiques.

2. Matériel et méthodes

La détection des phycotoxines paralytiques a été conduite par méthode biologique sur souris. La toxicité totale a été analysée dans la chair totale des coquillages, par contre la toxicité des organes a été suivie dans les dissections des différents organes des bivalves : les glandes digestives (hépatopancréas), le siphon (chez le couteau), les branchies, les gonades, le manteau et dans le muscle adducteur. L'étude du profil chimique des différentes toxines a été réalisée par chromatographie liquide à haute performance (CLHP). En parallèle, l'identification et le dénombrement du phytoplancton toxiques dans l'eau de mer des sites d'échantillonnage a été mené par microscope inversé

2.1. Test biologique sur souris

La détection des phycotoxines paralytiques dans les mollusques bivalves des trois régions a été réalisée par épreuve biologique sur souris (*Swiss albino*) selon les méthodes officielles d'AOAC 1990. Cette méthode consiste en l'injection d'un extrait acide de l'échantillon dans la cavité intra-péritonéale des souris de poids entre 18 et 20 g. Le délai de mort (le temps entre la fin de l'injection et la mort de la souris) est exprimé en Unité Souris (US) à l'aide des tables de Sommer (tableau 1). Une unité souris est définie comme la quantité de toxine qui, injectée par voie intra-péritonéale, tue une souris de 20g en 15 minutes. Le résultat est présenté en US/100g de chair. Pour la convertir en µg eq-STX/100g, il faut multiplier par le facteur de conversion.

- Produits et matériel d'analyse**

Matériel	Usage
- Balance	- Pesés
- Mixeur	- Broyage des tissus
- pH-mètre	- Mesure du pH
- Plaque chauffante	- Chauffage des extraits
- Centrifugeuse	- Séparation entre le culot et surnageant
- Seringues stériles de 1ml	- Injection des extraits
- Chronomètre	- Calcule du délai de la mort

Produits	Usage
- HCl 0.1N	- Extraction des toxines PSP
- HCl 5N	- Ajustement du pH
- NaOH 0.1N	- Ajustement du pH

- Extraction des toxines

Les mollusques sont nettoyés soigneusement à l'eau courante. Après écoquillage la chair est égouttée sur un tamis puis homogénéisé dans un mixeur.

A 100g de broyat on ajoute 100ml d'acide chlorhydrique 0.1N. Le mélange est homogénéisé à l'ultraturx et la valeur du pH est vérifiée, elle doit être entre 2 et 4 (le pH est ajusté par NaOH 0.1N ou de HCl 5N). L'ensemble est porté à ébullition sous agitation permanente sur une plaque chauffante, puis bouilli pendant 5min. Après refroidissement le pH est vérifié, toujours entre 2 et 4. Le contenu est transvasé dans une éprouvette graduée et ajuster à 200ml avec de l'eau distillée. Le tout est centrifugé pendant 5 minutes à 3000 tpm.

- Injection

Un millilitre du surnageant (l'extrait acide) est injecté à une souris mâle d'un poids entre 18 et 20 g. Le temps entre la fin de l'injection et le dernier souffle de la souris est calculé précisément avec un chronomètre.

Si le temps enregistré est supérieur à 5 minutes, on injecte deux autres souris. Par contre si délai de mort est inférieur à 5 minutes, l'extrait doit être dilué de façon à ce que le délai de mort soit compris entre 5 et 7 minutes et l'inoculation est effectuée sur deux autres souris pour établir la toxicité moyenne de l'échantillon.

- Calcul de la toxicité

Après la déterminer des délais de mort médians des trois souris, en tenant compte des survivantes et calculer le nombre correspondant d'unités souris à l'aide des tables de sommer (tableau1).

Si les animaux pèsent moins plus ou moins de 20g, une corrélation pondérale doit être effectuée à l'aide de la table de Sommer. Le facteur de corrélation pondérale est multiplié par le nombre d'unités souris correspondant.

La Conversion du nombre d'unités souris en microgramme Saxitoxines équivalent /100gramme de chair est obtenu par la multiplication par le facteur de conversion (tableau 2)

La formule utilisée pour calculer la concentration des phycotoxines PSP est la suivante:
 $\mu\text{g SAX eq} / 100 \text{ de chair de moules} = \text{USm} \times \text{FC} \times \text{FD} \times 200$

USm: unité souris médiane = US x FCP

FCP : facteur de corrélation pondérale

FD : facteur de dilution

FC : facteur de Conversion

Calcul du coefficient de conversion (FC)

Ce facteur permet de convertir les Unités Souris (US) en leur équivalent en μg par rapport à une solution standard de saxitoxine ($\mu\text{g STXéqui.}$).

Ce facteur varie en fonction de la souche de souris, des conditions opératoires et du manipulateur, donc il est propre aux conditions du laboratoire. Pour le calculer, une solution mère de concentration 1 $\mu\text{g/ml}$ a été préparée à partir d'une solution standard de STX de concentration 0,14 mg/ml acquise auprès du Conseil National de Recherche du Canada. Des gammes de dilution de cette solution mère de 0,5; 0,4; 0,33 et 0,25 $\mu\text{g/ml}$, ont préparées et inoculées à des lots de 10 souris chacune. Seules les concentrations ayant donné un temps médian de mort de souris entre 5 et 7 min ont été pris en considération .Le coefficient de concentration a été déduit à partir de la moyenne de ces trois Concentrations.

Tableau 1 : Tableau de sommer.

Relation délai de mort/unité souris(US)				facteur de correction du poids (fcp)	
Temps létal (mn/sec)	US	Temps létal (mn/sec)	US	Poids de la souris (g)	fcp
1.00	100	5.00	1.92	10	0.5
1.10	66.2	5.05	1.89	10.5	0.53
1.15	38.3	5.10	1.86	11	0.56
1.20	26.4	5.15	1.83	11.5	0.59
1.25	20.7	5.20	1.80	12	0.62
1.30	16.15	5.30	1.74	12.5	0.65
1.35	13.9	5.40	1.69	13	0.675
1.40	11.9	5.45	1.67	13.5	0.7
1.45	10.4	5.50	1.64	14	0.73
1.50	9.33	6.00	1.60	14.5	0.76
1.55	8.42	6.15	1.54	15	0.785
2.00	7.67	6.30	1.48	15.5	0.81
2.05	7.07	6.45	1.43	16	0.84
2.10	6.52	7.00	1.39	16.5	0.86
2.15	6.06	7.15	1.35	17	0.88
2.20	5.66	7.30	1.31	17.5	0.905
2.25	5.32	7.45	1.28	18	0.93
2.30	5.00	8.00	1.25	18.5	0.95
2.35	4.73	8.15	1.22	19	0.97
2.40	4.48	8.30	1.20	19.5	0.985
2.45	4.26	8.45	1.18	20	1.00
2.50	4.04	9.00	1.16	20.5	1.015
2.55	3.88	9.30	1.13	21	1.03
3.00	3.70	10.00	1.11	21.5	1.04
3.05	3.57	10.30	1.09	22	1.05
3.10	3.47	11.00	1.075	22.5	1.06
3.15	3.31	11.30	1.06	23	1.07
3.20	3.19	12	1.05		
3.25	3.08	13	1.03		
3.30	2.98	14	1.015		
3.35	2.88	15	1.00		
3.40	2.79	16	0.99		
3.45	2.71	17	0.98		
3.50	2.63	18	0.972		
3.55	2.56	19	0.965		
4.00	2.50	20	0.96		
4.05	2.44	21	0.954		
4.10	2.38	22	0.948		
4.15	2.32	23	0.942		
4.20	2.26	24	0.937		
4.25	2.21	25	0.934		
4.30	2.16	30	0.917		
4.35	2.12	40	0.898		
4.40	2.08	60	0.875		
4.45	2.04				
4.50	2.00				
4.55	1.96				

Tableau 2 : Calcul du facteur de conversion.

Souris	Concentration de STX :		Concentration de STX :		Concentration de STX :	
	0,4 µg/ml		0,25 µg/ml		0,33 µg/ml	
	Toxicité en US	FC	Toxicité en US	FC	Toxicité en US	FC
S1	2.21		1.35		1.48	
S2	2.14		1.13		1.71	
S3	2.59		1.64		1.53	
S4	1.56		2.26		1.94	
S5	2.86	0.18	1.8	0.23	1.74	0.20
S6	1.48		1.74		1.64	
S7	1.94		1.54		0.88	
S8	2.94		1.39		1.7	
S9	1.92		1.39		1.84	
S10	2.2		0.875		1.5	

2.2. Test chimique par chromatographie liquide à haute performance (CLHP).

Le profil chimique des PSP a été obtenu par la chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrofluorimétrie (CLHP/FD) selon la méthode de Thielert et al., (1991), modifiée par Hummert et al., (1997), par Yu et al., (1998). Cette méthode permet de séparer entre la STX et la dcSTX d'un coté et la séparation entre les différents GTXs et plus précisément entre GTX-1 et GTX-4. La séparation et l'identification des toxines PSP se fait selon leurs fluorescences des toxines après oxydation.

- **Extraction des phycotoxines**
 - **Solvant d'extraction :**
acide acétique 0.03M 4ml/2g d'échantillons

- **Préparation de l'échantillon :**

L'échantillon et le solvant sont mélangés dans Vortex pendant 1min puis homogénéisés durant 10min dans un bain ultrasonique, le tout est centrifugé 10 min à 3000 t/min. le surnagent est filtré par une seringue-filtre de diamètre 0.45µm. le filtrat est prêt pour l'analyse par CLHP.

- **Hydrolyse**

Pour la détermination des C-toxines (N-sulfocarbamates) une hydrolyse du filtrat est effectuée. A 150 µl du filtrat en ajoute 37µl du HCL 1M le tout est mélangé dans un vortex pendant 30 seconde et chauffé pendant 15 min à 90°C. Après refroidissement à la température ambiante le mélange est passé au vortex une deuxième fois pendant 30 secondes. L'extrait acide est neutralisé par 75µl d'acétate de sodium et mélangé pendant 30 secondes. L'échantillon est prêt pour l'analyse par CLHP.

- **Conditions de la chromatographie**

- **Le Volume d'injection**

10µl

- **La phase stationnaire :**

La colonne est de type Phenomenex, Luna 5 µm RP-C18, 250 mm x 4,6 mm.

- **La phase mobile :**

Éluant A : 6 mM d'acide octanesulfonique

6 mM d'acide héptanesulfonique

40 mM du phosphate d'ammonium

Le pH de cette phase est ajusté à 7 avec du H₃PO₄ et 0.75% tétrahydrofurane.

Éluant B : 7 mM d'acide octanesulfonique

7 mM d'acide héptanesulfonique

48 mM du phosphate d'ammonium

Le pH de cette phase est ajusté à 7 avec du H₃PO₄ et avec 1% tétrahydrofurane et 10% d'acetonitrile.

- **Gradient :**

Temps (min)	A%	B%	Débit (ml/min)
0.0	100	0	1.0
15.0	100	0	1.0
16.0	0	100	1.0
43.0	0	100	1.0
44.0	100	0	1.0
65.0	100	0	1.0

- **Température de la colonne :**

25°C (+ou- 3°C)

- **La dérivatisation Post-colonne:**

Oxydation : 10 mM d'acide périodique et 550mM de la solution NH3 avec un débit de 0.3 ml/min

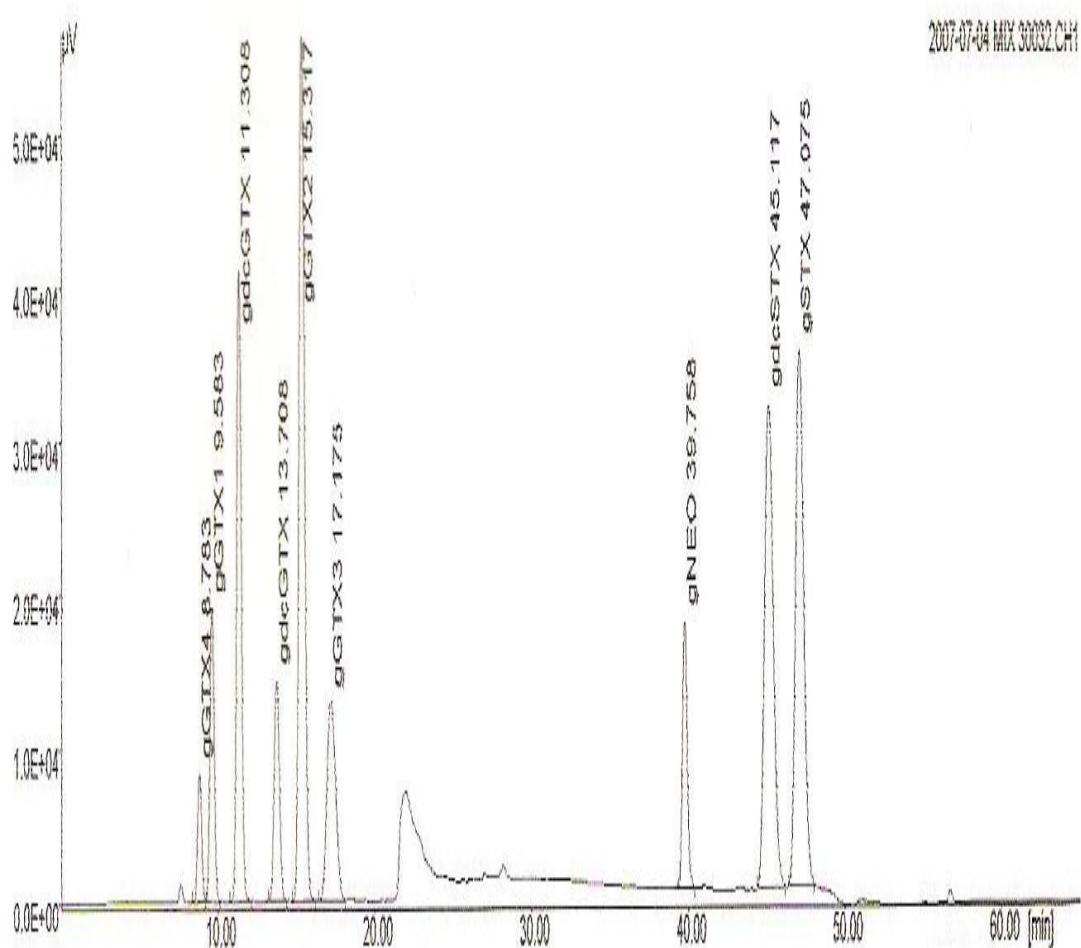
Acidification : 0.75M d'acide nitrique ave un débit de 0.4 ml/min

- **La détection**

La détection se fait à des longueurs d'onde d'excitation de 330 nm et d'émission de 390 nm

- **Les standards**

Les standards des phycotoxines détectées sont obtenus du Conseil National de Recherche du Canada (NCR Canada). La quantification des toxines carbamates se fait par la comparaison de leurs pics par ceux des standards par contre pour la quantification des C-toxines est déduite à partir des différences entre les airs des pics des carbamates avant et après hydrolyse (Figure I).



Name	RT	Area [pV.Sec]	Quantity
1 gGTX4	8.783	133368.250	10.990 ng/inj.
2 gGTX1	9.583	327691.000	31.026 ng/inj.
3 gdcGTX2	11.308	759456.000	2.722 ng/inj.
4 gdcGTX3	13.708	309030.500	0.860 ng/inj.
5 gGTX2	15.317	1290153.000	3.197 ng/inj.
6 gGTX3	17.175	474926.750	1.129 ng/inj.
7 gNEO	39.758	330769.000	10.541 ng/inj.
8 gdcGTX	45.117	1176746.411	3.929 ng/inj.
9 gSTX	47.075	1264572.814	3.506 ng/inj.

Figure I : Chromatogramme d'une mixture de standard des toxines PSP

2.3 Analyse phytoplanctonique

La détermination des espèces est effectuée à l'aide d'un microscope inversé selon la méthode de sédimentation d'Uthermol (1958). Le comptage des espèces phytoplanctoniques est réalisé sur des cuves de sédimentation de 10 à 25 ml le temps minimum pour sédimentation est de 6heures. Tous les espèces produisant ces toxines ont été recensées aussi bien ceux de petite taille que ceux de grande taille, ceci est réalisé à l'aide d'un balayage horizontal de la cuve champs par champs lors de l'observation.

3. Résultats

3.1 Test biologique sur souris

i. Agadir

Le suivi régulier des PSP a montré que les concentrations dans la chair totale des bivalves d'Agadir n'ont pas dépassé la norme adoptée pour la surveillance des toxines au Maroc qu'est fixée à 80 µg eq STX /100g. Les concentrations révélées par test biologique dans les organes de la moule ont montré que ces toxines algales n'ont été décelées que dans les glandes digestives avec des concentrations supérieures à celle de la chair totale.

A Tifint, Le suivi de la toxicité dans les moules de Tifnit a révélé une accumulation des toxines PSP Durant les périodes estivales de 2003, 2004, 2006 et 2007. Les valeurs décelées oscillaient entre un minimum de 33.5 enregistré en Aout 2004 et un maximum de 71.5 µg eq STX /100g de chair totale noté en juin 2006. Les glandes digestives ont accumulé ces phycotoxines deux fois plus que de la chair avec un maximum de 135 µg eq STX /100g de glandes digestives détecté en juin 2006 (Figure 1). A Cap ghir, cinq épisodes de toxicité de moule ont été enregistré durant les cinq années d'étude, 61.5 µg eq STX/100g de chair totale est la plus forte concentration a été notée en juillet 2006. Concernant le suivi de ces toxines dans les organes, un maximum de 160 et un minimum de 31.6 µg eq STX/100g ont été détectés respectivement en juillet 2006 et en juin 2004 (Figure 2).

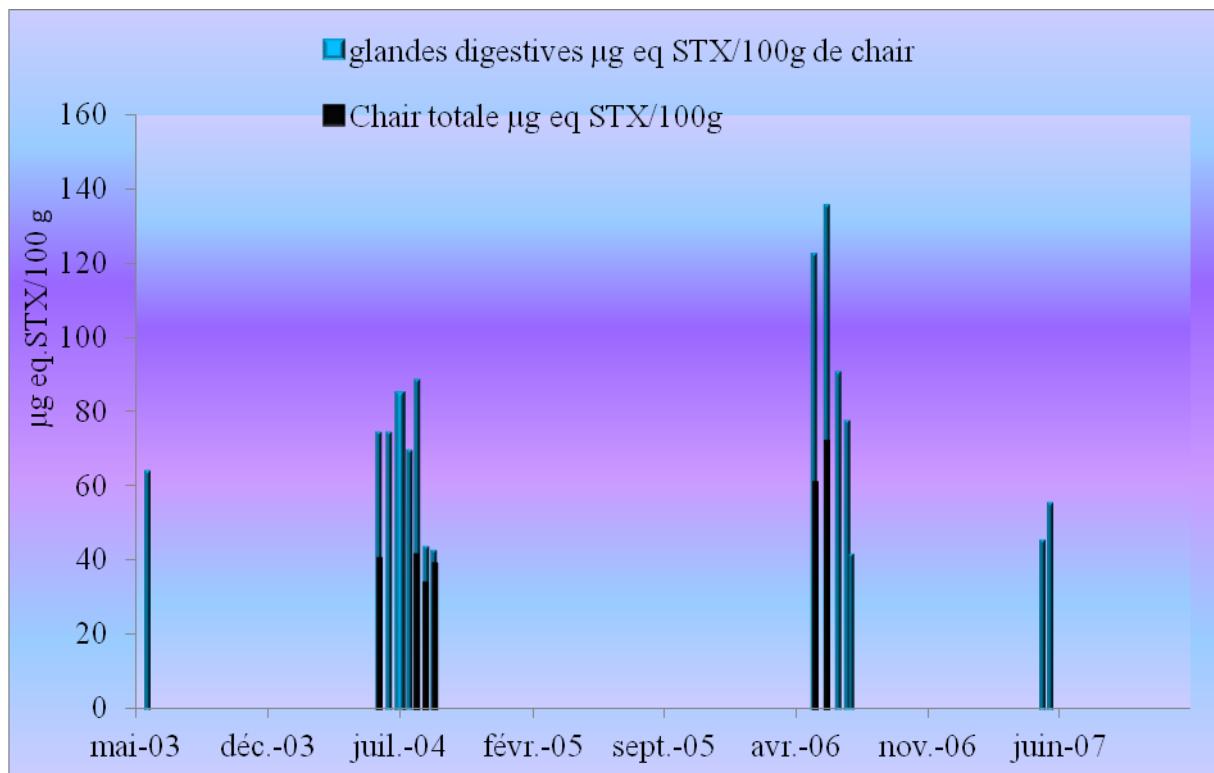


Figure 1 : Evolution annuelle des toxines PSP dans les glandes digestives et dans la chair totale de la moule de Tifnit.

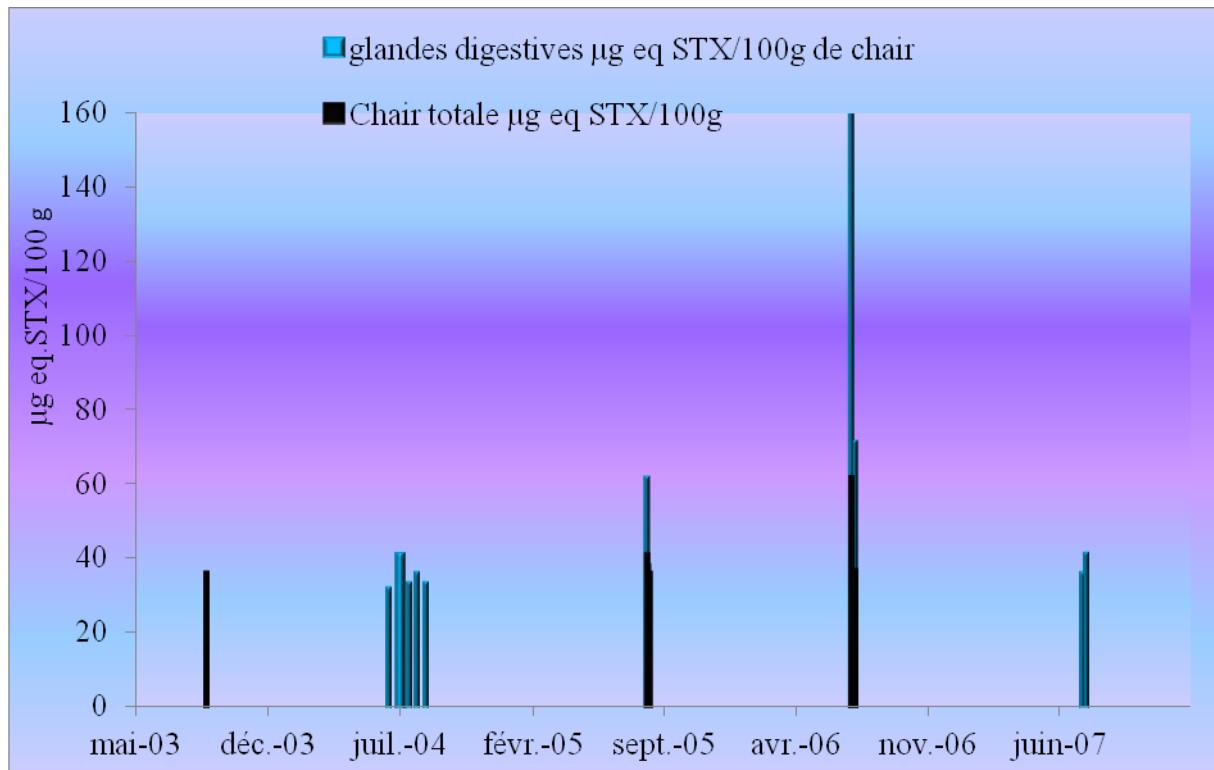


Figure 2 : Evolution annuelle des toxines PSP dans les glandes digestives et dans la chair totale de la moule de Cap ghir.

ii. Laâyoune

L'analyse des phycotoxines PSP réalisée sur les moules d'Akhfenir du mai 2003 au décembre 2006 a montré la présence de ces toxines avec un niveau maximum atteignant les 54 µg eq STX/100 g de chair totale en mai 2003. Les concentrations enregistrées de cette région de Laâyoune n'ont pas dépassé les normes en vigueur. Deux périodes de toxicité de coquillages ont été décelées durant cette étude, la première a débuté en mai jusqu'au Aout 2003 et la dixième du juin jusqu'au Aout 2005. Les toxines PSP n'ont été détectées que dans les glandes digestives avec des taux plus élevés que ceux enregistrés pour la chair totale (Figure 3).

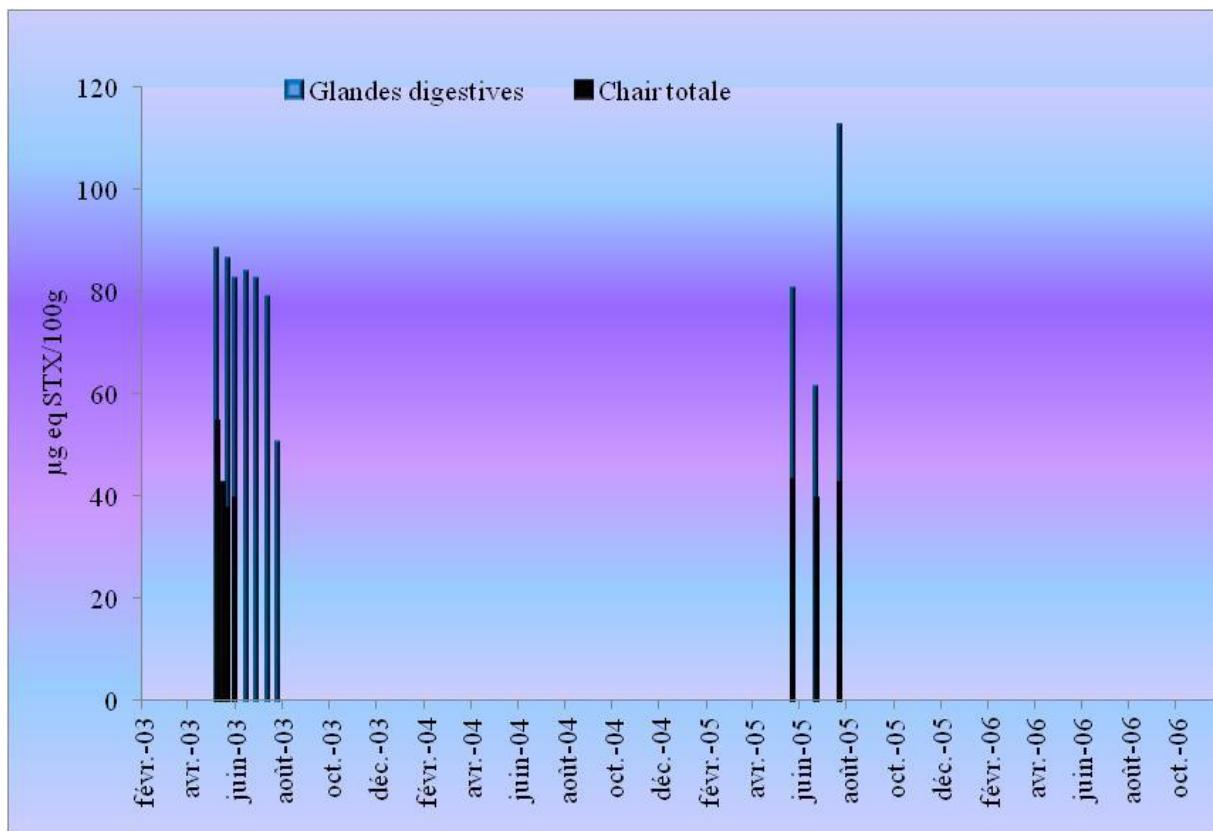


Figure 3 : évolution annuelle des toxines PSP dans les glandes digestives et dans la chair totale de la moule d'Akhfenir.

iii. Dakhla

Les analyses biologiques de la PSP sur souris ont intéressé quatre espèces de coquillages de la région Dakhla. Deux milieux marins ont été étudié au niveau de cette région la baie avec quatre espèces (la moule, le couteau, la coque et l'huître) et le littoral avec seule espèce la moule.

Excepté la moule de N'tirift, Les phycotoxines paralytiques ont été décelé dans les quartes espèces de coquillages de la baie et au niveau de la moule du littoral du littoral de tous les sites

étudiés durant ce travail. Les concentrations de ces toxines algales n'ont dépassés les normes qu'à une seule reprise en Décembre 2006 d'où les couteaux de pK25 ont enregistrés un taux maximal de toxicité. Les analyses biologiques dans les organes des mollusques étudiés ont montré que seules les glandes digestives qui ont accumulé ces phycotoxines.

- Le littoral et mer ouverte

Au niveau des moules du littoral de Dakhla, deux épisodes de PSP ont été notées la première en fin 2004 au niveau d'Oumlabouir et la deuxième en fin 2004 et en fin 2006 au niveau de Dunforf. Les concentrations de toxines enregistrées ont été très faibles elles ne dépassaient les 38.5 µg eq STX/100g de chair totale. Les concentrations qui ont été détectées dans les glandes digestives ont été presque deux fois plus élevées que celles trouvées dans la chair totale (Figure 4 et 5). Les moules de N'tirift n'ont pas été touchées par la PSP tout au long de cette étude.

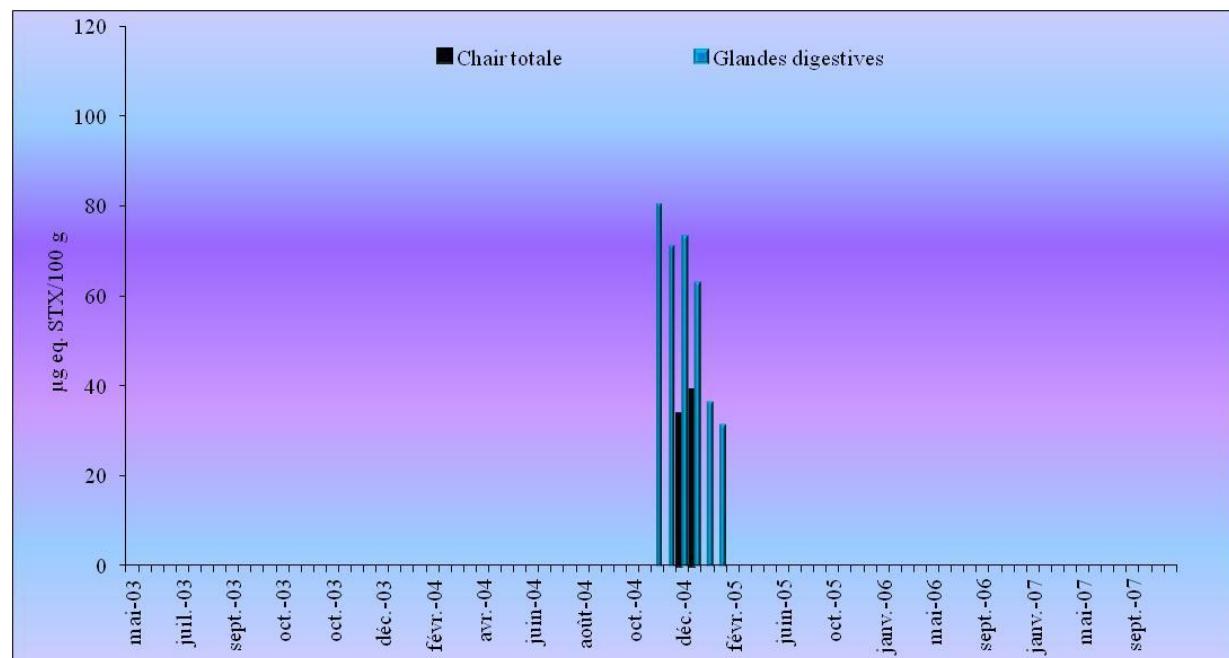


Figure 4 : Evolution annuelle des toxines PSP dans les glandes digestives et dans la chair totale de la moule d'Oumlabouir.

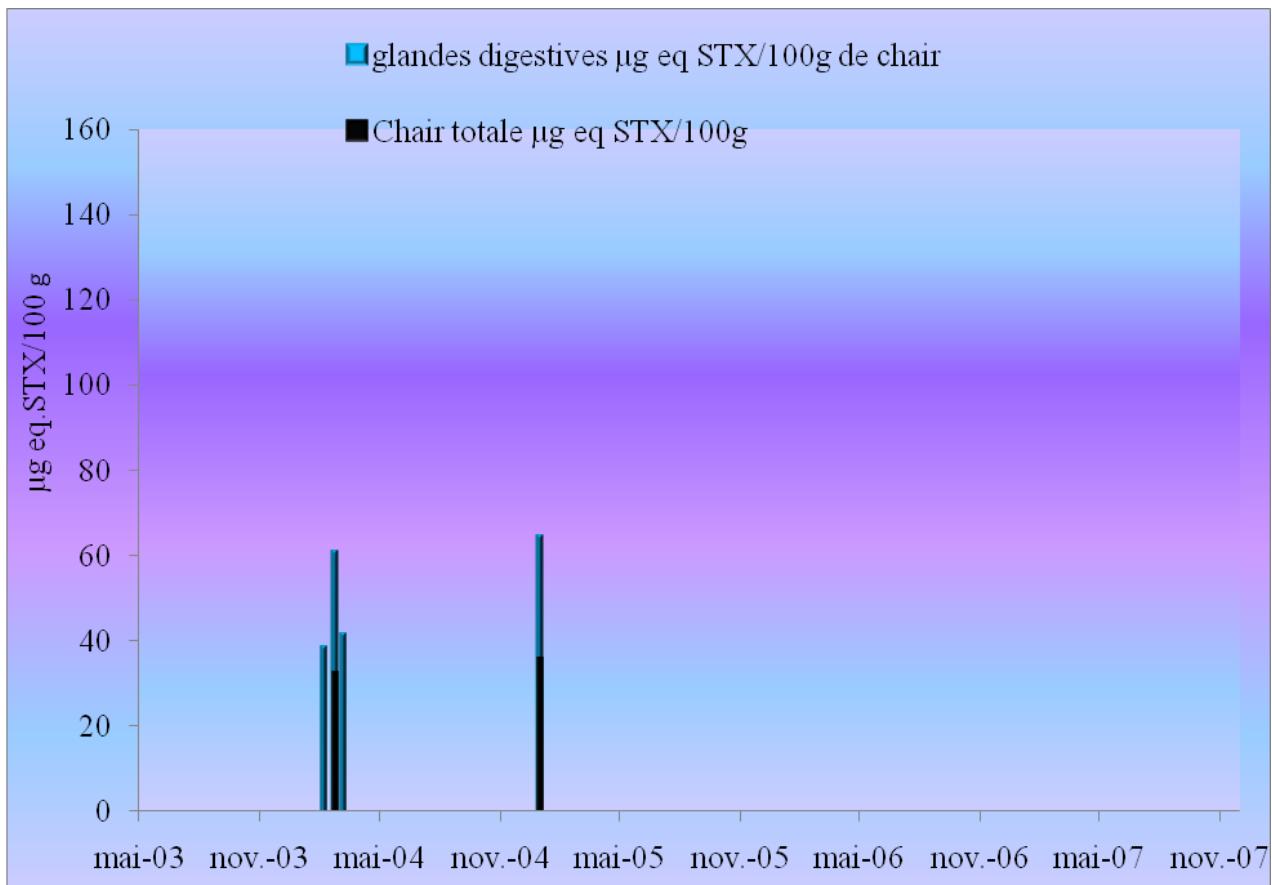


Figure 5 : Evolution annuelle des toxines PSP dans les glandes digestives et dans la chair totale de la moule de Dunford.

- **La baie**

- Hojallamira et Puertitto.

Les moules de la baie ont accumulé les phycotoxines paralytiques ont fin 2004, 36.6 et 36.2 µg eq STX/100g de chair totale ont été les concentrations maximales détectées respectivement à Hojallamira et Puertitto (Figure 6 et 7).

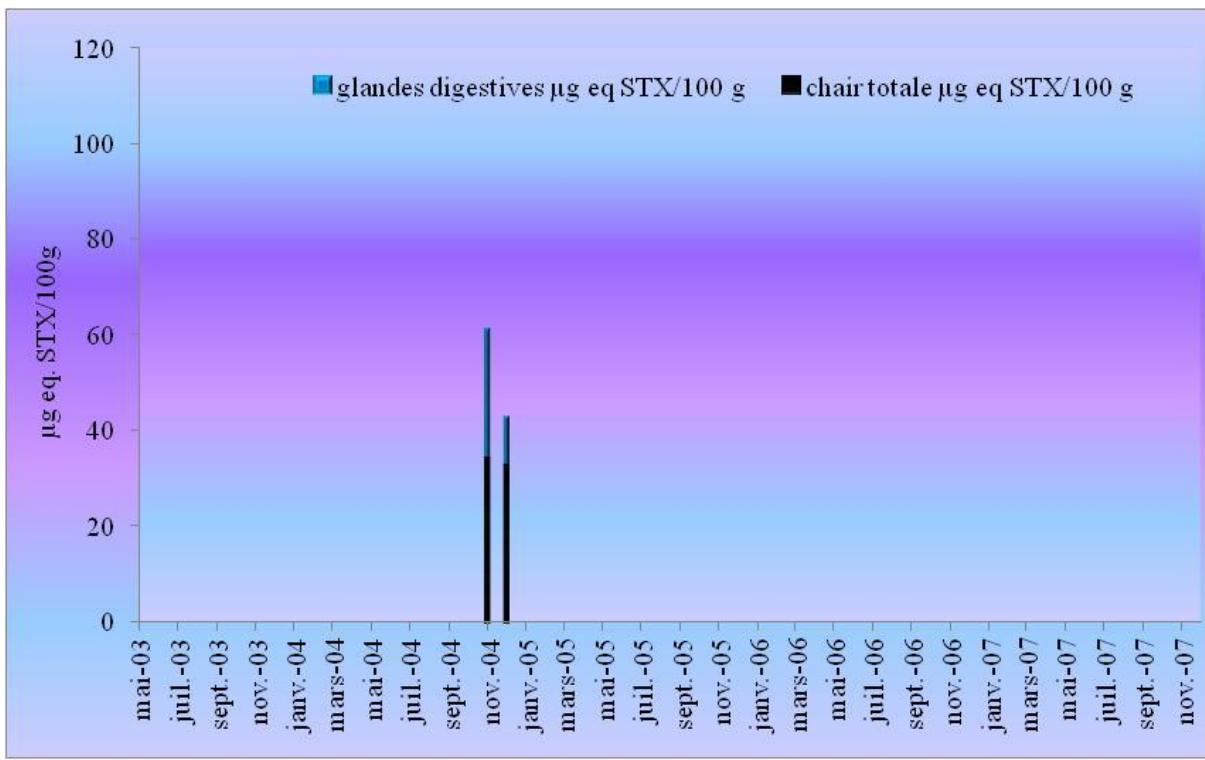


Figure 6 : Evolution annuelle des toxines PSP dans les glandes digestives et dans la chair totale de la moule de Hojallamira.

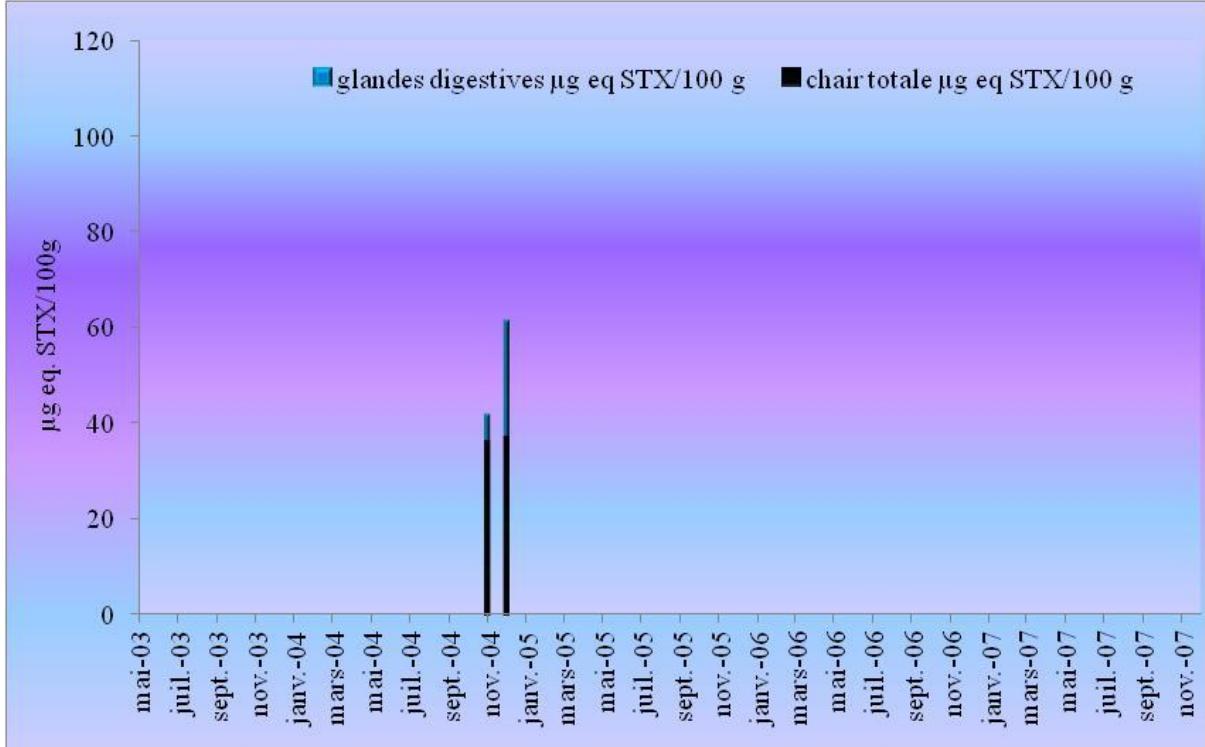


Figure 7 : Evolution annuelle des toxines PSP dans les glandes digestives et dans la chair totale de la moule de Puertitto.

- Pk25

En comparaison avec les autres bivalves étudiés, les couteaux de Pk25 ont été les mollusques qui ont accumulé la plus forte concentration des toxines PSP. Les couteaux de ce site ont connu trois épisodes de toxicité la première de décembre 2004 jusqu'au Janvier 2005 d'où ces toxines n'ont été décelées que dans les glandes digestives et avec des taux très faible 30 et 35 µg eq STX/100g, la deuxième période elle s'étale d'octobre jusqu'au Décembre 2006. 121.5 et 238 µg eq STX/100g ont été les concentrations maximales enregistrées respectivement dans la chair totale et dans les glandes digestives en fin décembre 2006 (Figure 8). En automne 2007, ces toxines n'ont été décelées que les glandes digestives avec des concentrations ne dépassants pas les 60 µg eq STX/100g (Figure 8)

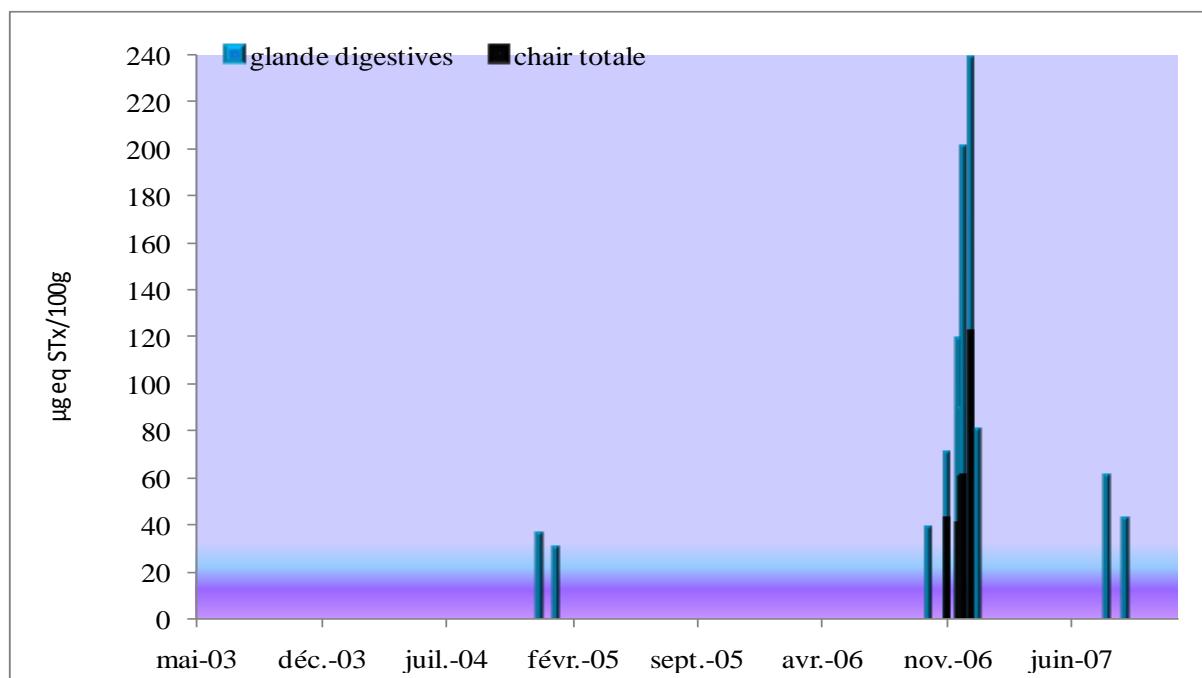


Figure 8 : Evolution annuelle des toxines PSP dans les glandes digestives et dans la chair totale du couteau de Pk25.

- Boutalha

A Boutalha, les toxines PSP ont été suivies à partir du janvier 2004 jusqu'au décembre 2007. Ces phycotoxines n'ont été décelées que dans les mollusques fouisseurs étudiés: les coques et les couteaux par contre les huîtres de ce site n'ont pas été toxiques. Ces toxines ont été présentes dans ces deux espèces d'octobre 2006 jusqu'au janvier 2007 avec des maximums de concentration PSP 47.5 et 53 µg eq STX/100g de chair totale notés respectivement dans les couteaux en novembre

2006 et dans coques en décembre 2006. La concentration de ces toxines dans les glandes digestives de ces deux bivalves variaient entre 32.91 et 66.4 µg eq STX/100g pour la coque et 20.4 et 32.35 µg eq STX/100g pour le couteau (Figure 9).

- Dunablanca

A Dunablanca, deux périodes de toxicité ont été distinguées la première d'octobre 2004 jusqu'au janvier 2005 dans les huîtres et la deuxième de novembre jusqu'au décembre 2006 dans les couteaux. Les concentrations des toxines PSP dans la chair totale des deux espèces oscillaient dans la limite de détection entre 34.5 et 52.5 µg eq STX/100g. Les taux de toxines enregistrés dans les glandes digestives étaient nettement plus élevés, des maximums de 140 et 201 µg eq STX/100g noté respectivement dans les huîtres en novembre 2004 et dans les couteaux en décembre 2006. Par contre dans les coques de ce site, de faibles concentrations en toxines PSP ont été décelées dans les glandes digestives novembre et décembre 2006. (Figure 10).

3.2 Saisonnalité des phycotoxines paralytiques.

Les analyses des phycotoxines paralytiques effectuées de 2003 jusqu'aux 2007 dans les mollusques bivalves des trois régions ont révélé une saisonnalité d'apparition de ces toxines. Cette saisonnalité diffère d'une région à une autre, elle est estivale à Agadir et à Laâyoune et automnale à hivernale à Dakhla (Figure 11,12 et 13).

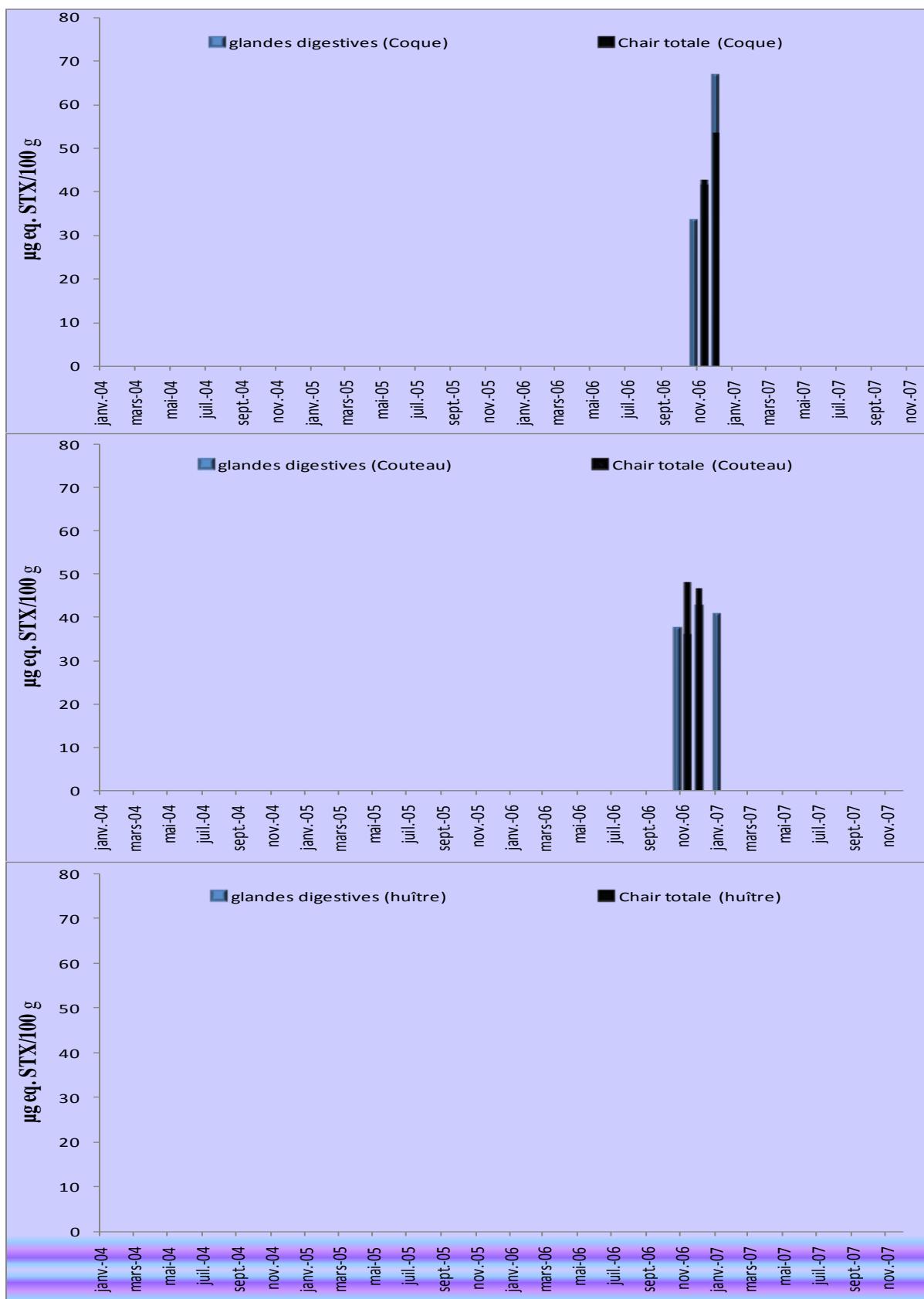


Figure 9 : Evolution annuelle des toxines PSP dans les glandes digestives et dans la chair totale des trois espèces de bivalves de Boutalha.

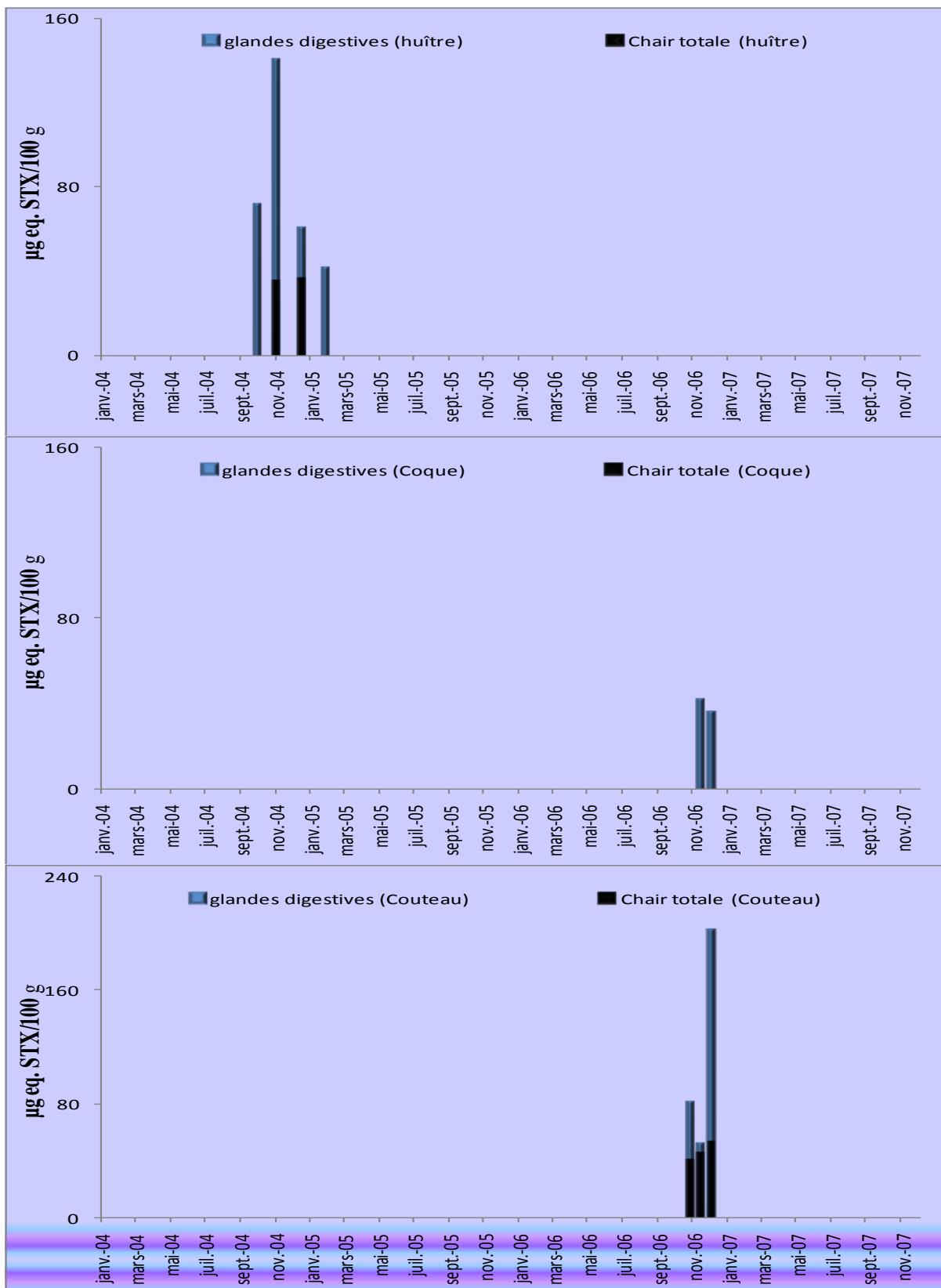


Figure 10 : Evolution annuelle des toxines PSP dans les glandes digestives et dans la chair totale des trois espèces de bivalves de Dunablanca

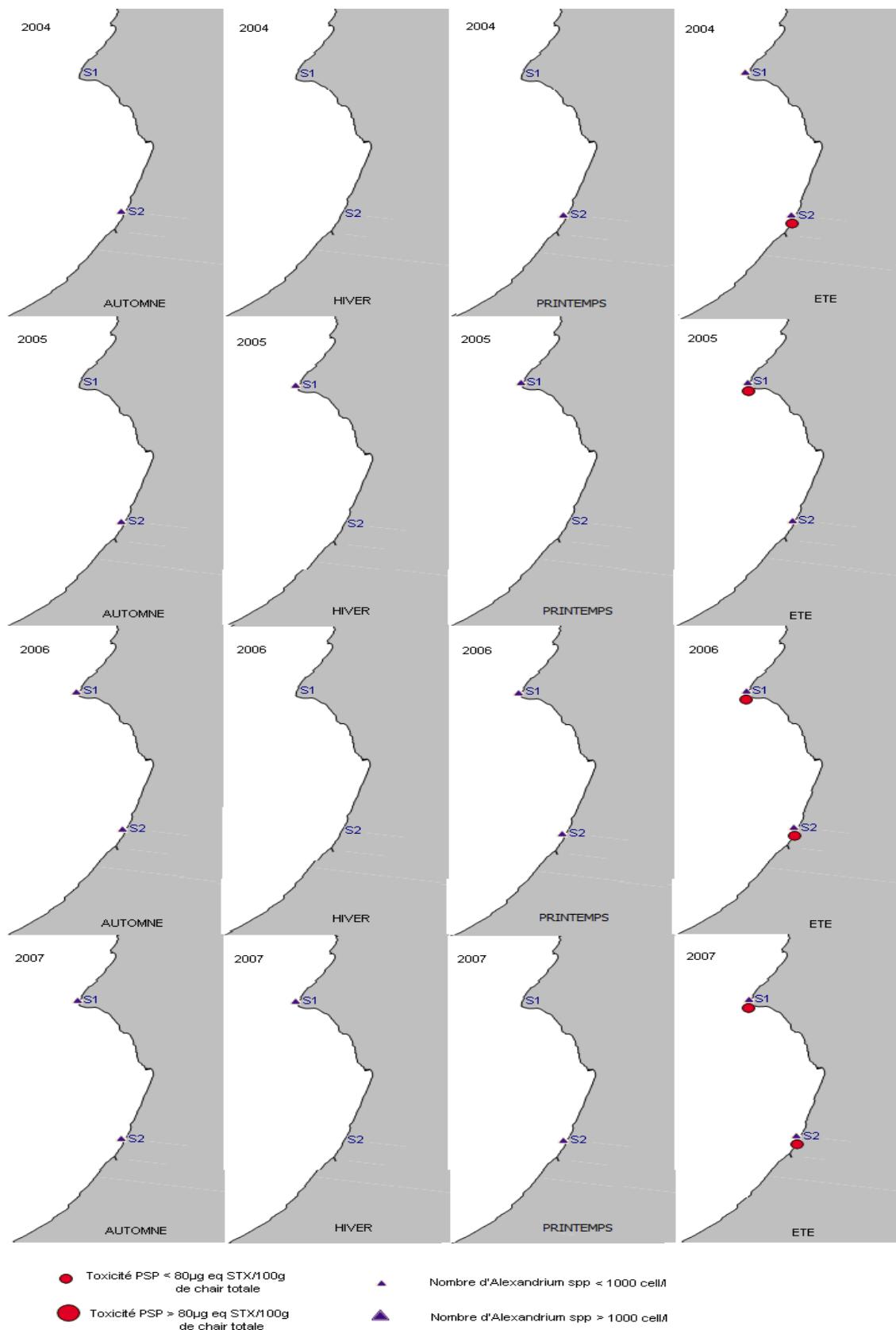


Figure 11: *Alexandrium spp* et des phycotoxines PSP dans le littoral d'Agadir durant les quatre saisons de 2004-2007.

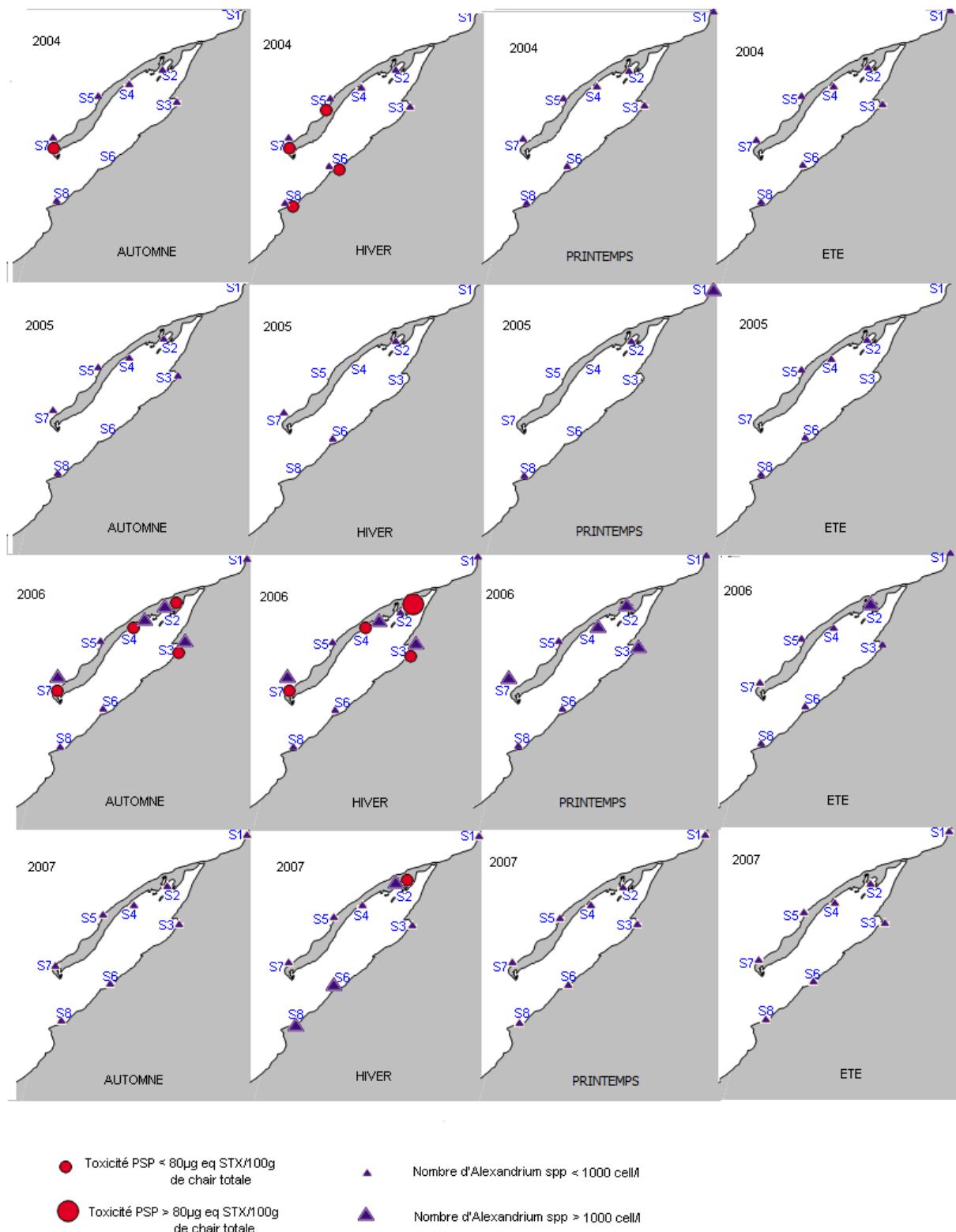


Figure 12 : *Alexandrium spp* et des phycotoxines PSP dans le littoral et la baie de Dakhla durant les quatre saisons de 2004-2007.



Figure 13 : *Alexandrium spp* et des phycotoxines PSP à Akhfenir (Laâyoune) durant les quatre saisons de 2003-2006.

3.3 Test chimique par CLHP

3.3.1. Toxicité totale

Les résultats des analyses chimiques de la PSP par CLHP dans la chair totale des bivalves des trois régions ont confirmé la présence des toxines détectées par le test biologique. Les concentrations enregistrées ont été faibles et elles ne dépassaient pas les 54.8 µg eq STX/100g.

• Agadir

L'analyse PSP dans la chair totale des moules de Cap ghir ont confirmé la présence de ces toxines dans les échantillons de 2004, de 2005 et de 2006. Le minimum 11 µg eq. STX/100g de chair totale et le maximum 39.7 µg eq. STX/100g de chair totale ont été détectées respectivement en aout et en mars 2005. A Tifnit, ces phycotoxines n'ont été détectées qu'en 2004 et en 2006. Ces concentrations ont été plus élevées que celle de détectées dans les moules de Cap ghir, 54.8 µg eq. STX/100g de chair totale a été le maximum de toxicité enregistrée dans les moules de ce site (Figure 14).

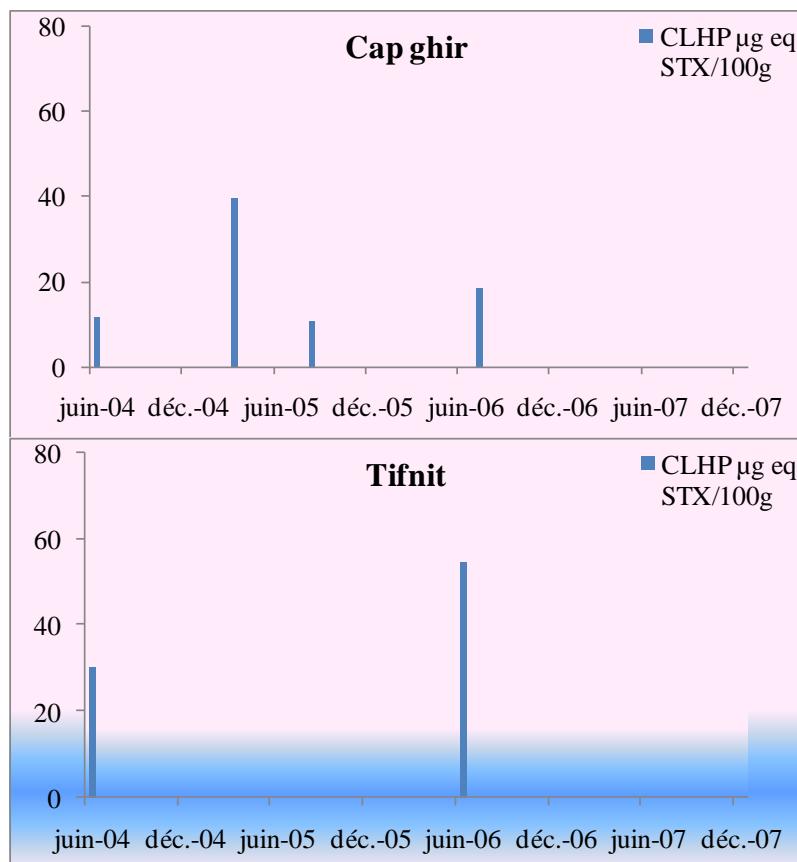


Figure 14 : Taux des toxines PSP détectées par CLHP dans la chair totale des moules d'Agadir durant les périodes de toxicité de 2004, 2005 et 2006.

- **Laâyoune**

A Akhfennir, les analyses par le test chimiques ont révélés la présence de ces toxines durant les deux périodes de toxicité en 2003 et 2005. Les concentrations obtenues ont été très faibles elles ne dépassaient pas les 19.3 µg eq STX/100g de chair totale (Figure 15)

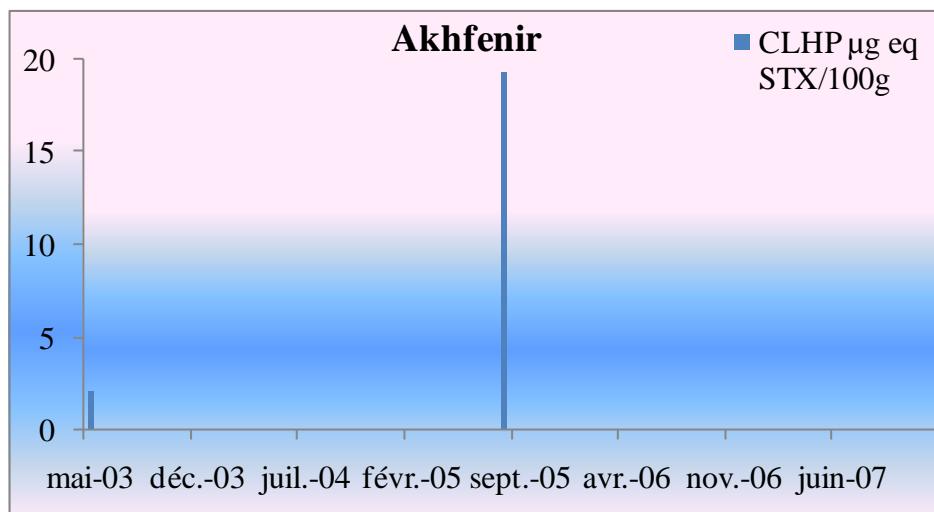


Figure 15 : Taux des toxines PSP détectées par CLHP dans la chair totale des moules d'Akhfenir durant les périodes de toxicité de 2003 et 2005.

- **Dakhla**

Les analyses de la CLHP effectuées sur les échantillons prélevés durant les périodes de toxicité de 2004 jusqu'au 2007 ont confirmé la présence de la PSP dans les quatre espèces de bivalves de cette région. Les taux des toxines retrouvées dans les moules du littoral de Dakhla (Oumlabouir et Dunfors) en 2004 et 2006 ont été très faibles, ces concentrations variaient entre 6.3 et 17.7 µg eq STX/100g de chair totale (Figure 16 a). Concernant dans les coques de Boutalha, la PSP a été détectée sous forme de trace dans les échantillons de 2004 et 2006 ne dépassaient pas les 6 µg eq STX/100g de chair totale (Figure 16 b). L'analyse chimique de ces toxines dans les huîtres de Dunablanca de 2004 a montré qu'aussi l'huître de ce site concentrat de très faibles quantités des toxines PSP dans leur chair totale (Figure 16 c). Par contre les concentrations décelées dans les couteaux de Pk25 ont été plus ou moins élevées, ce test chimique a détecté ces toxines durant les trois périodes de toxicité de 2004, 2006 et 2007. Le maximum de concentration PSP a été 51,10 µg eq STX/100g de chair totale décelé en Décembre 2006 et un minimum de 2.6 µg eq STX/100g de chair totale noté dans les échantillons du juin de la mémé année (Figure 16 d).

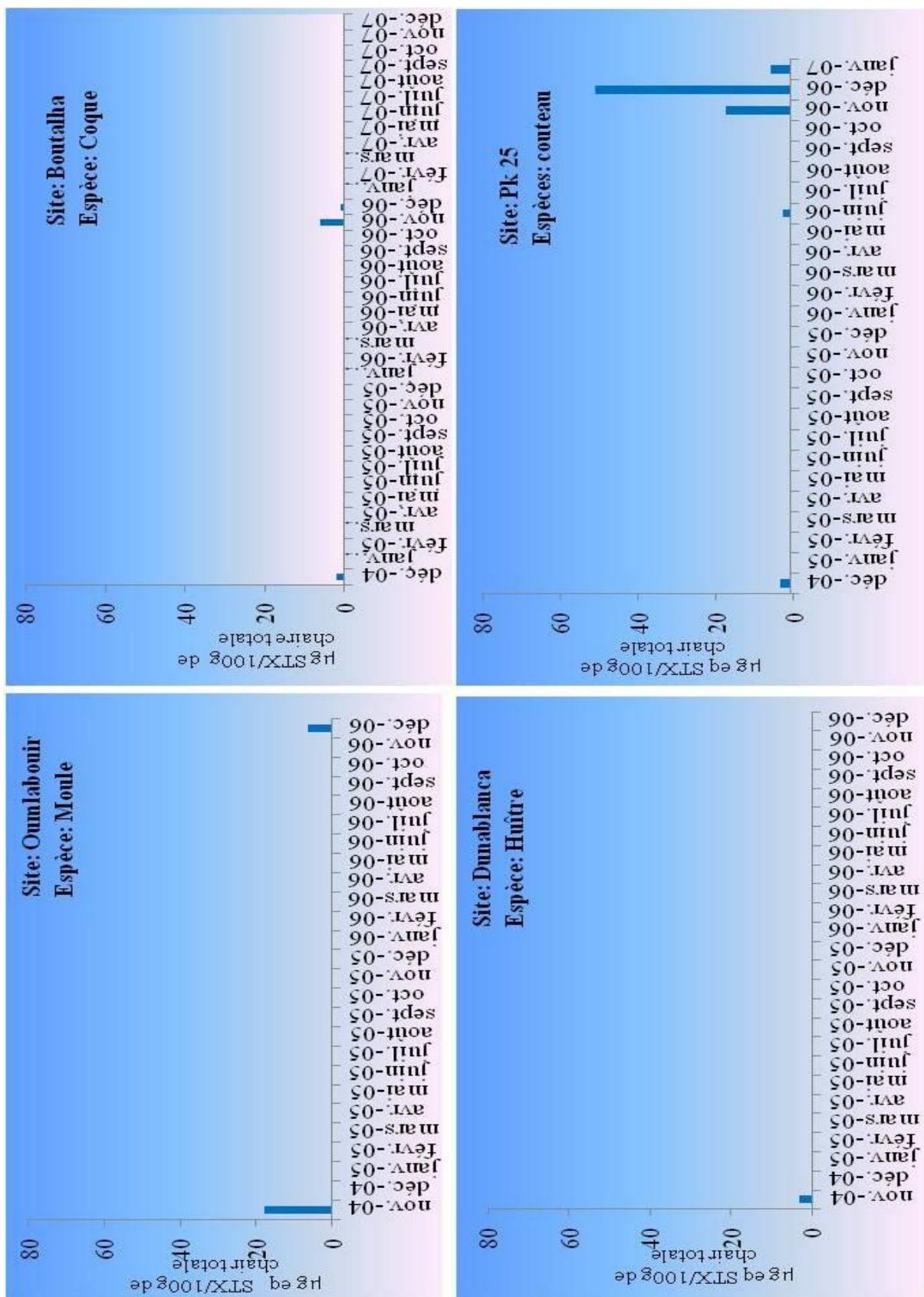


Figure 16 : Taux des toxines PSP par CLHP dans la chair totale des les bivalves de la région Dakhla durant les périodes de toxicité de 2004 et 2006.

3.3.2. Toxicité des organes des moules

Les résultats de cette analyse chimique effectué en 2003 et 2004 dans les différents organes de moules prélevées des trois régions (à Akhfenir, à Tifni et à Oumlabouir) ont montré que la PSP est principalement concentrée dans les glandes digestives. Les taux de PSP les plus élevés ont été détectés dans ces glandes avec 10 à 13 fois plus que les autres organes. Cette toxicité décroît selon le gradient suivant : glandes digestives > les gondes + le manteau > les branchies > le muscle (Figure 17).

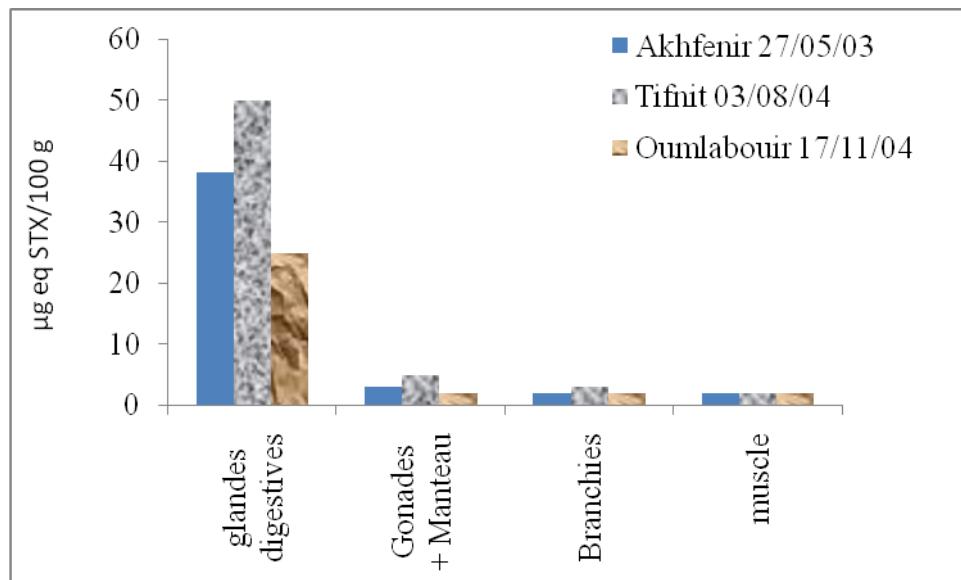


Figure 17 : Accumulation des toxines PSP par les différents organes de la Moule *Perna Perna* prélevée des trois régions de l'Atlantique sud Marocain.

3.3.3. Profil toxinique

Les analyses des profils toxiniques effectuées par CLHP dans la chair totale et les organes des coquillages des trois régions ont montré la présence des toxines carbamates : principalement la GTX1, la GTX2, la GTX3, la GTX4 et la STX.

- **Agadir**

Le profil toxinique des moules d'Agadir collectées durant les périodes toxicité de 2004, 2005 et 2006 a montré une prédominance des toxines carbamates par rapport aux autres toxines PSP. Le profil toxinique trouvé dans la chair totale des moules de Tifnit prélevées en juin 2004 et 2006 a été dominé par les toxines carbamates GTX-1, GTX-2, GTX-3 et STX par contre celui des différents organes de la moules de la même période de 2004 a été caractérisé par des taux élevés de GTX2 et de GTX3 et par la présence de la STX dans les gonades+le manteau (36%) et dans les

glandes digestives (7.5%). La GTX4 n'a été détecté que dans les glandes digestives avec un taux très faible ne dépassant pas les 4% (Figure 18).

A Cap ghir, le profil toxinique enregistré dans la chair totale durant les périodes estivales des années 2004, 2005 et 2006 est caractérisé aussi par la présence des toxines carbamates, la GTX-2 et la GTX-3 ont été les toxines les plus dominantes et les plus fréquentes des toxines carbamates. L'analyse des phycotoxines dans les organes de la moule de juin 2004 a montré qu'à l'exception de la STX dans les gonades+manteau, toutes les toxines carbamates ont été détectées dans des glandes digestives et les gonades+manteaux. 1%, 56.16%, 22.49, 6.7 et 20.98 % ont été Les maximums de la STX, GTX-1, GTX-2, GTX-3 et GTX-4. A Laâyoune, et plus précisément à Akhfennir, les principales toxines délectées dans les moules de ce site ont été la STX, GTX-2 et La GTX-3 (Figure 19).

- **Laâyoune**

A Laâyoune, en plus de la dominance de la GTX2 la GTX3 et la STX ont été détectées dans les moules d'Akhfenir durant les deux périodes de toxicité de 2003 et de 2005. 75% et 65% ont été les maximums de la GTX-2 détectées dans la chair totale des moules de Mai 2003 et d'Aout 2005. Au niveau des organes des échantillons de 2003, la GTX-2 a été encore une fois la toxine la plus dominante avec 28% dans les glandes digestives et 100% dans les branchies et le muscle suivi par les GTX-3 11% dans les gonades+manteau (28%). La GTX-4, GTX-1 et la STX ont été détectées juste dans les glandes digestives respectivement avec 11%, 46% et 4% (Figure 20).

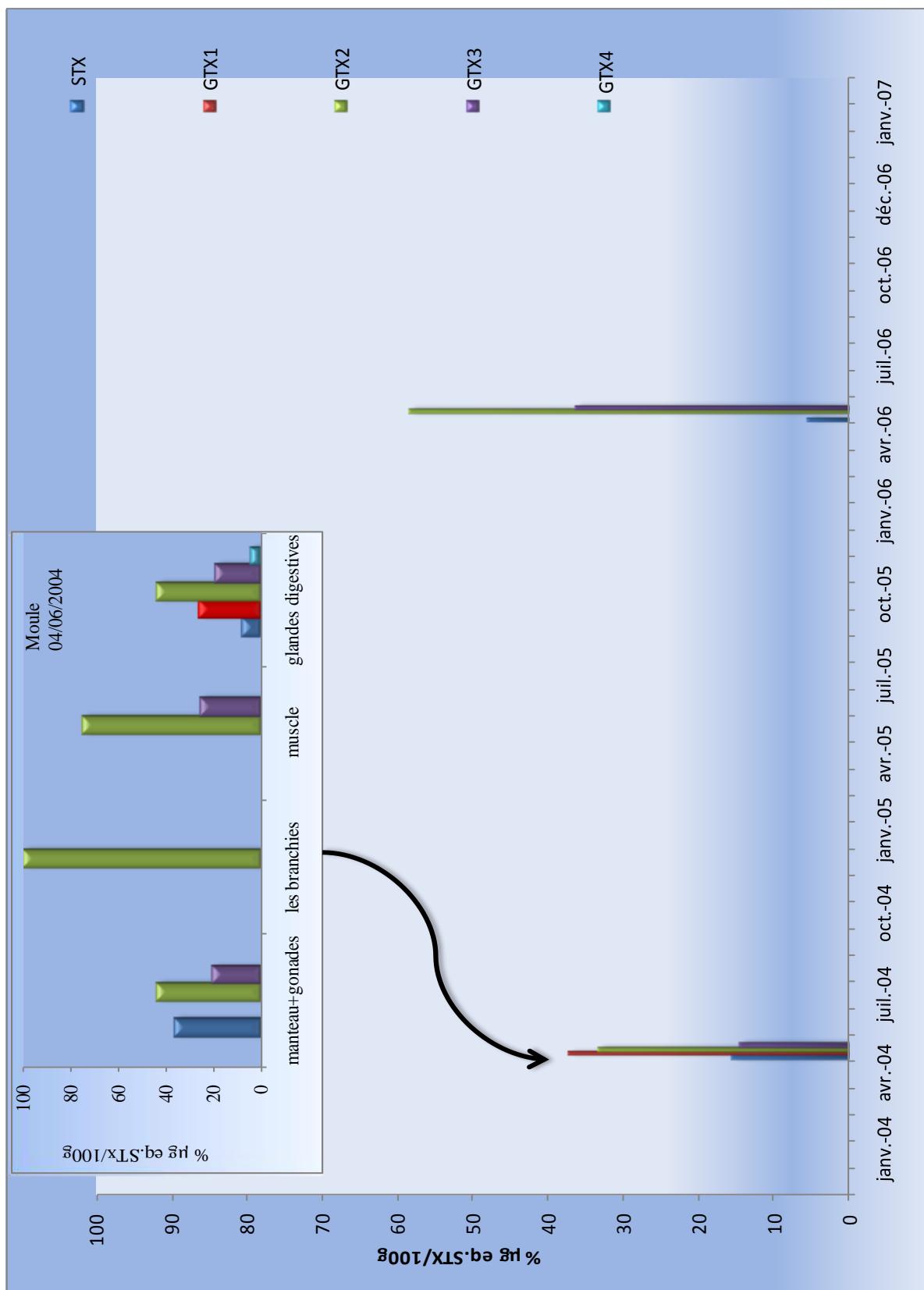


Figure 18 : Profil des toxines PSP détectées dans les moules de Tifnit durant les périodes de toxicité de 2004 et 2006.

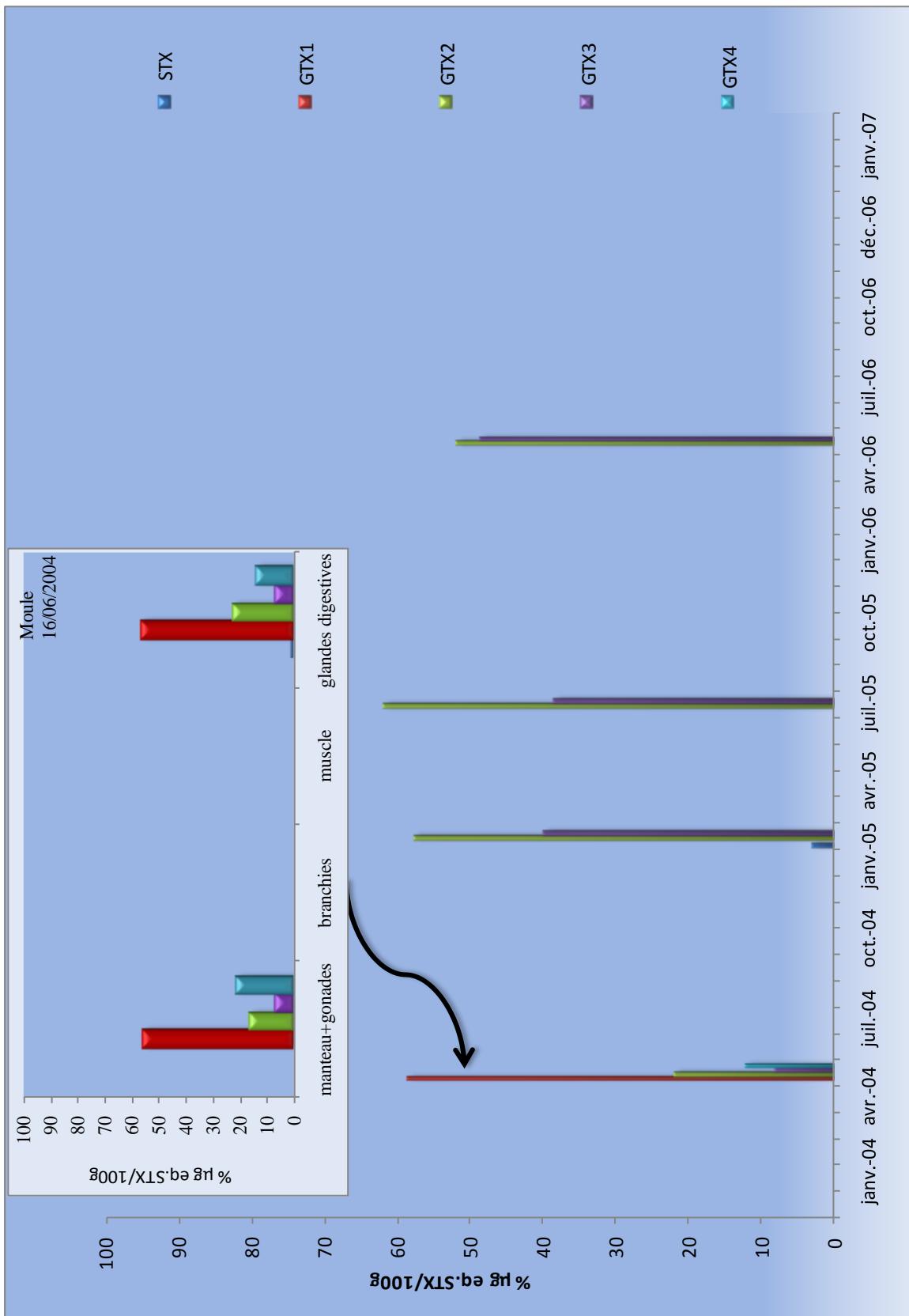


Figure 19 : Profil des toxines PSP détectées dans les moules de Cap ghir durant les périodes de toxicité de 2004 et 2006.

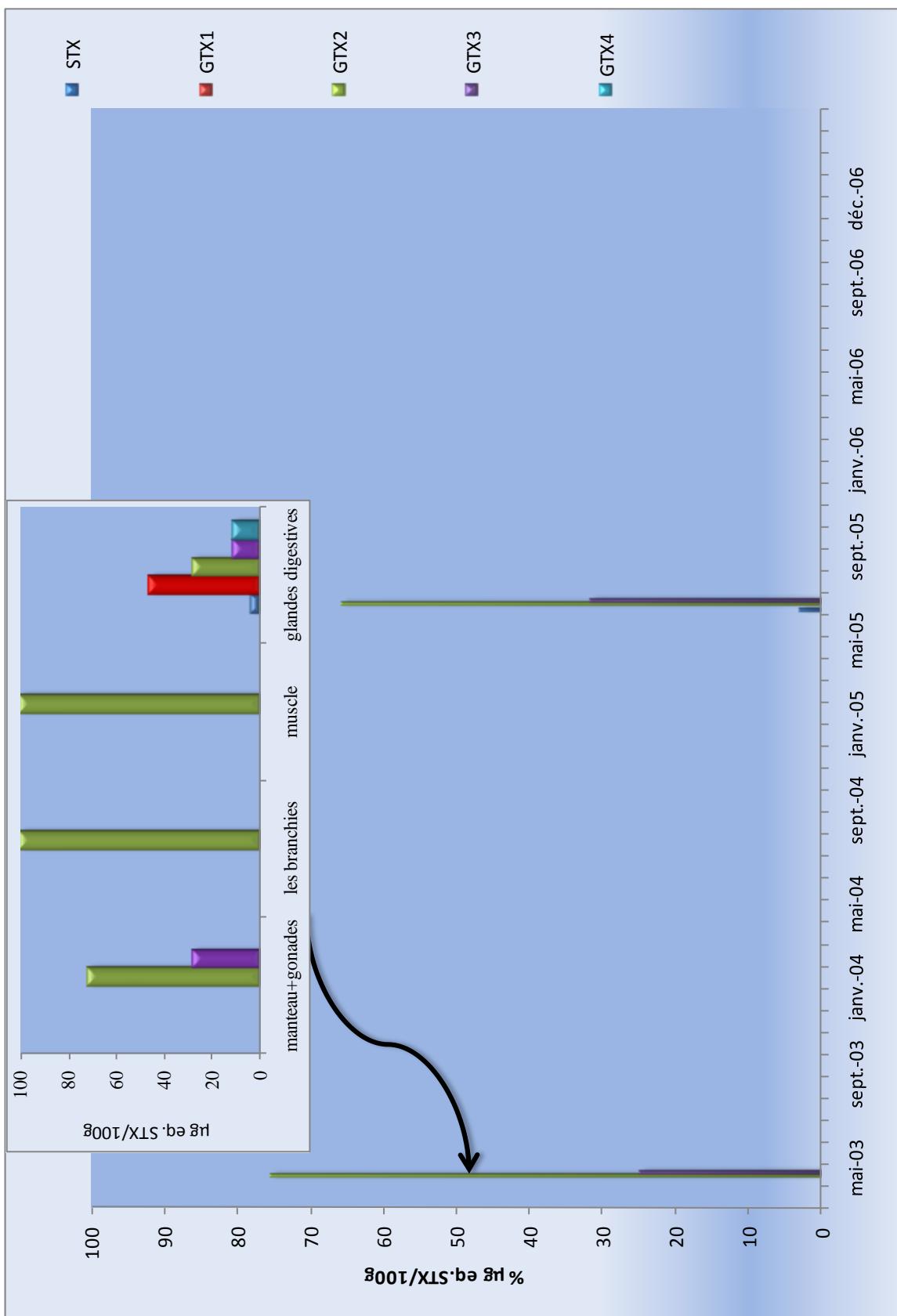


Figure 20 : Profil des toxines PSP détectées dans les moules d'Akhfenir durant les périodes de toxicité de 2003 et 2005.

- **Dakhla**

Au niveau de la région Dakhla, l'étude du profil toxinique a intéressé la chair totale de quatre espèces de coquillage qui ont accumulées les toxines durant les trois périodes de toxicité de 2004, 2006 et 2007. Par contre au niveau des organes, cette étude a intéressé les échantillons de 2004 (période de toxicité générale). Le premier résultat à tirer de ces analyses, c'est la dominance des toxines GTX-2 par rapport à la GTX-3 et la STX.

Dans les moules d'Oumlabouire, les toxines détectées ont été la GTX-2 et la GTX-3 en 2004 et en 2006, la STX n'a été détectée qu'en 2004 avec un taux de 29%. Le profil des organes a montré que la GTX-2 est la toxine la plus dominante avec 54% du total des toxines présentes, suivi par la STX avec 29% et la GTX-3 avec 17% ces toxines n'ont été trouvées que dans les glandes digestives. Aucune toxine n'a été détectée dans les autres organes. Le profil des organes a montré que la GTX-2 est la toxine la plus dominante avec 54% du total des toxines présentes, suivi par la STX avec 29% et la GTX-3 avec 17% ces toxines n'ont été trouvées que dans les glandes digestives. Aucune toxine n'a été détectée dans les autres organes (Figure 21).

Dans la chair totale des coques de Boutilha de 2004 et 2006 les mêmes toxines que celle trouvées dans les moules d'Oumlabouire ont été détectées. La GTX-2, la toxine les plus dominantes suivies par la GTX-3 et la STX qui n'a été présente qu'en 2006 avec un taux faible ne dépassant pas les 7%. Au niveau des organes des coques de ce site, la GTX-2, la GTX-3 et la STX ont détectées qu'au niveau des glandes digestives respectivement avec les taux suivant 64%, 22% et 14% (Figure 22).

A Dunablanca, l'analyse de la chair totale des huitres de ce site de 2004 a révélé la dominance de la GTX-2 par rapport à la GTX-3. Ces deux types de toxines n'ont été trouvés que dans les glandes digestives avec une dominance de 71% pour la GTX-2 et 29% pour la GTX3 (Figure 23).

A Pk25, l'analyse du profil chimique des échantillons de couteau collectés durant les trois périodes de toxicité de 2004, 2006 et 2007 a montré la prédominance des toxines carbamates GTX2 par rapport à la GTX-3 et la STX, cette dernière n'a été détectée que dans les échantillons de 2006 avec un taux de 16%. L'analyse des du profil toxinique des organes du couteau effectuée en 2004 a révélé la présence de la GTX2 (77%) et de la GTX-3 (23%) que dans les glandes digestives de cette espèces de mollusques bivalves. Le siphon, le muscle et les gonades+ manteau n'ont pas accumulé de toxines (Figure 24).

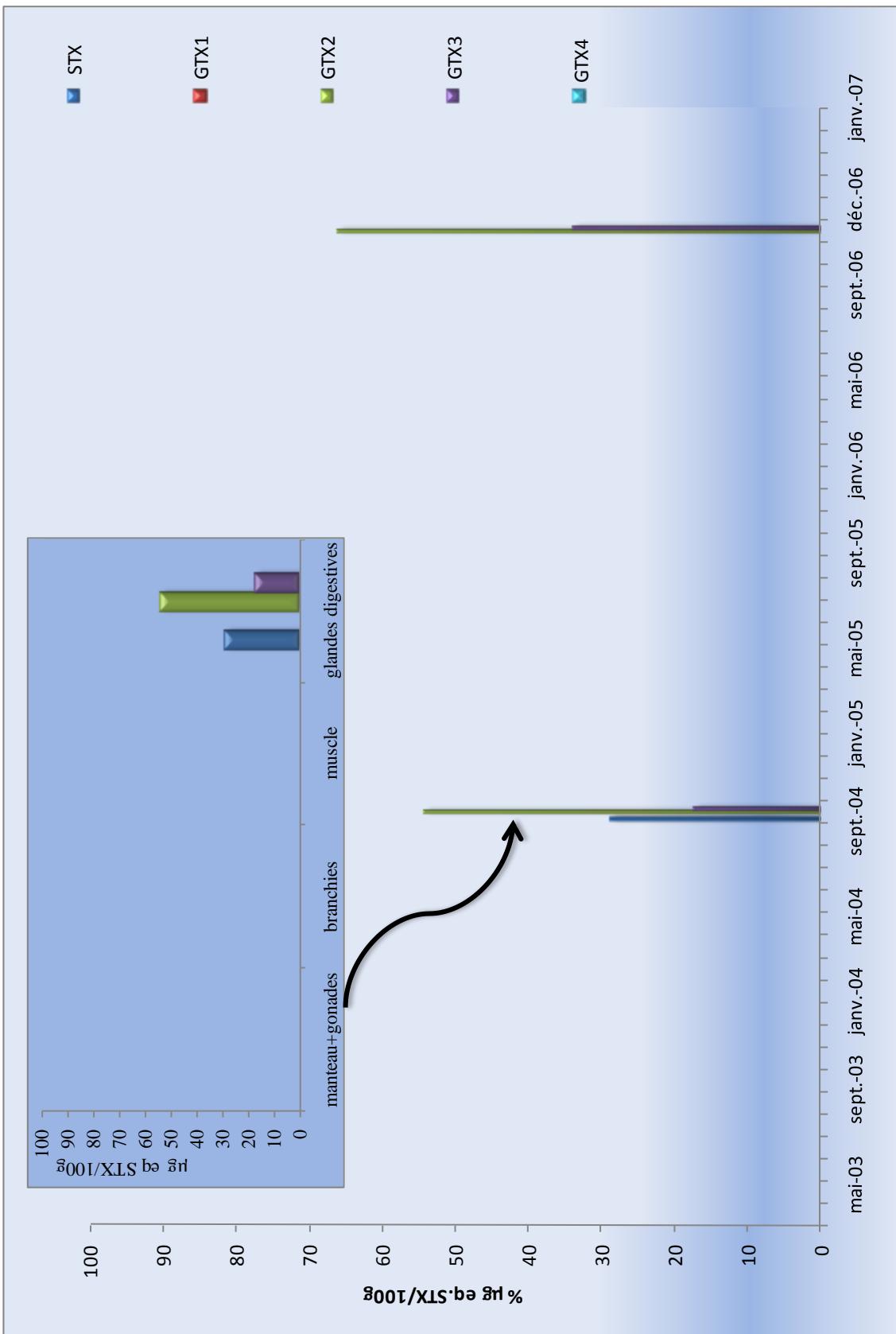


Figure 21 : Profil des toxines PSP détecté dans les moules d’Oumlabouir durant les périodes de toxicité de 2004 et 2006.

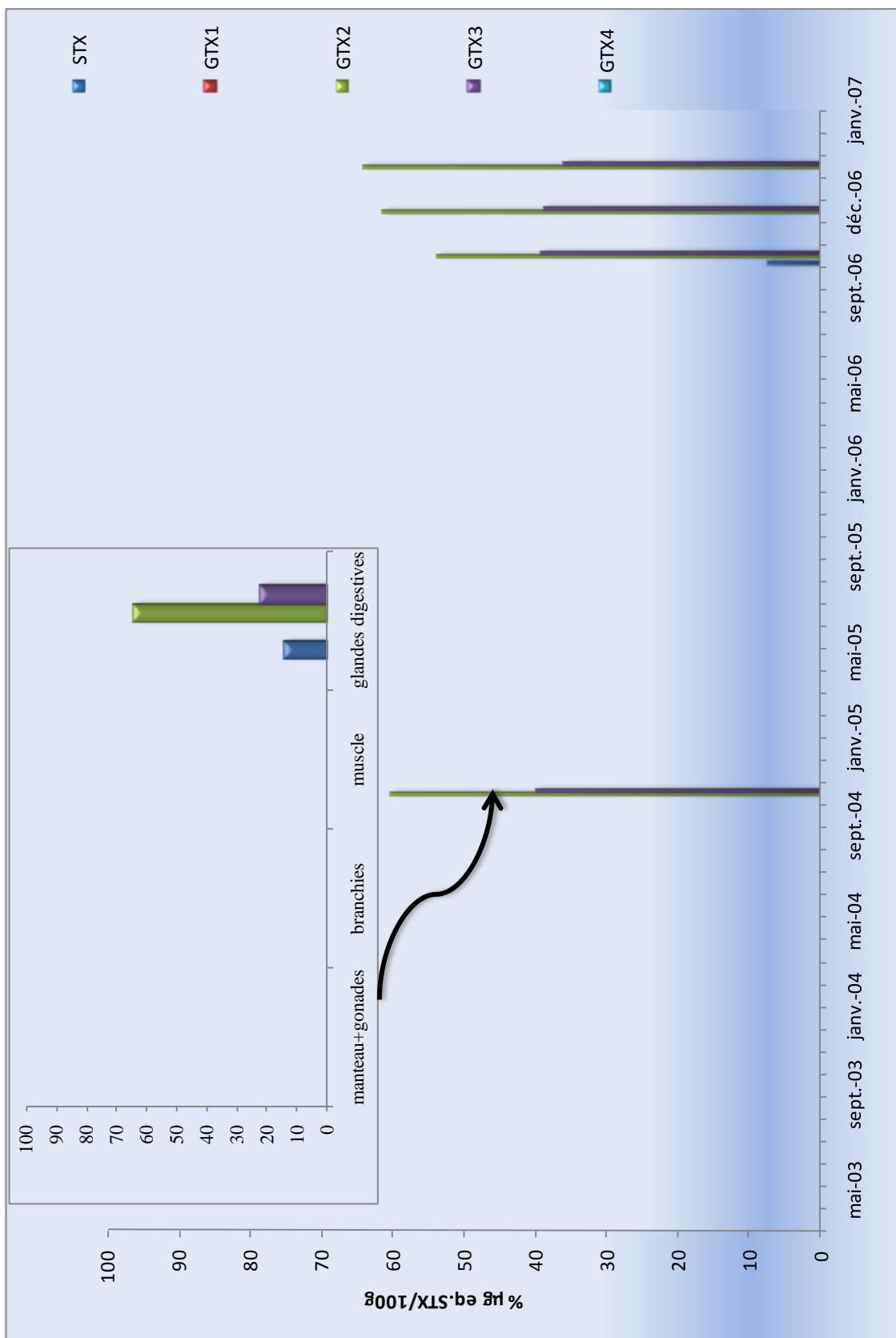


Figure 22 : Profil des toxines PSP détectées dans les coques de *Boutalha* durant les périodes de toxicité de 2004 et 2006.

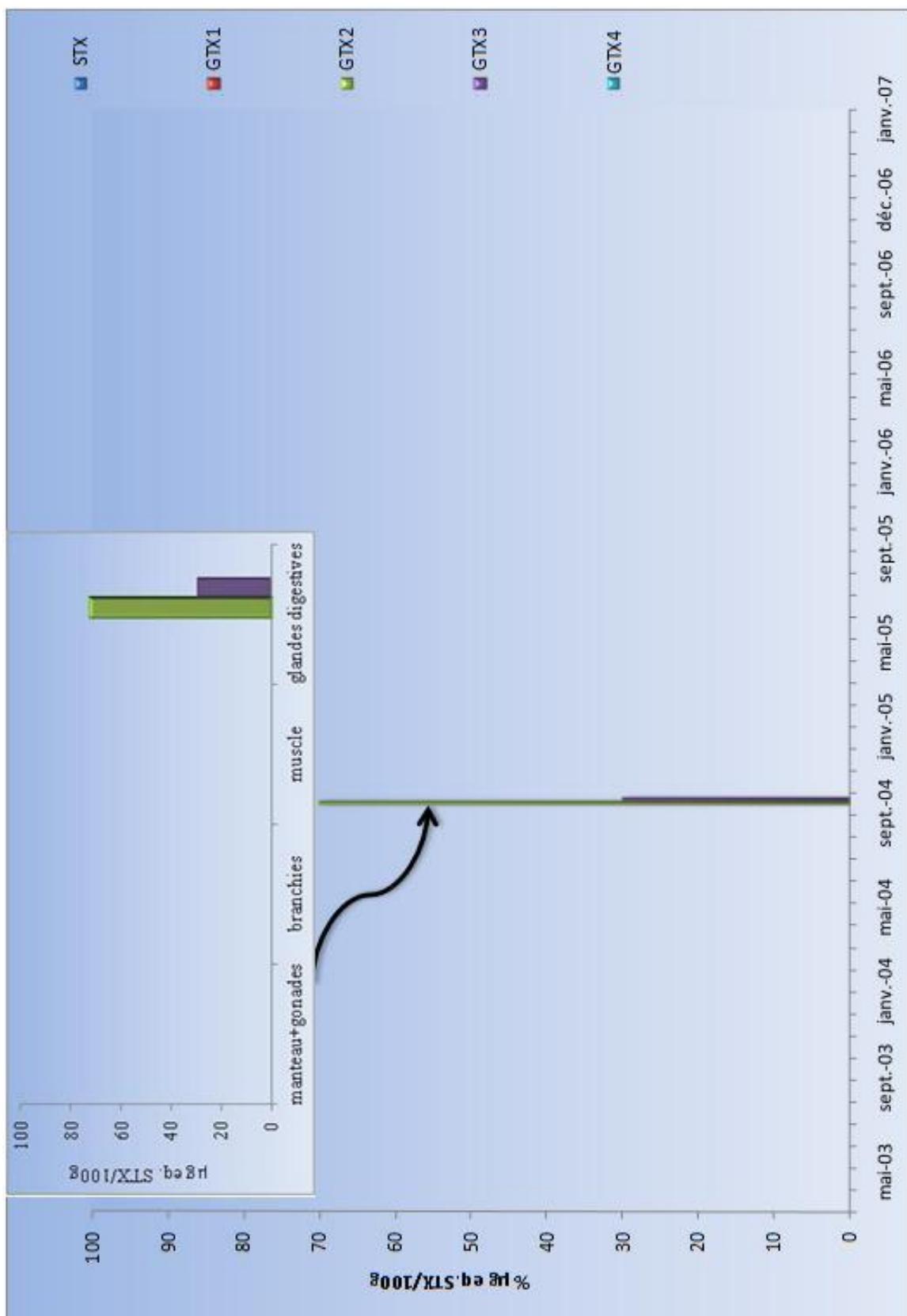


Figure 23 : Profil des toxines PSP détectées dans les huîtres de Dunablanca durant la période de toxicité de 2004.

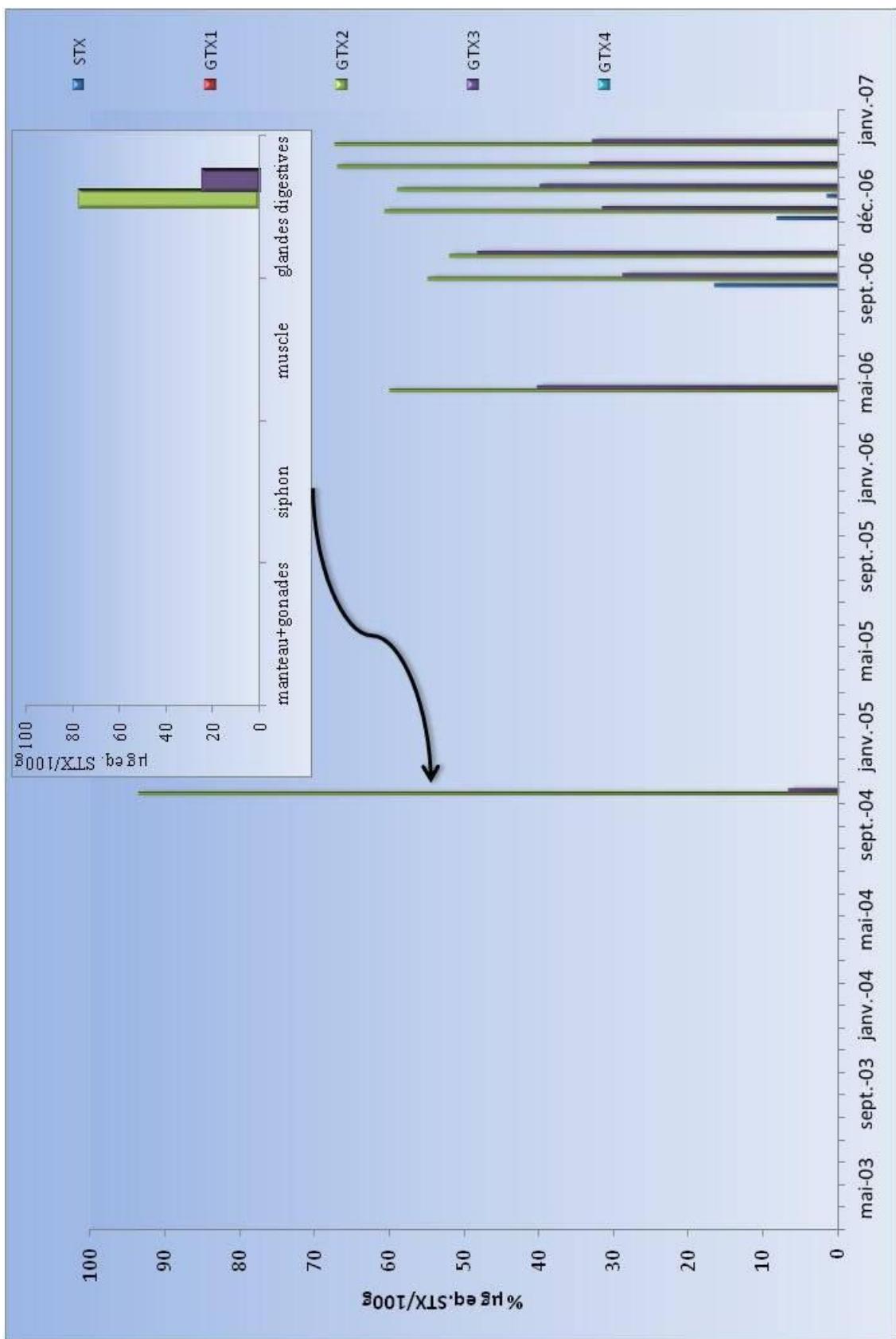


Figure 24 : Profil des toxines PSP détectées dans les couteaux de Pk 25 durant les périodes de toxicité de 2004, 2006 et 2007.

3.4. Espèces phytoplanctonique productrice de la PSP

Les analyses phytoplanctoniques par microscopie ont révélé la présence l'espèce phytoplanctonique *Alexandrium spp* dans l'eau de mer des trois régions étudiées. Cette espèce a été identifiée dans ces eaux durant toutes les périodes de toxicité.

- **Agadir**

A Tifnit, Les concentrations d'*Alexandrium spp* enregistrées tout au long de cette étude n'ont pas excédées à 1000 cellules/litre la norme marocaine établie pour cette espèce. Un maximum de 700 cellules/litre a été enregistré en Mai 2003, les autres concentrations variaient entre 0 et 80 cellules/litre. A Cap ghir, Le suivi microscopique d'*Alexandrium spp* dans l'eau de mer a montré que cette espèce a été identifiée durant tous les épisodes de toxicité. Les concentrations de cette cellule algale n'ont pas dépassées les normes adoptés pour cette espèce, le maximum 800 cellules.l⁻¹ a été enregistré en juillet 2007 (Figure 25)

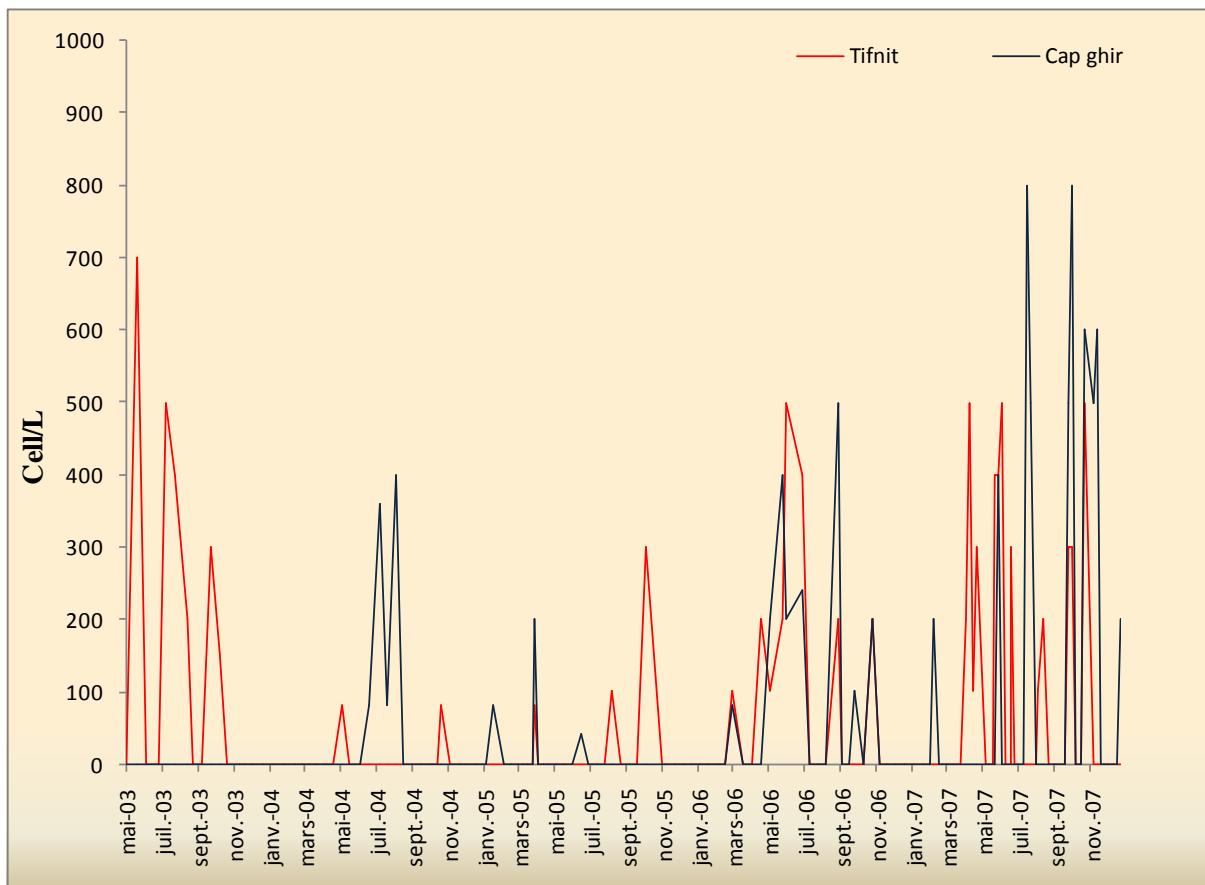


Figure 25 : Evolution mensuelle d'*Alexandrium spp* dans les eaux d'Agadir.

- **Laâyoune**

Les toxicités enregistrées au niveau de cette région ont coïncidé avec l'identification dans l'eau de l'espèce phytoplanctonique *Alexandrium spp* avec des taux dépassant les normes fixées pour cette espèce en fin printemps 2003 et en été 2005. Les concentrations enregistrées tout au long de cette étude variaient entre 40 et 1280 Cell.l⁻¹ notées pendant les deux périodes de toxicité (Figure 26).

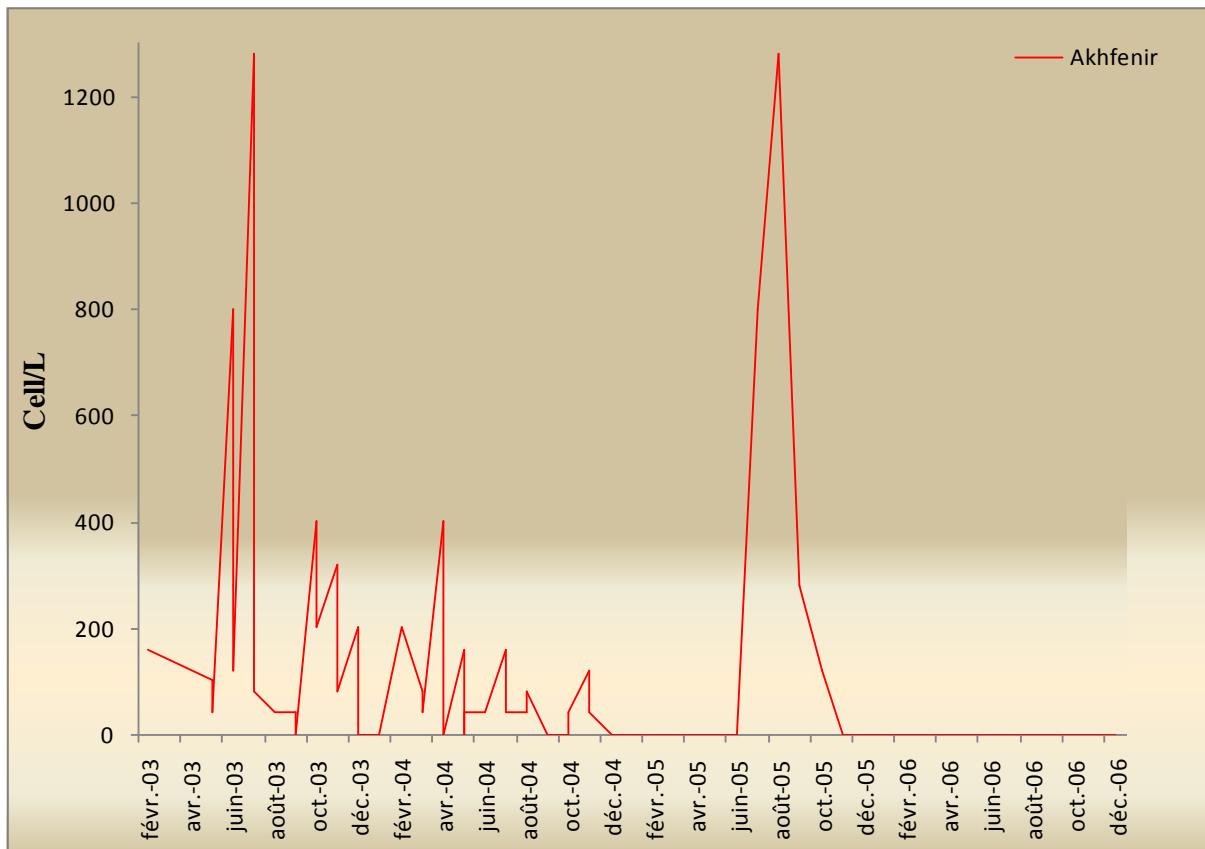


Figure 26 : Evolution mensuelle d'*Alexandrium spp* dans les eaux de Laâyoune

- **Dakhla**

Les analyses microscopiques d'eau de mer prélevée de la région de Dakhla a montré la présence d'*Alexandrium spp*, cette espèce algale, connue par sa production de toxines PSP, a été identifiée dans les eaux des deux milieux marins de la région Dakhla dans le littoral et la baie avec taux dépassant parfois la norme (1000 Cell.l-1).

- **Le littoral**

A Oumlabouir, *Alexandrium spp* a été présente dans l'eau de mer de ce site durant toute la période d'étude en atteignant des concentrations très élevées comme celle enregistrée en octobre 2003 avec 10300 Cell.l-1. Les concentrations cellulaires enregistrées durant la période de toxicité

de novembre 2004 ont été très faibles, elles ne dépassaient pas les 100 Cell.l⁻¹. A Dunford, la concentration maximale de cette espèce 33500 Cell.l⁻¹ a été détectée en janvier 2006 mais au cours de cette période les toxines PSP ont été non décelables malgré la présence de cette espèce phytoplanctonique durant les périodes de toxicité les concentrations d'*Alexandrium spp* n'ont pas dépassées les 100 Cell.l⁻¹ pendant l'épisode de toxicité de 2004 et les 200 Cell.l⁻¹en pendant celle de 2006. A N'tirift, malgré l'absence des toxines PSP dans les moules de ce site, *Alexandrium spp* a été identifiée à plusieurs reprise dans l'eau de mer. Les concentrations de cette espèce algale ont dépassées une fois la norme avec 1100 en septembre 2005 Cell.l⁻¹ (Figure27).

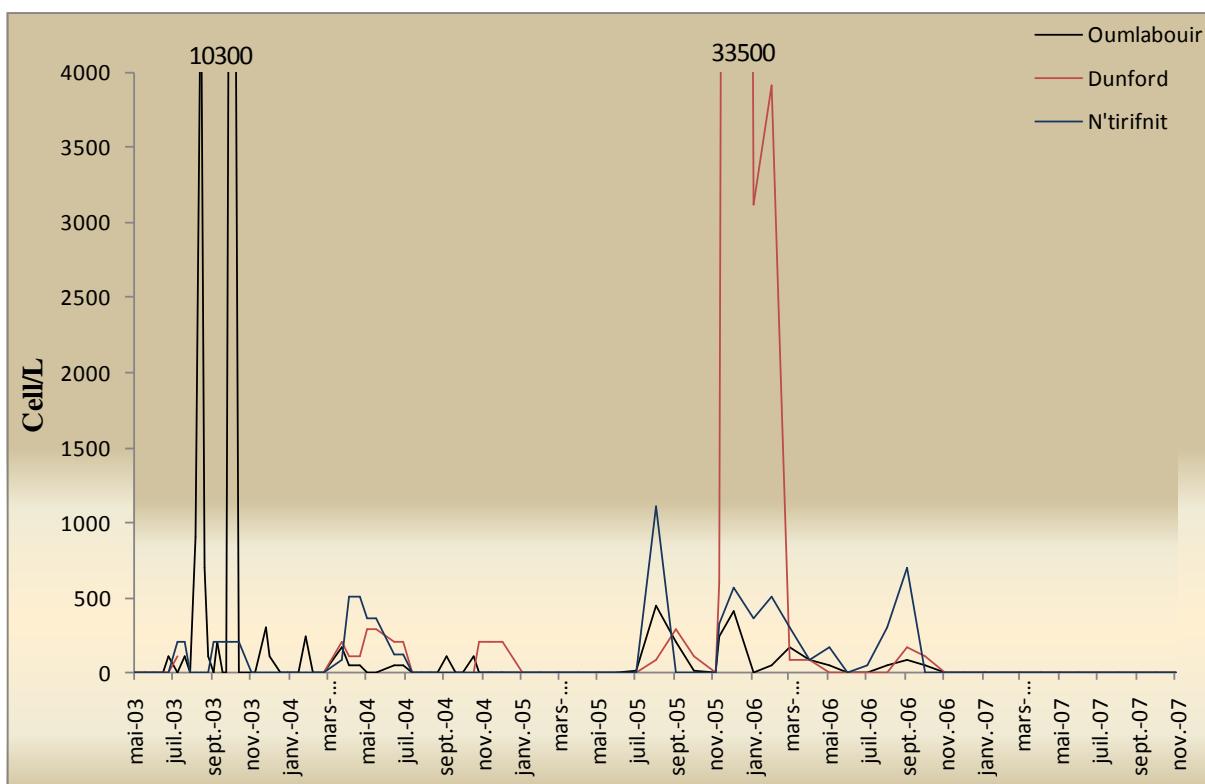


Figure 27 : Evolution mensuelle d'*Alexandrium spp* dans les eaux du littoral de Dakhla.

- La baie

A Hojallamira, *Alexandrium spp* a été observée avec des taux très faibles durant la période de toxicité (80 Cell.l⁻¹). Le maximum de cette cellule (1760 Cell.l⁻¹) a été enregistré en décembre 2006 en absence de toxicité des bivalves. A Puertitto, aucune cellule d'*Alexandrium* n'a été enregistrée au cours de la toxicité des coquillages de ce site, les maximums de concentrations ont

été 1200 et 5000 Cell.l⁻¹ trouvés respectivement en septembre 2003 et en décembre 2006 (Figure 28).

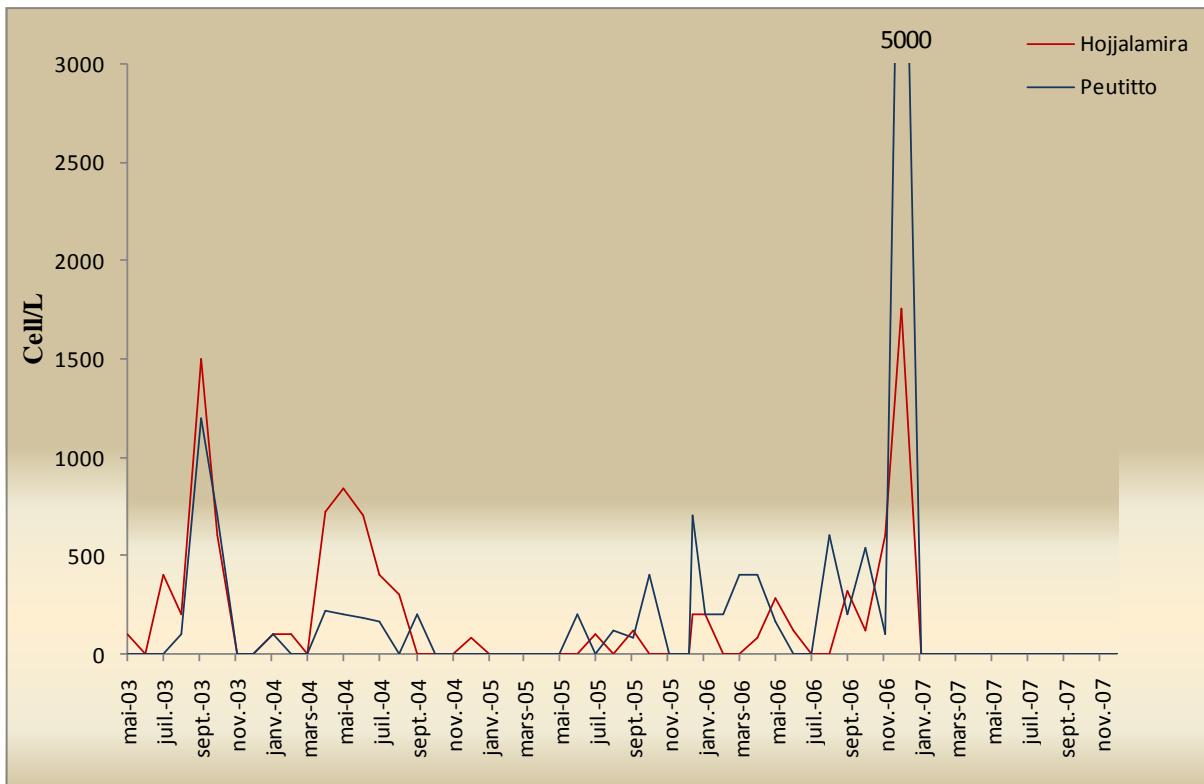


Figure 28 : Evolution mensuelle d'*Alexandrium spp* dans les eaux de la baie de Dakhla.

À PK25, des taux très élevés d'*Alexandrium spp* ont été enregistrées durant la période de toxicité de 2006 dans l'eau de mer de ce site, les concentrations Oscillaient entre 800 et 49400 Cell.⁻¹. Par contre en fin 2004 et début 2005 (première épisode de toxicité) les concentrations n'ont pas dépassées les 200 Cell.l⁻¹. A Boutalha, les analyses phytoplanctoniques d'eau de mer ont révélées la présence d'*Aléxandrium spp*, le maximum de concentration a été noté durant la période période de toxicité avec 18800 Cell.l⁻¹. A Dunablanca, des taux records d'*Alexandrium spp* ont apparus dans l'eau de mer de ce site avec 218000 Cell.l⁻¹, cette efflorescence algale a été enregistrée en Décembre 2005. Les concentrations trouvées durant les toxicités des coquillages à la fin de l'année 2004 et au début 2005 ont été très faibles par contre celles enregistrées lors de la deuxième période de toxicité ont dépassé largement la norme avec 2600 Cell.l⁻¹ en Novembre 2006 (Figure 29).

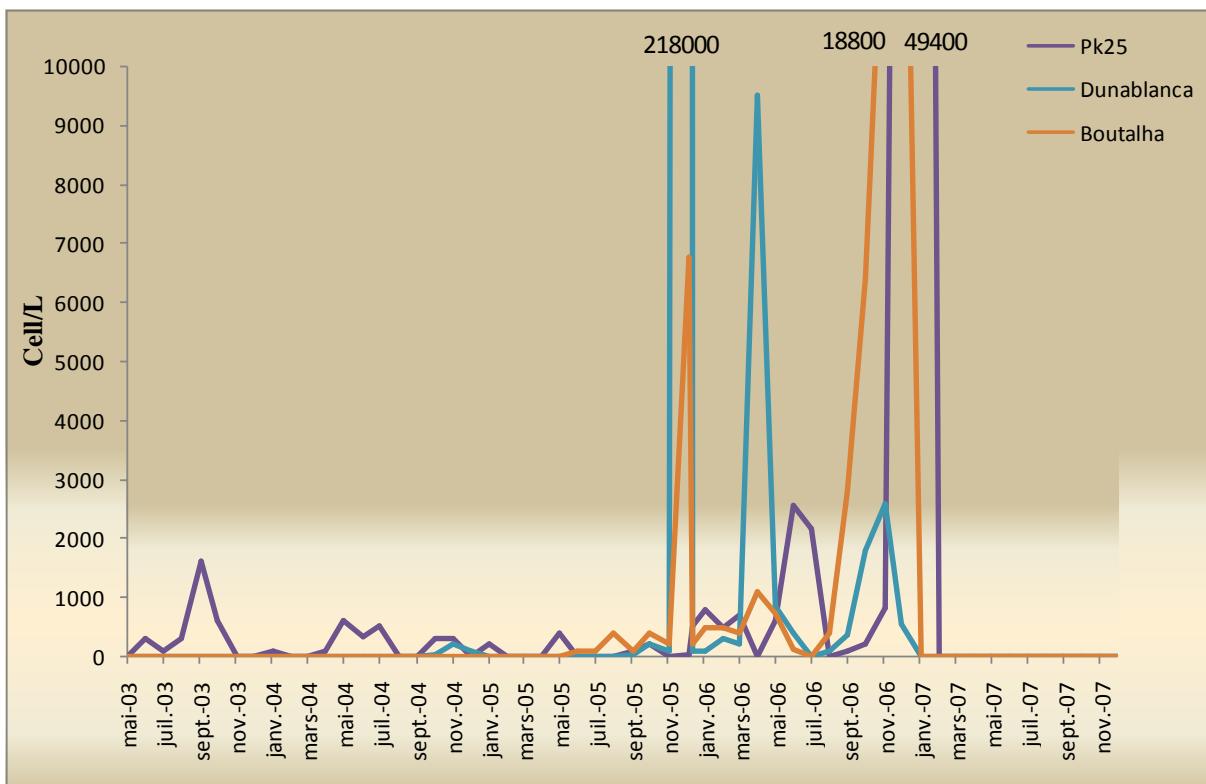


Figure 29 : Evolution mensuelle d'*Alexandrium spp* dans les eaux de la baie de Dakhla.

3.5. Comparaison entre les tests biologiques et test chimique

Les résultats des analyses chimiques par CLHP des échantillons prélevés au niveau des trois régions ont confirmé la toxicité décelée par le test biologique sur souris. Le tableau 3 montre la comparaison entre les données des deux tests, 100% des tests souris (TS) positif ont été trouvés positifs par CLHP et que 3% des TS négatifs ont été trouvés positif par CLHP. Cette comparaison a montré que les résultats des deux méthodes diffèrent d'une manière hautement significative

$$T_{obs} = 31,20 / \sqrt{\left\{ \left(\frac{31797,94}{31 * 32} \right) \right\}} = 5,51$$

T observée est comparée avec la valeur de T dans la table de distribution de t STUDENT à 31 Degrés de liberté. Pour α égal 5%, 1%, 0,1% ces valeurs sont respectivement égales à 2,0399 ; 2,7454 et 3,6365 après interpolation au niveau des tables de Student.

Tableau 3 : Comparaison entre les résultats du test souris et de CLHP-FD.

	Test souris Positif PSP > 32 µg		Test souris Négatif PSP < 32 µg	
	eq.STX/100g		eq.STX/100g	
	HPLC-FD positif	HPLC-FD négatif	HPLC-FD positif	HPLC-FD négatif
les moules	100%	0	8%	92%
les huîtres	100%	0	0	100%
les couteaux	100%	0	2%	98%
les coques	100%	0	2%	98%

3.6. Incidence de la toxicité PSP dans les différents sites étudiés.

Les résultats des analyses PSP dans les moules de l'atlantique sud marocain ont montré que les moules prélevées au niveau des sites nord de l'atlantique ont été plus touchés par ces phycotoxines que celles prélevées au niveau des sites qui se trouvent au sud. Les pourcentages des échantillons toxiques des moules d'Agadir ont été plus élevés (entre 8 et 10 %) que ceux des moules de Laâyoune (6.3%) et ceux de la région Dakhla (0% à N'tirift et 5 à Pk25). (Figure 30)

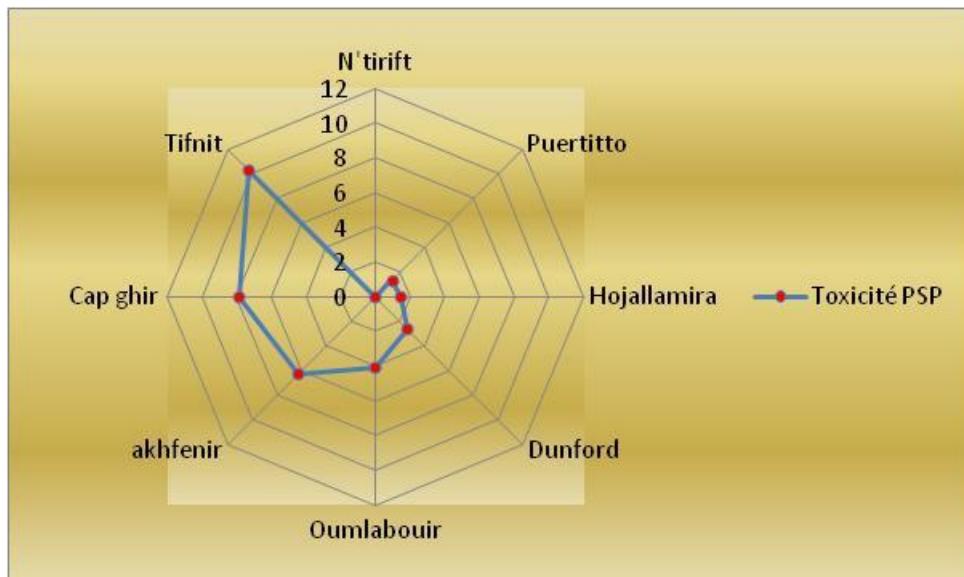


Figure 30 : Incidence de la toxicité PSP dans les moules des différents sites étudiés.

3.7. Comparaison entre la toxicité PSP des différents bivalves étudiés.

La comparaison entre pourcentage de toxicité PSP des différents mollusques de la baie de Dakhla à montré que les couteaux (6.18%), ont été plus touchés par ces toxines algales que les huîtres (1.84 %), suivis par moules (1.42 %) et par les coques (1.34 %). (Figure 31)

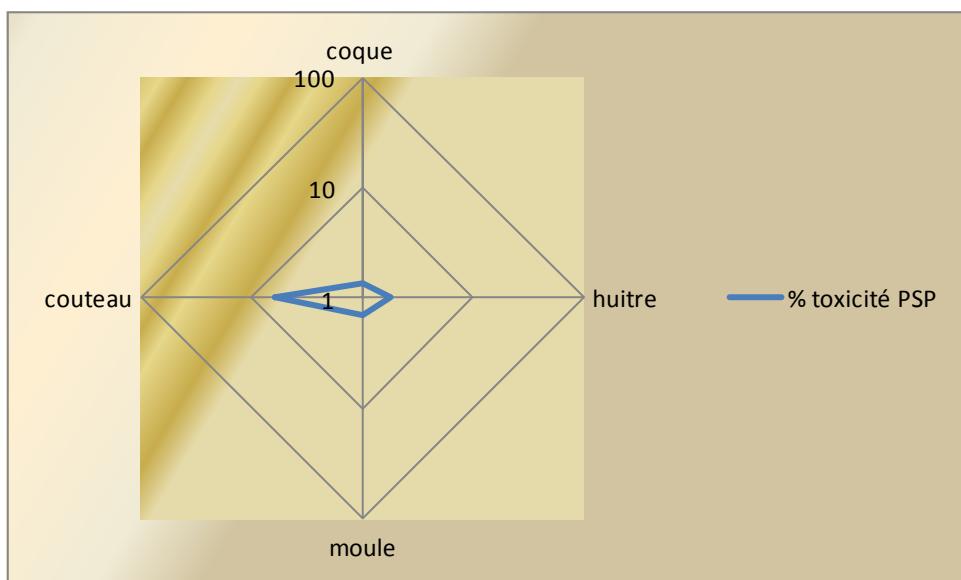


Figure 31 : Toxicité PSP des différentes espèces des mollusques bivalve de la baie de Dakhla étudiés.

3.8. Toxicité PSP dans les bivalves des différents sites étudiés (2008-2011).

L'analyse des phycotoxines paralytiques dans les bivalves des trois régions étudiées de 2008 à 2011 a montré que ces neurotoxines n'ont été détectées que dans les moules d'Agadir durant la période estivale de 2008 et durant Automne 2011. Par contre dans les quatre bivalves de Dakhla (moule, couteau, coque et et huitre) dans la moule de Laâyoune ces toxines n'ont pas été décelées.

Les concentrations détectées ont dépassées en novembre 2011 le seuil sanitaire établie pour ces toxines algales ($80 \mu\text{g eq STX}/100\text{g de chaire totale}$), par contre en juin 2008 le taux enregistrés ont été très faible. La figure 32 montre la détection de ces toxines dans les moules d'Agadir depuis le début de cette étude sur les PSP en 2003 jusqu'à 2011.

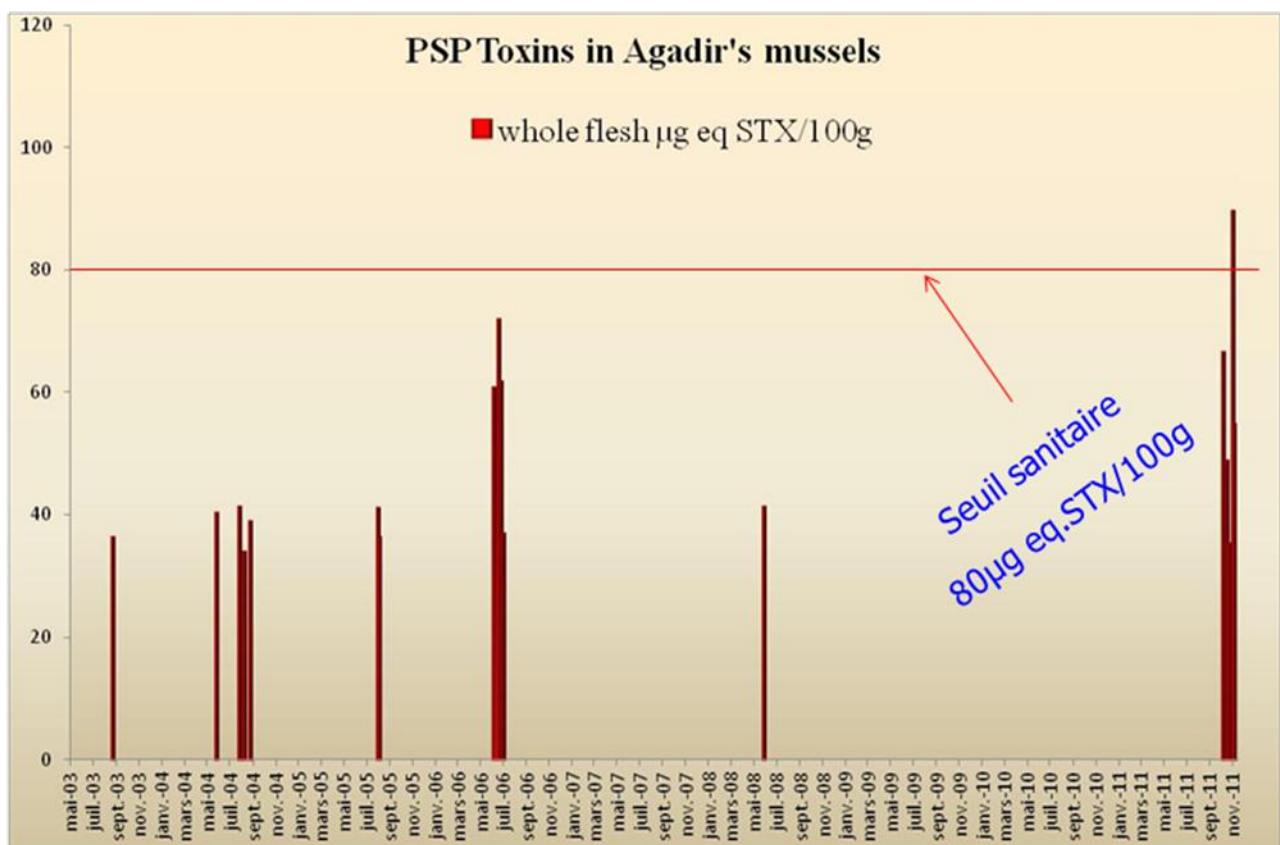


Figure 32 : Toxicité PSP dans les moules d'Agadir de 2003-2011

4. Discussion

Cette étude a montré que les toxines PSP détectaient dans la chair totale des bivalves des trois régions n'ont dépassé la norme adopté par l'Institut National de Recherche Halieutique (80 $\mu\text{g eq STX/100g}$) qu'à une seule reprise dans les couteaux de Pk25 prélevés en décembre 2006, par contre tous les autres échantillons ne présentaient aucun risque de toxicité paralytique pour le consommateur de ces mollusques bivalves.

Ces toxines algales ont été décelées principalement durant les périodes chaudes à Agadir et à Laâyoune (périodes estivales) et par contre à Dakhla ces toxines ont apparu durant les saisons hivernales et automnales.

Les toxines PSP durant les périodes chaudes a été précédé par des poussées d'*Alexandrium* spp en fin printemps et début été ceci est en accord avec l'étude menée par Faikech et al. (2005) sur les populations phytoplanctoniques dans les eaux d'Agadir qui indique que les concentrations maximales d'*Alexandrium minutum* ont été détectées durant la saison du printemps, ces

efflorescences ont été observées à des températures d'eau de mer entre 17 et 19 °C et des salinités voisines de 35.6 PSU.

Les taux non alarmants de ces toxines dans les moules d'Agadir et de Laâyoune peuvent être expliqués par les faibles concentrations d'*Alexandrium* spp qui dépassaient rarement les 1000 Cellule/litre. Par contre les fortes concentrations d'*Alexandrium* spp. qui ont coïncidé avec l'absence de toxicité des coquillages, peut être expliquer par la variabilité de la toxicité d'*Alexandrium*, qui dépend des conditions environnementales, chez l'espèce et la souche (Anderson, 1990).

La comparaison de la toxicité des bivalves de la baie de Dakhla a montré que les espèces fouisseuses et plus précisément les couteaux ont été les plus fréquemment toxiques que les autres espèces et que l'huître a été l'espèce la moins touchée par ces toxines algales. Cette différence de toxicité est probablement due au mode de nutrition des bivalves fouisseurs qui absorbent les particules en suspension les plus fines (suspensivore) ou récoltent celles déposées sur le sédiment grâce à son siphon (dépositivore) par contre les filtreurs comme les huîtres et moules ne se nourrissent que de la matière en suspension.

Pour la comparaison entre les différents sites étudiés a montré que ceux d'Agadir et de Laâyoune ont été plus touchés par les toxines PSP que ceux de Dakhla : le gradient de détection des toxines PSP a été nord-sud.

Concernant la répartition tissulaire de ces toxines, le maximum de la toxicité et la majorité des toxines PSP ont été enregistrés dans les glandes digestives, des résultats semblables ont été rapportés par Bricelj et Shumway en 1998.

Ce pendant, le gradient d'accumulation des toxines PSP par les différents organes des bivalves de l'Atlantique sud marocain a montré que les glandes digestives ont accumulé ces toxines plus que les gonades + manteau suivi par les branchies par contre le muscle adducteur a été l'organe à accumuler très faiblement les toxines PSP. Comme il a été montré expérimentalement et en accord avec la littérature, la glande digestive est le tissu qui accumule le plus les toxines du contenu toxinique total (Silvert & Cembella 1995, Gueguen et al. 2008) alors que les tissus locomoteurs c'est l'organe qui accumule le moins.

Mais cette répartition des toxines paralytiques dans les différents tissus est variable d'une espèce de bivalve à l'autre, l'étude menée sur la coque de la méditerrané a montré l'importante contribution du pied dans la toxicité totale de ce bivalve chose qui caractérise les bivalves à décontamination lentes soit : pied > glande digestive > manteau > branchies > muscle (Sagou et al.

2005). De plus, la détoxication ne s'effectue pas à la même vitesse pour les différents tissus (Chen & Chou 2002, Yu et al. 2005).

Concernant l'identification de la relation entre les nature des toxines PSP décelées dans les bivalves et l'espèce toxique du phytoplanctonique, le profil toxinique des glandes digestives a été comparé avec celui d'*Alexandrium minutum* obtenu d'autre pays et ceci à cause du manque de données sur les profils toxiniques des espèces d'*Alexandrium* des côtes marocaines. Cette espèce phytoplanctonique est connue dans la littérature par sa synthèse des toxines PSP (Wright, 1995).

La compositions en toxines PSP au niveau des glandes digestives a été différentes de celle des autres organes et elle a montré une bonne ressemblance avec certaines souches d'*Alexandrium minutum* prélevées du Taiwan (Chen and Chou, 1998; Hwang et al., 1999), d'Ireland (Touzeta et al., 2007) et au niveau de l'mer adriatique et des côtes françaises (Ledoux et al., 1991) où la GTX-3 et la GTX-2 sont les toxines les plus abondantes par rapport aux autres toxines carbamates. Les souches australiennes (Oshima et al., 1990), espagnoles, portugaises (Franco et al., 1995) ont montré un profil différents avec une dominance de GTX-1 et GTX-4. Ce profil toxinique des bivalves du sud marocain est caractérisé par une dominance des GTXs (GTX-2 et GTX-3 > GTX-1 et GTX-4) et une minorité de STX. Des résultats semblables ont été rapportés par Taleb et al. 2003 où les haricots de mer prélevés du nord d'Agadir ont montré un profil à 100 % de GTX1-4. Selon des études antérieures sur l'accumulation tissulaire des toxines par les bivalves (Cembella et al., 1994), le profil des glandes digestives des bivalves est toujours proche des cellules phytoplanctoniques ingérées qui sont presque intact dans ces organes. Donc, les résultats de cette étude supposent qu'*Alexandrium minutum* est fort probablement le principal producteur des toxines PSP au niveau des côtes sud de l'Atlantique marocain.

Cette espèces a déjà été observée et identifiée par microscopie électronique dans les eaux des côtes de l'Atlantique marocain (Bennouna et al., 2000, 2008) durant les périodes de toxicité des bivalves de 1998 et 1999 (Taleb., 2005).

La comparaison entre les résultats des deux tests utilisés dans la détection de ces phycotoxines marines, le test souris et HPLC-FD, a montré qu'il y a une forte différence entre les deux. Plusieurs étude ont montré que le test souris est une méthodes non sélectives et non sensible dans la détection des faibles quantités en toxines PSP surtout pour les concentrations avoisinantes à la limite de détection (32 µg eq STX/100 g), par contre pour les fortes concentrations ce problème ne se pose pas car le test biologique montre une très bonne détection des toxines paralytiques (Ujevicv et al., 2012).

Chapitre 4

**« Etude des phycotoxines lipophiles dans les
mollusques bivalves de l'Atlantique sud marocain »**

1. Introduction

Depuis 2002, plusieurs cas de toxicité des mollusques bivalves ont été enregistrés au niveau des côtes sud de l'Atlantique marocain. Cette toxicité a été détectée par le test biologique sur souris, par la méthode de référence pour la détection des phycotoxines lipophiles au Maroc (Yasumoto et al., 1978 ; 1984).

Vu le manque de données sur le profil des toxines lipophiles de la zone sud du Maroc, cette étude vise l'identification du profil toxinique dans les échantillons toxiques depuis 2003 jusqu'à 2007, ainsi que l'identification des espèces phytoplanctoniques soupçonnées dans les événements de toxicité.

Dans cet objectif, plusieurs toxines lipophiles telles que l'A.O, DTXs, PTXs, YTXs et AZAs, ainsi que d'autres toxines lipophiles à action rapide comme les gymnodimines GYM ont été recherchées simultanément dans les bivalves des côtes de l'Atlantique sud. Cette caractérisation du profil toxinique a été effectuée par CL-MS basé sur l'ionisation électro-spray (ESI), méthode à sensibilité très élevée.

Les résultats de cette méthode chimique ont été comparés à ceux de la méthode biologique (MBA). Aussi, l'identification et l'énumération des espèces phytoplanctoniques productrices des phycotoxines diarrhéiques ont été suivies par microscopie photonique durant cette étude.

2. Matériel et méthodes

Les phycotoxines lipophiles ont été analysées par méthode biologique sur souris. La présence ou l'absence de ces phycotoxines ont été suivies dans les glandes digestives des coquillages. Par contre le profil chimique a été réalisé par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (CL/MS).

2.1. Test biologique sur souris

La détection des phycotoxines lipophiles a été effectuée par la méthode de Yasumoto 1984 modifiée. Cette méthode consiste à l'injection d'un extrait dans la cavité intra péritonéale des souris de poids entre 18 et 20 g. Cet extrait est obtenu après une double extraction, la première est acétonique et la deuxième est effectué avec du dichlorométhane et de l'eau.

• Produits et matériel d'analyse

Produits	Usage
Tween 60	Solubilisation des résidus obtenus après évaporation
Acétone	Extraction des toxines lipophiles
Dichlorométhane.	Extraction des toxines lipophiles

Matériel	Usage
Ultra turrax	Broyage
Evaporateur rotatif (Rotovapeur) avec ballons adaptables de capacités 500ml	Évaporation sous vides des solvants
Filtres plissés	Filtration de l'extrait
Seringues	Injection
Ampoule à décantation	Séparation entre phase organique et phase aqueuse.

- Extraction des toxines

25g d'hépatopancréas sont broyées en présence de 50 ml d'acétone. Le broyat est ensuite filtré et récupéré dans un ballon de 500ml. Le résidu restant dans le filtre est repris avec 50 ml d'acétone, puis broyé et filtré. Ce filtrat est récupéré dans le même ballon. Cette étape est répétée une troisième fois jusqu'à l'obtention d'un volume final de 150ml d'extrait acétonique.

Dans le but d'obtenir un résidu, l'acétone est évaporée sous vide au moyen d'un évaporateur rotatif à une température comprise entre 30 et 40 °C. Après évaporation, le résidu est repris avec de l'eau (volume total du mélange est de 15 ml). Ce mélange est traité avec 50 ml de dichlorométhane dans une ampoule à décantation. Deux phases sont séparées, fractions organique (contenant les toxines lipophiles) et aqueuse (élimination des toxines PSP). Cette dernière phase est reprise avec 50 ml de dichlorométhane. Cette étape est répétée une deuxième fois. Le volume final obtenu est de 150 ml. Le dichlorométhane est évaporé sous vide à l'aide du rotovapeur à une température entre 30 et 40°C. Le résidu obtenu est solubilisé dans 5ml du tween 60 (1%),

- Injection

Trois souris sont injectées. 1 ml de l'extrait est injecté dans la cavité intrapéritonéale d'une souris *Suisse albinos*.

- Calcul de la toxicité

Le test est considéré comme positif si au moins deux souris sur trois sont mortes dans un délai de 24h après l'injection.

2.2 Test chimique par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. (CLHP/MS).

Le profil chimique des toxines lipophiles a été obtenu par la chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse (CLHP/MS) selon la méthode de Holland et al. (2003). Cette méthode permet de séparer et d'identifier dans une seule analyse plusieurs types de phycotoxines lipophiles comme l'AO, les DTXs, les PTXs, les YTXs, les AZAs et les GYMs (figures I et II). Pour la détection des esters d'AO, du DTX-1 et du DTX-2 une hydrolyse des extraits a été effectuée avant l'analyse par HPLC

• Extraction des phycotoxines

- Solvant d'extraction :

Les produits suivant sont des solvants purs pour analyse : acétonitrile, hexane, eau pure, acide formique

- **Préparation de l'échantillon :**

2 g du broyat de chair totale sont homogénéisés avec 18.0 mL du méthanol–water (9 + 1, v/v) pendant 1 min (Goto et al. 2001). 2 ml de l'extrait est lavée avec 5 ml d'hexane puis centrifugé à 3400 tour/min pendant 10 min. le surnageant est filtré puis transféré à un autosampler pour analyse par CL/MS.

- **Hydrolyse des esters**

Pour la détermination des esters d'AO, du DTX-1 et du DTX-2 une hydrolyse alcaline des extraits (avant d'être lavés par l'hexane) a été effectuée selon la procédure du Mountfort et al. 2001. A 1 ml de l'extrait en ajoute 125 µl de NaOH 2.5M, le tout est mélangé dans un vortex pendant 1min puis chauffé pendant 40 min à 76°C. Après refroidissement dans un bain de glace, le mélange est neutralisé avec 125µl d'acide acétique (pH 5-7). L'échantillon est prêt pour l'analyse des esters par CL/MS.

• **Conditions de la chromatographie**

Le dispositif du CL-MS est constitué d'une pompe PE Série 200, Passeur automatique d'échantillons PE Série 200 et le Spectromètre de masse API 165 EX équipé d'un nébuliseur d'ions TIS (Turbo Ion Spray).

Le gaz de nébulisation est l'azote à une température de 450°C.

- **Le Volume d'injection**

10µl

- **La phase stationnaire :**

La colonne est de type Phenomenex, Luna 5 µm RP-C18, 150 mm x 2 mm.

La phase mobile:

(A) Acetonitrile–water (1 + 9,v/v);

(B) acetonitrile–water (9 + 1, v/v);

(C) 33mM d'hydroxyde d'ammonium et 500mM d'acide formique.

Tous ces solvants sont filtrés par des seringues-filtres de 0.45 µm de diamètre.

- **Température de la colonne : 30°C**

- Gradient :

Temps (min)	A%	B%	C%	Débit (ml/min)
0	85	5	10	0.7
2	85	5	10	0.7
10	5	85	10	0.7
15	5	85	10	0.7
15.1	0	90	10	0.7
25	0	90	10	0.7
30	5	85	10	0.7
35	85	5	10	0.7

- Les Paramètres de détection des toxines lipophiles

Pour la masse détection des toxines deux différents modes sont possible, positif et négatif, excepté les YTXs, les autres phycotoxines lipophiles ont été recherchées en mode positif (Tableau 1).

Tableau 1 : Paramètres de la CL-MS pour la détection des phycotoxines lipophiles.

Toxines	Mode	[M-H] ⁻	M	[M+H] ⁺	[M+NH ₄] ⁺	[M+Na] ⁺	[M-2H ₂ O+H] ⁺
AO	Positive		804.5			827.5	769.5
DTX-1	Positive		818.5			841.5	783.5
PTX-1	Positive		874.5		892.5	897.5	
PTX-2	Positive		858.5		876.5	881.5	
PTX-2 sa	Positive		876.5		894.5	899.5	
AZA-1	Positive		841.5	842.5			
AZA-2	Positive		855.5	856.5			
AZA-3	Positive		827.5	828.5			
GYM	Positive		507.3	508.3			
YTX	Négative	1142.5	1141.5				
45-OH-YTX	Négative	1158.5	1157.5				
Homo-YTX	Négative	1156.5	1155.5				
45-OH-Homo-YTX	Négative	1172.5	1171.5				

- Les standards

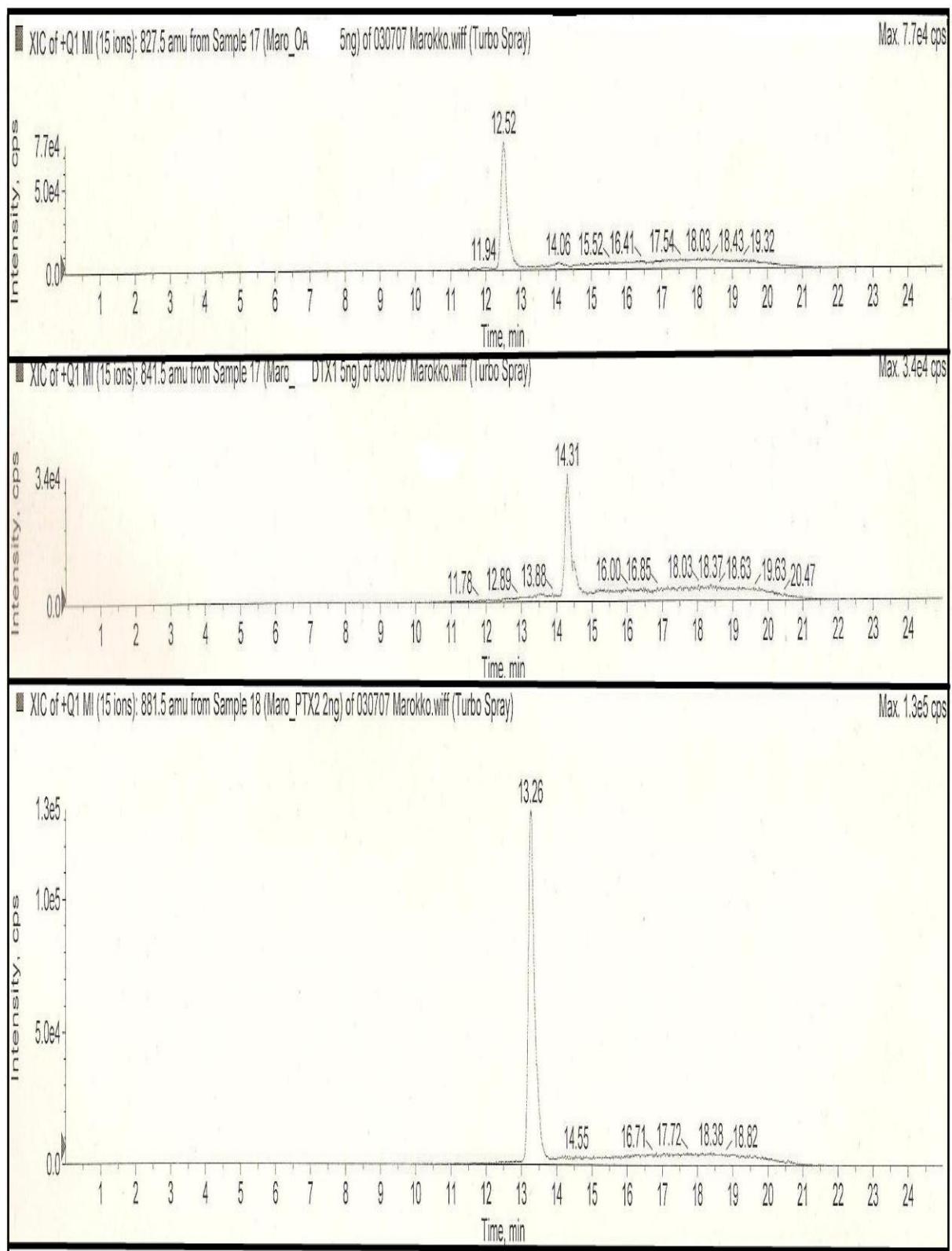


Figure 1 : Chromatogramme CL-MS des standards de l'AO, DTX-1 et du PTX-2.

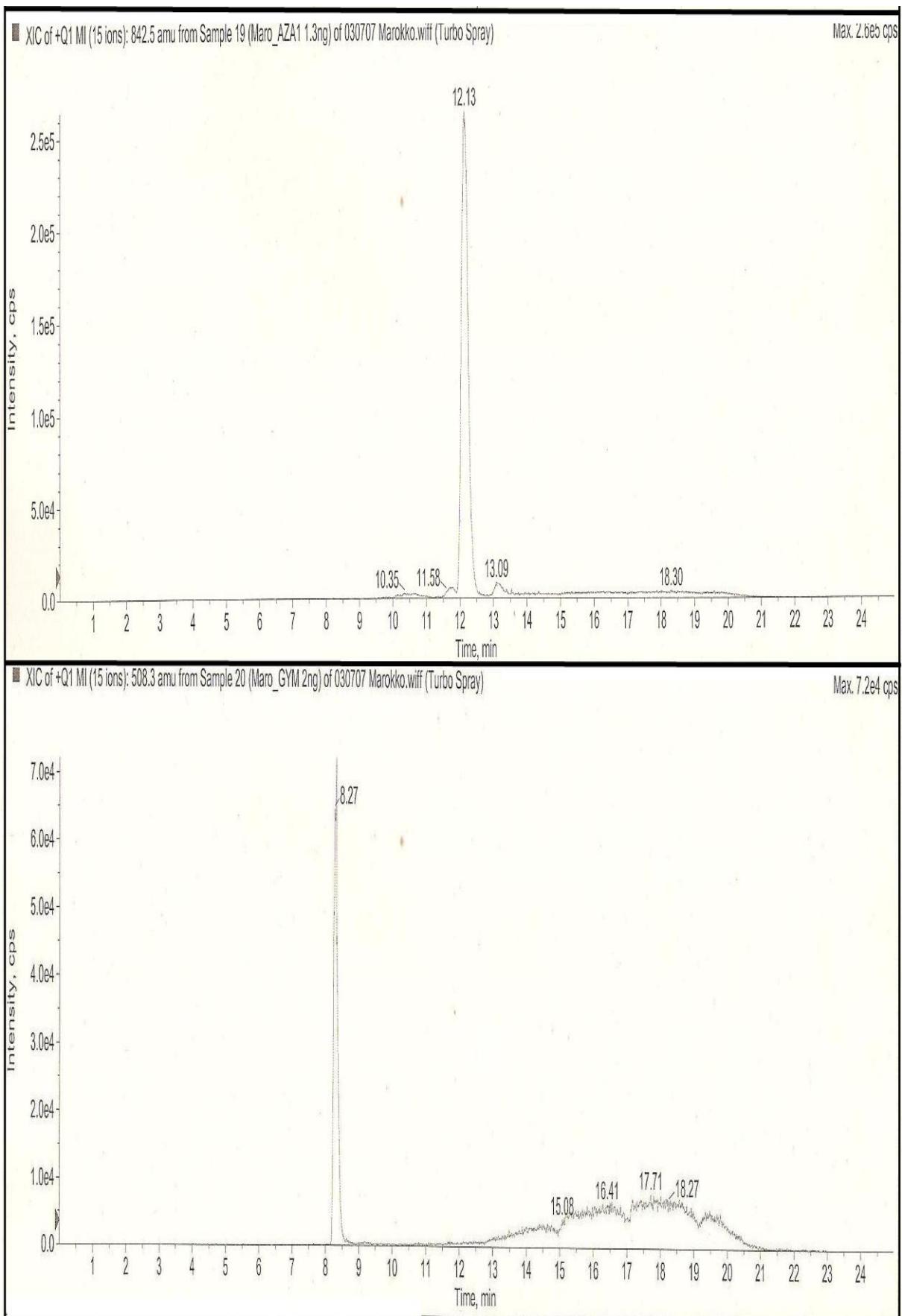


Figure 2 : Chromatogramme CL-MS des standards d'AZA-1 et GYM.

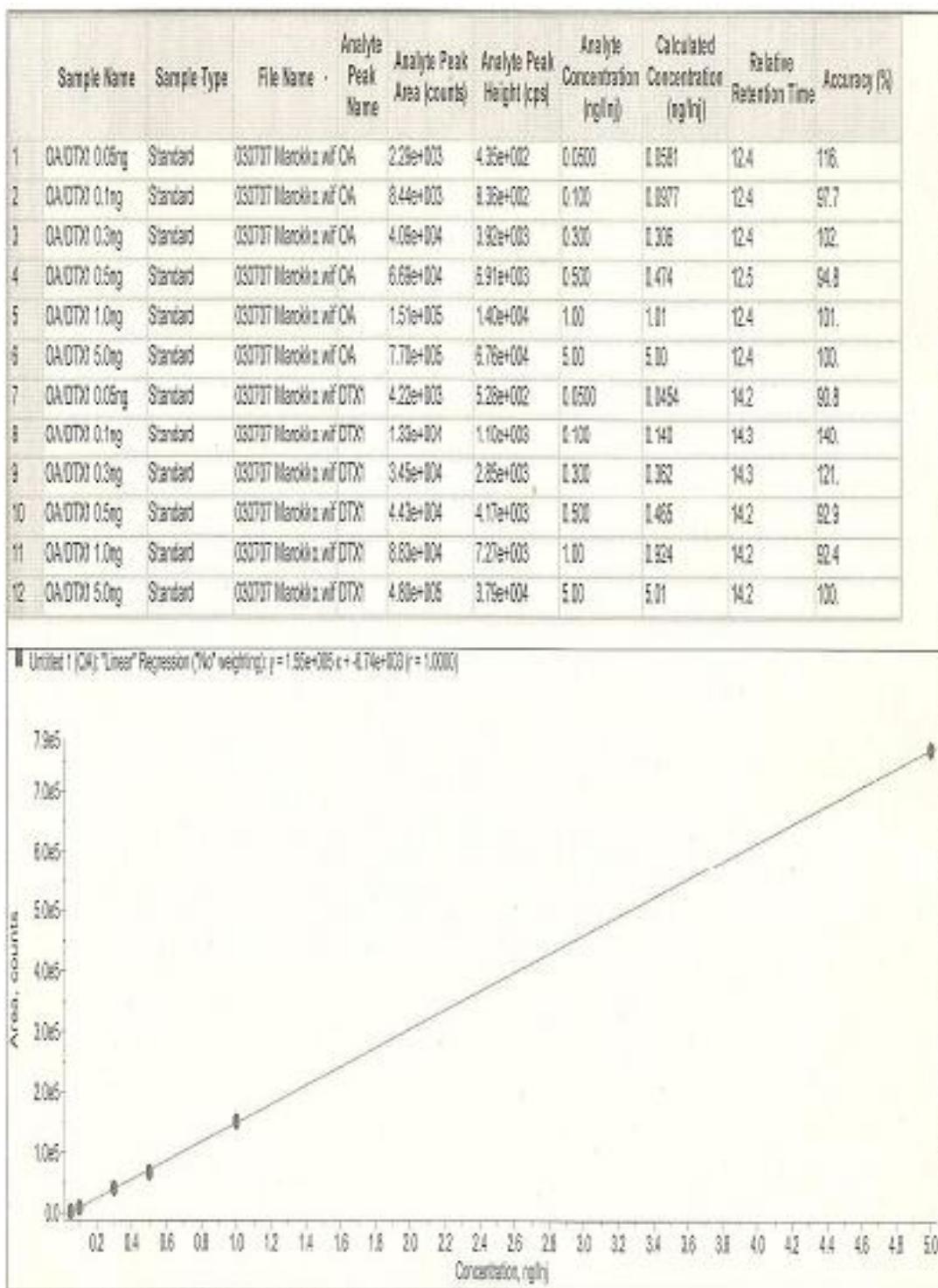


Figure 3 : Calibrage de la CL-MS

- Expression des résultats

La toxicité totale de l'échantillon est calculée en microgramme équivalent acide okadaïque par un kilogramme de bivalve : µg eq A.O/kg.

La toxicité de chaque toxine est calculée en microgramme par un kilogramme de bivalve : $\mu\text{g/kg}$.

3. RESULTATS

L'étude des phycotoxines lipophiles a intéressé les mollusques bivalves des trois régions de l'Atlantique sud marocain : Agadir, Laâyoune et Dakhla.

L'analyse biologique de ces toxines a montré qu'il n'y a pas de grandes différences entre les pourcentages de toxicité des échantillons des trois régions qui sont au voisinage de 4% (Figure 4).

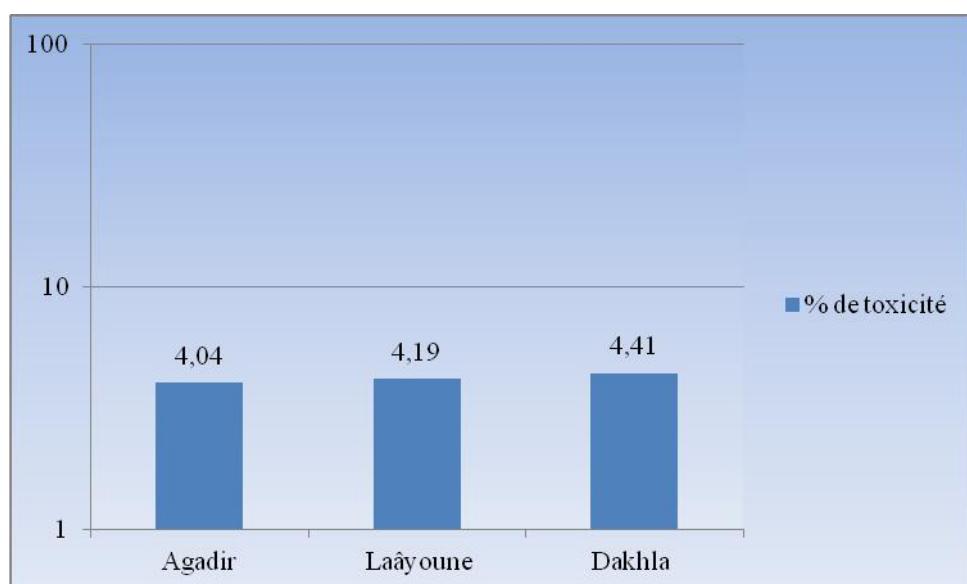


Figure 4 : Pourcentage des échantillons toxiques au niveau des trois régions étudiées.

3.1. Dakhla

a. Toxicité et phytoplancton toxique

L'analyse des phycotoxines lipophiles par test souris dans les mollusques bivalves de la région de Dakhla, de janvier 2003 à décembre 2007, a montré que 5.72 % d'échantillons analysés ont été positifs. 46% des échantillons positifs ont eu une forte toxicité manifestée par un délai de mort des souris injectées moins de 5 heures et 54 % des échantillons ont une toxicité moyenne avec un délai de mort entre 5 et 24 heures. Le suivi de cette toxicité durant la période entre 2005 et 2006 a montré que 15% des échantillons de couteaux ont été positifs, 5% pour les coques et 4% pour les moules, par contre, les tests sur huîtres ont été négatifs (Figure 5).

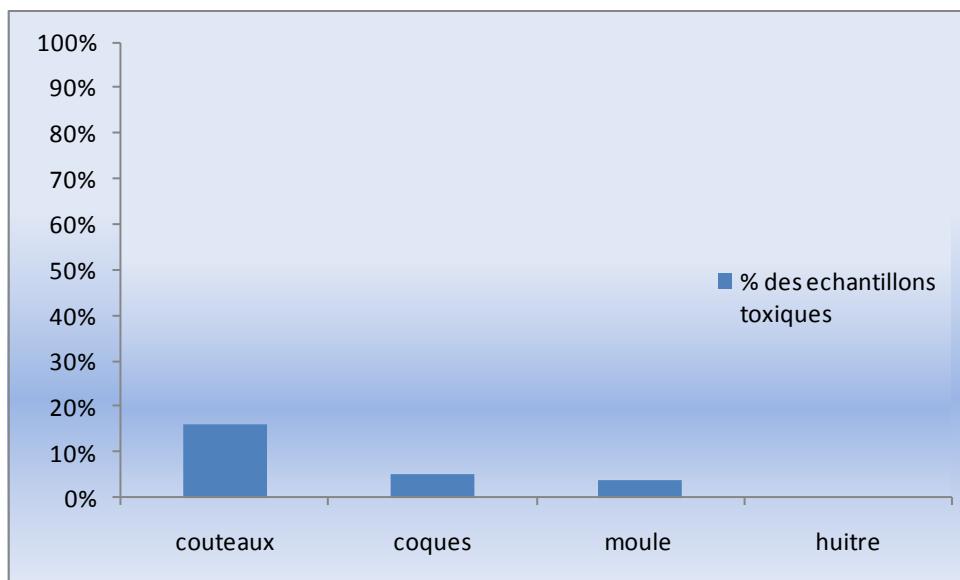


Figure 5 : Pourcentage de toxicité des mollusques bivalve de la région Dakhla.

- **Boutalha**

L'analyse biologique des phycotoxines lipophiles dans les trois espèces de bivalves de Boutalha, de janvier 2005 jusqu'au Décembre 2007, a révélé la présence de ces biotoxines en fin 2005 et début 2006 ainsi qu'en avril 2007. Cette toxicité a été décelée dans les couteaux et les coques de ce site ; par contre, les toxines dans huîtres ont été non décelables par le test-souris. En comparaison avec les coques, la toxicité décelée dans les couteaux a été plus élevée ; les délais de morts des souris ont été inférieurs à 5 heures à plusieurs reprises. L'analyse phytoplanctonique de l'eau de mer de ce site a montré que le dinoflagellé *Dinophysis* spp a été identifié dans ce site à partir de février 2005 jusqu'au Décembre 2007. Le maximum $13400 \text{ Cell.l}^{-1}$ a été enregistré juste avant l'épisode de toxicité de novembre 2005 à juin 2006 (Figure 6).

L'analyse chimique par CL/MS des bivalves de Boutalha, prélevés durant les périodes de toxicité, a montré que les concentrations des toxines oscillaient entre 80,31 dans les huîtres à 659,38 $\mu\text{g eq A.O/kg}$ enregistrée dans les couteaux de ce site (Figure 7).

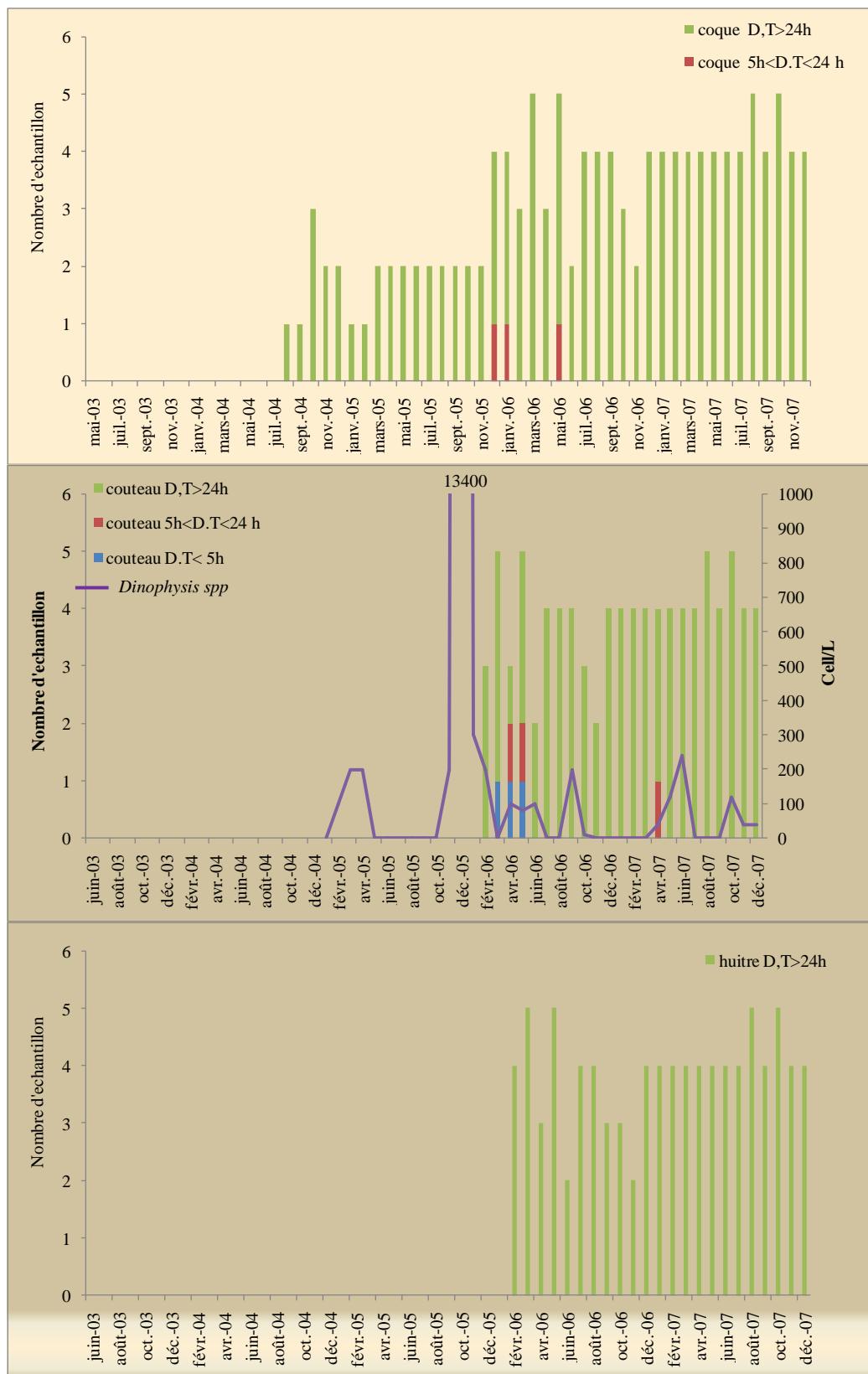


Figure 6 : Résultats du test biologique avec l'évolution mensuelle de *Dinophysis spp* dans le site de Boutalha.

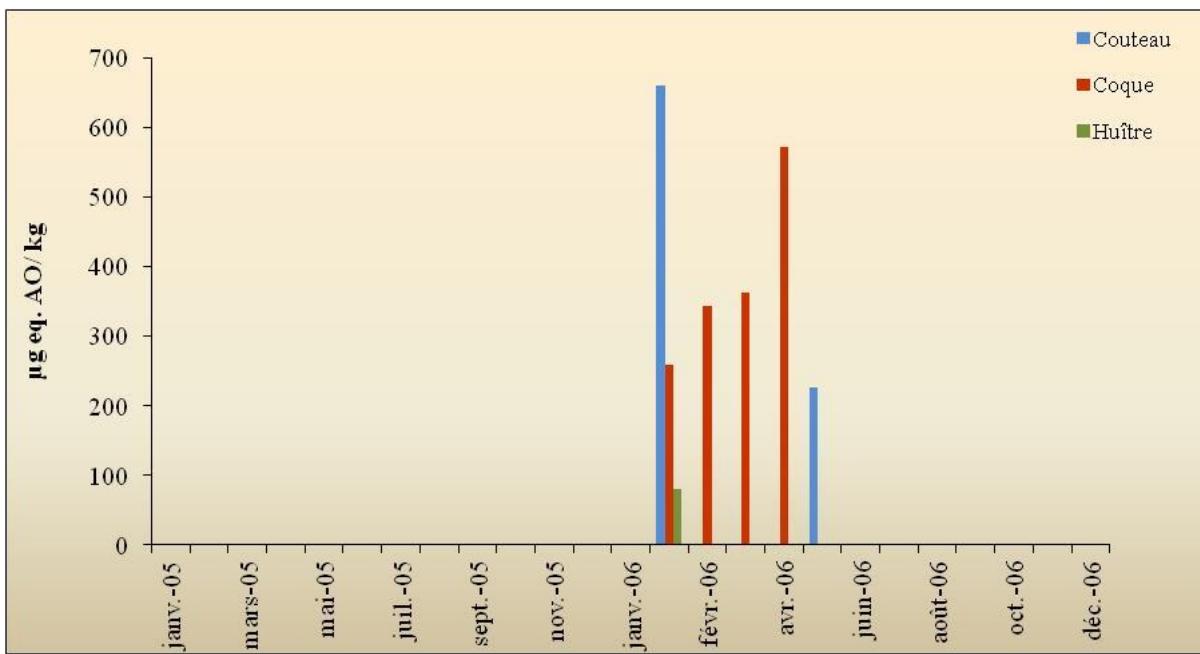


Figure 7 : Résultats du test chimique dans les trois espèces de bivalves de Boutalha durant la période de 2006.

- **Pk25**

A Pk 25, quatre périodes de toxicité ont été enregistrées durant cette étude : la première en automne 2003, la deuxième en automne 2005 jusqu'au début de l'été 2006, la troisième en été 2007 et la dernière en automne 2007.

La toxicité la plus élevée a été notée durant le deuxième épisode d'où les délais de mort des souris qui ont été inférieurs à 5 heures.

L'espèce phytoplanctonique *Dinophysis spp* a été identifiée dans l'eau de mer de ce site tout au long de cette étude où les taux les plus élevés ont été observés durant les périodes 2006 - 2007 avec respectivement 1900 et 640 cellules par litre (Figure 8).

L'analyse chimique des couteaux de cette zone a montré que le niveau de toxicité des échantillons de la deuxième période de toxicité a été très élevé avec 3281,25 µg eq A.O/kg enregistrée en décembre 2005 (Figure 9).

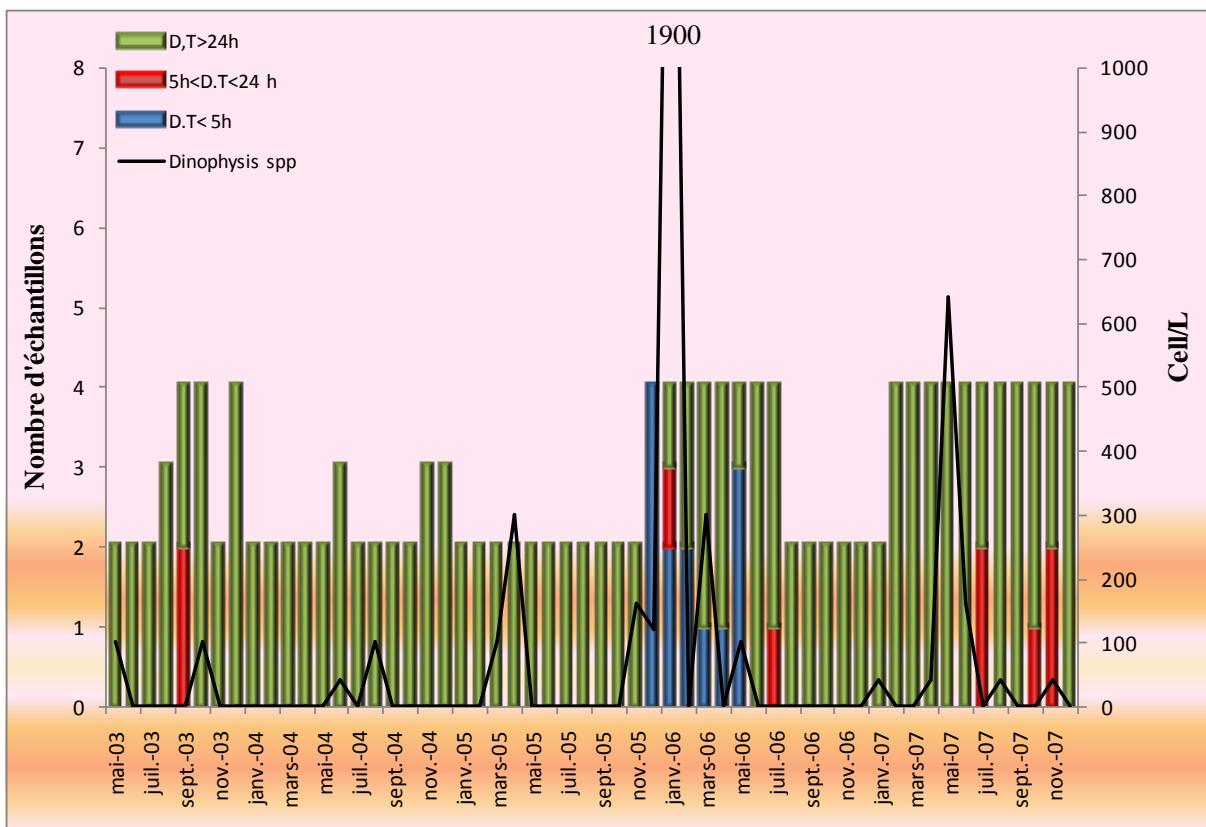


Figure 8 : Résultats du test biologique avec l'évolution mensuelle de *Dinophysis spp* dans le site de Pk25.



Figure 9 : Résultats du test chimique dans les couteaux de Pk25 durant la deuxième période de toxicité (2005-2006)

- N'tirift

A Ntirift, trois périodes de toxicité ont été décelées par le test biologique sur souris en fin 2003, fin 2005 et en mi 2006. Le niveau de toxicité a été moyen et les délais de mort des animaux a été compris entre 5 et 24 heures.

Les espèces de *Dinophysis* spp ont été détectées mensuellement dans les eaux de mer de ce site, d'octobre 2005 jusqu'à avril 2006 et la concentration variait de 100 à 1400 Cell/L (Figure 10).

La toxicité des moules détectée par le test chimique CL/MS en fin 2005 et au début de 2006 a affiché un maximum de 437,79 µg eq A.O/kg de mollusque noté en décembre 2005 (Figure 11).

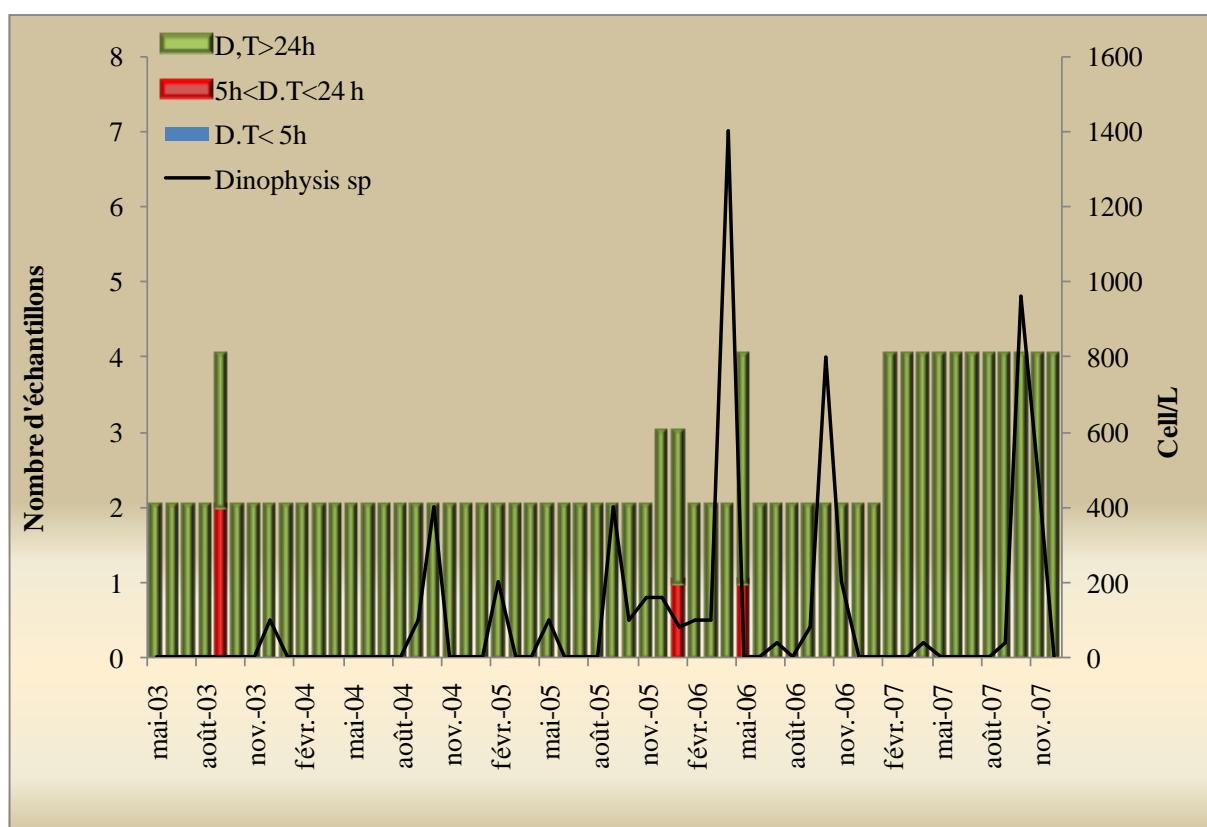


Figure 10 : Résultats du test biologique avec l'évolution mensuelle de *Dinophysis* spp dans le site de N'tirift

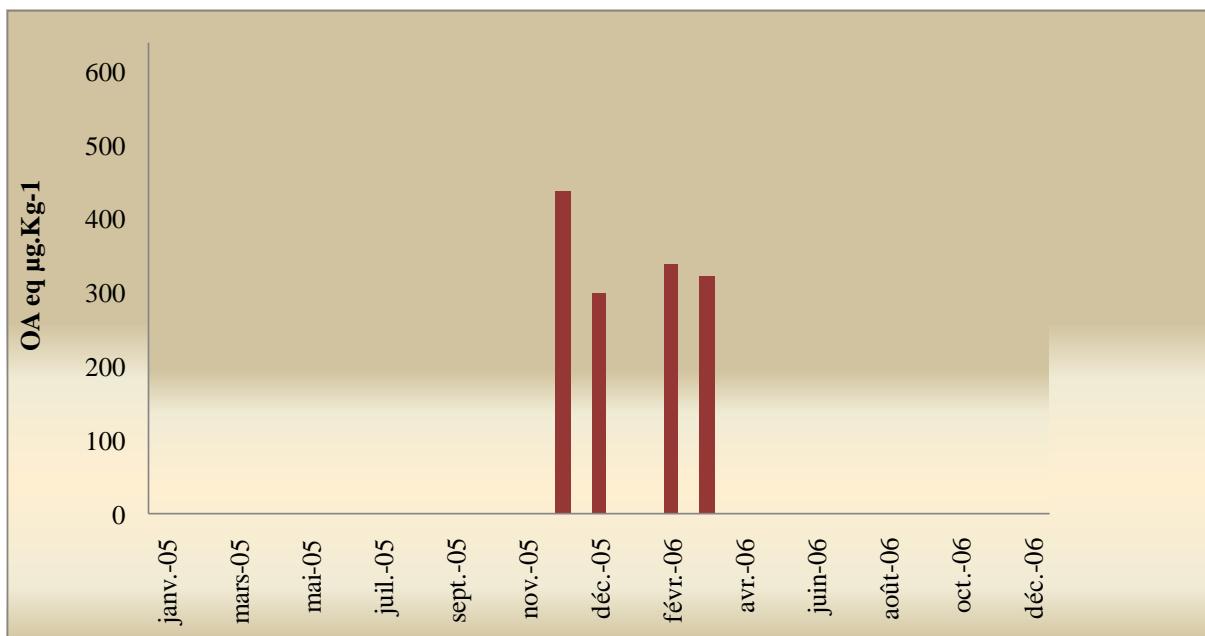


Figure 11 : Résultats du test chimique dans les moules de N'tirift durant la deuxième période de toxicité (2005-2006).

b. Profils toxiniques

L'investigation des phycotoxines lipophiles a intéressé les toxines suivantes: A.O, DTXs, PTXs, YTXs et AZAs et GYM. Les résultats de l'analyse phycotoxines lipophiles par la CL-MS ont montré la détection de l'A.O et de la DTX-1 avec leurs deux formes libres et estérifiées. Les esters de l'A.O ont été les composés les plus dominants avec 82,08% suivi par les formes libres de l'A.O (16,46%), des esters de DTX-1 (1,45%) et de DTX-1 libre avec 0,01%. Les PTXs, les AZAs, les YTXs et les GYM n'ont pas été détectés dans les échantillons analysés.

- **Pk25**

L'analyse du profil toxinique des couteaux prélevés durant les périodes de toxicité de 2005 et de 2006 ont révélés la détection des deux formes de l'AO (libre et estérifiée). La toxine la plus dominante dans ces échantillons a été l'ester de l'AO avec des taux variant de 91 à 93% ; la forme libre de l'AO n'a pas dépassé les 9% (Figure 12) et (Tableau 2).

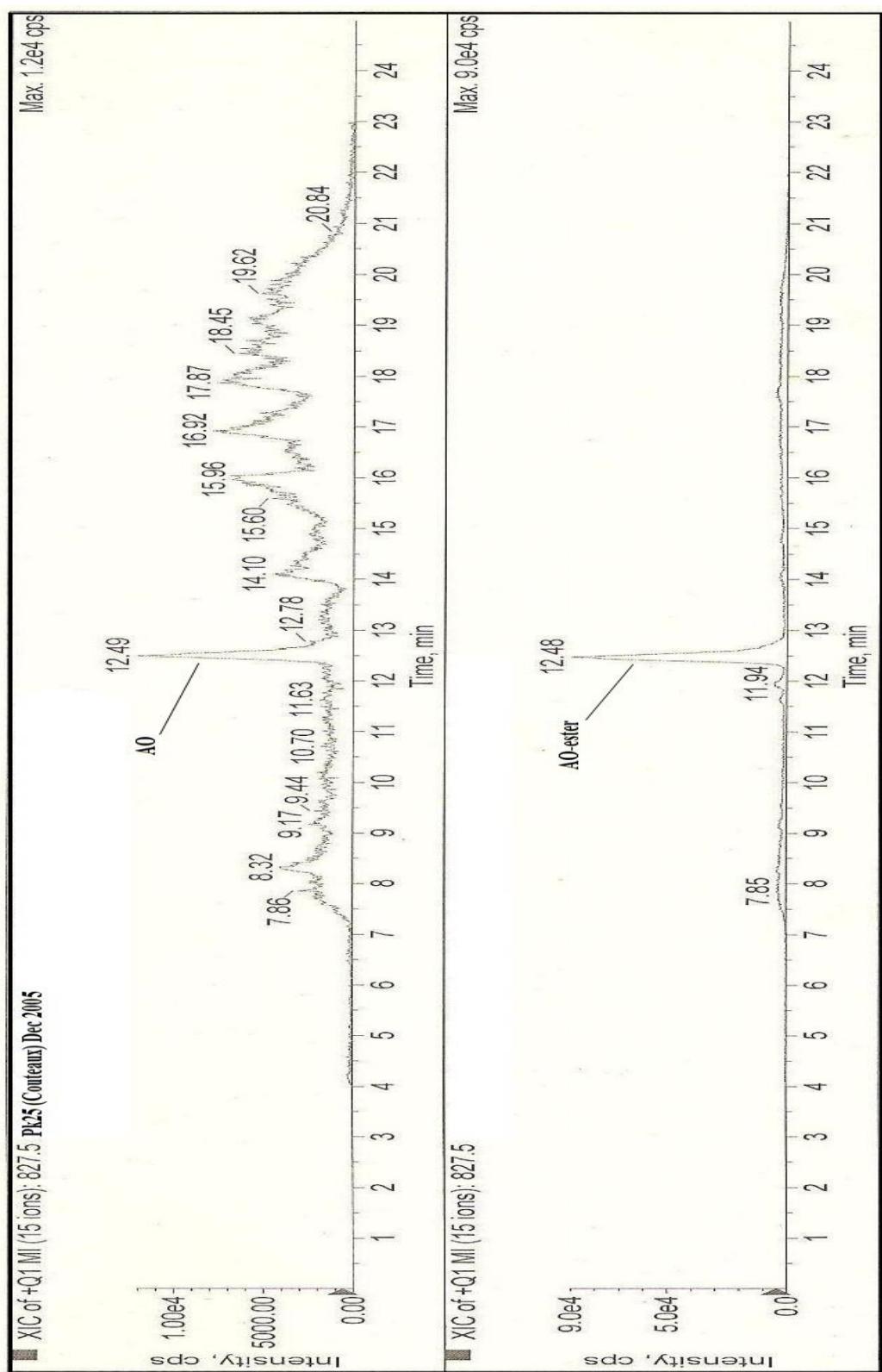


Figure 12 : Chromatogramme CL-MS des couteaux intoxiqués de PK25 de Décembre 2005.

Tableau 2 : Profils toxiniques des échantillons des couteaux prélevés durant les périodes 2005 et 2006.

Date	Site	Espèce	% AO/1kg	% Ester-AO/Kg	% DTX-1/1kg	% Ester-DTX1/ kg
déc.-05	Pk25	couteau	7	93	0	0
déc.-05			9	91	0	0
févr.-06			7	93	0	0
févr.-06			7	93	0	0

- N'tirift

A Ntirift, trois types de toxines ont été identifiée par CL-MS durant les périodes de toxicité de 2005 et 2006: l'AO et les esters du DTX-1 et de l'AO les autres toxines. Cette composition toxique a été dominée par des taux élevés de l'AO et son ester (entre 36 % et 54%) ; par contre, de faibles teneurs en ester de la DTX-1 et une absence totale de son ester ont été notées (Figure 13) et (Tableau 3)

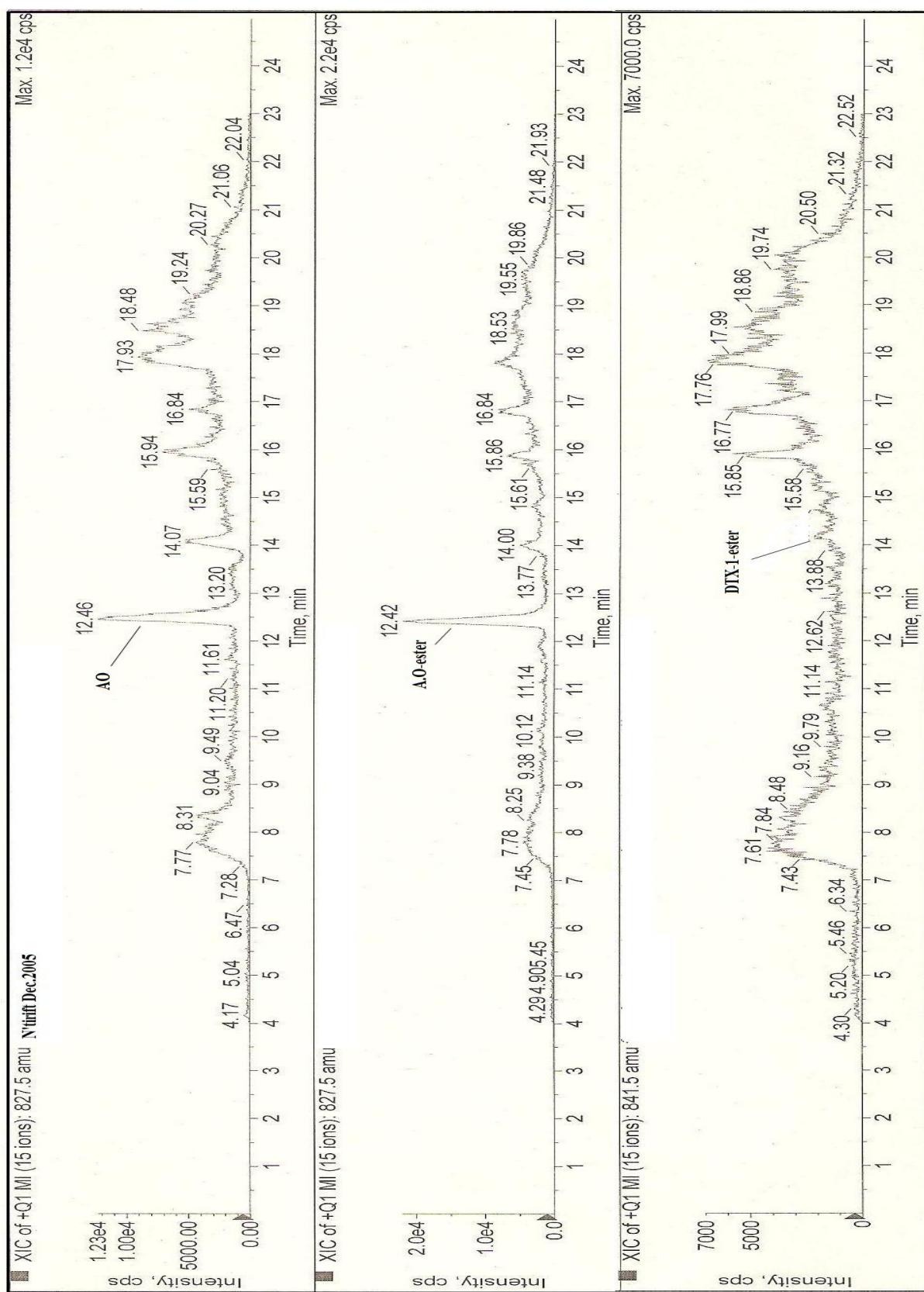


Figure 13 : Chromatogramme CL-MS des moules contaminées de N'tirift de Décembre 2005.

Tableau 3 : Profils toxiniques des échantillons des moules prélevées durant les périodes 2005 et 2006.

Date	Site	Espèce	% AO/1kg	% Ester-	% DTX-1/1kg	% Ester-
				AO/Kg		DTX1 / kg
déc.-05	N'tirift	moule	44	47	0	9
déc.-05			52	44	0	4
févr.-06			53	47	0	0
mars-06			54	36	0	10

- **Boutalha**

L'analyse de CL-MS des bivalves de Boutalha (les coques, les huîtres et les couteaux) a indiqué une dominance l'A.O et son ester. L'A.O libre a été détecté dans tous les échantillons analysés excepté dans ceux des huîtres, 94% et 64 % ont été Les maximums de l'AO et de son ester détecté dans les couteaux respectivement en février 2006 et en Mai de la même année. L'ester de la DTX-1 a été détecté avec de très faible teneures ne dépassant pas les 7%, par contre le DTX-1 libre n'a été détecté que dans les couteaux de mai 2006 avec une faible quantité (1%) (Figure 14, 15 et 16) et (Tableau 4).

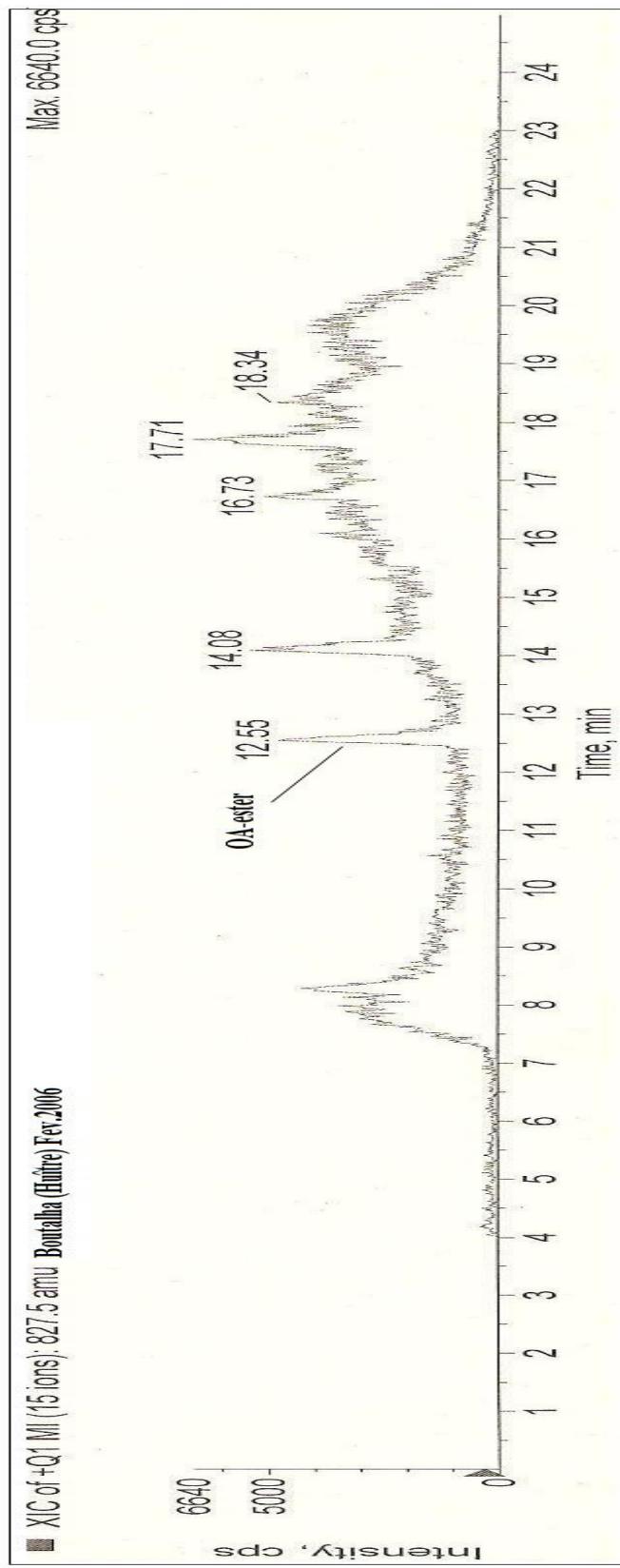


Figure 14 : Chromatogramme CL-MS des huîtres toxiques de Boutalha de février 2006.

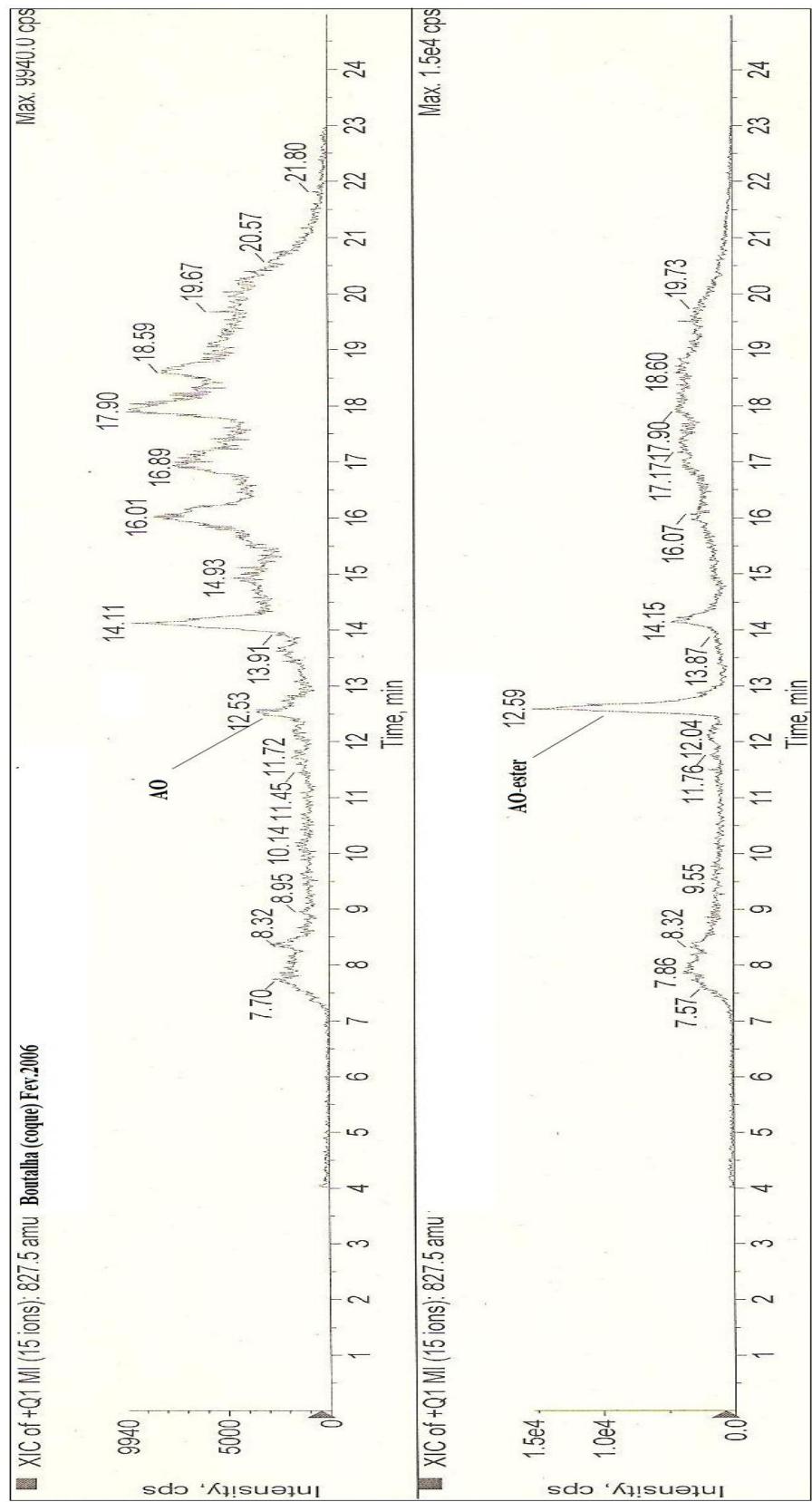


Figure 15 : Chromatogramme CL-MS des coques toxiques de Boutalha de février 2006.

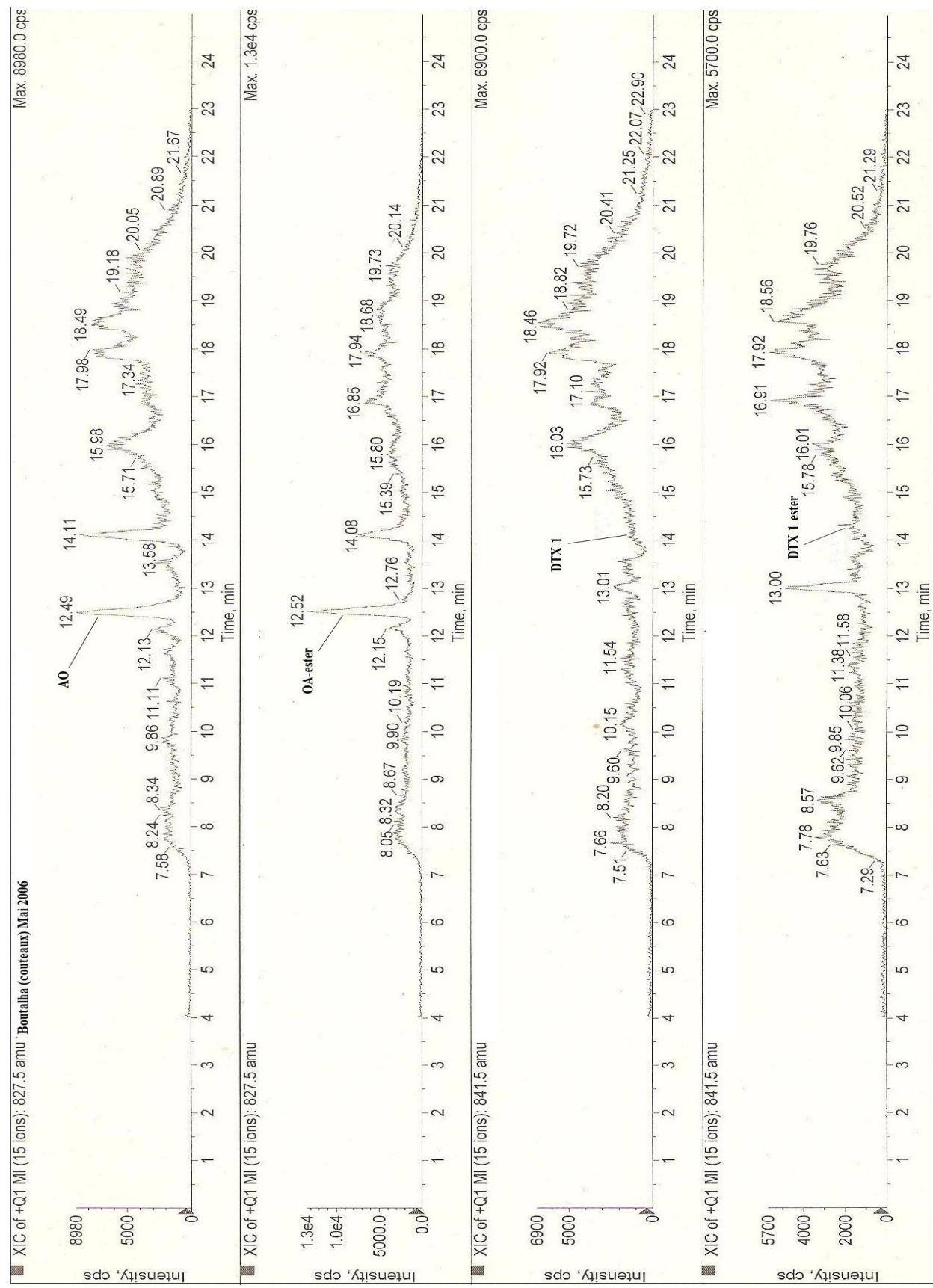


Figure 16 : Chromatogramme CL-MS des couteaux toxiques de Boutalha de mai 2006.

Tableau 4 : Profils toxiniques des coquillages bivalves prélevés durant la période toxique de 2006.

Date	Site	espece	%	%	% DTX-	% Ester-
			AO/1kg	Ester-AO/Kg	1/1kg	DTX1/ kg
févr.-06	Boutalha	huître	0	100	0	0
févr.-06		coque	13	87	0	0
févr.-06			16	84	0	0
mars-06			5	88	0	7
avr.-06			8	89	0	3
févr.-06		couteau	6	94	0	0
avr.-06			10	84	0	6
mai-06			64	31	1	4

3.2. Agadir

L'analyse des phycotoxines marines dans les moules des la région d'Agadir à révélé la présence de ces phycotoxines lipophiles, cette toxicité a été détectée par le test biologique sur souris. La caractérisation de ces toxines par CL-SM a révélé L'identification et la quantification des phycotoxines lipophiles de types diarrhéiques principalement l'AO et la DTX ainsi que son relatif ester.

a. Toxicité et phytoplancton toxique

- **Tifnit**

A Tifnit, depuis Mai 2003 jusqu'au décembre 2007 trois grandes épisodes de toxicité ont été recensées en septembre 2004, mars 2005 et en mai 2007. Ces toxicités ont été détectées par le test biologique sur souris. Le délai de mort des souris suite aux injections des extraits toxiques a été entre 5 et 24 heures. Ces toxicités ont coïncidé avec la détection dans l'eau de mer de ce site de *Dinophysis spp.* 360 et 1000 cell/l ont été Les maximums de concentrations de ce dinoflagellé détectés respectivement durant les périodes de toxicité de 2004 et de 2007 (Figure 17).

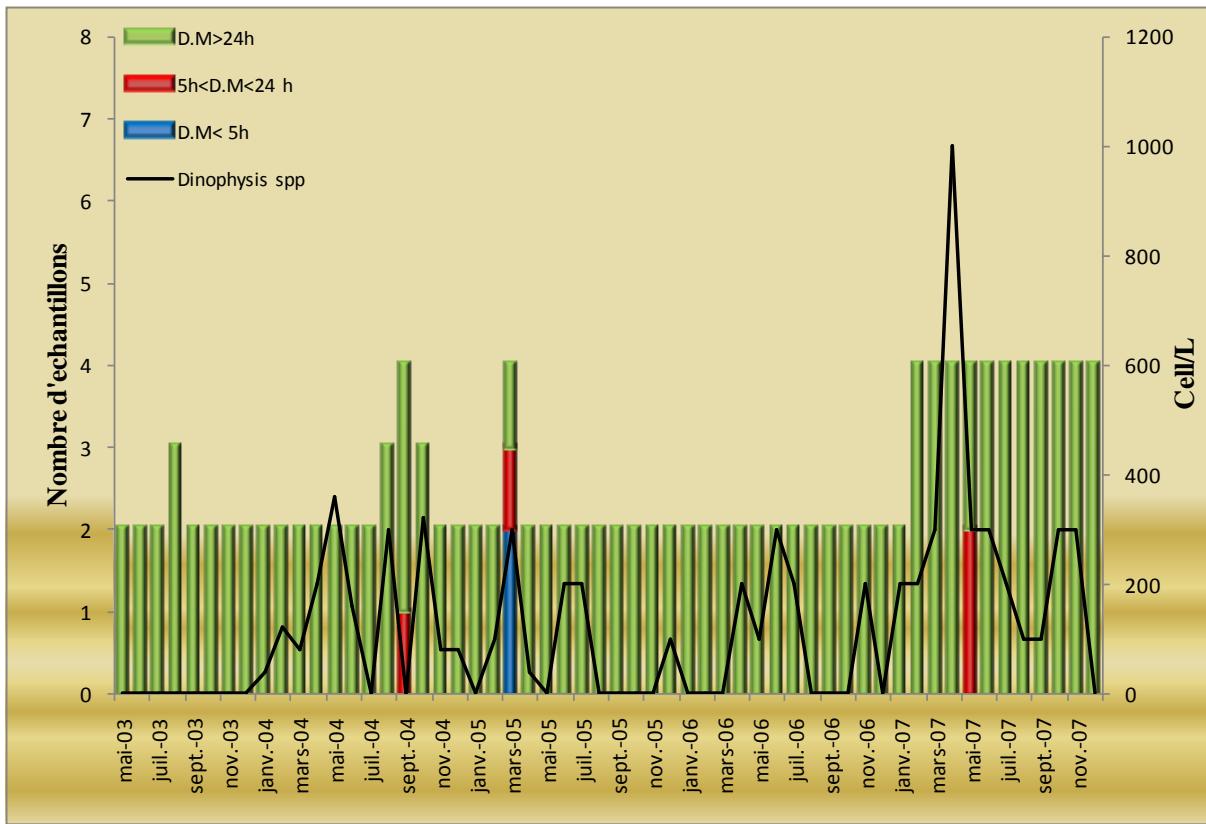


Figure 17 : Résultats du test biologique avec l'évolution mensuelle de *Dinophysis spp* dans le site de Tifnit.

- **Cap ghir**

A Cap ghir aussi trois épisodes de toxicité ont été enregistrées durant cette période d'étude, la première en septembre 2004 qui a duré cinq semaines, la deuxième en mai - juin 2007 et la dernière en novembre de la même année. Les délais de mort des souris injectées par les extraits toxiques ont été compris entre 5 et 24 heures. L'analyse d'eau de mer de ce site a révélé l'identification des espèces de *Dinophysis*, les concentrations les plus élevées ont été enregistrées durant les périodes de toxicité des moules de site avec 300, 1100 et 600 cellule/l des dénombrés respectivement en septembre 2004, en mai 2007 et en novembre 2007 (Figure 18).

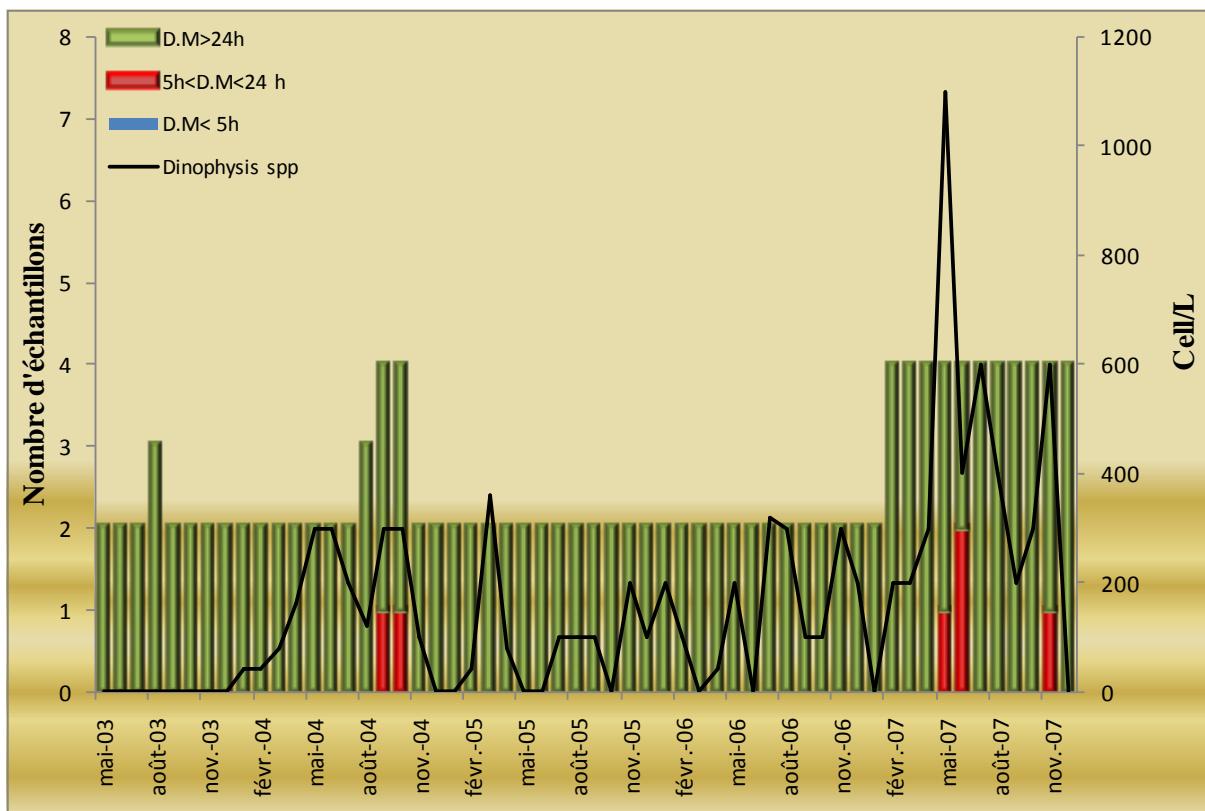


Figure 18 : Résultats du test biologique avec l'évolution mensuelle de *Dinophysis spp* dans le site de Cap ghir.

La toxicité détectée dans les moules de Cap ghir par le test biologique sur souris a été confirmée par le test chimique CL-SM. Au début de cet épisode, les moules de ce site ont été fortement toxiques avec 734.25 µg eq A.O/kg presque 4 fois plus que la norme établie pour ces toxines diarrhéiques. Vers la fin de cette période de toxicité la concentration des esters totaux ainsi que la toxicité totale des moules a diminué pour descendre au dessous de 160 µg eq A.O/kg (Figure 19).

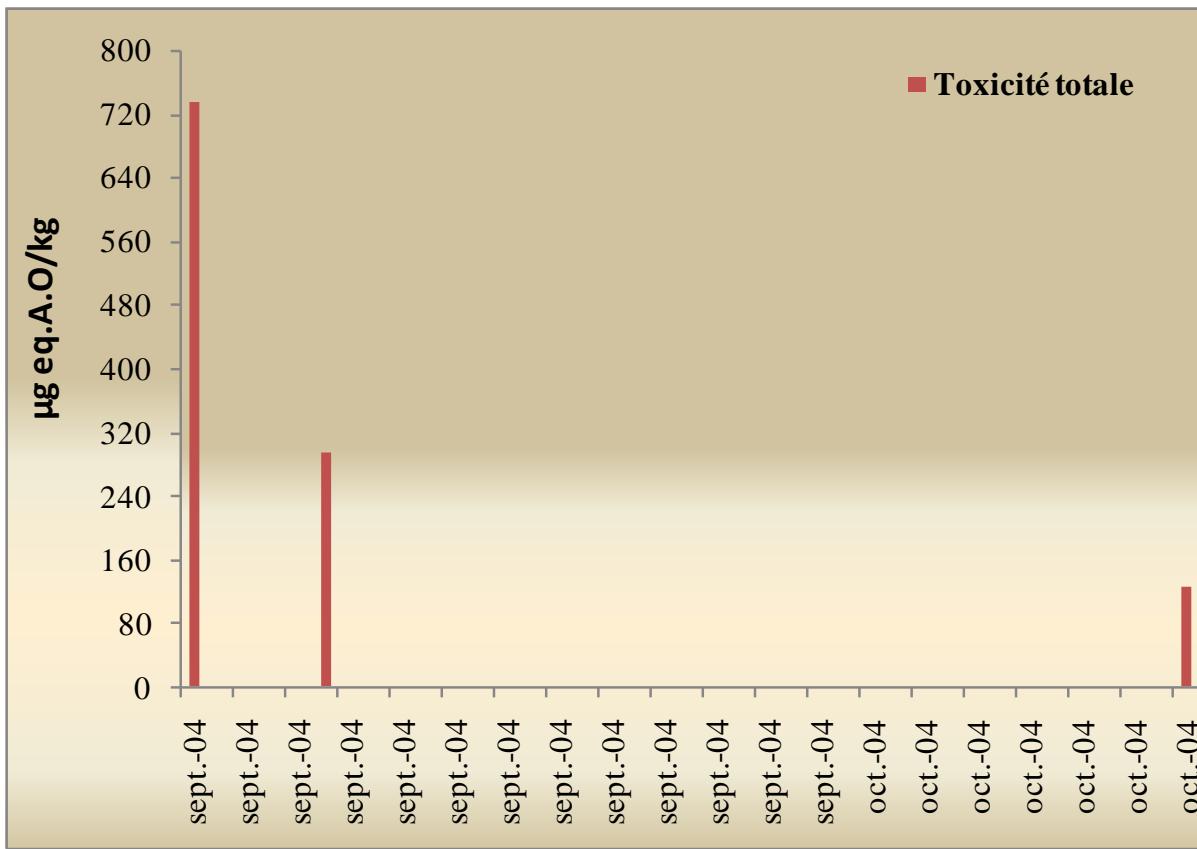


Figure 19 : Toxicité totale, par CL-MS, des moules de Cap ghir durant la période de toxicité de 2004.

b. Profil toxinique

Le profil des phycotoxines lipophiles dans les moules d'Agadir et plus précisément de celle de Cap ghir d'automne 2004 a été caractérisé par la détection de l'A.O et des esters relatifs à cette toxine et celle du DTX-1. Au début de la toxicité, les esters d'A.O ont été détectés avec un taux de 75% des toxines décelées par contre vers la fin de la toxicité l'A.O a été le composant majeur des toxines retrouvées avec 54%, 27% pour son esters et 19% pour l'ester de la DTX-1 (Tableau 5) et (Figure 20).

Tableau 5 : Profils toxiniques des moules prélevés à Cap ghir durant la période de toxicité de 2004.

Date	Site	Espèce	% d'A.O	% d'ester-OA	% de DTX-1	% d'ester-DTX1
sept.-04	Cap ghir	Moule	25	75	0	0
oct.-04			54	27	0	19

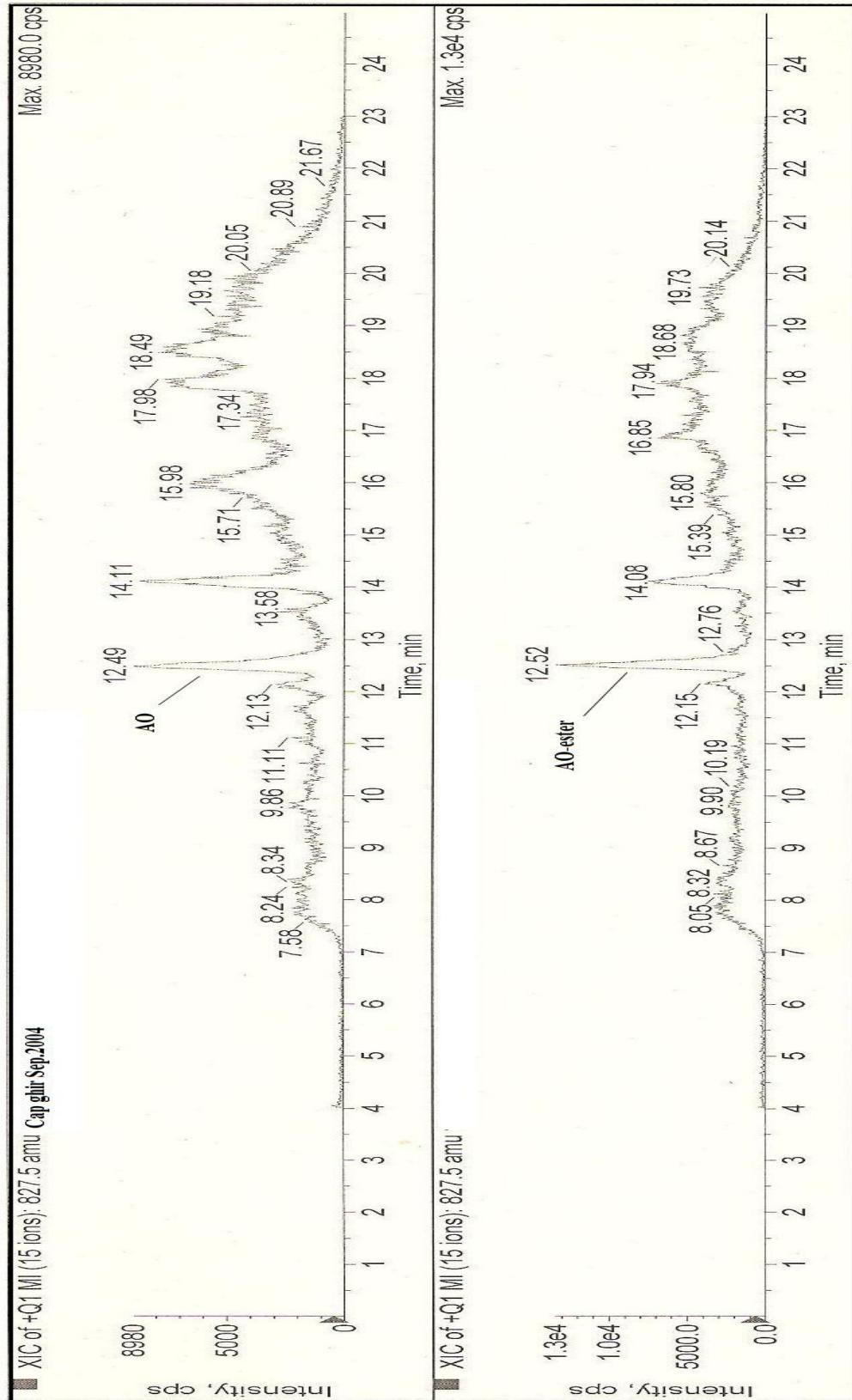


Figure 20 : Chromatogramme CL-MS des moules toxiques de Cap ghir de septembre 2004.

3.3. Laâyoune

- **Test biologiques**

Les résultats du test biologiques sur souris effectué du Mai 2003 jusqu'au décembre 2007, a relèves deux épisodes de toxicité des moules d'Akhfenir, la première en Aôut et septembre 2003 et la deuxième en juin 2005. Le délai de mort des souris injectée n'a descendu au dessous de 5h qu'à une seule reprise en septembre 2003. Pour les autres échantillons toxiques le délai de morts a été compris entre 5 et 24h (Figure 21). L'analyse d'eau de mer d'Akhfenir durant la période de toxicité de 2003 à révélé la présence de l'espèce *Dinophysis spp* avec une concentration de 2120 Cell/l en septembre 2003.

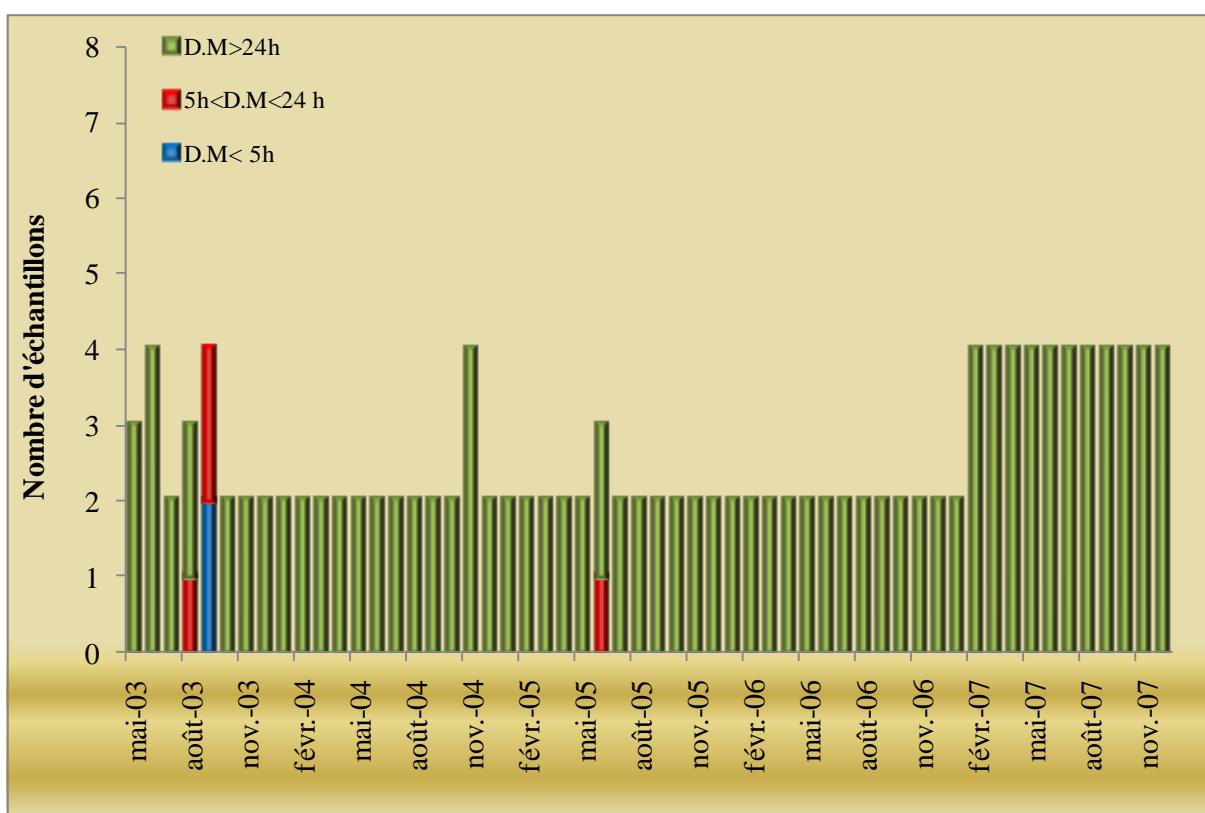


Figure 21 : Résultats du test biologiques dans les moules d'Akhfenir.

- **Test chimique**

L'analyse par chromatographie liquide des phycotoxines lipophiles dans les moules d'Akhfenir prélevées en juin 2005 a montré la dominance des esters sur l'A.O et l'absence du DTX-1. La toxine la plus dominante est l'ester d'A.O avec 87 % suivi par L'A.O avec 13 %. La

concentration enregistrée de ces toxines diarrhéiques a été au-dessus des normes établie pour ces toxines algales 1559.32 µg eq A.O/kg (Figure 22 et 23) et (Tableau 6).

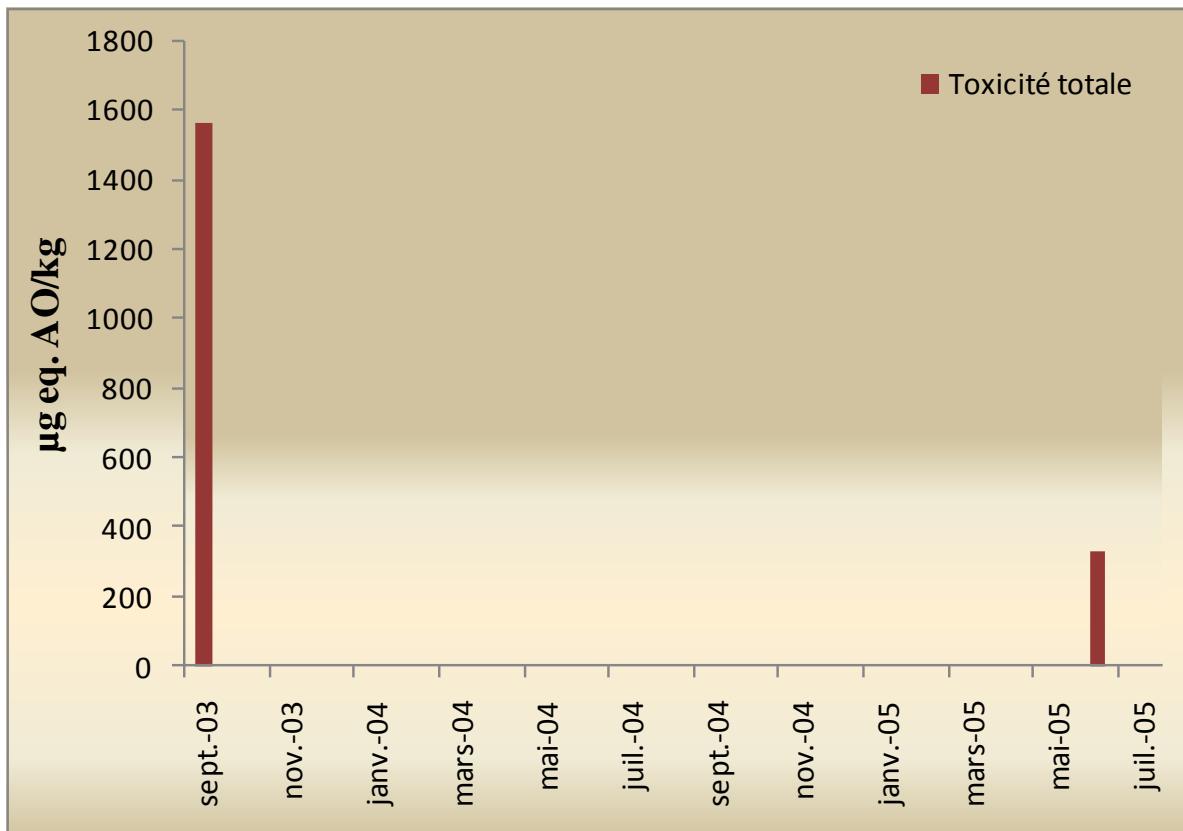


Figure 22 : Toxicité totale, par Cl-MS, des moules d'Akhfenir durant les périodes de toxicité de 2003 et 2005.

Tableau 6 : Profil toxinique des moules prélevés à Akhfenir durant les périodes de toxicité de 2005 et 2006.

Date	Site	Espèce	% AO/1kg	% Ester-AO/Kg	% DTX-1/1kg	% Ester- DTX1/ kg
juin.-05	Akhfenir	moule	13	87	0	0

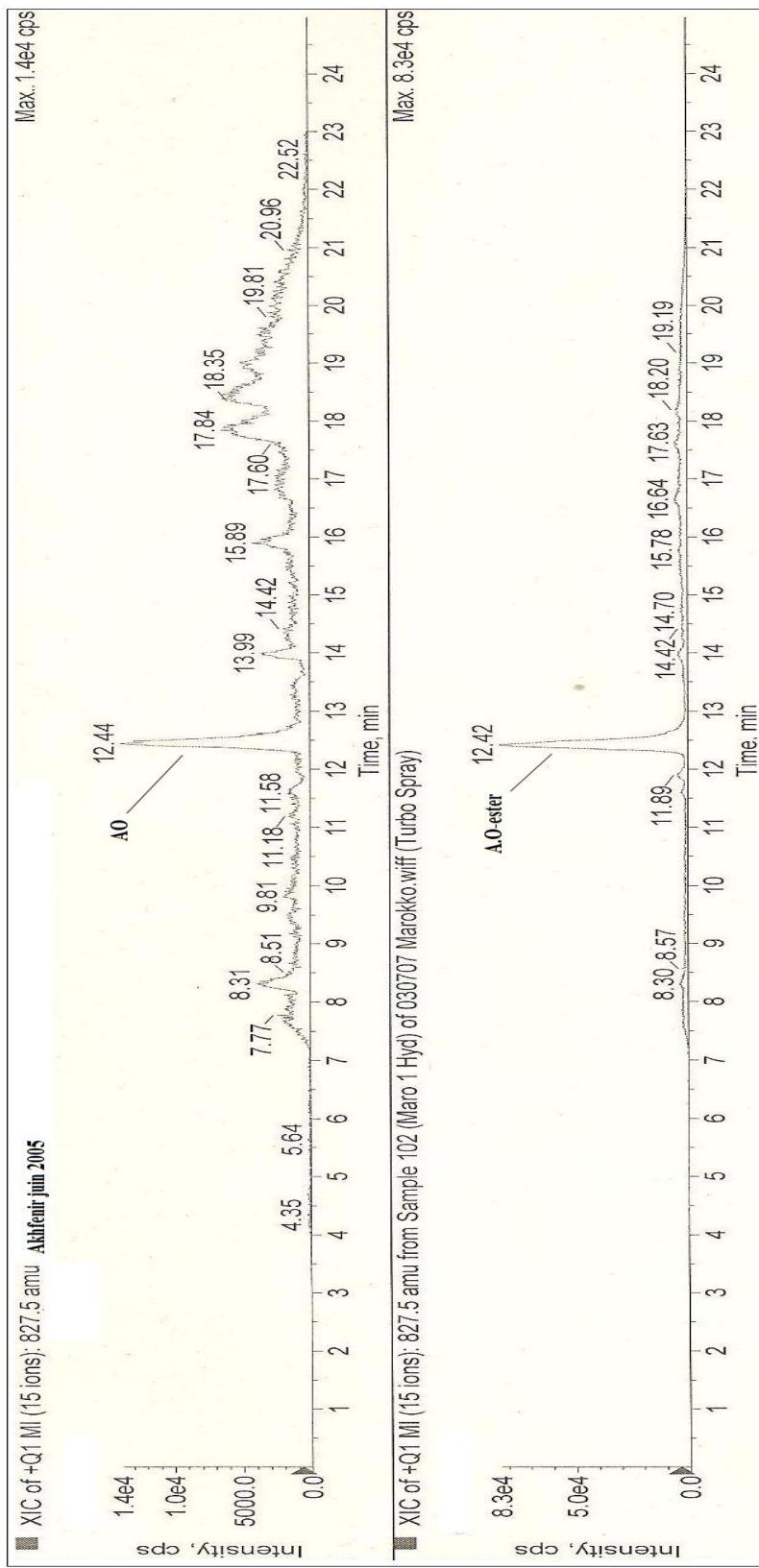


Figure 23 : Chromatogramme CL-MS des moules toxiques d'Akhfenir de juin 2005.

3.4. Comparaison entre le test biologique sur souris et la chromatographie liquide couplé à la spectrométrie de masse.

La comparaison entre les résultats du test biologique sur souris et le test chimique par CL-MS a montré l'existence d'une bonne corrélation négative entre les deux tests $r = -0.78$. La figure 24 Montre que les échantillons qui ont de fortes concentrations correspondent à des délais de mort très court. Ce pendant, plus l'échantillon est toxique plus les délais de mort est court.

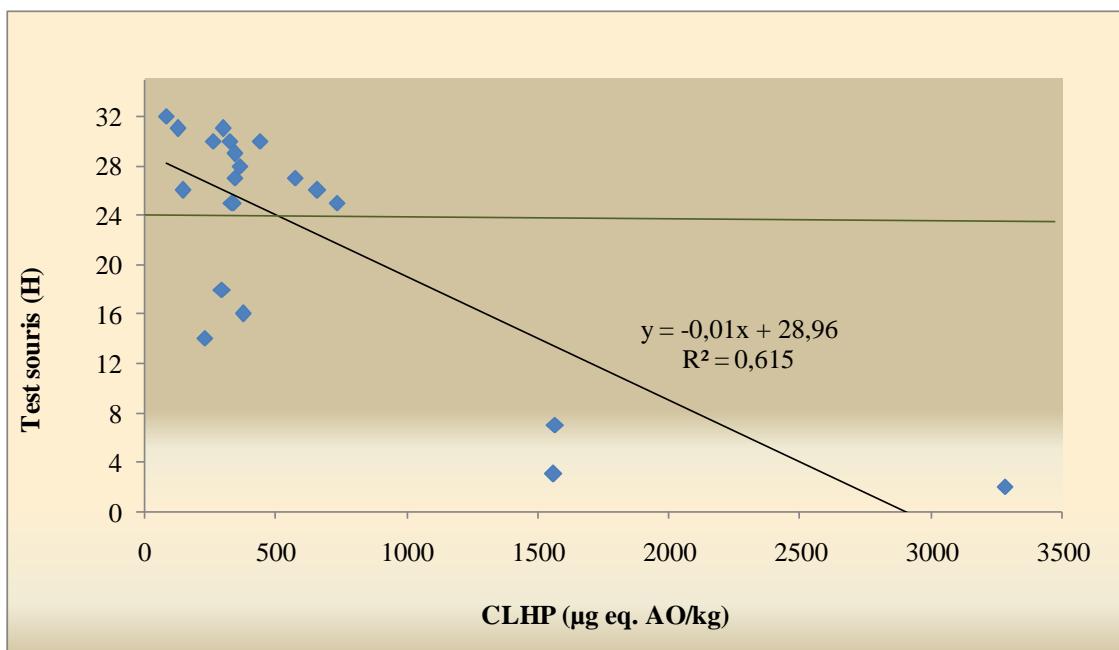


Figure 24 : Corrélation entre le test souris et la CLHP.

29% des échantillons décelés positifs par le test souris (délai de mort < à 24 h) ont été positive par la CL-MS avec des concentrations supérieures à la norme (160 µg eq. A.O /kg) et 14% des échantillons ont été test souris négatifs et CL-MS positifs mais avec des concentrations inférieures à 160 µg e A.O /kg par contre 57% des échantillons ont été test souris négatif et CL-MS positifs au dessus de la norme.

Tableau 7 : Comparaison entre le test souris et la CLHP

Test souris positif		Test souris négatif	
CL-MS positif (>160 µg eq. A.O /kg)	CL-MS négatif (<160 µg eq. A.O /kg)	CL-MS positif (>160 µg eq. A.O /kg)	CL-MS négatif (<160 µg eq. A.O /kg)
29%	0%	57%	14%

3.5. Incidence de la toxicité LSTs dans les différents sites étudiés.

Les analyses des phycotoxines LSTs dans les moules des différents sites étudiés de l'atlantique sud marocain ont montré que les moules d'Agadir ont été le plus touchées par les toxines lipophiles que celles prélevées des autres sites durant cette période d'études (Figure 25).

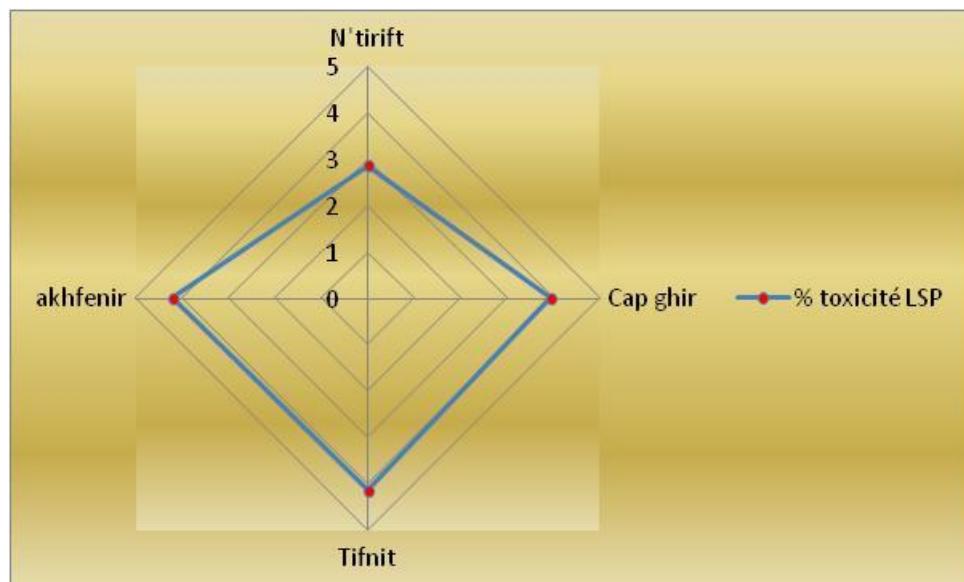


Figure 25 : Incidence de la toxicité LSTs dans les moules des différents sites étudiés.

3.6. Toxicité LSTs dans les moules des trois régions de 2008 jusqu' à 2011

Les analyses biologiques des phycotoxines lipophiles réalisées 2008 jusqu'à 2011 dans les glandes digestives des moules des trois régions a révélé la présence de ces toxines algales durant les quatre saisons.

A Dakhla, l'apparition de ces toxines a été notée en été 2008 et en hiver 2009. Figure 26 (A)

A Laâyoune, ces toxines ont été enregistrées durant l'automne de 2010 et en printemps et automne 2011. Figures 26 (B)

A Agadir, ces toxines algales ont été détectées durant les périodes automnales de 2008, 2009, 2010 et 2011 et printanière de 2011. Figures 26 (C)

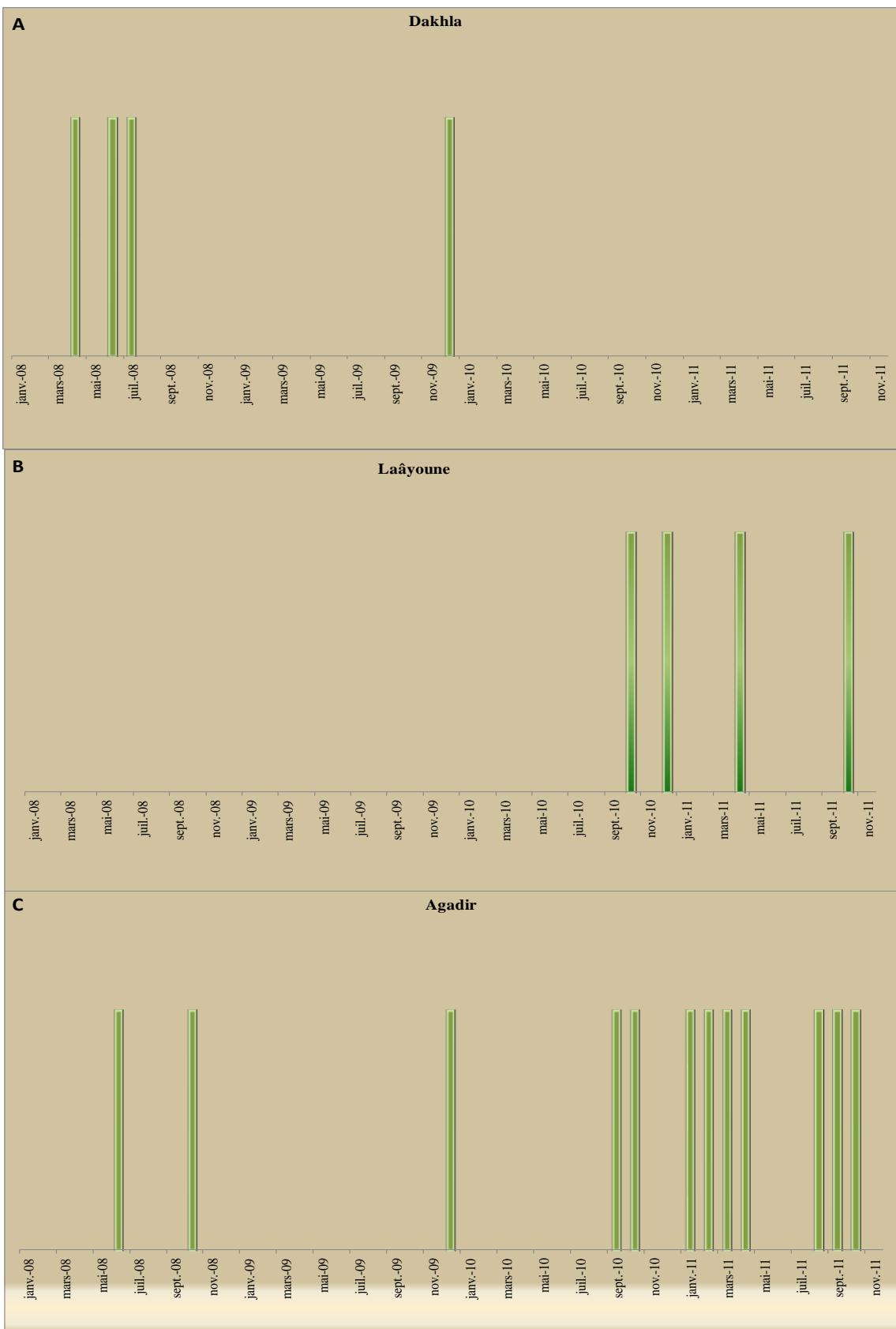


Figure 26 : Toxicité LSTs dans les moules de Dakhla, de Laâyoune et d'Agadir

4. Discussion

Ceci est le premier travail de recherche sur la présence des phycotoxines diarrhéiques dans quatre espèces de bivalves en provenance des côtes sud de l'Atlantique marocain. La période d'étude de 2003 jusqu'à 2007 a révélé une faible occurrence des phycotoxines diarrhéiques dans les bivalves des trois régions (5% des échantillons). Durant la période 2008-2011, la surveillance routinière des gisements coquilliers du littoral sud marocain a été entamée dans le cadre du programme de surveillance de l'INRH. Les résultats ne sont pas présentés dans ce travail.

La majorité des échantillons détectés toxiques par le test biologique de Yasumoto et al. 1984 sur souris avait une toxicité faible à moyenne, les délais de mort des animaux injectés par les extraits des échantillons toxiques étaient compris entre 5 et 24 h.

Les analyses d'eau de mer des régions concernées ont révélé la présence de plusieurs espèces appartenant au genre *Dinophysis*. Ce dernier constitue avec *Prorocentrum* les principaux producteurs des toxines diarrhéiques (Lee et al., 1989a).

La comparaison de la toxicité des quatre bivalves a montré que les couteaux étaient plus fréquemment toxiques que les autres bivalves, par contre les huîtres étaient les moins touchées par ces toxines. Cette différence d'accumulation des toxines peut être attribuée premièrement à la capacité d'accumulation spécifique des toxines de certaines espèces de bivalves comme il a été démontré par Suzuki and Mitsuya (2001), deuxièmement à la différence dans la distribution de *Dinophysis* spp dans la colonne d'eau (Hoshiai et al, 1997). Aussi la différence dans les conditions de reproduction des bivalves peuvent influencer leur accumulation des toxines (Svennsson and Förlin 2004). Autre explication a été rapportée par Kim et al., (2010) où ils expliquent la différence de l'accumulation spécifique des toxines de certains bivalves.

Les résultats des analyses LC-MS ont montré que le profil toxinique des bivalves prélevés de 2003 jusqu'au 2007 des côtes sud marocaine est caractérisé par la détection des toxines diarrhéiques de type acide okadaïque, dinophysitoxines-1 et leurs esters associés. Ces derniers ont été les composés les plus dominants. Les autres phycotoxines lipophiles n'ont pas été détectées durant cette étude.

Ce profil toxiniques laisse à suggérer que plusieurs espèces de *Dinophysis* ont été responsables des toxicités des bivalves du sud marocain. Lee et al. (1989) ont rapporté que 7 espèces appartenant au genre *Dinophysis* (*D. acuta*, *D. acuminata*, *D. fortii*, *D. rotundata*, *D. mitra*, *D. norvegica* et *D. tripos*) collectées d'Europe et du Japon ont été impliquées dans la production de l'AO et de DTX-1.

Concernant le profil des toxines DSP des bivalves de l'Atlantique nord Marocain, la composition toxinique a été dominée par l'AO et la DTX-2 avec leurs deux formes libres et estérifiées. (Taleb et al, 2009), cette toxicité a été principalement associée à *Dinophysis acuta* et à *D. acuminata* (Bennouna et al, 2002).

Ce même profile est régulièrement retrouvé dans les bivalves des côtes d'Irlande, d'Espagne et du Portugal (McMahon et al., 1996; Gago-Martinez et al., 1996; Vale and Sampayo, 2000).

Les concentrations des toxines diarrhéiques détectées par CL-MS dans la majorité des échantillons ont été supérieures à la norme : 160 µg eq. OA/ kg de coquillage. La densité de *Dinophysis* dans les échantillons d'eau de mer prélevés durant les périodes de toxicité ont dépassé la norme établie au Maroc pour ce genre du phytoplancton : 400 Cell.l-1. Mais reste à noter que durant certaines périodes de toxicité de bivalves (Dakhla en 2007 et Agadir en 2004 et en 2005) les concentrations de *Dinophysis* n'ont pas dépassé cette norme. Des résultats semblables ont été rapportés par Viviani et al. (1995) qui explique que de faibles concentrations de *Dinophysis*, ne dépassant pas par fois les 200 Cell/l, peuvent causer de très fortes toxicités des coquillages. Cette difficulté de relier la toxicité des coquillages avec la concentration de l'algue毒ique peut être expliquée par la variabilité dans le contenu cellulaire qui peut changer selon la saison et la région (Pavela-Vrancic et al. 2002). Cette hypothèse peut aussi expliquer la non saisonnalité de l'apparition des toxines DSP dans les bivalves de l'Atlantique sud marocain.

Concernant la comparaison entre les résultats du test souris et ceux de l'CL-MS a révélé que cette dernière méthode est capable de détecter les faux négatifs obtenus par le test souris. Contrairement au test souris qui consomme beaucoup de temps (24 h) et qui peut donner des faux positifs ou des faux négatifs. Les faux résultats du test biologique peuvent être causés par l'interférence avec d'autres composés toxiques autres que les phycotoxines diarrhéiques (Combes, 2003). Par contre, la méthode chimique possède un degré élevé de sélectivité par la séparation des différents composés toxiques présents dans les échantillons (Ciminiello et al. 2006), de sensibilité par la détection de faibles quantités des toxines et de rapidité, une cinquantaine de nos échantillons ont été analysés simultanément par CL-MS dans un délai très court.

Les concentrations des toxines DSP détectées par cette méthode chimiques dépassent dans la majorité des cas le seuil sanitaire qu'est de 160 µg eq. AO/ kg et dépassent aussi les taux induisant des intoxications diarrhéiques (800 µg eq. AO/ kg) (F.A.O 2004). Les alertes déclenchées par l'INRH ont permis l'instauration à temps des interdictions de la collecte et de la commercialisation des mollusques bivalves au niveau des zones touchées par ces toxines. Cependant, aucune intoxication alimentaire n'a été reportée durant ces épisodes de toxicité et la

commercialisation des coquillages a été autorisée après une épuration totale de l'environnement marin de ces régions.

CONCLUSION GENERALE

Le but de cette étude est de mettre au point un outil permettant d'évaluer l'exposition des gisements coquilliers, en particulier les mollusques bivalves, au phénomène des phycotoxines marines au niveau des côtes sud de l'Atlantique marocain (Agadir, Laâyoune et Dakhla). L'utilisation de deux méthodes de détection de ces biotoxines ainsi que l'identification des espèces phytoplanctoniques responsables des toxicités, ont été étudiées afin de répondre à cet objectif.

Cette étude a aussi traité l'implication de certaines espèces toxiques du phytoplancton dans le phénomène de toxicité des bivalves dans ces côtes.

Les analyses des phycotoxines effectuées dans les bivalves des côtes sud ont permis la détection des toxines PSP et DSP ainsi que l'identification des espèces productrices du phytoplancton.

Le suivi régulier des toxines PSP au niveau des gisements coquilliers a montré une manifestation annuelle de ces dernières durant les périodes chaudes estivales à Agadir et Laâyoune et automnales à Dakhla. Les taux de ces neurotoxines n'ont dépassé les normes établis au Maroc qu'à une seule reprise. Cette toxicité a été plus accentuée chez les espèces fouisseuses, notamment le couteau, que les bivalves filtreurs. Concernant les huîtres, ces mollusques ont montré une très faible accumulation des toxines en comparaison avec les autres espèces étudiées.

La majorité des toxines détectées ont été concentrées dans les glandes digestives des bivalves, l'analyse du profil toxinique de ces organes a permis d'identifier l'espèce phytoplanctonique responsable de la toxicité PSP. Cependant, la dominance des toxines carbamates GTX 2 et 3 par rapport aux toxines GTX1 et 4 et à la STX a permis de soupçonner l'implication d'*Alexandrium minutum* dans les épisodes de toxicité de 2003 jusqu'à 2007 touchant les côtes sud marocaines. Ce micro-organisme ainsi que plusieurs espèces appartenant au genre *Alexandrium* ont été identifiés durant toute cette étude.

Les dosages quantitatifs et qualitatifs de ces toxines ont été réalisés par le test biologique sur souris et par un test chimique utilisant la chromatographie (CLHP). Le premier protocole, basé sur l'utilisation des animaux de laboratoire, nécessite beaucoup de temps et ne donne pas une idée sur la composition toxinique ainsi que les concentrations réelles dans les échantillons. Par contre ; la chromatographie (CLHP-FD ou CL-MS) est un test très performant, sensible et très rapide. Ce dernier a permis la détection de faibles concentrations non décelées par le test biologique. Mais malgré ces inconvénients, le test souris reste suffisant pour la surveillance de certaines phycotoxines est plus précisément les phycotoxines paralytiques.

Concernant les phycotoxines lipophiles, les toxines détectées ont été des composés diarrhéiques de type A.O, DTX-1, ainsi que leurs esters associés. Ces toxines ont été décelées durant les quatre saisons et durant toute la période d'étude.

Les concentrations notées dans les échantillons toxiques dépassaient dans la majorité des cas les normes adoptées par le Maroc, ce qui justifie les interdictions instaurées durant ces épisodes de toxicité.

L'analyse du profil toxinique a permis de soupçonner l'implication de plusieurs espèces de *Dinophysis* dans ces événements de toxicité des bivalves dans les trois régions étudiées.

Les deux phycotoxines PSP et DSP ont touché les mollusques de tous les sites étudiés. A cause des faibles teneurs de la PSP décelées dans les coquillages de la zone sud, ces toxines ne présentaient pas un risque pour les consommateurs, par contre la toxicité DSP des bivalves posait un réel danger de santé publique. Ce pendant, le suivi régulier établi par le réseau de surveillance de la salubrité du milieu littoral de l'INRH a permis de déclencher des alertes à temps, ce qui a permis d'instaurer des interdictions de la collecte et de la commercialisation de ces mollusques durant les périodes de toxicité dans le but de protéger le consommateur de tout risque d'intoxication diarrhéique.

Les résultats présentés sur les comparaisons des données obtenues par la méthode chimique et par la méthode biologique ont mis le point sur les inconvénients de ces derniers tests surtout dans l'analyse des toxines lipophiles. Nos résultats viennent en accord avec la dernière directive de la C.E (E.U) 15/2011, le test souris doit être remplacé par la LC-MS/MS ou par d'autres méthodes alternatives validées par l'U.E dans la surveillance des phycotoxines lipophiles avant le 31/12/2014.

Références bibliographiques

- Abouabdellah R., Taleb H., Bennouna A., Erler K., Chafik A & Moukrim A., (2008). Paralytic shellfish poisoning toxin profile of mussels *Perna perna* from southern Atlantic coasts of Morocco. *Toxicon*, 51 : 780-786.
- Abouabdellah R, Bennouna A, El Attar J, Erler K, Dellal M, Chafik A. & Moukrim A. (2011). Diarrhetic shellfish poisoning toxin profil of shellfish from Southern Atlantic coasts of Morocco. *South Asian J Exp Biol*; 1 (2): 101-106.
- Elgarch A, Vale P, Rifai S & Fassouane A., (2008). Detection of Diarrheic Shellfish Poisoning and Azaspiracid Toxins in Moroccan Mussels: Comparison of the LC-MS Method with the Commercial Immunoassay Kit. *Mar Drugs*. 6 (4) : 587–594.
- Alfonso M., Durán R.& Arufe M.C. (2000). Effect of excitatory amino acids on serum tsh and thyroid hormone levels in freely moving rats. *Hormone Research*, 54: 78-83.
- Amzil Z., Vernoux J.P. & Pottier I. (2001a). Les principales classes de phycotoxines. In: *Toxines d'algues dans l'alimentation*. Frémy J.P., Lassus P. et al. Ifremer, 159-188.
- Amzil Z, Sibat M, Royer F, Masson N. & Abadie E, (2007). Report on the first detection of pectenotoxin-2, spirolide-A and their derivatives in French shellfish. *Mar.Drugs* 5: 168-179.
- Anderson D.M., (1990). Toxin variability in *Alexandrium* species. In: Graneli E., et al. (Eds.), *Toxic Marine Phytoplankton*. Elsevier, New York, pp. 41–51.
- AOAC, (1990). Paralytic Shellfish Poison, Biological Method, Final Action. In: AOAC (Ed.), *Official Methods of Analysis*.15th Ed., Arlington, VA, Method no 959.08.
- AOAC, Official Methods Of Analysis, (2000). Natural Toxins, chapter 49 p : 59.
- Baden, D., Fleming L., (1995). Marines Toxins. *Handbook of clinical neurology: intoxications of the nervous system. II Natural toxins and drugs*. F. A. d. Wolff. Amsterdam., Elsevier. 21.
- Balech (1995). The genus *Alexandrium* Halim (Dinoflagellata). Sherkin Island Marine Station, Sherkin Island, Co. Cork, Ireland, 151p.
- Bates S.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.*, 46: 1203-1215.
- Bennouna A., Berland B., El Attar J. & Assobhei O., (2000). Etude des populations phytoplanctoniques de la lagune de Oualidia (Maroc), dinoflagelles potentiellement nuisibles. *Marine Life*, 10 (1-2) : 3-18.

- Bennouna A., Berland B., El Attar J., Assobhei O., (2002). *Lingulodinium polyedrum* (Stein) Dodge red tide in shellfish areas along Doukkala coast (Moroccan Atlantic). Oceanologica Acta 25 (2002) 159–170.
- Bennouna A , El Attar J, Berland B et Assobhei O. (2005a). Etude du phytoplancton des sites lagunaires aquacoles Oualidia et Sidi Moussa (Evolution spatio-temporelle, utrastructure et nuisance), Proceeding du Workshop international « AIRES MARINES & COTIERS PROTÉGÉS » Meknes 5.
- Bennouna A , El Attar J, Berland B et Assobhei O. (2005b): «Study of phytoplankton along of Abda-doukkala area (Moroccan Atlantic), GEOHAB and Stratification, UNESCO,. p.19.
- Benouna A. 2008. Etude du phytoplancton du littoral atlantique Abda-Doukala (Evolution spatio-temporelle, Utrastructure et impact des taxons potentiellement nuisibles). Thèse université Bouchaib Doukali, El Jadida. 175p.
- Billard C., Fresnel J. & Chrétiennot-Dinet M.J., (2001). Les espèces productrices de phycotoxines marines et leur détection. In: Toxines d’algues dans l’alimentation. Frémy J.P., Lassus P. et al. Ifremer, 129-156.
- Bolch C.J.S., Negri A.P. & Hallegraeff G.M. , (1999). *Gymnodinium microreticulatum* nov. sp. (Dinophysaceae): a naked, microreticulate cystproducing dinoflagellate, distinct from *Gymnodinium catenatum* and *Gymnodinium nollerii*. Phycologia, 9-74.
- Bourhili, E.H., (1982). Intoxication alimentaire par la moule (51 cas à Agadir), Octobre et Novembre 1982. Thèse Fac. Med. et Pharm., Rabat. 84p.
- Bricelj, V.M., Lee, H., Cembella, A.D. & Anderson, D.M., (1990). Uptake kinetics of paralytic shellfish toxins from the dinoflagellate *Alexandrium fundyense* in the mussel *Mytilus edulis*. Mar. Ecol. Prog. 63, 177–188.
- Bricelj, V.M. & Shumway, E., (1998). Paralytic shellfish toxins in bivalve molluscs: occurrence, transfer kinetics, and biotransformation. Rev. Fish. Sci. 6, 315–383.
- Cembella, A.D., Shumway, S.E. & Lewis, N.I., (1994). Sequestering and putative biotransformation of paralytic shellfish toxins by the sea scallop *Placopecten magellanicus*: seasonal and spatial scales in natural populations. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 180: 1–22.
- Cembella A.D., Lewis N.I. & Quilliam M.A., (2000). The marine dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophysaceae) as the causative organism of spirolide shellfish toxins. Phycologia, 39: 67-74.

- Cendes F., Anderman, F.A., Carpenter, S., Zatorre, R.J. & Cashman N.R. (1995). Temporal Lobe Epilepsy Caused by Domoic Acid Intoxication: Evidence for Glutamate Receptor-mediated Excitotoxicity in Humans. *Ann. Neurol.* 37: 123-126.
- Chen, C.Y. & Chou, H.N. (1998). Transmission of the paralytic shellfish poisoning toxins from dinoflagellate to gastropod. *Toxicon* 36 (3): 515-522.
- Chen CY. & Chou HN., (2002). Fate of paralytic shellfish poisoning toxins in purple clam *Hiatula rostrata*, in outdoor culture and laboratory culture. *Marine Pollution Bulletin* 44:733738
- Ciminiello P., C. Dell'Aversano, E. Fattorusso, M. Fiorino, G.S. Magno, L. Tartaglione, C. Grillo & N. Melchiorre, (2006). The Genoa 2005 Outbreak. Determination of putative palytoxin in Mediterranean Ostreopsis ovata by a new liquid chromatography tandem mass spectrometry method, *Analytica Chemistry* 78: 6153-6159.
- Ciminiello P, Fattorusso E., Fiorino M. & Montresor M., (2000). Saxitoxin and neosaxitoxin as toxic principles of *Alexandrium andersonii* (Dinophysaceae) from the Gulf of Naples, Italy. *Toxicon*, 38:1871-1877.
- Clark, R. F. & S. R. Williams, (1999). "A review of selected seafood poisonings." *Undersea Hyperb. Med.* 26(3): 175-184.
- Combes RD. , (2003). The mouse bioassay for diarrhetic shellfish poisoning: a gross misuse of laboratory animals and of scientific methodology. *Alternatives to laboratory animals* 31: 595–610.
- Daranas AH, Norte M. & Fernandez JJ., (2001) Toxic marine microalgae. *Toxicon* 39: 1101– 32.
- Dellal M, Abouabdellah R, Chafiq A., Hassani L. M.& Rijal Leblad B., (2007). *Alexandrium minutum* et contamination des coquillages par la PSP au niveau de la Baie de Dakhla (sud du Maroc). First IOC/HANA Workshop on Harmful Algal Blooms in North Africa, Casablanca, Morocco, 18 – 20 October 2007.
- Draisci R., Lucentini L., Giannetti L., Boria P. & Poletti R., (1996). First report of PTX-2 in algae (*Dinophysis fortii*) related to seafood poisoning in Europe. *Toxicon*, 34 : 923-925.
- Draisci R., Palleschi L., Giannetti L., Lucentini L., James K.J., Bishop A.G., Satake M., & Yasumoto T., (1999). New approach to the direct detection of known and new diarrheic Shellfish toxins in mussels and phytoplankton by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr., A* 847 : 213-221.
- Eaglesham G.K, Brett S.J., Davis B.C. & Holling N. (2000). Detection of pectenotoxin 2 and pectenotoxin 2 seco acids in phytoplankton and shellfish from the Ballina region of

New South Wales, Australia. 10th Int., IUPAC Symp. Mycotoxins and Phycotoxins, Sao Paulo, Brazil, May 21-25.

EFSA, (2009). Les biotoxines marines dans les coquillages – Le groupe des saxitoxines. The EFSA Journal 1019: 2-3.

FAO, (2004). Marine Biotoxins, FAO Food and Nutrition Paper, 80. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. 278 pp. [1] Lee J.S., Igarashi T., Fraga S., Dahl E., Hovgaard P., Yasumoto T., 1989. Determination of diarrhetic shellfish toxins in various dinoflagellates species. *J. Appl. Phycol.*, 1, p. 147-152.

Fernandez M.L., Miguez A., Cacho E., Martinez A., Diogene J. & Yasumoto T., (2002). Bioensayos con mamiferos y ensayos bioquimicos y celulares para la detection de ficoltoxinas. In: Sar, E.A., Ferrario, M.E. y Reguera, B. (eds.), *Floraciones Algales nocivas en el Cono sur Americano*. Instituto Espagnol de Oceanografia, 77-120.

Fraichech M, Berraho A, Ramdani M, Chafik A, Serghini M & Moukrim A., (2005). Evolution spatio-temporelle des dinoflagellés dans la baie d'Agadir, Mar. Life, 15 (1-2) : 19-27.

Franco, J.M. & Fernández, P., (1993). Separation of paralytic shellfish toxins by reversed phase high performance liquid chromatography with postcolumn reaction and fluorimetric detection. *Chromatographia* 35: 613-620.

Gago-Martinez, A., Rodriguez-Vazquez, J.A., Thibault, P. & Quilliam, M.A., (1996). Simultaneous occurrence of diarrhetic and paralytic shellfish poisoning toxins in Spanish mussels in 1993. *Nat. Toxins*, 4 (2): 72-79.

Goto H, Igarashi T, Yamamoto M, Yasuda M, Sekiuchi R, Watai M, Tanno K. & Yasumoto T., (2001). Quantitative determination of marine toxins associated with diarrhetic shellfish poisoning by liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 907: 181–189.

Gueguen M, Lassus P, Laabir M, Bardouil M, Baron R, Sechet V, Truquet P, Amzil Z, & Barille L., (2008). Gut passage times in two bivalve molluscs fed toxic microalgae: *Alexandrium minutum*, *A. catenella* and *Pseudo-nitzschia calliantha*. *Aquatic Living Res.* 21:21-29

Hallegraeff, G.M., (1993). A review of harmful algae blooms and their apparent global increase. *Phycologia*, 32: 79-99.

Halstead B.W. (1965). Poisonous and venomous marine animals of the world. United States Government, Printing Office, Washington, DC, 1: 184-189.

- Hampson D.R., Huang X.P., Wells J.W., Walter J.A. & Wright J.L.C. , (1992). Interaction of domoic acid and several derivatives with kainic acid and AMPA binding sites in rat brain. Eur. J. Pharmacol., 218: 1-8.
- Holland PT, McNabb P, Selwood AL, Mackenzie L. & Beuzenberg V., (2003). LC-MS methods for marine biotoxins and their introduction into the New Zealand shellfish regulatory programme. Cawtron Report 906, Cawthon Institute, Nelson, 10–17.
- Hoshiai G, Suzuki T, Onodera T, Yamasaki M. & Taguchi S., (1997). Cases of non toxic mussels under the presence of high concentrations of toxic dinoflagellate *Dinophysis acuminata* that occurred in Kesennuma Bay, Northern Japan. Fisheries Science 63: 317–318.
- Hu T., Curtis J.M., Walter J.A., McLachlan J.L. & Wright J.L.C., (1995). Two new water-soluble DSP toxin derivatives from the Dinoflagellate *Prorocentrum maculosum*: possible storage and excretion products. Tetrahedron Lett., 36 (51): 9273-9276.
- Hu T., Curtis J.M., Walter J.A. & Wright J.L.C., (1996). Characterization of biologically inactive spirolides E and F: identification of the spirolides pharmacophore. Tetrahedron Lett., 37(43): 7671-7674.
- Hummert, C., Ritscher, M., Reinhardt, K. & Lukas, B., (1997). Analysis of the characteristic PSP profiles of *Pyrodinium bahamense* and several strains of Alexandrium by HPLC based on ion-pair separation, post-column oxidation, and detection. Chromatographia 45: 312–316.
- Hwang, D.F. & Tsai, Y.H. , (1999). Toxins in Toxic Taiwanese crabs. Food Rev. Int. 15(2): 145-162.
- Ito E., Satake M., Ofuji K., Kurita N., Mc Mahon T., James K. & Yasumoto T., (2000). Multiple organ damage caused by a new toxin azaspiracid, isolated from mussels produced in Ireland. Toxicon, 38 (7): 917-930.
- Kat M., (1979). The occurrence of *Prorocentrum* species and coincidental gastrointestinal illness of mussel consumers. In: Toxic dinoflagellate blooms. Taylor D.L. et Seliger H.H. (eds). Elsevier, Amsterdam, 215-220.
- Kerr DS, Razak A. & Crawford N., (2002) Age-related changes in tolerance to the marine algal excitotoxin domoic acid. Neuropharmacology 43:357–366
- Krys S. & Frémy J.M., (2002). Phycotoxines et produits de la mer : risques sanitaires associés et mesures de prévention. Revue française des Laboratoires, 348, 29-38.
- Klopper S, Scharek R, Gredts G., (2003). Diarrhetic shellfish toxicity in relation to the abundance of *Dinophysis spp* in the German Bight near Helgoland. Marine Ecology progress Series 259: 93-102.

- Ledoux, M. I., Bardouil, M, Nezan, E. & Erard, E. (1991). Field and experimental studies of shellfish contaminated by an *Alexandrium minutum* strain. In Fremy, J.M. ed. Proceedings of the symposium on marine biotoxins, January 1991, pp. 43-51. Paris, Centre National d'Etudes Veterinaires et Alimentaires.
- Lee J.S., Igarashi T., Fraga S., Dahl E., Hovgaard P. & Yasumoto T., (1989a). Determination of diarrhetic shellfish toxins in various dinoflagellates species. *J. Appl. Phycol.*, 1, 147- 152. In: M. Pavela-Vrancic, V. Mestrovic, I. Marasovic, M. Gillmanc, A. Fureyc, K. J. James 2002. DSP toxin profile in the coastal waters of the central Adriatic Sea. *Toxicon* 40 1601–1607.
- Litaker R.W., Tester P.A., Levy M.G., Noga E.J. (1999). The phylogenetic relationship of *Pfiesteria piscida*, Cryptoperidiniopsoid sp., *Amyloodinium ocellatum* and a *Pfiesteria-like* dinoflagellate to thers dinoflagellates and apicomplexans. *J. Phycol.*, 35, 1379-1389.
- McMahon, T., Silke, J., Nixon., E., Taaffe, B., Nolan, A., McGovern, E. & Doyle, J., 1996. Seasonal variation in diarrhetic shellfish toxins in mussels from the Southwest coast of Ireland in 1994. In: Keegan, B.F. and O'Connor R. (eds.), Irish Marine Science 95. Galway University Press, Galway, p. 417-432.
- Marcaillou-Le Baut C., Krys S. & Bourdeau P. (2001). Syndromes observés et données épidémiologiques. In: Toxines d'algues dans l'alimentation. Frémy J.P., Lassus P. et al. Ifremer, 371-399.
- Maruyama, J., Noguchi, T., Onoue, Y., Ueda, Y., Hashimoto, K. & Kamimura, S., (1983). anatomical distribution and profiles of the toxins in highly PSP-infested Scallops from Ofunato Bay during 1980–1981. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 43, 233–235.
- Miles CO, Wilkins AL, Stirling DJ. & MacKenzie AL, (2003). Gymnodimine C, an isomer of Gymnodimine B, from *Karenia selliformis*. *J. Agric. Food Chem.* 51: 4838-4840.
- Mountfort, D.O. , (2001). Protein phosphatase inhibition assay adapted for determination of total DSP in contaminated mussels. *Toxicon* 39: 383-390.
- Mundey R., Towers N.R., Mackenzie L., Beuzenberg V., Holland P.T. & Miles C.O. (2004). Acute toxicity of gymnodimine to mice. *Toxicon*, 44, 173-178.
- Murakami Y., Oshima Y. &Yasumoto T., (1982). Identification of okadaic acid as a toxic componend of a marine dinoflagellate *Protocentrum lima*. *Bull. Jap. Soc. Fish.*, 48(1), 69-72.

- Ofuji K., Satake M., McMahon T., Slike J., James K.J., Naoki H., Oshima Y & Yasumoto T. (1999). Two analogs of azspiracid isolated from mussels, *Mytilus edulis*, involved in human intoxication in Ireland. *Nat. Toxins*, 7, 99-102.
- Olney, J. W. (1990). "Excitotoxicity: an overview." *Can Dis Wkly Rep* 16 Suppl 1E: 47-57; discussion 57-8.
- Oshima Y., Sugino H., Itakura M., Hirota M, Yasumoto T., (1990). Comparative studies on paralytic shellfish toxin profil of dinoflagellates and bivalves. In: Graneli, E., Sundström B., Edler L., & Anderson D.M., (eds.), *Toxic Marine Phytoplankton*, Elsevier, New York, pp.391-396.
- Pavela-Vrancic M, Mestrovic V, Marasovic I, Gillmanc M, Fureyc A & James K J. (2002). DSP toxin profile in the coastal waters of the central Adriatic Sea. *Toxicon* 40: 1601–1607.
- Peng, Y.G., Clayton, E.C. & Ramsdell, J.S. (1997). Repeated Independent Exposures to Domoic Acid Do Not Enhance Symptomatic Toxicity in Outbred or Seizure-Sensitive Inbred Mice. *Fundam. Appl. Toxicol.* 40: 63-67.
- Pruss A. (1998) Review of epidemiological studies on health effects from exposure to recreational waters. *Int. J. Epidemiol.* 27:1-9.
- Puiseux-Dao S., Molgo J., Benoit E., Fessard V., Puech L. & Ten-Hage L. (2001). Toxicologie. In: *Toxines d'algues dans l'alimentation*. Frémy J.P., Lassus P. et al. Ifremer, 301-369.
- Quilliam M.A. (2003) Chemical methods for lipophilic shellfish toxins. In: G.M. Hallegraeff, D.M. Anderson, & A.D. Cembella, pp. 211-224. *Monographs of Oceanographic Methodology*. Paris: Intergovernmental Oceanographic Commission (UNESCO).
- Sagou R, Amanhir R, Taleb H, Vale P, Blaghen M. & Loutfi M, (2005). Comparative study on differential accumulation of PSP toxins between cockle (*Acanthocardia tuberculatum*) and sweet clam (*Callista chione*). *Toxicon*, 46 (6) 612-8.
- Satake, M., Ofuji, K., Naoki, H., James, K., Furey, A., McMahon, T., Silke, J. & Yasumoto, T. (1998b). Azaspiracid, a New Marine Toxin Having Unique Spiro Ring Assemblies, Isolated from Irish Mussels, *Mytilus edulis*. *J. Am. Chem. Soc.* 120: 9967-9968.
- Shimizu,Y., Gupta, S. & Prasad, A. V.V., (1989). Biosynthesis of dinoflagellate toxins, in *Toxic Marine phytoplankton* (E, Graneli, S. Sundstrom, L. Edler, and D.M. Anderson eds), Elsevier, New York, pp. 62-73
- Sierra-Beltran, A.P., Cruz, A., Nunez, E., Del Villar, L.M., Cerecero, J. & Ochoa, J.L. (1998). An overview of the marine food poisoning in Mexico. *Toxicon* 36(11) : 1493-1502.

- Silvert WL, Cembella AD (1995) Dynamic modeling of phycotoxin kinetics in the blue mussel, *Mytilus edulis*, with implication for other marine-invertebrates. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 52:521-531
- Smith J.C. (1993). Toxicity and *Pseudo-nitzschia pungens* in Prince Edward Island, 1987-1992. Harmful Algae News, 6, 1-8.
- Sommer H, Whedon WF, Kofoid CA. & Stohler R. (1937). Relation of paralytic shellfish poison to certain plankton organisms of the genus Gonyaulax. AMA Arch Path 24:537–559.
- Steidinger, K. A. (1993). Some taxonomic and biologic aspects of toxic dinoflagellates. In Falconer, I. R. (Ed.). Algal toxins in sea food and drinking water. Academic Press, London, pp. 1–28.
- Suganuma M., Fujiki H., Suguri H., Yoshizawa S., Hirota M., Nakayasu M., Ojika M., Wakamatsu K., Yamada K. & Sugimura T., (1988). Okadaic acid: an additional nonphorbol-12-tetradecanoate-13-acetate-type tumor promoter. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85 : 1768-1771.
- Suzuki, T. & Mitsuya, T., (2001). Comparison of dinophysistoxin-1 and esterified dinophysistoxin-1 (dinophysistoxin-3) contents in the scallop *Patinopecten yessoensis* and the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Toxicon 39: 905-908.
- Suzuki, T., Mitsuya, T., Matsubara, H. & Yamasaki, M. (1998). Determination of pectenotoxin-2 after solid-phase extraction from seawater and from the dinoflagellate *Dinophysis fortii* by liquid chromatography with electrospray mass spectrometry and ultraviolet detection: Evidence of oxidation of pectenotoxin-2 to pectenotoxin-6 in scallops. J. Chromatogr. A 815: 155-160.
- Svennsson, S. & Förlin, L., (2004). Analysis of the importance of lipid breakdown for elimination of okadaic acid (diarrhetic shellfish toxin) in mussels. *Mytilus edulis*: results from a field study and a laboratory experiment. Aquat. Toxicol. 66, 405–418.
- Tachibana K., Scheuer P.J., Tsukitani Y., Kikuchi H., Engen D.V., Clardy J. & Shhmitz F.J., (1981). Okadaic acid a cytotoxic polyether from two marine sponges of the genu *Halichondria*. J. Am. Chem. Soc., 103 : 2469-2471.
- Tagmouti F., (2001). Etude des phycotoxines marines PSP, DSP chez les mollusques bivalves des côtes marocaines. Mémoire de thèse. Université Hassan II, Faculté des sciences Aïn chock, Casablanca, Maroc. 170p.
- Takai A., Bialojan C., Troschka M. & Rueegg J.C., (1987). Smooth muscle myosin phosphatase inhibition and force enhancement by black sponge toxin. FEBS Lett., 217 : 81-84.

- Takemoto T. & Daigo K. (1958). Constituents of *Chondria armata*. Chem. Pharm. Bull., 6, 578-580.
- Taleb, H., 2005. Phycotoxines paralysantes (PSP) et diarrhéiques (DSP) le long des côtes marocaines: évolution spatio-temporelle, profil toxinique et cinétique de décontamination. Thèse de Doctat d'Etat, Université Hassan II, Faculté des Sciences Ain Chok, Casablanca, Maroc, 159 p
- Taleb H. & Hummert C., (2000). Okadaïc Acid and dinophysistoxin-2 in Morocco. Abstracts of 9th Inter. Conf. on Harmful Algae Bloom, Tasmania.
- Taleb H., Vale P., Amanhir R., Benhadouch A. & Sagou R. (2009). Simultaneous screening for diarrheic toxins and azaspiracids on Moroccan Coasts. ICMSS09 – Nantes, France symposcience.org
- Taleb, H., Vale, P., Jaime, E. & Blaghen, M., (2001). Study of paralytic shellfish poisoning toxin profile in shellfish from the Mediterranean shore of Morocco. Toxicon 39 (12) : 1855–1861.
- Taleb, H., Vale, P., et Blaghen, M., (2003). Spatial and temporal evolution of PSP toxins along the Atlantic shore of Morocco. Toxicon 41 (2) : 199–205.
- Taleb H., Vale P., Amanhir R., Benhadouch A., Sagou R. & Chafik A., (2006). First detection of azaspiracids in North West Africa. Journal of Shellfish Research 25(3) : 1067-1070.
- Tber A. (1983), Intoxication biologique : Cas de mytilotoxine (phénomène des eaux rouges), Magh. Vétér. 2 : 15–19.
- Teitelbaum JS., Zatorre RJ., Carpenter S., Gendron D., Evans AC., Gjedde A. & Cahsman NR., (1990). Neurologic sequelea of domoic acid intoxication due to the ingestion of contaminated mussels. New England journal of medecine 322: 1781-1787
- Ten-Hage L., Turquet J., Quod J.P. & Couté A. (2000). An overview of the biodiversity of benthic dinoflagellates from La Réunion Island (France, South West Indian Ocean). Proc. 9th Int. Conf. Harmful algal blooms, February 7-11, Hobart, Tasmania, abstract book, 232.
- Thielert G., Kaiser I. & Luckas B., (1991). HPLC determination of PSP toxins. In: J.M. Fremy (eds.) Proceedings of symposium on marine biotoxins. Editions CNEVA, Maisons-Alfort. pp. 121-125.
- Touzeta, N., Francob, J. M. & Rainea, R., (2007). Influence of inorganic nutrition on growth and PSP toxin production of *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) from Cork Harbour, Ireland. Toxicon 50: 106–119

- Ujevic I, Roje Rb., Nincevic-Gladan Z & Marasovic I., (2012). First report of Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from eastern Adriatic Sea (Croatia). *Food Control* 25. pp : 285-291
- Utermohl, H., (1958). Zur Vervollkommung der Quantitativen Phytoplankton Methodik. "Mitteilungen-Communications" Internationale Vereinigung fur Theoretische und Angewandte Limnologie 9, 1-38.
- Underdal, B., Yndestad, M. & Aune, T., (1985). DSP intoxication in Norway and Sweden, autumn 1984 – spring 1985. In Toxic dinoflagellates. pp. 489-494. Ed. by D. M. Anderson. A. W. White, and D. G. Baden. Elsevier, New York.
- Vale, P., Sampayo, M.A.M., 2000. Dinophysistoxin-2: a rare diarrhetic toxin associated with *Dinophysis acuta*. *Toxicon*, 38 (11) : 1599-1606.
- Van Apeldoorn, M.E., (1999). Amnesic shellfish poisoning: A review. RIVM report 388802 019. October 1999.
- Van Dolah, F. M., (2000). "Marine algal toxins: origins, health effects, and their increased occurrence." *Environ. Health Perspect*, 108 Suppl 1: 133-41.
- Van Egmond, H.P., Aune, T., Lassus, P., Speijers, G. & Waldock, M., (1993). Paralytic and diarrhoeic shellfish poisons: occurrence in Europe, toxicity, analysis and regulation. *J. Nat. Toxins* 2: 41-83.
- Viviani, R., Boni, L., Cattani, O., Milandri, A., Polletti, R. & Pompei M., (1995). ASP, DSP, NSP and PSP monitoring in mucilaginous aggregates and in mussels in a coastal area of the Northern Adriatic Sea facing Emilia-Romagna in 1988, 1989 and 1991. *Sci. Total. Environ.* 165, 203.
- Wright, J.L.C. & Quilliam, M.A., (1995). Methods for Domoic Acid, the Amnesic Shellfish Poisons. In Hallegraeff, G.M. et al. eds. Manual on Harmful Marine Microalgae. IOC Manuals and Guides No. 33. UNESCO. pp.113-133.
- Wright, J.L.C., (1995). Dealing with seafood toxins: present approaches and future options. *Food Res. Int.*, 28: 347–358.
- Wu Q., Nelson W.H., Hargraves P., Zhang J., Brown C.W. Seelenbinder J.A., (1998). Differentiation of algae clones on the basis of resonance raman spectra excited by visible light. - *Anal. Chem.*, 70 (9) : 1782-1787.
- Yasumoto T., Oshima Y., Yamaguchi M., (1978). Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the Tohoku District. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 44 (11): 1249-1255.
- 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. Sc. Fish., 46 : 1405-1411.

Yasumoto, T., Murata, M., Oshima, Y., Matsumoto, G.K. & Clardy J., (1984). Diarrhetic shellfish poisoning. ACS Symposium Series No. 262. In Ragelis, E.P. ed. Seafood Toxins, pp. 207-214. American Chemical Society Symposium Series.

Yasumoto, T., Murata, M., Oshima, Y., Sano, M., Matsumoto, G.K. & Clardy, J., (1985). Diarrhetic Shellfish Toxins. Tetrahedron, 41(6) : 1019-1025.

Yasumoto T., Murata M., Lee J.S. & Torigoe K., (1989). Polyether toxins produced by dinoflagellates. In: Mycotoxins and phycotoxins, 88. Natori S., Hashimoto K. et Veno T. (eds). Elsevier, Amsterdam, 375-382.

Yu KN, Choi MC, Shen XY, Wu RSS, Wang WX & Lam PKS, (2005). Modeling of depuration of paralytic shellfish toxins in *Chlamys nobilis* and *Perna viridis*. Marine Pollution Bulletin, 50: 474-479.

Yu R.C., Hummert C., Luckas B., Qian P.Y. & Yhou M.J., (1998). Modified HPLC method for analysis of PSP toxins in algae and shellfish from China. Chromatographia, 48: 671-675

Zardoya R., Costas E., Lopez-Rodas V., Garrido-Pertierra A. & Bautista J.M., (1995). Revised dinoflagellate phylogeny inferred from molecular analysis of large-subunit ribosomal RNA gene sequences. J. Mol. Evol., 41: 637-645.

ANNEXES:

Annexe 1 : Publication sur les phycotoxines PSP

Rachid Abouabdellah, Hamid Taleb, Asmae Bennouna, Katrin Erler, Abdeghani Chafik, Abdelatif Moukrim **2008**. Paralytic Shellfish Poisoning Toxin Profil of mussels *Perna perna* from southern Atlantic coasts of Morocco. *Toxicon* 51 : 780–786.

Annexe 2 : Publication sur les phycotoxines DSP

Rachid Abouabdellah, Asmae Bennouna, Jaouad El Attar, Katrin Erler, Mina Dellal, Abdelghani Chafik, Abdelatif Moukrim **2011**. Diarrhetic shellfish poisoning toxin profil of shellfish from Southern Atlantic coasts of Morocco. *South Asian J Exp Biol*; 1 (2): 101-106.

Annexe 3 : Publication sur Ostréopsis et toxines lipophiles.

Annexe 4 : Communications.

Annexe 1



ELSEVIER

Toxicon 51 (2008) 780–786

TOXICON

www.elsevier.com/locate/toxicon

Paralytic shellfish poisoning toxin profile of mussels *Perna perna* from southern Atlantic coasts of Morocco

Rachid Abouabdellah^a, Hamid Taleb^b, Asmae Bennouna^a, Katrin Erler^c,
Abdeghani Chafik^b, Abdelatif Moukrim^d

^aInstitut National de Recherche Halieutique, B.P 5221 Q.I, Agadir, Morocco

^bInstitut National de Recherche Halieutique, 2 rue Tiznit, Casablanca, Morocco

^cFriedrich-schiller University of Jena, Dornberger Strasse 25, 07743 Jena, Germany

^dFaculté des sciences Ibnou Zohr, Université Ibnou Zohr, Agadir, Morocco

Received 7 August 2007; received in revised form 20 November 2007; accepted 5 December 2007

Available online 14 December 2007

Abstract

During the monitoring programme of harmful algal blooms established along the south Atlantic coast of Morocco, a bimonthly determination of harmful algae and phycotoxins analysis in *Perna perna* was carried out from May 2003 to December 2004. Results of mouse bioassay (in organs and whole flesh) showed a seasonal evolution of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxin. The mussel's contamination was associated with the occurrence in water of *Alexandrium minutum*.

The PSP toxin profile obtained with high-performance liquid chromatography (HPLC/FD) revealed the dominance of gonyautoxins GTX2 and GTX3 and a minority of GTX1, GTX4 and saxitoxin (STX). This profile explains that the toxicity was mainly associated with *A. minutum*.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Alexandrium minutum*; Paralytic shellfish poisoning; Toxin profile; *Perna perna*; Morocco

1. Introduction

The contamination of shellfish by paralytic shellfish poisoning (PSP) is a real worldwide threat for public health and has a negative effect on shellfish farming (Hallegraeff, 1995).

Currently, there are at least 21 PSP known compounds. These toxins are separated into four groups: carbamate (saxitoxin (STX), neosaxitoxin (neoSTX) and gonyautoxins (GTX1-4); N-sulpho-carbamoyl (GTX5-6, C1-4); decarbamoyl (dc-)

(dcSTX, dcneoSTX and dcGTX1-4) and deoxydecarbamoyl (doh) (doSTX, doneoSTX and doGTX1). Generally, the PSP toxins are synthesized by several *Alexandrium* species (Schantz et al., 1966), *Gymnodinium catenatum* (Oshima et al., 1987) and *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* (Harada et al., 1982). The specie *Alexandrium minutum* was identified as the organism responsible for the PSP events in several countries in Ireland (Touzeta et al., 2007), Italy, UK, Portugal, Norway, France and Spain (FAO, 2004).

Morocco with important natural beds of mussels and some areas of aquaculture is not spared from this problem. In the Mediterranean coast, the

Corresponding author. Fax: +212 28 82 74 15.
E-mail address: dichar75@yahoo.fr (R. Abouabdellah).

permanent PSP toxicity in bivalve shellfish has been associated with *G. catenatum* (Taleb et al., 2001), but in the North Atlantic coasts, *G. catenatum* and *A. minutum* are both implied in the PSP toxicity of 1994 and 1998. The level of this toxicity was superior to the maximum permissible level (MPL) (Taleb et al., 2003). In 1982, 51 persons were intoxicated following the ingestion of Agadir's mussels (Bourhili, 1982). In Morocco, the MPL (80 mg STX equivalents/100 g shellfish) is similar to that set by the US Food and Drug Administration (FDA, 1997).

This study reports the first determination of PSP toxin profile of *Perna perna* from the southern Atlantic coasts of Morocco. The temporal evolution of *Alexandrium* spp. and *Gymnodinium* spp. and the accumulation of this toxin in organs and in whole flesh were reported in this paper.

2. Materials and methods

A monitoring programme was carried out bimonthly from May 2003 to December 2004 at three mussels beds regions along the South Atlantic Moroccan shore: Tifnit (Agadir) 30°11'718N-09°13'846W; Akhfennir (Laayoune) 28°10'534N-12°10'636W and Oum labouir (Dakhla) 23°14'92N-15°15'59W (Fig. 1). The geographical location of sampling areas was determined using the Global Positioning system. More than 120 water samples were collected in surface waters at high tide.

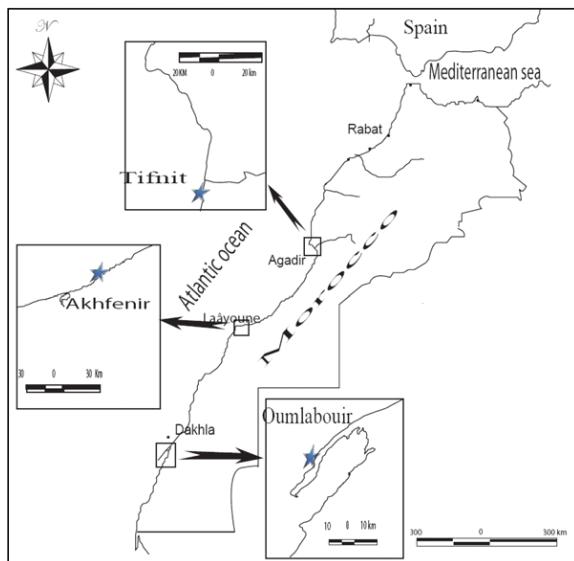


Fig. 1. Sampling sites in southern Atlantic coasts of Morocco.

Mussels (*P. perna*) samples were collected at low tide, in the same areas, washed and dissected into digestives glands, muscle, mantel, gonads and gills.

2.1. Phytoplankton analysis

A potentially harmful species of dinoflagellates were analysed and identified by inverted microscopy according to the Utermöhl method (1958).

2.2. Mouse bioassay

Mussel samples were extracted according to the AOAC method (1990). Briefly, 100 g of homogenized tissues was mixed with 100 ml of chlorydric acid 0.1 M (pH adjusted to 2–3) and the extract boiled for 5 min; after cooling the pH was adjusted to 2–3 by HCl 5 M or NaOH 0.1 M, then the mixture was transferred to a graduated cylinder, diluted to 200 ml by distilled water and centrifuged at 3000g for 15 min. One millilitre of the supernatant was injected intraperitoneally into three 20 g albinos mice. The values were expressed in mg STX eq/100 g meat.

2.3. HPLC analysis

PSP toxins profiles were screened by liquid chromatography (high-performance liquid chromatography (HPLC)/FD) on contaminated mussel's tissues using post-column oxidation with periodic acid as described by Thielert et al. (1991) and modified by Hummert et al. (1997) and Yu et al. (1998). STX, neoSTX and gonyautoxins (GTX1, 2, 3, 4) were purchased from the National Research Council Canada (NRC-PSP- 1B). The standards solutions were diluted with acetic acid 0.03 N as required.

3. Results

3.1. Monitoring data

The samples of seawater analysed from Tifnit, Akhfennir and Oumlabouir contained micro algae belonging to two genera: *Alexandrium* and *Gymnodinium*. (Fig. 2) The specie *A. minutum* was observed and identified during the detection of PSP toxin in the mussels of three regions.

In Akhfennir surface waters, *Alexandrium* spp. and *Gymnodinium* spp were recorded in 2003 and 2004 at

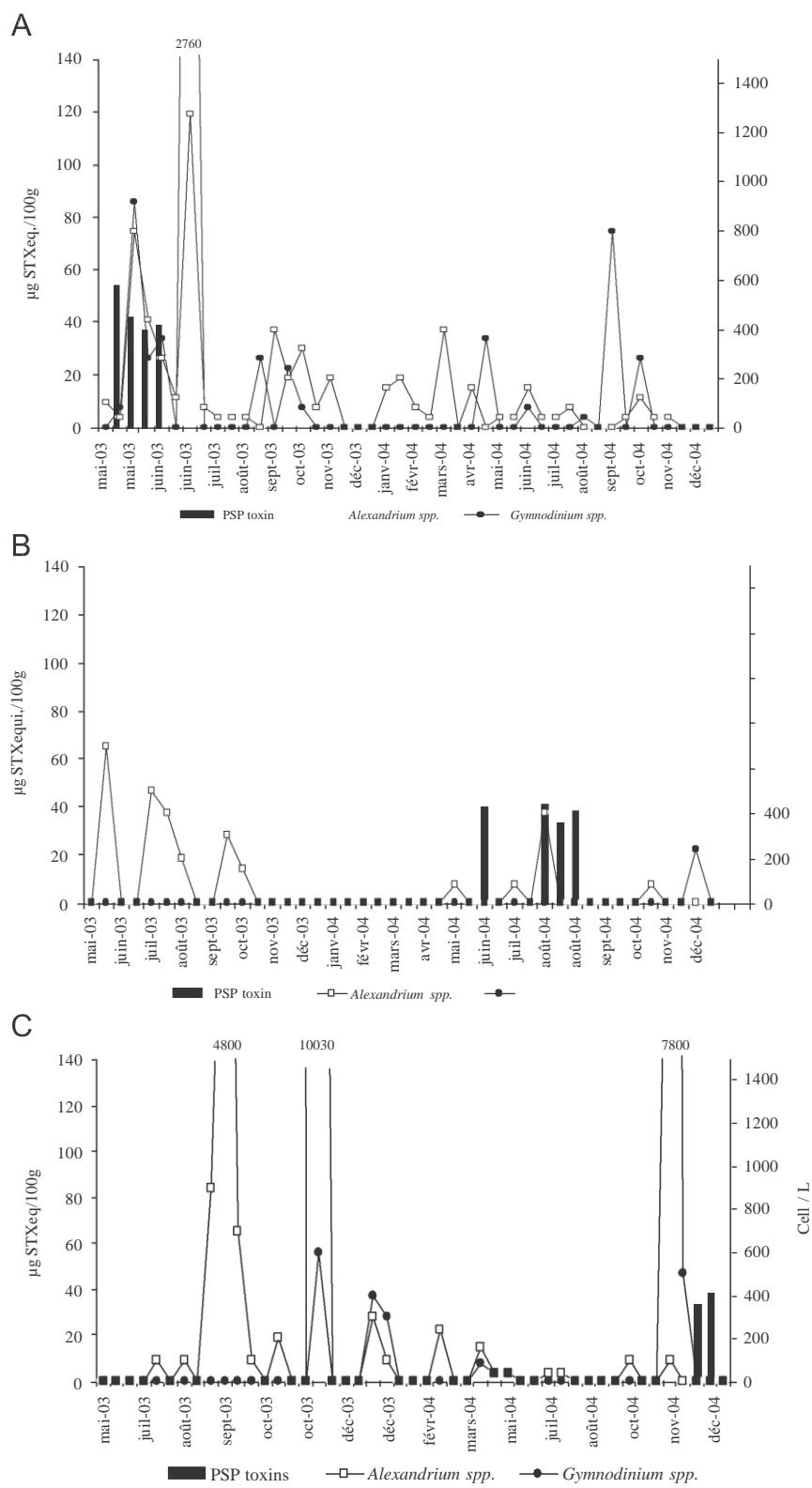


Fig. 2. Evolution of bivalve toxicity in association with *Alexandrium* spp. and *Gymnodinium* in Akhfenir (A), Tifnit (B) and Oumlabouir (C).

the same periods, May/June and September/November (Fig. 2A). The maximum of the concentrations of *Alexandrium* spp varied between 800 and 1280 cells L⁻¹. However, in the end of spring 2003, the concentrations of *Gymnodinium* spp. reached about 3000 cells L⁻¹.

Toxin analysis conducted in the mussels of Akhfenir showed the presence of PSP toxins in spring 2003, with maximum level reaching 54 mg STX eq./100 g meat of PSP toxins (Fig. 2A).

The samples of water of Tifnit were composed mainly by *Alexandrium* spp. In 2003, the concentrations varied from 100 to 700 cells L⁻¹ principally at summer period. The same phenomenon was observed in summer 2004, but with low concentrations. *Gymnodinium* spp. was also detected at this site in December 2004 but with very low concentration about 200 cells L⁻¹ (Fig. 2B).

The monitoring of toxicity in Tifnit's mussels showed an accumulation of PSP toxins in summer 2004. The values of toxicity ranged around 40 mg eq. STX/100 g relieved at June. During August the concentrations oscillated between 33.5 and 41 mg STX eq./100 g (Fig. 2B).

The analysis of seawater of Oumlabouir allowed identifying the presence of *Alexandrium* spp (Fig. 2C). The high concentrations of this species were recorded in September and October with 4800 and 10 300 cells L⁻¹, respectively. In 2003, significant concentrations of *Gymnodinium* spp. were detected from October to December and in November 2004. In autumn 2004, a low accumulations of PSP toxin were recorded in Oumlabouir's mussels

corresponding to 33.5 and 38.7 mgSTXeq./100 g meat (Fig. 2C).

The PSP toxin was not exceeding the sanitary threshold (80 mgSTXeq./100 g meat) adopted by the National Institute of Fisheries Research (INRH).

3.2. Organs toxicity

The results of Mouse bioassay in different organs showed an accumulation of PSP toxin by digestives glands of mussels of three regions studied, but these toxins were not detected in gills, gonads+mantel and in muscle (Fig. 3).

At Akhfenir, the maximum mussel toxicity (88 mgSTXeq. /100 g meat) was detected at the end of May and decreased to 50 mgSTXeq./100 g meat until August.

At Tifnit's mussels, one accumulation was recorded at June 2003 corresponding to 63 mg STXeq./100 g meat. But in summer 2004, a notable accumulation was detected from June to August, with high levels reaching 88 mgSTXequi./100 g DG noted at the beginning of August and 42 mgSTXequi. /100 g meat DG at the end of August.

However, a level of 80 mgSTXequi./100 g was detected in the digestives glands of oumlabouir's mussels in the middle of November and the minimum of 36 mgSTXequi./100 g was determined in the end of autumn.

Furthermore, the HPLC analysis carried out in different mussel organs from the three sites studied showed a concentration of PSP toxins mainly in digestive glands (Fig. 4). The level of toxicity in

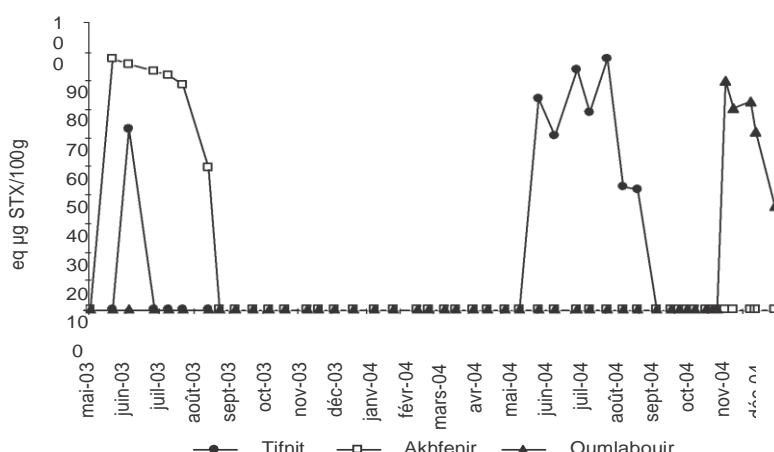


Fig. 3. Digestives glands toxicity of mussels from Akhfenir, Tifnit and Oumlabouir.

digestives glands was 10–13 times higher than in others tissues. The PSP toxicity was decreasing according to the order: digestives glands > gonads + mantel > gills > muscle.

3.3. Toxin profiles

The toxin profile of the mussels of the three sites showed a presence of carbamate toxins: mainly the gonyautoxins (GTx1, 2, 3, 4) and STX (Tables 1–3). GTx2 and GTx3 were the most dominants compounds in this profile.

At Akhfennir's mussels, harvested in May 2003, the major compound was GTx2 with 28 mol% in digestives glands and 100 mol% in the gills and muscle followed by GTx3 registered in digestives

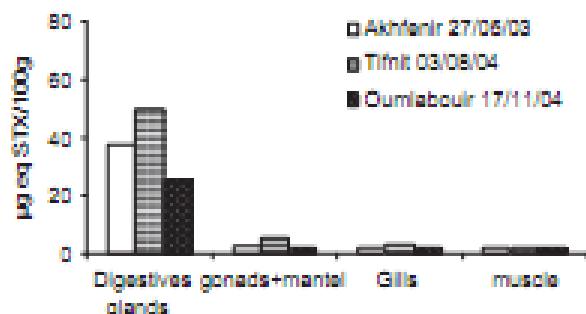


Fig. 4. Toxicity of different organs from the three sites.

Table 1
Toxin concentrations (mol%) of different organs of Akhfennir's mussels

Akhfennir	Gonad+mantel	Gills	Muscle	Digestive gland
STX	ND	ND	ND	4.0
GTx1	ND	ND	ND	46.0
GTx2	72.0	100	100	28.0
GTx3	28.0	ND	ND	11.0
GTx4	ND	ND	ND	11

Table 2
Toxin concentrations (mol%) of different organs of Tifnit's mussels

Tifnit	Gonad+mantel	Gills	Muscle	Digestive gland
STX	36.0	ND	ND	7.5
GTx1	ND	ND	ND	25.5
GTx2	44.0	100	75.0	44.0
GTx3	20	ND	25.0	19.0
GTx4	ND	ND	ND	4.0

Table 3
Toxin concentrations (mol %) of different organs of Oumlabour's mussels

Oumlabour	Gonad+mantel	Gills	Muscle	Digestive gland
STX	ND	ND	ND	29.0
GTx1	ND	ND	ND	ND
GTx2	ND	ND	ND	54.0
GTx3	ND	ND	ND	17.0
GTx4	ND	ND	ND	ND

glands (11 mol%) and in gonads + mantel (28 mol%). GTx4, GTx1 and STX were only detected in digestives glands with, respectively, 11, 46 and 4 mol%. (Table 1).

At Tifnit, the toxin profile of sample harvested in June 2004 showed a predominance of GTx2 and GTx3, with occurrence of STX in gonads + mantel (36 mol%) and in digestives gland (7.5). Low amounts of GTx4 were registered in the last organ (4 mol%) (Table 2).

In December 2004, toxin profile in *P. perna* organs of Oumlabour showed that GTx2 was the predominant toxins corresponding to 54 mol% of total toxins, followed by STX with 29 mol% and GTx3 with 17 mol%. These values just occurred in the digestives glands. No toxins were detected in the others organs (Table 3).

4. Discussion

This study reports that the PSP toxin in *Perna perna* from south Atlantic of Morocco was not exceeding the sanitary threshold. The maximum of toxicity and the majority of PSP components were detected principally in digestive glands, this organ was the most contaminated organ and the other tissues contributed weakly to the total toxicity; the same result was reported by Bricelj and Shumway (1998).

However, a gradient of toxins accumulation by different organs was established: digestive glands > gonads + mantel > gills > muscle. Ours results corroborate with those reported by others authors (Maruyama et al., 1983; Bricelj et al., 1990).

The digestive glands toxin profile is different from that of the other organs and very close to that of the ingested dinoflagellate, indicating the presence of the micro algae almost intact in the visceral mass (Cembella et al., 1994).

The identification of *Alexandrium minutum* in seawater of three regions was coincided with the detection of PSP toxins in mussels.

Due to the lack of *A. minutum* toxin's profile from Moroccan coast, the digestes gland's toxin profile was compared with the toxin components of *A. minutum* obtained from different countries.

The obtained toxin profile in the three regions showed good similarity with that occurring in some strains of *A. minutum* reported from Taiwan (Chen and Chou, 1998; Hwang et al., 1999), Ireland (Touzeta et al., 2007), Adriatic Sea and France (Ledoux et al., 1991); GTX3 and GTX2 were the major toxins. The Australian (Oshima et al., 1990), Spanish, Portugal and Atlantic strains (Franco et al., 1995) show different profiles with predominance of GTX1 and GTX4.

Thus, the obtained results of the present study revealed that *A. minutum* is probably the principal producer of PSP toxicity in south Atlantic coasts of Morocco. This specie has been already identified by scanning electronic microscopy by Bennouna et al., 2000 in Atlantic Moroccan coasts during the PSP outbreaks of 1998, 1999.

However, the cases of significant concentration of *Alexandrium* spp. in waters, with the absence of PSP contamination in mussels, may possibly be explained by the variability of *Alexandrium* toxicity, which depends on environmental conditions, among species and strains (Anderson, 1990).

The specie *G. catenatum* is frequently responsible for PSP shellfish toxicity at the north Atlantic and Mediterranean Moroccan coasts (Tahri, 1998). *G. catenatum* toxin profile is characterized by the presence of C1-4, GTX5/6, neoStx and especially the dcSTX (Donker et al., 1997, Anderson et al., 1989; Franca et al., 1996; Rodriguez-Vasquez et al., 1989; Oshima et al., 1990, 1993; Vale and Sampayo, 2001; Taleb et al., 2001, 2003). But, the toxin profile obtained in this study is marked by the presence of STX and the absence of dcSTX, suggesting that *Gymnodinium* spp. occurring in waters do not influence the mussels' toxicity.

Acknowledgments

We acknowledge Mr. Abdellatif Berraho, Director of the National Institute of Fisheries Research (INRH), for his support, Mr. Bernoussi, Mr. El Attar and the staff of LSSL Dakhla and Laayoune. The HPLC runs were performed in the laboratory of Professor Bernd Luckas at the Friedrich Schiller

University in Jena (Germany). Also a hearty appreciation to my family.

References

- Anderson, D.M., 1990. Toxin variability in *Alexandrium* species. In: Graneli, E., et al. (Eds.), Toxic Marine Phytoplankton. Elsevier, New York, pp. 41–51.
- Anderson, D.M., Sullivan, J.J., Reguera, B., 1989. Paralytic shellfish poisoning in northwest Spain: the toxicity of the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *Toxicon* 27 (6), 665–674.
- AOAC, 1990. Paralytic Shellfish Poison, Biological Method, Final Action. In: AOAC (Ed.), Official Methods of Analysis. 15th Ed., Arlington, VA, Method no 959.08.
- Bennouna, A., Berland, B., El Attar, J., Assobhei, O., 2000. Etude des populations phytoplanctoniques de la lagune de Oualidia (Maroc), dinoflagelles potentiellement nuisibles. *Marine Life* 10 (1–2), 3–18.
- Bourhili, E.H., 1982. Intoxication alimentaire par la moule (51 cas), Agadir, Octobre et Novembre 1982. These no 33 Fac. Med. et pharm., Rabat. 84p.
- Bricelj, V.M., Shumway, E., 1998. Paralytic shellfish toxins in bivalve molluscs: occurrence, transfer kinetics, and biotransformation. *Rev. Fish. Sci.* 6, 315–383.
- Bricelj, V.M., Lee, H., Cembella, A.D., Anderson, D.M., 1990. Uptake kinetics of paralytic shellfish toxins from the dinoflagellate *Alexandrium fundyense* in the mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Ecol. Prog. S.* 63, 177–188.
- Cembella, A.D., Shumway, S.E., Lewis, N.I., 1994. Sequestering and putative biotransformation of paralytic shellfish toxins by the sea scallop *Placopecten magellanicus*: seasonal and spatial scales in natural populations. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 180, 1–22.
- Chen, C.Y., Chou, H.N., 1998. Transmission of the paralytic shellfish poisoning toxins, from dinoflagellate to gastropod. *Toxicon* 36, 515–522.
- Donker, S., Reyero, M.I., Reguera, B., Franco, J.M., 1997. Perfil de toxinas PSP de seis cepas de *Gymnodinium catenatum* de Galicia. In: Yeyeites, J.M., Leira, F. (Eds.), VReunion Iberica sobre Fitoplancton Toxicó y Biotoxinas. Vigo, pp. 69–76.
- FAO, 2004. Marine Biotoxins. FAO Food and Nutrition Paper, Vol. 80. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 278pp.
- Food and Drug Administration (F.D.A.) 1997. HACCP Guidelines Annex 5. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, FDA. Available online at <http://www.fda.gov>.
- Franca, S., Alvito, P., Sousa, I., Cargo, A., Rodriguez-Vasquez, J.A., Leao, J.M., Comesana, M., Thibault, P., Burdaspal, P., Bustos, J., Legarda, T., 1996. The toxin profile of some PSP toxin producing dinoflagellate occurring in Portuguese coastal waters as determined by alternative analytical methods. In: Yasumoto, T., Oshima, Y., Fujuyoshi, Y. (Eds.), Harmful and Toxic Algal Blooms. IOC of UNESCO, Paris, pp. 519–522.
- Franco, J.M., Fraga, S., Zapata, M., Bravo, I., Fernandez, P., Ramilo, I., 1995. Comparison between different strains of genus *Alexandrium* of the minutum group. In: Lassus, P., Arzul, G., Erard-Le Denn, E. (Eds.), Harmful Marine Algal Blooms/Proliferation d'Algues Marines Nuisibles,

- Proceedings of the Sixth International Conference on Toxic Marine Phytoplankton, Nantes (France), October 1993, Lavoisier, Paris (France), pp. 53–58.
- Hallegraeff, G.M., 1995. Harmful algal blooms: a global overview. In: Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., Cembella, A.D. (Eds.), Manual on Harmful Marine Microalgae. IOC Manuels and Guides No. 33. UNESCO, pp. 1–22.
- Harada, T., Oshima, Y., Kamiya, K., Yasumoto, T., 1982. Confirmation of paralytic shellfish toxins in the dinoflagellate *Pyrodinium bahamense* var. *compressa* and bivalves in Palau. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 48, 821–825.
- Hummer, C., Ritscher, M., Reinhardt, K., Lukas, B., 1997. Analysis of the characteristic PSP profiles of *Pyrodinium bahamense* and several strains of *Alexandrium* by HPLC based on ion-pair separation, post-column oxidation, and detection. Chromatographia 45, 312–316.
- Hwang, D.F., Tsai, Y.H., Liao, H.J., Matsuoka, K., Noguchi, T., Jeng, S.S., 1999. Toxins of the dinoflagellate *Alexandrium minutum* Halim from the coastal waters and aquaculture ponds in southern Taiwan. Fish. Sci. 65, 171–172.
- Ledoux, M., Bardouil, M., Nezan, E., Erard, E., 1991. Field and experimental studies of shellfish contamination by an *Alexandrium minutum* strain. In: Fremy, J. M., (Ed.), Actes du colloque sur biotoxines marines, Paris 30–31 Janvier 1991. Centre National d'Etudes Veterinaires et alimentaires, B. P. 19, 94701, Maisons-Alfort, France, pp. 43–51.
- Maruyama, J., Noguchi, T., Onoue, Y., Ueda, Y., Hashimoto, K., Kamimura, S., 1983. Anatomical distribution and profiles of the toxins in highly PSP-infested Scallops from Ofunato Bay during 1980–1981. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 43, 233–235.
- Oshima, Y., Hasegawa, M., Yasumoto, T., Hallegraeff, G., Blackburn, S., 1987. Dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* as the source of paralytic shellfish toxins in Tasmanian shellfish. Toxicon 25, 1105–1111.
- Oshima, Y., Sugino, K., Itakura, H., Hirota, M., Yasumoto, T., 1990. Comparative studies on paralytic shellfish toxin profile of dinoflagellates and bivalves. In: Graneli, E., Sundstrom, B., Elder, L., Anderson, D.M. (Eds.), Toxic Marine Phytoplankton. Elsevier Science Publishers, New York, pp. 391–396.
- Oshima, Y., Itakura, H., Kian-Chuan, L., Yasumoto, T., Blackburn, S., Hallegraeff, G.M., 1993. Toxin production by the dinoflagellate *Gymnodinium Catenatum*. In: Smayda, T.J. and Shimizu, Y. (Eds.), Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea, pp. 907–912.
- Rodriguez-Vasquez, J.A., Oshima, Y., Sugino, K., Lee, J.S., Yasumoto, T., 1989. Analysis of toxins in mussels from the Atlantic Coast of Spain. In: Natori, S., Hashimoto, K., Ueno, Y. (Eds.), Mycotoxins and Phycotoxins, vol. 88. Amsterdam, Elsevier, pp. 367–374.
- Schantz, E.J., Lynch, J.M., Vayada, G., Masumoto, K., Rapoport, H., 1966. The purification and characterization of the poison produced by *Gonyaulax catenella* in axenic culture. Biochemistry 5, 1191–1195.
- Tahri, L.J., 1998. *Gymnodinium catenatum* Graham blooms on Moroccan waters. In: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L., Wyatt, T. (Eds.), Harmful Algae, Xunta de Galicia and IOC of UNESCO. Spain, pp. 66–67.
- Taleb, H., Vale, P., Jaime, E., Blaghen, M., 2001. Study of paralytic shellfish poisoning toxin profile in shellfish from the Mediterranean shore of Morocco. Toxicon 39 (12), 1855–1861.
- Taleb, H., Vale, P., et Blaghen, M., 2003. Spatial and temporal evolution of PSP toxins along the Atlantic shore of Morocco. Toxicon 41 (2), 199–205.
- Thieler, G., Kaiser, I., Luckas, B., 1991. HPLC determination of PSP toxins. In: Fremy J.M. (Eds.), Proceedings of Symposium on Marine Biotoxins. Editions CNEVA, Maisons-Alfort, pp. 21–125.
- Touzeta, N., Francob, J.M., Rainea, R., 2007. Influence of inorganic nutrition on growth and PSP toxin production of *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) from Cork Harbour, Ireland. Toxicon 50, 106–119.
- Utermohl, H., 1958. Zur Vervollkommung der quantitativen phytoplankton. Methodik. Mitt. Int. Verein. Theor. Angew. Limnol. 9, 1–38.
- Vale, P., Sampayo, M.A.M., 2001. Determination of paralytic shellfish toxins in Portuguese shellfish by automated pre-column oxidation. Toxicon 39 (4), 561–571.
- Yu, R.C., Hummer, C., Luckas, B., Qian, P.Y., Yhou, M.J., 1998. Modified HPLC method for analysis of PSP toxins in algae and shellfish from China. Chromatographia 48, 671–675.

Annexe 2



Diarrhetic shellfish poisoning toxin profile of shellfish from Southern Atlantic coasts of Morocco

Rachid Abouabdellah^{a*}, Asmae Bennouna^a, Jaouad El Attar^a, Katrin Erler^b, Mina Dellal^c, Abdelghani Chafik^d, Abdelatif Moukrim^e

^aInstitut National de Recherche Halieutique, B.P 5221 Q.I, Agadir, Morocco

^bFriedrich-schiller University of Jena, Dornberger Strasse 25, 07743 Jena Germany

^cInstitut National de Recherche Halieutique, Dakhla, Morocco

^dInstitut National de Recherche Halieutique, Casablanca, Morocco

^eUniversité Ibnou Zohr, Faculté des sciences Ibnou Zohr, Agadir, Morocco

ARTICLE INFO

Article History:

Received: 11-03-2011

Revised: 07-04-2011

Accepted: 08-04-2011

*Corresponding Author:

Rachid Abouabdellah

E-mail: dichar75@yahoo.fr

Fax: + 212 28 82 74 15

Tel: +212 28 82 50 60

ABSTRACT

During the monitoring program of phycotoxins conducted in 2005 and 2006, lipophilic shellfish toxins (LSTs) are involved in shellfish toxicity phenomena in the South Atlantic Moroccan coasts (Dakhla region). Toxicity was assessed by the traditional mouse bioassay (MBA); the content and the nature of the toxic components were established through Liquid chromatography (LC) coupled with mass spectrometry (MS). The 'traditional' DSP toxins group, okadaic acid (OA) and dinophysitoxins (DTXs) and their associated esters were exclusives contaminants of Dakhla's shellfish (mussels, cockles, oysters and solen). Pectenotoxins, yessotoxins, and azaspiracids were not detected during this study. A survey of the phytoplankton community in the surrounding seawater revealed the presence of several potentially toxic species from the Dinophysis genus.

1. Introduction

The diarrhetic shellfish poisoning (DSP) represents a serious threat to public health and aquaculture industries. Some toxins can cause human gastrointestinal illness (OA, DTXs) while others (YTXs and PTXs), reportedly, give rise to positive results in the traditional mouse bioassay (MBA) used for their detection (Miles et al., 2005, 2006). The consumption of contaminated shellfish can cause gastroenteritis in humans. The gastrointestinal symptoms normally begin in few hours after consumption of toxic shellfish (Daranas et al., 2001; klopper et al., 2003). Symptoms include abdominal pain and cramps, diarrhoea, nausea and vomiting (Marcaillou-Le Baut et al., 2001). OA and DTX-2

have been considered as causatives agents of diarrhetic shellfish poisoning outbreaks in North Atlantic Moroccan coasts (Taleb et al., 2006); the phytoplanktonic genus implicated was *Dinophysis* (Bennouna et al., 2002). However, the wide geographical spread of algal toxins throughout South Moroccan coastal waters and the frequency of their appearance since 2002 in shellfisheries has emphasised the necessity to determine toxin profiles in shellfish and exploring the variability of toxin composition. In this work, two methods, diarrhetic shellfish poisoning mouse bioassay and LC-MS methodology for the detection of multiple lipophilic shellfish toxins (OA: okadaic acidA, DTXs: dinophysitoxins, YTXs: yessotoxins, PTXs: pectenotoxins and AZAs: azaspiracids) was employed to sur-

vey shellfish to assess toxin concentrations and the co-occurrence of algal toxins in four species of shellfish harvested from Dakhla in south of Morocco. The data of these two methods were compared. The identification and the enumeration of *Dinophysis* spp in the surrounding seawater were studied by microscopy.

2. Materials and Methods

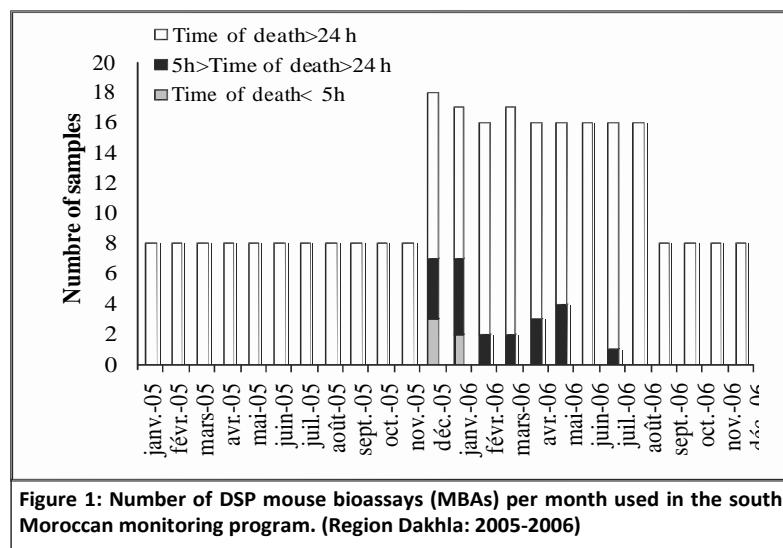
2.1 Sampling

Four different types of bivalve shellfish were collected in Dakha region in South of Morocco from January 2005 to December 2006. The shellfish collected were sole (*Solen marginatus*) from Pk25 (23°41'526 N - 15°48'912 W) and from Boutalha (23°51'431N-15°50'671W), oysters (*Crassostrea gigas*) from Boutalha (23°51'123N-15°50'013W), cockles (*Cerastoderma edule*) from Boutalha (23° 51'314N-15°50'290W) and mussels (*Perna perna*) harvested from N'tirift (24°04'512N-15°34'410W).

Two hundred sixty eight samples of surface water were sampled at high tide. The composition of the phytoplankton community in the water surrounding the sampling areas was determined by inverted microscopy according to the Utermöhl method (1958).

2.2 Reagents

All Solvents used for LC-MS analysis and for mouse bioassay were LC grade purchased from Merck, Darmstadt, Germany), Tween-60 from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA. Standard solutions of OA, YTXs, PTXs and AZAs were obtained from the CNRC (Halifax, Canada). DTXs were purchased from BlueBiotech (Germany).



2.3 Mouse bioassay

The mouse bioassay for the diarrhetic shellfish poisoning toxins was performed according to the method of Yasumoto et al. (1984). The toxicity of each extract is given as mean survival time based on time from Intraperitoneal administration of extract, to death of two or three mice within 24 h.

2.4 Liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS)

Liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS) analysis for lipophilic toxins was performed at the food chemistry Institute in Jena, Germany. LC-MS analyses were released by using the method described by Holland et al. (2003).

Toxins extraction was conducted according to the method of Goto et al. (2001). 2 g subsamples were homogenized with 18.0 ml of methanol/ water (9 + 1, v/v). The crude extract was centrifuged (3400 g, 10 min) and 2 ml of the supernatant was washed with 5 ml hexane. After centrifugation, 1 ml of the lower layer was transferred to an autosampler vial for LC-MS/MS analysis. Determination of the proportion of esterified forms of okadaic acid (OA) and dinophysitoxins (DTXs) in sample extracts was performed before and after alkaline hydrolysis.

The LC was equipped with a PE Series 200 quaternary pump and a PE Series 200 autosampler (Perkin -Elmer, Germany). Chromatographic separation was performed using a Phenomenex Luna C18 column (5 m, 150 mm 2 mm, operated at 30 °C). injection volume was 10 µL. the mobile phase consisted of Acetonitrile/Water (10:90,v/v) containing 5 mM ammonium format and 53 mM of Formic Acid in channel A and Acetonitrile/Water (90:10,v/v) containing 5 mM ammonium format and 53 mM of Formic Acid in channel B. The mobile phase flow-rate set at 0.2 ml/min.

The mass spectral experiments were performed by using an API-165 triple quadrupole mass spectrometer with a pneumatic assisted atmospheric pressure ion (API) source operating in a turbo ion-spray mode (TIS) (Applied Biosystems, Thornhill, Ont., Canada). The mass spectrometer was operated simultaneously in both positive and negative modes (Table1)

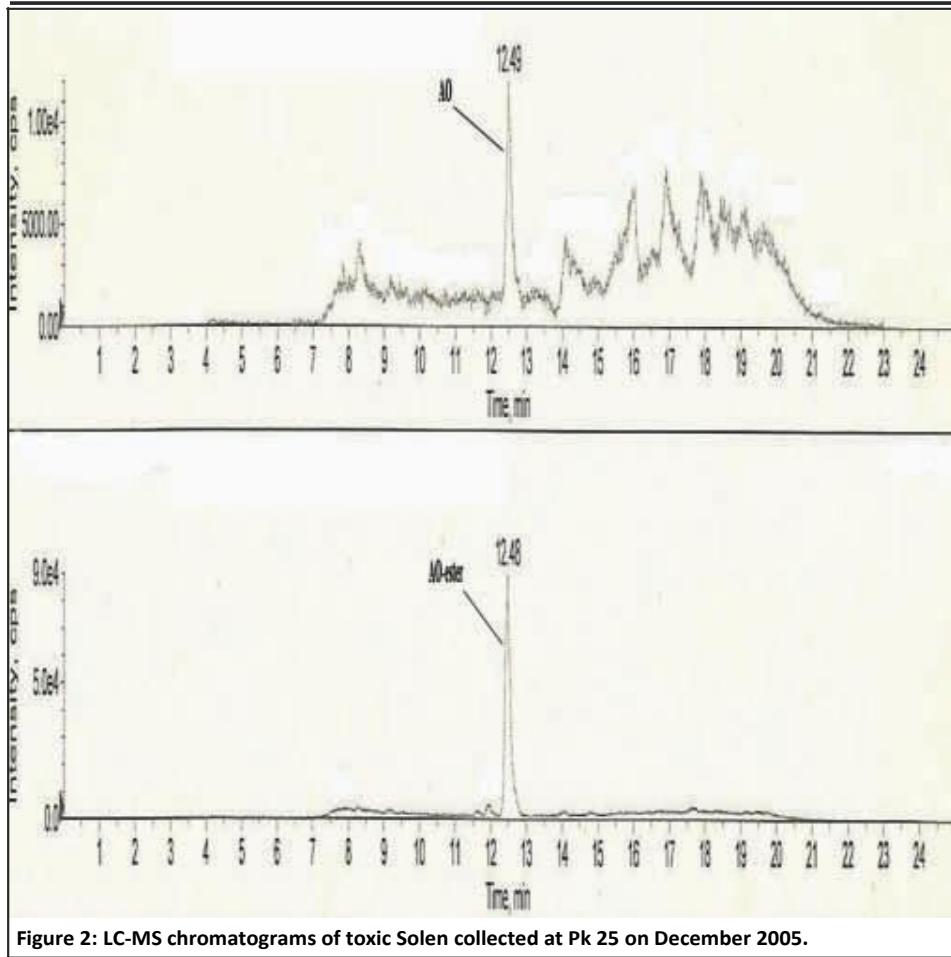


Figure 2: LC-MS chromatograms of toxic Solen collected at Pk 25 on December 2005.

using the following parameters: nebulizer gas: nitrogen; ionization spray voltage: 5.2 kV, the dry gas: 6.5 L/min; temperature: 450°C.

3. Results and Discussion

3.1 Monitoring data

Surveillance of shellfish samples from south Moroccan waters (Dakhla), during January 2005 to December 2006, revealed presence of diarrhetic shellfish poisoning in four species of shellfish. Toxicity was commonly found in samples from nearly all sampling sites.

There were 10 % of samples mouse bioassay positives, 19 % of them were very toxic with time of death lower than 5 hours (Fig. 1). 16% of the solen's samples, collected during the toxic episode, were mouse bioassay positive (MBA) followed by cockles (5%) and mussels (4%); the oyster's samples were MBA negative. The solen samples, also a benthic species, having toxicity higher than other samples specially mussels and oysters. It is possible that the lower toxicity found in the oysters could be attributable to changes in distribution of *Dino-*

physis spp through the water column. Suzuki and Mitsuya (2001) and Kim et al. (2010) explain differences between species in the ability to accumulate specific toxins. Another possible explanation for the variance in toxin concentrations may be attributed to the differences in the reproductive condition of shellfish (Svennsson and Förlin, 2004).

3.2 Toxin profile

Due to the lack of specificity of the diarrhetic shellfish poisoning mouse bioassay used in routine monitoring, little has been known about the prevalence of other lipophilic shellfish toxins in south Moroccan waters. In this study, shellfish were further examined using LC-MS methodology.

Diarrhetic shellfish poisoning analogues in the OA/DTX group (including esterified forms) were the most prevalent and occurred in 100% of samples tested. These toxins were detected in all shellfish species examined. The other lipophilic toxins (PTXs, AZAs and YTXs) were not detected. The prevalence of individual LSTs in the shellfish samples is summarized in table 2.

Until December 2005, the most frequently detected diarrhetic shellfish toxins were OA, DTX-1 and theirs associated esters, The rank order (highest to lowest) of individual toxin occurrence was OA > OA esters > DTX-1 ester > DTX-1.

At pk25, the toxin profile of solen harvested in December 2005 showed a dominance of OA with 7% and OA-esters with 93% mol (Fig.2). At the same period three kinds of diarrhetic toxins were detected in mussels of Ntirift, the major compound

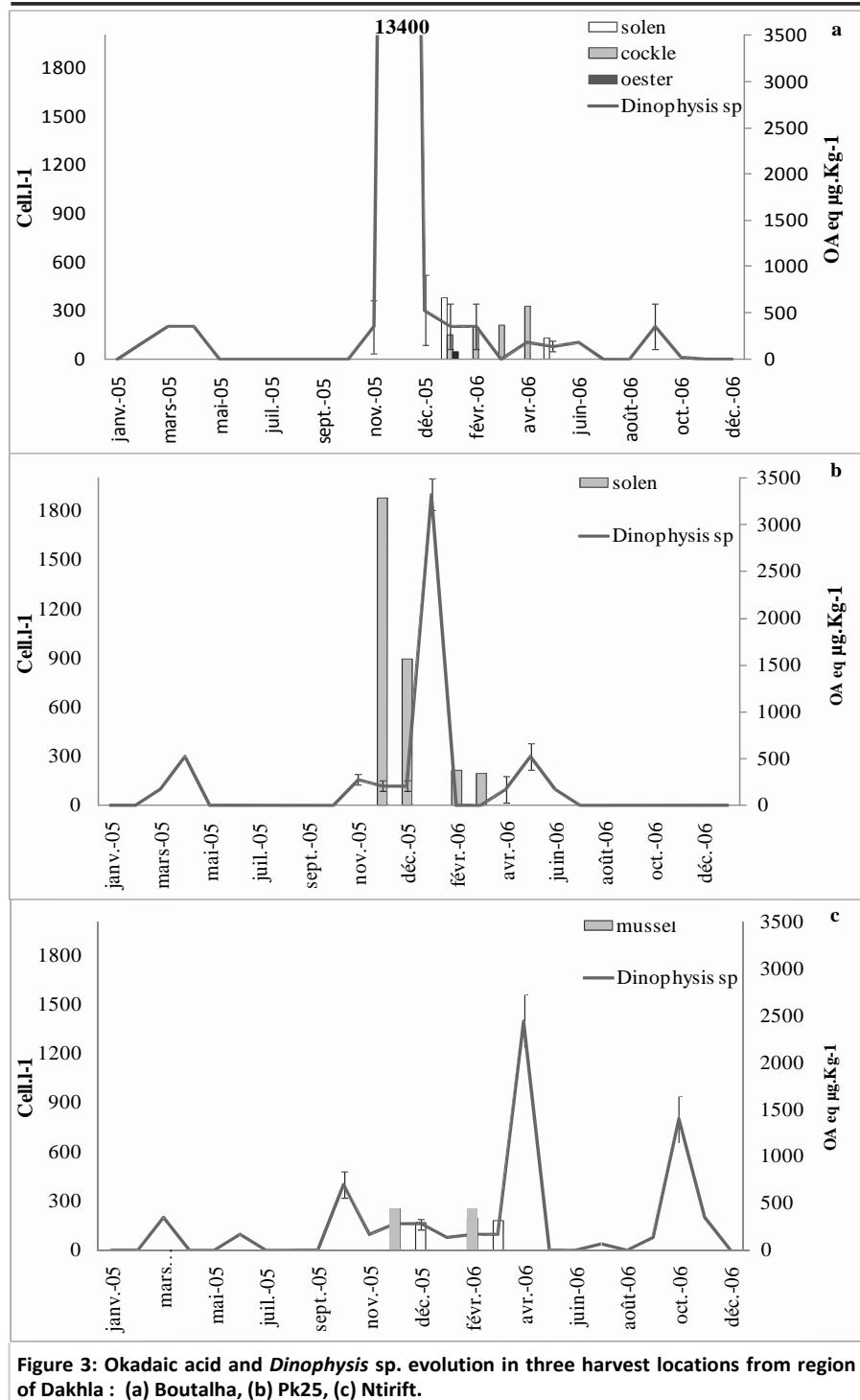


Figure 3: Okadaic acid and *Dinophysis* sp. evolution in three harvest locations from region of Dakhla : (a) Boutalha, (b) Pk25, (c) Ntirift.

was OA-ester (47% mol) followed by OA (44%) and by DTX-1 ester with 9%. The free form of DTX-1 was not detected. At Boutalha's shellfish (solen, cockles and oysters), the toxin profile was dominated by OA (64%) and OA-ester (31 %). The OA was detected in all samples except in oysters which contained only OA-esters. A low concentration of DTX-1 was detected in Boutalha's solen in May 2006.

3.3 Toxicity and phytoplankton

Concentrations of these algal toxins were higher than the sanitary threshold (160 µg OA eq. kg shellfish flesh-1) in all samples, except in Bou-talha's oysters. 80.31, 507.25 and 659.38µg OA eq. kg shellfish flesh-1 were maximums registered respectively in oysters, cockles and solen sampled during the toxic event of November 2005 to June 2006 (Fig.3 a).

vealed presence of the toxic algae *Dinophysis* appeared from February 2005 to October 2006; 13400 Cell L-1

At Pk25, a very high toxicity of 3281.25 µg OA eq. kg shellfish flesh-1 was registered in solen harvested in December 2005, the maximum of *Dinophysis* spp 1900 Cell.l-1 was noted in January 2006 (Fig.3 b). At Ntirift's mussels, the maximum of toxin concentration 437.79 µg OA eq. kg shellfish flesh-1 was noted in December 2005. In this area, *Dinophysis* spp was detected from October 2005 to April 2006 with a density varied from 100

to 1400 Cell.l-1 (Fig.3 c).

The toxin profile of Dakhla's shellfish let to suggest that various species of the *Dinophysis* genus were responsible for shellfish toxicity. Lee et al. (1989) reported that seven species of *Dinophysis* (*D. acuta*, *D. acuminata*, *D. fortii*, *D. rotundata*, *D. micta*, *D. norvegica* and *D. tripos*) collected from Japan and Europe were implicated in production of

	Mode	[M-H]-	M	[M+H]+	[M+NH4] +	[M+Na] +	[M- 2H2O+H]+
OA	Positive		804.5			827.5	769.5
DTX-1	Positive		818.5			841.5	783.5
PTX-1	Positive		874.5		892.5	897.5	
PTX-2	Positive		858.5		876.5	881.5	
PTX-2 sa	Positive		876.5		894.5	899.5	
AZA-1	Positive		841.5	842.5			
AZA-2	Positive		855.5	856.5			
AZA-3	Positive		827.5	828.5			
GYM	Positive		507.3	508.3			
YTX	Negative	1142.5	1141.5				
45-OH-YTX	Negative	1158.5	1157.5				
Homo-YTX	Negative	1156.5	1155.5				
45-OH-Homo-YTX	Negative	1172.5	1171.5				

Table 1: LC/MS parameters for determination of lipophilic toxins.

Site	Shellfish	Date	Free OA	OA esters	Free DTX-1	DTX-1 esters
Pk25	solen	11/12/2005	7,00	93,00	ND	ND
		19/12/2005	9,00	91,00	ND	ND
		14/02/2006	7,00	93,00	ND	ND
		21/02/2006	7,00	93,00	ND	ND
Ntirift	mussel	11/12/2005	44,00	47,00	ND	9,00
		05/12/2005	52,00	44,00	ND	4,00
		01/02/2006	53,00	47,00	ND	ND
		13/03/2006	54,00	36,00	ND	10,00
Boutalha	cockle	15/02/2006	13,00	87,00	ND	ND
	oyster		ND	100,00	ND	ND
	solen		6,00	94,00	ND	ND
	cockle	21/02/2006	16,00	84,00	ND	ND
		09/03/2006	5,00	88,00	ND	7,00
		18/04/2006	8,00	89,00	ND	3,00
	solen	09/05/2006	64,00	31,00	1,00	4,00

Table 2: DSP toxins profile (mol %) in shellfish harvested from Dakhla.
ND: not detected

either OA or DTX-1, or both. But in Northern coasts of Morocco The shellfish toxin profile was dominated by OA and DTX-2, this toxicity was mainly associated to *Dinophysis acuta* and *Dinophysis acuminata* (Bennouna et al., 2002).

Concentrations of this dinoflagellate were rarely exceeding the threshold adopted by the Moroccan Institute of Marine Research (INRH) 400 cell.l⁻¹. Viviani et al. (1995) reported that low concentrations of some species of Dinophysis may cause high shellfish toxicity. The variability in the cell toxin content is one of the factors explaining the difficulty of relating the concentration of toxic algae

with the shellfish toxicity. Multiple studies suggested that the content of the toxics Dinophysis species may vary substantially depending the time and the region (Pavela-Vrancic et al., 2002).

3.4 Comparison between LC-MS and MBA

Comparing results from the mouse bioassay and LC-MS for the detection of diarrhetic shellfish poisoning, 100% of mouse bioassay positive samples were determined, by LC-MS, to contain toxins with concentration superior at 160 µg OA eq.kg shellfish flesh-1. But, Almost half (47 %) of LC-MS results scored as positive (exceeding 160 µg OA eq. kg shellfish flesh -1) were negative by mouse bioassay.

say. However, the LC-MS method allowed to detect the 'false negative' results of the bioassay. Also, the chemical method used possesses a high degree of selectivity, sensitivity, reliability and rapidity compared to the biological method (Ciminiello et al., 2006). Additionally, the MBA is time consuming and may give 'false positive' results caused by the interferences of the other compounds (Combes, 2003).

4. Conclusion

Okadaic acid, DTX-1 and associated esters were majors diarrhetic shellfish toxins detected in south Atlantic Moroccan coasts. The restrictions of shellfish-harvesting activity, during toxics episodes, had limited the exposure of consumers to all phycotoxins which can be present in shellfish. Thus, no human intoxications were reported. The commercialization of the mollusks was authorized after total purge of the marine environment.

Acknowledgment

We acknowledge and greatly thank the Professor Bernd Luckas, Bernoussi and A. LAHNIN, Chair of the Regional Centre of INRH in Agadir for his support and we thank all the staff of the laboratory of marine biotoxins of the Regional Centre of INRH in Dakhla. The HPLC analyses were performed in Institute of food chemistry - University Friedrich Schiller in Jena (Germany).

References

- Bennouna A, Berland B, El Attar J, Assobhei O (2002) Lingulodinium polyedrum (Stein) Dodge red tide in shellfish areas along Doukkala coast (Moroccan Atlantic). *Oceanologica Acta* 25: 159–170.
- Ciminiello P, Dell'Aversano C, Fattorusso E, Forino M, Silvana M, Santelia F, Tsoukatos M, (2006) Investigation of the toxin profile of Greek mussels *Mytilus galloprovincialis* by liquid chromatography—mass spectrometry. *Toxicon* 47: 174–181.
- Combes RD (2003) The mouse bioassay for diarrhetic shellfish poisoning: a gross misuse of laboratory animals and of scientific methodology. *Alternatives to laboratory animals* 31: 595–610.
- Kim JH, Lee KJ, Suzuki T, Kang YS, Kim PH, Song KC and Lee TS (2010) Seasonal Variability of Lipophilic Shellfish Toxins in Bivalves and Waters, and Abundance of *Dinophysis* spp. in Jinhae Bay, Korea. *Journal of Shellfish Research* 29 (4) : 1061-1067.
- Daranas AH, Norte M, Fernández JJ (2001) Toxic marine microalgae. *Toxicon* 39: 1101–32.
- Goto H, Igarashi T, Yamamoto M, Yasuda M, Sekiuchi R, Watai M, Tanno K, Yasumoto T (2001) Quantitative determination of marine toxins associated with diarrhetic shellfish poisoning by liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 907: 181–189.
- Holland PT, McNabb P, Selwood AL, Mackenzie L, Beuzenberg V (2003) LC-MS methods for marine biotoxins and their introduction into the New Zealand shellfish regulatory programme. *Cawthron Report No. 906*, Cawthron Institute, Nelson, pp. 10–17.
- Klopper S, Scharek R, Gredts G (2003) Diarrhetic shellfish toxicity in relation to the abundance of *Dinophysis* spp. In: *The German Bight near Helgoland*. *Marine Ecology progress Series* 259: 93–102.
- Lee JS, Igarashi T, Fraga S, Dahl E, Hovgaard P, Yasumoto T (1989a) Determination of diarrhetic shellfish toxins in various dinoflagellates species. *J. Appl. Phycol* 1: 147– 152. In: Pavela-Vrancic M, Mestrovic V, Marasovic I, Gillmanc M, Fureyc A, James K J (2002) DSP toxin profile in the coastal waters of the central Adriatic Sea. *Toxicon* 40: 1601–1607.
- Marcaillou C, Gentien P, Lunven M, Legrand J, Mondegue F, Daniélou MM, Crassous MP, Younou A, (2001) *Dinophysis acuminata* distribution and specific toxin content in relation to mussel contamination, In: *Harmful Algal Blooms (2000)* Hallegraeff GM, Blackburn SI, Bolch CJ & Lewis R.J. (eds). *JOC of UNESCO Publish*, pp. 356–359.
- Miles CO, Samdal IA, Aasen JAG, Jensen DJ, Quilliam MA, Petersen D, Briggs LM, Wilkins AL, Rise F, Cooney JM, MacKenzie AL (2005) Evidence for numerous analogs of yessotoxin in *Protoceratium reticulatum*. *Harmful Algae* 4: 1075–1091.
- Miles CO, Wilkins AL, Munday JS, Munday R, Hawkes AD, Jensen DJ, Cooney JM, Beuzenberg V (2006) Production of 7-epi-peptenotoxin-2 seco acid and assessment of its acute toxicity to mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 1530–1534.
- Pavela-Vrancic M, Mestrovic V, Marasovic I, Gillmanc M, Fureyc A, James K J (2002) DSP toxin profile in the coastal waters of the central Adriatic Sea. *Toxicon* 40: 1601–1607.
- Suzuki T, Mitsuya T (2001) Comparison of dinophysistoxin-1 and esterified dinophysistoxin-1 (dinophysistoxin-3) contents in the scallop *Patinopecten yessoensis* and the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicon* 39: 905–908.
- Svennsson S, Förlin L (2004) Analysis of the importance of lipid breakdown for elimination of okadaic acid (diarrhetic shellfish toxin) in mussels *Mytilus edulis* results from a field study and a laboratory experiment. *Aquatic Toxicology* 66: 405–418.
- Taleb H, Vale P, Amanhir R, Benhadouch A, Sagou R, Chafik A (2006) First detection of azaspiracids in mussels in north west Africa. *Journal of Shellfish Research* 25: 1067–1070.
- Utermöhl H (1958) Zur Vervollkommung der Quantitativen Phytoplankton Methodik. "Mitteilungen-Communications" Internationale Vereinigung für Theoretische und angewandte Limnologie 9: 1–38.
- Viviani R, Boni L, Cattani O, Milandri A, Polletti R, Pompei M (1995) ASP, DSP, NSP and PSP monitoring in mucilaginous aggregates and in mussels in a coastal area of the Northern Adriatic Sea facing Emilia-Romagna in 1988, 1989 and 1991. *Science of the Total Environment* 165: 203–211.
- Yasumoto T, Murata M, Oshima Y, Matsumoto GK, Clardy J (1984) Diarrhetic Shellfish Poisoning. In: Ragelis, E.P. (ed.), *Seafood toxins*. ACS Symposium Series 262: 207–214.

Annexe 3



HARMFUL ALGAE NEWS

An IOC Newsletter on toxic algae and algal blooms

www.ioc-unesco.org/hab

No. 42

First records of *Ostreopsis heptagona*, *O. cf. siamensis* and *O. cf. ovata* – in the Azores archipelago, Portugal

During summer 2008, surveys were carried out around São Miguel island in the Azores archipelago (36–39°N, 25–31°W) (Fig. 1). The sampling area is located between the main paths of the Azores Current (AC) and North Atlantic Current. The average SST around the island, was above 21°C, denoting a greater influence of the AC. Seawater samples were collected with a Niskin bottle, and preserved with neutralized formalin, for phytoplankton observations and cell counting. Species of *Ostreopsis* were morphologically characterized with an Olympus BX50 equipped with

epifluorescence, following Penna *et al.* [1]. The three *Ostreopsis* species were found together in the water, exclusively on the north side of the island where the waters were warmer. The highest concentration of *Ostreopsis* spp. was 90 cells L⁻¹.

The measurements (Table 1) and plate patterns observed suggest the presence of three species of *Ostreopsis*: *O. heptagona* Norris, Bomber et Balech, 1985 (Fig. 2), *O. cf. siamensis* Schmidt, 1982 (Fig. 3) and *O. cf. ovata* Fukuyo, 1981 (Fig. 4).

Since sampling was not focussed on

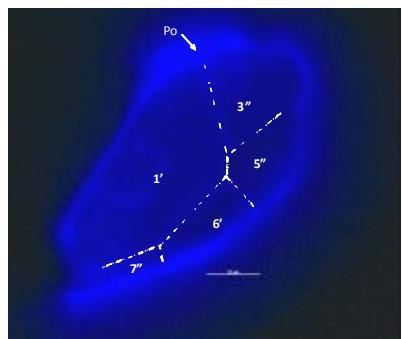


Fig. 2. *O. heptagona*, LM, epithecal view (scale bar = 20 µm). The distinct feature of plate 5'', pentagonal, in contact with 1'', can be observed.
(Cont'd on p. 2)

First records of *Ostreopsis cf. siamensis* in Moroccan Atlantic upwelling waters

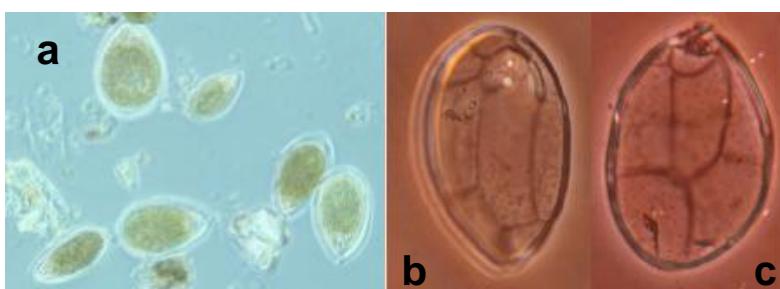


Fig. 1. *Ostreopsis cf. siamensis* from a sample off Cape Ghir. Light microscopy—phase contrast (a). Epitheca (b) and hypotheca (c) views. (right).

We report the first records of *Ostreopsis cf. siamensis* Schmidt detected in the NE Africa Atlantic upwelling system by the Moroccan HAB and phycotoxins national monitoring programme. The species was identified by phase contrast (Fig. 1) and epifluorescence microscopy during the Morocco-Portugal project of scientific cooperation on HABs and marine

biotoxins. Identification was confirmed by sequencing the 5.8S –ITS and LSU ribosomal genes [1].

Ostreopsis blooms were first observed in seawater samples from the Cape Ghir region (30°N, 9°W) on 5 October 2004, reaching 3.7×10^3 cell L⁻¹. Blooms recurred in the following years, and increased in concentration and duration, reaching 9.8×10^3 to

1.2×10^4 cell L⁻¹ in 2008, and a maximum of 10^5 cell L⁻¹ observed in August 2009. In 2007, *O. cf. siamensis* cells were observed from late summer to early autumn, in 2008 from early summer to late autumn, and in 2009 from spring to late autumn. The blooms occurred with surface temperatures ranging from 20 to 24°C, with maxima recorded in August and September. In parallel, the detection of toxins by mouse bioassay in mussels collected from the same area indicated the presence of neurotoxins.

Four monitoring stations were sampled in the Agadir area (Fig. 2). Highest *Ostreopsis* concentrations were always observed in samples from Cape Ghir and a station further north, at Tamri, both sites located on a rocky coastline highly exposed to northerly (upwelling favourable) winds and waves
(Cont'd on p. 3)

(Cont'd from p. 1)

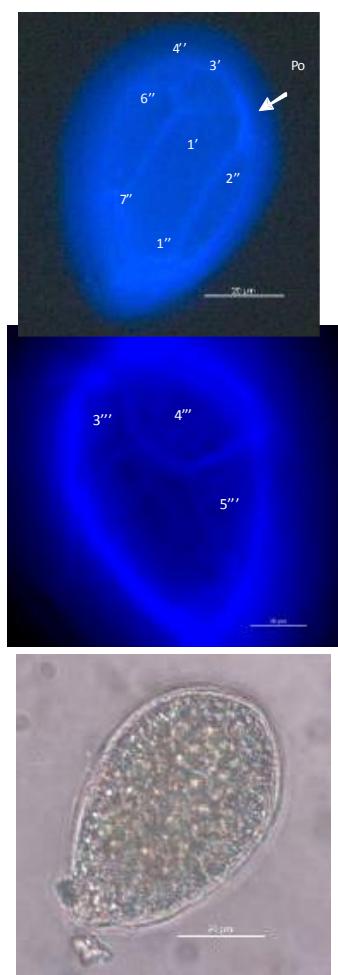


Fig. 3. *O. cf. siamensis*, LM, epithecal (top) and hipothecal views (center) (scale bar = 20 μ m).



Fig. 4. *O. cf. ovata*, LM, epithecal view (top) (scale bar = 10 μ m).

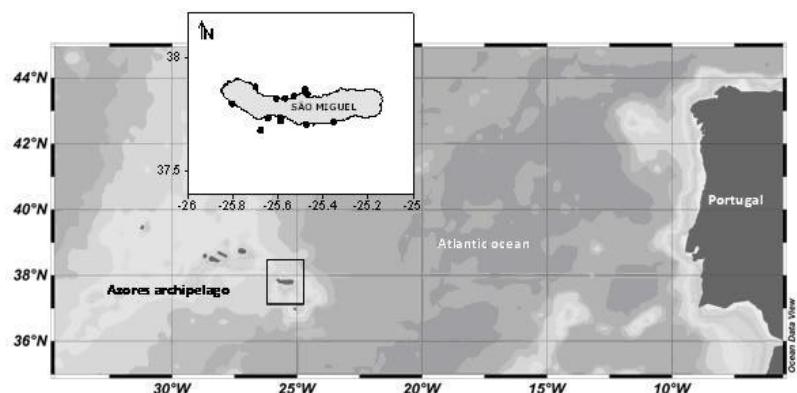


Fig. 1. The Azores archipelago: São Miguel (oriental group).

Table 1. Dorsoventral and transversal measurements.

	Dorsoventral diameter (μ m)	Transverse diameter (μ m)
<i>O. heptagona</i> (Fig. 2)	80–83	53–55
<i>O. cf. siamensis</i> (Fig. 3)	60–70	34–42
<i>O. cf. ovata</i> (Fig. 4)	49–51	22–30

the study of this genus, the fixative used did not allow complementary phylogenetic analysis. Future research will comprise genotyping *Ostreopsis* strains by PCR based assay.

This preliminary work in Azores waters is expected to contribute to the biogeographical distribution of HAB species, and to clarify their role as environmental tracers in Atlantic waters and as climate indicators.

Acknowledgements

V. Veloso for technical assistance with the epifluorescence and photography. R. Ferreira Patarra, N. Álvaro and A. Prestes for the field sampling, SRAM/DROTRH, Governo Regional dos Açores for financial support.

Reference:

- Penna A et al 2005. *J Phycol* 41: 212–225
- A. Silva¹, V. Brotas¹, E. Orive² & A. Neto³

¹Centro de Oceanografia, Fac. Ciências, Univ. Lisboa, Campo Grande, 1749-016 Lisbon, Portugal.

²Dep. Plant Biology and Ecology, Univ. Basque Country, Apdo. 644, 48080 Bilbao, Spain.

³CIMAR & Dep. Biologia, Univ. Açores, 9501-801 Ponta Delgada, São Miguel, Açores, Portugal.



(Cont'd from p. 1)

(Fig. 2). In contrast, other dinoflagellate species were favoured at stations south of Agadir, in the shadow of the Cape, on a sandy coast with calmer waters. This suggests that turbulent conditions north of the cape favoured resuspension of this epiphytic species in the water column although not dispersing the cells. Villa *et al.* [2] also pointed out that *Ostreopsis* sp. prefers more turbulent conditions than other benthic dinoflagellates such as *Coolia monotis*. In contrast, the abundance of *Ostreopsis ovata* in the Adriatic Sea was significantly higher in sheltered sites compared with exposed ones, indicating a major role of hydrodynamism in regulating bloom dynamics [3].

According to a recent study of the phylogeography of *Ostreopsis* species based on several strains isolated from the Mediterranean and Northeast Atlantic [1], *O. cf. siamensis* was, until now, only observed in the Mediterranean, while *O. cf. ovata* was found both in the Mediterranean and NE Atlantic, e.g. in Madeira and the Canary Islands. However, neither species was observed on the upwelling coasts of Iberia, such as the Galician *rías* (Santiago Fraga, pers. com.), or NW Africa where the species was not investigated before. Simultaneously, during the Morocco blooms, a strain of *O. cf. siamensis* was isolated from macroalgae off the SW coast of Portugal [4]. It is possible that this species is actually spreading in this region of the Atlantic due to an exchange between the Atlantic and the Mediterranean basins or even to a warming of these coastal upwelling waters [5]. However, it is not yet clear whether this apparent biogeographical expansion is real since HAB monitoring only became routine on the Agadir coast after 2002, and there is still no monitoring programme for microphytobenthic communities along the Moroccan coast. After these *Ostreopsis* blooms and due to their annual re-occurrence, the HAB monitoring programme has included this genus among the potentially harmful species of the Atlantic and Mediterranean coasts of Morocco.

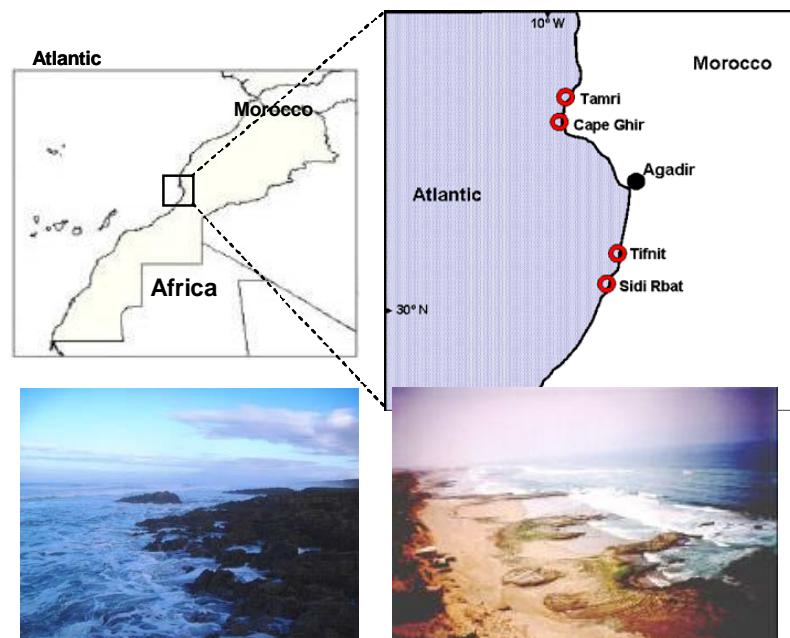


Fig. 2. Location of Moroccan monitoring stations in Agadir region and photo of Cape Ghir (lower left) and Sidi Rbat (lower right) monitoring sites.

References:

1. Penna A *et al* 2010. *J Biogeogr* 37: 830–841
2. Vila M *et al* 2001. *Aquat Microb Ecol* 26: 51–60
3. Totti C *et al* 2010. *Harmful Algae* 9: 233–239
4. Amorim A *et al* 2010. *Harmful Algae News* (this issue)
5. Relvas P *et al* 2009. *Geophys Res Lett* 36: L22601, doi:10.1029/2009GL040504

A. Bennouna¹, J. El Attar¹,
R. Abouabdellah¹, S. Palma²,
A. Penna³ & M.T. Moita²

¹National Institut of Marine Research (INRH), Regional Center of Agadir, Aghsdis, Nouveau Port, Agadir, Morocco.
Email: bennouna5@hotmail.com

²INRB-IPIMAR, Av. Brasília,
1449-006 Lisbon, Portugal.
Email: tmoita@ipimar.pt

³Sez. Environmental Biology, Dep.
Biomolecular Sciences, Univ.
Urbino, Vle. Trieste 296, 61121
Pesaro, Italy.
Email: antonella.penna@uniurb.it

PHYCOTOXINS

You can also get news on HAB research and events at the Phycotoxins-list at the internet.

The address of this list is:
phycotoxins@www.agr.ca

To join the list, send
“subscribe phycotoxins” to:
listserv@www.agr.ca

Archives are located at
www.agr.ca/archives/
phycotoxins.html

Harmful Algae News
only exists if the Editor gets
input from YOU!

Write the Editor NOW with news
on your work, HAB events in
your country or region, or any
other matter you wish to share
with HAB scientists and managers
worldwide. Harmful Algae News
has more than 2000
subscribers.

ANNEXE 4 : Communications

- **Abouabdellah R.**, Bennouna A., El attar J., Erler K., Chafik A., Moukrim A. **2011**. The detection of PSP and DSP toxins in bivalves from the southern Moroccan coasts by HPLC and mouse bioassay. Marine and Freshwater Toxins Analysis. Second Joint Symposium and AOAC Task Force Meeting Baiona, Spain May 1-5, 2011.
- **Rachid Abouabdellaha**, Asmae Bennounaa, Jaouad El Attara, Katrin Erler, Mina Dellal. 201. PSP and DSP in four specis of shellfish from south Atlantic moroccan coasts (2003-211). Third IOC/ HANA Workshop on Harmful Algal Blooms in North Africa. Casablanca-Morocco 5-7 December **2011**
- **Abouabdellah R.**, Bou m'handi N. Benouna A., Hassani, A., Taleb H., Moukrim., A. **2004**. marin phycotoxins in shellfish from Agadir Bay, Laâyoune Lagune et Dakhla bay by Mouse bioessay. Journées Biologie et santé. Kenitra **Novembre 2004**.
- **Abouabdellah, R.**, Hassani, A., Moukrim., A. **2004**. PSP and DSP toxins in *Mytilus* sp and *Crassostrea gigas* from south of Morocco. Proceedings of 1er International Congress of Biochemistry. Marrakech.3-6 Mai 2004.
- DELLAL M., **ABOUABDELLAH R.**, and CHAFIQ L. **2009**. Proliferation of *Dinophysis* and contamination of the shells by DSP in the area of Dakhla in the South of Morocco. IOC / HANA SECOND WORKSHOP ON HARMFUL ALGAL BLOOMS IN NORTH AFRICA. Alexandria 07 – 09 November 2009.
- DELLAL M., **Abouabdellah R.**, Chafiq L., Hassani L. M. and Rijal leblad L. **2007** *Alexandrium minutum* and PSP contamination in shellfish from DAKHLLA Bay, (south of Morocco). IOC / HANA FIRST WORKSHOP ON HARMFUL ALGAL BLOOMS IN NORTH AFRICA. CASABLANCA 18– 20 Octobre 2007.
- Bennouna A., El Attar j., **Abouabdellah R.**, Chafik A., Penna A., Oliveira P. B., Palma S.,

Moita M.T. **2011.** Occurrence of *Osteppsis* cf. *siamensis* blooms in Moroccan Atlantic waters from 2004 to 2010.international conference on osteropsis development. Villefranche-sud-Mer/ 4-8 April 2011.

- Bennouna A., El Attar J., **Abouabdellah R.**, Chafik A., Penna A., Oliveira P. B., Palma S., Moita M.T. **2010** ostreopsis cf. *siamensis* blooms in Moroccan Atlantic upwelling waters (2004-2009). 14th international conference on harmful algae. Hersonissos-crete, Greece, 1-5 November 2010.
- El attar J., Benouna A., **Abouabdellah R.**, Setti B., Hanoune A., **2005.** Study of salubrity of seawater and shellfish from Agadir. Moroccan Days of Marine Science. Agadir – Novembre2005.
- Asmae Bennouna; Jaouad EL Attar; **R. Abouabdellah;** Antonella Penna, Paulo B. Oliveira, and M Teresa. Moita HAB blooms in Moroccan Atlantic Agadir caosts during the monitoring program (2003-2011). Third IOC/ HANA Workshop on Harmful Algal Blooms in North Africa. Casablanca- Morocco 5-7 December **2011.**