

Inter comparaison des analyses des phycotoxines paralysantes (PSP) au niveau des coques rouges entre le laboratoire de la société DINAY et les laboratoires des phycotoxines de l'INRH réalisées par test biologique sur souris (protocole AOAC n°: 959.08, 1990)

[Inter-comparison analyzes of Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) at the red shells from the laboratory of the company DINAY and laboratories phycotoxin INRH performed by mouse bioassay (AOAC protocol No.: 959.08, 1990)]

Dalila Ghallab¹, Hassan Bouzidi², Najat Oualit², Mohammed Marhraoui³, Mouhamed Al maadoudi⁴, and Abdenbi Bendriss¹

¹Université Abdelmalek Essaâdi, Faculté des Sciences, Tétouan, Maroc

²Société DINAY 39, Zone Industrielle, Tétouan, Maroc

³Institut National de Recherche Halieutique – Station RSSL – M'diq,
BP 31 Port Maritime de M'Diq, 93200 M'Diq, Tétouan, Maroc

⁴Laboratoire Régional d'Analyse et Recherche Vétérinaire, Rue Ibn Toumart, BP N°3, Tanger, Maroc

Copyright © 2014 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ABSTRACT: The main vectors of paralytic shellfish poisoning are bivalves that accumulate toxins through their mode of nutrition (filtration) during proliferation of toxigenic algae.

Acanthocardia tuberculatum is one of the most important bivalve molluscs which cause paralytic shellfish poisoning problems in Moroccan and Spanish Mediterranean coasts this species is capable of accumulating high levels of PSP toxins for a long time in these same tissues when microalgae producing potentially toxin are not present. This presents a danger to the health of consumers.

This work is part of a cooperation agreement and scientific research between the NHRI and DINAY Company is to do a study on the contamination of the red shell (*Acanthocardia tuberculatum*) paralytic marine biotoxins (PSP) by dosage of these last by the biological method in mice jointly by five laboratories.

Taking into account the coefficient of variation of the method of mouse bioassay is 20% our results concluded that the comparison of results obtained by the statistical test between the different laboratories revealed no significant difference in the same commission inter responsible for monitoring the safety of marine and shellfish acknowledged in September 2008 that these results are satisfactory.

This study also allowed taking measures during internal checks and monitoring of the marine environment as expand the batch of samples and diversifies in terms of size and that each lot is the subject of several repetitive analyzes.

KEYWORDS: *Acanthocardia tuberculatum*, Paralytic Shellfish Poisoning (PSP), Mousse Bioassay, Morocco.

RESUME: Les principaux vecteurs d'intoxication paralysante sont les mollusques bivalves qui accumulent les toxines par leur mode de nutrition (filtration) lors de prolifération des algues toxigènes.

Acanthocardia tuberculatum est une des plus importants mollusques bivalves qui cause des problèmes d'intoxication paralysante dans les côtes méditerranéennes marocaines et espagnoles cette espèce est capable d'accumuler des taux

importants de toxines paralysantes pendant longtemps dans ces tissus même lorsque les micro-algues produisant potentiellement la toxine ne sont pas présentes. Ce qui présente un danger pour la santé des consommateurs.

Ce travail entre dans le cadre d'une convention de coopération et de recherche scientifique entre l'INRH et la société DINAY qui consiste à faire une étude sur la contamination de la coque rouge (*Acanthocardia tuberculatum*) par les biotoxines marines paralysantes (PSP) par dosage de ces derniers par la méthode biologique sur souris conjointement par cinq laboratoires.

En tenant compte que le coefficient de variation de la méthode de test biologique sur souris est de 20% nos résultats ont permis de conclure que la comparaison des résultats obtenus par le test statistique entre les différents laboratoires ne révèle pas de différence significative de même la commission interministérielle chargée du suivi de la salubrité du milieu marin et des coquillages a reconnu en septembre 2008 que ces résultats sont satisfaisantes.

Cette étude a permis aussi de prendre des mesures durant les autocontrôles et la surveillance de milieu marin telle que d'élargir le lot de prélèvement et le diversifier en terme de taille ainsi que chaque lot fait l'objet de plusieurs analyses répétitives.

MOTS-CLEFS: *Acanthocardia tuberculatum*, phycotoxines paralysantes (PSP), test souris, Maroc.

1 INTRODUCTION

Il est à signaler que la pêche des bivalves en méditerranée marocaine occidentale occupe une activité importante, du fait qu'elle engage plusieurs personnes dans l'exploitation des coquillages. En effet la zone Oued Lou - Kaâ Srass (OL-KS) recèle une richesse en gisements coquilliers très importantes notamment les coques *Acanthocardia Tuberculatum* et les vernis *Callista Chione*.

Contrairement au vernis les coques présentent un risque majeur pour la santé publique du fait qu'elles accumulent de façon permanente les toxines paralysantes (PSP) même en absence des micro-algues produisant la toxine [1] cette permanence qu'est dû au fait que les PSP ont tendance à s'accumuler dans les organes non viscéraux (pied et branchies) de la coque rouge [2] ainsi que la présence de la PSPBP, nouvelle protéine capable de fixer et retenir les toxines paralysantes empêchant la détoxification de la coque [3] [4].

A cet égard, une étude sur la contamination de la coque rouge (*Acanthocardia tuberculatum*) par les biotoxines marines (PSP) a été menée conjointement entre les laboratoires d'analyses des biotoxines marines de l'INRH et celui de la Société DINAY.

Il est à rappeler que DINAY est une société de valorisation des bivalves (conserves) qui dispose d'un agrément pour la détoxification des coques rouges en cas de dépassement des taux de toxines de 300 µg éq STX /100g (1500 US dans 100g de chaire) (US= unité souris).

A cet égard, la dite société a mis en place un laboratoire d'analyse des toxines marines et dispose aussi d'une animalerie d'élevage des souris utilisés pour réaliser le test biologique [5]. La présente étude est réalisée en 2006 et 2007 sur des échantillons de coque rouge issues de la zone de production Oued Laou – Kaâ Srass.

Le but de cette étude est de procéder à une inter-comparaison des résultats obtenus entre les laboratoires de l'INRH et celui de la société DINAY pour une meilleure surveillance du milieu marin.

2 MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 SITES D'ÉCHANTILLONNAGE

La zone est riche en gisement naturel de bivalve notamment les coques et vernis. Par ailleurs cette zone connue des phénomènes recrutant de la présence de la PSP à des taux élevés au niveau des coques rouges pendant une longue période de l'année. La zone abrite deux points de débarquement dédiés à la pêche artisanale (voir photo ci-joint), sis aux villages oued Laou et Kaâ Srass. Les limites géographiques de la zone d'étude (voir carte ci jointe) sont :

35°27',310 N – 05°05',067 W

35°24',682 N – 05°03',445 W

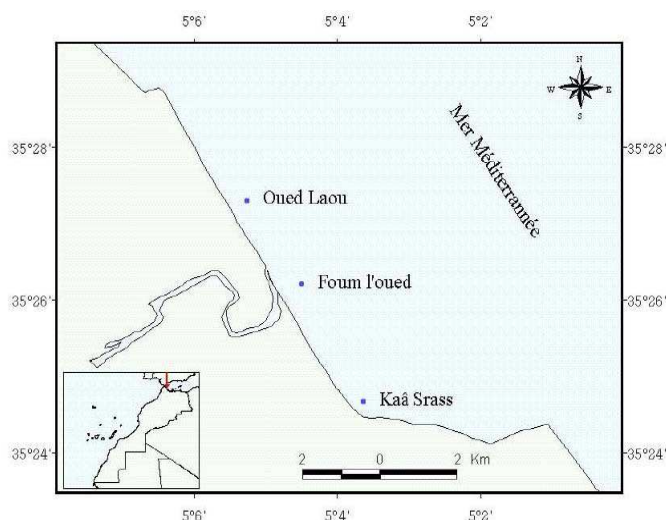


Fig. 1. Carte de la zone de production des coques à Oued Laou – Kaâ Ssras

2.2 ESPÈCE ÉTUDIÉE



Fig. 2. photo de la coque rouge (*Acanthocardia tuberculatum*)

L'espèce de bivalve sur laquelle l'étude a été menée est la coque rouge (*Acanthocardia tuberculatum*), c'est un bivalve fouisseur superficiel qui vit dans le sédiment sableux – sableux vaseux où se concentreraient les kystes de *G.catenatum* qui engendrent une toxicité permanente de ce bivalve [6].

2.3 FRÉQUENCE D'ÉCHANTILLONNAGE

Les campagnes d'échantillonnages ont été réalisées durant la période mars-avril 2006 et septembre-novembre 2007. Les échantillons prélevés au niveau de chaque site ont été subdivisés en plusieurs lots de coques d'environ 20 individus de différentes tailles. Chaque laboratoire concerné reçoit les lots correspondants.

Tous les échantillons seront conservés au congélateur à une température de moins 20 °C avant expédition aux laboratoires concernés.

2.4 PROCÉDURE D'ANALYSE

Au cours de chaque prélèvement chaque laboratoire a reçu deux lots de coque issus des deux points de prélèvements (Oued Laou et Kaâ Ssras). Chaque lot a été subdivisé en trois portions et qui ont été traité et broyé selon la méthode AOAC. L'extrait obtenu va subir trois répliquas (3 ou 2 analyses/ lot).

2.5 LABORATOIRES PARTICIPANT À L'ÉTUDE

L'étude a été réalisée conjointement entre les laboratoires d'analyse des biotoxines marines :

- Le Laboratoire d'analyse des biotoxines marines de la Société DINAY à Martil,
- Le Laboratoire Centrale d'analyse des biotoxines marines de l'INRH à Casablanca,
- Le Laboratoire d'analyse des biotoxines marines du Centre Régional de l'INRH à Agadir,
- Le Laboratoire d'analyse des biotoxines de la Station du RSSL de l'INRH à M'diq,
- Le Laboratoire Régionale d'Analyse et de Recherche Vétérinaire Tanger LRARVT.

2.6 TECHNIQUE D'ANALYSE

La technique d'analyse utilisée a été la même pour les cinq laboratoires, c'est la méthode préconisée par l'AOAC qui consiste en l'extraction en milieu acide du contenu de coquillage et de sa purification avant injection à des souris mâles d'un poids de 20 ± 2 g.



Cette technique consiste à faire le :

- Décorticage des coquillages ;
- Nettoyage et égouttage de la chair ;
- Broyage de la chair;
- Extraction acide des toxines avec HCl ; ajustement du pH;
- Mettre à ébullition; ajustement d'eau et pH;
- Centrifugation ;
- Injection intra péritonéale de 1ml de surnageant à une souris mâle ;
- Mesure du temps de survie ;
- Calcul de la toxicité.

Fig. 3. Analyse des toxines paralysantes par test biologique sur souris (méthode de l'AOAC 1990)

3 RÉSULTATS

Les résultats sont regroupés dans la figure suivante :

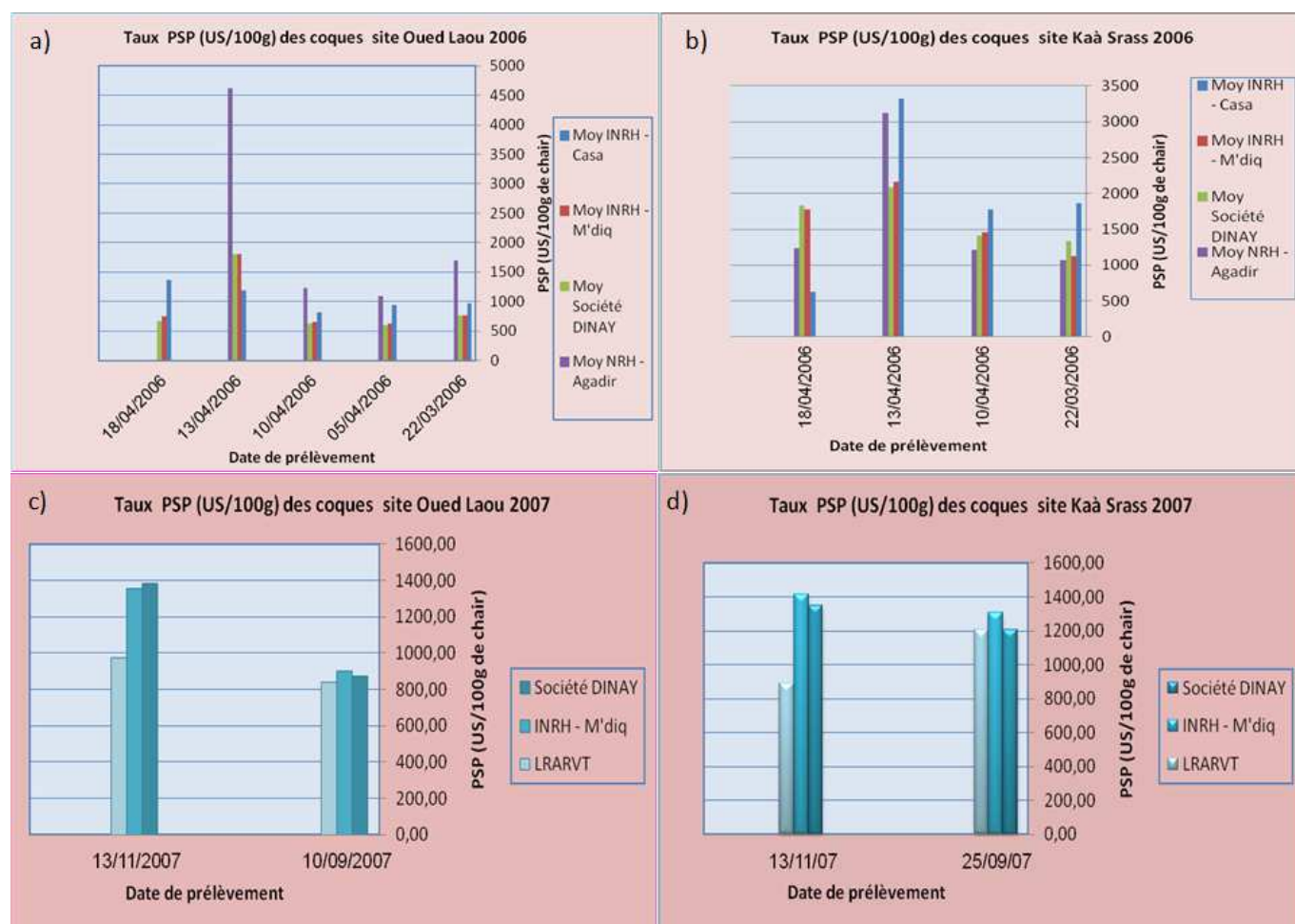


Fig.4. résultats d'analyse des biotoxines marines PSP (US/100g) réalisée par les laboratoires au niveau du site (a: OL 2006; b: KS 2006; c: OL 2007; d: KS 2007).

4 DISCUSSION

Les résultats enregistrés par chaque laboratoire ont montré au cours de la durée d'étude que le taux de PSP enregistrés dépasse parfois le seuil de 1500 US/100g de chaires.

Il est à signaler que chaque lot a fait l'objet de trois ou deux analyses répétitives voir tableaux des résultats d'analyse en annexe.

Les résultats comme les démontrent les figures et tableaux ci-joint montrent une légère différence de toxicité au niveau du même point de prélèvement et une divergence significative concernant un seul laboratoire (INRH Agadir) par rapport aux autres laboratoires qui ont des résultats proche (voir calcul statistique des résultats en annexe).

En septembre 2008 la commission interministérielle chargée du suivi de la salubrité du milieu marin et des coquillages a reconnu que les résultats obtenus en 2007 ne révèlent pas de différences significatives entre les laboratoires.

REFERENCES

- [1] Vale P., Sampayo M.A.M. 2002. "Evaluation of marine biotoxin's accumulation by *Acanthocardia tuberculatum* from Algarve, Portugal," *Toxicon* 40: 511-517.
- [2] Sagou R., Amanhir R., Taleb H., Vale P., Blaghen M., Loutfi M.(2005). "Comparative study on differential accumulation on PSP toxins between cockle (*Acanthocardia tuberculatum*) and sweet clam (*Callista chione*)," *Toxicon* 46: 612-618.
- [3] Takati N., Mountassif D., Taleb H., Lee K., Blaghen M. (2007a). "Purification and partial characterization of paralytic shellfish poison-binding protein from *Acanthocardia tuberculatum*," *Toxicon* 50: 311-321.
- [4] Takati. N., Mountassif. D., Taleb. H., et Blaghen. M., (2007b)- "Détermination des causes de persistance de la toxicité chez la coque « *Acanthocardia tuberculatum* »,» Journée Scientifique « Ressources Naturelles et Antibiothérapie », 22 Juin 2007, Faculté des Sciences – Kénitra. Communication Afichée (A14).
- [5] AOAC, (1990). Paralytic shellfish poison, biological method, final action. In: AOAC, (Ed.), "Official Methods of Analysis," 15th ed., Arlington, VA, method n° 959.08.1990.
- [6] Daoudi., M (2004). "Contribution à l'étude du peuplement phytoplanctoniques dans la baie de M'Diq et l'estuaire de Oued Laou espèces toxique et nuisibles," Mémoire de troisième cycle (DESA).2004. Université Abdelmalek Essaâdi Tétouan.

ANNEXES

Tableau 1. Taux de biotoxines PSP (US/100g) des coques issues du site Oued Laou pour chaque laboratoire (2006).

Date de prélèvement	Echantillon	INRH - Casa	INRH - M'diq	Société DINAY	INRH - Agadir 1	INRH - Agadir 2
22/03/2006	A1	960	906,56	1059	1653	1730
	A2	971	699,13	564	//	//
	A3	//	695,25	660	//	//
05/04/2006	C1	1125	716,44	641	1079	1101
	C2	858	584,94	589	//	//
	C3	834	566,67	569	//	//
10/04/2006	D1	1044	679,89	644	1190	1281
	D2	775	639,34	618	//	//
	D3	628	628,52	605	//	//
13/04/2006	F1	1280	1882,65	1811	4908,5	4326
	F2	1242	1830,2	1889	//	//
	F3	1063	1692,55	1728	//	//
18/04/2006	H1	1488	938,22	873	//	//
	H2	1336	611,97	569	//	//
	H3	1277	694,69	574	//	//

Tableau 2. Calcul statistique des Taux des biotoxines PSP enregistrés au niveau des coques issues du site de Oued Laou (2006).

Date de prélèvement	MOY INRH - Casa	MOY INRH - M'diq	MOY Société DINAY	INRH - Agadir	Moy	Max	Min	Ecart type	Variance
22/03/2006	965,5	766,98	761	1691,5	1046,25	1691,50	761,00	440,54	194075,81
05/04/2006	939	622,68	599,67	1090	812,84	1090,00	599,67	241,06	58112,10
10/04/2006	815,67	649,25	622,33	1235,5	830,69	1235,50	622,33	283,10	80143,70
13/04/2006	1195	1801,8	1809,33	4617,25	2355,85	4617,25	1195,00	1534,84	2355719,40
18/04/2006	1367	748,29	672	-	929,10	1367,00	672,00	381,15	145274,54

Tableau 3. Taux de biotoxines PSP (US/100g) des coques issues du site Kaa Asrass pour chaque laboratoire (2006).

Date de prélèvement	Echantillon	INRH - Casa	INRH - M'diq	Société DINAY	INRH - Agadir 1	INRH - Agadir 2
22/03/2006	B1	1716	1429,64	1501,3	1048	1099
	B2	1869	1048,27	1108,2	//	//
	B3	2004	898,88	1388,14	//	//
10/04/2006	E1	1848	1811	1351,41	1178	1250,5
	E2	1755	1362,45	1435,12	//	//
	E3	1716	1178,17	1453,6	//	//
13/04/2006	G1	2880	2855,84	2359,4	2883	3352,5
	G2	3660	1554,34	2005,8	//	//
	G3	3420	2074,7	1886,05	//	//
18/04/2006	H1	888	1597,53	1579,2	1202	1269
	H2	512	2142,36	2131,3	//	//
	H3	475	1597,73	1775,82	//	//

Tableau 4. Calcul statistique des Taux des biotoxines PSP enregistrés au niveau des coques issues du site de Kaa Asrass (2006).

Date de prélèvement	MOY INRH - Casa	MOY INRH - M'diq	MOY Société DINAY	INRH - Agadir	Moy	Max	Min	Ecart type	Variance
22/03/2006	1863	1125,6	1332,55	1073,5	1348,6625	1863	1073,5	360,68	130091,32
10/04/2006	1773	1450,54	1413,38	1214,25	1462,7925	1773	1214,25	231,37	53531,26
13/04/2006	3320	2161,63	2083,75	3117,75	2670,7825	3320	2083,75	639,04	408368,91
18/04/2006	625	1779,21	1828,77	1235,5	1367,12	1828,77	625	563,03	317001,60

Tableau 5. Taux de biotoxines PSP (US/100g) des coques issues du site Oued Laou pour chaque laboratoire (2007)

Date de prélèvement	Echantillon	Société DINAY	INRH - M'diq	LRARVT
10/09/2007	A1	825	924	832
	A2	874	858	835
	A3	912	924	845
13/11/2007	C1	1459	1436	954
	C2	1312	1269	990
	A1	825	924	832

Tableau 6. Calcul statistique des Taux des biotoxines PSP enregistrés au niveau des coques issues du site de Oued Laou (2007).

Date de prélèvement	MOY Société DINAY	MOY INRH - M'diq	MOY LRARVT	Moy	Max	Min	Ecart type	Variance
22/03/2006	870,33	902,00	837,33	869,89	902,00	837,33	32,34	1 045,59
10/04/2006	1385,50	1352,50	972,00	1 236,67	1 385,50	972,00	229,80	52 808,58

Tableau 7. Taux de biotoxines PSP (US/100g) des coques issues du site Kaa Asrass pour chaque laboratoire (2007).

Date de prélèvement	Echantillon	Société DINAY	INRH - M'diq	LRARVT
25/09/2007	B1	1232	1124	1112
	B2	1112	1464	1210
	B3	1280	1336	1293
13/11/2007	D1	1312	1392	810
	D2	1392	1440	972
	B1	1232	1124	1112

Tableau 8. Calcul statistique des Taux des biotoxines PSP enregistrés au niveau des coques issues du site de Kaa Asrass (2007).

Date de prélèvement	MOY Société DINAY	MOY INRH - M'diq	MOY LRARVT	Moy	Max	Min	Ecart type	Variance
22/03/2006	1208,00	1308,00	1205,00	1240,33	1308,00	1205,00	58,62	3 436,33
10/04/2006	1352,00	1416,00	891,00	1 219,67	1 416,00	891,00	286,43	82 040,33