

ETUDE DE L'IMPACT DE L'ALIMENTATION SUR LA DETOXIFICATION DE LA PALOURDE *Ruditapes decussatus* CONTAMINEE IN-SITU PAR LES GYMNODIMINES (LAGUNE DE BOUGHRARA, SUD DE LA TUNISIE).

Walid MEDHIOUB^{1,2,3}, Z. AMZIL¹, Ph. SOUDANT³, A. HAMZA², M. N. MEDHIOUB²,
M. M. KRAIEM¹ et P. LASSUS¹.

¹Laboratoire d'Aquaculture, INSTM, Institut National des Sciences et Technologies de la Mer, Route de Kniss - 5000 Monastir, Tunisie.

²Laboratoire Phycotoxines, IFREMER, Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer, BP21105 44311 Nantes CEDEX3, France.

³Université de Bretagne Occidentale – IUEM, LEMAR CNRS UMR 6539, Place Nicolas Copernic, technopôle Brest Iroise – 29280 Plouzané, France.
medhwalid@yahoo.fr

دراسة تأثير التغذية على إزالة السموم من *Ruditapes decussatus* الملوثة بمادة البيوتكسين *Gymnodimine* المتواجدة ببحيرة

عام 1994 إنتشر الطحلب المجهرى *Karenia selliformis* المفترزة لمادة البيوتكسين *Gymnodimine* في خليج قابس (جنوب شرق تونس) وبالتحديد وبصفة مستمرة في بحيرة بوغرارة مما إنجر عنه تلوث القفالة *Ruditapes Decussatus* بهذه المادة، ما إستوجب عنه إيقاف إنتاج القفالة وتسويقه.

ويعتبر تلوث الرخويات بمادة البيوتكسين مشكلة عالمية تطلب إيجاد حل. وفي هذا الإطار يندرج هذا العمل وهدفه دراسة تأثير التغذية المعتمدة على الطحالب الدقيقة من سلالة الأعلاف *(T.Iso)Isochrysis Galbana*.

تم تحليل مادة البيوتكسين المتواجدة بالعدّة الهظمية للقفالة باستعمال تقنية (LC/MS/MS) وتقنية فئران الإختبار. بلغ محتوى البيوتكسين (*GYM-I*) بالعدّة الهظمية للقفالة البري $3375 \mu\text{g GYM kg}^{-1}$.

أبرزت النتائج أن مدة إزالة المادة السامة تساوي 15 يوماً بالنسبة للقفالة المتحصل على التغذية و39 يوماً بالنسبة للقفالة غير المعالج وذلك بالإعتماد على تقنية فئران التجارب مما يجعل نسبة تراجع كمية البيوتكسين على التوالي بـ 82 % و 95 %.

الكلمات المفاتيح : بحيرة بوغرارة , البيوتكسين, *Karenia selliformis*, *Ruditapes decussates*, تنقية القفالة

RESUME

Depuis 1994 la prolifération de la micro algue toxique, *Karenia selliformis*, productrice de la gymnodimine (GYM), dans le golfe de Gabes (Sud de la Tunisie) contamine fréquemment les sites de production de la palourde *Ruditapes decussatus* et, d'une façon continue la lagune de Boughrara, entraînant ainsi l'arrêt de la commercialisation de cette espèce.

La contamination des mollusques bivalves par les phycotoxines est un problème mondial qui nécessite d'apporter une solution. C'est dans ce cadre que s'inscrit ce travail qui a pour objectif l'étude de l'impact de l'alimentation à base de la microalgue fourrage *Isochrysis galbana* Tahitian clone (T.Iso) sur la cinétique de détoxification de la palourde contaminée naturellement.

Les analyses de la toxine ont été effectuées par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse triple quadruple (CL/SM/SM) et par test souris.

Le contenu en GYM dans la glande digestive des palourdes récoltées dans le milieu naturel atteint $3375 \mu\text{g GYM kg}^{-1}$ à T_0 . La durée de détoxification avec un test souris négatif est de 15 jours pour les lots alimentés et de 39 jours pour les animaux à jeun avec un abattement respectif de 82 % et 95%.

Mots Clés : Détoxification, lagune de Boughrara, Gymnodimine, *Karenia selliformis*, *Ruditapes decussates*

ABSTRACT

Impact study of food supply on the detoxification kinetics of *Ruditapes decussatus* contaminated in-situ by gymnodimine (Boughrara Lagoon, Southern Tunisia) : In the Boughrara Lagoon (Gulf of Gabès, Eastern Mediterranean sea, Tunisia,), the grooved carpet shell *Ruditapes decussatus* has been contaminated by the toxic dinoflagellate *Karenia selliformis* and seen to contain persistent levels of gymnodimine (GYM) for several years.

The contamination of bivalve molluscs by phycotoxins is a worldwide problem requiring a solution. In this context, the present study investigated the detoxification kinetics of naturally contaminated clams by using *Isochrysis galbana* Tahitian clone (T.Iso) as food supply.

Contents of (GYM) in digestive gland and remaining tissues during contamination and detoxification periods were measured by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and by mouse bioassay.

The GYM content in the digestive gland of clams harvested in the natural environment reaches 3375 mg kg⁻¹ GYM at T₀. At the end of the experiment, DSP mouse bioassay was negative after 15 days of detoxification for fed group and 39 days for the non fed group with a respective reduction of 82% and 95%.

Keywords: Detoxification, Boughrara lagoon, Gymnodimine, *Karenia selliformis*, *Ruditapes decussatus*.

INTRODUCTION

La contamination des coquillages par les phycotoxines est un phénomène naturel qui est la cause de pertes économiques importantes au niveau de l'aquaculture mondiale, particulièrement dans le secteur conchylicole. La Tunisie n'a pas échappé à ce phénomène.

En effet, depuis les proliférations d'algues toxiques de 1994 (Hamza et El Abed, 1994 ; Hansen et al., 2004, Idriss et al., 2011) les palourdes *Ruditapes decussatus* du Golfe de Gabès (sud de la Tunisie) sont fréquemment contaminées par la micro-algue toxique *Karenia selliformis*. Ce dinoflagellé marin produit la gymnodimine, un composé qui fait partie de la famille des phycotoxines du type 'imines cycliques' (Stirling et al., 2002 ; Biré et al., 2002). Cette micro-algue se développe plus particulièrement dans la lagune de Boughrara où la production de la palourde est affectée de façon continue. Ces contaminations ont engendré de sérieux problèmes socio-économiques puisque la décontamination naturelle peut prendre de plusieurs semaines à plusieurs mois. La contamination des mollusques bivalves par les phycotoxines est un problème mondial qui a très vite nécessité d'apporter des solutions aux problèmes économiques engendrés par les interdictions de vente de coquillages contaminés.

Ainsi, différents procédés ont été mis au point dans le but de réduire rapidement le contenu en toxines dans la chair des mollusques bivalves comestibles. Un des procédés les plus simples consiste à transférer les animaux contenant des toxines dans un site non contaminé pour faciliter le processus d'auto-épuration. Malheureusement, cette méthode présente l'inconvénient majeur d'une contamination secondaire possible de la zone saine par revivification des kystes d'espèces toxiques comme *Alexandrium* spp (toxines PSP) (Bricelj et al., 1993 ; Schwinghamer et al., 1994 ; Harper et al., 1997). Shumway et al. (1995), ont proposé d'autres méthodes de traitement à terre notamment des stress thermiques ou salins, des chocs électriques, la

réduction du pH, la chloration. Cependant, les effets ne sont pas convaincants.

Le traitement à l'ozone reste le procédé qui a été le plus testé bien que les résultats obtenus soient controversés. Blogoslawski (1979) a signalé que l'eau ozonée permettait de détoxifier les bivalves récemment contaminés par des cellules productrices de toxines paralysantes alors que Shumway et al. (1995) estiment que l'ozone est inefficace pour détoxifier des bivalves qui ont ingéré des kystes d'espèces toxiques ou qui ont bioaccumulé depuis longtemps des toxines paralysantes déjà métabolisées et liées aux tissus. Ce même procédé utilisé pour les toxines diarrhéiques (DSP) n'a pas montré une réduction significative de ces toxines chez les moules traitées (Reboreda et al., 2009).

L'apport de nourriture non toxique au cours de la détoxification, a été également utilisé par différents auteurs bien que les effets obtenus soient parfois contradictoires. Plusieurs auteurs considèrent néanmoins que la disponibilité d'une nourriture non toxique est le principal facteur permettant d'accélérer la détoxification de coquillages vivants (Haamer et al., 1990; Sampayo et al., 1990; Marcaillou-Le Baut et al., 1993; Poletti et al., 1996; Blanco et al., 1999 ; Bauder et al., 1996).

A l'opposé, d'autres travaux ont comparé des individus alimentés et non alimentés et ont montré que la détoxification des bivalves pouvait être obtenue sans l'ajout d'aliment non toxique (Haamer et al. 1990 ; Novaczek et al., 1992 ; Wohlgeschaffen et al., 1992 ; Croci et al., 1994; Bjork et Gilek., 1997 ; Chen et Chou., 2001 et Svensson, 2003).

Par ailleurs, en ce qui concerne les toxines lipophiles, des essais de contamination/détoxification de différents bivalves comestibles tels que moules, huîtres, coquille Saint Jacques et palourdes (Madenwald 1985, Marcaillou-Le Baut et al., 1993, Blanco et al. 1999, Svensson 2003, Duinker et al., 2007) ont permis de mettre en évidence des différences 'espèce-dépendantes' dans les cinétiques de contamination et de détoxification.

En effet, les travaux portant sur la détermination des cinétiques de détoxification de la palourde *R. decussatus* contaminée dans son milieu naturel (lagune de Boughrara) par les gymnodimines sont limités. Le seul essai réalisé dans des conditions

contrôlées et sans apport alimentaire a montré une durée de détoxification de 29 jours (Marrouchi et al., 2010). Cependant, aucun procédé de détoxification n'a été appliqué pour pouvoir réduire cette durée.

C'est dans ce contexte que s'inscrit ce présent travail qui a pour objectifs d'étudier l'impact de l'ajout de l'alimentation en conditions contrôlées sur les vitesses de détoxification et de déterminer l'impact du pré-stockage sur la cinétique de détoxification, en particulier pendant les premiers jours de détoxification.

MATERIELS ET METHODES

1. Site d'échantillonnage

La lagune de Boughrara est un milieu semi fermé présentant une communication limitée avec la mer. Cette lagune est un site exceptionnel pour la biodiversité marine. Cependant, son écosystème a connu depuis quelques années une détérioration progressive en raison des contraintes naturelles et anthropiques qui lui sont imposées. En effet, en plus des conditions hydrodynamiques et climatiques sévères (déficit notable en eau continentale, faible profondeur, circulation d'eau limitée, évaporation intense), la lagune continue à subir les nuisances des activités aquacoles, des installations portuaires, de divers rejets industriels contribuant à sa dégradation (Ayari et al., 2008). Par conséquent, la diversité biologique a subi une régression avec une réduction particulière des ressources halieutiques, entraînant la chute des revenus dans le secteur (Ayari et al., 2008). Cette lagune est située dans le sud-est tunisien entre les méridiens 10°45' et 10°57' et les parallèles 33°28' et 33°45' nord. Elle est définie en tant que mer intérieure, bordée par l'île de Djerba du côté nord et par le continent du côté sud. Son bassin versant, dont la superficie est de 2394 km², est drainé par six principaux oueds qui se déversent dans la lagune. Elle présente une superficie de 50000 hectares avec une profondeur moyenne de l'ordre de 5m. La lagune est entourée de 5 sebkhas, qui correspondent à des dépressions planes, inondables et dont les sols salés interdisent toute végétation sur la plus grande partie de leur surface. Ce plan d'eau communique avec la mer par le canal Ajim-Jorf, large de 2.2 km et par une petite ouverture de 12 m de largeur, située sous le pont de la chaussée romaine dans le bassin d'El Kantara. La lagune de Boughrara est soumise à des phénomènes de marée, dont la valeur maximale de marnage, 80 cm en période de vives eaux, est enregistrée au niveau du port d'Ajim (Ayari et al., 2008). Selon cet auteur, la salinité mensuelle mesurée au cours de l'année 1999 / 2000 a montré un maximum de 48.8 en septembre et un minimum de 47 au mois de mai. Un gradient croissant de salinité a été signalé, depuis la zone à influence marine vers la rive sud de la lagune (Anonyme, 2000). Plus tard, Féki et

al. (2008) et Dammak-Zouari et al. (2009) enregistrent respectivement une salinité maximale de 50 à 52 psu. Les températures mensuelles des eaux de surface oscillent entre un minimum de 10.7°C et un maximum de 32.7°C (Benrejeb-Jenhani et Romdhane, 2002). Les valeurs en oxygène dissous sont comprises entre 4.8 mg/l et 16.0 mg/l (Anonyme, 2000).

2. Matériel biologique

40 kg de palourdes *Ruditapes decussatus* de longueur et de poids moyens respectivement de 30,7 mm et 4,99 g, contaminées naturellement par la gymnodimine, ont été pêchés dans la lagune de Boughrara (Fig 1).

Les palourdes ont été acheminées au laboratoire d'aquaculture du Centre de l'INSTM de Monastir, après un stockage à température ambiante, durant une nuit, dans un sac humide.

La contamination de ces palourdes a été vérifiée, par des bioessais sur souris spécifiques, des toxines diarrhéiques DSP (Yasumoto et al., 1978) et paralysantes PSP (AOAC95908, 1990) et par analyse chimique par HPLC pour les toxines amnésiantes ASP (Quilliam et al., 1995).

3. Protocole expérimental

Huit raceways (180 litres/raceway), contenant chacun 6 kg de palourdes, ont été maintenus en circuit ouvert, avec une circulation d'eau de mer brute, sans filtration, à la température moyenne de 16,8 ± 0,2 °C, à la salinité de 38 psu. Cette eau est renouvelée trois fois par 24 heures et les raceways sont répartis en quatre lots comme suit :

- Deux raceways sans aliment sont maintenus en circuit ouvert (SA).
- Deux raceways sont alimentés et maintenus en circuit ouvert dès l'arrivée des palourdes (AA).
- Deux raceways sont alimentés, et maintenus en circuit ouvert, après stockage des palourdes à sec pendant 48 heures à la température ambiante de 15°C (AAT).
- Deux raceways sont alimentés et maintenus en circuit ouvert, après stockage des palourdes à sec pendant 48 heures à 8°C (AATB).

L'alimentation algale à base d'*Isochrysis galbana* souche Tahiti (T-Iso) a été distribuée tous les jours en continu, avec une ration moyenne R=1,3%, définie comme le rapport : poids sec de l'algue distribuée / poids sec de la chair de palourdes, pendant toute la durée de l'expérimentation. La micro-algue a été cultivée en gaine de polyéthylène de 100 litres dans une eau de mer enrichie en milieu de Conway, à la salinité de 30 psu, à la température de 20°C, et à une intensité lumineuse de 70 µmoles photon/m²/s mesuré à l'aide d'un luxmètre. La concentration cellulaire de cette micro-algue est contrôlée par le compteur de particules Multisizer 3[®].

Les raceways ont été nettoyés tous les jours par siphonage afin d'éliminer les biodépôts. Au cours de la période de détoxification, les palourdes des quatre lots ont été échantillonnées pour l'analyse quantitative de la GYM aux jours : 0, 1, 2,

3, 8, 12, 15, 17 pour le lot AA, 0, 1, 2, 3, 8, 12, 15, 17, 27, 39 pour le lot SA et 0, 1, 2, 5, 7, 8, 12, 15, 17 et 27 pour les lots AAT et AATB. Pour chaque lot, 10 individus (5 pièces/raceway) ont été choisis

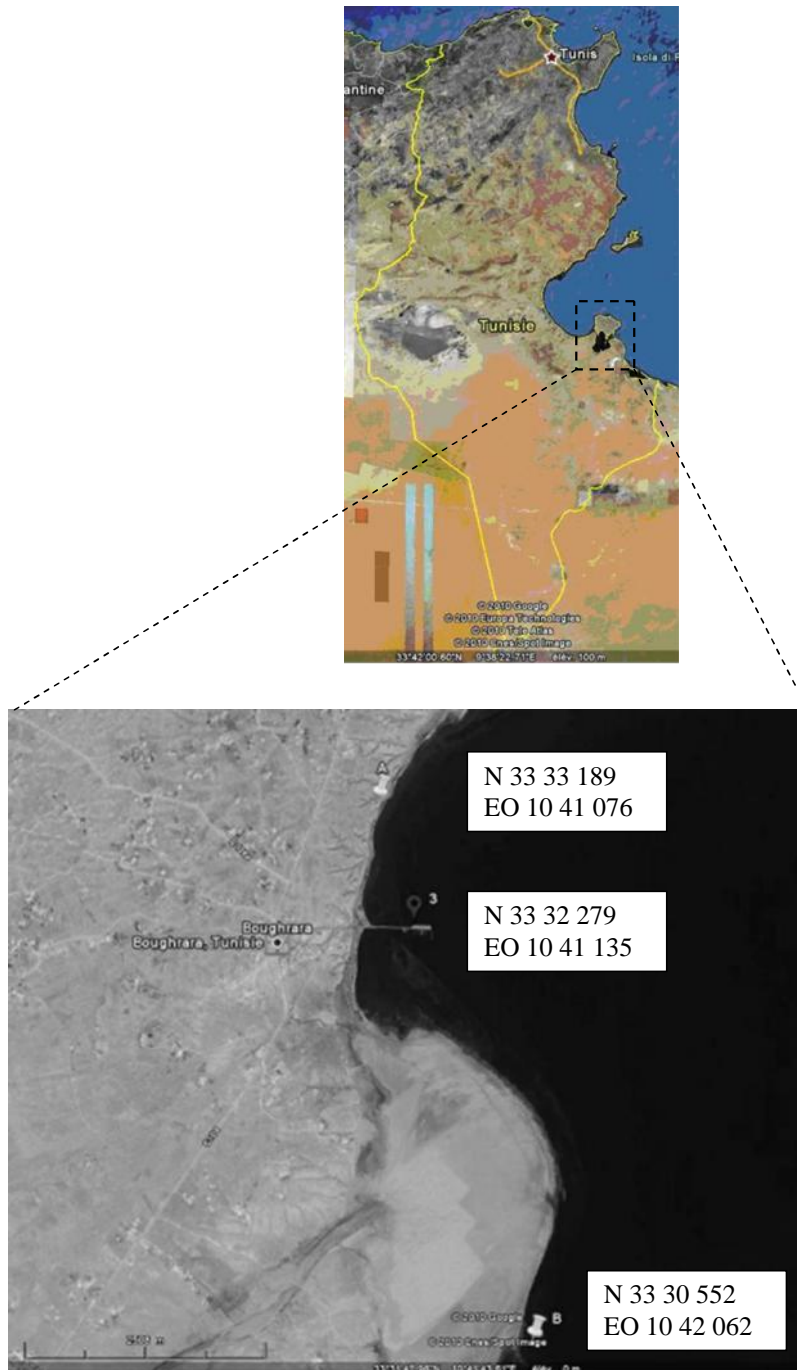


Figure 1. Zone de récolte des palourdes contaminées dans la lagune de Boughrara. (sud de la Tunisie). De A vers B.

aléatoirement puis disséqués et divisés en quatre fractions: glande digestive, siphon, pied, branchies. Ces fractions ont été égouttées pendant 2 h sur des lot. Pour les bioessais sur souris, 2 kg/lot (1kg/raceway) de palourdes ont été prélevés séquentiellement suivant la fréquence indiquée dans

Büchner, pesées, puis congelées à -80°C. Dix individus supplémentaires ont été échantillonnés pour analyse individuelle aux jours 0 et 15, pour chaque. (tableau I.)

Tableau I : Jours d'échantillonnage pour le bioessai sur souris

Jour	0	8	10	12	15	17	27	39
AA	*	*	*	*	*	*		
SA	*			*		*	*	*
AAT	*	*			*			
AATB	*	*			*			

4. Indice de condition

10 pièces/lot (5/raceway) ont été prélevées tous les 4 jours pour AA, SA, AAT et AATB. Deux prélèvements supplémentaires ont été effectués aux 1 jours 27 et 39 pour le lot non alimenté (SA).

L'indice de condition IC est calculé suivant la formule suivante :

$$IC = (\text{Poids sec de la chair/poids sec de la coquille}) \times 100.$$

5. Extraction et analyse chimique par CL-SM/SM

5.1 Méthode d'extraction

Les toxines lipophiles ont été extraites à partir de 2 g d'homogénat de glande digestive ou d'autres tissus avec 18 ml (3x6 ml) d'une solution méthanol/eau (90/10). Après centrifugation (3000g, 15min, 4°C) les surnageants ont été regroupés et homogénéisés. 1 ml d'échantillon a été ultra-filtré par centrifugation à travers une membrane d'épaisseur 0,2mm (filtre Whatman) à 10 000 g pendant 10 min. Cinq microlitres du filtrat ont été injectés dans le système CL-SM/SM.

5.2 Analyse chimique par CL-SM/SM

Les analyses CL-SM/SM ont été effectuées selon la méthode de Amzil et al. (2007) en utilisant un modèle Agilent 1100 LC® couplé à un spectromètre de masse API 2000.

Les toxines ont été éluées dans une colonne 3-µm hyperclone MOS C8 (50 mm x 2,0 mm, Phenomenex) à 20°C avec un gradient linéaire fixé à 0,2 ml / min. Les analyses ont été effectuées en utilisant la méthode (MRM : Multiple Reaction Monitoring) en mode d'ionisation positive et les deux ions produits les plus intenses par composé recherché ont été sélectionnés. Les conditions de transition choisies pour les gymnodimines sont indiquées dans le tableau II

Tableau II : Conditions de transition pour la GYM-A et la GYM-B. m/z (rapport masse sur charge).

Toxine	Transitions m/z
GYM A	508.4>490.2/392.3
GYM B	524.4>506.4

6. Bioessai sur souris

6.1 L'extraction des toxines

Le test souris pour les toxines DSP a été réalisé selon la méthode de Yasumoto et al. (1978). Vingt grammes de glandes digestives (GD) de chaque échantillon de palourdes ont été extraits avec 50 ml d'acétone, homogénéisés par Ultra-Turax, filtrés et ensuite placés dans un évaporateur rotatif. Cette dernière étape a été répétée deux fois. Enfin, après évaporation du mélange eau / acétone, le résidu sec a été recueilli et agité avec des billes de verre dans 4 ml de Tween 60 à 1% avant d'être stocké à -80°C jusqu'à son utilisation.

6.2 Inoculation

Le résidu dilué dans 1 ml de Tween 60 à 1% est injecté par voie intra-péritonéale (i.p) à trois souris. La toxicité a été déterminée par le temps écoulé entre l'injection des extraits de palourdes et la mort de la souris. Trois souris témoins (sex mâle, poids = 20 ± 2 g et âgés de 45 à 60 jours), ont également été injectées avec 1 ml de Tween solution standard. Dès que l'inoculation a été faite, les souris ont dû être soigneusement observées, en accordant une attention particulière aux symptômes survenant dans les 15 premières minutes. L'essai biologique est considéré comme positif si au moins deux des trois souris sont mortes dans les 24h.

7. Analyse statistique

L'étude comparative de la détoxification et de l'indice de condition entre les différents traitements a été effectuée à l'aide du Student T test. Le seuil de probabilité $P < 0.05$ a été utilisé pour définir les différences significatives entre traitements, pour toutes les données. Le logiciel STATISTICA 5.5, a été utilisé pour les analyses statistiques.

RESULTATS

Cinétiques de détoxification de la palourde *R. decussatus*

La cinétique de détoxification a été déterminée par analyse chimique du contenu en GYM dans la glande digestive (Fig 2). Le contenu en GYM dans la GD des palourdes récoltées dans le milieu naturel atteint $3375 \mu\text{g GYM kg}^{-1}$ à T0. Le temps de détoxification pour atteindre un niveau inférieur à $200 \mu\text{g GYM kg}^{-1}$ est de 15 jours pour les lots alimentés selon les

conditions AA, AAT, AATB. La perte de toxine pour les animaux à jeun (SA) n'atteint que 82 % (approximativement $600 \mu\text{g GYM kg}^{-1}$) à J15. Ce niveau de toxine est significativement supérieur à celui des animaux nourris (AA, AAT, AATB). Il faut 39 jours pour les animaux à jeun pour éliminer 95% de la toxine et passer en dessous de $200 \mu\text{g GYM kg}^{-1}$ (Fig 2).

Du point de vue de la cinétique, deux phases distinctes peuvent être distinguées en fonction de l'abattement en GYM.

Une première phase qui dure une journée et au cours de laquelle la concentration initiale chute drastiquement dans les différents lots pour atteindre $879, 750, 1039$ et $1769 \mu\text{g GYM kg}^{-1}$ GD respectivement pour AA, AAT, AATB et SA ce qui représente un abattement en toxine de 74, 78, 69 et 48 %. Une deuxième phase plus longue, qui s'étale sur 14 jours pour AA, AAT et AATB et 38 jours pour SA.

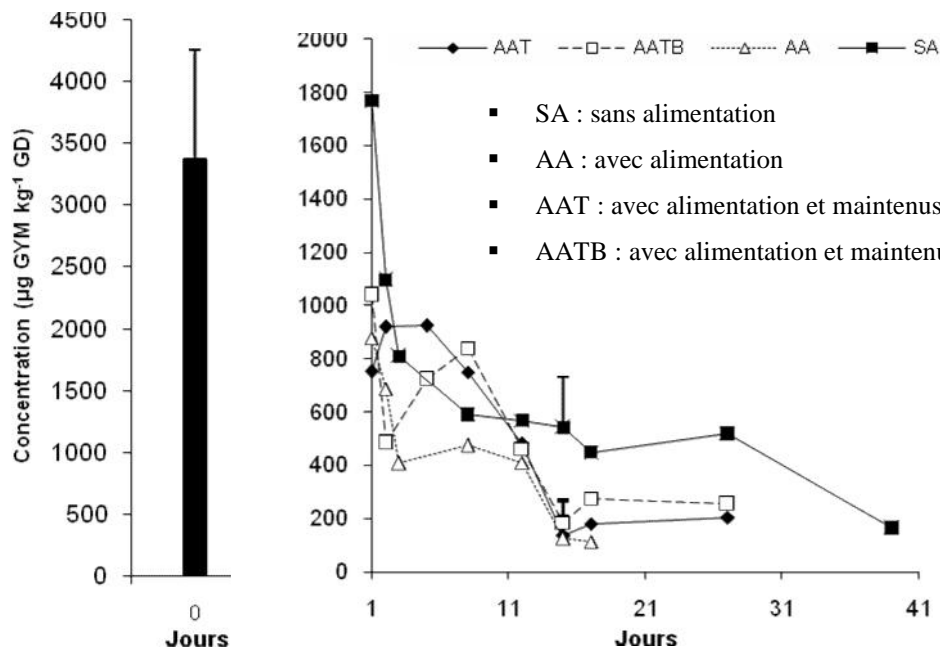


Figure 2. Cinétique de détoxification de palourdes contaminées naturellement par *Karenia selliformis* pour différentes conditions expérimentales. (n=10)

Ainsi le taux de détoxification de la palourde *R. decussatus* pour les lots alimentés et le lot non alimenté est décrit selon une fonction exponentielle négative de premier ordre $y_1 = y_0 e^{-kt}$ qui correspond à un modèle simple pour lequel t (jours) : durée de détoxification ; y_0 ($\mu\text{g eq GYM kg}^{-1}$ GD) : concentration initiale de la toxine et k (jour^{-1}) : coefficient de détoxification.

Les résultats des expérimentations (analyses chimiques et test souris DSP) sont présentés dans le tableau III pour les différents lots testés.

Dans cette expérience les tests souris effectués au jour 8, 10, 12 et 15 pour les lots nourris n'ont été négatifs qu'au jour 15 avec des concentrations de 125, 138, 185 GYM kg^{-1} GD respectivement pour AA, AAT, AATB. En revanche, les tests souris effectués pour le lot non nourri ont été positifs aux jours 12, 17 et 27 avec des concentrations respectives de 568, 449 et 519 GYM kg^{-1} GD. Ce bioessai n'a été négatif qu'au jour 39 avec une concentration de 164 GYM kg^{-1} GD.

Dans cette expérience les coefficients de détoxification k respectifs des lots alimentés AA,

Tableau III : Récapitulatif des conditions expérimentales, équations exponentielles, analyses chimiques, bioessais.

1

Lot	Pré-stockage	Période de détoxification	Concentration initiale µg GYM kg ⁻¹ GD	Concentration finale µg GYM kg ⁻¹ GD	Test souris DSP	Equation
AA	Pas de stockage	17		125 (J15) 113(J17)	- -	Y=1297 exp(-0,14) R2=0,75
AAT	Stockage à température ambiante 15C°pendant 48 heures	15	3375	138	-	Y=1355 exp(-0,09) R2=0,70
AATB	Stockage à 8C°pendant 48 heures	15		185	-	Y=1202 exp(-0,07) R2=0,60
SA	Pas de stockage	39		449 (J17) 519 (J27) 164(J39)	+ + -	Y=1436 exp(-0,05) R2=0,74

AAT et AATB sont 0,14, 0,09 et 0,07 alors que le lot non alimenté présente un coefficient presque trois fois moins important (0,05) en comparaison du lot AA.

Les variations du pourcentage de GYM au niveau de la glande digestive et dans les autres tissus incluant le pied, les branchies et le siphon sont représentées dans la figure 3. Au début de la détoxification, le maximum de GYM est principalement situé dans la glande digestive avec 84 % de la toxicité totale de la chair alors que les autres tissus ne représentent que 16 % avec des proportions équivalentes entre le pied, les branchies et le siphon (Fig 3). Pendant toute la durée de la détoxification, le pourcentage de GYM au niveau de la glande digestive chute pour atteindre 60 % au bout de 17 jours alors que l'ensemble des autres tissus représente 40 % du contenu toxique total (Fig 3).

Indice de condition

Les courbes des indices de condition (IC) sont différentes entre les lots alimentés et le lot non alimenté (Fig 4). En effet, pour les lots alimentés, des fluctuations non significatives des valeurs des IC sont observées mais elles restent similaires aux valeurs initiales.

L'IC du lot non alimenté montre une légère diminution non significative de 7% à la fin de

l'expérience (jour 39). L'analyse statistique des IC ne montre une différence significative à P<0,05 entre les lots alimentés (AA, AAT, AATB) et le lot non alimenté (SA) qu'à partir du 16^{ème} jour.

DISCUSSION

Impact du pré-stockage et de l'ajout d'Isochrysis galbana sur les vitesses de détoxification

Différents procédés d'alimentation ont été testés dans le but d'accélérer l'élimination des toxines marines, de type DSP, des mollusques bivalves. Aucune tentative n'a été réalisée sur la détoxification de coquillages contaminés naturellement par la GYM. C'est dans ce cadre que s'inscrit ce travail. La méthode consiste à transférer, en conditions contrôlées, des palourdes contaminées naturellement dans le but de tester l'effet d'une alimentation avec une algue non toxique et les différentes méthodes de pré-stockages utilisés sur la cinétique de détoxification des palourdes. Dans cette étude, le choix de la température de détoxification (17°C) est basé sur le comportement physiologique des bivalves. En effet, à des températures basses (inférieure à 12°C), Shumway et Cembella (1993) ont observé un ralentissement général de la détoxification des mollusques. De même, Fleet (1978) et Shumway (1996) ont montré une influence significative de la

baisse de température sur les processus physiologiques des mollusques (arrêt de la filtration,

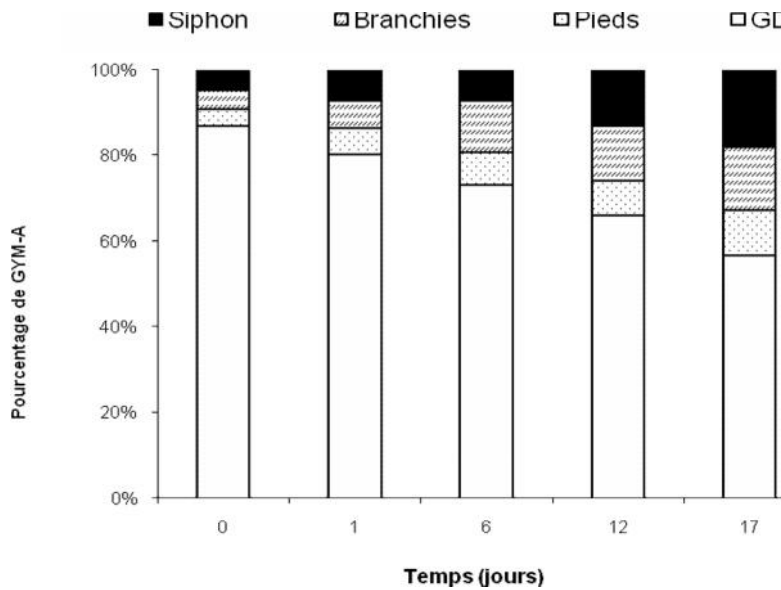


Figure 3. Distribution de la GYM (%) entre les différents organes de la palourde alimentée pendant la détoxification

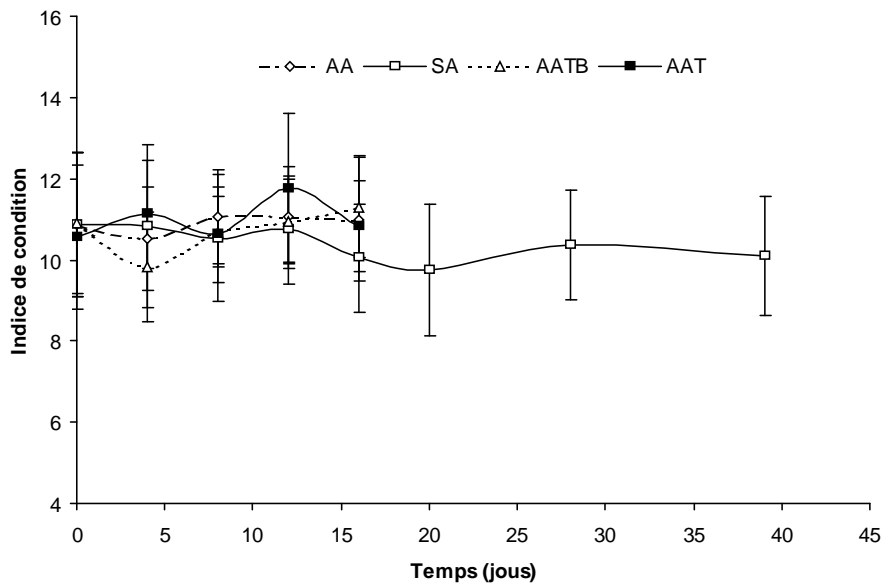


Figure 4. Variation de l'indice de condition des palourdes alimentées (AA, AAT, AATB) et des palourdes non alimentées (SA) pendant leurs détoxifications.

ponte provoquée), et par conséquent sur l'efficacité de l'élimination des micro-organismes et des composés toxiques. De même, dans les stations d'épuration de la palourde en Tunisie, la température utilisée avoisine 17°C.

Dans cette expérience, la cinétique de détoxification a été plus rapide chez les palourdes nourries avec T.Iso que chez les palourdes non alimentées. Ces résultats confirment les travaux de Medhioub et al. (2010) obtenus sur la détoxification des palourdes

contaminées par la gymnodimine, en circuit ouvert et fermé, au laboratoire. En effet, la disponibilité de l'aliment non toxique a été proposée par plusieurs auteurs comme le meilleur procédé pour accélérer la cinétique de détoxification dans la mesure où une nutrition active accélère à la fois le transit dans la glande digestive et le métabolisme global (Haamer et al., 1990; Sampayo et al., 1990; Marcaillou-Le Baut et al., 1993; Poletti et al., 1996; Blanco et al., 1999 ;). De même, Svensson (2003) a noté l'effet positif de la floraison printanière des micro-algues non toxiques sur la vitesse de détoxification de la moule en milieu naturel. Cependant, ce même auteur ne constate pas de différence entre les cinétiques de détoxification expérimentales des moules, nourries et non nourries, contaminées naturellement par l'acide okadaïque. Les études réalisées par Haamer et al. (1990) et Croci et al. (1994) ont montré que la détoxification des moules peut se produire même si aucune particule de nourriture n'est ajoutée au système. Toutefois, ces premiers auteurs ont signalé également une plus grande variabilité du contenu toxinique dans les moules qui n'ont pas reçu d'aliment.

Dans le cadre d'essais visant à déterminer la cinétique de détoxification des palourdes contaminées in-situ, dans des conditions contrôlées et sans apport alimentaire (Marrouchi et al., 2010), il a été démontré que la cinétique de détoxification des palourdes, dans des conditions d'absence de nourriture, est de 29 jours. Cette cinétique présente un aspect biphasique caractérisé par une première longue période de 12 jours pendant laquelle un abattement de 64% a été déterminé suivi d'une deuxième phase qui dure 17 jours et qui correspond à un abattement de 11%. Il faut néanmoins noter que le contenu initial en GYM de la glande digestive est inférieur à celui retrouvé dans cette présente étude.

Par ailleurs, les essais de détoxification menés sur des palourdes contaminées au laboratoire (avec des concentrations initiales en GYM-A égales à 1240 et 9500 $\mu\text{g GYM kg}^{-1}$ GD), ont permis d'obtenir au bout de 7 à 8 jours des animaux salubres avec des concentrations en GYM pouvant être réduites à 5% de la concentration initiale (Medhioub et al., 2010). Cette différence observée aux niveaux des périodes de détoxification ne peut pas être attribuée à la quantité initiale en GYM se trouvant dans la glande digestive. En effet, malgré le fait que les niveaux de contamination en GYM soient similaires entre palourdes contaminées au laboratoire et celles provenant de la lagune de Boughrara, les durées de détoxification passent du simple au double.

La présence endémique des cellules de *Karenia selliformis* dans la lagune de Boughrara est un facteur significatif pour favoriser la liaison de la GYM au niveau des organes accumulateurs et des tissus des palourdes, par conséquent la durée de détoxification sera plus longue. L'explication la plus probable de

cette longue durée notamment pendant les derniers jours de détoxification est attribuable à la fixation de cette toxine au niveau des tissus.

Répartition de gymnodimines aux niveaux des organes

Dans la présente étude, les périodes de détoxification sont de 15 et 39 jours respectivement pour les palourdes nourries, quelle que soit la méthode de pré-stockage adoptée, et les palourdes non nourries. Le taux de détoxification de la GD des lots nourris et non nourris a été rapide au cours du premier jour avec 74, 47, 78 et 70 % respectivement pour AA, SA, AAT et AATB. Par la suite ce taux subit un ralentissement et est associé à un taux de détoxification lent dans les autres tissus. Les cinétiques de détoxification observées ici pour la GD et les autres tissus incluant les branchies, les siphons et le pied sont similaires à celles décrites par Medhioub et al. (2010) pour la même espèce mais après contamination expérimentale.

Cet aspect biphasique (rapide puis lent) de la cinétique de détoxification constaté dans la présente étude a déjà été observé pour d'autres types de toxines algales chez différentes espèces de mollusques, comme les DSP pour la moule (Marcaillou-Lebaut et al., 1993 ; Fernandez et al., 1998; Blanco et al., 1999) et les PSP pour *Pecten maximus* (Lassus et al., 1989) et *Spisula solidissima* (Bricelj et Cembella 1995). Les toxines semblent être réparties entre ces deux compartiments (GD et autres tissus) comme cela était observé chez la moule (Marcaillou-Le Baut et al. 1993) et la coquille Saint-Jacques (Bauder et al., 1996) contaminées par des toxines DSP. Ces derniers auteurs ont constaté que la perte rapide en toxines au cours des 3 premiers jours de détoxification a coïncidé avec l'évacuation d'algues productrices de toxines à partir des viscères.

Par ailleurs, ce travail montre que la glande digestive accumule la quantité la plus importante en GYM (84 %). Les toxines restantes (16 %) ont été distribuées dans les autres tissus (siphons, pied, branchie). Cette accumulation différentielle entre les organes confirme les résultats obtenus par Medhioub et al. (2010) pour la même espèce, et aussi ceux trouvés pour les autres mollusques bivalves tels que la coquille Saint-Jacques *P. maximus* dont la glande digestive peut représenter de 94 à 99% de la charge totale en acide domoïque (Blanco et al., 2002), la moule *M. edulis* avec 93% dans la GD (Grimmelt et al., 1990), l'huitre *C. virginica* avec 70% dans la glande digestive (Roelke et al., 1993). Pour les DSP on retrouve 99% de la charge en toxines dans la glande digestive de *M. galloprovincialis* (Blanco et al., 2007). De même, Bricelj et al.(1990) et Cembella et al.(1993) ont conclu que les GD des bivalves accumulent la plus grande partie de la charge totale en toxines, en dépit

de la faible contribution de ces organes au poids corporel total.

De plus, les travaux de détoxification des huîtres contaminées par *A. ostenfeldii* (Medhioub et al 2012) ont permis de démontrer des résultats similaires de répartitions des spirolides entre la glande digestive et le reste des tissus avec des proportions respectives de 97% et 3%.

Ces résultats montrent bien la répartition disproportionnée des neurotoxines à action rapide entre la glande digestive et les autres tissus comme dans le cas des toxines DSP.

Test-souris

Différentes quantités d'extraits de palourdes ont été échantillonnées lors de la détoxification, puis injectées aux souris par voie i.p. afin de déterminer le potentiel toxique de la GYM. La correspondance de ces analyses chimiques avec les résultats du bioessai montre que les concentrations inférieures à 185 µg GYM kg⁻¹ GD permettent d'obtenir des test souris négatifs. La symptomatologie observée chez les souris auxquelles des extraits de palourdes toxiques ont été administrés par voie i.p est caractérisée par des réactions déjà décrites par Seki et al. (1996) et Munday et al. (2004) : étirement, agitation du corps, sursauts successifs immédiatement après injection, queue tendue, mouvements ralentis, paralysie des membres postérieurs, respiration difficile, exophtalmie. Ces symptômes sont tous de type neurologiques (Hu et al., 1996; Cembella et al., 2000; Takada et al. 2001).

En effet, une des caractéristiques de la GYM et de ses analogues, comme d'autres imine cyclique, réside dans la mortalité rapide des souris injectées par voie i.p (Miles et al., 2000), ce qui a conduit à leur attribuer l'appellation « toxines à action rapide » ou "fast-acting toxins, FAT" (Munday et al., 2004). Ces mêmes auteurs précisent que la mortalité survient en moins d'une minute à des doses létales et qu'aucune mortalité n'est enregistrée après 10-11min. De même, Medhioub et al. (2010) notent, lors de l'injection à des souris de la GYM extraite à partir des cellules de *Karenia selliformis*, soit une mortalité au bout de 3 à 7 minutes, soit réapparition d'un état normal après 20 minutes.

CONCLUSION

La détoxification contrôlée, en circuit ouvert, appliquée à la palourde contaminée naturellement par la gymnodimine, est une des solutions pratiques à envisager pour la gestion de la pêche des palourdes afin d'assurer un approvisionnement continu du marché.

C'est dans ce contexte que l'étude décrite précédemment a été réalisée. Pour ce faire, les travaux ont porté sur la détoxification à plus grande

échelle de palourdes contaminées in-situ provenant de la lagune de Boughrara.

Les résultats obtenus ont montré que la détoxification expérimentale des palourdes s'accélère en présence d'algues non toxiques. Dans ces conditions, les concentrations finales en GYM sont réduites et tombent à environ 5 à 10 % de la concentration initiale. La durée de détoxification est de 15 jours. Par contre, la méthode de pré-stockage ne semble pas induire la durée de détoxification. Cette étude révèle également que le test souris est négatif dès lors que la concentration en gymnodimine dans la glande digestive devient inférieure à 185 µg kg⁻¹.

Ces connaissances nous permettront de concevoir le principe d'une unité pilote de détoxification de la palourde après quelques travaux supplémentaires, nécessaires à l'optimisation des conditions de détoxification. Il est nécessaire, par exemple, i) d'optimiser les concentrations minimales de micro-algues 'fourrage' à ajouter pour réduire significativement le temps de détoxification par rapport à des palourdes non alimentées et, ii) d'étudier le devenir des cellules de *K. selliformis* et de la toxine dissoute dans l'eau de mer circulant dans le circuit de détoxification. Par ailleurs, d'autres expériences sont nécessaires pour caractériser la qualité nutritionnelle des coquillages après détoxification, en particulier la composition en lipides, protéines, glucides et les qualités organoleptiques des animaux produits.

BIBLIOGRAPHIE

- Anonyme. 2000. Etude de l'amélioration de la qualité de l'eau de la lagune de Bougrara. Rapport Ministère de l'Agriculture. SCET - Tunisie. Eco-Ressources International, 180 p.
- Ayari, M., Allegue, M., Tlili, I., 2008. Etude pour la construction d'un ouvrage de communication au niveau de la chaussée romaine entre la lagune de Boughrara et la mer méditerranée. Xèmes Journées Nationales Génie Côtier – Génie Civil, 14-16 octobre 2008, Sophia Antipolis. 666 p.
- Bauder, A. G., Cembella, A.D., Quilliam, M.A., 1996. Dynamics of Diarrhetic Shellfish Toxins from the dinoflagellate *Prorocentrum lima*, in the bay scallop, *Argopecten irradians*. In: Yasumoto, T., Oshima, Y. Eds, Harmful and Toxic Algal Blooms, Elsevier, Amsterdam. 433-436.
- Bauder, A. G., Cembella, A.D., Quilliam, M.A., 1996. Dynamics of Diarrhetic Shellfish Toxins from the dinoflagellate *Prorocentrum lima*, in the bay scallop, *Argopecten irradians*. In: Yasumoto, T., Oshima, Y. Eds, Harmful and Toxic Algal Blooms, Elsevier, Amsterdam. 433-436.

- Benrejeb-Jenhani, A. et Romdhane, M.S., 2002. Impact des perturbations anthropiques sur l'évolution du phytoplancton de la lagune de Boughrara, (Tunisie). Bull. Inst. Natn. Scien. Tech. Mer de Salammbô. 29, 65-75.
- Biré, R., Krys, S., Fremy, J.M., Dragacci, S., Stirling, D., Kharrat, R., 2002. First evidence on occurrence of GYM in clams from Tunisia. Journal natural toxins 11, 269-275.
- Bjork, M. & Gilek, M., 1997. Bioaccumulation kinetics of PCB 31, 49 and 153 in the blue mussel, *Mytilus edulis* L. as a function of algal food concentration. Aquat. Toxicol. 38, 101-123.
- Blanco, J., Acosta, C.P., Bermudez de la Puente, M., Salgado, C., 2002. Depuration and anatomical distribution of the amnesic shellfish poisoning (ASP) toxin domoic acid in the king scallop *Pecten maximus*. Aquat. Toxicol. 60, 111-121.
- Blanco, J., Fernandez, M.J., Miguez, A., Morono, A., 1999. Okadaic acid depuration in the mussel *Mytilus galloprovincialis*: one and two-compartment models and the effect of environmental conditions. Mar. Ecol., Prog. Ser. 176, 153-359.
- Blanco, J., Marino, C., Martin, M., Acosta, C.P., 2007. Anatomical distribution of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Toxicon.50, 1011-1018.
- Blogoslawski, W., Stewart, M., Hurst, J.J., Kern, F.R., 1979. Ozone detoxification of paralytic shellfish poison in the softshell clam (*Mya arenaria*). Toxicon. 17 (6), 650-654.
- Bricelj, V.M. & Cembella, A.D., 1995. Fate of gonyautoxins in surf-clams, *Spisula solidissima*, grazing upon toxicogenic *Alexandrium*. In: Lassus P, Arzul G, Erard E, Gentien P, Marcaillou C eds. Harmful marine algal blooms. Lavoisier, Intercept Ltd, Paris, 413-418.
- Bricelj, V.M., Lee, J.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. Progr. Ser. 63, 177-188.
- Cembella, A. D., Lewis, N. I., Quilliam, M., 2000b. The marine dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) as the causative organism of spirolide shellfish toxins. Phycologia. 39, 67-74.
- Cembella, A.D., Shumway, S.E., Lewis, N.I., 1993. Anatomical distribution and spatio-temporal variation in paralytic shellfish toxin composition in two bivalve species from the Gulf of Maine. J. Shellfish. Res. 12 (2), 389-403.
- Chen, C. Y. & Chou, H.N., 2001. Accumulation and depuration of paralytic shellfish poisoning toxins by purple clam *Hiatula rostrata* Lightfoot. Toxicon 39, 1029-1034.
- Croci, L., Toti, L., De Medici, D., Cozzi, L., 1994. Diarrhetic shellfish poisoning in mussels: comparison of methods of detection and determination of the effectiveness of depuration. Int. J. Food Microbiol. 24, 337-342.
- Dammak-Zouari, H., Hamza, A., Bouain, A., 2009. Gymnodiniales in the Gulf of Gabes (Tunisia). Cahiers de Biologie Marine. 50, 153-170.
- Duinker, A., Bergslien, M., Strand, O., Olseng, C.D., Svoldal, A., 2007. The effect of size and age on depuration rates of diarrhetic shellfish toxins (DST) in mussels (*Mytilus edulis* L.). Harmful Algae. 6, 288-300.
- Fernandez, M.L., Miguez, A., Morono, A., Cacho, E., Martinez, A., Blanco, J., 1998. Detoxification of low polarity toxins (DTX-3) from mussels *Mytilus galloprovincialis* in Spain. In: Reguera, B., Blanco, J., Fernandez, M.L., Wyatt, T. (Eds.), Harmful Algae. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. 449- 452.
- Fiki W., Hamza A., Bel Hassen M. & Rebai A., 2008. Les efflorescences phytoplanctoniques dans le golfe de gabes (Tunisie) au cours de dix ans de surveillance (1995-2005). Bulletin de l'Institut National des Sciences et Technologies de la Mer. 35, 105-116.
- Fleet, G. H., 1978. Oyster depuration - a review. Food Technology in Australia. 30, 444-454.
- Grimmelt, B., Nijjar, M.S., Brown, J., Macnair, N., Wagner, S., Johnson, G.R., Amend, J.F, 1990. Relationship between domoic acid levels in the blue mussel (*Mytilus edulis*) and toxicity in mice. Toxicon. 28, 501-508.
- Haamer, J., Andersson, P.O., Lange, S., Li,X,P., Edebo, L., 1990. Effects of transplantation and reimmersion of mussels *Mytilus edulis* L. on their contents of okadaic acid. J. Shellfish Res. 9 (1), 109-112.
- Hamza A. & EL Abed, A., 1994. Les eaux colorées dans le golfe de Gabès : Bilan de six ans de surveillance (1989-1994). Bulletin Institut National Sciences Technologies Mer 21, 66-72.
- Hansen, G., Erard-Le Denn, E., Daugbjerg, N., Rodriguez, F., 2004. *Karenia selliformis* responsible for the fish-kills in the Gulf of Gabes, Tunisia 1994. Communication Ifremer: Poster présenté à la Conférence Internationale sur le phytoplancton toxique.
- Hu, T., deFreitas, A. S., Curtis, J. M., Oshima, Y., Walter, J. A., Wright, J. L., 1996. Isolation and structure of prorocentrolide B, a fast-acting

- toxin from *Prorocentrum maculosum*. *J. Nat. Prod.* 59, 1010-1014.
- Idriss Ben Naila, Asma Hamza , Radhouane Gdoura , Jorge Dioge`ne , Pablo de la Iglesia 2012 Prevalence and persistence of gymnodimines in clams from the Gulf of Gabes (Tunisia) studied by mouse bioassay and LC–MS/MS *Harmful Algae* 18 .56–64.
- Lassus, P., Fremy, J.M., Ledoux, M., Bardouil, M., Bohec, M., 1989. Patterns of experimental contamination by *Protogonyaulax tamarensis* in some French commercial shellfish. *Toxicon*. 12, 1313-1321.
- Madenwald, N.D., 1985. Effetc of water temperature on the loss of paralytic shellfish poison from the butter clam, *Saxidomus giganteus*. In: Anderson D.M., White A.W., Baden D.G. (eds) *Toxic Dinoflagellates*. Elsevier- North Holland. New york. 479-484.
- Marcaillou-Le Baut, C., Bardin, B., Bardouil, M., Bohec, M., Le Dean, L., Masselin, P., Truquet, P., 1993. DSP depuration rates mussels reared in a laboratory and an aquaculture pond. In: Smayda TJ, Shimizu Y (eds), *toxic phytoplankton blooms at the sea*. Elsevier, Amsterdam, p 531-535.
- Miles, C. O., Wilkins, A. L., Stirling, D. J., MacKenzie, A. L., 2000a. New analogue of gymnodimine from a *Gymnodinium* species. *J. Agric. Food. Chem.* 48, 1373-1376.
- Munday, R., Towers, N.R., MacKenzie, L., Rhodes, L., Beuzenberg, V., Holland, P.T., Miles, C.O., 2004. Acute toxicity of gymnodimine in mice. *Toxicon*. 44, 173–178.
- Munday, R., Towers, N.R., MacKenzie, L., Rhodes, L., Beuzenberg, V., Holland, P.T., Miles, C.O., 2004. Acute toxicity of gymnodimine in mice. *Toxicon*. 44, 173–178.
- Novaczek, I., Madhyastha, M.S., Ablett, R.F., Donald, A., Johnson, G., Nijjar, M.S., Sims, D.E., 1992. Depuration of domoic acid from live blue mussels (*Mytilus edulis*). *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 49,312-318.
- Poletti, R., Viviani, R., Cassadei, C., Lucentini, L., Funari, E., draisci, R., 1996. depuration dynamics of mussels naturally contaminated with diarrhetic toxins relocated to a basin of the Adriatic sea In : Yasumuto, T., Oshima, Y., Fukuyo, Y Eds *Harmful and Toxic Algal Blooms*. Intergovenmental Oceanographic Commision of UNESCO. 429-432.
- Quilliam, M.A., Philipp H., Carmela, D.A., 2001. Recent development in the analysis of phycotoxins by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of AOAC International* 84, 1615-1615.
- Roelke, D.L., Fryxell,G.A.,Cifuentes,L.A.,1993. Effectsontheoyster *Crassostrea virginica* caused by exposure to the toxic diatom *Nitzschia pungens* f. *multiseriis*. *J. Shellfish Res.*12. 143 p.
- Sampayo, M.A., Alvito, P., Franca, S., Sousa, I., 1990. *Dinophysis* spp, toxicity and relation to accompanying species. In: Granéli, E., Sundstrom, B., Edler, L., Anderson, D.M.M Eds, *Toxic Marine Phytoplankton*. Elseiver, New York. 215-220.
- Seki, T., Satake, M., MacKenzie, A. L., Kaspar, H. F. & Yasumoto, T., 1996. Gymnodimine, a novel toxic imine isolated from the Foveaux Strait oysters and *Gymnodinium* sp. In *Harmful and Toxic Algal Blooms*. Edited by T. Yasumoto, Y. Oshima & Y. Fukuyo. Paris: Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. 495-498.
- Shumway, S. E., 1996. Natural Environmental Factors. In: V. S. Kennedy, R. I. E. Newell and A. F. Elbe (eds). *The Eastern Oyster Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant College, College Park, Maryland. 467-513.
- Shumway, S.E. & Cembella, A.D., 1993. The impact of toxic algae on scallop culture and fisheries. *Reviews in Fisheries Science*. 1, 121-150.
- Stirling, D. & Kharrat, R., 2002. First Evidence on Occurrence of Gymnodimine in Clams from Tunis. *J. Nat. Tox*, 11(4), 269-275.
- Svensson, S., 2003. Depuration of Okadaic acid (Diarrhetic Shellfish Toxin) in mussels, *Mytilus edulis* (Linnaeus), feeding on different quantities of nontoxic algae. *Aquaculture*. 218, 277-291.
- Takada., J, Umemura, N., Suenaga, K., Chou, T., Nagatsu, A., Haino, T., Yamada, K., Uemura, D., 2001a. Pinnatoxins B and C, the most toxic components in the pinnatoxin series from the Okinawan bivalve *Pinna muricata*. *Tetrahedron Letters*, 42, 3491-3494.
- Medhioub, W., Guéguen, M., Lassus, P., Bardouil, M., Truquet, P., Sibat, M., Medhioub, N., Soudant P., Kraiem, M., Amzil, Z., 2010. Detoxification enhancement in the gymnodimine contaminated grooved carpet shell, *Ruditapes decussatus* (Linné). *Harmful Algae*. 9, 200-207.
- Medhioub, W., Lassus, P., Philippe, T., Bardouil, M., Amzil, Z., Vechet, S., Sibat, M., Soudant, S., 2012. Spirolide uptake and detoxification by *Crassostrea gigas* exposed to the toxic dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* *Aquaculture* 358–359.108-115.

Wohlgeschaffen, G.D., Mann, K.H., Subba Rao, D.V., Pocklington, R., 1992. Dynamics of the phycotoxin domoic acid: accumulation and excretion in two commercially important bivalves. *J. Appl. Phycol.* 4, 297-310.

Yasumoto, T., Oshima, Y., Yamaguchi, M., 1978. Occurance of a new type shellfish poisoning in the tohoku district. *Bull. jpn. Soc. Fish.* 44(11), 1249-1255.