

Diminution de la phycotoxine paralysante PSP dans la coque rouge « *Acanthocardia Tuberculatum* » issue de la zone littorale méditerranéenne marocaine ouest selon les étapes de détoxification (Décision européenne : 96/77/CE)

[Decrease in Paralytic Shellfish Poisoning in Red Shells «*Acanthocardia Tuberculatum*» Taken from the western Moroccan Mediterranean coast According to Detoxification Stages (European Decision: 96/77/EC)]

Dalila Ghallab¹, Hassan Bouzidi², Najat Oualit², Mohammed Marhraoui³, 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

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: All shells can be contaminated with paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins, but at variable levels depending on the area and type of shells. The highest rate of PSP toxins registered so far is 1000 µg saxitoxin (SAX) per 100 g of flesh. Bivalves are filter feeding mollusks that accumulate phycotoxins in their tissues at variable rates depending on the species and physiological condition. *Acanthocardia tuberculatum* is a bivalve mollusk that is experiencing persistent contamination by paralyzing toxins on the Mediterranean coasts of Morocco. A reliable thermal detoxification treatment of this bivalve (Directive 96/77/EC) permits the harvest of *Acanthocardia tuberculata* with PSP levels higher than 80 µg SAX/100g of flesh but less than 300 µg SAX/100 g of flesh. The purpose of this paper is to try to find the limit of treatment in the presence of higher PSP toxin threshold rates.

Even with very high levels of paralyzing bio-toxins in red shells (787µg SAX/100g of flesh), this detoxification treatment gave satisfying results with no PSP toxins detectable in the final stage of the treatment after analyzing through mouse bioassay. The cooking step of the thermal detoxification treatment registers a rate of maximal reduction that can reach up to 44.4 %.

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

RESUME: Tous les coquillages peuvent être contaminés par les toxines PSP, mais de façon variable selon les zones et les types de coquillages. Le taux maximum de toxines PSP enregistré jusqu'à présent est de 1 000 µg d'équivalent-saxitoxine par 100 g de chair.

Les bivalves sont des mollusques filtreurs qui accumulent des phycotoxines dans leurs tissus à des taux variable selon les espèces et leur état physiologique, (*Acanthocardia tuberculatum*) est un mollusque bivalve qui connaît une persistance de la contamination par la toxine paralysante dans les côtes méditerranéennes du Maroc et puisqu'il existe un traitement thermique fiable de détoxification de ce bivalve (Directive 96/77/CE) (taux de toxines autorisé : supérieur à 80 µg SAX/100g

de chair mais inférieur à 300 µg SAX/100g de chair) Le but de cette revue est d'essayer de trouver la limite de traitement en présence des taux supérieur au seuil.

Il en ressort que même en présence des taux très élevées de biotoxines paralysantes dans les coques rouges (787 µg SAX/100g de chair) ces dernier sont non décelable dans la dernière étape de traitement analysé par la méthode biologique sur souris.

Nous avons constaté que l'étape de cuisson est celle qui connait un taux d'abattement le plus grande qui peut atteindre jusqu'au 44,4%.

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

1 INTRODUCTION

Les mollusques bivalves constituent une excellente source de protéines. Ils sont riches en minéraux essentiels et pauvres en calories, en gras et en cholestérol. Les mollusques bivalves, dont la coquille est articulée en deux parties, comprennent les huîtres, les palourdes, les pétoncles, les moules et les coques.

Les mollusques bivalves jouent un rôle clé dans de nombreux écosystèmes côtiers, en raison de leur forte capacité de filtration et de la densité des élevages [1] [2]. Consommateurs primaires, peu mobiles, sont capables de concentrer de larges volumes d'eau par unité de temps, et sont relativement insensibles vis-à-vis des phycotoxines [3]. Ce sont de bons vecteurs de transmission des toxines aux autres maillons de la chaîne alimentaire, dont l'homme) [4] [5] . Par mesure de précaution, des seuils sanitaires spécifiques à chaque toxine ont été mis en place (directive européenne 91/492/CEE) [6]. Lorsque ces seuils sont atteints ou dépassés dans la chair des mollusques, les zones conchylicoles sont fermées avec l'interdiction de la vente des mollusques. Ceci peut entraîner des pertes économiques et une méfiance du consommateur vis-à-vis des producteurs et de la grande distribution [3] [7] [8]. Ainsi en Nouvelle Angleterre, en 2005, des fermetures de zones conchylicoles ont entraîné un préjudice financier chiffré à 23 millions de dollars [9].

Les phycotoxines marines sont des métabolites produits en général par des espèces de dinoflagellés toxigènes, représentant moins de 1% du phytoplancton. Au moment de prolifération de ces micro-organismes, les bivalves filtreurs accumulent dans leurs tissus des toxines et deviennent eux même toxiques.

Quatre types de syndromes d'intoxications ont été décrits. Il s'agit de l'intoxication paralytique (dite PSP : Paralytic Shellfish Poisoning), de l'intoxication diarrhéique (DSP : Diarrhéic Shellfish Poisoning), de l'intoxication neurologique (NSP : Neurotoxic Shellfish Poisoning), et de l'intoxication amnésique (ASP : Amnesic Shellfish Poisoning).

Les phycotoxines paralysantes sont produites par des dinoflagellés nageurs du genre *Alexandrium* (ex-*Protogonyaulax*, ex-*Gonyaulax*) et par *Gymnodinium catenatum* et *Pyrodinium bahamens var. compressa*, deux espèces de morphologie et de physiologie relativement proches du genre *Alexandrium* [10] [11] [12]. Au Maroc, l'étude phytoplanctonique des eaux de récoltes des coquillages responsables de l'intoxication paralytique de 1994, incrimine l'espèce *Gymnodium Catenatum* Graham.

Les phycotoxines impliquées dans les intoxications paralytiques par les fruits de mer sont des endotoxines. Ce sont des dérivés des tetrahydropurines ; les formes les plus rencontrées à des concentrations élevées sont les saxitoxines (STX), les gonyautoxines-II (GTX - II) et les gonyautoxines-III (GTX-III). Chacune de ces toxines, à une toxicité spécifique qui la différencie des autres molécules, cette toxicité est exprimée en équivalent saxitoxine.

La STX a un poids moléculaire de 299.30 ; elle est thermostable à un pH acide, cependant, elle est instable et facilement oxydée dans une solution alcaline. On outre, la STX est très soluble dans l'eau et dans le méthanol, peu soluble dans l'éthanol et l'acide acétique et pratiquement insoluble dans les solvants lipidiques. Son chauffage pendant 3 à 4 heures, à pH 3, réduit sa toxicité [13].

Les autres phycotoxines paralysantes, nommées néosaxitoxines (néoSTX) et gonyautoxines (GTXs), sont des dérivés de la STX par combinaison de substitutions de radicaux hydrolyse du bras carbamoyl [14]. Ces toxines sont polaires, hydrosoluble, et chargées de -1 à +2.

L'activité de la pêche du coquillage dans la zone littoral méditerranéennes marocaine a un rôle socio-économique très important offrant environ 200 postes de travail par jour pour les pêcheurs et plus de poste au sein des industries, l'une des espèces pêchées est la coque rouge (*Acanthocardia tuberculatum*), mais cela est influencé par les interdictions successifs de la pêche car (*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 ses tissus même lorsque les micro-algues produisant potentiellement la toxine ne sont pas présentes, cela est en relation avec la faible détoxification des tissus non viscérales des coques (tel que le pied, branchies et manteau) qui contient le double de la quantité présente dans la glande digestive [1 5] [16] de la rétention sélective de la saxitoxine et aussi de la présence de la PSPBP (protéine fixatrice des toxines Paralysantes), protéine thermosensible estimée être homodimérique de poids moléculaire 181kDa, qui présente une activité optimale à pH 7 et une température de 30°C capable de fixer et retenir les toxines paralysantes empêchant ainsi la détoxification de la coque de se faire [17].

Puisqu'il existe un traitement thermique fiable de détoxification de ce bivalve (Directive 96/77/CE) [18] (taux de toxines autorisé : supérieur à 80 µg STX/100g de chair mais inférieur à 300 µg STX/100g de chair) traitement utiliser dans la société DINAY spécialisé dans la transformation des bivalves en conserve, le but de cette revue est d'essayer de trouver la limite de traitement en présence des taux supérieur au seuil.

La perte économique engendrée par la fermeture des zones est inquiétante pour les professionnels. Il est donc important de pouvoir trouver des solutions afin de limiter les périodes d'arrêt de vente.

2 MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 SITES D'ÉCHANTILLONNAGE

Les échantillons de coques rouge (Acanthocardia Tuberculatum) contaminées sont issu du site géographique de la côte méditerranéenne marocaine ouest (Oued Laou - Kaâ Srass) Les coordonnées géographiques sont comme suit :

- Oued laou : 35°25'40 N- 5°05'10 W
- Kaä Srass : 35°25'00 N - 5°04'00 W

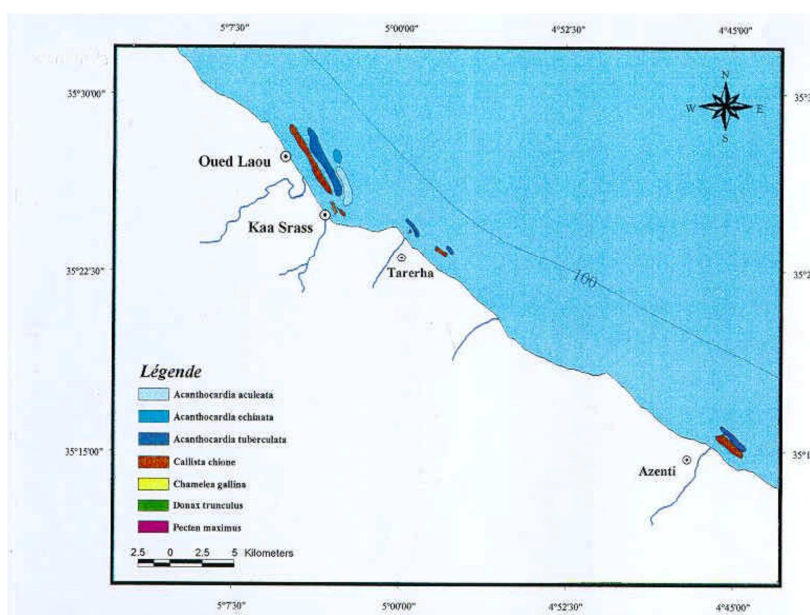


Fig. 1. Carte de la zone de production des coques à Oued Laou – Kaâ Srass

2.1.1 CARACTÉRISTIQUES CLIMATIQUES

Climat méditerranéen à caractère humide (saison humide et fraîche- saison sèche)

- Précipitation : alternance (interannuelle) sans périodicité régulière.
- T° variable suivant les saisons
- Le vent : souffle durant toute l'année (vent de l'est [cherqui] -l'été- et vent de l'ouest [gharbi]-l'hiver-)
- Nombre d'heure d'ensoleillement effectif est de 2780h/an
- Humidité relative est égale à environ 73,2 %

2.1.2 CARACTÈRES HYDROLOGIQUES

- Marée : faible amplitude diminue de l'ouest vers l'est.
- La houle : les plus fréquents sont ouest nord-ouest (WNW)
- Hydrologie : T° de surface = 19,9-21,2°C
Ecart de T° entre surface et fond ≈ 0,8°C
Salinité de 36 à 37 ‰
- Hydrographie : Oued Laou diverse un écoulement fin automne (fin novembre) et début hiver (janvier) avec crue passagère et brutal au printemps (mars, avril).

2.1.3 SOURCE DE POLLUTION

- pollution domestique : rejet d'eau résiduaire de Oued Laou dans la méditerranée sans traitement préalable.
- Pollution industrielle : industrie chimique, para chimique, mécanique, métallurgique, électrique, électronique et industrie agro-alimentaire.

2.1.4 CRITÈRE DE CHOIX DU SITE D'ÉTUDE

Pour le choix du site on s'est basé sur plusieurs critères parmi lesquels :

- la présence permanente des toxines paralysantes au niveau des coques rouges
- le site est facilement accessible
- la présence des gisements naturels de coquillages très productifs et exploitables : coques rouges (*Acanthocardia tuberculatum*)

2.2 ESPÈCE ÉTUDIÉE

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 [19].

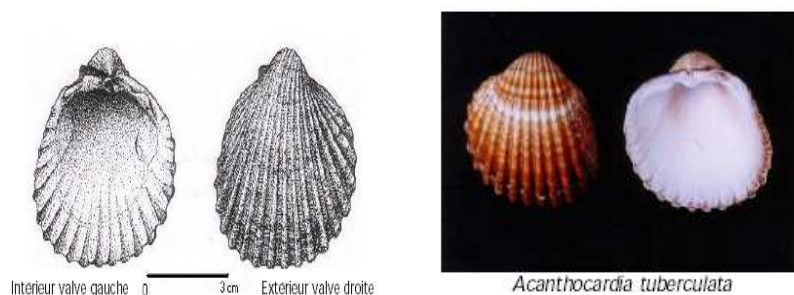


Fig. 2. la coque rouge (*Acanthocardia tuberculatum*) (Linnaeus, 1758) [15].

2.3 PROCÉDURE D'ANALYSE

Les échantillons de coque rouge sont récoltés pendant des périodes qui connaissent une augmentation du taux de toxines paralysantes supérieurs à 300 µg STX/100g de chair, après détermination du taux de toxines paralysantes ces échantillons subissent les étapes de détoxification au sein de la société DINAY selon la directive (96/77/CE) et pour chaque étape un échantillon est prélevé pour analyse de toxicité par dosage biologique sur souris, donc on aura sept étapes pour chaque échantillon réparties comme suit :

- 1- Lot initial : l'échantillon récolté sans aucun traitement.
- 2- Prélavage : après le lavage à l'eau douce pendant au moins 2 min à une $T^{\circ} = 20 \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- 3- Pré-cuisson : après une pré-cuisson dans l'eau douce pendant au moins 3 min à une $T^{\circ} = 95 \pm 5^{\circ}\text{C}$.
- 4- Lavage : après la séparation des chairs et des coquilles et un lavage à l'eau douce courante pendant au moins 30 seconds à une $T^{\circ} = 20 \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- 5- Cuisson : après une cuisson dans l'eau douce pendant au moins 9 min à une $T^{\circ} = 98 \pm 3^{\circ}\text{C}$.
- 6- Séparation parties non comestible : après le refroidissent dans l'eau froide et séparation des parties comestibles (pied) des parties non comestibles (branchies, viscères et manteau) mécaniquement avec l'eau sous pression.
- 7- Stérilisation : après sertissage et stérilisation en autoclave à une T° minimale de 116°C pendant un temps calculé selon les dimensions du récipient non inférieur à 51 min. (Décision européenne : 96/77/CE).

Les analyses de toxicité ont été réalisées par dosage biologique sur souris selon la méthode AOAC (1990) [20]. Ce test consiste à mélanger 100 g de tissus homogénéisés avec 100 ml HCl 0,1 M. On ajuste à pH 2-3, on fait bouillir pendant 5 min et centrifugé pendant 15 min à 3000 tr / min. on ajuste à 200 ml par l'eau distillée, on ajuste à pH 2-3, Un millilitre du surnageant est injecté par voie intra péritonéale à trois souris albinos de $20 \pm 2\text{g}$. Le temps de survie est mesuré avec précision et correspond au temps écoulé entre la fin de l'injection et la mort de la souris. Les symptômes présentés par les souris, caractéristiques des toxines paralysantes, sont des sauts, des convulsions suivis de la mort par arrêt respiratoire.

Le temps de survie est ensuite exprimé en Unités-Souris (US) à l'aide d'une table. Une US est définie comme la quantité de phycotoxine qui, injectée par voie intra péritonéale, tue une souris de $20 (\pm 1)\text{g}$ en 15 minutes. Les US sont convertis en µg équivalent-STX à l'aide d'un Facteur de Conversion (FC) mesuré lors de l'étape préliminaire de standardisation du test. Ce test sur souris est quantitatif pour les temps de survie compris entre 5 et 7 minutes. C'est pourquoi, il est parfois indispensable d'effectuer plusieurs dilutions de l'extrait pour obtenir ces temps de survie.



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

3 RÉSULTATS

Les résultats de notre étude s'étalent sur une durée de quatre ans (de 2006 à 2009). L'ensemble des résultats obtenus est regroupé dans le tableau suivant :

Tableau 1. Résultats d'analyses de PSP ($\mu\text{g STX}/100\text{g de chair}$)

Rubrique 1	lot initial	Pré-lavage	Pré-cuisson	lavage	cuisson	séparation	stérilisation
28/07/2006	712	633	425	418	263	134	0
01/08/2006	494	338	197	143	141	136	0
02/11/2006	732	547	264	137	114	68	0
08/11/2006	787	661	460	268	128	68	0
28/11/2006	410	366	277	148	67	45	0
05/12/2006	370	174	167	135	77	49	0
11/09/2007	626	436	274	139	119	59	0
13/09/2007	609	459	312	189	136	63	0
17/09/2007	597	453	321	178	127	54	0
18/09/2007	517	410	259	175	127	56	0
11/10/2007	480	442	274	209	106	65	0
22/10/2007	331	286	274	159	109	103	0
23/10/2007	524	397	268	125	68	59	0
25/10/2007	358	351	298	65	58	46	0
18/11/2007	479	381	252	194	129	61	0
23/11/2007	553	463	338	182	132	62	0
29/11/2007	556	521	335	214	119	55	0
01/12/2007	736	503	308	134	122	73	0
05/12/2007	571	529	304	137	71	64	0
09/12/2007	595	492	259	205	119	55	0
11/12/2007	648	449	244	134	110	68	0
08/01/2008	449	385	234	127	110	65	0
13/01/2008	536	476	264	129	110	57	0
19/01/2008	626	440	259	134	118	62	0
21/01/2008	696	508	340	229	128	63	0
30/10/2008	463	410	207	165	117	57	0
30/10/2008	402	346	198	163	70	56	0
15/01/2009	720	536	348	257	128	67	0
01/06/2009	521	427	272	138	114	58	0
03/08/2009	385	344	268	225	109	57	0
07/10/2009	504	385	268	135	114	58	0
09/10/2009	576	487	342	264	139	45	0
15/10/2009	418	331	172	178	122	56	0
30/10/2009	508	476	342	257	134	68	0
18/12/2009	601	518	381	328	124	55	0
Moy	545	439	286	183	117	65	0
ET	118	95	64	67	34	20	0
max	787	661	460	418	263	136	0
min	331	174	167	65	58	45	0

Les résultats obtenus montrent que le taux des toxines paralysantes diminue après chaque étape de détoxification jusqu'à être non décelable après l'étape de stérilisation avec une accentuation du taux de détoxification pendant l'étape de cuisson qui a un taux d'abattement le plus grande qui peut atteindre jusqu'au 44,4%.

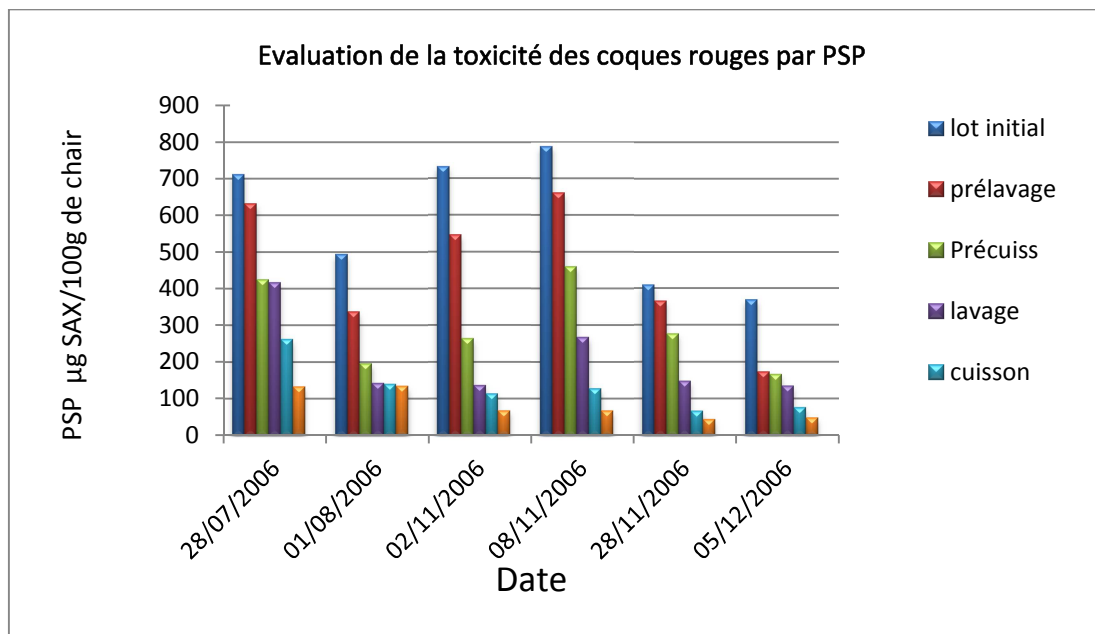


Fig. 4. Analyse Evaluation de la toxicité des coques rouges par PSP suivant les étapes de détoxification Année 2006

On constate que le taux de toxine diminue suivant les étapes de la détoxification avec une accentuation pendant l'étape de cuisson, cette constatation est vraie pour tous les graphes suivants.

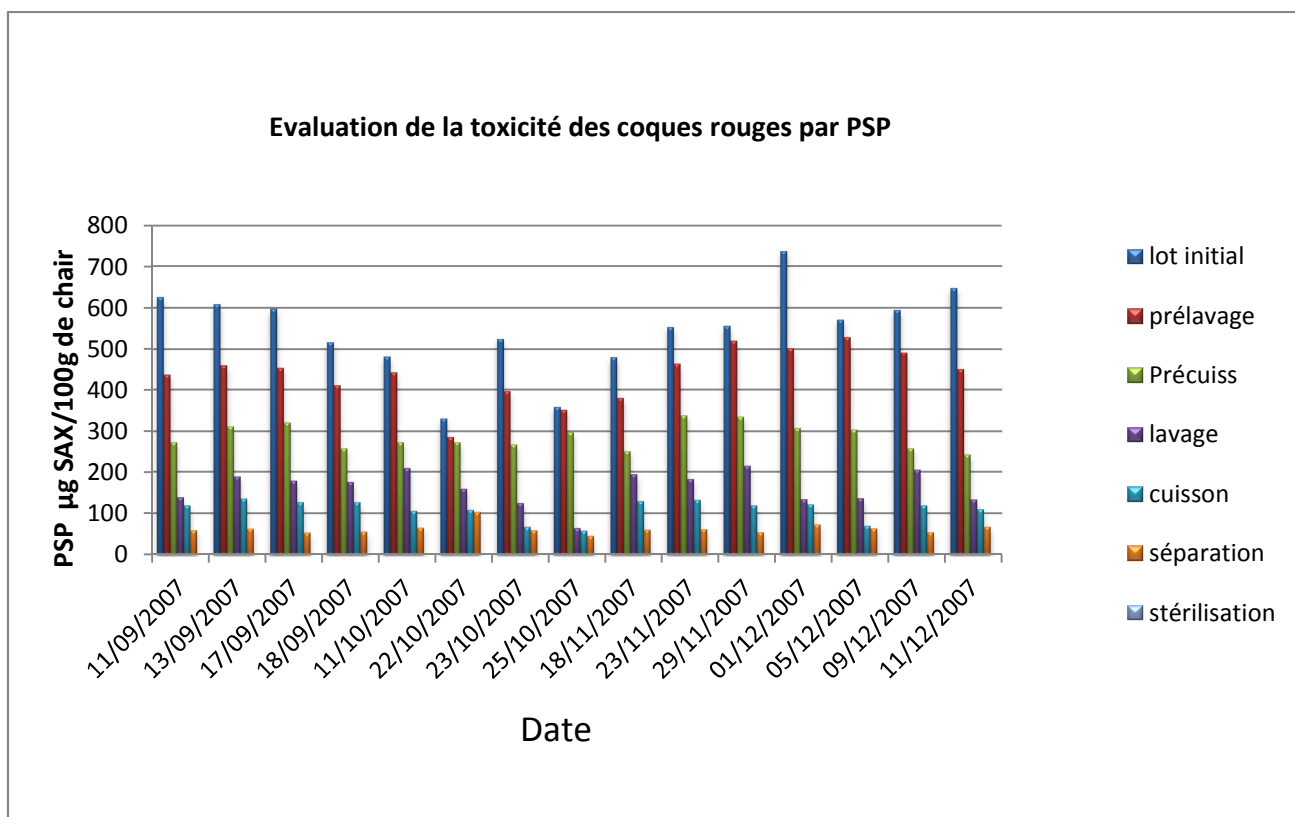


Fig. 5. Analyse Evaluation de la toxicité des coques rouges par PSP suivant les étapes de détoxification Année 2007

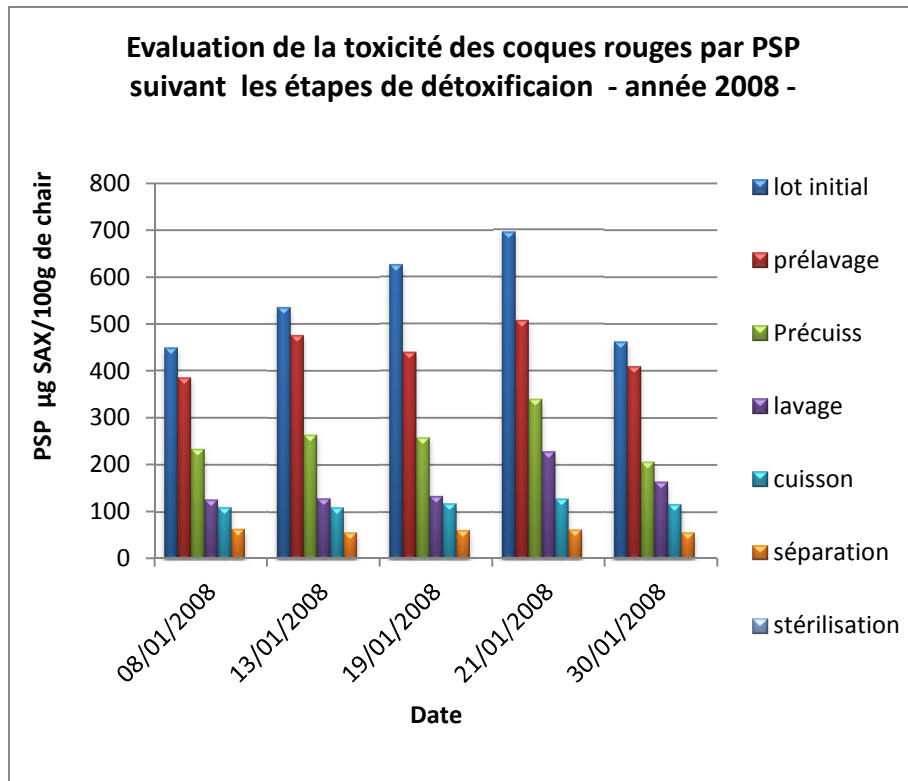


Fig. 6. Analyse Evaluation de la toxicité des coques rouges par PSP suivant les étapes de détoxification Année 2008

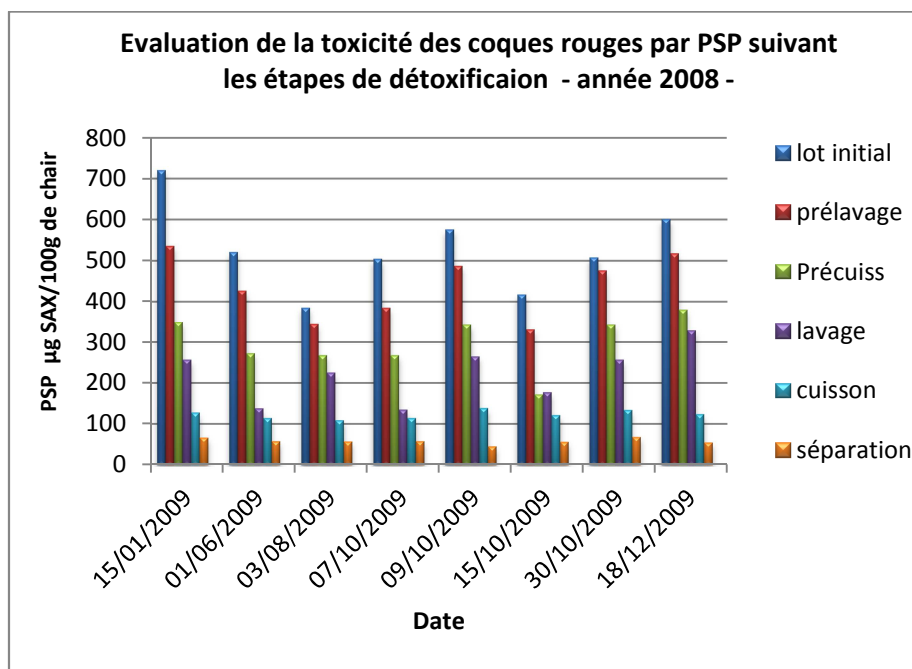


Fig. 7. Analyse Evaluation de la toxicité des coques rouges par PSP suivant les étapes de détoxification Année 2009

L'étude statistique des résultats montre qu'il existe une corrélation entre les tests (annexe 1).

4 CONCLUSION

Cette étude a pour objectif de mettre en valeur le principe de détoxification artificielle de la coque rouge (*Acanthocardia tubercularum*) contaminée par la toxine paralysante PSP.

Il est à signaler qu'en matière de contrôle des phycotoxines, deux approches sont retenues ; en cas d'efflorescence non durable responsable de la contamination des coquillages au-dessus des seuils réglementaires, la gestion repose sur une décision officielle d'interdiction provisoire de récolte et de mise sur le marché. La décontamination a lieu de manière naturelle dans la zone de production concernée. Ce sont les contrôles des laboratoires officiels qui vérifient que la décontamination respecte les critères de salubrité en vigueur pour les toxines en cause avant de lever les mesures de restriction ; par contre en cas de contamination durable d'une zone par les toxines PSP, phénomènes notamment observés en Espagne et au Maroc, des décisions autorisent la récolte et la mise à la consommation sous conditions très strictes de maîtrise ne concernant que certaines espèces de coquillages. Ces solutions imposent une transformation des coquillages considérés (élimination des parties les plus contaminées ou cuisson selon des barèmes élevés) et des analyses des lots produits finis.

L'application de la Décision de la Commission 96/77/CE du 18 janvier 1996, régissant les conditions de récolte et de transformation de certains mollusques bivalves provenant de zones où les niveaux de toxines paralysantes dépassent la limite fixée par la directive 91/492/CEE du Conseil ; montrent que le traitement thermique approprié réalisé au niveau de notre étude est en mesure de garantir que le taux de toxine PSP est réduit à un niveau indétectable lorsque le niveau initial de la contamination dépasse 300 µg pour 100 g (Décision européenne: 96/77/CE).

Les études réalisées sur les coques rouges issues de la zone Oued Laou – Kaâ Sraas (zone littoral méditerranéen marocaine ouest) montrent que le taux de toxine diminue suivant les étapes de la détoxification avec une accentuation pendant l'étape de cuisson, cette constatation est exacte durant toute les périodes d'étude selon les saisons (voir figures du 1 au 5).

Dans l'étape de stérilisation, la concentration de la toxine a fortement baissée ce qui montre le rôle de la température sur l'interaction des micro-algues toxiques avec les mollusques et leur détoxification.

A la lumière des résultats des analyses obtenus portant sur les procédures d'application de la directive 91/493/CEE [21] en ce qui concerne les autocontrôles sanitaires des produits de la pêche et en particulier pour son application aux mollusques bivalves appartenant à l'espèce *Acanthocardia tuberculatum*, sont en mesure d'assurer une bonne application du traitement thermique approprié.

REMERCIEMENTS

La gratitude est due à tous les responsables de la société DINAY sarl (Dr BOUZIDI Hassan, Dr Najat OUALIT) et ceux de la faculté des sciences de Tétouan (Dr Bendriss Abdenbi) pour leur aide précieuse dans cette étude. Une assistance technique et la révision critique du manuscrit par le Dr Mohamed MAGHRAOUI (Institut national de recherche halieutique - RSSL Station- M'diq) sont grandement appréciés.

REFERENCES

- [1] Smaal, A., van Stralen, M., Schuiling, E., 2001. The interaction between shellfish culture and ecosystem processes. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 58, 991- 1002.
- [2] Mao Y Z, Zhou Y, Yang HS, Wang RC (2006) Seasonal variation in metabolism of cultured Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Sanggou Bay, China. Aquaculture 253, 322-333.
- [3] Bricelj VM, Shumway SE (1998a) An overview of the occurrence and transfer kinetics of paralytic shellfish toxins in Bivalve molluscs.
- [4] Choi MC, Yu PKN, Hsieh DPH, Lam PKS (2006) Trophic transfer of paralytic shellfish toxins from clams (*Ruditapes philippinarum*) to gastropods (*Nassarius festivus*). Chemosphere 64:1642-1649.
- [5] Kvitck RG, Goldberg JD, Smith GJ, Doucette GJ, Silver MW (2008) Domoic acid contamination within eight representative species from the benthic food web of Monterey Bay, California, USA. Marine Ecology-Progress Series 367:35-47.
- [6] Council Directive 91/492/CEE of 15 July 1991 laying down the health conditions for the production and the placing on the market of live bivalve molluscs.

- [7] Lassus P, Bardouil M, Baron R, Berard JB, Masselin P, Truquet P, Pitrat JP (2005) Improving detoxification efficiency of PSP contaminated oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aquaculture Europe*: 3-6.
- [8] Gueguen M, Bardouil M, Baron R, Lassus P, Truquet P, Massardier J, Amzil Z (2008a) Detoxification of Pacific oyster *Crassostrea gigas* fed on diets of *Skeletonema costatum* with and without silt, following PSP contamination by *Alexandrium minutum*. *Aquatic Living Resources* 21:13-20.
- [9] Jin D, Thunberg E, Hoagland P (2008) Economic impact of the 2005 red tide event on commercial shellfish fisheries in New England. *Ocean & Coastal Management* 51:420-429.
- [10] Somer, H & K. F. Meyer 1937. Paralytic shellfish poisoning. *Arch. Path.* 24: 560 – 598.
- [11] Oshima Y., Marchida M., Sasaki K., Tanokiy., Ysumoto T., 1984. Liquid chromatography-fluorometric analysis of paralytic shellfish toxins. *Argic. Biol. Chem.*, 48 (7), 1707 – 1711.
- [12] Oshima Y., S. I. Blackburn & G. M. Hallegraef, 1993. Comparative study on paralytic shellfish toxins profiles of dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* from three different countries. *Mar, Biol.* 16: 471 – 476.
- [13] Ravn H., 1995. Toxicological and chemical aspects of paralytic shellfish poisoning (PSP). IOC-UNEP-FAO-Italy Training Course on Toxin Chemistry and Toxicology related to Harmful Algal Blooms, University of Trieste.
- [14] Hall, S., G. Strichartz, E. Moczydlowski, A. Ravindran & P. B. Reichardt, 1990. The saxitoxins: source, chemistry and pharmacology. In: Hall & G. Strichartz (eds), *Marine toxins*. Am. Chem. Soc. Symp. Ser. 418: 29 – 65.
- [15] Taleb H., Vale P., Jaime E. et Blaghen M., (2001) – Study of paralytic shellfish from the Mediterranean shore of Morocco. *Toxicon* 39: 1855-1861. Utermöhl, H. 1985. Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Mitt. Int. Ver. Theor. Angew. Limnol.* 9: 1-38. Van Dolah, F.M. 2000. Marine algal toxins: origins, health effects and their increased occurrence. *Environment Health Perspectives* 108, supplement 1.
- [16] Sagou R., Amanhir R., Taleb H., Vale P., Blaghen M. et Loutfi M., (2005)- comparative study on differential accumulation of PSP toxins between cockle (*Acanthocardia tuberculatum*) and sweet clam (*Callista chione*). *Toxicon*. 46 (6): 612-618.
- [17] Takati. N., Moutassif. D., Taleb. H., et Blaghen. M., (2007)- 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).
- [18] Commission Decision 96/77/EC of 18 January 1996 establishing the conditions for the harvesting and processing of certain bivalve molluscs coming from areas where the paralytic shellfish poison level exceeds the limit laid down by Council Directive 91/492/EEC.
- [19] 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.
- [20] AOAC. 1990. Paralytic Shellfish Poison. Biological method. Final action. In Hellrich, K. ed. *Official Method of Analysis*. 15th Edition, pp. 881-882, Sec 959.08. Association of Official Analytical Chemists (AOAC), Arlington, Virginia, USA.
- [21] Council Directive 91/493/EEC of 22 July 1991 laying down the health conditions for the production and the placing on the market of fishery products.

ANNEXE 1

The SAS System 15:10 Thursday, December 6, 2010 6

Obs	Init Set	pre-wash	pre-cook	washing	cooking	separat	steriliz
1	712	633	425	418	263	134	0
2	494	338	197	143	141	136	0
3	732	547	264	137	114	68	0
4	787	661	460	268	128	68	0
5	410	366	277	148	67	45	0
6	370	174	167	135	77	49	0
7	626	436	274	139	119	59	0
8	609	459	312	189	136	63	0
9	597	453	321	178	127	54	0
10	517	410	259	175	127	56	0
11	480	442	274	209	106	65	0
12	331	286	274	159	109	103	0
13	524	397	268	125	68	59	0
14	358	351	298	65	58	46	0
15	479	381	252	194	129	61	0
16	553	463	338	182	132	62	0
17	556	521	335	214	119	55	0
18	736	503	308	134	122	73	0
19	571	529	304	137	71	64	0
20	595	492	259	205	119	55	0
21	648	449	244	134	110	68	0
22	449	385	234	127	110	65	0
23	536	476	264	129	110	57	0
24	626	440	259	134	118	62	0
25	696	508	340	229	128	63	0
26	463	410	207	165	117	57	0
27	402	346	198	163	70	56	0
28	720	536	348	257	128	67	0
29	521	427	272	138	114	58	0
30	385	344	268	225	109	57	0
31	504	385	268	135	114	58	0
32	576	487	342	264	139	45	0
33	418	331	172	178	122	56	0
34	508	476	342	257	134	68	0
35	601	518	381	328	124	55	0

The SAS System 15:10 Thursday, December 6, 2010 7
The CORR Procedure

7 Variables: initial Set pre-washing pre-cooking washing cooking separation
sterilization

Simple Statistics

Variable	N	Mean	Std Dev	Sum	Minimum	Maximum
Initial set	35	545.42857	117.96791	19090	331.00000	787.00000
Pre-wash	35	438.85714	94.88201	15360	174.00000	661.00000
Pre-cooking	35	285.85714	63.97019	10005	167.00000	460.00000
washing	35	183.34286	67.45933	6417	65.00000	418.00000
cooking	35	116.54286	33.77812	4079	58.00000	263.00000
separat	35	64.77143	20.17145	2267	45.00000	136.00000
Sterilization	35	0	0	0	0	0

The board above shows the average values of toxin in every stage: we can consider that in the stage pre-cooking, the rate of biotoxin is < 300 ug.

Pearson Correlation Coefficients, N = 35
 Prob > |r| under H0: Rho=0

	Initial Set	pre-wash	pre-cook	washing	cooking	separat	steriliz
initial	1.00000	0.86002 <.0001	0.62054 <.0001	0.39166 0.0200	0.48729 0.0030	0.17494 0.3148	.
pre-wash	0.86002 <.0001	1.00000	0.80319 <.0001	0.56311 0.0004	0.51343 0.0016	0.14971 0.3907	.
pre-cook	0.62054 <.0001	0.80319 <.0001	1.00000	0.67117 <.0001	0.47248 0.0042	0.13890 0.4262	.
lavag washing	0.39166 0.0200	0.56311 0.0004	0.67117 <.0001	1.00000	0.73696 <.0001	0.31182 0.0682	.
cooking	0.48729 0.0030	0.51343 0.0016	0.47248 0.0042	0.73696 <.0001	1.00000	0.61769 <.0001	.
separat	0.17494 0.3148	0.14971 0.3907	0.13890 0.4262	0.31182 0.0682	0.61769 <.0001	1.00000	.
steriliz

The board above shows the correlations enter the number of biotoxin for every pair of stages (value of correlation in yellow and test of meaning in red). The coefficients which have a probability (red) < 0.05 are significant.

The SAS System 15:10 Thursday, December 6, 2010 8
 The REG Procedure
 Model: MODEL1
 Dependent Variable: initial set

Number of Observations Read 35
 Number of Observations Used 35

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	349967	349967	93.75	<.0001
Error	33	123192	3733.07770		
Corrected Total	34	473159			
Root MSE		61.09892	R-Square	0.7396	
Dependent Mean		545.42857	Adj R-Sq	0.7318	
Coeff Var		11.20200			

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t
Intercept	1	76.16875	49.55372	1.54	0.1338
Pre-wash	1	1.06928	0.11044	9.68	<.0001

The rate of dejection (allowance) enters initial and prerectal injection is 1.06928, that means that the increase (decrease) of a unity(unit) (1) of the number of biotoxin in the stage prewash pulls(entails) the increase (decrease) of 1.06928 unity (ies(unit (s)) of the number of biotoxin in the stage initial.

The SAS System 15:10 Thursday, December 6, 2010 9

The REG Procedure
 Model: MODEL2
 Dependent Variable: initial set

Number of Observations Read 35
 Number of Observations Used 35

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	182197	182197	20.66	<.0001
Error	33	290962	8817.03241		
Corrected Total	34	473159			

Root MSE 93.89905 R-Square 0.3851
 Dependent Mean 545.42857 Adj R-Sq 0.3664
 Coeff Var 17.21565

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t
Intercept	1	218.31242	73.68993	2.96	0.0056
Pre-cooking	1	1.14433	0.25174	4.55	<.0001

The same comment as above can be made here and for all the rest of the file.

The SAS System 15:10 Thursday, December 6, 2010 10

The REG Procedure
 Model: MODEL3
 Dependent Variable: initial set

Number of Observations Read 35
 Number of Observations Used 35

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	72582	72582	5.98	0.0200
Error	33	400577	12139		
Corrected Total	34	473159			

Root MSE 110.17576 R-Square 0.1534
 Dependent Mean 545.42857 Adj R-Sq 0.1277
 Coeff Var 20.19985

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t
Intercept	1	419.85575	54.62585	7.69	<.0001
washing	1	0.68491	0.28009	2.45	0.0200

The SAS System 15:10 Thursday, December 6, 2010 11

The REG Procedure
 Model: MODEL4
 Dependent Variable: initial set

Number of Observations Read 35
 Number of Observations Used 35

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	112353	112353	10.28	0.0030
Error	33	360805	10933		
Corrected Total	34	473159			

Root MSE 104.56333 R-Square 0.2375
 Dependent Mean 545.42857 Adj R-Sq 0.2143
 Coeff Var 19.17086

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t
Intercept	1	347.09154	64.34640	5.39	<.0001
cooking	1	1.70184	0.53089	3.21	0.0030

The SAS System 15:10 Thursday, December 6, 2010 12

The REG Procedure
 Model: MODEL5
 Dependent Variable: initial set

Number of Observations Read 35
 Number of Observations Used 35

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	14480	14480	1.04	0.3148
Error	33	458679	13899		
Corrected Total	34	473159			

Root MSE 117.89550 R-Square 0.0306
 Dependent Mean 545.42857 Adj R-Sq 0.0012
 Coeff Var 21.61520

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t
Intercept	1	479.16238	67.91339	7.06	<.0001
separat	1	1.02308	1.00235	1.02	0.3148

The SAS System 15:10 Thursday, December 6, 2010 13

The REG Procedure
 Model: MODEL6
 Dependent Variable: initial set

Number of Observations Read 35
 Number of Observations Used 35

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	0	0	.	.	.
Error	34	473159	13916		
Corrected Total	34	473159			
Root MSE		117.96791	R-Square	0.0000	
Dependent Mean		545.42857	Adj R-Sq	0.0000	
Coeff Var		21.62848			

NOTE: Model is not full rank. Least-squares solutions for the parameters are not unique. Some statistics will be misleading. A reported DF of 0 or B means that the estimate is biased.

NOTE: The following parameters have been set to 0, since the variables are a linear combination of other variables as shown.

steriliz = 0

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t
Intercept	1	545.42857	19.94022	27.35	<.0001
steriliz	0	0	.	.	.

The SAS System 15:10 Thursday, December 6, 2010 14

The REG Procedure
 Model: MODEL7
 Dependent Variable: pre-wash

Number of Observations Read 35
 Number of Observations Used 35

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	197460	197460	59.99	<.0001
Error	33	108628	3291.75912		
Corrected Total	34	306088			
Root MSE		57.37385	R-Square	0.6451	
Dependent Mean		438.85714	Adj R-Sq	0.6344	
Coeff Var		13.07347			

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t
Intercept	1	98.31427	45.02575	2.18	0.0362

Pre-cooking 1 1.19130 0.15381 7.75 <.0001

The SAS System 15:10 Thursday, December 6, 2010 15

The REG Procedure
Model: MODEL8
Dependent Variable: pre-wash

Number of Observations Read 35
Number of Observations Used 35

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	97060	97060	15.32	0.0004
Error	33	209028	6334.18994		
Corrected Total	34	306088			

Root MSE 79.58762 R-Square 0.3171
Dependent Mean 438.85714 Adj R-Sq 0.2964
Coeff Var 18.13520

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t
Intercept	1	293.64508	39.46006	7.44	<.0001
washing	1	0.79202	0.20233	3.91	0.0004

The SAS System 15:10 Thursday, December 6, 2010 16

The REG Procedure
Model: MODEL9
Dependent Variable: pre-wash

Number of Observations Read 35
Number of Observations Used 35

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	80689	80689	11.81	0.0016
Error	33	225399	6830.27848		
Corrected Total	34	306088			

Root MSE 82.64550 R-Square 0.2636
Dependent Mean 438.85714 Adj R-Sq 0.2413
Coeff Var 18.83198

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t
Intercept	1	270.77632	50.85856	5.32	<.0001
cooking	1	1.44222	0.41961	3.44	0.0016

The SAS System 15:10 Thursday, December 6, 2010 17

The REG Procedure
 Model: MODEL10
 Dependent Variable: pre-wash

Number of Observations Read 35
 Number of Observations Used 35

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	6860.09864	6860.09864	0.76	0.3907
Error	33	299228	9067.52082		
Corrected Total	34	306088			

Root MSE 95.22353 R-Square 0.0224
 Dependent Mean 438.85714 Adj R-Sq -0.0072
 Coeff Var 21.69807

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t
Intercept	1	393.24588	54.85326	7.17	<.0001
separat	1	0.70419	0.80959	0.87	0.3907

The SAS System 15:10 Thursday, December 6, 2010 18

The REG Procedure
 Model: MODEL11
 Dependent Variable: pre-wash

Number of Observations Read 35
 Number of Observations Used 35

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	0	0	.	.	.
Error	34	306088	9002.59664		
Corrected Total	34	306088			

Root MSE 94.88201 R-Square 0.0000
 Dependent Mean 438.85714 Adj R-Sq 0.0000
 Coeff Var 21.62025

NOTE: Model is not full rank. Least-squares solutions for the parameters are not unique. Some statistics will be misleading. A reported DF of 0 or B means that the estimate is biased.
 NOTE: The following parameters have been set to 0, since the variables are a linear combination of other variables as shown.

steriliz = 0

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t
Intercept	1	438.85714	16.03799	27.36	<.0001

steriliz 0 0 . . .

The SAS System 15:10 Thursday, December 6, 2010 19

The REG Procedure
 Model: MODEL12
 Dependent Variable: pre-cooking

Number of Observations Read 35
 Number of Observations Used 35

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	62675	62675	27.05	<.0001
Error	33	76459	2316.94386		
Corrected Total	34	139134			

Root MSE	48.13464	R-Square	0.4505
Dependent Mean	285.85714	Adj R-Sq	0.4338
Coeff Var	16.83871		

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t
Intercept	1	169.16808	23.86547	7.09	<.0001
washing	1	0.63645	0.12237	5.20	<.0001

The SAS System 15:10 Thursday, December 6, 2010 20

The REG Procedure
 Model: MODEL13
 Dependent Variable: pre-cooking

Number of Observations Read 35
 Number of Observations Used 35

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	31060	31060	9.48	0.0042
Error	33	108074	3274.97657		
Corrected Total	34	139134			

Root MSE	57.22741	R-Square	0.2232
Dependent Mean	285.85714	Adj R-Sq	0.1997
Coeff Var	20.01958		

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t
Intercept	1	181.57454	35.21672	5.16	<.0001
cooking	1	0.89480	0.29056	3.08	0.0042

The SAS System 15:10 Thursday, December 6, 2010 21

The REG Procedure
Model: MODEL14
Dependent Variable: pre-cooking

Number of Observations Read 35
Number of Observations Used 35

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	2684.30206	2684.30206	0.65	0.4262
Error	33	136450	4134.84799		
Corrected Total	34	139134			

Root MSE 64.30278 R-Square 0.0193
Dependent Mean 285.85714 Adj R-Sq -0.0104
Coeff Var 22.49473

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t
Intercept	1	257.32578	37.04145	6.95	<.0001
separat	1	0.44049	0.54671	0.81	0.4262

The SAS System 15:10 Thursday, December 6, 2010 22

The REG Procedure
Model: MODEL15
Dependent Variable: pre-cooking

Number of Observations Read 35
Number of Observations Used 35

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	0	0	.	.	.
Error	34	139134	4092.18487		
Corrected Total	34	139134			

Root MSE 63.97019 R-Square 0.0000
Dependent Mean 285.85714 Adj R-Sq 0.0000
Coeff Var 22.37838

NOTE: Model is not full rank. Least-squares solutions for the parameters are not unique. Some statistics will be misleading. A reported DF of 0 or B means that the estimate is biased.

NOTE: The following parameters have been set to 0, since the variables are a linear combination of other variables as shown.

steriliz = 0

Parameter Estimates

Parameter Standard

Variable	DF	Estimate	Error	t Value	Pr > t
Intercept	1	285.85714	10.81294	26.44	<.0001
sterilis	0	0	.	.	.

The SAS System 15:10 Thursday, December 6, 2010 23

The REG Procedure
 Model: MODEL16
 Dependent Variable: washing

Number of Observations Read 35
 Number of Observations Used 35

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	84034	84034	39.23	<.0001
Error	33	70692	2142.18622		
Corrected Total	34	154726			

Root MSE 46.28376 R-Square 0.5431
 Dependent Mean 183.34286 Adj R-Sq 0.5293
 Coeff Var 25.24437

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t
Intercept	1	11.81385	28.48219	0.41	0.6810
Cooking	1	1.47181	0.23499	6.26	<.0001

The SAS System 15:10 Thursday, December 6, 2010 24

The REG Procedure
 Model: MODEL17
 Dependent Variable: washing

Number of Observations Read 35
 Number of Observations Used 35

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	15045	15045	3.55	0.0682
Error	33	139681	4232.76331		
Corrected Total	34	154726			

Root MSE 65.05969 R-Square 0.0972
 Dependent Mean 183.34286 Adj R-Sq 0.0699
 Coeff Var 35.48526

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t
Intercept	1	115.79702	37.47746	3.09	0.0040
separat	1	1.04283	0.55314	1.89	0.0682

The SAS System 15:10 Thursday, December 6, 2010 25

The REG Procedure
Model: MODEL18
Dependent Variable: washing

Number of Observations Read 35
Number of Observations Used 35

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	0	0	.	.	.
Error	34	154726	4550.76134		
Corrected Total	34	154726			

Root MSE 67.45933 R-Square 0.0000
Dependent Mean 183.34286 Adj R-Sq 0.0000
Coeff Var 36.79409

NOTE: Model is not full rank. Least-squares solutions for the parameters are not unique. Some statistics will be misleading. A reported DF of 0 or B means that the estimate is biased.

NOTE: The following parameters have been set to 0, since the variables are a linear combination of other variables as shown.

steriliz = 0

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t
Intercept	1	183.34286	11.40271	16.08	<.0001
steriliz	0	0	.	.	.

The SAS System 15:10 Thursday, December 6, 2010 26

The REG Procedure
Model: MODEL19
Dependent Variable: cooking

Number of Observations Read 35
Number of Observations Used 35

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	14801	14801	20.36	<.0001
Error	33	23992	727.02577		
Corrected Total	34	38793			

Root MSE 26.96342 R-Square 0.3815
Dependent Mean 116.54286 Adj R-Sq 0.3628
Coeff Var 23.13605

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t
Intercept	1	49.54668	15.53220	3.19	0.0031
separat	1	1.03435	0.22924	4.51	<.0001

The SAS System 15:10 Thursday, December 6, 2010 27

The REG Procedure
 Model: MODEL20
 Dependent Variable: cuisson

Number of Observations Read 35
 Number of Observations Used 35

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	0	0	.	.	.
Error	34	38793	1140.96134		
Corrected Total	34	38793			

Root MSE	33.77812	R-Square	0.0000
Dependent Mean	116.54286	Adj R-Sq	0.0000
Coeff Var	28.98343		

NOTE: Model is not full rank. Least-squares solutions for the parameters are not unique. Some statistics will be misleading. A reported DF of 0 or B means that the estimate is biased.

NOTE: The following parameters have been set to 0, since the variables are a linear combination of other variables as shown.

$$\text{sterilis} = 0$$

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t
Intercept	1	116.54286	5.70954	20.41	<.0001
steriliz	0	0	.	.	.

The SAS System 15:10 Thursday, December 6, 2010 28

The REG Procedure
 Model: MODEL21
 Dependent Variable: separat

Number of Observations Read 35
 Number of Observations Used 35

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	0	0	.	.	.
Error	34	13834	406.88739		
Corrected Total	34	13834			

Root MSE	20.17145	R-Square	0.0000
Dependent Mean	64.77143	Adj R-Sq	0.0000

Coeff Var 31.14251

NOTE: Model is not full rank. Least-squares solutions for the parameters are not unique. Some statistics will be misleading. A reported DF of 0 or B means that the estimate is biased.

NOTE: The following parameters have been set to 0, since the variables are a linear combination of other variables as shown.

steriliz = 0

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t
Intercept	1	64.77143	3.40960	19.00	<.0001
sterilis	0	0	.	.	.