



Maisons-Alfort, le 16 septembre 2008

AVIS

de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à la pertinence des outils de détection des phycotoxines lipophiles dans les coquillages

LA DIRECTRICE GÉNÉRALE

1. RAPPEL DE LA SAISINE

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 09 septembre 2008 par Direction générale de l'alimentation (DGAL) d'une demande d'appui scientifique et technique relatif à la proposition de la Section Régionale Conchylicole Arcachon Aquitaine en vue d'une révision des tests de détection des phycotoxines lipophiles dans les coquillages.

En réponse à cette demande, l'Afssa a réalisé une synthèse des données économiques, réglementaires et scientifiques relatives aux outils de détection.

2. METHODE D'EXPERTISE

Le groupe d'expertise collective d'urgence (GECU) « Phycotoxines » créé par décision de la Directrice générale de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments, en concertation avec le président du Comité d'experts spécialisé « Résidus et Contaminants Chimiques et Physiques » a été chargé de mener cette expertise.

Ce GECU « Phycotoxines » est composé :

- d'experts du Comité d'Experts Spécialisé « Résidus et contaminants chimiques et physiques », dont le président de ce Comité ;
- d'un expert de l'Ifremer¹, Département Environnement, Microbiologie et Phycotoxines ;
- d'experts de l'Unité toxines, polluants organiques et pesticides (TOP) du Laboratoire d'études et de recherche sur la qualité des aliments et les procédés agroalimentaires (LERQAP), Laboratoire national de référence des biotoxines marines ;
- d'un expert de la Direction de l'évaluation des risques nutritionnels et sanitaires (DERNS).

Après consultation du GECU « Phycotoxines » le 10 septembre 2008, l'Afssa rend l'avis suivant.

3. CONTEXTE : DONNEES DU MARCHE CONCHYLICOLE EN FRANCE ET DANS LE MONDE

3.1 La production ostréicole

Selon les données publiées par l'Ifremer², la production ostréicole française (de l'ordre de 130 000 tonnes par an) a représenté en 2000, **91 % de la production de l'Europe des 15**, la plaçant au 4^{ème} rang mondial derrière la Chine, le Japon et la Corée.

Les échanges commerciaux français, avec des pays de l'Union Européenne, se limitent à 3000 tonnes par an vers la France et à 6000 tonnes par an à partir de la France (détails en annexe 1).

¹ Ifremer : Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer

² <http://www.ifremer.fr/reper/pages/themes/Socio-economie/ostreiculture.htm> .

Sept régions participent à la production nationale : la Bretagne (30%), le Poitou-Charente (22,5%) et la Basse-Normandie (22,5%), la Méditerranée (9%), Arcachon-Aquitaine (8,3%) et les Pays de la Loire (7,5%)³.

3.2 La production mytilicole

L'Espagne occupe le premier rang avec 46% de la production européenne⁴. La France, avec 12% de la production soit environ 75 000 tonnes /an, se situe à la 3^{ème} place en Europe derrière l'Espagne et l'Italie, et au 5^{ème} rang mondial (avec 5% de la production mondiale) derrière la Chine, l'Espagne, l'Italie et la Nouvelle-Zélande.

Contrairement à l'ostréiculture, la production mytilicole mondiale est répartie dans un plus grand nombre de pays.

Selon les données de l'année 2000, les échanges commerciaux français se font essentiellement avec des pays européens et la Nouvelle-Zélande. La France introduit ainsi 46 250 tonnes de moules sur son territoire et en cède 5384 tonnes.

3.3 La consommation des huîtres

Contrairement aux moules qui sont consommées toute l'année, 70% de la production d'huîtres est consommée en hiver (entre novembre et janvier), principalement à l'occasion des fêtes de fin d'année.

Sur la base de l'étude CALIPSO⁵ (2006) qui s'est intéressée aux forts consommateurs de produits de la mer, la consommation française d'huîtres pour les hommes est de 41 g/sem (grammes par semaine) en moyenne et de 144 g/sem au P95 ; pour les femmes, elle est de 28 g/sem en moyenne et 90 g/sem au P95 ; pour les sujets âgés (65 ans et plus, hommes et femmes) elle est de 51,3 g/sem en moyenne et 144 g/sem au P95.

4. HISTORIQUE

Connus depuis les années 70, les phénomènes de contamination des coquillages se sont étendus à l'ensemble des littoraux dans le monde. Depuis quelques années, non seulement davantage de zones géographiques ont été touchées, mais de nouvelles espèces phytoplanctoniques et familles de toxines sont apparues. L'étude et la caractérisation des épisodes de toxicité qui évoluent constamment, sont donc devenues complexes.

4.1 Les algues planctoniques toxiques

On connaît à l'échelle mondiale environ 4000 espèces d'algues planctoniques dont 250 peuvent proliférer sous forme de bloom (on parle aussi d'efflorescence) et environ 70 sont actuellement connues comme toxiques pour la faune, la flore et parfois le consommateur de coquillages (source : Ifremer).

Des intoxications périodiques liées à la consommation de coquillages ont été décrites de longue date, mais la mise en évidence d'une corrélation entre la présence de certaines espèces d'algues planctoniques et la toxicité des coquillages pour le consommateur ne remonte qu'aux années 1970. A cette époque, des équipes japonaises ont en effet établi un lien entre la contamination des coquillages, la présence de *Dinophysis fortii* dans l'eau de mer et des intoxication humaines (Frémy et Lassus, 2001).

³ <http://www.ifremer.fr/littoralbasnormand/page.php?numpage=119>

⁴ <http://www.ifremer.fr/reper/pagethemes/Socio-economie/ValerieBarbierUniPoitiers/mytiliculture.htm>

⁵ CALIPSO : Etude des consommations alimentaires de produits de la mer et Imprégnation aux éléments traces, polluants et oméga3, AFSSA/DGAI/INRA, 2006

4.2 Les phycotoxines

Quatre groupes de toxines ont été distingués jusqu'en 2004, selon les symptômes cliniques d'intoxication humaine consécutifs à la consommation de coquillages :

- les toxines diarrhéiques liposolubles : Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP), intoxication diarrhéique par les fruits de mer (IDFM) ;
- les toxines paralysantes hydrosolubles : Paralytic Shellfish Poisoning (PSP), intoxication paralysante par les fruits de mer (IPFM) ;
- les toxines amnésiantes hydrosolubles : Amnesic Shellfish Poisoning (ASP), intoxication amnésiante par les fruits de mer (IAFM) ;
- les toxines neurologiques liposolubles : Neurotoxic shellfish poisoning (NSP), intoxication neurologique par les fruits de mer (INFM).

Parmi ces 4 groupes, celui des toxines diarrhéiques liposolubles s'est révélé plus complexe au fur et à mesure des avancées scientifiques. On considérait initialement que ce groupe était constitué majoritairement par l'acide okadaïque et les dinophysistoxines produites par le genre *Dinophysis*. Du fait de la liposolubilité de ces toxines, leur toxicité a été recherchée en administrant au rat ou à la souris des fractions de coquillages contaminés extraites par des solvants organiques. Progressivement, les campagnes de surveillance effectuées avec ce bio-essai sur rongeurs et les travaux de recherche menés en parallèle ont mis en évidence plusieurs familles de toxines liposolubles, produites par des espèces ou des genres différents de phytoplancton et dont les modes d'action ou les effets biologiques diffèrent. On a donc été amené à distinguer les toxines provoquant des effets diarrhéiques manifestes chez l'homme (acide okadaïque, dinophysistoxines et azaspiracides) de celles pour lesquelles il n'a jamais été rapporté de symptomatologies chez l'homme, mais une hépatotoxicité (pecténotoxines) ou une cardiotoxicité (yessotoxines) chez l'animal.

Ainsi, la dénomination a évolué vers « toxines lipophiles » qui comprend 4 familles réglementées :

- l'acide okadaïque et les dinophysistoxines (DTXs) produites notamment par des espèces du genre *Dinophysis* ;
- les pecténotoxines (PTXs) produites notamment par *Dinophysis spp.* ;
- les yessotoxines (YTXs) produites notamment par *Lingulodinium polyedrum* ;
- les azaspiracides (AZAs) dont le genre producteur n'est pas été formellement identifié à ce jour.

Ce groupe inclut également des toxines émergentes comme les gymnodimines et les spirolides pour lesquelles le risque pour le consommateur n'a pas été étudié.

Le groupe des **toxines paralysantes**, hydrosolubles, produites notamment par le genre *Alexandrium*, comporte au moins 24 analogues identifiés, dont la plus connue est la saxitoxine (STX).

Le groupe des **toxines amnésiantes**, hydrosolubles, produites notamment par des diatomées du genre *Pseudo-nitzschia*, est constitué principalement par l'acide domoïque (AD) et ses isomères.

Le groupe des **toxines neurologiques** est constitué des brevéttoxines et ses congénères. Du fait de leur toxicité sur les poissons qui permet de détecter facilement leur présence et leur répartition géographique toujours limitée, aucune réglementation n'a été mise en place au niveau européen. Ce sont des toxines lipophiles responsables d'une symptomatologie particulière qui permet de les distinguer des toxines lipophiles diarrhéiques (dans le bio-essai souris).

L'évolution des connaissances, la mise en évidence d'un plus grand nombre de familles de phytoplancton/phycotoxines, dont certaines toxines émergentes, a amené les gestionnaires à actualiser la réglementation.

Ainsi, dans le cadre de l'élaboration d'un code de bonne pratique pour les poissons et produits de la pêche, et d'un projet de norme pour les mollusques bivalves vivants, le *Codex alimentarius* a sollicité la création d'un groupe mixte d'experts FAO/IOC/WHO afin de fournir :

- des avis scientifiques pour l'établissement de limites maximales de salubrité ;
- des lignes directrices pour l'analyse de chacun des groupes de phycotoxines ;
- des éléments pour la surveillance ;
- des éléments sur la répartition géographique.

Depuis 2004, les toxines ont été classées en fonction de leur nature chimique et le groupe d'expert a distingué 8 familles:

- le groupe de l'acide okadaïque et des dinophysistoxines ;
- le groupe des saxitoxines ;
- le groupe de l'acide domoïque ;
- le groupe des pecténotoxines ;
- le groupe des yessotoxines ;
- le groupe des brevétoxines ;
- le groupe des azaspiracides ;
- le groupe des imines cycliques (dont les spirolides).

L'apparition sur les côtes méditerranéennes (Grèce, Espagne, Italie, France) de dinoflagellés du genre *Ostreopsis* depuis 2003, nécessite de considérer une 9^{ème} famille : les palytoxines. En effet, la palytoxine et un analogue « ovatoxine » ont été détectés pour la première fois en France dans les oursins en Méditerranée en été 2008 liés au développement d'*Ostreopsis cf. ovata* (données Ifremer/laboratoire Phycotoxines).

4.3 Historique de la situation en France

En France, en 1983, des algues planctoniques ont été considérées comme responsables de milliers d'intoxications alimentaires de type diarrhéique, en Bretagne et en Normandie ; les espèces de phytoplancton appartenaient au genre *Dinophysis*, capables de produire des toxines diarrhéiques.

Afin de garantir la santé du consommateur de coquillages produits en France, l'Ifremer a mis en place le réseau REPHY⁶ en 1984 et procédé à une surveillance des zones de production avec une surveillance du milieu (détection du phytoplancton potentiellement toxique) associée à des contrôles sanitaires des bivalves (mesure du niveau global de toxicité). Ces mesures ont permis :

- de mettre en évidence la présence de toxine (acide okadaïque) dans les coquillages des zones contaminées ;
- de démontrer l'extension géographique des zones contaminées par des phycotoxines diarrhéiques ;
- de détecter, dès 1988, les premiers cas de contamination de coquillages par des toxines paralysantes, en Bretagne Nord, puis 10 ans plus tard, en Méditerranée (étang de Thau, (Masselin *et al.*, 2001) ;
- de détecter pour la première fois en 2000 la contamination de coquillages par des toxines amnésiantes en Bretagne (Amzil *et al.*, 2001).

Ces dernières années, l'amélioration des connaissances aux niveaux européen et international, l'amélioration des méthodes d'analyse des toxines associées au réseau de surveillance REPHY ont permis de mettre en évidence des épisodes de toxicité en rapport avec une grande diversité de toxines, réglementées et émergentes (spirolides).

Ainsi, ont été identifiées :

- la dinophysistoxine-2 et les dérivés dinophysistoxines-3 liés à la présence de *Dinophysis acuta*, en 2002 en Bretagne Sud (Amzil et Mathias, 2006) ;
- la pecténotoxine-2 et un dérivé en 2004 dans les étangs de Salses, Leucate et de Corse ouest en relation avec le développement de *Dinophysis spp.* (Amzil *et al.*, 2007) ;
- les spirolides associés à la présence d'*Alexandrium ostenfeldii* en 2005 dans le bassin d'Arcachon (Amzil *et al.*, 2007) ;

⁶ Réphy : Réseau de surveillance du phytoplancton et des phycotoxines

- des composés de la famille des palytoxines : i) dans les échantillons d'*Ostreopsis cf. ovata* prélevés sur les côtes méditerranéennes françaises en 2006 ; ii) dans les oursins de Méditerranée en 2008 (Ifremer/laboratoire Phycotoxines)
- les azaspiracides en 2006 au large de Roscoff (Amzil et al. 2008) ;
- les yessotoxines en 2007 liées à la présence de *Lingulodinium polyedrum* et *Gonyaulax spinifera* dans l'étang de Thau (Amzil et al. 2008), et en 2008 dans le bassin d'Arcachon liées à la présence *Gonyaulax spinifera*.

En France, aucune mortalité humaine n'a été répertoriée en lien avec la consommation de coquillages contaminés par des phycotoxines, contrairement à d'autres pays.

5. EVOLUTION REGLEMENTAIRE

La mise en place de la réglementation relative à la production des mollusques bivalves vivants a débuté au niveau européen en 1991, puis a été progressivement complétée par différents textes, (liste en références bibliographiques et détails en annexe 2). Cette réglementation a ensuite été reprise dans le cadre du paquet hygiène.

5.1 Groupe des saxitoxines (anciennement « toxines PSP »)

Cette famille de toxines (plus de 20 analogues) est réglementée depuis 1991, par la directive 91/492/CE qui fixait un seuil de 800 µg/kg de chair de coquillage et précisait la méthode d'analyse qui devait être biologique (bio-essai souris). Cette directive offrait néanmoins la possibilité d'associer une méthode chimique. En cas de contestation des résultats, la méthode de référence devait être la méthode biologique.

Le seuil réglementaire n'a pas été modifié par les différentes évolutions de la réglementation. En revanche, depuis 2006, il est possible d'utiliser une méthode chimique validée en tant que méthode alternative au bio-essai.

Le bio-essai souris pour les toxines paralysantes a été validé par l'AOAC (Association of Official Analytical Chemist). Il permet de détecter et quantifier la toxicité globale des coquillages par comparaison à la toxicité de la saxitoxine, seule molécule pour laquelle un étalon était disponible. Ce bio-essai relativement spécifique (notamment par son extraction) ne pose pas de problème particulier d'interprétation des résultats car les toxines ciblées ont toutes le même mode d'action toxique (neurotoxicité immédiate). Il n'est actuellement pas remis en question si ce n'est pour des aspects éthiques.

5.2 Groupe de l'acide domoïque (anciennement toxines ASP)

En 1997, la réglementation a été étendue au groupe de l'acide domoïque par la directive 97/61/CE, qui fixe un seuil de 20 mg/kg de chair de coquillage et définit une méthode d'analyse validée par CLHP/UV (chromatographie liquide haute performance avec détection par ultra-violet). Cette méthode est applicable car cette famille de toxines est composée d'un analogue principal, l'acide domoïque, le plus toxique et représentant au moins 95% de la quantité de toxines présentes.

Le seuil réglementaire et la méthode de référence n'ont pas été modifiés par les différentes évolutions de la réglementation.

5.3 Famille des toxines lipophiles (anciennement toxines DSP)

Lors de la mise en place de la 1^{ère} réglementation en 1991, le terme « toxines diarrhéiques » ne faisait référence qu'à l'acide okadaïque et aux dinophysistoxines et aucun seuil quantitatif n'était proposé. La directive indiquait sans autre précision que le contrôle devait s'effectuer par des méthodes biologiques « habituelles » sur rongeur.

Dans les années qui ont suivi cette directive, d'autres familles de toxines ont été mises en évidence par ces méthodes biologiques, démontrant que le groupe des toxines lipophiles était beaucoup moins homogène que supposé en 1991.

Dans ce contexte, une réflexion communautaire a été engagée en 2001 pour affiner la réglementation des toxines lipophiles et a conduit à la décision 2002/225/CE, établissant des seuils réglementaires spécifiques pour 4 familles de toxines et précisant les méthodes de référence : bio-essai sur souris ou sur rat (pour les groupes de toxines acide okadaïque et azaspiracides). Cette décision présente les grandes lignes du protocole analytique et précise que la durée d'observation des souris doit être de 24h pour permettre la détection de l'ensemble des toxines.

La limite maximale dans les coquillages (corps entier ou toute partie consommable séparément) est de :

- 160 microgrammes en équivalent-acide okadaïque par kilogramme pour l'acide okadaïque, les dinophysistoxines et les pecténotoxines ;
- 1 milligramme en équivalent-yessotoxine par kilogramme ;
- 160 microgrammes en équivalent-azaspiracide¹ par kilogramme pour les azaspiracides.

La décision 2002/225/CE introduit la possibilité de recourir à des méthodes alternatives, à **condition que celles-ci, seules ou combinées**, permettent de détecter au moins les analogues listés ci-dessous, ne soient pas moins efficaces que les méthodes biologiques et assurent un degré équivalent de protection de la santé publique :

- acide okadaïque et dinophysistoxines (DTX1, DTX2, DTX3): une phase d'hydrolyse peut être nécessaire pour détecter la présence de DTX3 ;
- pecténotoxines: PTX1 et PTX2 ;
- yessotoxines: YTX, 45 OH YTX, Homo YTX, et 45 OH Homo YTX ;
- azaspiracides: AZA1, AZA2 et AZA3.

La toxicité totale devra être calculée à l'aide de facteurs d'équivalence toxique (TEF) fondés sur les données de toxicité disponibles pour chaque toxine.

La décision précise également que si de nouveaux analogues critiques pour la santé publique sont découverts, l'analyse devra alors les prendre en compte.

Enfin, il est indiqué que les caractéristiques de performance de ces méthodes alternatives doivent être définies après validation selon un protocole agréé à l'échelle internationale. L'article 5 de cette même décision précise que « Lorsque les résultats des analyses font apparaître des écarts entre les différentes méthodes, le dosage biologique sur souris doit être considéré comme la méthode de référence ».

En 2004, l'entrée en vigueur du règlement 853/2004 (Paquet Hygiène) n'a entraîné aucune modification ni des seuils ni des méthodes applicables à ces toxines.

En 2005, le règlement (CE) n°2074/2005 rappelle les méthodes de détection pour toutes les familles de phycotoxines. Il indique que les méthodes biologiques pourraient être remplacées par d'autres méthodes de détection dès lors que du matériel de référence concernant la détection des toxines mentionnées à l'annexe III, section VI, chapitre V, du règlement (CE) n°853/2004 sera facilement accessible, que ces méthodes auront été validées et que le règlement aura été modifié en conséquence.

5.4 Travaux internationaux

Dès 2002, le *Codex alimentarius* s'est intéressé aux biotoxines, à travers sa session sur les poissons et les produits de la pêche (CCFFP), dans l'objectif d'établir un Avant-projet de norme pour les mollusques bivalves vivants et "transformés". Un groupe d'experts mixte FAO/OMS/COI⁷ a donc été créé.

⁷ Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture/Organisation Mondiale de la Santé/Commission Océanographique Intergouvernementale

Les conclusions de ce groupe d'experts, présentées en 2005, ont suscité des avis contradictoires et de vives discussions entre les États. Il a par conséquent été décidé de créer un groupe de travail pour compléter l'expertise du rapport dans le cadre de l'élaboration de ces normes et codes d'usage.

Parallèlement à ces travaux internationaux conduits par le Codex, un groupe de travail constitué d'experts internationaux et dénommé groupe « Toxicology » a été créé par le LCR (Laboratoire Communautaire de Référence) en 2005, en vue de réaliser une **évaluation des risques liés aux toxines lipophiles** et d'établir des limites de salubrité dans les coquillages pour chacune des familles de ce groupe de toxines.

Les travaux menés par le Codex et par le LCR soulignent un manque général de données toxicologiques et la complexité du domaine relatif aux biotoxines, conduisant pour certaines familles à des divergences pour fixer la dose de référence aiguë pour l'homme (ArfD), la portion consommée à prendre en compte et les limites réglementaires dans les coquillages.

On peut raisonnablement considérer que les travaux du Codex ne devraient pas aboutir avant plusieurs années.

5.5 Travaux de l'AESA

Compte tenu de l'évolution des connaissances scientifiques, des travaux du Codex et du LCR, de la mise en évidence de toxines émergentes et de la remise en cause du bio-essai sur souris par les professionnels et certains scientifiques, la DG SANCO a saisi l'Autorité européenne de sécurité sanitaire (AESAs) fin 2006 pour répondre à ces questions.

La Commission demande à l'AESA d'évaluer les limites européennes actuelles vis-à-vis de la santé publique et les méthodes d'analyses pour les différentes toxines marines telles qu'établies dans la réglementation européenne, incluant les nouvelles toxines émergentes en s'appuyant sur les travaux disponibles réalisés antérieurement (Codex, LCR, ECVAM...).

Un groupe de travail de l'AESA rassemblant des scientifiques spécialisés dans le domaine des biotoxines a été créé. Un premier rapport portant sur la famille de l'acide okadaïque et les dinophysistoxines a été publié début 2008. Il ressort de ce rapport que l'ArfD pour ces toxines est similaire aux valeurs proposées par les GT internationaux du Codex et du LCR (0,3 µg/kg p.c.).

S'appuyant sur des données récentes, les experts du GT concluent que le bio-essai souris a 40 à 50% de chance de donner une réponse positive (mort de 2 souris sur 3) pour une teneur en acide okadaïque de 160 µg/kg dans le coquillage.

Les experts rappellent que la législation européenne permettrait le remplacement des bio-essais, à condition que des méthodes alternatives aient été validées au niveau international mais relèvent qu'au moment de leur expertise, aucune des méthodes de détection des toxines du groupe acide okadaïque et dinophysistoxines n'a été validée (voir 6.1.2). Selon les données actuellement disponibles, les essais d'inhibition des protéines-phosphatases et de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse sont les méthodes qui présentent le plus grand potentiel pour remplacer les bio-essais, mais un grand nombre d'obstacles doivent être surmontés avant que ces méthodes puissent être utilisées en routine.

In fine, la sensibilité du bio-essai souris pour une teneur en acide okadaïque au seuil réglementaire de 160 µg eq AO/kg est limitée, même avec une durée d'observation de 24h, mais aucune autre méthode de détection n'est actuellement disponible.

Enfin, les experts du GT ont considéré que dans le cadre de l'évaluation des risques aigus liés à ces toxines, il est important d'utiliser une portion consommée élevée plutôt qu'une moyenne de consommation à long terme. Ayant retenu une portion quotidienne de 400 g, les experts concluent que pour ne pas dépasser la dose tolérable aiguë (ArfD), la quantité de toxines dans les coquillages ne devrait pas excéder 45 µg équivalent AO/kg.

Les autres familles de toxines (les groupes des saxitoxines, acide domoïque, pecténotoxines, yessotoxines, brevéttoxines, azaspiracides, imines cycliques (dont les spirolides)) sont actuellement en cours d'évaluation, les travaux ne seront pas finalisés avant mi-2009.

6. CARACTERISATION D'EPISODES TOXIQUES

La caractérisation d'un épisode toxique par les toxines lipophiles repose sur :

- la mise en évidence d'une prolifération d'un genre ou d'une espèce phytoplanctonique potentiellement toxique
- une réponse positive dans le bio-essai sur souris
- une identification de toxines lipophiles dans les coquillages par analyse chimique en quantité suffisante pour expliquer la toxicité observée chez la souris.

Si la présence de phytoplancton potentiellement toxique est un élément de caractérisation d'un épisode toxique et un indicateur d'une contamination éventuelle des coquillages, il ne permet cependant pas de statuer sur la salubrité des coquillages. Celle-ci est déterminée par l'analyse du niveau de contamination directement dans les coquillages.

6.1 Méthodes de détection des toxines dans les coquillages

Depuis de nombreuses années, la sécurité sanitaire du consommateur est assurée par une démarche réglementaire (limites maximales dans les denrées alimentaires) basée sur le profil toxicologique et le seuil d'innocuité d'une substance déterminés chez le rongeur. Ces tests, qui évaluent la toxicité aiguë (DL50), à moyen terme (90 jours) ou à long terme (24 mois), sont normalisés (Organisation pour la coopération et le développement économique, OCDE). C'est ainsi qu'historiquement le test souris à été appliqué à la surveillance des phycotoxines ; les adaptations du protocole ont permis d'avoir une estimation de la quantité de certaines toxines présentes dans la chair des coquillages. Ce bio-essai permet de détecter un danger connu ou inconnu.

6.1.1 Le bio-essai souris

Explication du seuil de salubrité de 160 µg/kg pour AO, DTXs

Les seuils retenus au niveau international pour la recherche de phycotoxines diarrhéiques (acide okadaïque et dinophysistoxines) ont été déduits de données épidémiologiques obtenues au Japon. Les coquillages incriminés ont été analysés et des études de toxicologie menées sur des souris montrent qu'une unité souris (us), correspondant à la dose minimale injectée par voie intrapéritonéale qui entraîne la mort de la moitié des souris en 24h (DL50⁸ à 192 µg d'AO/kg de souris), est de l'ordre de 4 µg d'AO.

Les données issues de l'épisode du Japon ont montré que le seuil d'apparition des effets chez l'homme correspond à 12 us soit 48 µg d'AO ingéré, ou 0,8 µg/kg p.c. (poids corporel moyen de 60 kg).

Afin de tenir compte de la variabilité de sensibilité des individus exposés (âge et état de santé des consommateurs de coquillages), un facteur de sécurité de 3 a été retenu, en raison du grand nombre de données épidémiologiques disponibles, conduisant à une dose de référence aiguë de 0,27 µg d'AO/kg p.c. Rapporté à un individu moyen de 60 kg, la quantité « ingérable » est donc de 16,2 µg (0,27 µg x 60 kg).

La consommation moyenne de coquillages retenue, lors de cette première évaluation des risques réalisée dans le cadre de la directive 91/492, était de 100 g. La limite réglementaire déduite est de 160 µg éq.AO /kg.

⁸ Dose Létale 50 (dose qui entraîne la mort de la moitié des animaux suite à l'administration d'une dose unique d'une substance au cours de 24h (ligne directrice OCDE 401).

L'injection à chaque souris de l'équivalent de 25 g de chair de coquillage (soit l'équivalent de 5 g d'hépatopancreas, organe qui concentre la quasi-totalité des toxines lipophiles) permet de tester le seuil de salubrité de 160 µg éq AO /kg de chair de coquillage. En effet, chaque souris pesant 20 g répond à 4 µg éq AO (correspondant à la DL50 de 192 µg d'AO/kg de souris). Le test est considéré positif si 2 souris sur trois décèdent et négatif si une seule souris décède.

La justification du temps d'observation de 24 heures

Le temps d'observation de 24 heures est indispensable pour contrôler :

- le niveau des phycotoxines lipophiles réglementaires hors yessotoxines, c'est-à-dire 160 µg équivalent AO/kg de chair de coquillage liée à mortalité de la souris à 24h,
- le niveau des dérivés DTX3,
- le niveau en azaspiracides.

a. S'agissant de la nécessité de contrôler le niveau des phycotoxines lipophiles réglementaires hors yessotoxines, c'est-à-dire 160 µg équivalent AO/kg de chair de coquillage liée à mortalité de la souris à 24h

Des travaux publiés entre 1985 et 1991 proposaient des courbes dose-réponse de mortalité chez la souris après administration par voie intra-péritonéale (IP) de toxines issues de moules naturellement contaminées par une efflorescence de *Dinophysis* et d'un standard d'acide okadaïque. Ils proposaient également une étude comparant les délais de survie de souris dans le bio-essai par voie IP et ceux de sourceaux intoxiqués par voie orale (Marcaillou-Le Baut *et al.*, 1985 ; Marcaillou-Le Baut et Masselin 1990; Marcaillou *et al.*, 1991). Les auteurs concluaient qu'il n'y avait pas de différence significative entre le bio-essai à 5h et à 24h.

Ces résultats n'ont pas été confirmés par les travaux de Vale et Sampayo (1996) et de Vieytes *et al.* (1997) qui ont montré que les mortalités de souris à 5 heures sont observées seulement à des concentrations supérieures ou égales à 400 µg/kg de chair pour l'acide okadaïque (soit plus de 2 fois le seuil de 160 µg/kg).

Sur la base de ces études, le LCR a réaffirmé en 1998 la nécessité de maintenir le seuil de salubrité à 24 et non à 5h pour couvrir le risque pour le consommateur en regard de l'AO et ses analogues (Miguez *et al.*, 1998).

b. S'agissant de la nécessité de contrôler le niveau des dérivés DTX3

Les DTX3 forment un groupe de métabolites issus de l'estérification de la toxine native (AO ou DTX1 ou DTX2) par une série d'acides gras. Ils ont été mis en évidence dès le début des années 1980 par Yasumoto *et al.* (1984). D'après Holland *et al.* (2007), les esters sont 2 à 3 fois moins toxiques par voie IP que la molécule native. En revanche, ils ont une toxicité similaire à la molécule native par voie orale chez la souris. Enfin, les données épidémiologiques montrent que les DTX3 sont toxiques pour l'homme (Vale and Sampayo, 1999).

Toujours selon Holland *et al.* (2007), ces esters sont présents à des taux variables mais significatifs dans les différents types de coquillages : de 10 à 50% dans des moules (*Mytilus edulis*), de 10 à 85% dans des Coquilles Saint-Jacques et > 90% dans des huîtres (*Crassostrea gigas*).

En France, leur recherche systématique par analyse chimique dans les échantillons de coquillages ayant donné un bio-essai sur souris positif a mis en évidence la présence de DTX3 dans des proportions allant de 50% à 100% de la concentration totale en équivalent AO (Amzil et Mathias, 2006 ; études toxines émergentes depuis 2002 dans le cadre de convention DPMA/Ifremer).

Il apparaît donc indispensable que le délai de 24h soit appliqué pour tenir compte des DTX3, dont l'expression de la toxicité est moins rapide que l'AO en raison de leur structure chimique (plus haut poids moléculaire et apolaires).

c. S'agissant de la nécessité de contrôler le niveau en azaspiracides

Les azaspiracides ont été découverts après plusieurs foyers d'intoxication humaine (Pays-Bas, France, Irlande, Italie) à la fin des années 1990 à partir de moules d'Irlande. Au moment de ces intoxications, l'Irlande pratiquait un contrôle par bio-essais avec le seuil fixé à 5h d'observation qui

n'a pas permis de détecter cette toxicité. C'est à cette occasion que l'Irlande a remis en œuvre le test à 24h, en accord avec les recommandations du réseau des LCR/LNRs.

d. Bilan sur les avantages et les inconvénients du bio-essai souris

- Il présente de bonnes performances pour la mise en évidence d'une toxicité globale au regard de l'ensemble des familles de toxines lipophiles ;
- Il est le seul test disponible à permettant la détection en routine d'une toxicité nouvelle ou émergente ou de nouveaux analogues d'une toxine déjà connue ;
- Il permet d'obtenir une réponse qualitative au seuil de salubrité et donne des indications sur la nature des toxines impliquées par les symptômes des souris ;
- Il pose des problèmes de spécificité et de sensibilité en partie liées à la variabilité du matériel biologique (la souris) ;
- Il impose des exigences logistiques (transfert en réseaux, qualification du personnel, approvisionnement en souris, coût) ;
- Il est effectué par voie intra-péritonéale (IP) alors que l'homme est exposé par voie orale.

e. Tests de toxicité cellulaire

Par rapport au test de DL50 qui est basé sur la mortalité des souris, les tests de toxicité cellulaire *in vitro* sont basés sur la mort cellulaire (IC50) et l'observation des mécanismes entraînant cette mort (par exemple cytotoxicité, viabilité cellulaire, apoptose...). Ces tests non spécifiques permettent de détecter toute substance toxique pour la cellule. Ils sont reconnus dans les protocoles d'évaluation des substances chimiques (en particulier REACH) et validés par l'ECVAM. Des tests plus spécifiques sont basés sur l'altération d'un processus biologique (inhibition enzymatique, liaison à un récepteur, atteintes de macromolécules...). Ces tests sont en cours de développement dans un programme de recherche piloté par l'Afssa pour mieux comprendre l'atypie de certains épisodes toxiques mais ne sont pas adaptés à un dispositif de surveillance.

Conclusions sur le bio-essai sur souris

Les bio-essais souris ou rats utilisés pour le dépistage officiel des phycotoxines lipophiles ne sont pas validés selon les normes internationales (contrairement au bio-essai pour les phycotoxines paralysantes), mais bénéficient de 30 ans de pratique au niveau mondial.

Dans le bio-essai souris visant à détecter les toxines lipophiles, une durée d'observation de 5h ne permettrait de détecter que des teneurs fortes, au moins 2 fois supérieures au seuil de salubrité. Une durée d'observation de 24h est indispensable pour détecter le seuil de 160 µg eq AO/kg, les DTX3 et les azaspiracides.

Enfin, le bio-essai souris permet de détecter des toxines émergentes potentiellement toxiques pour l'homme.

6.1.2 Autres méthodes de détection

Pour pallier certains problèmes posés par le bio-essai souris et suite à la séparation des phycotoxines lipophiles en 4 familles distinctes avec un seuil de salubrité fixé pour chacune d'entre elles, la décision 2002/225/CE a retenu la possibilité d'utiliser des méthodes « alternatives » pour la détection des phycotoxines lipophiles réglementées à condition que la méthode choisie ou la combinaison de méthodes ne soit pas moins efficace que le bio-essai souris officiel pour protéger le consommateur, permettent de détecter au moins les quatre familles de phycotoxines (acide okadaïque/dinophysistoxines, pectenotoxines, yessotoxines, azaspiracides) et qu'elles aient fait l'objet d'une analyse inter-laboratoires au niveau international.

Dans les textes réglementaires, les méthodes alternatives ont vocation à substituer le bio-essai souris dans le cadre de la surveillance des phycotoxines dans les coquillages à des fins de gestion des zones de production (ouverture/fermeture). En revanche, ces méthodes ne permettront pas d'assurer une vigilance quant à l'émergence de nouvelles toxines ou de nouveaux analogues.

Dans ce contexte, la Commission a financé 3 projets dans le cadre du 6^{ème} PCRD en vue de développer des méthodes de remplacement du bio-essai :

- BIOTOX : Development of cost-effective tools for risk management and traceability systems for marine biotoxins in seafood. Terminé depuis mars 2008.
- DetecTox : Development of an SPR-based biosensor for the detection of lipophilic phycotoxins in shellfish residues.
- BIOTOXMARIN : Development of novel analytical tools for the detection of marine biotoxins.

Les travaux de développement de méthodes de substitution du bio-essais sur souris se basent sur 3 types d'approches :

- **physico-chimique** : ces méthodes permettent la séparation et la quantification des toxines individuellement, mais ne ciblent que celles pour lesquelles un étalon est disponible. Elles ne permettent pas de détecter et quantifier de nouveaux analogues ou de nouvelles toxines. Elles ne donnent pas d'indication sur le niveau de toxicité.
- **immuno-chimique** : elles permettent la détection et la quantification des toxines (antigènes) possédant une structure spécifique reconnue par le (ou les) anti-corps utilisés dans le test. Elles donnent une réponse globale sans apporter d'information sur le niveau de toxicité des analogues détectés. Elles peuvent détecter de nouveaux analogues si ceux-ci sont reconnus par l'anti-corps, mais ne permettent pas la détection de nouvelles familles de toxines.
- **fonctionnelle** : elles permettent la détection et la quantification de l'ensemble des toxines possédant un même mécanisme d'action. Elles donnent une réponse globale. Elles permettent la détection de nouveaux analogues, mais pas la détection de nouvelles familles de toxines dont le mécanisme d'action est différent.

a. L'analyse physico-chimique par CL-SM/SM

Les méthodes développées sont basées sur un couplage de la chromatographie liquide avec un spectromètre de masse en tandem (CL-SM/SM). Elles visent à détecter et à quantifier l'ensemble des phycotoxines lipophiles en une seule analyse (méthode multi-toxines). Grâce à la spectrométrie de masse, elles permettent l'identification formelle des différentes phycotoxines avec une grande sensibilité et grande spécificité.

Actuellement, le développement de ces méthodes se heurte au problème de disponibilité d'étalons des analogues de toxines lipophiles de base. En effet, elles ne sont pas toutes disponibles et proviennent essentiellement d'un seul fournisseur (National Research Council, Canada). Les étalons disponibles sont les suivants :

- AO et DTX1
- PTX2 et PTX2-séco acide
- AZA1
- YTX
- SPX1 (13 déméthyle spirolide C)
- GYM (gymnodimine)

Ainsi, les méthodes développées permettent la détection et la quantification des toxines de base pour lesquelles un étalon est disponible, tandis que les analogues de toxines sont détectées mais non quantifiables. Dans l'attente d'étalons, les scientifiques procèdent à une quantification par extrapolation à partir de l'étalon disponible représentatif de sa famille. Par exemple, la DTX2 est quantifiée à partir de l'AO. Une telle approche repose sur le postulat que toutes les molécules d'une même famille ont le même facteur de réponse instrumental. Au niveau national, la méthode d'analyse chimique en CL-SM/SM est actuellement utilisée en complément au test-souris pour acquérir des données sur la concordance des résultats test-souris / analyse chimique (PHYC-lfremer et LNR-Afssa).

Par ailleurs, pour pouvoir comparer le bioessai sur souris qui donne une réponse toxicologique et les méthodes physico-chimiques qui donnent une réponse moléculaire, il est nécessaire de disposer des facteurs d'équivalence toxique (Toxic equivalent factors ; TEF).

A ce jour, peu de valeurs de TEF sont déterminées et/ou validées au niveau international. Dans son Avis de 2008, l'AESA a proposé des TEF pour les DTX1 (1), DTX2 (0,6) par rapport à l'acide okadaïque.

L'un des objectifs du projet BIOTOX réalisé dans le cadre du 6^{ème} PCRD était de développer et valider une ou plusieurs méthodes CL-SM pour l'analyse des toxines lipophiles. En raison de résultats d'essais inter-laboratoires non satisfaisants, ce projet n'a pas permis de valider une méthode unique d'analyse par CL-SM. Les difficultés relevées tiennent à la complexité de l'utilisation de l'outil SM, à la diversité des analyseurs commercialement disponibles et à la nature de la matrice coquillage. Les réflexions conduites dans le prolongement de ce programme de recherche évoquent la possibilité de suivre une approche basée sur des critères de performances, donnant ainsi plus de liberté quant au choix de la méthode, dans la même ligne que les conclusions de l'AESA.

Bilan sur les avantages et les inconvénients de l'analyse chimique

- Elle est spécifique et sensible pour les toxines connues ;
- Elle permet de déterminer le profil toxinique (nature et quantité individuelles) des toxines connues ;
- Elle permet de fournir une réponse qualitative et/ou quantitative avec une limite de quantification très inférieure au seuil de salubrité et avec une variabilité inférieure à celle du bio-essai (< à 10%) ;
- Elle ne permet pas en routine, l'identification d'une nouvelle toxine ou de nouveaux analogues d'une toxine déjà connue ;
- Elle a un temps de mise en œuvre plus court que le bio-essai ;
- Elle n'est pas actuellement validée au niveau international, pour permettre un transfert au réseau de surveillance ;
- Elle nécessite un niveau de qualification élevé du personnel.

b. Les méthodes immuno-chimiques

Un test ELISA est spécifique d'une famille de toxines (structure). Plusieurs kits ELISA ont été développés pour l'acide okadaïque et un test est en cours de validation pour les yessotoxines. Ces méthodes restent peu utilisées et peuvent donner des réactions croisées sources de résultats faux-positifs. De plus, il n'est pas possible avec un seul test de couvrir toutes les familles de toxines lipophiles.

c. Les méthodes fonctionnelles

Un test fonctionnel est spécifique d'un mécanisme d'action. Des travaux basés sur l'inhibition des protéines phosphatases ont fait l'objet de développements et ont abouti à deux types de tests qui diffèrent par la technique de détection (colorimétrique et fluorimétrique). Pour le groupe des toxines lipophiles, seule la famille de l'acide okadaïque peut être quantifiée par ces tests.

Bilan des avantages et inconvénients des méthodes immuno-chimiques et fonctionnelles

- Elles sont rapides et sensibles avec des matrices bien définies mais leur fiabilité n'est pas connue avec des coquillages de diverses espèces et origines ;
- Elles ont une spécificité limitée (immuno-chimie) à élevée (fonctionnelle)
- Elles permettent de détecter la présence d'une famille de toxines mais pas de déterminer le profil toxinique au sein de cette famille ;
- Elles ne permettent pas de mettre en évidence de nouvelles toxines ;
- Elles devraient permettre de fournir une réponse au moins semi-quantitative et quantitatives (selon les kits) ;
- Elles ont des exigences logistiques globalement favorables au transfert en réseau ;
- Elles n'ont pas fait l'objet d'essais inter-laboratoires de validation internationale ;
- Elles pourraient servir à des auto-contrôles une fois validés au niveau communautaire.

Conclusions sur les autres méthodes de détection

Les méthodes les plus avancées pour détecter l'ensemble des phycotoxines lipophiles visées par la réglementation sont basées sur la chromatographie liquide en couplage avec un spectromètre de masse en tandem (CL-SM/SM) mais les résultats d'essais inter-laboratoires ont montré la difficulté de les quantifier de manière reproductible en appliquant une méthode unique. Ainsi, il pourrait être proposé d'adapter par chaque laboratoire la méthode à son propre instrument et de faire une validation intra-laboratoire basée sur des critères de performance.

Des travaux doivent être poursuivis pour :

- évaluer la pertinence et mettre en place les critères de performance ;
- poursuivre les travaux pour la production des étalons ;
- poursuivre la détermination des TEF pour pouvoir pondérer les résultats des analyses chimiques ;
- mener une réflexion au niveau national pour adapter le dispositif de surveillance des coquillages ; en particulier pour implanter la technique dans de nouveaux laboratoires ce qui nécessitera un investissement important en terme d'équipement et de formation de personnel qualifié.

6.2 Point sur la situation arcachonnaise

Les tableaux 1 et 2 présentent le suivi des analyses réalisées à Arcachon en 2007 puis en 2008 par bio-essai souris et par analyse chimique (résultats Ifremer).

Eléments concernant interprétation de résultats :

- l'interprétation ne porte que sur les analyses pour lesquelles les résultats bio-essais et chimiques sont disponibles ;
- les données doivent être interprétées avec précaution car le bio-essai exprime une activité toxique globale, prenant en compte toutes les molécules actives, avec d'éventuels effets synergiques ou antagonistes entre elles et avec la matrice alors que l'analyse chimique mesure des quantités des toxines connues. Pour une meilleure interprétation des deux méthodes, il faudrait connaître les TEF pour chacune des toxines et pondérer les résultats obtenus par analyse chimique. Ces TEF n'ont été établis que pour DTX1 et DTX2 en 2008 par l'AESA. Par souci de simplification, les données chimiques sont comparées au seuil réglementaire avec tous les TEF égaux à 1, ce qui correspond au pourcentage de non concordance le plus élevé. En effet, dans certaines situations un bio-essai peut être positif avec des quantités de toxines inférieures à 160 µg/kg.

D'autres éléments sont susceptibles d'influencer la concordance des résultats du bio-essai et de l'analyse chimique, notamment :

- la variabilité de réponse inter-individuelle des souris ;
- un « effet de matrice » ;
- la présence de composés pouvant interférer lors du bio-essai souris, toxique par voie intrapéritonéale chez la souris mais non toxique chez l'homme par voie orale (exemple des acides gras) ;
- la présence de nouvelle(s) toxine(s) détectée(s) par bio-essai.

Tableau 1 : Année 2007 - comparaison par rapport au seuil réglementaire des résultats des analyses par bio-essai souris (BE) et analyses chimiques (C) réalisées sur des coquillages du bassin d'Arcachon (Arguin Sud et Grand Banc)

| | | Période | Nb analyses | BE + C + (%) | BE - C - (%) | BE + C - (%) | BE - C + (%) | Concordance (%) | Non concordance (%) | Commentaires |
|----------------------------|---------|----------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-----------------|---------------------|--|
| A R G U I N | Huîtres | 05/02 au 24/09 | 14 | 0 | 93 | 7 | 0 | 93 | 7 | 1 résultat non concordant toxicité non expliquée fin mars |
| | Moules | 05/02 au 27/08 | 11 | 0 | 73 | 27 | 0 | 73 | 27 | 3 résultats non concordants toxicité non expliquée (fin mars ; mi-avril ; mi-juin) |
| G D | Huîtres | 12/03 au 03/09 | 10 | 0 | 100 | 0 | 0 | 100 | 0 | Pas de toxicité |
| B A N C | Moules | 18/06 au 03/09 | 5 | 0 | 80 | 20 | 0 | 80 | 20 | 1 seul résultat non concordant toxicité non expliquée mi-juin |

Tableau 2 : Année 2008 - comparaison par rapport au seuil réglementaire des résultats des analyses par bio-essai souris (BE) et analyses chimiques (C) réalisées sur des coquillages du bassin d'Arcachon (Arguin Sud et Grand Banc)

| | | Période | Nb analyses | BE + C + (%) | BE - C - (%) | BE + C - (%) | B - C + (%) | Concor-dance | Non concor-dance | Commentaires |
|----------------------------|----------------------------|----------------|-------------------------------------|-------------------------------------|--------------|--------------|-------------|--------------|------------------|---|
| A R G U I N | Huîtres | 11/02 au 15/07 | 16 | 0 | 100 | 0 | 0 | 100 | 0 | Pas de toxicité |
| | | 21/07 au 13/08 | 5 | 0 | 40 | 60 | 0 | 40 | 60 | 3 résultats non concordants Toxicité non liée à une toxine connue |
| | | 18/08 au 08/09 | 5 | Bio-essais négatifs ; pas de chimie | | | | | | Pas de toxicité |
| | Moules | 11/02 au 14/04 | 5 | 0 | 100 | 0 | 0 | 100 | 0 | Pas de toxicité |
| | | 28/04 au 12/05 | 3 | 67 | 0 | 33 | 0 | 67 | 33 | Episode de toxicité expliqué par AO et DTXs (1 résultat à 87 µg/kg en fin épisode) |
| | | 19/05 au 26/05 | 2 | 0 | 50 | 50 | 0 | 50 | 50 | Période transition entre épisode AO/DTXs et YTXs |
| | | 02/06 au 21/07 | 8 | 0 | 13 | 88 | 0 | 13 | 88 | Episode de toxicité expliqué par les YTXs 126 à 680 µg/kg (seuil réglementaire 1000 µg/kg) |
| | | 28/07 au 18/08 | 4 | 0 | 25 | 75 | 0 | 25 | 75 | 3 résultats non concordants Toxicité non liée à une toxine connue |
| | 25/08 au 08/09 | 3 | Bio-essais négatifs ; pas de chimie | | | | | | Pas de toxicité | |
| | G D B A N C | Huîtres | 28/04 au 28/07 | 15 | 0 | 100 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| 04/08 | | | 1 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | 100 | 1 seul résultat Toxicité non liée à une toxine connue |
| 11/08 au 08/09 | | | Bio-essais négatifs ; pas de chimie | | | | | | Pas de toxicité | |
| Moules | | 28/04 au 12/05 | 3 | 67 | 0 | 33 | 0 | 67 | 33 | Episode de toxicité expliqué par AO et DTXs 1 résultat à 91 µg/kg en fin épisode) |
| | | 19/05 au 02/06 | 3 | 0 | 100 | 0 | 0 | 100 | 0 | Pas de toxicité 1 résultat concordant avec 127 µg/kg |
| | | 09/06 au 15/07 | 6 | 0 | 67 | 33 | 0 | 67 | 33 | Episode de toxicité expliqué par les YTXs 81 à 388 µg/kg (seuil réglementaire 1000 µg/kg) |
| | | 21/07 au 18/08 | 5 | 0 | 100 | 0 | 0 | 100 | 0 | Pas de toxicité |
| | | 25/08 au 08/09 | Bio-essais négatifs ; pas de chimie | | | | | | Pas de toxicité | |

Bilan 2008 :

- 1 épisode de toxicité expliquée par les toxines AO/DTXs affectant uniquement les moules à Arguin et Grand Banc ; fin avril à mi-mai ;
- 1 épisode de toxicité expliquée par les Yessotoxines (YTXs) affectant uniquement les moules à Arguin et Grand Banc ; début juin à mi-juillet ;
- 1 épisode de toxicité non expliqué affectant moules (Arguin et Grand Banc) et huîtres (Arguin) ; fin juillet à mi-août ;
- Arguin est plus affecté que Grand Banc.

Concernant la concordance entre les outils de détection et la notion de toxicité atypique

Selon les données extraites par Ifremer de la base de données Quadrigé⁹ au 8 septembre 2008, 3198 échantillons de coquillages ont été traités sur la période 2006-2008 pour la détection de toxines lipophiles sur l'ensemble du littoral français : bio-essai souris et/ou analyses chimiques par CL-SM/SM.

Sur les 3189 échantillons analysés par les 2 méthodes :

- 2618 échantillons ont conduit à un résultat négatif dans le bio-essai souris (dont 2440 avec 3 souris survivantes et 178 avec 2 souris survivantes),
- 571 échantillons ont conduit à un résultat positif dans le bio-essai souris (dont 393 avec 3 souris mortes et 178 avec 2 souris mortes).

Echantillons négatifs dans le bio-essai souris

2618 échantillons étaient négatif en bio-essai souris.

321 ont également été analysés par CL-SM/SM.

Parmi ces 321 échantillons, 14 échantillons étaient positifs en chimie (valeur et répartition géographique dans le tableau 3). Il conviendra d'approfondir les discordances observées avec les valeurs chimiques les plus élevées à la lumière des données des programmes de recherche en cours.

Tableau 3 : répartition géographique de 14 échantillons ayant conduit à des résultats négatifs par bio-essai et positifs par analyse chimique (AO+DTXs+PTXs \geq 160 μ g éq. AO/kg ou AZAs \geq 160 μ g éq. AZA/kg)

| Zone Quadrigé | Nombre d'échantillons concernés | Valeur max trouvée en AO+DTXs+PTXs | Valeur max trouvée en AZAs |
|-----------------------------|---------------------------------|------------------------------------|----------------------------|
| 018 Flamanville | 2 | | 461 |
| 035 Les Abers | 2 | | 274 |
| 040 Baie d'Audierne | 1 | 228 | |
| 060 Estuaire de la Loire | 1 | 406 | |
| 077 Bassin d'Arcachon | 1 | 167 | |
| 083 Etang de Salses Leucate | 3 | 988 | |
| 088 Côte languedocienne | 1 | 403 | |
| 114 Etangs de Diana-Urbino | 3 | 330 | |

A noter que dans ces 321 échantillons analysés par CL-SM/SM, il a été détecté dans 81 échantillons la présence de SPXs ou dans 17 échantillons la présence de YTXs, à des concentrations inférieures au seuil de sécurité sanitaire (quand il existe, c'est-à-dire seulement pour les YTXs).

Echantillons positifs dans le bio-essai souris

Sur les 571 échantillons ayant donné un résultat positif par le bio-essai souris, 368 ont été analysés par CL-SM/SM. Parmi ceux ci :

- 171 échantillons ont conduit à des résultats positifs par CL-SM/SM,
- 197 échantillons ont conduit à des résultats négatifs par CL-SM/SM (AO+DTXs+PTXs < 160 μ g éq. AO/kg).

La répartition géographique de ces échantillons est détaillée dans le tableau 4.

⁹ Les données de Quadrigé ne sont pas encore entièrement validées pour cette période. Les résultats sont donc susceptibles d'être modifiés ultérieurement.

Tableau 4 : répartition géographique des 197 échantillons ayant conduit à des résultats positifs par bio-essai et négatifs par analyse chimique

| zone Quadrigé | coquillages concernés | Année | nombre d'échantillons concernés |
|--------------------------------|-----------------------|-------|---|
| 010 Antifer | moules | 2007 | 2 |
| 036 Iroise | donax | 2007 | 1 |
| 039 Baie de Douarnenez | donax | 2007 | 1 |
| 040 Baie d'Audierne | donax | 2007 | 1 |
| 041 Iles de Glénan | palourdes roses | 2006 | 2 |
| | | 2007 | 2 |
| 042 Bénodet | moules | 2007 | 1 |
| 043 Concarneau | moules et coques | 2007 | 5 |
| 044 Aven, Belon et Laïta | huîtres | 2006 | 1 |
| 045 Rade de Lorient | moules | 2006 | 5 |
| | | 2007 | 6 |
| | | 2008 | 1 |
| 046 Baie d'Etel | donax | 2006 | 1 |
| | | 2007 | 10 |
| | | 2008 | 1 |
| 047 Rivière d'Etel | huîtres et moules | 2006 | 4 |
| | | 2007 | 3 |
| | | 2008 | 1 |
| 048 Courreaux de Belle île | coquilles St Jacques | 2007 | 2 |
| 049 Baie de Quiberon | huîtres | 2006 | 1 |
| 050 Le Pô | huîtres et palourdes | 2007 | 3 |
| 051 Rivière de Crach | palourdes | 2007 | 4 |
| 052 St Philibert - Le Brénéguy | moules et palourdes | 2006 | 1 |
| | | 2007 | 2 |
| 056 Rivière de Pénerf | moules | 2007 | 3 |
| 057 Baie de Vilaine | moules et huîtres | 2006 | 3 |
| | | 2007 | 9 |
| | | 2008 | 3 |
| 059 Traicts du Croisic | huîtres et coques | 2007 | 1 |
| | | 2008 | 1 |
| 060 Estuaire de la Loire | moules | 2007 | 1 |
| | | 2008 | 1 |
| 065 Pertuis Breton | moules | 2006 | 2 |
| 066 Baie de l'Aiguillon | moules | 2007 | 1 |
| 077 Bassin d'Arcachon | moules + huîtres | 2006 | 30 |
| | | 2007 | 5 |
| | | 2008 | 20 (dont 4 éch. avec des teneurs en YTXs entre 388 et 680) |
| 083 Étang de Salses Leucate | moules et huîtres | 2006 | 8 |
| | | 2007 | 14 |
| | | 2008 | 11 |
| 089 Etangs palavasiens | moules et huîtres | 2006 | 1 |
| | | 2007 | 16 |
| | | 2008 | 4 |
| 114 Etangs de Diana- Urbino | moules | 2008 | 2 |
| | | | |
| total période | | | 197 |
| total 2006 | | | 59 |
| total 2007 | | | 93 |
| total 2008 | | | 45 |

Dans une partie de ces échantillons, il a été observé la présence de SPXs (la plupart du temps en

faible quantité), et/ou d'AZAs (en très faible quantité), et/ou de YTXs (en quantités variables, mais inférieures au seuil de sécurité sanitaire).

En conclusion

- La comparaison entre l'analyse chimique et le bio-essai souris doit être prudente mais corrobore le fait que le bio-essai souris détecte une toxicité beaucoup plus globale que celle induite par les toxines connues et recherchées dans l'analyse CL-SM/SM.

- La présence de bio-essai positif sans mise en évidence de toxine connue est observée dans de nombreuses zones réparties sur l'ensemble du littoral ; 25% de ces situations sont observées à Arcachon et elles ont été plus fréquentes en 2007 qu'en 2006.

7. POINT SUR LA SITUATION DANS LES AUTRES PAYS DE L'UE

Les rapports d'inspection de l'Office Alimentaire et Vétérinaire (OAV) permettent d'obtenir des informations sur les pratiques des autres pays concernant le bio-essai souris pour les toxines lipophiles.

Ainsi, le bio-essai souris était appliqué conformément aux prescriptions de la décision 2002/225 par :

- la Belgique (inspections 2001 et 2005),
- l'Italie (inspection 2004),
- l'Espagne (inspection 2004),
- le Danemark (inspection 2004),
- l'Irlande (inspection 2001).

A noter que l'Italie réalise un bio-essai sur souris avec une durée d'observation de 5h avec l'objectif unique de surveiller les yessotoxines. Cette mesure est liée au seuil spécifique de ces toxines, de 1 mg/kg de coquillages (comparé aux autres toxines lipophiles dont le seuil est 160 µg/kg).

En revanche, l'OAV a noté que le bio-essai souris n'était pas appliqué conformément aux prescriptions de la décision 2002/225 par :

- l'Allemagne (inspections 2002 et 2005),
- le Royaume-Uni (inspection 2004),
- le Portugal (inspection 2004),
- les Pays-Bas (inspection 2001).

Dans ses rapports d'inspection, l'Office rappelle que les prescriptions communautaires actuellement en vigueur concernant les biotoxines marines devraient être respectées et invitent les autorités compétentes à entreprendre des actions afin de remédier aux lacunes concernant les méthodes utilisées. Le rapport d'inspection du Portugal conclut que les méthodes alternatives ne seront reconnues au niveau international que lorsque des matériaux de références seront disponibles.

8. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS

Concernant la durée d'observation du bio-essai souris

Sur la base de l'argumentation présentée, l'Afssa conclut qu'il est indispensable que le délai de 24h d'observation dans le bio-essai souris soit appliqué pour permettre la détection du seuil de 160 µg eq AO/kg, les DTX3 et les azaspiracides et donc assurer la sécurité sanitaire du consommateur puisque ces toxines ont toutes été impliquées dans des intoxications humaines de type diarrhémique.

Concernant les méthodes de détection alternatives au bio-essai souris

Dans le cadre de la surveillance des phycotoxines dans les coquillages à des fins de gestion des zones de production (ouverture/fermeture), les méthodes chimiques multi-toxines de type CL-SM/SM sont les plus avancées mais nécessitent des travaux complémentaires pour pouvoir être appliquées à large échelle. Plusieurs méthodes immuno-chimiques ou fonctionnelles permettent

de détecter des familles de toxines mais elles devraient être utilisées en combinaison, pour couvrir les 4 familles réglementées.

Aucune de ces méthodes alternatives ne permet d'assurer de vigilance et de détecter de toxines émergentes potentiellement toxiques pour l'homme.

Aucune des méthodes de détection des toxines du groupe acide okadaïque et dinophysistoxines n'a été validée par des essais inter-laboratoires. Dans l'attente de disposer d'une méthode chimique multi-toxines validée à l'échelle internationale, il pourrait être envisagé, avec les instances réglementaires nationales et communautaires :

- de reconnaître une validation intra-laboratoire selon des critères de performance ;
- d'analyser les familles de toxines séparément (par exemple, sur les 4 familles de toxines lipophiles, cibler 1 ou 2 familles par analyse) ;
- de considérer que tous les facteurs d'équivalence toxique (TEF) sont égaux à 1, en l'absence de TEF validés pour l'ensemble des toxines ;
- de considérer que toutes les molécules actives apparentées répondent de manière égale, en l'absence de certains étalons.

L'utilisation de cette méthode chimique nécessiterait aussi d'adapter le dispositif national de surveillance des coquillages.

9. BIBLIOGRAPHIE

Liste des textes réglementaires

Directive du Conseil 15 juillet 1991 fixant les règles sanitaires régissant la production et la mise sur le marché de mollusques bivalves vivants (91/492/CEE).

Directive 97/61/CE du Conseil du 20 octobre 1997 modifiant l'annexe de la directive 91/492/CEE fixant les règles sanitaires régissant la production et la mise sur le marché des mollusques bivalves vivants.

Décision de la Commission 2002/225/CE du 15 mars 2002 fixant les modalités d'application de la directive 91/492/CEE du Conseil en ce qui concerne les limites maximales et les méthodes d'analyse de certaines biotoxines marines dans les mollusques bivalves, les échinodermes, les tuniciers et les gastéropodes marins.

Règlement (CE) n°853/2004 du Parlement Européen et du Conseil du 29 avril 2004 fixant des règles spécifiques d'hygiène applicables aux denrées alimentaires d'origine animale.

Règlement (CE) n°2074/2005 de la Commission du 5 décembre 2005 établissant les mesures d'application relatives à certains produits régis par le règlement (CE) n°853/2004 du Parlement européen et du Conseil et à l'organisation des contrôles officiels prévus par les règlements (CE) n°854/2004 du Parlement européen et du Conseil et (CE) n°882/2004 du Parlement européen et du Conseil, portant dérogation au règlement (CE) n°852/2004 du Parlement européen et du Conseil et modifiant les règlements (CE) n°853/2004 et (CE) n°854/2004.

Règlement (CE) n°1664/2006 de la Commission du 6 novembre 2006 modifiant le règlement (CE) no 2074/2005 en ce qui concerne les mesures d'application relatives à certains produits d'origine animale destinés à la consommation humaine et abrogeant certaines mesures d'application.

Références scientifiques

AESA – Autorité Européenne de Sécurité Alimentaire, 2008. Marine biotoxins in shellfish - okadaic acid and analogues - Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain. Question number: EFSA-Q-2006-065A. *The EFSA Journal* (2008) 589, 1-62.

AFSSA – Agence française de Sécurité Sanitaire des Aliments, 27 octobre 2006. Avis et rapports relatifs à l'évaluation du dispositif de surveillance du milieu et à l'évaluation du risque lié à la consommation des coquillages, notamment dans la situation du bassin d'Arcachon. www.afssa.fr

Amzil Z., Fresnel J., Le Gal D., Billard C., 2001. Domoic acid accumulation in French shellfish in relation to toxic species of *Pseudo-nitzschia multiseriata* and *P. pseudodelicatissima*. *Toxicon* 39 (8), 1245-1251.

Amzil Z., Mathias A., 2006. First report on detection of okadaic acid 7-O-acyl-ester derivatives (DTX-3) in French shellfish. In *Molluscan Shellfish Safety*. Henshilwood K., Deegan B., McMahon T., Cusack C., Keaveney S., Silke J., O' Cinneide M., Lyons D. and Hess P. (eds), 150-161.

Amzil Z., Sibat M., Royer F., Masson N., Abadie E., 2007. Report on the First Detection of Pectenotoxin-2, Spirolide-A and Their Derivatives in French Shellfish. *Mar. Drugs* 5, 168-179.

Amzil, Z., Sibat M., Royer F., Savar V., 2008. First report on azaspiracids and yessotoxins groups detection in French shellfish. *Toxicon* 52, 39-48.

- Aune, T. (2001). Risk assessment of toxins associated with DSP, PSP and ASP in seafood. In : De Koe, W.J. *et al.* (eds.) Mycotoxins and phycotoxins in perspective at the Turn of the millenium. *Proceedings of the Xth International IUPAC symposium on Mycotoxins and Phycotoxins* – 21-25 May, 2000 Guarujá (Brazil), Wageningen, the Netherlands, Ponsen & Looyen, pp 515-526.
- Cordier, S., C. Monfort, et al. (2000). Ecological analysis of digestive cancer mortality related to contamination by diarrhetic shellfish poisoning toxins along the coasts of France. *Environ Res* **84**(2): 145-50.
- Creppy, E. E., A. Traore, et al. (2002). Recent advances in the study of epigenetic effects induced by the phycotoxin okadaic acid. *Toxicology* **181-182**: 433-9.
- Frémy J.P. et Lassus P., 2001. *Toxines d'algues dans l'alimentation*. Ed. Ifremer, 560 p.
- Fujiki, H., M. Suganuma, et al. (1988). Diarrhetic shellfish toxin, dinophysistoxin-1, is a potent tumor promoter on mouse skin. *Jpn J Cancer Res* **79**(10): 1089-93.
- Holland, P., Mc Nabb P., Mackensie L., Selwood A., Quilliam M, (2007). Esterified forms of okadaic acid and dinophysistoxins in New Zealand shellfish. *International Conference on Molluscan Shellfish Safety (ICMSS07)*, Blenheim, Nouvelle-Zélande, 18-13 March 2007.
- Lawrence, J. F., M. Maher, et al. (1994). Effect of cooking on the concentration of toxins associated with paralytic shellfish poison in lobster hepatopancreas. *Toxicon* **32**(1): 57-64.
- Marcaillou, C., P. Masselin, et al. (1991). Comparaison des méthodes chimiques et biologiques pour la détermination des toxines diarrhéiques dans les moules. *Colloque sur les biotoxines marines*, Paris, CNEVA.
- Marcaillou-Le Baut, C., D. Lucas, et al. (1985). Dinophysis acuminata toxin : Status of toxicity bioassays in France. *Toxic Dinoflagellates*. W. Anderson, and Baden, Editors: 485-488.
- Marcaillou-Le Baut, C. and P. Masselin (1990). Recent data on diarrhetic shellfish poisoning in France. *Toxic Marine Phytoplankton*. E. Graneli, B. Sundström, L. Edler and D. M. Anderson. New York, Elsevier: 487-492.
- Masselin P., Amzil Z., Abadie E., Nézan E., Le Bec C., Chiantella C., Truquet P., 2001. Paralytic shellfish poisoning on the French Mediterranean coast in the autumn 1998 : Alexandrium tamarense complex (Dinophyceae) as causative agent. In: *Harmful Algal Blooms 2000*. Hallegraeff G.M., Blackburn S.I., Bolch C.J. & Lewis R.J. (eds). JOC of UNESCO Publish., 407-410.
- Miguez A., Fernandez M.L. *et al.*, (1998), Mouse survival time as a DSP toxicity criterion, In : *Harmful Algae*, pp 239-240 (Reguera B., Blanco J., Fernandez M.L. & Wyatt T., Ed.). Xunta de Galicia and I.O.C. of UNESCO.
- Office Alimentaire et Vétérinaire (OAV), Rapport 8588/2002 du 18 au 28 février 2002 en Allemagne
http://ec.europa.eu/food/fvo/act_getPDF.cfm?PDF_ID=3153
- Office Alimentaire et Vétérinaire (OAV), Rapport 7561/2005 du 11 au 15 avril 2005 en Belgique
http://ec.europa.eu/food/fvo/act_getPDF.cfm?PDF_ID=4787
- Office Alimentaire et Vétérinaire (OAV), Rapport 7559/2005 du 7 au 11 mars 2005 au Danemark ;
http://ec.europa.eu/food/fvo/act_getPDF.cfm?PDF_ID=4662
- Office Alimentaire et Vétérinaire (OAV), Rapport 7024/2004 du 10 au 19 mai 2004 en Espagne
http://ec.europa.eu/food/fvo/act_getPDF.cfm?PDF_ID=4476
- Office Alimentaire et Vétérinaire (OAV), Rapport 3292/2001 du 9 au 19 juillet 2001 en Irlande
http://ec.europa.eu/food/fvo/act_getPDF.cfm?PDF_ID=2681
- Office Alimentaire et Vétérinaire (OAV), Rapport 7024/2004 du 20 septembre au 1er octobre 2004 en Italie
http://ec.europa.eu/food/fvo/act_getPDF.cfm?PDF_ID=4743
- Office Alimentaire et Vétérinaire (OAV), Rapport 3454/2001 du 22 octobre au 02 novembre 2001 aux Pays-Bas
http://ec.europa.eu/food/fvo/act_getPDF.cfm?PDF_ID=2955
- Office Alimentaire et Vétérinaire (OAV), Rapport 7029/2004 du 27 avril au 7 mai 2004 au Portugal ;
http://ec.europa.eu/food/fvo/act_getPDF.cfm?PDF_ID=4460
- Office Alimentaire et Vétérinaire (OAV), Rapport 7025/2004 du 11 au 22 octobre 2004 au Royaume-Uni ;
http://ec.europa.eu/food/fvo/act_getPDF.cfm?PDF_ID=4525
- Puiseux-Dao S., 2006. Phytoplankton et phycotoxines : un problème de santé publique. *La Lettre de l'ARET* – septembre 2006. <http://www.aret.asso.fr/images/extraitlettre52.pdf>
- Rapport du groupe de travail européen de la DG SANCO, (2001), Bruxelles, 21-23 mars.
- Suzuki, T. (1994). High-performance liquid chromatographic resolution of dinophysistoxin-1 and free fatty acids as 9-anthrylmethyl esters. *J. Chromatogr. A* **677**: 301-306.
- Suzuki, T., R. Yoshizawa, et al. (1996). Interference of free fatty acids from the hepatopancreas of mussels with the mouse bioassay for shellfish toxins. *Lipids* **31**(6): 641-5.
- Tachibana K., Scheuer P.J., Tsukitani Y., Kikuchi H., Van Engen D., Clardy J., Gopichand Y, Schmitz F.J. (1981). Okadaic acid, a cytotoxic polyether from two marine sponges of the genus *Halichondria*. *J. Am. Chem. Soc.* **103**: 2469-2971.
- Ten-Hage, R. C., et al. (2002). Effects of toxic extracts and purified borbotoxins from *Prorocentrum borbonicum* (Dinophyceae) on vertebrate neuromuscular junctions. *Toxicon* **40**(2): 137-48.
- Vale, P. and M. A. Sampayo (1996). DTX-2 in Portuguese shellfish. In *Harmful and Toxic Algal Blooms. International Commission of UNESCO*, Sendai.

- Vale, P. and M. A. Sampayo (1999). Comparison between HPLC and a commercial immunoassay kit for detection of okadaic acid and esters in Portuguese bivalves. *Toxicon* **37**(11): 1565-77.
- Vieytes, M. R., O. I. Fontal, et al. (1997). A fluorescent microplate assay for diarrhetic shellfish toxins. *Anal Biochem* **248**(2): 258-64.
- Yasumoto, T., M. Murata, et al. (1984). Diarrhetic shellfish poisoning. ACS Symposium series. *American Chemical Society* **262**: 207-214.
- Yasumoto T., (2001). DSP toxins and determination methods, *IOC International Training session*, Cork, Ireland.
- Zonta, F., B. Stancher, et al. (1992). High-performance liquid chromatography of okadaic acid and free fatty acids in mussels. *J. Chromatogr.* **594**(1-2): 137-144.

10. MOTS CLES.

Biotoxines marines, bio-essai souris, toxines lipophiles.

Pascale BRIAND

ANNEXE 1

Quelques données économiques relatives à la production ostréicole française

Figure 1 : répartition de la production ostréicole 2000 selon les pays de l'UE
(source : LEN-CORRAIL, calculé d'après des données FAO).

Tableau 1 : répartition de la production ostréicole française en 2000 selon les pays de l'UE

| Huîtres | Echanges vers la France | | Echanges à partir de la France | |
|---------------------------|-------------------------|--------------|--------------------------------|--------------|
| | Origine | Poids (t) | Destinations | Poids (t) |
| Plates Inf. 40 g | R.U | 72 | Espagne | 180 |
| | Irlande | 44 | Italie | 151 |
| | Espagne | 13 | Belgique | 43 |
| | | | Allemagne | 9 |
| | | Suisse | 14 | |
| | Total | 44 | Total | 407 |
| Creuses | Irlande | 1 456 | Italie | 3 458 |
| | R.U | 620 | Belgique | 718 |
| | Espagne | 316 | Allemagne | 481 |
| | Pays-Bas | 315 | Espagne | 203 |
| | Portugal | 253 | Suisse | 236 |
| | Danemark | 9 | Irlande | 83 |
| | | | Luxembourg | 73 |
| | | Pays-Bas | 62 | |
| | Total | 2 995 | Total | 5 671 |
| Total des produits | | 3 139 | | 6 077 |
| | | | Balance | 2 938 |

Source : rapport annuel Commerce Extérieur 2001-OFIMER

ANNEXE 2 Point réglementaire

1. Directive 91/492

Directive du Conseil 15 juillet 1991 fixant les règles sanitaires régissant la production et la mise sur le marché de mollusques bivalves vivants (91/492/CEE).

Dans son chapitre VI, la directive prévoit de contrôler la présence possible de plancton toxique dans les eaux de production et de re-parcage, et de biotoxines dans les mollusques bivalves vivants.

La teneur en toxines paralysantes «Paralytic Shellfish Poison» (PSP) dans les parties comestibles des mollusques (corps entier ou toute partie consommable séparément) ne doit pas dépasser 80 microgrammes pour 100 g, d'après la méthode d'analyse biologique - le cas échéant associée avec une méthode chimique de recherche de la saxitoxine - ou toute autre méthode reconnue par le comité vétérinaire permanent (comité européen). En cas de contestation sur les résultats, la méthode de référence doit être la méthode biologique;

Concernant les toxines lipophiles, la directive ne fixait pas de seuil mais précisait que « les **méthodes d'analyse biologiques habituelles ne doivent pas donner de réaction positive** en ce qui concerne la présence toxines diarrhéiques de «Diarrhetic Shellfish Poison» (DSP) dans les parties comestibles des mollusques (corps entier ou toute partie consommable séparément) ».

2. Décision 2002/225/CE

Décision de la Commission 2002/225/CE du 15 mars 2002 fixant les modalités d'application de la directive 91/492/CEE du Conseil en ce qui concerne les limites maximales et les méthodes d'analyse de certaines biotoxines marines dans les mollusques bivalves, les échinodermes, les tuniciers et les gastéropodes marins.

La Décision 2002/225 est le 1^{er} texte réglementaire dans lequel apparaît une différenciation de différentes familles de toxines lipophiles avec des seuils réglementaires spécifiques et dans lequel il est fait mention du bio-essai comme méthode de référence (souris ou rat). Ces seuils seront repris dans le paquet hygiène (853/2004).

La limite maximale dans les animaux visés (corps entier ou toute partie consommable séparément) est de :

- 160 microgrammes en équivalent-acide okadaïque par kilogramme pour l'acide okadaïque, les dinophysistoxines et les pecténotoxines.
- 1 milligramme en équivalent-yessotoxine par kilogramme
- 160 microgrammes en équivalent-azaspiracide¹ par kilogramme, pour les azaspiracides.

Cette décision précise dans son article 5 : « Lorsque les résultats des analyses font apparaître des écarts entre les différentes méthodes, le test biologique sur souris doit être considéré comme la méthode de référence ».

Les méthodes de détection sont définies en annexe de cette décision :

Un seul bio-essai sur souris avec extraction à l'acétone peut être utilisé pour détecter l'acide okadaïque, les dinophysistoxines, les pecténotoxines et les yessotoxines.

La détection des azaspiracides, aux niveaux réglementaires, par cette procédure requiert l'utilisation du corps entier comme fraction à analyser.

Trois souris doivent être utilisées pour chaque test. La mort d'au moins deux souris sur trois dans les 24 heures suivant l'inoculation dans chacune d'elles d'un extrait équivalent à 5 g d'hétopancréas ou 25 g de corps entier doit être considérée comme critère de la présence d'une ou plusieurs toxines mentionnées à l'article 1er à des niveaux dépassant ceux fixés aux articles 2, 3 et 4.

Les méthodes de détection alternatives

Une série de méthodes, telles que la chromatographie liquide haute performance (CLHP) avec détection fluorimétrique, la chromatographie liquide (CL) couplée à la spectrométrie de masse (SM), les immuno-essais et des tests fonctionnels, tels que l'essai d'inhibition des protéines phosphatases, peuvent être utilisées comme méthodes alternatives ou complémentaires aux méthodes biologiques **à condition que, seules ou combinées**, elles permettent de détecter au moins les analogues suivants, qu'elles ne soient pas moins efficaces que les méthodes biologiques et que leur application assure un degré équivalent de protection de la santé publique:

- acide okadaïque et dinophysistoxines (DTX1, DTX2, DTX3): une phase d'hydrolyse peut être nécessaire pour détecter la présence de DTX3,
- pecténotoxines: PTX1 et PTX2,
- yessotoxines: YTX, 45 OH YTX, Homo YTX, et 45 OH Homo YTX,
- azaspiracides: AZA1, AZA2 et AZA3.

Si de nouveaux analogues importants pour la santé publique sont découverts, ils doivent être inclus dans l'analyse. Des critères devront être disponibles avant que l'analyse chimique puisse être réalisée. La toxicité totale sera calculée à l'aide de facteurs de conversion fondés sur les données de toxicité disponibles pour chaque toxine.

Les caractéristiques de performance de ces méthodes doivent être définies après **validation selon un protocole agréé à l'échelle internationale**.

3. Règlement (CE) n°853/2004

Règlement (CE) n°853/2004 du Parlement Européen et du Conseil du 29 avril 2004 fixant des règles spécifiques d'hygiène applicables aux denrées alimentaires d'origine animale.

Ce règlement précise, dans sa section VII : mollusques bivalves vivants, que la quantité totale de biotoxines marines (mesurées dans le corps entier ou dans toute partie comestible séparément) ne doit pas dépasser les limites suivantes:

- a) pour le «Paralytic Shellfish Poison» (PSP), 800 microgrammes par kilogramme ;
- b) pour le «Amnesic Shellfish Poison» (ASP), 20 milligrammes d'acide domoïque par kilogramme ;
- c) pour l'acide okadaïque, les dinophysistoxines et les pectenotoxines pris ensemble, 160 micro-grammes d'équivalent-acide okadaïque par kilogramme ;
- d) pour les yessotoxines, 1 milligramme d'équivalent-yessotoxine par kilogramme ;
- e) pour les azaspiracides, 160 microgrammes d'équivalent-azaspiracide¹ par kilogramme.

4. Règlement (CE) n°2074/2005

Règlement (CE) n°2074/2005 de la Commission du 5 décembre 2005 établissant les mesures d'application relatives à certains produits régis par le règlement (CE) n°853/2004 du Parlement européen et du Conseil et à l'organisation des contrôles officiels prévus par les règlements (CE) n°854/2004 du Parlement européen et du Conseil et (CE) n°882/2004 du Parlement européen et du Conseil, portant dérogation au règlement (CE) n°852/2004 du Parlement européen et du Conseil et modifiant les règlements (CE) n°853/2004 et (CE) n°854/2004.

Dans son annexe III, **ce règlement précise les méthodes de détection pour chaque famille de phycotoxines :**

- **toxines paralysantes (PSP) : analyse biologique** ou toute autre méthode reconnue au niveau international. La méthode d'analyse biologique peut être associée, en tant que de besoin, à une autre méthode de détection de la saxitoxine et de ses analogues, à condition qu'elle soit normalisée. En cas de contestation des résultats, la méthode de référence est la méthode biologique.
- **toxines amnésiantes (ASP) : chromatographie liquide haute performance (CLHP)** ou par toute autre méthode reconnue. En cas de contestation des résultats, la méthode de référence est la méthode de CLHP.

- **toxines lipophiles (DSP) :**

- **analyse biologique**, suivant diverses procédures de dosage biologique sur souris différant par la prise d'essai (hépatopancréas ou corps entier) et par les solvants utilisés pour l'extraction et la purification,
Trois souris doivent être utilisées pour chaque test. La mort d'au moins deux souris sur trois dans les 24 heures suivant l'inoculation d'un extrait équivalent à 5 g d'hépatopancréas ou 25 g de corps entier doit être considérée comme critère de la présence, dans des proportions supérieures aux limites fixées, d'une ou plusieurs toxines mentionnées à l'annexe III, section VII, chapitre V, points 2 c), d) et e), du règlement (CE) n°853/2004.
Un dosage biologique sur rat peut être utilisé pour détecter l'acide okadaïque, les dinophysistoxines et les azaspiracides. Trois rats doivent être utilisés pour chaque test. Une réaction diarrhéique chez l'un des trois rats est considérée comme critère de la présence d'acide okadaïque, de dinophysistoxines et d'azaspiracides dans des proportions supérieures aux limites fixées à l'annexe III, section VII, chapitre V, points 2 c) et e), du règlement (CE) no 853/2004.
- **Concernant les autres méthodes de détection**, le règlement reprend les mêmes exigences que la Décision 2002/225/CE.
Il précise toutefois que les méthodes biologiques seront remplacées par d'autres méthodes de détection dès lors que du matériel de référence concernant la détection des toxines mentionnées à l'annexe III, section VI, chapitre V, du règlement (CE) n°853/2004 sera facilement accessible, que ces méthodes auront été validées et que le présent chapitre aura été modifié en conséquence.

ANNEXE 3

Point sur les travaux internationaux

À la 25^{ème} session du Comité du *Codex alimentarius* sur les poissons et les produits de la pêche (CCFFP), en 2002, les membres du Comité ont demandé à la FAO et à l’OMS de fournir des avis scientifiques sur les biotoxines et de présenter leurs travaux sur l’Avant-projet de norme pour les mollusques bivalves vivants et “transformés”.

Lors de sa 26^{ème} session, en 2003, le CCFFP a précisé sa demande :

- D’avis scientifiques afin de permettre d’établir les teneurs maximales de toxines dans les mollusques bivalves ;
- de recommandations sur les méthodes d’analyse des toxines de chaque groupe ;
- d’indications relatives à la surveillance du phytoplancton producteur de toxines et des mollusques bivalves (notamment les méthodes d’échantillonnage) ;
- de données sur la répartition géographique du phytoplancton marin producteur de toxines.

En 2004, la consultation d’experts *ad hoc* mixte FAO/OMS/COI sur les biotoxines dans les mollusques bivalves a abouti à la production d’un rapport abondant les demandes susmentionnées.

Lors de sa 27^{ème} session, en 2005, le CCFFP a présenté les conclusions de ce rapport, qui a suscité des avis contradictoires et de vives discussions entre les États, ce qui a conduit à la création d’un nouveau groupe de travail présidé par le Canada. L’objectif de ce groupe de travail est de préparer à l’intention du CCFFP un document présentant une évaluation du rapport de la consultation d’experts *ad hoc* mixte FAO-COI-OMS sur les biotoxines dans les mollusques bivalves et précisant comment le rapport d’experts peut faire progresser les travaux sur l’Avant projet de norme et l’Avant projet de code d’usage du Codex pour les mollusques bivalves. Le rapport du groupe de travail devra donc présenter comment le CCFFP pourrait utiliser les conseils d’experts ainsi que des recommandations sur les approches que le comité pourra envisager en vue d’intégrer les conseils des futures norme et code d’usage.

Le **tableau 1** ci-après résume les propositions de limites pour les toxines pour lesquelles la consultation d’experts *ad hoc* mixte a pu établir, au regard des données disponibles, une Dose de Référence Aiguë (ARfD) provisoire. Sont indiquées dans ce tableau les propositions de limites déduites de l’ARfD et basées sur une consommation de coquillages de 250 g (consommation qui selon le groupe d’expert couvre le 97,5^{ème} percentile de la population). Enfin, sont également indiquées en grisé les limites qui sont actuellement en vigueur au sein de l’UE.

Tableau 1 : ARfD provisoires et limites réglementaires proposées par la Consultation d’experts *ad hoc* mixte FAO/OMS/COI par biotoxine et rappel des limites réglementaires actuellement en vigueur dans l’UE

| Biotoxines | ARfD provisoire (pour un adulte de 60 kg) | Limite réglementaire déduite de l’ARfD et basée sur une consommation de 250g | Limite réglementaire en vigueur actuellement dans les états membres de l’UE |
|------------------|---|--|---|
| AZA | 0,04 µg/kg pc | 0,0096 mg/kg chair | 0,16 mg éq. AZA/ kg chair |
| Brevetoxines | - * | - * | - |
| Imines cycliques | - * | - * | - |
| AD | 0,1 mg/kg pc | 24 mg/kg chair | 20 mg/kg chair |
| AO et DTXs | 0,33 µg/kg pc | 0,08 mg/kg chair | 0,16 mg/kg chair |
| PTXs | - * | - * | 0,16 mg éq. AO/ kg chair |
| STXs | 0,7 µg/kg pc | 0,17 mg/kg chair | 0,8 mg/kg chair |
| YTXs | 50 µg/kg pc | 12 mg/kg chair | 1 mg/kg chair |

AZA : azaspiracides – AD : acide domoïque – AO et DTXs : acide okadaïque et dinophysistoxines – PTX : pecténotoxines – STX : saxitoxines – YTX : yessotoxines - * famille de toxines examinée mais jugée non prioritaire

Parallèlement à ces travaux internationaux menés par le Codex, un autre groupe de travail nommé groupe « Toxicology » organisé par le LCR (Laboratoire Communautaire de Référence) et constitué d'experts internationaux s'est tenu en 2005.

L'objectif de ce GT « Toxicology » était de réaliser une **évaluation des risques pour les toxines lipophiles** afin d'établir des limites de salubrité dans les coquillages par famille de toxines lipophiles.

Les conclusions de ce GT sont exposées dans le **tableau 2** ci-dessous :

Tableau 2 : ARfD provisoires et limites réglementaires proposées par les experts du GT Toxicology (LCR) et rappel des limites réglementaires actuellement en vigueur dans l'UE

| Biotoxines | ARfD provisoire (pour un adulte de 60 kg) | Limite réglementaire déduite de la ARfD et basée sur une consommation de 250 g | Limite réglementaire en vigueur actuellement dans les états membres de l'UE |
|--------------|---|--|---|
| AO et DTXs | 0,33 µg/kg pc | 0,08 mg/kg chair | 0,16 mg/kg chair |
| PTXs | 3 µg/kg pc | 0,72 mg/kg chair | 0,16 mg éq. AO/ kg chair |
| YTXs | 50 µg/kg | - | 1 mg/kg chair |
| AZA | 0,127 µg/kg pc | 0,032 mg/kg chair | 0,16 mg éq. AZA/ kg chair |
| Gymnodimines | 75 µg/kg pc | - | - |
| Spirolides | 1,67 µg/kg pc | 0,4 mg/kg chair | - |
| Palytoxine | 1,07 µg/kg pc | 0,25 mg/kg chair | - |
| Ciguatoxine | 1,75 ng/kg pc | 0,00004 mg/kg chair | - |

ANNEXE 4**Description du bio-essai souris pour les toxines lipophiles**

Les méthodes de détection sont définies en annexe de la décision 2002/225/CE :

Un seul bio-essai sur souris avec extraction d'hépatopancréas à l'acétone peut être utilisé pour détecter l'acide okadaïque, les dinophysistoxines, les pecténotoxines et les yessotoxines.

La détection des azaspiracides, aux niveaux réglementaires, par cette procédure requiert l'utilisation du corps entier comme fraction à analyser.

Trois souris doivent être utilisées pour chaque test. La mort d'au moins deux souris sur trois dans les 24 heures suivant l'inoculation dans chacune d'elles d'un extrait équivalent à 5 g d'hépatopancréas ou 25 g de corps entier doit être considérée comme critère de la présence d'une ou plusieurs toxines réglementées.

En l'état actuel de la réglementation communautaire, le bio-essai sur souris est le seul test de référence pour détecter la présence de toxines lipophiles dans les coquillages, en raison notamment de l'efficacité qu'il a pu montrer à travers sa pratique depuis de nombreuses années dans de nombreux pays. Le bio-essai n'est pas validé¹⁰ selon les critères normalisés mais plutôt par une longue expérience qui a permis l'amélioration des conditions de sa mise en œuvre et l'acquisition de données issues d'analyses inter-laboratoires d'aptitude réalisés au niveau national et communautaire. Il n'existe pas de méthode alternative officiellement reconnue à ce jour.

Le bio-essai sur souris pour les phycotoxines lipophiles associe la préparation d'un extrait liposoluble semi-purifié par des solvants organiques et l'injection de cet extrait par voie intrapéritonéale (voie i.p.) à des souris selon un protocole chimique et biologique défini pour contrôler une seule dose correspondant à la valeur du seuil de salubrité. Ainsi, au sens réglementaire :

- Un bio-essai sur souris est négatif si le résultat montre 0 ou 1 souris morte sur les 3 souris injectées dans un délai de 24h après l'injection. Cela signifie que les coquillages sont soit exempts de toxines lipophiles, soit en contiennent des quantités inférieures au seuil de salubrité. Ils sont conformes par rapport au seuil réglementaire et donc sont consommables.
- Un bio-essai sur souris est positif si le résultat montre 2 ou 3 souris mortes sur les 3 souris injectées dans un délai de 24h après l'injection. Cela signifie que les coquillages contiennent des quantités de toxines lipophiles supérieures au seuil de salubrité. Ils sont non conformes par rapport au seuil réglementaire et donc sont impropres à la consommation.

¹⁰ En 1999, sur proposition du Laboratoire Communautaire de Référence (LCR) de valider et normaliser le bio-essai sur souris, le Comité Européen de Normalisation a opposé un refus pour ne pas entrer en contradiction avec la réglementation européenne qui vise au remplacement des tests sur animaux.

ANNEXE 5

Historique des méthodes associées aux bio-essais sur souris pour les phycotoxines lipophiles effectués à l'Ifremer, depuis la création du REPHY (1984).

En 1983 et 1984

Le seuil semble avoir été variable. Les informations sont extraites du rapport :

Berthomé J.P. & Lassus P., 1985. – Manifestation et suivi de l'algue toxique *Dinophysis acuminata* sur les côtes françaises, en 1984. – Rapport interne IFREMER / DRV-85.01-SR-NTES : 28 p.

« ...le seuil de 48 heures, délai au bout duquel on donnait le résultat du test a semblé dès lors irréaliste. Nous avons donc limité le temps d'observation des souris à 24 heures et estimé qu'au bout de 4 heures nous pourrions donner un avis... Les derniers résultats obtenus semblent démontrer que le délai à retenir serait 5 heures... »

De 1985 à 1992

Extraction acétone

Seuil 5 heures

1^{ère} référence disponible : note Berthomé & Belin (322/89) du 21 mars 1989

1992

Introduction d'une extraction méthanol suivie d'un lavage à l'hexane, pour éliminer les acides gras pouvant donner des faux positifs :

- extraction acétone
- reprise dans le méthanol - eau
- lavage hexane

Seuil 5 heures

Référence : CR réunion REPHY 1992

1994

Introduction d'un partage dichlorométhane / méthanol - eau, qui permet de récupérer les toxines diarrhéiques dans le dichlorométhane, et éliminer les toxines dites « atypiques » dans le méthanol :

- extraction acétone
- reprise dans le méthanol -eau
- lavage hexane
- partage dichlorométhane / méthanol -eau

Seuil 5 heures

Référence : CR réunion REPHY 1994

1996

- l'extraction acétone est remplacée par une extraction méthanol - eau
- puis hexane
- puis dichlorométhane

Seuil 5 heures

Référence :

Belin C., Marcaillou-Le Baut C., Amzil Z. & Le Doux M., 1996. REPHY (Réseau de Surveillance du Phytoplancton et des Phycotoxines). Méthodes de détection des phycotoxines diarrhéiques (DSP) et paralysantes (PSP). Méthodes biologiques sur souris. Rapport interne IFREMER / DEL / 96.17 / Nantes : 28 p.

1998

Première analyse des données pour évaluer les conséquences d'un changement de seuil de 5 à 24 heures. Examen du problème test-souris DSP en CSTS → recommandations : s'en tenir au test décrit en 1996

Référence : CR des journées REPHY 1998

1999

Protocole expérimental pour comparer les procédures acétone et dichlorométhane/méthanol-eau.

Suppression du lavage à l'hexane (une partie des DTX3 seraient retenues dans la phase hexane)

Références :

Amzil Z., 1999. Procédure analytique pour déterminer à la fois la toxicité globale des coquillages sur souris et le type de toxines impliquées. Protocole expérimental 1999. Rapport RST.DEL/99 04/Nantes, 10 p.
Amzil Z. & Belin C., 2000. Bilan du protocole expérimental Ifremer sur le dépistage des toxines diarrhéiques. Document de travail. Rapport DEL/MP/RST/00/10/Nantes, 89 pages.
Amzil Z., 2001. Addendum au rapport DEL/MP/RST/00/10/Nantes : synthèse et interprétation des résultats des tests-souris et analyses physico-chimiques. 6 pages.

2000

- extraction méthanol / eau
- partage dichlorométhane / méthanol -eau

2001

Même protocole qu'en 2000

2002

Méthode Yasumoto 1984 modifiée :

- extraction acétone
- partage dichlorométhane / eau

Références : Amzil Z., 2001. Toxines diarrhéiques (DSP) et associées. Guide et Manuel. Document de prescription REPHY. 21 pages.

Changement de seuil : 24h au lieu de 5h.

2003 - 2006

Méthode Yasumoto 1984 modifiée

Références : Guides et Manuels 2003 (complément aux Manuels 2001), puis 2004, et 2006.