



## AVIS

### de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à la proposition de mise en œuvre d'une gestion multicritères des zones conchylicoles, dans le cadre de la recherche des phycotoxines lipophiles

LA DIRECTRICE GÉNÉRALE

#### 1. RAPPEL DE LA SAISINE

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 17 avril 2009 par la Direction générale de l'Alimentation (DGAI) et la Direction générale de la Santé (DGS) d'une demande d'appui scientifique et technique relatif à la proposition de mise en œuvre d'une gestion multicritères des zones conchylicoles, dans le cadre de la recherche des phycotoxines lipophiles.

#### 2. CONTEXTE ET QUESTIONS POSEES

La Section Régionale Conchylicole (SRC) Arcachon Aquitaine a adressé au Ministère de l'Agriculture et de la Pêche une demande de révision des bases de gestion en fonction des résultats des analyses de recherche des phycotoxines lipophiles dans les coquillages, en proposant un protocole combinant bio-essai souris avec une observation à 5 heures et à 24 heures, analyses chimiques et dénombrement des algues productrices de toxines présentes dans le milieu.

Ce protocole a été préparé à la demande du Ministre de l'Agriculture et de la Pêche en vue d'une soumission à la Commission Européenne. Il permet de comparer, dans diverses situations, les bases de la gestion actuelle à celles souhaitées par les professionnels et celles proposées par les gestionnaires.

Dans ce contexte, il est demandé à l'Afssa :

- d'évaluer si, dans chacune des situations analysées, les propositions de gestion permettent de répondre aux exigences communautaires, à savoir d'assurer un degré de protection de la santé publique comparable au seul bio-essai souris à 24 heures ;
- d'indiquer, parmi les cas qui présenteraient un niveau de protection inférieur à ces exigences, lesquels pourraient néanmoins être retenus comme acceptables, à condition de leur associer des mesures d'accompagnement ou des recommandations de consommation qui permettraient d'assurer pour le consommateur le degré de protection répondant aux exigences communautaires.

#### 3. 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'Ifremer<sup>1</sup>, Département Environnement, Microbiologie et Phycotoxines ;
- d'experts de l'Unité Caractérisation des Toxines (CAT) du Laboratoire d'études et de recherche sur la qualité des aliments et les procédés agroalimentaires (LERQAP), Laboratoire national de référence (LNR) pour les biotoxines marines ;
- d'un expert de la Direction de l'évaluation des risques nutritionnels et sanitaires (DERNS).

<sup>1</sup> Ifremer : Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer

Après consultation du GECU « Phycotoxines », réuni le 24 avril 2009, l'Afssa rend l'avis suivant.

## 4. ARGUMENTAIRE

### 4.1 Rappel des conclusions de l'avis de l'Afssa du 16 septembre 2008 et des exigences réglementaires

Le Règlement (CE) n°2074/2005 (remplaçant la décision 2002/225/CE) précise qu'un bio-essai souris doit être considéré comme positif dès lors que 2 souris sur 3 sont mortes dans les 24 h (quel que soit le délai de mortalité entre 0 et 24h).

Dans son avis du 16 septembre 2008 (relatif à la saisine 2008-SA-0268), 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, des DTX3 et des azaspiracides et donc assurer la sécurité sanitaire du consommateur puisque ces toxines ont toutes été impliquées dans des intoxications humaines de type diarrhéique.

Pour rappel, l'injection à chaque souris de l'équivalent de 25 g de chair de coquillage (soit l'équivalent de 5 g de glande digestive, organe qui concentre la quasi-totalité des toxines lipophiles) permet de tester le seuil de salubrité de 160 µg eq AO /kg de chair de coquillage. En effet, chaque souris pesant 20 g répond à 4 µg eq AO (correspondant à la DL50 de 192 µg d'AO/kg de souris).

Les travaux de Vale et Sampayo (1996) et de Vieytes *et al.* (1997) 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).

### 4.2 Analyse de la stratification proposée

#### Concernant la stratification en 7 cas

Le protocole de gestion multicritères proposé (présenté en annexe) repose sur 7 cas, définis selon le nombre de souris mortes (0, 1, 2, ou 3 souris mortes sur 3 souris testées) et de leur délai de mortalité (pas de mortalité, mortalité inférieure à 5h, entre 5 et 24 heures).

L'Afssa estime qu'aucune nouvelle donnée scientifique justifierait une stratification basée sur une modification des paramètres du bio-essai souris sans compromettre la fiabilité du dispositif général actuel.

#### Concernant la stratification au sein de chaque cas

Chacun de ces 7 cas est décomposé en 9 à 12 situations (identifiées de A à L) selon les critères suivants :

- présence/absence de phytoplancton toxigène du genre *Dinophysis* uniquement<sup>2</sup>,
- résultats du bio-essai souris avec la prise en compte du délai de mortalité de chaque souris,
- résultats de l'analyse chimique, en considérant :
  - o les toxines réglementées quantifiables d'une part et non quantifiables d'autre part<sup>3</sup>,
  - o une catégorie additionnelle dite « autres ». Il convient de souligner que sous ce terme « autres » sont pris en compte à la fois des interférences au sens propre<sup>4</sup>, mais surtout des toxines dont l'évaluation est en cours par l'AESA, l'Autorité Européenne de Sécurité Alimentaire (spiroïdes, gymnodimines par exemple).

Il est important de préciser que la non détection de *Dinophysis* dans les prélèvements d'eau ne garantit pas son absence dans le milieu. Il n'y a en effet aucune garantie que l'échantillon d'eau

<sup>2</sup> : *Dinophysis* est le genre producteur de l'acide okadaïque et des dinophysistoxines ainsi que des pecténotoxines. Il convient de noter que le bio-essai souris vise également à détecter d'autres toxines lipophiles réglementées, à savoir les azaspiracides et les yessotoxines, qui sont produites par d'autres genres que *Dinophysis* non recherchés en surveillance de routine.

<sup>3</sup> : Pour l'interprétation, sous phycotoxines réglementées quantifiables, le LNR a pris en compte uniquement l'acide okadaïque et les dinophysistoxines (AO/DTXs). Les autres toxines réglementées que sont azaspiracides (AZAs), pecténotoxines (PTXs), yessotoxines (YTXs), ont été considérées comme non quantifiables (méthode analytique validée sur AO/DTXs uniquement).

<sup>4</sup> : Composés toxiques pour la souris par injection intra-péritonéale et dont l'innocuité est avérée chez l'homme par voie orale (cas des acides gras libres).

prélevée se trouve dans le bloom de *Dinophysis* (compte tenu de la distribution hétérogène des cellules planctoniques dans la colonne d'eau).

L'Afssa estime qu'une décision de gestion basée sur la détection de *Dinophysis* ou sur les résultats de l'analyse chimique pris isolément ne garantit pas la sécurité sanitaire du consommateur.

**Conclusion concernant la stratification**

Afin de préserver la cohérence du dispositif actuel, les cas 1 à 4 doivent être traités de manière identique (résultat positif<sup>5</sup> du bio-essai), de même que les cas 5 à 7 (résultat négatif<sup>6</sup> du bio-essai), comme présenté dans le tableau 1 suivant.

**Tableau 1 : Regroupement des cas proposés dans le protocole selon l'interprétation du bio-essai souris dans le dispositif actuel**

	Cas n° 1 et 2		Cas n° 3 et 4		Cas n° 5 et 6		Cas n° 7
<b>Mortalité détaillée dans le bio-essai souris</b>	2-3 <5h	1<5h	1<5h	0<5h	1<5h	0<5h	3>24h
	1-0 <24h	2<24h	1<24h	2<24h	0 <24h	1<24h	
			1>24h	1>24h	2>24h	2>24h	
<b>Mortalité globale dans le bio-essai souris</b>	3/3<24h		2/3<24h		1/3<24h		0/3<24h
<b>Résultat réglementaire</b>	Positif		Positif		Négatif		Négatif

Les situations correspondant à une évolution de la décision de gestion d'une fermeture vers une proposition de non fermeture sont listées ci-dessous et analysées au cas par cas.

Les situations ne correspondant pas à un changement de gestion ne sont pas analysées.

**4.3 Analyse de cas**

**Cas 1 à 4 : bio-essai souris positif (mortalité de 2/3 ou 3/3 souris)**

Pour les situations de A à K, un résultat positif du bio-essai souris est associé aux critères additionnels suivants :

- détection de *Dinophysis* ;
- et/ou détection de toxines réglementées quantifiables ou non, par analyse chimique ;
- et/ou détection de toxines non réglementées par analyse chimique.

*Le dispositif actuel de gestion prévoit une fermeture de la zone conchylicole dans tous les cas.*

*Les professionnels prévoient plusieurs situations de non fermeture (correspondant à des cas où *Dinophysis* n'est pas détecté).*

*Les gestionnaires ne prévoient pas d'évolution de la décision de gestion.*

Selon l'Afssa, pour toutes ces situations et comme indiqué ci-dessus, le bio-essai souris doit rester l'outil de décision. Les modifications proposées dans ce protocole de gestion diminueraient le degré de protection du consommateur.

Pour la situation L, un résultat positif du bio-essai souris est associé aux 3 critères suivants :

- non détection de *Dinophysis* ;
- non détection de toxines réglementées quantifiables ou non, par analyse chimique ;
- non détection de toxines non réglementées par analyse chimique.

La situation L correspond à une situation de toxicité atypique<sup>7</sup>.

<sup>5</sup> résultat positif : 2/3 ou 3/3 souris mortes en 24 h.

<sup>6</sup> résultat négatif : 0/3 ou 1/3 souris morte en 24 h.

<sup>7</sup> Il s'agit d'un épisode de contamination des coquillages révélé selon le test officiel, par une réponse toxique chez la souris (2 souris mortes sur 3) après injection intra-péritonéale (ip) de l'extrait de glandes digestives, mais dont l'origine ne peut pas être expliquée par la présence de toxines connues habituellement recherchées (par méthode analytique LC/MS) ou par une quantité de toxine(s) connue(s) suffisante pour expliquer la positivité du bio-essai souris et qui ne peut pas être reliée à la présence de phytoplancton toxigène connu dans le milieu.

*Le dispositif actuel de gestion prévoit une fermeture de la zone conchylicole dans tous les cas.  
Les professionnels prévoient une non fermeture dans tous les cas.  
Les gestionnaires prévoient d'évoluer d'une gestion de fermeture vers une non fermeture dans 2 cas (1 souris morte avant 5h et 1 souris morte entre 5 et 24h, 2 ou 3 souris mortes entre 5 et 24h).*

L'Afssa estime qu'en l'absence de données quant à l'origine de toxicités atypiques, le risque pour le consommateur ne peut pas être écarté. En attente d'éléments de réponse issus de la recherche sur l'identification du ou des agent(s) responsable(s) de la mortalité des souris, l'allègement du protocole de gestion (non fermeture) ne peut pas permettre d'assurer un degré de protection de la santé publique comparable au seul bio-essai à 24h.

**Cas 5 à 7 : bio-essai souris négatif (mortalité de 0/3 ou 1/3 souris)**

Pour les situations de A à D, un résultat négatif du bio-essai souris est associé à la présence de toxines réglementées au-dessus du seuil de salubrité.

*Le dispositif actuel de gestion prévoit une non fermeture de la zone conchylicole dans tous les cas.*

*Les professionnels et les gestionnaires prévoient une gestion basée sur les résultats de l'analyse chimique.*

*Les professionnels prévoient une fermeture uniquement lorsque la teneur en toxines est supérieure aux seuils réglementaires en présence de Dinophysis.*

*Les gestionnaires prévoient une fermeture dans tous les cas où la teneur en toxines est supérieure aux seuils réglementaires.*

En premier lieu, il convient de signaler que pour l'année 2008, au niveau national, sur 300 échantillons qui ont fait l'objet d'une double analyse bio-essai souris et analyse chimique, le taux de survenue de ces situations de non-concordance était seulement de 2%.

L'Afssa estime que ces situations de non-concordance doivent faire l'objet d'une discussion entre le LNR et le laboratoire concerné pour déterminer l'origine des anomalies de résultats. En l'attente, la zone doit être considérée comme présentant un risque pour la sécurité sanitaire du consommateur.

## 5. CONCLUSIONS

Après examen des propositions des professionnels ou des gestionnaires portant sur des modifications de gestion des zones conchylicoles, l'Afssa estime que ces propositions ne permettent pas d'assurer un degré de protection de la santé du consommateur comparable au dispositif actuel.

Dans l'état actuel des connaissances, aucune mesure d'accompagnement ne peut être proposée à court terme pour garantir le même degré de protection de la santé du consommateur en cas de maintien de la commercialisation des coquillages issus d'une zone de production avec un bio-essai souris positif.

## 6. MOTS CLES.

Phycotoxines lipophiles, biotoxines marines, gestion multicritères, toxicité atypique.

Pascale BRIAND