

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 14 août 2015

NOTE
d'appui scientifique et technique
de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation,
de l'environnement et du travail

**relatif à la définition de nouvelles modalités pour la veille d'émergence pour les
biotoxines contaminant les coquillages dans le milieu marin**

L'Anses a été saisie le 15 juin 2015 par la Direction Générale de l'Alimentation (DGAL) et la Direction Générale de la Santé (DGS) pour la réalisation de l'appui scientifique et technique suivant : « Saisine de l'Anses relative à la définition de nouvelles modalités de vigilance vis-à-vis des toxines émergentes contaminant les coquillages dans le milieu marin ».

A des fins de clarification sémantique et pour éviter toute confusion avec les systèmes sanitaires de vigilance déjà en place en France (toxicovigilance, pharmacovigilance, nutrivigilance, etc.), l'Anses suggère d'utiliser le terme de « veille d'émergence » pour les biotoxines contaminant les coquillages.

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA DEMANDE

En complément du programme national de surveillance pour les phycotoxines (aussi appelées biotoxines marines) lipophiles dans les coquillages, un dispositif dit « de vigilance » a été mis en place en France en 2010 dans l'objectif d'accompagner le changement de la méthode analytique mise en œuvre (analyse chimique ciblée des biotoxines réglementées par LC-MS/MS à la place du bio-essai sur souris).

Aujourd'hui, l'administration souhaite améliorer et étendre le champ de ce dispositif complémentaire pour détecter l'apparition de biotoxines émergentes contaminant les coquillages dans le milieu marin et susceptibles de présenter un risque pour la santé du consommateur.

La présente demande fait suite à l'avis de l'Anses du 29 juillet 2014 relatif au dispositif de vigilance exercée vis-à-vis des phycotoxines lipophiles contaminant les coquillages dans le milieu marin (saisine n°2012-SA-0196). Dans cet avis, l'Anses a validé les modalités mises en place dans leurs grandes lignes (maintien du bio-essai sur souris en tant qu'outil de toxicité globale sur quelques points de référence) et a émis des recommandations visant à optimiser le dispositif.

Le comité de pilotage de la « vigilance » auprès de la DGAL s'est réuni le 30 janvier 2015 et a discuté des améliorations possibles du dispositif dans le cadre des recommandations formulées par l'Agence. A cette occasion, il a été convenu que des propositions portées par l'Ifremer feraient l'objet d'un examen approfondi par l'Anses dans le cadre d'un appui scientifique et technique.

Les propositions de l'Ifremer ne présagent pas de la répartition des tâches entre l'un ou l'autre des acteurs du dispositif (Ifremer et Anses/Laboratoire National de Référence pour les Biotoxines Marines).

Les questions posées à l'Anses sont les suivantes :

- 1) Les propositions formulées en vue de l'optimisation du dispositif de vigilance sont-elles d'une manière générale en adéquation avec les recommandations de l'Anses formulées dans l'avis du 29 juillet 2014 (saisine n°2012-SA-0196)? Quel est votre avis concernant la proposition de points de vigilance et le fait de privilégier la moule comme espèce à prélever ?
- 2) La réalisation du bio-essai sur souris après extraction par acétone (selon la méthode de Yasumoto 1978), en vue de prendre en compte les biotoxines lipophiles et hydrophiles, est-elle pertinente ? Induirait-elle un gain de performance par rapport à l'extraction actuelle ?
- 3) Comment assurer la fiabilité des résultats alors qu'il n'existe pas d'agrément ni d'essai inter-laboratoire (EIL) pour la recherche de certaines biotoxines ? Quels seraient les contrôles minimaux à mettre en place par le Laboratoire National de Référence (LNR) pour fiabiliser les résultats de ces analyses ?

2. ORGANISATION DES TRAVAUX

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

L'expertise s'est appuyée d'une part sur les pièces jointes à la saisine :

- document de l'Ifremer « Evolution du dispositif de vigilance à l'égard des toxines d'algues émergentes ou nouvelles », Zouher Amzil *et al.*, avril 2015, 7 pages ;
- document de l'Ifremer « Vigilance - revue des points et propositions d'évolutions pour 2016 », Nadine Neaud, avril 2015, 12 pages ;
- document Agreste « Recensement de la conchyliculture 2012 », Numéro 316 - juillet 2014, 6 pages ;

et d'autre part sur les travaux antérieurs réalisés à l'Agence :

- avis de l'Anses du 29 juillet 2014 relatif au dispositif de vigilance exercée vis-à-vis des phycotoxines lipophiles contaminant les coquillages dans le milieu marin (saisine n°2012-SA-0196), 15 pages ;
- avis de l'Afssa du 4 décembre 2009 relatif au dispositif de surveillance des phycotoxines lipophiles dans les zones conchylicoles concernant la détermination des périodes à risque et des points de référence (saisine n°2009-SA-0205), 24 pages. L'Afssa (Agence française de sécurité sanitaire des aliments) est devenue l'Anses au 1^{er} juillet 2010.

Le Comité d'experts spécialisé « Evaluation des risques physico-chimiques dans les aliments » (CES ERCA) a été consulté lors des réunions plénières du 20 mai et du 2 juillet 2015. Les discussions se sont basées sur :

- le rapport du rapporteur nommé pour cette expertise, membre du CES ERCA ;
- une analyse interne réalisée par l'Unité « Evaluation des risques liés aux aliments » (UERALIM) de la Direction de l'Evaluation des Risques, dont un représentant est membre du comité de pilotage de la « vigilance » auprès de la DGAL ;
- une analyse réalisée par le Laboratoire National de Référence (LNR) pour les Biotoxines Marines, Unité « Pesticides et Biotoxines Marines » (PBM) du Laboratoire de sécurité des aliments de Maisons Alfort et de Boulogne/Mer et dont un représentant est membre du comité de pilotage de la « vigilance » auprès de la DGAL.

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise. Les déclarations d'intérêts des experts sont rendues publiques via le site internet de l'Anses (www.anses.fr).

3. ANALYSE

- **Question 1** : Les propositions formulées en vue de l'optimisation du dispositif de vigilance sont-elles d'une manière générale en adéquation avec les recommandations de l'Anses formulées dans l'avis du 29 juillet 2014 (saisine n°2012-SA-0196)? Quel est votre avis concernant la proposition de points de vigilance et le fait de privilégier la moule comme espèce à prélever ?

1) Rappels concernant les points de prélèvement pour la « vigilance »

Dans son avis du 4 décembre 2009, l'Agence avait considéré que les dix « points de référence toxines lipophiles », qui avaient été définis par l'Ifremer pour une surveillance renforcée sur l'année 2009, constituaient la base d'un dispositif de « vigilance » pour l'année 2010 (tableau 1). Le choix de ces points reposait sur les critères suivants :

- une répartition le long du littoral métropolitain ;
- des points situés dans des zones de production actives toute l'année ;
- des points situés dans des zones à risque¹, dont certains avec présence de toxicité atypique² ;
- des points situés dans des zones non à risque ;
- priorité donnée à des points comportant des moules (espèce sentinelle) ;
- des points pour lesquels l'Ifremer dispose déjà d'un historique de surveillance.

Tableau 1 : historique des points de référence des biotoxines lipophiles (avis Afssa 2009)

zone marine		points de référence 2009		suivi depuis	coquillages		commentaires	échantillonnage
code	libellé	mnémo	libellé					
006	Baie de Somme - large	006-P-009	Pointe de St Quentin	2009	moules	bouchot	zone non à risque, n'ayant jamais connu d'épisode toxique	aucun résultat disponible
010	Baie de Seine et Orne	010-P-002	Antifer ponton pêche	2008	moules	struct. spécifique	zone à risque + maxima nationaux <i>Dinophysis</i>	moules régulièrement échantillonnées depuis mars 2008
018	Cotentin Ouest	018-P-056	Pointe Agon nord	2009	moules huîtres creuses	bouchot culture sur table	zone non à risque pour les coquillages côtiers, n'ayant jamais connu d'épisode toxique	moules régulièrement échantillonnées depuis mars 2009
047	Baie de Concarneau	047-P-003	Le Scoré	2008	moules	filière	zone à risque	moules régulièrement échantillonnées
					huîtres creuses	culture sur table		
065	Estuaire de la Vilaine	065-P-001	Kervoyal	2008	moules	bouchot	zone à risque + résultats de temps de survie courts avec symptômes neurologiques en 2006 et en 2007	moules régulièrement échantillonnées depuis mai 2008
068	Traicts du Croisic	068-P-002	Le Grand traict	2006	moules	culture à plat	zone à risque + observation de résultats douteux à plusieurs reprises, dont certains avec symptômes neurologiques en 2006, 2007 et 2008	moules (principalement) ou huîtres ou coques ou palourdes régulièrement échantillonnées depuis mai 2006
					huîtres creuses	culture sur table		
					coques	gisement naturel		
082	Pertuis de Maumusson	082-P-009	Ronce	2006	huître creuse	culture sur table	zone non à risque, mais observation de résultats douteux à plusieurs reprises avant 2007	huîtres régulièrement échantillonnées depuis avril 2006
					coque	gisement naturel		
087	Arcachon aval	087-P-009	Banc Arguin sud	2006	moules	gisement naturel	plusieurs épisodes toxiques atypiques depuis 2005	moules ET huîtres régulièrement échantillonnées depuis janvier 2006
					huîtres creuses	culture sur table		
					coques	gisement naturel		
097	Etang de Salses-Leucate	097-P-002	Parc Leucate 2	2006	moules	filière ou corde	zone à risque sur une longue période + observation de résultats douteux à plusieurs reprises,	moules ET huîtres régulièrement échantillonnées depuis janvier 2006
					huîtres creuses	filière ou corde		
118	Etang de Diana	118-P-001	Diana centre	2008	moules	filière ou corde	zone à risque	moules (principalement) ou huîtres régulièrement échantillonnées depuis janvier 2008
					huîtres creuses	radeau		

¹ Zones marines dans lesquelles un résultat supérieur au seuil réglementaire pour les biotoxines lipophiles dans les coquillages a été observé au moins une fois sur les 3 dernières années d'observation.

² Episode de contamination des coquillages, révélé par une réponse toxique chez la souris en injection intrapéritonéale, dont l'origine ne peut pas être expliquée par la présence de biotoxines lipophiles connues.

2) Evolutions concernant les points de prélèvement pour la « vigilance »

La liste de points de prélèvement pour la « vigilance » (aussi appelés points de référence des biotoxines lipophiles) a subi quelques changements entre 2010 et 2014 :

- **2011** : arrêt de la « vigilance » sur les moules au point « Parc Leucate 2 », en raison d'une trop faible exploitation (les huîtres sont maintenues) ; remplacement du point « Pointe Agon nord » par le point « Moulières d'Agon » en Normandie ; ajout du point « Ingril Sud » pour le suivi des pinnatoxines (phycotoxines émergentes non réglementées).
- **2013** : arrêt de la « vigilance » au point « Le Grand Traict » en raison de l'épuisement de la ressource coquillière (moule et coque) ; arrêt de la « vigilance » sur les huîtres au point « Banc Arguin sud » (les moules sont maintenues).
- **2014** : arrêt de la « vigilance » au point « Antifer ponton pêche » sur décision du comité de pilotage du fait qu'il s'agit d'une zone portuaire ; arrêt de la « vigilance » par bio-essai souris au point « Ingril Sud » sur décision du comité de pilotage considérant que ce point fait l'objet d'une étude ciblée par l'Ifremer pour le suivi des pinnatoxines par analyses chimiques.

Depuis 2014, il n'y a donc que 8 points de prélèvement pour la « vigilance ».

Lors de la réunion annuelle du comité de pilotage de la « vigilance » début 2015, il a été demandé à l'Ifremer de proposer une liste de nouveaux points afin de maintenir un dispositif avec un minimum de 10 points, suivant les recommandations de l'Anses. Ce travail s'est accompagné d'une revue des 8 points restant afin de vérifier la pertinence de leur maintien.

L'Ifremer s'est appuyé sur les critères d'inclusion suivants :

- o point situé en zone de production conchylicole ;
- o points avec une forte production et donc un fort intérêt en termes de représentativité de coquillages consommés en France ;
- o moule de préférence car cette espèce semble être le meilleur intégrateur ;
- o point susceptible de permettre de détecter des événements atypiques² ;
- o en zone à faible durée de période à risque³ pour les biotoxines lipophiles et dans laquelle il y a habituellement très peu d'échantillonnage pour la recherche de biotoxines (ceci pour combler le manque de surveillance des coquillages de ces zones, cf. avis de l'Anses⁴ relatif à la saisine n°2012-SA-0272) ;
- o point associé à un lieu de surveillance phytoplanctonique de type flore totale ;
- o ensemble des points correspondant à une répartition géographique couvrant tout le littoral métropolitain.

Le tableau 2 et les figures 1 à 3 résument ces évolutions et présentent les nouveautés proposées par l'Ifremer.

Boulogne, Pointe de St Quentin : conservé, répond aux critères « moule », « point associé à un lieu de surveillance phytoplanctonique de type flore totale », « point associé à une forte production » (la plus importante du secteur).

Normandie, Moulière d'Agon : conservé, répond au critère « moule ». Le point est associé à un lieu de surveillance phytoplanctonique de type flore partielle indicatrice (et non flore totale), mais 2 autres points de la même zone marine font l'objet d'un suivi de flore totale.

³ La période à risque recouvre l'ensemble des mois de la zone ayant fait l'objet d'un résultat supérieur au seuil réglementaire pour les biotoxines lipophiles au cours d'une des trois dernières années. En période à risque, l'échantillonnage des coquillages est hebdomadaire (cf Cahier de Procédures REPHY 2012-2013)

http://envlit.ifremer.fr/content/download/81386/558742/file/Cahier_REPHY_2012_version_finale_12_sep_%202012.pdf

⁴ Avis de l'Anses du 29 juillet 2014 relatif aux modalités de définition des périodes à risque et des zones à risque concernant les phycotoxines lipophiles contaminant les coquillages dans le milieu marin, 54 pages (saisine n°2012-SA-0272).

Ifremer indique qu'une réflexion est en cours pour avoir une représentation plus homogène du suivi des flores de la zone.

Bretagne Nord, Arguenon pt g5 : NOUVEAU POINT, répond aux critères « moule », « point associé à un lieu de surveillance phytoplanctonique de type flore totale », « point associé à une forte production », « zone à faible durée de période à risque » (il n'y a pas de période à risque identifiée sur ce secteur qui n'est quasiment jamais affecté par les *Dinophysis*).

Bretagne occidentale, Le Scoré : répond aux critères « moule » et « point associé à un lieu de surveillance phytoplanctonique de type flore totale ».

Bretagne Sud/Pays-de-la-Loire, Kervoyal : répond aux critères « moule » et « point associé à un lieu de surveillance phytoplanctonique de type flore totale ».

Poitou-Charentes, Ronce : ne répond pas au critère « moule » (production d'huîtres creuses), l'Ifremer propose donc de l'arrêter et de le remplacer par l'un ou les 2 points suivants (car il s'agit d'une zone de très forte production) :

Poitou-Charentes, l'Eperon (terre) : NOUVEAU POINT, répond aux critères « moule », « point associé à un lieu de surveillance phytoplanctonique de type flore totale ».

Poitou-Charentes, Baie d'Yves (a) : NOUVEAU POINT, répond aux critères « moule », « point associé à un lieu de surveillance phytoplanctonique de type flore totale ».

Aquitaine, Banc Arguin sud : répond aux critères « moule », « point associé à un lieu de surveillance phytoplanctonique de type flore totale », « point associé à une forte production ».

Languedoc Roussillon, Parc Leucate 2 : ne répond pas au critère « moule » (production d'huîtres creuses), de plus ce point est trop souvent affecté par des contaminations en biotoxines lipophiles (période à risque d'octobre à juin). L'Ifremer propose donc de l'exclure du dispositif de veille et de le remplacer par le point suivant (pour conserver un point en Languedoc-Roussillon) :

Etang de Thau, Marseillan (a) : NOUVEAU POINT, répond aux critères « moule », « point associé à un lieu de surveillance phytoplanctonique de type flore totale », « point associé à une forte production », « zone à faible durée de période à risque » (un seul mois en période à risque, juin).

Provence-Alpes-Côte-d'Azur/Corse, Diana centre : répond aux critères « moule » et « point associé à un lieu de surveillance phytoplanctonique de type flore totale ».

Tableau 2 : évolution des points de prélèvement pour la « vigilance » aussi appelés points de référence des biotoxines lipophiles

Lieux		2010	2011	2012	2013	2014	2015 (proposition de l'Ifremer)
LER/BL Boulogne	Pointe de St Quentin 006-P-009	moule	moule	moule	moule	moule	moule
LER/N Normandie	Antifer ponton pêche 010-P-002	moule	moule	moule	moule	arrêt en février (zone portuaire, pas de consommation)	
	Pointe Agon Nord 018-P-056	moule	moule	arrêt			
	Moulières d'Agon 018-P-096		moule	moule	moule	moule	moule
LER/BO Bretagne occidentale	Le Scoré 047-P-003	moule	moule	moule	moule	moule	moule
LER/MPL/TM La Trinité	Kervoyal 065-P-001	moule	moule	moule	moule	moule	moule
LER/MPL/NT Nantes	Le Grand traict 068-P-002	moule	moule	moule ou coque	arrêt en mars (épuisement de la ressource)		
LER/PC Pertuis charentais	Ronce 082-P-009	huître creuse	huître creuse	huître creuse	huître creuse	huître creuse	arrêt car pas de moule
LER/AR Arcachon	Banc Arguin sud 087-P-009	moule	moule	moule	moule	moule	moule
		huître	huître	huître	arrêt		
LER/LR Languedoc Roussillon	Parc Leucate 2 097-P-002	moule	arrêt				
		huître	huître	huître	huître	huître	arrêt car pas de moule
	Ingril sud 105-P-152		moule	moule	moule	arrêt	
LER/PAC/CO Corse	Diana centre 118-P-001	moule	moule	moule	moule	moule	moule
LER/BN Bretagne Nord	Arguenon pt g5 022-P-008						moule
LER/PC Pertuis charentais	L'Eperon 076-P-002 et/ou Baie d'Yves 079-P-024						moule (sous réserve ⁵) moule (sous réserve ⁴)
LER/LR Languedoc Roussillon	Marseillan (a) 104-P-002						moule
Total		10	11	11	10	8	10 (dont 2 sous réserve)

Les cases grisées signifient que les prélèvements ont été arrêtés.

⁵ L'Ifremer indique ne pas être en mesure actuellement de prélever des moules sur ces points sans une réflexion préalable pour savoir comment intégrer cette nouvelle charge de travail.

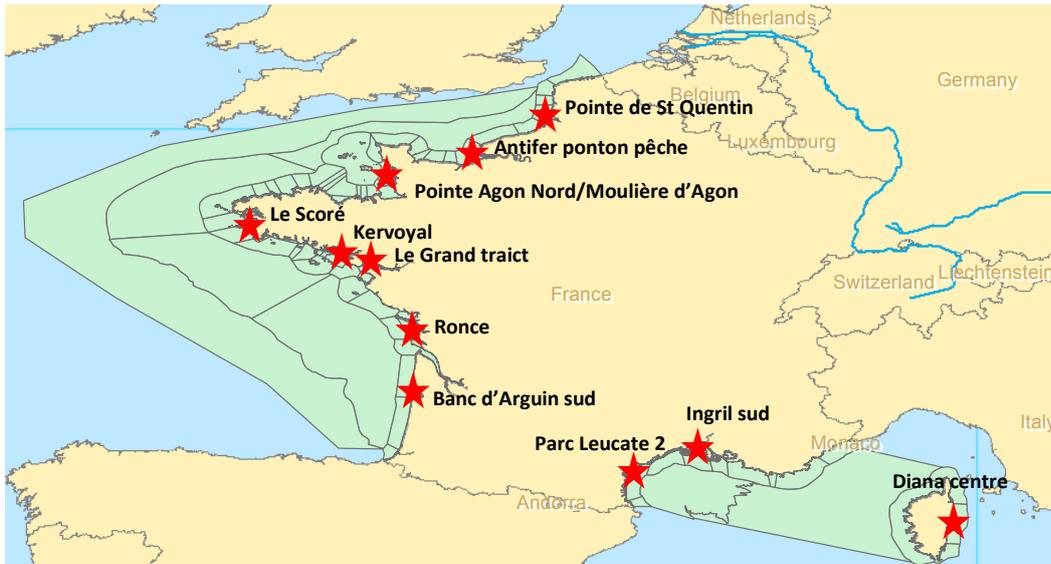


Figure 1 : carte des points de référence des biotoxines lipophiles en 2011



Figure 2 : carte des points de référence des biotoxines lipophiles en 2014



Figure 3 : carte des points de référence proposés par l'Ifremer pour 2016

3) Commentaires sur les propositions concernant les points de prélèvement pour la « vigilance » et le fait de privilégier la moule

L'Ifremer propose de retirer le point « Ronce » du dispositif de « vigilance » car il n'y a pas de production de moules. La moule (*Mytilus sp*) est connue pour accumuler plus vite et en plus grande quantité les biotoxines en comparaison des autres mollusques bivalves, d'où son statut d'espèce sentinelle. Si l'Anses reconnaît que la moule est à privilégier, elle estime néanmoins que le dispositif dit de « vigilance », c'est-à-dire de « veille d'émergence » des biotoxines ne doit pas reposer uniquement sur la moule et écarter d'autres mollusques bivalves fortement consommés, tels que les huîtres.

Au regard des propositions de l'Ifremer, l'Anses recommande que soient conservés :

- le point « Ronce » pour des prélèvements d'huîtres, la côte de Poitou-Charentes étant une zone importante de production (à savoir près de la moitié de la production nationale, document Agreste pour l'année 2012) ;
- le point « Parc Leucate 2 » pour des prélèvements d'huîtres car il représente une zone de forte production en Méditerranée. Toutefois, ce point est très souvent affecté par des contaminations en biotoxines lipophiles (période à risque d'octobre à juin) et il ne semble pas pertinent dans ces conditions de maintenir le bio-essai sur souris. La « veille d'émergence » pourrait s'y limiter à l'analyse chimique de biotoxines lipophiles réglementées et non réglementées à ce jour.
- le point « Ingril Sud » associé à un prélèvement de moules du fait de la présence récurrente de pinnatoxines, afin de maintenir une veille sur ces toxines émergentes dans l'attente d'une possible évaluation des risques sanitaires et/ou d'une évolution réglementaire. Comme pour le point précédent, il ne semble pas pertinent de maintenir le bio-essai sur souris : la « veille d'émergence » pourrait s'y limiter à l'analyse chimique de biotoxines lipophiles réglementées et non réglementées à ce jour.

L'Anses recommande que soient ajoutés les nouveaux points proposés par l'Ifremer :

- Bretagne Nord, Arguenon pt g5
- Pertuis Breton, l'Eperon (terre) et/ou Pertuis d'Antioche, Baie d'Yves (a)
- Etang de Thau, Marseillan (a).

La nouvelle liste comporterait ainsi 12/13 points de prélèvement. Pour 2 de ces points, la « veille d'émergence » serait uniquement par analyse chimique (pas de possibilité d'identifier de situation de discordance⁶) selon les nouvelles modalités proposées par l'Ifremer et présentées ci-après, au point 4.

⁶ On appelle situations de discordance les situations dans lesquelles un résultat dit positif par bio-essai sur souris (2 ou 3 souris mortes dans les 24h après l'injection intrapéritonéale de l'échantillon à 3 souris) ne peut pas être expliqué par la quantité de biotoxines lipophiles mesurée par analyse chimique (LC-MS/MS). Lorsqu'aucune biotoxine lipophile connue n'est détectée par analyse chimique, on parle de toxicité atypique.

Tableau 3 : ventes en 2012 de coquillages adultes (Agreste, 2014)

Régions conchylicoles de localisation du siège social de l'entreprise	Ensemble des coquillages ¹		Huitres creuses		Huitres plates		Moules <i>galloprovincialis</i>		Moules <i>edulis</i>	
	Nombre d'entreprises	Poids tonnes	Nombre d'entreprises	Poids tonnes	Nombre d'entreprises	Poids tonnes	Nombre d'entreprises	Poids tonnes	Nombre d'entreprises	Poids tonnes
Poitou-Charentes	617	50 272	577	37 093	13	8			121	13 058
Bretagne-Nord	173	29 196	111	6 984	31	828	4	28	100	21 317
Nord-Normandie	217	25 281	169	9 024	4	12			101	15 928
Méditerranée	384	23 471	355	6 043	9	10	320	17 228	s	s
Pays de la Loire	259	12 338	236	7 122	26	15	s	s	137	5 100
Bretagne-Sud	241	11 810	212	6 604	92	229	9	70	82	3 838
Aquitaine	281	7 195	281	6 349	3	32	s	s	s	s
Total	2 172	159 563	1 941	79 220	178	1 133	335	17 358	544	59 781

1 : Ensemble des coquillages : huitres creuses et plates, moules *edulis* et *galloprovincialis*, palourdes, coques et autres coquillages

4) Commentaires sur les propositions concernant les investigations chimiques et toxicologiques

Les propositions concernant les investigations chimiques formulées par l'Ifremer comportent 2 phases :

- Phase I : criblage dans tous les échantillons de l'ensemble des points du dispositif pour la recherche des biotoxines répertoriées dans le monde, réglementées et non réglementées en Europe. L'objectif est la mise en évidence de toxines émergentes non encore répertoriées en France, pouvant être introduites via les transferts de coquillages, d'eaux de ballast, etc.
- Phase II : investigations à déclencher en cas de discordance avérée entre les résultats de l'analyse chimique et du bio-essai sur souris. L'objectif est d'acquérir des connaissances scientifiques (propriétés physico-chimiques, toxicologiques...) relatives à l'agent inconnu cause de la toxicité inexpiquée.

4.1) Description de la phase I

La phase I se déploierait en 2 temps :

Pour la période 2016-2017 :

1) Le criblage ciblé des biotoxines **lipophiles** réglementées et non réglementées en Europe, en utilisant : i) le bio-essai sur souris selon la méthode de Yasumoto 1984 modifiée ; ii) l'analyse chimique par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse basse résolution (LC-MS/MS).

Les groupes de phycotoxines ciblés seraient : acide okadaïque/dinophysistoxines (AO/DTXs), azaspiracides (AZAs), pecténotoxines (PTXs), yessotoxines (YTXs), spirolides (SPXs), gymnodimines (GYMs), pinnatoxines (PnTX), ptériatoxines (PtTX), palytoxines (PITXs), ovatoxines (OVAs).

2) Le développement méthodologique et l'harmonisation de traitement des données analytiques entre les laboratoires de l'Ifremer et de l'Anses, pour le criblage non ciblé à la fois des biotoxines **lipophiles et hydrophiles** (listées ci-après) par analyse chimique en utilisant la spectrométrie de masse haute résolution (LC-MSHR).

En plus des prélèvements d'eau et de coquillages, l'Ifremer propose d'utiliser des échantillonneurs passifs afin de détecter les toxines dissoutes.

L'Ifremer envisage de prélever 2 x 2 kg de coquillages et que les analyses (bio-essai sur souris et LC-MS/MS) soient réalisées dans la mesure du possible au plus tard la semaine suivant ce prélèvement afin d'optimiser les chances de récolte de matériel contaminé supplémentaire en cas de discordance. Les analyses porteraient sur la glande digestive (qui concentre plus les toxines que la chair totale).

En cas de bio-essai sur souris « positif » (mort de 2 souris sur 3) ou douteux (mort d'une souris sur 3 ou observation de symptômes anormaux) non expliqué par les résultats du criblage ciblé, le prélèvement de matériel supplémentaire (10 kg) servirait à :

i) réaliser un autre bio-essai sur souris pour vérifier la discordance durant la semaine n+1 ;

ii) démarrer les actions préliminaires, également sur le second lot de 2 kg, permettant de cerner davantage les propriétés physico-chimiques (thermostabilité, solubilité, comparaison des empreintes LC-MSHR des échantillons positifs et négatifs...).

Ce matériel supplémentaire ne pourra pas servir à mener la phase II du programme qui a pour objectif de tenter d'identifier l'agent en cause de la discordance. En effet, la purification, l'isolement et l'identification structurelle de composés bioactifs nécessite une grande quantité de coquillages contaminés.

Les résultats de l'ensemble des actions entreprises (y compris le suivi phytoplanctonique) feraient systématiquement l'objet d'un rapport annuel rédigé par l'Ifremer à destination des membres du comité de pilotage auprès de la DGAL.

A partir de 2018 :

Le criblage ciblé des biotoxines **lipophiles et hydrophiles** réglementées et non réglementées en Europe, en utilisant : i) le bio-essai sur souris selon la méthode de Yasumoto 1978 ; ii) l'analyse chimique par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse basse résolution (LC-MS/MS).

Les groupes de toxines ciblés seraient (en plus de celles listées précédemment) : ciguatoxines (CTXs), brévétoxines (BTXs), acide domoïque (AD), saxitoxines et gonyautoxines (STXs/GTXs), tétrodotoxines (TTXs), cyanotoxines.

4.2) Commentaires de l'Anses concernant la phase I

Les investigations proposées par l'Ifremer sont parfaitement en adéquation avec les recommandations de l'Anses formulées dans l'avis du 29 juillet 2014 (saisine n°2012-SA-0196).

Concernant les échantillonneurs passifs (afin de détecter les toxines dissoutes), l'Anses reconnaît l'intérêt scientifique de ce type d'étude mais aurait souhaité disposer de plus de détails concernant l'aspect opérationnel (nature des résines, durée d'immersion, fréquence des analyses, etc.).

Des commentaires spécifiques concernant la méthode d'extraction selon Yasumoto 1978 sont formulés en réponse à la question 2.

4.3) Description de la phase II

Des propositions sont également faites concernant des investigations plus poussées en cas de situation de discordance avérée, visant à tenter d'identifier l'agent causal et à cerner sa toxicité, ce que l'Ifremer désigne sous le terme de « phase II ».

Cette phase II n'est envisageable qu'à condition de disposer d'une quantité suffisante de coquillages contaminés.

Ces investigations comprendraient, selon la proposition rédigée l'Ifremer et soumise à la présente expertise de l'Anses, 3 pistes d'action :

- 1) Une étude de toxicité aiguë par voie orale chez la souris selon les lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques (non précisées par l'Ifremer).
- 2) L'immersion de moules saines dans la zone contaminée afin de suivre le niveau d'accumulation de(s) composé(s) en cause dans le temps. Un lot de ces mêmes moules serait gardé comme témoin pour les analyses comparatives des empreintes de métabolites par LC-MSHR. Cette comparaison permettrait de mettre en évidence un(des) pic(s) dans le chromatogramme des moules contaminées après immersion correspondant au(x) composé(s) toxique(s) en cause et qui serait(seraient) absent(s) dans le chromatogramme des moules témoins.
- 3) Dans le cadre d'une action à moyen terme (2 à 3 ans), serait réalisé un fractionnement bio-guidé pour la mise en évidence de nouveaux composés bio-actifs. Il s'agirait de procéder à une recherche d'activité biologique par fractionnements successifs de l'extrait brut de départ avec un guidage (suivi d'activité) sur une batterie de tests cellulaires couplée à l'analyse chimique. Cela permettrait d'acquérir des éléments de réponse sur l'activité toxique (cytotoxicité, neurotoxicité, activité hémolytique...) et éventuellement le mécanisme d'action du(es) principe(s) actif(s) en cause contenu(s) dans les fractions pré-purifiées.

Les fractions pré-purifiées feraient l'objet de : i) un bio-essai sur souris par voie intrapéritonéale pour faire le lien avec l'activité de départ de l'extrait brut à l'origine de la mort des souris, ii) une étude de toxicité par voie orale chez la souris pour caractériser le potentiel toxique et mieux apprécier le risque sanitaire.

La poursuite du fractionnement bio-guidé, à partir des fractions purifiées, chercherait à isoler et à tenter d'identifier le(s) composé(s) à l'origine de la discordance.

Ces travaux pourraient aboutir au développement de tests de toxicité cellulaire *in vitro* applicables à grande échelle et en routine dans le cadre du dispositif de « vigilance » à la place du bio-essai sur souris.

4.4) Commentaires de l'Anses concernant la phase II

Les investigations proposées par l'Ifremer sont en adéquation avec les recommandations de l'Anses formulées dans l'avis du 29 juillet 2014 (saisine n°2012-SA-0196).

Concernant l'étude de toxicité par voie orale chez la souris, l'Anses regrette l'absence de détails sur le protocole (tels que la référence de ligne directrice de l'OCDE, le nombre de souris, le type d'extrait, la méthode d'extraction, la durée d'observation des souris, le type d'effets étudiés : uniquement la mortalité ou est-il prévu de réaliser des analyses anatomo-pathologiques ?).

■ **Question 2** : La réalisation du bio-essai sur souris après extraction par acétone (selon la méthode de Yasumoto 1978), en vue de prendre en compte les biotoxines lipophiles et hydrophiles, est-elle pertinente ? Induira-t-elle un gain de performance par rapport à l'extraction actuelle ?

La figure 4 présente les différentes étapes des méthodes d'extraction selon Yasumoto 1984 modifiée et Yasumoto 1978.

La méthode de Yasumoto 1978 permet l'extraction en une étape et sans partage ultérieur avec d'autres solvants organiques des biotoxines lipophiles et des composés plus polaires. Le LNR « Biotoxines Marines » estime donc que cela constitue un gain de performance au regard de la diversité des biotoxines extraites par rapport à l'extraction actuelle (Yasumoto

1984 modifiée) qui cible uniquement les biotoxines lipophiles. La sensibilité du bio-essai sur souris avec injection de l'extrait selon la méthode de Yasumoto 1978 est satisfaisante, aussi bien pour les biotoxines lipophiles qu'hydrophiles.

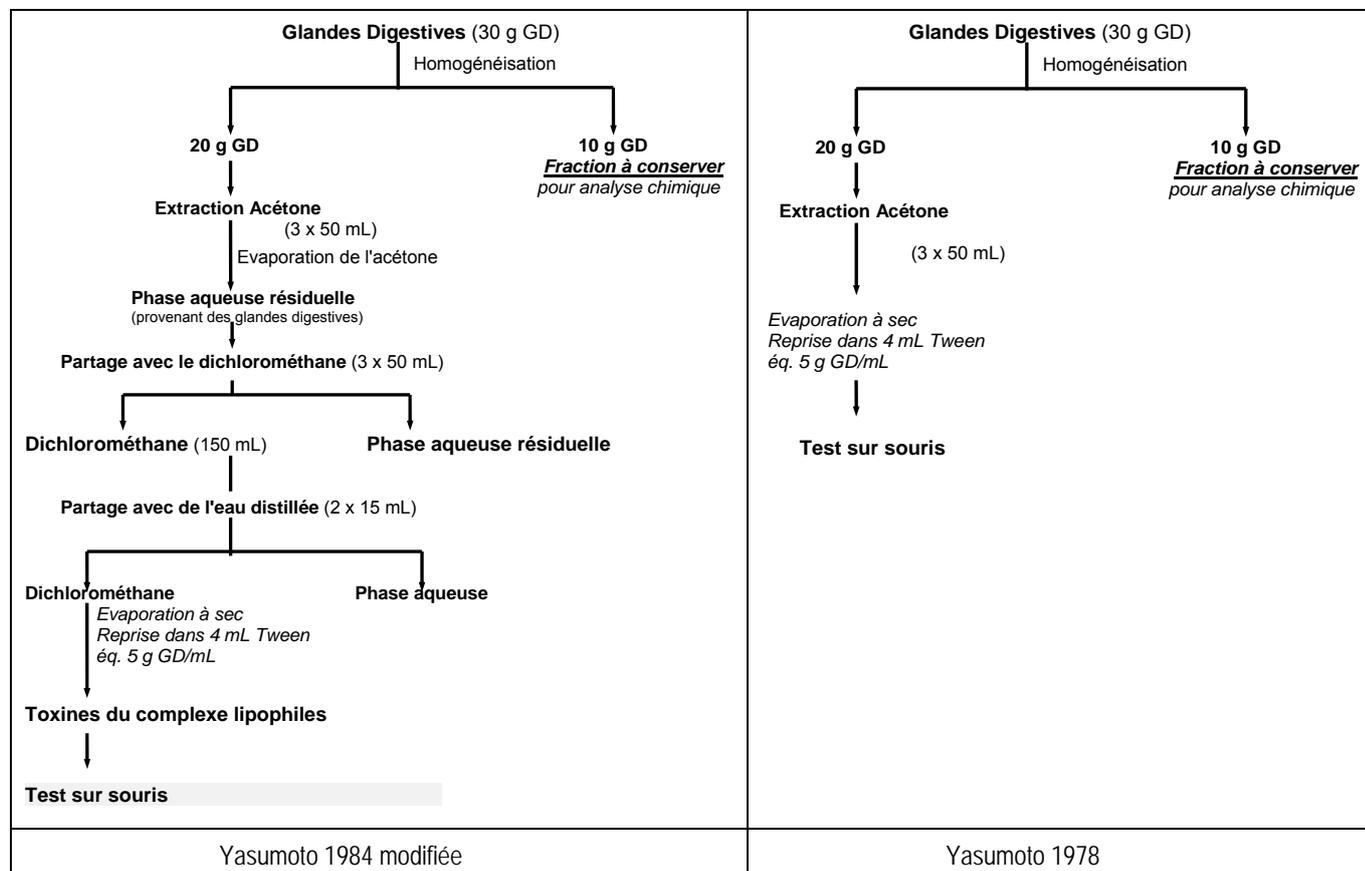


Figure 4: méthodes d'extraction de Yasumoto 1984 modifiée et 1978

Le rapporteur auprès du CES ERCA propose une variante de cette méthode, toujours pour 20 g de glandes digestives :

- réaliser une première extraction avec 60 ml d'acétone (et rinçage avec 10 ml d'acétone à 20% en eau ou 80% en acétone) → cela donne l'extrait n°1 ;
- réaliser une deuxième extraction du « gâteau » précédent avec 60 ml d'acétone pur (et rinçage avec 10 ml d'acétone pur) qui prend alors les composés les plus apolaires → cela donne l'extrait n°2 ;
- réaliser une troisième extraction du « gâteau organique restant » après la deuxième extraction avec 60 ml de méthanol-eau (50/50) et lavage avec 10 ml de ce même mélange → cela donne l'extrait n°3 ;
- évaporer et tester ces 3 fractions séparément par injection intrapéritonéale chez les souris.

Le rapporteur recommande de tester ce protocole pour s'assurer qu'il y a bien une discrimination d'extraction de produits de polarités différentes avec la réalisation des 3 extraits.

Le LNR « Biotoxines Marines » reconnaît que cette méthodologie (extraction à l'acétone en deux temps et une troisième extraction MeOH/eau) est de nature à maximiser l'efficacité de l'extraction des composés de polarités différentes mais elle suppose un travail préalable

conséquent et induit un surcoût lié au temps de travail supplémentaire et à l'utilisation d'animaux pour expérimentation. Le LNR propose donc de mélanger les 3 extraits avant injection aux souris.

L'Anses recommande que les performances de cette méthodologie alternative (en mélangeant ou non les 3 extraits) soient comparées à celles de la méthode de Yasumoto 1978 à l'aide d'un protocole adapté à définir par le LNR « Biotoxines Marines » et/ou l'Ifremer.

■ **Question 3** : Comment assurer la fiabilité des résultats alors qu'il n'existe pas d'agrément ni d'EIL pour la recherche de certaines biotoxines ? Quels seraient les contrôles minimaux à mettre en place par le LNR pour fiabiliser les résultats de ces analyses ?

En ce qui concerne le bio-essai sur souris, le LNR « Biotoxines Marines » maintiendrait des essais d'inter-comparaison avec le laboratoire impliqué dans le dispositif pour assurer la concordance des résultats obtenus selon un protocole harmonisé. Les échantillons soumis aux essais d'inter-comparaison seraient des échantillons naturellement contaminés en fonction de leur disponibilité.

Quant à la mise en œuvre de la méthode chimique par LC-MS/MS, le LNR « Biotoxines Marines » proposerait des essais d'inter-comparaison qui porteraient sur :

i) des échantillons naturellement contaminés par des biotoxines non réglementées (par exemple pinnatoxines, palytoxines) ; ces essais permettraient d'assurer la bonne mise en œuvre de l'étape d'extraction - et le cas échéant de purification - ainsi que la détection et la quantification.

ii) des extraits d'échantillons naturellement contaminés mentionnés ci-dessus supplémentés pour les autres biotoxines pour lesquelles il n'y a pas de matrice naturellement contaminée, dans la mesure où des étalons existent et que leur coût ne soit pas prohibitif pour suivre cette approche ; ces essais permettraient d'évaluer la détection et la quantification de ces toxines.

Une évaluation favorable des deux étapes serait de nature à apporter les éléments de garantie pour la fiabilisation des résultats analytiques.

4. CONCLUSIONS

Dans le cadre d'une évolution du dispositif dit « de vigilance » mis en place en 2010 en complément du programme national de surveillance pour les phycotoxines (aussi appelées biotoxines marines) lipophiles dans les coquillages, la DGAL et la DGS ont souhaité recueillir l'avis de l'Anses sur des propositions portées par l'Ifremer, afin de s'assurer qu'elles étaient en adéquation avec les recommandations de l'avis du 29 juillet 2014.

L'objectif de ce nouveau dispositif étant de détecter l'apparition de biotoxines émergentes contaminant les coquillages dans le milieu marin et susceptibles de présenter un risque pour la santé du consommateur, l'Anses suggère de le désigner sous le terme de « veille d'émergence » pour les biotoxines contaminant les coquillages.

Après un examen approfondi des documents joints à la lettre de saisine, l'Anses conclut que les propositions d'évolution répondent en grande partie aux recommandations de l'avis du 29 juillet 2014 et sont de nature à améliorer le dispositif par rapport à la situation actuelle. Toutefois, l'Anses tient à souligner que ces propositions ne sont pas décrites dans le détail et

que la mise en œuvre opérationnelle devra être supervisée par le comité de pilotage auprès de la DGAL. Une nouvelle consultation de l'Anses pourrait être envisagée, en particulier concernant les études de toxicité proposées en phase II.

De plus, l'Anses a formulé des recommandations concernant les points de prélèvement de coquillages, à savoir :

- de ne pas se limiter au prélèvement de moules (sans remettre en cause son statut de sentinelle par rapport aux autres mollusques bivalves) ;
- de conserver les points « Ronce » et « Parc Leucate 2 » pour des prélèvements d'huîtres ;
- d'inclure à nouveau le point « Ingril Sud » pour des prélèvements de moules (qui avait été retiré en 2014) du fait de la présence récurrente de pinnatoxines, afin de maintenir une veille sur ces toxines émergentes dans l'attente d'une possible évaluation des risques sanitaires et/ou d'une évolution réglementaire ;
- d'ajouter les nouveaux points proposés par l'Ifremer en Bretagne Nord, dans le Pertuis Breton et/ou dans le Pertuis d'Antioche et dans l'Etang de Thau.

Concernant la proposition d'utiliser une méthode d'extraction unique pour les biotoxines lipophiles et hydrophiles, l'Anses reconnaît que la méthode de Yasumoto 1978 offrirait un gain de performance par rapport à la méthode actuellement mise en œuvre pour les seules biotoxines lipophiles (Yasumoto 1984 modifiée). Des pistes d'investigations ont été formulées par l'Anses qu'il conviendrait de tester avant la mise en œuvre de cette nouvelle méthode d'extraction dans le dispositif.

Concernant la fiabilisation des résultats, en particulier ceux issus d'analyses chimiques pour les biotoxines non réglementées, le LNR « Biotoxines Marines » propose de mettre en place des essais d'inter-comparaison en deux étapes qui devraient être de nature à apporter les éléments de garantie nécessaires.

Enfin, l'Anses rappelle que la surveillance phytoplanctonique est un élément-clé de la « veille d'émergence » et qu'il conviendrait de poursuivre les efforts pour que le dispositif soit réactif et puisse être en mesure de détecter des micro-algues benthiques/épi-benthiques ou de nouveaux producteurs de toxines en milieu marin/estuarien tels que les cyanobactéries.

Le directeur général

Marc Mortureux

MOTS-CLES

Biotoxines marines ; Veille d'émergence ; Vigilance ; Coquillages

ANNEXES

- Annexe 1 : document de l'Ifremer « Evolution du dispositif de vigilance à l'égard des toxines d'algues émergentes ou nouvelles », Zouher Amzil *et al.*, avril 2015, 7 pages ;
- Annexe 2 : document de l'Ifremer « Vigilance - revue des points et propositions d'évolutions pour 2016 », Nadine Neaud, avril 2015, 12 pages ;

NOTE
d'appui scientifique et technique
de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation,
de l'environnement et du travail

relatif à la définition de nouvelles modalités pour la veille d'émergence pour les
biotoxines contaminant les coquillages dans le milieu marin

ANNEXE 1

Document de l'Ifremer :
« Evolution du dispositif de vigilance
à l'égard des toxines d'algues émergentes
ou nouvelles »,
Zouher Amzil et *al.*, avril 2015, 7 pages



Evolution du dispositif de vigilance à l'égard des toxines d'algues émergentes ou nouvelles

Cette proposition a pour objet de faire évoluer le dispositif actuel de vigilance en complément du dispositif national de surveillance réglementaire des phycotoxines (REPHY, plan de surveillance de la DGAL). En effet, dans son dernier avis, l'Anses estime que le système de vigilance actuel assuré par Ifremer (convention DGAL) doit être maintenu en vue de mettre en évidence un éventuel danger lié à la présence dans les coquillages : i) de toxines lipophiles et hydrophiles connues mais non répertoriées en France, ii) de nouvelles toxines, dont les nouveaux analogues de toxines réglementées. Aussi, un projet d'évolution du dispositif « Vigilance » est proposé pour acquérir des connaissances scientifiques et de développer de nouvelles approches analytiques et de traitement de données permettant de détecter un éventuel danger potentiel pour le consommateur. Ce projet concernera une dizaine de zones réparties sur tout le littoral français, incluant une partie des zones du dispositif de vigilance existant. Le tableau ci-dessous donne les points de référence des zones sélectionnées, en accord avec la DGAL, du nouveau dispositif.

Points de référence du nouveau dispositif de vigilance

LER	point	coquillages prélevés	Commentaires
LER/BL Boulogne	Pointe de St Quentin 006-P-009	moules bouchot	zone située hors zone à risque, n'ayant jamais connu d'épisode toxique jusqu'en 2010.
LER/N Port-en-Bessin	Antifer ponton pêche 010-P-002	moules struct. spécifique	Arrêt en février 2014 car zone portuaire risque de contamination chimique
	Moulières d'Agon 018-P-096	moules bouchot	zone située hors zone à risque pour les coquillages côtiers, n'ayant jamais connu d'épisode toxique.
LER/BN Dinard	Une proposition de point est à l'étude		
LER/BO Concarneau	Le Scoré 047-P-003	moules filières	zone à risque d'avril à novembre
LER/MPL/TM La Trinité	Kervoyal 065-P-001	moules bouchot	zone à risque mai à sept + résultats de temps de survie courts avec symptômes neurologiques en 2006 et en 2007
LER/MPL/NT Nantes	Le Grand trait 068-P-002	coques gisement naturel	Arrêt de la vigilance sur ce point en mars 2013, pour cause d'épuisement de la ressource coquillage
LER/PC/LR La Rochelle	Ronce 082-P-009	huîtres creuses culture sur table	Zone à risque en mai, observation de résultats douteux à plusieurs reprises avant 2007
	Une proposition de point est à l'étude pour un suivi sur les moules au lieu des huîtres		

Document de travail

LER/AR Arcachon	Banc Arguin sud 087-P-009	moules gisement naturel	plusieurs épisodes toxiques atypiques depuis 2005 Arrêt en 2013 de la vigilance sur les huîtres de ce point
LER/LR Sète	Parc Leucate 2 097-P-002	huîtres creuses filière ou corde	zone à risque sur une longue période + observation de résultats douteux à plusieurs reprises depuis 2003
	Une proposition de point est à l'étude en remplacement du point Parc Leucate trop souvent affecté par des contaminations en toxines lipophiles (période à risque d'octobre à juin).		
	Ingril Sud 105 P 152	moules filière ou corde	Arrêt des bio-essais en 2014. Lieux suivi pour les pinnatoxines
LER/PAC/CO Bastia	Diana centre 118-P-001	moules filière ou corde	N'a plus de période à risque en 2015

Le programme proposé se décline en deux phases :

- Phase I : criblage des toxines répertoriées dans le monde, réglementées et non réglementées en Europe. L'objectif est la mise en évidence des toxines d'algues et des espèces de microalgues toxiques émergentes non encore répertoriées en France, pouvant être introduites via les transferts de coquillages et/ou les eaux de ballast.
- Phase II : étude d'investigation à déclencher en cas de toxicité inexplicée des coquillages sur souris dont l'objectif est d'acquérir des connaissances scientifiques (propriétés physico-chimiques, toxicologiques...) relatives à l'agent en cause de la toxicité inexplicée. Rappelons qu'une toxicité atypique sur souris correspond à une discordance entre les résultats du test-souris et de l'analyse chimique : les quantités de toxines connues trouvées par analyse chimique n'expliquent pas le résultat positif du test-souris (temps de survie et symptômes des souris). Les conditions de déclenchement de la phase II seront définies par le comité de vigilance au cas par cas.

La phase II est multidisciplinaire et s'appuiera sur des hypothèses de recherche à prospecter seulement en cas de mise en évidence de toxicité inexplicée avérée des coquillages sur souris. Par contre, la phase I, qui constitue la base du nouveau dispositif de vigilance, pourrait être mise en place dès 2016, en étroite collaboration avec le LNR-Biotoxines de l'Anses (réunion PHYC & LNR du 15 avril 2015) pour une période de quatre ans dans un premier temps. Un bilan annuel fera l'objet d'une évaluation par les membres du comité de vigilance (DGAL, DPMA, DGS, InVs, ANSES, IFREMER).

Phase I : criblage des toxines d'algales et détection des espèces de microalgues toxiques répertoriées dans le monde

En plus du suivi de la recherche de microalgues toxiques émergentes, la mise en place du criblage des toxines lipophiles et hydrophiles se fera en deux temps.

Durant la période 2016 - 2017, le dispositif portera sur :

Document de travail

1) le criblage ciblé des toxines lipophiles réglementées et non réglementées en Europe, en utilisant : i) le test-souris selon la méthode de Yasumoto 1984 modifiée ; ii) l'analyse chimique par Chromatographie Liquide couplée à la spectrométrie de masse basse résolution (CL-SM/SM). Les groupes de toxines ciblés sont : acide okadaïque/Dinophysistoxines (AO/DTXs), azaspiracide (AZAs), pectenotoxine (PTXs), yessotoxine (YTXs), spirolide (SPXs), gymnodimine (GYMs), pinatoxine (PnTX), pteriatoxine (PtTX), palytoxine (PITXs), ovatoxine (OVAs).

2) développement méthodologique et harmonisation de traitement de données analytiques, entre les laboratoires IFREMER/PHYC et ANSES/LNR, pour le criblage non ciblé à la fois des toxines lipophiles et hydrophiles (listées ci-après) par analyse chimique en utilisant la spectrométrie de masse haute résolution (CL/SMHR).

A l'horizon 2018, mise en place du dispositif de vigilance pour les deux catégories de toxines lipophiles et hydrophiles : i) le test-souris selon la méthode de Yasumoto 1978 ; ii) criblage non ciblé en CL/SMHR : groupes acide okadaïque/Dinophysistoxines (AO/DTXs), azaspiracide (AZAs), pectenotoxine (PTXs), yessotoxine (YTXs), spirolide (SPXs), gymnodimine (GYMs), pinatoxine (PnTX), pteriatoxine (PtTX), ciguatoxine (CTXs), brevétoxine (BTXs), palytoxine (PITXs), ovatoxine (OVAs), acide domoïque (AD), saxitoxine/gonyautoxine (STXs/GTXs), tétrodoxin (TTXs), Cyanotoxines.

Pour chaque zone, la phase I se déroulera de la manière suivante :

- 1) des prélèvements systématiques mensuels d'eau de mer et de moules (espèce sentinelle pour les toxines marines. A défaut de moules, prélèvement d'une autre espèce coquillages).
 - i) Les prélèvements d'eau feront l'objet d'examens de la flore totale pour détecter d'éventuelles espèces de phytoplancton potentiellement toxiques, connues dans d'autres régions du monde mais non détectées dans les eaux françaises jusqu'à présent. Les observations phytoplanctoniques, réalisées par les Laboratoires Environnement Ressources (LERs) concernés par les zones sélectionnées, seront confirmées si nécessaire par les experts taxonomistes du LER de Concarneau. Cette action sera centralisée par le LER-BO de Concarneau.
 - ii) Les prélèvements de coquillages seront réalisés (2 X 2 kg de moules), dans la mesure du possible, la même semaine dans toutes les zones concernées.
- 2) Des échantillonneurs passifs, contenant un adsorbant, seront également émergés pour concentrer les toxines dissoutes, présentes à l'état de traces, afin de les détecter par analyse chimique. L'intérêt d'utiliser les échantillonneurs passifs est double : i) détecter les toxines des espèces phytoplanctoniques benthiques qui ne sont pas présentes dans la colonne d'eau (ex. *Prorocentrum lima* producteur des toxines du groupe acide okadaïque, *Ostreopsis ovata* producteur de palytoxine & ovatoxines) ; ii) utiliser matrice simple pour le criblage des toxines puisque la matrice des échantillonneurs passifs est beaucoup moins complexe que celle de moules (moins d'effet matrice).

En cas de discordance entre les résultats de test-souris et analyse chimique, un rapport sera réalisé immédiatement et transféré au comité de vigilance pour suite à donner, en particulier définir les actions à mener selon la conclusion du rapport sur la discordance.

Période 2016-2017 : criblage ciblé des toxines lipophiles réglementées et non réglementées en Europe

1. A partir d'un lot de coquillages de 2 kg, réalisation des tests biologiques sur souris selon la méthode Yasumoto 1984 modifiée (permettant l'extraction spécifique des toxines lipophiles) à partir des glandes digestives des coquillages dans lesquelles se concentrent le maximum de toxines algales, ce qui permettra de mettre en évidence de toxines émergentes présentes en faibles quantité. L'ensemble des échantillons fera l'objet de tests-souris, dans la mesure du possible, la semaine n+1 afin de pouvoir anticiper la récolte éventuelle de matériel contaminé supplémentaire (environ 10 kg).
2. A partir d'homogénats de glandes digestives ayant subi le test-souris, réalisation de criblage ciblé des toxines lipophiles réglementées et non réglementées en Europe par analyse chimique en utilisant la CL-SM/SM basse résolution: groupes acide okadaïque/Dinophysistoxines (AO/DTXs), azaspiracide (AZAs), pectenotoxine (PTXs), yessotoxine (YTXs), spirolide (SPXs), gymnodimine (GYMs), pinatoxine (PnTX), pteriatoxine (PtTX), palytoxine (PITXs), ovatoxine (OVAs). Après un essai d'inter-comparaison, en plus du laboratoire IFREMER/PHYC, le LNR de l'ANSES prendra en charge une partie des échantillons pour le criblage ciblé en CL-SM/SM.
3. En cas de test positif (mort de 2 souris sur 3) ou douteux (mort d'une souris sur 3 ou observation de symptômes anormaux) non expliqué par les résultats du criblage ciblé, le matériel supplémentaire (10 kg) servira à : i) réaliser un autre test-souris pour vérifier la discordance durant la semaine n+1 ; ii) démarrer les actions préliminaires, également sur le second lot de 2 kg, permettant de cerner davantage les propriétés physico-chimiques (thermostabilité, solubilité, comparaison des empreintes CL/SMHR des échantillons positif et négatif...). Notons que ce matériel supplémentaire ne pourra pas servir à mener la phase II du programme qui a pour objectif de tenter d'identifier l'agent en cause de la discordance. En effet, la purification, l'isolement et l'identification structurelle de composés bioactifs nécessite une grande quantité coquillages en cause. Par conséquent, pour les cas de discordances, le comité de vigilance étudiera au cas par cas, en fonction de la situation, afin que des quantités plus importantes soient à prélever et congeler en vue d'investigations ultérieures utilisant le fractionnement bio-guidé.
4. Parallèlement, en étroite collaboration avec le LNR-Biotoxines de l'Anses, et selon la disponibilité de matériel de référence, un développement méthodologique et une harmonisation de traitement de données seront menés pour inclure les autres toxines lipophiles et les toxines hydrophiles afin de mettre en place à l'horizon 2018 le criblage non ciblé de l'ensemble des groupes de toxines lipophiles et hydrophiles.
5. Les données sur la flore totale associées aux résultats du criblage ciblé des toxines lipophiles durant la période 2016 - 2017 seront celles acquises sur les prélèvements d'eau de chacune des zones concernées. En effet, l'exploitation de ces données en lien avec les experts taxonomistes d'Ifremer (LER-BO, Concarneau) permettent effet de détecter d'éventuelles nouvelles espèces de phytoplancton potentiellement toxiques, connues dans d'autres régions du monde mais non détectées dans les eaux françaises jusqu'à présent.

6. Les résultats de l'ensemble des actions entreprises feront systématiquement l'objet d'un rapport annuel rédigé par l'Ifremer et destiné au comité de pilotage du dispositif de vigilance.

A l'horizon 2018 : criblage non ciblé à la fois des toxines lipophiles et hydrophiles réglementées et non réglementées en Europe

1. A partir d'un lot de coquillages de 2 kg, réalisation des tests biologiques sur souris selon la méthode de Yasumoto 1978 : extraction avec l'acétone, qui permet de récupérer à la fois la majorité des composés lipophiles et hydrophiles, à partir des glandes digestives des coquillages dans lesquelles se concentrent le maximum de toxines algales, ce qui permettra de mettre en évidence de toxines émergentes présentes en faibles quantité. L'ensemble des échantillons fera l'objet, dans la mesure du possible, de tests-souris la semaine n+1 afin de pouvoir anticiper la récolte éventuelle de matériel contaminé supplémentaire (environ 10 kg).
2. A partir d'homogénats de glandes digestives ayant subi le test-souris, application de la méthode de criblage non ciblé, développée et harmonisée durant la période 2016-2017, pour la recherche des toxines lipophiles et hydrophiles réglementées et non réglementées en Europe en utilisant la CL/SMHR : groupes acide okadaïque/Dinophysistoxines (AO/DTXs), azaspiracide (AZAs), pectenotoxine (PTXs), yessotoxine (YTXs), spirolide (SPXs), gymnodimine (GYMs), pinatoxine (PnTX), ptériatoxine (PtTX), ciguatoxine (CTXs), brevétoxine (BTXs), palytoxine (PITXs), ovatoxine (OVAs), acide domoïque (AD), saxitoxine/gonyautoxine (STXs/GTXs), tétrodoxin (TTXs), cyanotoxines (CYAN). Comme les systèmes analytiques CL/SMHR, utilisés par les deux laboratoires concernés (PHYC, LNR), ont des interfaces de traitements de données différentes, des essais d'inter-comparaison seront conduits dans un premier temps avant de répartir les échantillons à analyser entre les deux laboratoires.
3. En cas de test positif ou douteux non expliqué par les résultats de l'analyse chimique, le matériel supplémentaire (10 kg) servira à : i) réaliser un autre test-souris pour vérifier la discordance durant la semaine n+1 ; ii) démarrer les actions préliminaires, également sur le second lot de 2 kg, permettant de cerner davantage les propriétés physico-chimiques (thermostabilité, solubilité, comparaison des empreintes CL/SMHR des échantillons positif et négatif...). Notons que ce matériel supplémentaire ne pourra pas servir pour mener la deuxième phase du projet proposé en vue de tenter d'identifier l'agent en cause de la discordance. En effet, la purification, l'isolement et l'identification structurelle de composés bioactifs nécessite une grande quantité coquillages en cause. Par conséquent, pour les cas de discordances, le comité de vigilance étudiera au cas par cas, en fonction de la situation, afin que des quantités plus importantes soient à prélever et à congeler en vue d'investigations ultérieures utilisant le fractionnement bio-guidé.
4. Les données phytoplancton flore totale associées aux résultats du criblage non ciblé des toxines lipophiles et hydrophiles seront celles acquises sur les prélèvements d'eau de chacune des zones concernées. En effet, l'exploitation de ces données en lien avec les

Document de travail

experts taxonomistes d'Ifremer (LER-BO, Concarneau) permettent effet de détecter d'éventuelles nouvelles espèces de phytoplancton potentiellement toxiques, connues dans d'autres régions du monde mais non détectées dans les eaux françaises jusqu'à présent.

5. Les résultats de l'ensemble des actions entreprises feront systématiquement l'objet d'un rapport annuel destiné au comité de pilotage du dispositif de vigilance.

Nota 1 : dans le cadre de la surveillance et l'observation du phytoplancton réalisé par Ifremer, en cas d'observation d'une présence inhabituelle de phytoplancton potentiellement toxique, la cellule de vigilance sera informé et décidera des suites à donner au cas par cas.

Nota 2 : dans le cadre de la surveillance de routine réglementaire la famille des pinnatoxines, imine cyclique non réglementée, mise en évidence à Ingril à Thau, pourrait être intégrée dans la méthode d'analyse chimique des toxines lipophiles réglementées actuellement utilisée sur l'ensemble des échantillons de la surveillance. Pour cela, cette famille de toxine doit être prise en compte lors des essais d'aptitude organisés par le LNR-Anses.

Nota 3 : des propositions sur les modalités de mise en œuvre de ce nouveau dispositif de vigilance feront l'objet d'un autre document.

Phase II : étude d'investigation en cas de toxicité inexplicée des coquillages sur souris

Nota : cette phase relève de la recherche multipartenaires, et qui est déclenchée, seulement en cas de confirmation de toxicité inexplicée, par le comité de vigilance.

Sur les échantillons à l'origine de la discordance des résultats entre test-souris et analyses chimiques, des études plus approfondies seront menées pour tenter de cerner le(s) composé(s) à l'origine de la discordance.

- Un tests-souris par voie orale sera réalisé pour caractériser le potentiel toxique et mieux apprécier le risque sanitaire. Ce test sera réalisé selon une procédure standardisée OCDE selon les lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques par voie orale sur les rongeurs.
- Une action à court terme consistera à immerger des moules saines dans la zone contaminée afin de suivre le niveau d'accumulation de(es) composé(s) en cause dans le temps. Un lot de ces mêmes moules sera gardé comme témoin pour les analyses comparatives des empreintes de métabolites par CL/SMHR. En effet, il est possible de repérer éventuellement un(des) pic(s) dans le chromatogramme des moules contaminées après immersion correspondant au(x) composé(s) toxique(s) en cause et qui serait(seraient) absent(s) dans le chromatogramme des moules témoins.
- Dans le cadre d'une action à moyen terme (2 à 3 ans), le laboratoire IFREMER/PHYC propose son savoir-faire pour réaliser une stratégie de fractionnement bio-guidé couplé à l'analyse chimique non ciblée par CL/SMHR pour la mise en évidence de nouveaux composés bio-actifs. Il s'agit de procéder à une recherche d'activité(s) biologique(s) par fractionnements successifs de l'extrait brut de départ avec un guidage (suivi d'activité) sur une batterie de tests cellulaires couplée à l'analyse chimique. Cela permettra d'acquérir des éléments de réponse sur l'activité toxique (cytotoxicité, neurotoxicité, activité hémolytique...) et éventuellement le mécanisme d'action du(es) principe(s) actif(s) en cause contenus dans les fractions pré-purifiées. Cette partie sera réalisée en collaboration avec des équipes spécialisées (Anses-Fougères, laboratoire «Toxines, récepteurs et canaux ioniques» du CEA-Gif sur Yvette...).
- Les fractions prépurifiées feront l'objet de : i) test-souris par voie intrapéritonéale pour faire le lien avec l'activité de départ de l'extrait brut à l'origine de la mort des souris, ii) tests-souris par voie orale pour caractériser le potentiel toxique et mieux apprécier le risque sanitaire.
- Poursuite du fractionnement bio-guidé, à partir des fractions purifiées, en vue d'isoler le(s) composé(s) à l'origine de la toxicité inexplicée sur souris, et tenter de l'identifier.

Selon le degré de concordance des résultats entre les tests cellulaires et ceux du test-souris, ces travaux pourraient aboutir par la suite au développement de tests de toxicité cellulaire *in vitro* applicables à grande échelle et en routine dans le cadre du dispositif de vigilance à la place du test sur souris.

NOTE
d'appui scientifique et technique
de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation,
de l'environnement et du travail

relatif à la définition de nouvelles modalités pour la veille d'émergence pour les
biotoxines contaminant les coquillages dans le milieu marin

ANNEXE 2

Document de l'Ifremer :
« Vigilance - revue des points et propositions
d'évolutions pour 2016 »,
Nadine Neaud, avril 2015, 12 pages



INTRODUCTION

Suite à la réunion du comité de Vigilance qui s'est tenue à la DGAL le 30 janvier 2015, Il apparaît nécessaire de faire la revue des points suivis dans le cadre de ce système. D'une part parce qu'il ne reste plus que huit points suivis et d'autre part parce qu'il pourrait être envisageable de déplacer des points.

Dans son avis du 4 décembre 2009 (n°2009-SA-0205), l'Anses (ex-Afssa) considérait que les dix « points de référence toxines lipophiles » qui avaient été définis pour une surveillance renforcée sur l'année 2009, constituaient la base d'un dispositif de vigilance. Les critères ayant déterminé le choix de ces points étaient :

- une répartition homogène sur la France
- des points situés dans des zones de production actives toute l'année
- certains points dans des zones à risque, dont certains avec présence de résultats de bio-essais suspects ou non expliqués
- d'autres points dans des zones non à risque, pour la détection éventuelle de toxines émergentes
- priorité donnée à des points comportant des moules

Dans son avis rendu en 2014 suite à saisine n° 2012-SA-0196, l'ANSES recommande :

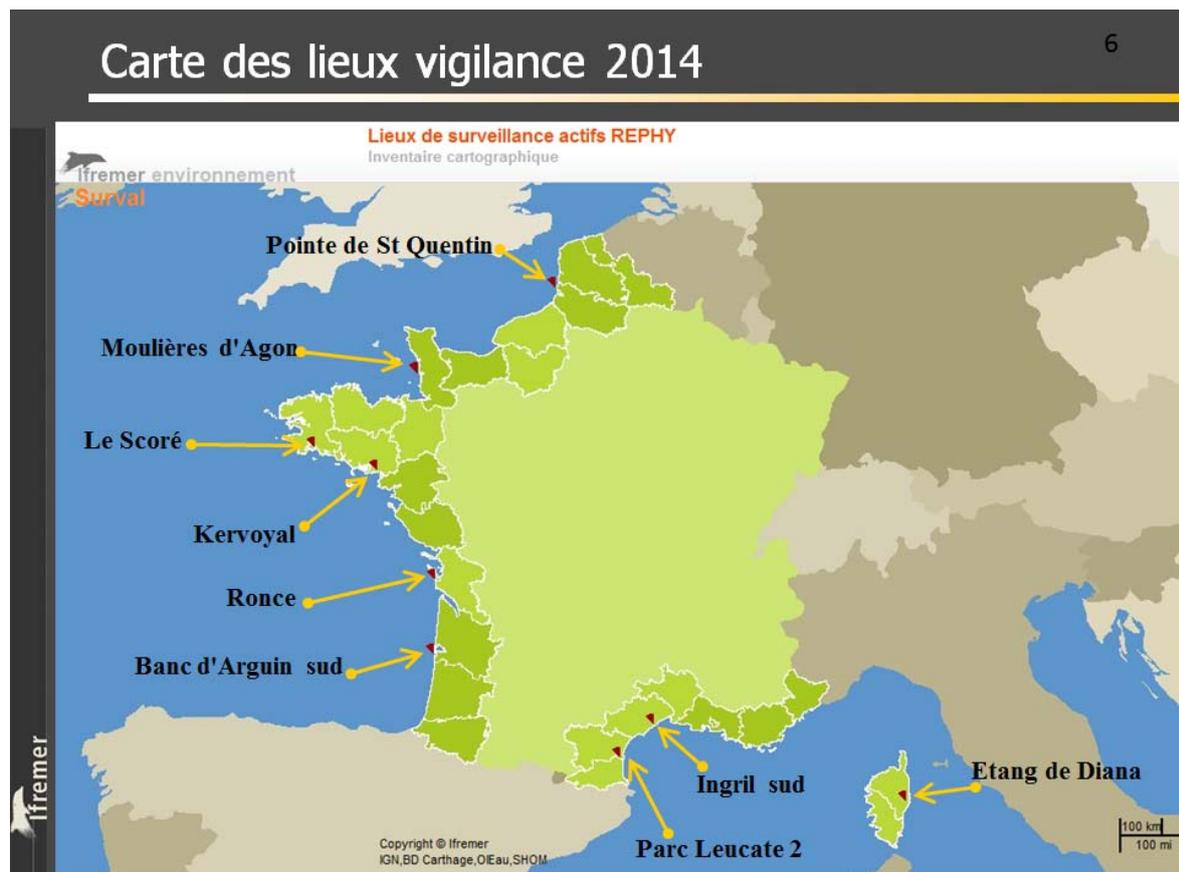
*"de maintenir des prélèvements de coquillages et d'eau de mer à un rythme mensuel sur les 10 points de référence et de les compléter sur la base d'autres critères tels que l'intérêt scientifique (par exemple « Ingril sud » pour le suivi des pinnatoxines) ou la production annuelle de coquillages (afin d'**inclure des points avec une forte production et donc un fort intérêt en termes de représentativité de coquillages consommés en France**)."*

TABLEAU 1 : POINTS DE VIGILANCE TOXINES LIPOPHILES 2014

LER	point	coquillages prélevés	Périodes à risque 2014	Commentaires
LER/BL Boulogne	Pointe de St Quentin 006-P-009	moules bouchot	/	zone située hors zone à risque, n'ayant jamais connu d'épisode toxique jusqu'en 2010.
LER/N Bessin	Antifer ponton pêche 010-P-002	moules struct. spécifique	Mai-juin août à oct	Arrêt en février 2014 car zone portuaire risque de contamination chimique
	Moulières d'Agon 018-P-096	moules bouchot	/	zone située hors zone à risque pour les coquillages côtiers, n'ayant jamais connu d'épisode toxique.
LER/BO Concarneau	Le Scoré 047-P-003	moules filières	Avril à novembre	zone à risque
LER/MPL/TM La Trinité	Kervoyal 065-P-001	moules bouchot	Mai-juin	zone à risque + résultats de temps de survie courts avec symptômes neurologiques en 2006 et en 2007
LER/MPL/NT Nantes	Le Grand traict 068-P-002	coques gisement naturel	Mai à juillet	Arrêt de la vigilance sur ce point en mars 2013, pour cause d'épuisement de la ressource coquillage

LER/PC/LR Rochelle	La Ronce 082-P-009	huîtres creuses culture sur table	Mai	Zone à risque depuis 2013, observation de résultats douteux à plusieurs reprises avant 2007
LER/AR Arcachon	Banc Arguin sud 087-P-009	moules gisement naturel	Avril à juin	plusieurs épisodes toxiques atypiques depuis 2005 Arrêt en 2013 de la vigilance sur les huîtres de ce point
LER/LR Sète	Parc Leucate 2 097-P-002	huîtres creuses filière ou corde	Janv à avril nov - déc	zone à risque sur une longue période + observation de résultats douteux à plusieurs reprises depuis 2003
	Ingril Sud 105-P-152	moules filière ou corde	Janv nov - déc	Arrêt des bio-essais en 2014. Lieux suivi pour les pinnatoxines
LER/PAC/CO Bastia	Diana centre 118-P-001	moules filière ou corde	Fév - mars	zone à risque

POSITIONNEMENT DES POINTS DE VIGILANCE 2014



Il ne reste donc plus que 8 points suivis dans le cadre de la Vigilance (Ingril exclu). La cellule déplore cela et souhaite que 2 points supplémentaires soient proposés afin de maintenir ce système sur 10 points au moins comme cela avait été recommandé à l'origine de sa mise en place.

Il semble utile de faire aussi une revue de ces lieux afin de vérifier leur pertinence pour le système de Vigilance mais aussi d'un point de vue opérationnel.

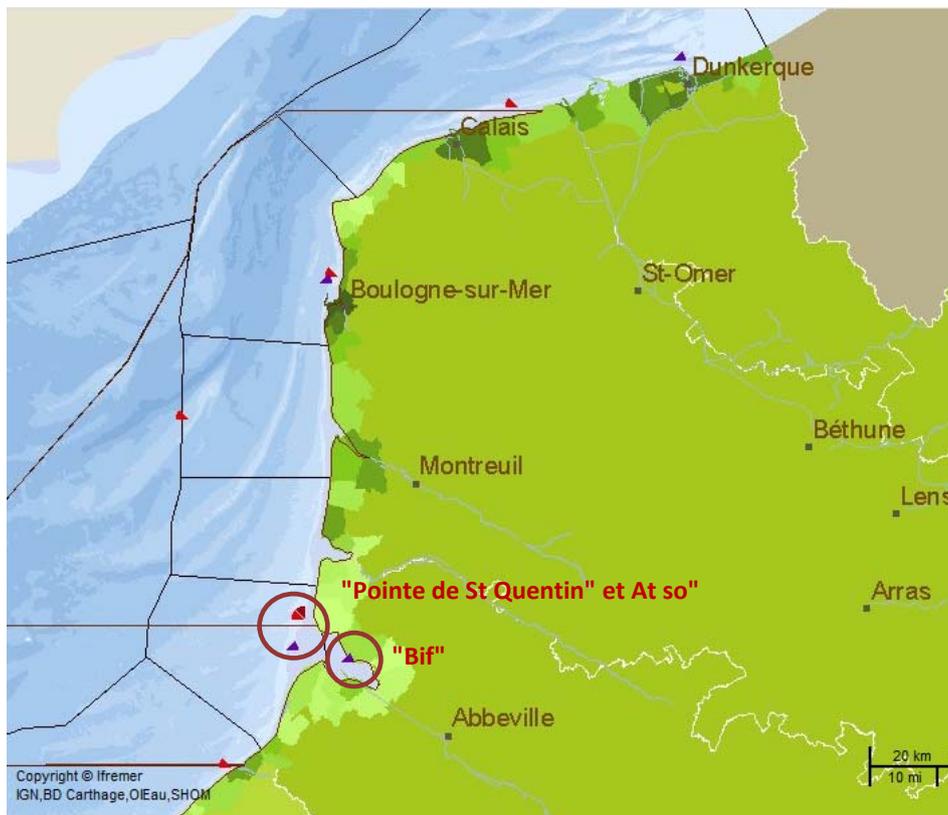
Les critères seraient tout ou partie :

- Situé en zone de production conchylicole. Moule de préférence car semble être meilleur intégrateur pour détecter des événements atypiques.
- En zone à faible durée de période à risque et dans la quelle il y a habituellement très peu d'échantillonnage pour recherche de toxine. Ceci pour combler le manque de surveillance des coquillages de ces zones (cf. avis ANSES suite à saisine n° 2012-SA-0272)
- Point associé à un lieu à stratégie flore totale
- Répartition géographique couvrant tout le littoral

REVUE DES LIEUX ET PROPOSITIONS D'EVOLUTIONS

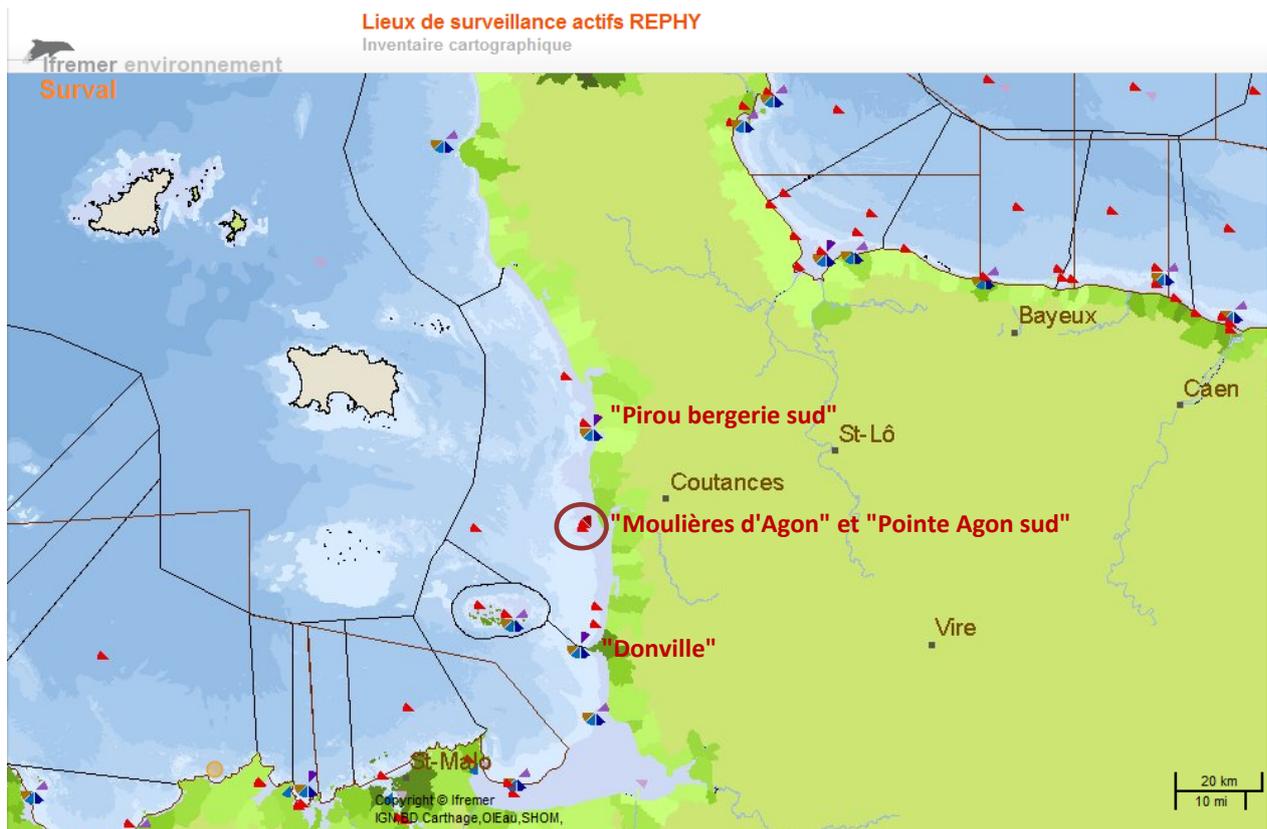
LER / BL "Pointe de St Quentin"

Pas de changement à proposer. "Pointe de St Quentin" réponds aux critères, particulièrement concernant le fait qu'il soit situé dans la zone de production de moules la plus importante du secteur. Il est associé au lieu "At so" dans la même zone marine pour le phytoplancton total dans l'eau. Le point "Bif" situé en baie de Somme fait l'objet du suivi des flores totales et peut apporter des éléments supplémentaires.



LER / N "Moulières d'Agon" 018-P-096

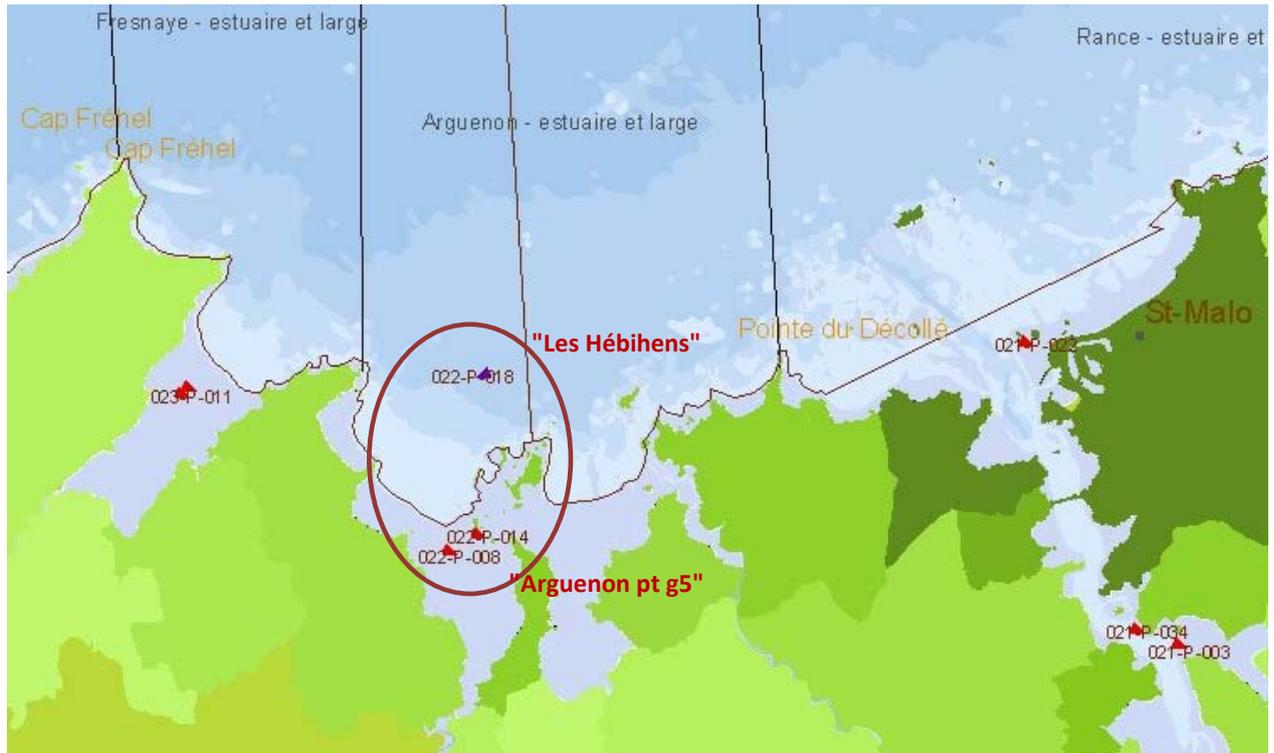
"Moulières d'Agon" répond aux critères et est associé au point "Pointe Agon sud" 018-P-057 qui fait l'objet d'un suivi des flores partielles indicatrices (programme RHLN). Deux autres points de la même zone marine font l'objet du suivi des flores totales : "Pirou Bergerie sud" 018-P-021 et "Donville" 018-P-054. Pour cette zone marine, une réflexion est en cours pour avoir une représentation plus homogène du suivi des flores de la zone.



LER / BN pas de point actuellement

Un point en Bretagne Nord est proposé afin d'augmenter le nombre de points et améliorer la couverture géographique.

Le point "Arguenon pt g5" 022-P-008 associé aux flores totales de "Les Hébihens" 022-P-018 semble approprié car situé en zone importante de production mytilicole. Il n'y a pas de période à risque identifiée sur ce secteur qui est quasiment jamais affecté par les *Dinophysis*.



LER / BO "Le Scoré" 047-P-003

"Le Scoré" est associé au point flore totale "Concarneau large" 047-P-016. A priori pas de changement à proposer, ce point répond bien aux critères.



LER / MPL "Kervoyal" 065-P-001

"Kervoyal" 065-P-001 est associé au point "Ouest Loscolo" 063-P-002 pour le suivi des flores totales. Ce point correspond aux critères, pas de changement à proposer pour ce secteur.



LER / PC "Ronce"

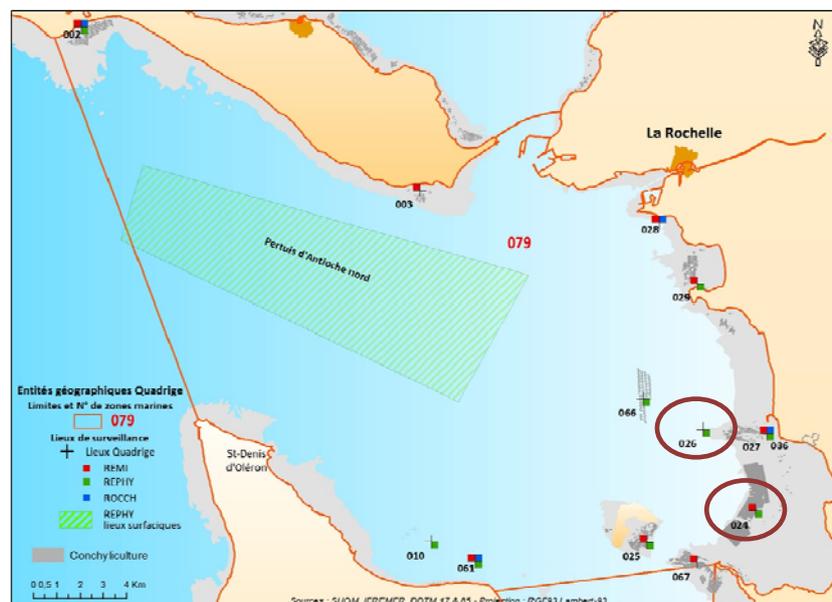
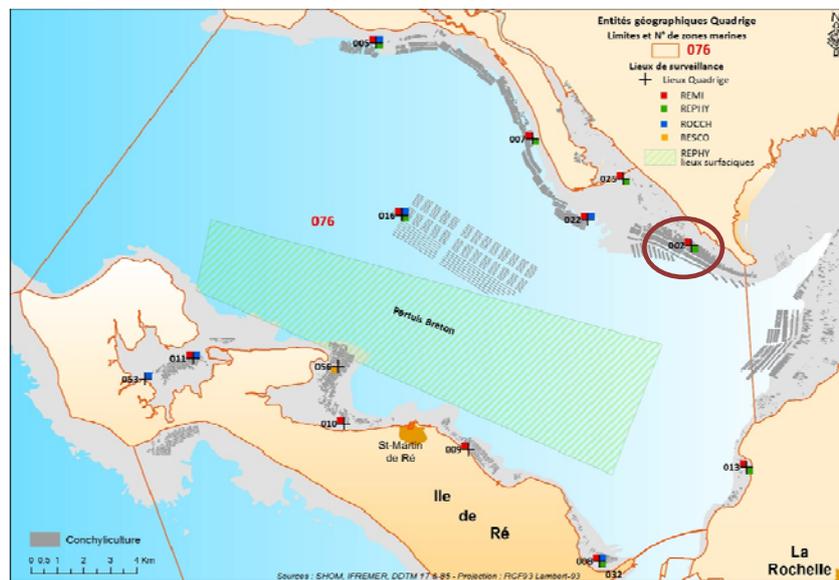
Pour le remplacement du suivi des huîtres par un suivi sur les moules deux propositions sont envisagées :

Dans le pertuis Breton le point "L'Eperon (terre) 076-P-002 qui est également échantillonné pour le suivi des flores totales.

Dans le pertuis d'Antioche le point "Baie d'Yves (a)" 079-P-024 associé à "Le Cornard" 079-P-026 pour la flore totale.

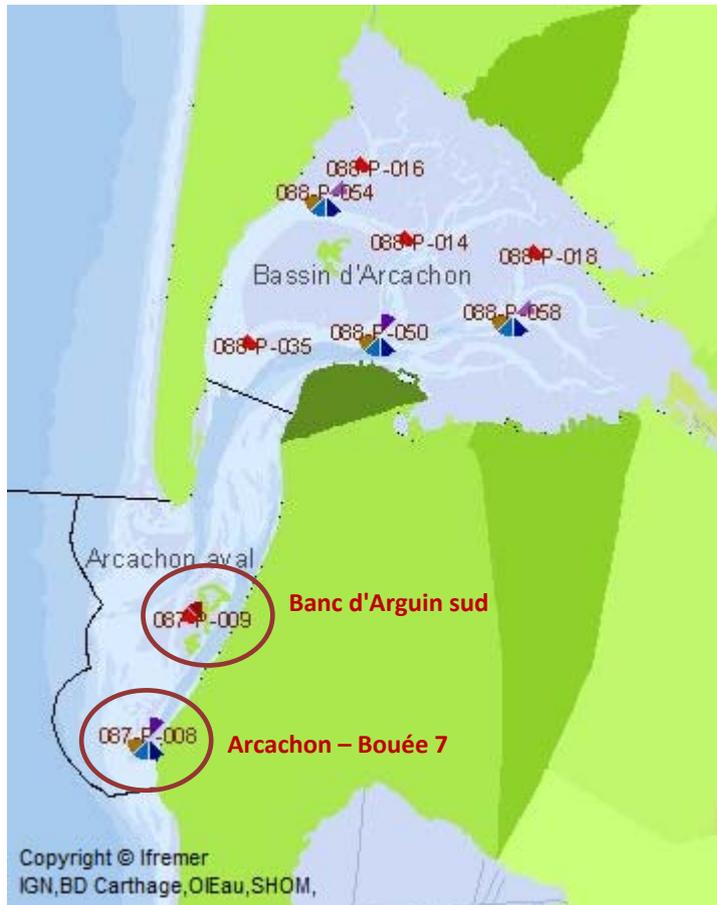
Les filières ne sont pas proposées pour raison opérationnelles car les prélèvements ne peuvent être faits que par un professionnel.

Le suivi pourrait s'opérer sur l'une ou l'autre de ces zones, ou bien les deux, cela répondrait au souhait de la cellule vigilance d'opérer un suivi proportionnel à l'importance de la production en tonnage. Toutefois cela représente une charge supplémentaire de travail pour le LER/PC pour laquelle nous ne sommes pas actuellement en mesure d'évaluer la capacité du laboratoire.



LER / AR "Banc d'Arguin sud" 087-P-009

"Banc d'Arguin sud" est associé au point "Arcachon – Bouée 7" pour le suivi des flores totales. Ce point correspond aux critères, pas de changement à proposer pour ce secteur.



LER / LR "Parc Leucate 2"

"Parc Leucate 2" n'est pas satisfaisant pour la vigilance car trop souvent affecté par des contaminations en toxines lipophiles (période à risque d'octobre à juin). L'étang de Thau qui est un gros centre de production de moules en méditerranée pourrait être envisagé (un seul mois en période à risque, juin). Dans cet étang, deux points font l'objet d'une surveillance des coquillages et de la flore totale dans l'eau : "Marseillan (a)" 104-P-002 dans le sud de l'étang et "Bouzigue (a)" 104-P-001 au nord. "Marseillan (a)" semble mieux indiqué pour un suivi dans le cadre de la Vigilance pour des raisons opérationnelles, et par ce qu'historiquement peut affecté par des alertes à phytoplanctons toxiques connus.

Par ailleurs, il existe des élevages de moules sur filière en pleine mer qui ont rarement fait l'objet de recherche de toxines car rarement affectés par des alertes à phytoplanctons toxiques connus. "Filières des Aresquiers" 102-P-005 et "Filières de Sète-Marseillan" 102-P-006, ces deux points sont associés au point "Sète mer" 102-P-007 pour le suivi de la flore totale dans l'eau. La difficulté pour le suivi des moules de ces filières réside dans le fait que l'échantillonnage ne peut être réalisé que par les professionnels.



LER / PAC site de Toulon pas de point suivi

LER / PAC site de Bastia "Diana centre" 118-P-001

La surveillance de la flore totale est réalisée sur le même point. Ce point répond aux critères. Aucun changement n'est proposé.



POSITIONNEMENT DES POINTS ENVISAGÉS POUR 2016

