

ENSP

ECOLE NATIONALE DE
LA SANTE PUBLIQUE

RENNES

Ingénieur du Génie Sanitaire

Promotion 2007

Atelier Santé et Environnement :
Les toxines marines sur le littoral français,
état des connaissances

Référent : Michèle LEGEAS
Département EGERIES, ENSP

BERTRAND Nicolas
Ingénieur ENSC Rennes
CATHALA Delphine
Elève ingénieur 2^e année Engées
DELAHAIE Sophie
Ingénieur UTC

R e m e r c i e m e n t s

Nos remerciements s'adressent aux personnes suivantes :

- Madame Michèle Legeas, enseignante-chercheure en gestion des risques microbiologiques au sein du département EGERIES de l'ENSP, pour sa disponibilité et ses nombreux conseils tout au long de ce travail,
- Monsieur Lilian Puech, responsable de la mission des affaires internationales à l'Afssa, pour ses précieux renseignements,
- Monsieur J-F Guillaud, du Département Dynamiques de l'Environnement Côtier (DYNECO) de l'Ifremer de Brest, pour ses conseils sur l'eutrophisation marine.

Sommaire

Introduction	7
Partie 1 Le danger	8
I. Effets néfastes	8
A. Classes de toxines et effets aigus associés	8
B. Effets chroniques ?	8
II. Littoral français : les toxines incriminées	9
A. Toxines DSP (Diarrheic Selfish Poisoning)	9
B. L'Ostréotoxine ou palytoxine	12
C. La Saxitoxine (STX)	14
D. La Brévotoxine (BTX)	16
E. Acide domoïque (Toxine ASP)	17
F. Les spirolides	19
III. Valeurs Toxicologiques de Référence et valeurs réglementaires	20
Partie 2 : Le déterminisme des HABs de microalgues toxiques	22
I. La diversité spécifique des populations phytoplanctoniques	22
II. Les facteurs influençant la dynamique des populations phytoplanctoniques	22
A. Les facteurs environnementaux	22
B. Les efflorescences algales	23
III. La toxinogénèse et le rôle des toxines d'algues	23
IV Conclusion de la partie.	25
Partie 3: La population face au risque sanitaire	27
I Voies d'exposition et population exposée	27
A. Voies d'exposition	27
B. Population exposée	28
II Données sanitaires	29
A Pourquoi s'intéresser aux données épidémiologiques ?	29
B Le recueil des données épidémiologiques	29
C L'exploitation des données épidémiologiques	29
III Evolution du risque sanitaire : facteurs soupçonnés	31
A. Le problème des eaux de ballast	31
B. Le réchauffement climatique	32
C. Les nitrates	33
D. Habitudes alimentaires	34
IV Potentialité de présence des toxines	35
A. Actuellement sur les cotes françaises	35
B. Nouvelles espèces	37
C. Les espèces dangereuses dans le monde	37
Partie 4 Gestion actuelle du risque lié aux toxines marines en France	39
I Surveillance mise en place	39
A. Le Rephy	39
B. La surveillance sur le marché	40
C. Le programme COSTE	41
II Techniques d'analyses des phycotoxines marines	42

A. Les méthodes _____	42
B. Critiques des bioessais sur les souris _____	42
C. Alternative au remplacement des bioessais sur les souris _____	43
III Détoxification des coquillages _____	44
A. Cadre réglementaire _____	44
B. Cinétiques de détoxification _____	44
C. Procédés de détoxification alternatifs au reparcage _____	44
IV La modélisation : futur outil de gestion ? _____	46
A. Modélisation prédictive _____	46
B. Modélisation descriptive : mise en évidence du bloom algal _____	46
V La crise du bassin d’Arcachon _____	47
A. Description des faits _____	47
B. Analyses et critiques de la gestion de crise _____	47
Partie 5 Discussion et propositions d’améliorations _____	48
Annexe _____	51

Liste des Figures et Graphes

<i>Figure 1: L'algue dinophysis.....</i>	9
<i>Figure 2: Structure de l'acide okadaïque.....</i>	10
<i>Figure 3: Structure de la pecténotoxine.....</i>	10
<i>Figure 4: Structure de l'azaspiracide.....</i>	10
<i>Figure 5: L'algue Ostreopsis ovata.....</i>	12
<i>Figure 6: L'algue Alexandrium tamarense.....</i>	14
<i>Figure 7: Structure des toxines paralysantes.....</i>	15
<i>Figure 8: L'algue Gymnodinium breve.....</i>	16
<i>Figure 9: L'algue Pseudo-nitzschia.....</i>	17
<i>Figure 10: Structure de l'acide domoïque.....</i>	17
<i>Figure 11 Structures des spirolides (Kai Meilert et al, 2006).....</i>	19
<i>Figure 12 : Relationships between environmental stressors and direct and indirect effects on biological systems. Direct pathways affect organisms primarily through biochemical and metabolic processes and indirect pathways influence biota through effects on food and habitat availability intra- and interspecific interactions.....</i>	26
<i>Figure 13: Chaîne de contamination par ingestion de coquillages.....</i>	27
<i>Figure 14: Découpage du littoral en sites.....</i>	35
<i>Grphe 1: évolution des ventes et cours des coquillages et céphalopodes frais (particuliers).....</i>	34
<i>Grphe 2: Durée cumulée de fermeture, par année, sur tout le littoral français.....</i>	36

Lexique et Sigles

Allelopathie : aptitude à inhiber la croissance des espèces algales concurrentes pour un ou plusieurs facteurs du milieu environnant, inhibition qui peut être nécessaire lorsque, par exemple, la surface disponible s'avère être un facteur limitant majeur, défense contre la prédation.

Diatomée : les diatomées sont des microalgues unicellulaires planctoniques des eaux douces et marines (de trois micromètres à un millimètre). Les diatomées peuvent être des cellules libres ou réunies en colonies. Elles sont bien représentées dans la flore des eaux douces et constituent près de 50% de la biomasse du phytoplancton marin eucaryote. Les formes pélagiques appartiennent au phytoplancton, les formes benthiques appartiennent au microphytobenthos.

Dose Létale 50 : La dose létale 50 ou DL50 (LD50 en anglais pour Lethal Dose 50) ou CL50 (concentration létale 50) est un indicateur quantitatif de la toxicité d'une substance. Cet indicateur mesure la dose de substance causant la mort de 50 % d'une population animale donnée (souvent des souris ou des rats) dans des conditions d'expérimentation précises.

Efflorescence algal : Il s'agit d'une prolifération d'algues qui survient lorsque les eaux sont enrichies en nutriments, notamment les phosphates et les nitrates issus de l'agriculture. Le phytoplancton en forte densité peut provoquer un changement de couleur visible de l'eau.

Episode toxique : correspond à la présence d'une efflorescence de microalgues toxigènes dans le milieu aquatique pouvant potentiellement contaminer les fruits de mer, mais sans préjudice sanitaire pour l'homme car détectée par le dispositif de prévention.

Episode d'intoxication alimentaire : correspond à l'observation d'une toxi-infection alimentaire et donc de désordres sanitaires.

HAB : L'appellation internationale «Harmful Algal Bloom» (HAB) remplace de plus en plus la terminologie très utilisée dans le passé de «Red Tides» (marées rouges). Les HABs se réfèrent à un ensemble hétérogène d'événements, qui ont comme caractéristiques communes i) une origine microalgale, et ii) des conséquences négatives sur les activités humaines (Gailhard, 2003).

Flagellé : les flagellés (du latin flagellum = fouet) sont des organismes eucaryotes unicellulaires, qui sont dotés de flagelles dont ils se servent pour leur propulsion. Certains flagellés sont hétérotrophes, c'est-à-dire qu'ils se nourrissent de substances organiques, d'autres sont autotrophes et pratiquent la photosynthèse

Mixotrophie : les mixotrophes sont des organismes capables d'exercer à la fois une activité photosynthétique et une activité hétérotrophe par ingestion de composés organiques dissous et/ou particulaires. La combinaison de ces 2 stratégies nutritionnelles peut présenter certains avantages compétitifs face aux hétérotrophes ou phototrophes stricts, en particulier en conditions limitantes (limitation liée à une faible luminosité, à une faible disponibilité en éléments nutritifs dissous ou particulaires....)

Photosynthèse : La photosynthèse est un processus qui permet aux plantes de capter l'énergie solaire, et de fabriquer les substances nécessaires à la vie de la plante. C'est la fabrication de matière avec du carbone organique à partir de carbone minérale en présence de lumière. Les besoins nutritifs de la plante sont le dioxyde de carbone de l'air, de l'eau et les minéraux du sol. Les végétaux sont dits autotrophes pour le carbone.

Phytoplancton : Le phytoplancton (du grec phyton ou « plante ») est le plancton végétal à la base de la chaîne alimentaire marine. Les algues flottantes du phytoplancton sont unicellulaires, autotrophes vis-à-vis du carbone et accomplissent la photosynthèse (les diatomées et les dinoflagellés appartiennent au phytoplancton).

Remontée d'eau (Upwelling en anglais) : phénomène océanographique qui se produit lorsque de forts vents marins (généralement des vents saisonniers) poussent l'eau de surface des océans laissant ainsi un vide où peuvent remonter les eaux de fond et avec elle une quantité importante de nutriments.

Valeur Toxicologique de Référence (VTR) : Appellation générique regroupant tous les types d'indice toxicologique qui permettent d'établir une relation entre une dose et un effet (toxique à seuil d'effet) ou entre une dose et une probabilité d'effet (toxique sans seuil d'effet). Les VTR sont établies par des instances internationales (OMS, CIPR, etc.) ou des structures nationales (US-EPA, ATSDR, RIVM, Health, CSHPF, etc.).

AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments

AO : Acide Okadaïque

ASP : Amnesic Shellfish Poisoning

AZP : Azaspiracid Poisoning

BTX : Brévetoxine

CEPRALMAR : Centre d'Etudes et de Promotion des Activités Lagunaires et Maritimes.

CNC : Comité National de la Conchyliculture

CNPMEM : Comité National des Pêches Maritimes et des Elevages Marins

COSTE : Comité d'Orientation Scientifique et Technique d'Evaluation

CREAA : Centre Régional d'Expérimentation et d'Application Aquacole

CRPM : Comités Régionaux des Pêches Maritimes et des élevages marins

CSP : Ciguatera Fish Poisoning

DGAL : Direction Générale de l'Alimentation

DDASS : Direction départementale de l'Action Sanitaire et Sociale

DDSV : Direction Départementale des Services Vétérinaires

DPAM : Direction des Pêches Maritimes et de l'Aquaculture

DSP : Diarrheic Shellfish Poisoning

DTX : Dinophysitoxine

HAB : Harmful Algal Bloom

ICP: Intoxication Ciguatérique pas les Poissons

IFREMER : Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer

LCR : Laboratoire Communautaire de Référence

LNR : Laboratoire National de Référence

NSP : Neurotic Shellfish Poisoning

PSP : Paralytic Shellfish Poisoning

PTX : Pecténotoxine

SMEL : Syndicat Mixte pour l'Équipement du Littoral

SMIDAP : Syndicat Mixte de Développement de l'Aquaculture et de la Pêche

STX : Saxitoxine

SRC : Sections Régionales de la Conchyliculture

Introduction

Durant l'été 2006, deux épisodes de contamination aux phycotoxines des eaux marines ont eu lieu le long du littoral français. L'un a donné lieu et donne encore lieu, aujourd'hui, à investigation et débat. L'autre est passé quasiment inaperçu, alors que l'analyse des faits et de la toxine probablement impliquée aurait pu également alerter les autorités sanitaires.

Les conditions de transfert et d'introduction d'organismes vivants via les échanges de produits ou de personnes, mais également du fait des changements de conditions écologiques (modification de la température des eaux, de la pluviométrie, des fonds ou des pressions anthropiques, ...) sont de plus en plus favorables à l'implantation d'espèces à potentiel toxique sur nos côtes.

En France, un organisme est chargé du contrôle de la présence des espèces ou des toxines dans les eaux littorales des zones de production halieutique (Ifremer). La surveillance repose sur la recherche ciblée d'espèces ou de molécules pré établies d'une part et sur un test global de toxicité d'autre part (test souris).

La crise ayant sévit dans le bassin d'Arcachon en 2006 met en évidence les limites de cette approche. Il semble donc intéressant de faire l'état des connaissances sur les substances toxiques produites par ces organismes et sur les moyens de lutte contre leurs effets sur la santé humaine.

Problématique

La surveillance mise en place est-elle suffisante par rapport au niveau de risque sanitaire induit par les toxines marines en France métropolitaine ?

Partie 1 Le danger

I. Effets néfastes

A. Classes de toxines et effets aigus associés

A ce jour, les scientifiques ont identifié six syndromes alimentaires dus à des phycotoxines : cinq pour lesquels les vecteurs sont les coquillages et un lié à la consommation de poissons tropicaux. Il est d'usage de dénommer les familles de toxines en fonction du syndrome qu'elles induisent chez l'homme.

Ainsi, cinq familles contaminent les coquillages :

- les phycotoxines diarrhéiques et associées, provoquant **l'intoxication diarrhéique par les fruits de mer (IDFM)** (ou DSP) ;
- les phycotoxines paralysantes, provoquant **l'intoxication paralysante par les fruits de mer (IPFM)** (ou PSP) ;
- les phycotoxines amnésiantes, provoquant **l'intoxication amnésiante par les fruits de mer (IAFM)** (ou ASP) ;
- les phycotoxines neurologiques, provoquant **l'intoxication neurologique par les fruits de mer (INFM)** (ou NSP)
- les azaspiracides, provoquant l'intoxication par les azaspiracides (ou AZP), caractérisée depuis 2002. Ces molécules sont également responsables d'un syndrome de nature diarrhéique, mais elles ont été volontairement singularisées car leur mode d'action diffère de celui des autres toxines diarrhéiques.

(Une description plus complète des effets associés à ces intoxications est réalisée par la suite avec la présentation des phycotoxines présentes sur nos côtes.)

On compte principalement une famille contaminant les poissons tropicaux : les phycotoxines ciguatériques, provoquant **l'intoxication ciguatérique par les poissons (ICP)**, de nature gastro-intestinale et neurologique (mortalité < 1%).

Encore peu étudiés et donc beaucoup moins évoqués dans la littérature, il existe des effets dus à l'inhalation de certaines toxines ou à un contact cutané. Ces effets sont cependant moins graves et le rétablissement est rapide :

- irritation des voies supérieures (toux, sensations de brûlures) lors d'inhalations,
- démangeaisons et irritations oculaires lors de contacts cutanés.

Pour la plupart des cas recensés, il s'agit de toxines qui induisent également des syndromes alimentaires. (*Krys S. et al, Déc.2002*)

B. Effets chroniques ?

Le risque chronique lié à la consommation régulière de faibles quantités de toxines sera probablement évalué dans l'avenir pour la famille des phycotoxines diarrhéiques. L'acide okadaïque, chef de file de cette famille, est soupçonné d'être un promoteur tumoral et de présenter une action génotoxique (voir II Littoral français : les toxines incriminées, toxines DSP). (*Krys S. et al, Déc.2002*)

II. Littoral français : les toxines incriminées

A. Toxines DSP (Diarrheic Selfish Poisoning)

1. Présentation

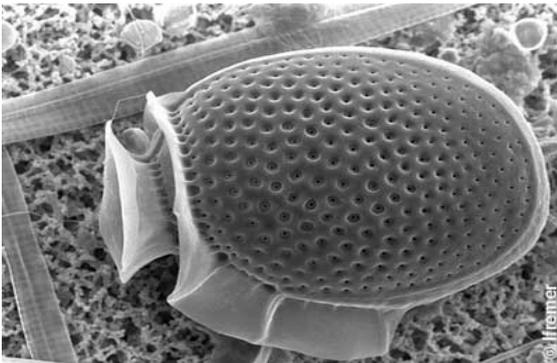
Les toxines DSP regroupent l'ensemble des toxines ayant un effet diarrhéique. Elles sont présentes en France, dans les dinoflagellés marins : *Dinophysis* spp. (R. Baylet et al., 2004 et JM. Frémy, 2001).

On distingue plusieurs toxines parmi cette famille: **l'acide okadaïque** et ses dérivés, **les pecténotoxines** (essentiellement au Japon et en Nouvelle Zélande) et ses dérivés (PTX1, PTX2, PTX3 et PTX6), **les yessotoxines** (Nouvelle Zélande, elles ne semblent pas toxiques) et **les azaspiracides** (toxines émergentes).

La principale toxine française étant **l'acide okadaïque**, c'est cette dernière que nous allons développer. Il a été trouvé de façon anecdotique des toxines de type pecténotoxine qui sembleraient être émergentes en France. Enfin, **l'azaspiracide** est une toxine responsable d'un syndrome émergent, sur laquelle nous disposons de très peu d'informations.

2. Caractéristiques de l'algue *Dinophysis* spp.

a- Les algues concernées



Les toxines DSP sont produites par le genre *Dinophysis* (photo ci-contre) qui appartient à la classe des dinophycées, et regroupe plusieurs espèces qui produisent pour la majorité d'entre elles des toxines. Sur la centaine de dinoflagellés répertoriés dans le monde, 6 seraient présents sur nos côtes françaises: *Dinophysis sacculus*, *Dinophysis acuminata*, *Dinophysis acuta*, *Dinophysis rotundata*, *Dinophysis caudata* et *Dinophysis fortii*. Ces toxines sont également produites par *Prorocentrum* spp. (JM Frémy et al. p560).

Figure 1: L'algue *dinophysis*

Ce genre a un faible taux de développement, les concentrations maximales sont généralement comprises entre 1000 et 10000 cellules par litre (R. Baylet et al, 2004).

Le cycle biologique de *Dinophysis* est mal connu mais il a été montré que la toxicité maximale est atteinte en fin de phase de croissance ou en début de phase stationnaire au cours du cycle biologique de l'algue. JM Frémy et al. (2001) ont remarqué que les toxines polyéther comme l'acide okadaïque étaient le produit de la photosynthèse des Dinoflagellés. Elles seraient conservées dans des compartiments cellulaires distincts de l'organisme. Par ailleurs, une variabilité génétique a pu être remarquée, ce qui expliquerait la présence de ces toxines aujourd'hui sur nos côtes.

Egalement, la stratification des masses d'eau en couches de température et de salinité différentes semble favoriser la prolifération de cette algue.

Par contre, selon le rapport de la journée scientifique de l'AFSSA du 6 mars 2003 (P11), des doutes apparaissent quant à la production de la toxine. Il se pourrait en effet que cette toxine soit produite par un autre organisme, prédateur des dinoflagellés comme les *Prorocentrum* benthiques.

Tous les mollusques bivalves sont potentiellement porteurs des toxines. En France, il s'agit essentiellement des moules, ainsi que des fousisseurs (tellines, palourdes, amandes, praires, coquilles Saint Jacques). (R. Baylet et al, 2004; S Leroux, 2006)

b- Répartition géographique de l'algue

Selon l'étude de René Baylet *et al.* (2004), cette algue apparaît en toute saison sur les côtes françaises (Atlantique et Méditerranée). Toutefois, selon l'enquête de S. Leroux (2006), la toxine est repérée sur une période plus tardive en Normandie, et sur une période plus étalée en Bretagne, et Méditerranée où elle peut survenir toute l'année.

3. Caractéristiques des toxines

Ces toxines sont solubles dans l'acétone, le dichlorométhane, le chloroforme et le méthanol. Etant stables à la chaleur, il est inutile de cuire les coquillages pour les éliminer.

a- L'acide okadaïque

L'acide okadaïque et ses dérivés lipophiles sont la base des toxines diarrhéiques. Son numéro CAS est le: 78111-17-8. La structure chimique de base est la suivante :

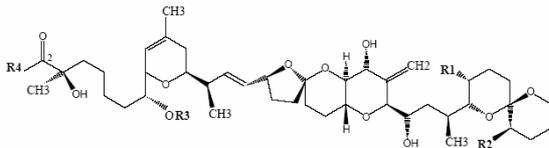
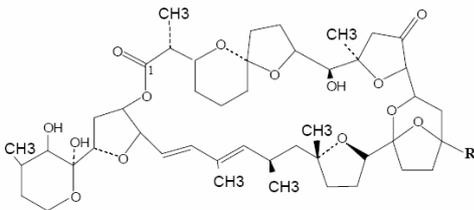


Figure 2: Structure de l'acide okadaïque
(JM Frémy *et al.*, 2001 p560)

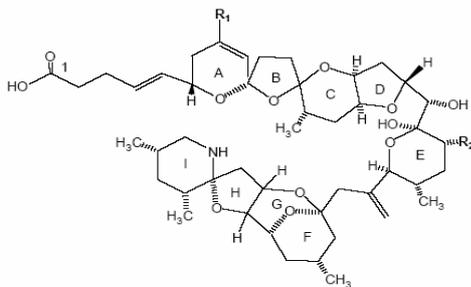
b- Les pecténotoxines



Les pecténotoxines de formule brute ($C_{47}H_{70}O_{15}$) sont également des polyéthers, chimiquement neutres ayant un squelette de base commun. (JM Frémy *et al.* 2001, p163)

Figure 3: Structure de la pecténotoxine
(JM Frémy *et al.* 2001, p560)

c- l'azaspiracide



La famille des azaspiracides est composée de 3 toxines majoritaires dont les caractéristiques sont regroupées en annexe. La principale ayant pour formule brute : $C_{47}H_{71}NO_{12}$ (n°CAS: 214899-21-5).

Figure 4: Structure de l'azaspiracide
(JM Frémy *et al.* 2001, p560)

4. Pathogénicité

a- Symptômes

La plupart des toxines DSP ont une action diarrhéique due à leurs fonctions inhibitrices des protéines phosphatases, elles provoquent chez le consommateur une intoxication dont les effets apparaissent dans un délai de 2 à 12h après l'ingestion des coquillages contaminés. Les principaux symptômes sont des diarrhées, des douleurs abdominales et des nausées voire des vomissements. La vitesse d'incubation permet de différencier une intoxication alimentaire d'un autre type de diarrhée aiguë. (JM. Frémy, 2001).

La mortalité de l'acide okadaïque est de 0%, la donnée n'est pas fournie pour l'azaspiracide. (Chateau-Degat, 2004)

C'est une étude japonaise (*Nonomura et al. 1983*) qui fournit la dose minimale ingérée entraînant des signes cliniques : 72 µg d'équivalent en AO (Acide Okadaïque). D'autres études de *Yasumoto (1978)* observaient les premiers signes cliniques dès 48 µg d'équivalent en AO.

L'acide okadaïque et son dérivé, la dinophysistoxine 1, seraient de puissants promoteurs dans le processus de la cancérogenèse selon *Fujiki et al., 1987 et Saganuma et al., 1988*. Par la suite, des études ont mis en évidence le potentiel génotoxique de l'AO à des concentrations très faibles, de l'ordre du nano molaire : on peut citer, par exemple, l'induction de mutations dans des régions localisées du génome (*Aonuma et al., 1991 ; Nakagama et al., 1997*) ou la formation d'adduits à l'ADN (*Fessard et al., 1996 ; Huynh et al., 1998*) qui sont des événements critiques pour le développement de cancers.

Par contre, cet effet chronique n'est pour l'instant pas pris en compte par le RePHY pour la mise en place du seuil de salubrité réglementaire. (*Puech, 2000*)

b- Traitement

Selon l'étude de *K de Schrijver (2002)*, une guérison complète et sans séquelle est possible en trois jours après un traitement symptomatique et d'appoint. Le faible délai d'incubation ainsi qu'une analyse des selles permettent d'exclure toute autre cause d'intoxication diarrhéique.

5. Crises sanitaires

Selon l'étude de *JM Frémy et al (2001)*, les premiers cas d'intoxications gastro-intestinales ont été observés aux Pays Bas dans les années 60. Ce phénomène a été observé au Japon dans les années 70.

En France, c'est en 1983 que les intoxications diarrhéiques sont liées aux efflorescences de dinoflagellés toxiques du genre *Dinophysis*. Elles ont provoqué, la même année, jusqu'à 3 300 cas de gastro-entérites en Bretagne sud. (*Guide d'information Complexe des toxines lipophiles DSP RePHY p13*).

Actuellement, les intoxications diarrhéiques sont responsables de la majorité des crises sanitaires, sur l'ensemble du littoral français.

En ce qui concerne l'azaspiracide, c'est en 1994 que des intoxications alimentaires avec des symptômes de type diarrhéiques, sans présence d'acide okadaïque, ont été signalées en Irlande. Depuis, d'autres cas ont été signalés, dont deux cas en France en 1998 et en 2000. (*JM Frémy et al, 2001*).

6. Méthodes de détection

Les toxines diarrhéiques sont quantifiables et mesurables par deux méthodes (*V. Choumet, 1999*) : recherche par des tests biologiques, recherche générale des bio-toxines et tests d'amplification des gènes.

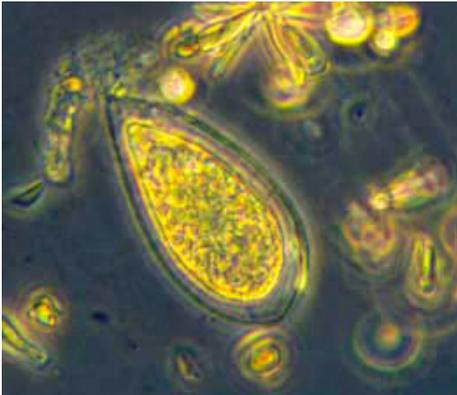
Un kit de dosage serait en cours de commercialisation (*V. Choumet, 1999*) pour le dosage de l'acide Okadaïque.

B. L'Ostréotoxine ou palytoxine

1. Origine de la toxine

L'ostréotoxine est une palytoxine synthétisée par un dinoflagellé benthique : *Ostreopsis ovata*. Dans les zones tropicales, cette algue fréquente les mêmes biotopes que *Gambierdiscus* spp., responsable de la ciguatera. L'ostréotoxine pourrait donc participer au syndrome ciguatérique. Toutefois, il est actuellement possible de la différencier de la ciguatera (symptomatologies différentes) (JM Frémy et al., 2001). C'est une toxine émergente.

1. Caractéristiques de l'algue *Ostreopsis ovata*



Il s'agit essentiellement d'une algue tropicale que l'on retrouve sur les côtes de Nouvelle Calédonie, de Polynésie Française, de la Mayotte et de la Réunion ; mais aussi et depuis peu, en Méditerranée.

Cette algue est difficilement repérable de par sa nature benthique : elle vit au fond de la mer. Toutefois, elle a été retrouvée entre 1994 et 1997 en Camargue, dans le golfe de Fos et la rade de Toulon.

Elle s'accroche sur des sédiments marins au moment où la température de l'eau est élevée, et où l'hydrodynamisme est faible (peu de courants marins). (article France 3 août 2006)

Figure 5: L'algue *Ostreopsis ovata*

Le genre *Ostreopsis* remonte à la surface de l'eau lors de la floraison. (C. Brescianini et al. 2005). Cette algue est ensuite consommée par un poisson herbivore : *Scarus ovifrons*, qui la concentre, d'où un risque d'intoxication par consommation de poisson pour l'homme. Ce poisson étant tropical, il n'y a à priori pas de risque vis-à-vis de cette voie d'intoxication en France métropolitaine actuellement. (S. Taniyama et al., 2003).

Ce genre est présent essentiellement entre fin juillet et fin novembre, dans une gamme de température spécifique (13,9 à 29,7°C). Aucune forme végétative n'est retrouvée lors de l'hiver et du printemps (K. Aligisaki et al. ; 2006)

2. Caractéristiques de la toxine

La palytoxine est une macromolécule complexe poly hydroxylée : $C_{129}H_{221}N_3O_{53}$. (JM Frémy et al, 2001). Sa structure exacte n'est pas établie à l'heure actuelle. Ses caractéristiques sont fournies en annexe (P. Riobó et al., 2006).

Cette toxine serait thermostable (par comparaison à la ciguatoxine).

N° CAS: 11077-03-5

3. Pathogénicité

Il existe plusieurs types de pathogénicité, selon la voie d'exposition.

La première est due à une ingestion de poissons contaminés (sardines, harengs...) et provoque une intoxication appelée Clupéotoxisme. Elle est responsable d'empoisonnements mortels chez l'homme.

Le clupéotoxisme est caractérisé par une incubation courte, un syndrome digestif, une tachycardie, des vertiges, une cyanose et parfois un ulcère (la mort ou le coma n'étant pas rares). Le mécanisme consisterait en une activation des canaux sodiques qui provoquerait une hémolyse (JM Frémy et al, 2001, p391 et Y. Onuma et al; 1999). Le traitement est principalement symptomatique par l'utilisation de vasodilatateurs.

Cette pathogénicité n'a pour l'instant pas été signalée en France.

La seconde est due à une inhalation de cette toxine transportée par les aérosols marins dans l'atmosphère. Les symptômes sont des problèmes respiratoires (Rhinites, Bronchites...) (C. Brescianini et al., 2005).

L'ostréotoxine peut également provoquer par contact des démangeaisons, rhinites, irritations oculaires et diarrhées. (Article France 3 du 10 août 2006)

4. Crises sanitaires

Un bloom en Ligurie (Italie) d'*Ostreopsis ovata* en juillet 2005 a eu pour conséquence l'hospitalisation de 80 personnes (irritation de la peau et des yeux, troubles respiratoires et gastriques) après inhalation des embruns (*journées RePHY 2006*).

Récemment, sa présence détectée dans les eaux marseillaises (10 août 2006) a empêché la baignade, par mesure de précaution, ainsi que la consommation de produits pêchés dans la zone.

5. Méthodes de détection

Il est souvent nécessaire de recourir à une combinaison de méthodes afin de confirmer la présence de la palytoxine.

- LC Séparation et mesure de l'absorbance de la toxine (2 pics sont nécessaires).

- LC- MS

P. Riobó et al. (2006) ont mis en place une nouvelle méthode très performante:

- LC-FLD (dérivatisation avec AccQ, puis chromatographie observation d'une fluorescence pour les longueurs d'onde 395 nm, excitation à 250 nm.) La limite de détection est estimée à 0,75 ng. La limite de quantification est quand à elle fixée à 2 ng.

La toxicité est estimable par un « Hemolytic assay » c'est à dire un test d'hémolyse . Le seuil de détection est de l'ordre de 0,005 pg.kg⁻¹.

C. La Saxitoxine (STX)

1. Origine de la toxine



La saxitoxine est la toxine de base de 18 molécules chimiquement proches : la famille des toxines PSP (paralytic Shellfish Poisoning). Parmi les dérivés de la STX, il y a les gonyautoxines (GTXs) et la néosaxitoxine.

Les saxitoxines sont produites par des dinoflagellés marins appartenant principalement à l'espèce *Gonyaulax* (actuellement *Alexandrium*)
(Institut National de Veille Sanitaire, novembre 2001)

Figure 6: L'algue *Alexandrium tamarense*

En France, les espèces productrices de saxitoxine les plus étudiées sont *Alexandrium minutum* et *Alexandrium tamarense / catenella*, qui sont des espèces toxiques.

Toutes les toxines paralysantes ne sont pas produites par les microalgues, quelques-unes résultent d'une dégradation ou d'une transformation des toxines algales par les coquillages.

2. Caractéristiques de l'algue

a- Répartition géographique :

Le genre *Alexandrium* est présent sur tous les continents (eaux froides ou chaudes du globe) avec en particulier le nord-ouest du Pacifique, sur la côte nord-est de l'Amérique du Nord et en Europe du Nord. (Hall et al., 1990).

Nous avons choisi d'étudier *Alexandrium minutum*, l'espèce majoritairement présente en France.

b- Distribution observée en France

Il s'agit de la seule espèce productrice de phycotoxines paralysantes dans les eaux côtières françaises, jusqu'en 1998.

La première prolifération d'*A. minutum* a été observée sur la côte nord-ouest en août 1988, dans la rivière de Morlaix (Finistère) en juillet 1989 et en Rance en 1996. Depuis, des efflorescences toxigènes apparaissent périodiquement chaque année.

Il semble que cette espèce gagne du terrain puisqu'elle a été repérée pour la première fois en Poitou-Charentes, en 1997, à des concentrations assez importantes.
(Sournia et al., 1991. et Belin C., et al., 1998.)

c- Cycle biologique et conditions propices au développement

A. minutum forme des kystes de résistance qui s'enfouissent dans le sédiment pour l'hiver. Certaines zones de Bretagne-Nord sont ainsi régulièrement touchées par des proliférations d'*A. minutum*, les kystes présents dans le sédiment trouvant au printemps les conditions adéquates pour redonner des cellules végétatives.

A. minutum est une espèce exclusivement marine, mais elle supporte une certaine dessalure. Sa distribution semble liée à l'enrichissement des eaux en éléments nutritifs dans des zones côtières « sensibles » recevant des eaux douces continentales, comme les estuaires, les golfes, les baies et les ports.

3. Caractéristiques de la toxine

Ces toxines sont des bases tétrahydropuriques substituées.

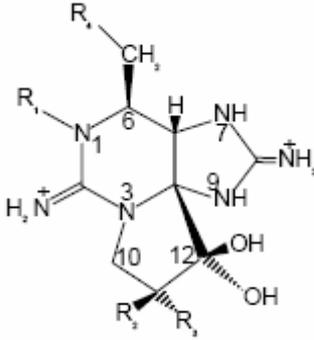


Figure 7: Sucture des toxines paralysantes

Elles sont hydrosolubles, thermostables (la cuisson ne les affecte pas) et stables en milieu acide. Par contre, ces toxines sont fragiles en milieu alcalin et sensibles aux oxydants. La majorité des dérivés sont le résultat d'une sulfatation à certains endroits des deux molécules de base : la saxitoxine et la néosaxitoxine (N-hydroxy saxitoxine). (*Ifremer, février 2006 3*)

4. Pathogénicité

La voie d'intoxication en cause est l'ingestion et les vecteurs d'intoxication sont les mollusques bivalves (moules, clams, coquilles et jacsques), certaines gastéropodes (bulots) et les crustacés (crabes et homards)

Il s'agit d'une toxine paralysante (IPFM) qui inhibe la transmission de l'influx nerveux, en particulier au niveau du système nerveux périphérique et bloque le fonctionnement des centres respiratoires et circulatoires. Le délai d'incubation est de moins d'une heure.

La mortalité associée varie de 1 à 14% des cas, selon les doses et sachant qu'il existe une grande variabilité inter individuelle. (*Chateau-Degat, mai 2004*)

Selon l'OMS :

- la dose de référence aiguë provisoire est de 0,7 µg d'équivalents STX/kg pc.
 - la dose maximale de saxitoxine (PSP) est fixée à 80 µg pour 100 g de chair de moule.
- Il n'y a pas de donnée pour l'enfant.

Le traitement est seulement symptomatique puisqu'il n'existe pas d'antidote, ni de vaccin. Il peut consister en un lavage gastrique et prise de charbon activé pour adsorber les toxines. Dans les cas graves, la respiration artificielle et l'hémodialyse (les toxines, étant hydrosolubles, sont éliminées par les reins) peuvent s'avérer nécessaires (*C. BELIN et al. décembre 1998*).

5. Crises sanitaires

Premières intoxications recensées : en 1920, intoxications mortelles par ingestion de moules aux Etats-Unis. En 1973, tout un équipage a été intoxiqué lors d'une expédition à Vancouver au Canada.

En France, aucune intoxication PSP n'a été enregistrée à ce jour depuis la création du REPHY en 1984.

6. Méthode de détection

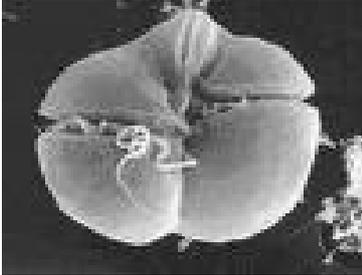
La méthode normalisée du bio-essai sur souris est largement répandue et a contribué à la sécurité sanitaire dans de nombreux États membres pendant plus de 60 ans.

D. La Brévotoxine (BTX)

1. Origine de la toxine

La Brévotoxine est produite par un dinoflagellé : *Gymnodinium* (*Ptychodiscus*) *breve*.

2. Caractéristiques de l'algue



Gymnodinium breve forme des marées rouges très caractéristiques, qui sont devenues l'emblème des algues toxiques nuisibles.

Cette algue est présente dans des eaux chaudes : les côtes du Mexique, de la Floride et de Nouvelle Zélande. Elle a été signalée en France et en Espagne (Méditerranée), sans être associée à des efflorescences toxiques.

Figure 8: L'algue *Gymnodinium breve*

3. Caractéristiques de la toxine

Du fait d'un fort pouvoir ichtyotoxique, la brévotoxine provoque des morts massives de poissons très visibles, ce qui explique les faibles fréquences d'intoxication (l'alerte peut être donnée rapidement).

Il s'agit d'un polyéther cyclique avec une structure propre aux dinoflagellés dans le monde des produits naturels. Il existe plusieurs molécules dérivées : BVX1, BVX2, BVX3,...

4. Pathogénicité

Les intoxications liées à la brévotoxine sont peu communes. Deux voies d'exposition ont des effets sur l'homme : l'ingestion de fruits de mer et l'inhalation (forme aéroportée, avec le ressac).

Ces toxines agissent sur les cellules du système nerveux central et périphérique par liaison aux canaux sodiques voltages dépendants, ce qui conduit à un état de subconductance.

Les effets sont peu sévères par ingestion (INFM) : paresthésie, vertiges, ataxie et perturbations gastro intestinales.

Quelques cas d'atteintes cutanées et pulmonaires ont été recensés chez des promeneurs : irritations et brûlures des voies respiratoires.

La mortalité est de 0 % (aucun décès n'a jamais été reporté).

La DL50 (humain) est de 1-4 mg/Kg (*Chateau-Degat, mai 2004*).

Ces toxines ne sont pas réglementées au niveau communautaire car peu présentes en Europe, visuellement détectables de par leur ichtyotoxicité et puisque les experts détiennent trop peu de données pour formuler une valeur toxicologique de référence.

5. Crises sanitaires

Les intoxications sont surtout rapportées dans les régions côtières de la Floride, dans les Caraïbes et en Nouvelle Zélande.

6. Méthodes de détection

Des analyses de routine de BVX2 sont réalisées mais de récents événements indiquent que ces analyses devraient être étendues aux autres dérivés des BTX. Le problème qui se pose est que cette analyse n'est pas assez sensible pour les autres molécules dérivées.

Une méthode de chromatographie liquide/spectrométrie de masse ou d'essai fonctionnel devrait être validée afin de répondre à ces critères. (*Afssa 2003, Chateau-Degat 2004, Kryz S et al 2002*)

E. Acide domoïque (Toxine ASP)

1. Origine de la toxine

L'acide domoïque est une toxine produite par certaines diatomées (notamment *Pseudo-nitzschia multiseries*, *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima*, *Pseudo-nitzschia pungens* et *Pseudo-nitzschia delicatissima*). Il fait partie de la famille des toxines amnésiantes (ASP). (S.Krys et al., 2002)

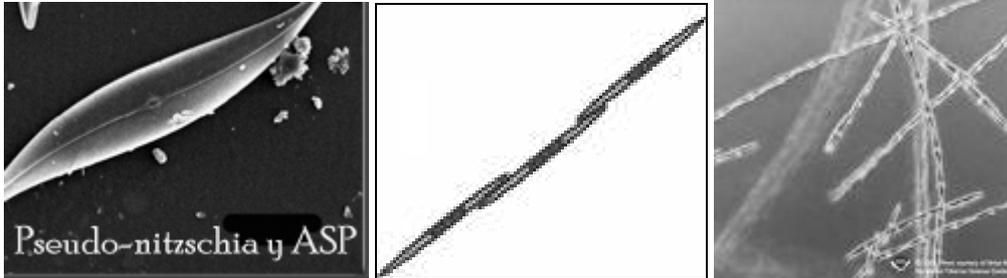


Figure 9: L'algue *Pseudo-nitzschia*

2. Caractéristiques des Diatomées pennées

Les diatomées pennées sont des algues unicellulaires, souvent coloniales et qui ne sont jamais flagellées pendant leur phase végétative. Elles se regroupent pour former macroscopiquement des filaments (voir ci-dessus). Elles sont photoautotrophes. Les espèces les plus toxiques sont *multiseries*, *pseudodelicatissima* et *australis*. Mais cette dernière est une espèce d'eau chaude que l'on n'a encore jamais trouvée en France.

- *Pseudo-nitzschia multiseries* : on la retrouve dans l'Atlantique.
- *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* : Manche, Atlantique et Méditerranée.
- *Pseudo-nitzschia delicatissima*, *Pseudo-nitzschia pungens* et *Pseudo-nitzschia fraudulenta* (cette dernière est non toxique) ont été identifiées en France mais ne sont pas responsables de crise sanitaire. (J.M.Frémy, 2001)

Les efflorescences à *Pseudo-nitzschia* semblent favorisées par les apports d'eaux douces riches en silicate et l'augmentation des proliférations est sans doute liée à l'eutrophisation des eaux côtières.

3. Caractéristiques de la toxine

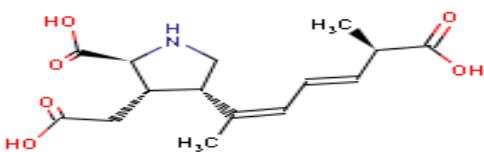


Figure 10: Structure de l'acide domoïque

RN: 14277-97- La toxicité de l'acide domoïque varie fortement suivant son degré de protonation et donc suivant le pH. La DL₅₀ sur la souris est de 120 µg/Kg et chez l'humain de 1 à 5 mg/Kg. (M.L. Chateau-Degat, mai 2004). La DL50 est de 3.6 mg/Kg. (B. Grimmelt, 1990)

4. Pathogénicité (effets sur l'homme, voie d'intoxication)

Les premiers symptômes, de type gastro-intestinal (vomissements, diarrhées, nausées...) surviennent dans un délai de 2 à 24 heures après consommation des coquillages. Entre 24 et 48 heures, ce sont des symptômes neurologiques qui sont observés (maux de tête persistants, désorientation et une confusion). Dans les cas les plus graves, il apparaît une perte de mémoire, des dommages cérébraux et parfois des convulsions ainsi qu'un coma pouvant conduire à la mort.

Ce type d'intoxication atteint surtout les enfants et les personnes âgées. Il est à noter que la gravité des signes neurologiques est en relation avec l'âge des patients. Plus le sujet est âgé, plus les signes cliniques sont marqués. (Ifremer, *Phycotoxines amnésiantes (ASP)*, 2006)

5. Crises sanitaires

En 1998, des traces d'acide domoïque ont été détectées dans les glandes digestives de moules en provenance des Côtes d'Armor liées à la présence locale de *P. pseudodelicatissima* (clone producteur de l'acide domoïque au Canada).

En 1999, année de mise en place de la surveillance des toxines amnésiantes par le REPHY, seules des traces de toxines largement inférieures au seuil de sécurité sanitaire ont été mises en évidence dans des bivalves en provenance de différents sites de la Bretagne, de la Charente Maritime et de la Méditerranée. Par contre, durant le mois de mai 2000, les taux de toxines ASP ont dépassé le seuil de sécurité sanitaire en Bretagne ouest, avec des maxima de 53 µg et 32 µg d'acide domoïque par g de chair, respectivement dans des donax (*Donax trunculus*) et des moules. L'accumulation de l'acide domoïque dans les coquillages pendant ces épisodes a été corrélée avec la présence d'espèces de *Pseudo-nitzschia* identifiées comme étant potentiellement toxiques : *P. pseudodelicatissima* et *P. multiseriis*. La mise en culture de cette dernière espèce a permis de confirmer sa toxicité.

Fin novembre 2004, les teneurs en acide domoïque enregistrées ont dépassé le seuil de sécurité sanitaire pour la première fois dans les coquilles Saint-Jacques en baie de Seine et en rade de Brest. Ces dépassements de seuil ont conduit à la prise d'arrêtés préfectoraux d'interdiction de pêche et de vente des coquilles, ce qui a généré de réels problèmes économiques pour les deux flottilles touchées : un mois d'interdiction totale en Manche, puis réouverture progressive des zones les unes après les autres. (*Ifremer, Phycotoxines amnésiantes ASP, 2006*)

6. Méthodes de détection

Pour l'acide domoïque, il existe une méthode d'analyse physico-chimique de quantification qui consiste en une analyse en HPLC couplée à une détection par UV.

F. Les spirolides

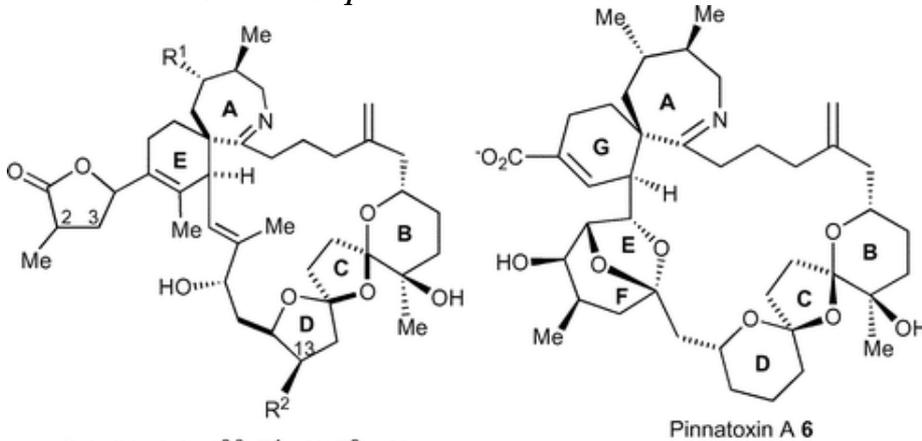
1. Origine de la toxine

Les spirolides sont des endotoxines découvertes pour la première fois au Canada en 1991. Elles proviennent de la dinoflagellée *Alexandrium ostenfeldii*. Il en existe 6 différentes (A, B, C, D, E et F). Seules les formes A, B, C et D sont toxiques (J.M.Frémy et P.Lassus, 2001). Ces toxines font parties du groupe des spiroimines, qui inclut la gymnodimine, les pinnatoxines et les pteriatoxines.

2. Caractéristiques de l'algue

Alexandrium ostenfeldii est présent en Manche et en Atlantique. Elle fait partie du groupe des Dinoflagellées. En plus des spirolides, l'espèce sécrète aussi des toxines paralysantes. (J.M.Frémy et P.Lassus, 2001).

3. Caractéristiques de la toxine



- Spirolide A 1: $\Delta^{2,3}$; R¹ = H; R² = Me
 Spirolide B 2: R¹ = H; R² = Me
 Spirolide C 3: $\Delta^{2,3}$; R¹ = Me; R² = Me
 Spirolide D 4: R¹ = Me; R² = Me
 13-Desmethylspirolide C 5: $\Delta^{2,3}$; R¹ = Me; R² = H

Figure 11 Structures des spirolides (Kai Meilert et al, 2006)

La DL50 de la Spirolide A est de 250 $\mu\text{g}/\text{Kg}$.

Les spirolides sont un sujet d'étude relativement récent et la réglementation les concernant n'en est pas encore établie

4. Pathogénicité

Ces toxines sont neurotoxiques. La toxicité pour l'homme n'est pas démontrée mais les effets sur les souris utilisées pour les contrôles sanitaires sur les coquillages sont bien réels. Les études pharmacologiques des effets de ces toxines n'ont pas permis, à l'heure actuelle, de préciser leur mode d'action au niveau cellulaire (ce qui aurait permis de préciser leur mode d'action, et donc d'ouvrir la possibilité d'établir des seuils de toxicité pour l'homme). Il semblerait que leur activité provienne de la présence d'un cycle imine, puisqu'il est absent dans les formes inactives. (J.M.Frémy et al, 2001).

5. Crises sanitaires imputées à la toxine

Mai 2005 : Crise sur le bassin d'Arcachon qui a entraîné l'interdiction de ramassage des huîtres, moules et coquillages durant plus d'un mois. (Les nouvelles de l'ifremer n°70, 2005)

III. Valeurs Toxicologiques de Référence et valeurs réglementaires

Les VTR sont établies à partir d'études toxicologiques. Elles permettent de caractériser le seuil limite de toxicité associé à une substance et donc de comparer les risques associés aux différents polluants que pourraient contenir les coquillages (métaux lourds, bactéries, virus, parasites...).

Les VTR ne sont pas utilisées pour définir les valeurs réglementaires de la surveillance. Dans la littérature, les valeurs de VTR sont présentées comme étant peu fiables. Elles proviennent, en effet, de tests sur des animaux, sans que l'on puisse extrapoler les doses et les effets au cas humain par manque d'études toxicologiques complémentaires et de données épidémiologiques.

De plus, une espèce algale produit plusieurs toxines. Or, il est impossible de prendre en compte les effets dus au cocktail de toxines présents dans les coquillages.

Il s'agit donc d'un **outil de gestion et non de réglementation**.

La VTR permet d'effectuer une gestion adaptée à chaque type de toxine. Par exemple, une toxine dont la VTR est élevée autorisera les pouvoirs publics à prendre plus de temps pour vérifier et valider les résultats avant de prendre la décision de fermer le bassin. Au contraire, s'il s'agit d'une toxine dont la VTR est dépassée rapidement (proche du seuil de détection de la méthode), les autorités fermeront les bassins de production avant de valider les résultats.

Le tableau de la page suivante récapitule les données utilisées pour établir les valeurs toxicologiques de référence pour les effets aigus, ainsi que les valeurs seuils préconisées dans les guides.

Tableau 1:Récapitulatif des données utilisées pour l'établissement de doses de référence aiguës et de valeurs guides calculées et actuelles
(FAO-COI-OMS, 26-30 septembre 2004,)

Groupe de toxines	DMENO(1) ^a DSENO(2) (µg/kg pc)	Facteur de sécurité données humaines : (H) données animales : (A)	Dose de référence aiguë provisoire ^b	Valeur guide/seuil maximal calculés pour une consommation de 100 g (1), 250 g (2) et 380 g (3)	Valeur guide/seuil maximal (actuellement en vigueur dans certains pays)
AZA	0,4 (1)	10 (H)	0,04 µg/kg 2,4 µg/adulte	0,024 mg/kg chair de mollusque (CM) (1) 0,0096 mg/kg CM (2) 0,0063 mg/kg CM (3)	0,16 mg/kg
Brevetoxines			n.d.		0,8 mg/kg comme PbTx-2
Imines cycliques			n.d.		
AD	1 000 (1)	10 (H)	100 µg/kg 6 mg/adulte	60 mg/kg CM (1) 24 mg/kg CM (2) 16 mg/kg CM (3)	20 mg/kg
AO	1 (1)	3 (H)	0,33 µg/kg 20 µg/adulte	0,2 mg/kg CM (1) 0,08 mg/kg CM (2) 0,05 mg/kg CM (3)	0,16 mg/kg
PTX			n.d.		
STX	2 (1)	3 (H)	0,7 µg/kg 42 µg/adulte	0,42 mg/kg CM (1) 0,17 mg/kg CM (2) 0,11 mg/kg CM (3)	0,8 mg/kg
YTX	5 000 (2)	100 (A)	50 µg/kg 3 mg/adulte	30 mg/kg CM (1) 12 mg/kg CM (2) 8 mg/kg CM (3)	1 mg/kg

^a DMENO = dose minimale avec effet nocif observé ; DSENO = dose sans effet nocif observé.

^b sur la base d'un poids corporel (pc) adulte de 60 kg.

Partie 2 : Le déterminisme des HABs de microalgues toxiques

Définition : L'appellation internationale «Harmful Algal Bloom» (HAB) remplace de plus en plus la terminologie très utilisée dans le passé de «Red Tides» (marées rouges). Les HABs se réfèrent à un ensemble hétérogène d'événements, qui ont comme caractéristiques communes i) une origine micro algale, et ii) des conséquences négatives sur les activités humaines (Gailhard, 2003).

Le but de ce deuxième chapitre est d'expliquer en quoi les HABs de microalgues toxiques sont complexes et de faire le point sur les connaissances scientifiques actuelles.

I. La diversité spécifique des populations phytoplanctoniques

La dynamique des populations phytoplanctoniques côtières est caractérisée par la succession d'assemblages d'espèces. Si on s'intéresse aux conditions de milieux favorables au développement de populations micro algales toxiques, celles-ci ne peuvent pas être considérées individuellement, mais comme partie intégrante de la communauté phytoplanctonique.

La structure des populations phytoplanctoniques est complexe du fait que les différentes espèces ne réagissent pas de la même manière aux facteurs du milieu et qu'il existe des relations interspécifiques.

Il est donc nécessaire de déterminer les facteurs environnementaux qui influent sur la dynamique des populations phytoplanctoniques de manière globale avant de s'intéresser aux espèces toxiques.

En particulier, l'explication des facteurs qui vont favoriser la dominance d'une population par rapport à une autre est une question centrale, surtout lorsqu'il s'agit de la croissance excessive d'une population toxique. (Gailhard, 2003).

II. Les facteurs influençant la dynamique des populations phytoplanctoniques

A. Les facteurs environnementaux

Les facteurs environnementaux (paramètres hydrodynamiques, physico-chimiques et écologiques) les plus couramment cités sont présentés ci-après :

- **la température**
- **l'oxygène**
- **la salinité**
- **l'intensité lumineuse et les stratégies photoadaptatives**

Les Flagellés ont pour principale caractéristique de s'adapter rapidement aux variations de l'intensité lumineuse, grâce à des comportements d'agrégation qui leur permettent de lutter contre le stress dû à une augmentation de l'éclairement ou grâce à une augmentation de leur concentration en chlorophylle en périodes de faible éclairement. La croissance des Diatomées est en revanche favorisée par de faibles taux d'éclairement.

- **les nutriments et les stratégies adaptatives** : mixotrophie*, compétition interspécifique et stratégies contre la prédation

L'affinité des espèces pour un type de nutriment est variable. Les espèces de Dinoflagellés responsables de HAB ont un coefficient d'affinité pour les nutriments élevé, et ont développé des stratégies adaptatives pour leur acquisition : i) la mobilité pour migrer vers des zones plus riches en nutriments, ii) un mode de nutrition mixotrophe et iii), la production de substances allélochimiques (compétition interspécifique) et allélopathiques* .

- **la turbulence** (le mélange vertical de la colonne d'eau)

La turbulence stimule la croissance des Diatomées, les Dinoflagellés se développant à l'inverse lorsque la colonne d'eau est stratifiée.

Il apparaît donc que, fréquemment, des conditions hydrodynamiques particulières, telles que la présence de fronts ou de stratifications thermiques ou halines, confèrent au milieu une plus grande

stabilité verticale, stabilité qui est vraisemblablement une condition nécessaire au développement des efflorescences de Dinoflagellés.

La variabilité interspécifique de réponse à la turbulence peut être un facteur explicatif de la sélection des espèces qui vont se développer et former des *blooms*

- **le vent**

Les efflorescences de dinoflagellés (*Gymnodinium*, *Alexandrium*, *Dinophysis*) dans les rias du nord-ouest de l'Espagne (Galice) et certains sites portugais ou en Californie sont mises en relation avec la diminution ou la suppression temporaire (liées au régime des vents) d'upwellings côtiers, ce qui provoque la pénétration, puis le développement d'algues toxiques dans ces sites.

- **les courants de marées**

Par exemple, dans le golfe du Maine, les efflorescences d'*Alexandrium* sont liées à l'interaction entre les courants côtiers et les panaches fluviaux où les espèces phytoplanctoniques trouvent les conditions nutritives et de lumière favorables à leur développement. (*Ménesguen A, janvier 2001*)

L'ensemble des études ayant trait à la dynamique des populations phytoplanctoniques met en évidence **la complexité du rôle des facteurs environnementaux et de leurs interactions**, aussi bien lorsque l'on considère la réponse de la communauté dans son ensemble à leurs variations, que lorsque l'on s'intéresse à la réaction spécifique d'une population, en particulier celle d'une population toxique ou nuisible. (*Gailhard, 2003*).

Selon la perception commune, les phénomènes d'efflorescences d'algues toxiques s'accompagnent de la production de phycotoxines et sont directement responsables de la contamination des coquillages.

B. Les efflorescences algales

La plupart des articles scientifiques évoquent l'augmentation des efflorescences d'algues depuis les trente dernières années.

Les facteurs qui expliqueraient l'augmentation des efflorescences algales (et potentiellement les efflorescences d'espèces toxiques) observées sont les suivants :

- un enrichissement en nutriments des eaux côtières par les rejets anthropiques* (N et P essentiellement) ;
- les changements climatiques à long terme (température, vent) et une dispersion des algues par les courants et les tempêtes liés au changement climatique ;
- la dispersion des algues nuisibles par les eaux de ballast ou le transport des produits aquacoles,
- l'altération de la structure trophique par la pêche (diminution des prédateurs ?) ;
- les instabilités climatiques : El Niño (phénomène particulier qui diffère du climat usuel, qui se caractérise par une élévation anormale de la température de l'océan).

(*Chateau-Degat, mai 2004*)

Beaucoup d'auteurs se posent néanmoins la question de l'accroissement de la surveillance des eaux côtières et des fruits de mer, ainsi que l'évolution des techniques analytiques de surveillance. Il apparaîtrait prématuré de statuer sur l'augmentation du nombre réel d'efflorescences sans avoir analysé l'ensemble de ces données.

III. La toxinogénèse et le rôle des toxines d'algues

Qu'il s'agisse des toxines PSP, ASP ou DSP :

- la relation entre concentration dans l'eau des algues productrices et le niveau de toxicité dans les coquillages est variable selon l'espèce mise en cause, mais aussi selon la zone géographique,
- le niveau de toxicité varie en fonction du coquillage concerné.

Il semble évident que **les phénomènes d'efflorescences algales ne sont pas directement responsables de l'augmentation de la toxicité dans les coquillages.**

(*Selon Ifremer, Fev 2006 3*)

Il faut donc distinguer les phénomènes d'eaux colorées où il y a proliférations massives d'organismes phytoplanctoniques (forte concentration cellulaire d'algues microscopiques) mais rarement toxiques, et le développement d'espèces phytoplanctoniques qui pourront être toxiques, éventuellement à faible concentration cellulaire.

Il apparaît primordial de **rechercher les causes de variations de production de toxines, au niveau cellulaire.**

Il existe deux types de toxines :

- les toxines azotées (composées de carbone et d'azote), l'azote étant souvent le facteur nutritif limitant dans les milieux naturels (ex : Saxitoxine, Acide Domoïque),
- les toxines polyéthers (composées uniquement de carbone) (ex : DSP, Brévetoxines).

La toxicité résulte à la fois :

- de la quantité de toxines par cellules,
- du profil toxinique (composition qualitative de la toxine),
- de la proportion de chaque toxine (rapport de concentrations entre plusieurs toxines).

Le profil toxinique est spécifique à chaque souche (déterminisme génétique) et ne varie pas avec les conditions environnementales.

Seules les quantités de toxines produites et leurs proportions peuvent varier selon la phase de croissance (déterminisme génétique) et/ou certains facteurs environnementaux : physicochimiques et nutritifs.

La synthèse de certaines toxines est reliée à la croissance cellulaire, en particulier, comme cela a été établi pour les toxines paralysantes et diarrhéiques, pendant la phase G1 (première phase de croissance) du cycle de division cellulaire.

Parmi ces facteurs environnementaux, certains semblent avoir une influence directe sur la synthèse des toxines : la nutrition (carbone et azote) et la lumière, via la photosynthèse conduisant à l'assimilation de carbone et aux nutriments azotés.

D'autres facteurs environnementaux semblent avoir une influence indirecte : les autres facteurs nutritifs (phosphore, silice) interviendraient dans la régulation du cycle cellulaire et les autres facteurs physicochimiques que sont la température et la salinité agiraient dans la modulation de l'activité métabolique cellulaire (production de toxines en plus ou moins grande quantité, accumulation dans la cellule ou libération dans le milieu extérieur).

Ainsi, on observe une augmentation de la production d'acide domoïque par les diatomées dans un milieu pauvre en Phosphore et/ou en Silice (*Stewart J.E. et al, date inconnue*), ainsi qu'une augmentation de la production d'acide okadaïque par les dinoflagellés dans un milieu pauvre en phosphore. Pour ces dernières, un milieu nutritif optimal (donc absence de stress trophique) pour la croissance de l'algue induit une production minimale de toxine.

Dans les deux cas, il s'agit d'un stress au niveau du milieu nutritif. (*JM Frémy et al. 2001, p191*)

De la même manière, lorsque la croissance de l'algue est défavorisée (salinité, éclaircissement et ou température inférieures aux valeurs optimales pour la croissance), la saxitoxine n'est pas ou peu transformée par le métabolisme d'*Alexandrium*.

L'acide domoïque, quant à lui, n'est pas libéré lorsque la température est trop faible (<10°C), ce qui augmente de la toxine au sein du coquillage d'où sa toxicité. Peu d'études décrivent l'influence de la salinité et de la lumière sur l'AD.

Ces exemples ne sont pas exhaustifs mais ils illustrent la grande hétérogénéité de comportement des algues (vis-à-vis de la production de toxines) en fonction des conditions environnementales.

Concernant les toxines azotées, la toxinogenèse des saxitoxines a été plus étudiée que celle de l'acide domoïque car sa production est connue depuis plus longtemps et parce que les événements toxiques associés sont plus fréquents.

La connaissance des facteurs influençant la production des toxines polyéthers à moins progressé que celle des toxines azotées : grande diversité de ces toxines, grande complexité structurale, méthode de détection récente, cultures en laboratoires difficiles pour certaines toxines.

Ces facteurs environnementaux ont une influence sur la production des toxines mais aussi sur leur accumulation et leur biotransformation dans les algues et les coquillages.

Des exemples de réponse aux stress environnementaux sont présentés dans l'article de *J.E. Stewart et al (date inconnue)*.

Le rôle des phycotoxines

Un rôle physiologique :

Plusieurs éléments laissent supposer qu'une relation existe entre la production de toxines diarrhéiques et l'activité photosynthétique de l'algue :

- des anticorps dirigés contre l'acide okadaïque ont permis de localiser cette phycotoxine au niveau des chloroplastes de certains dinoflagellés,
- une corrélation positive a été mise en évidence entre certaines formes de chlorophylles et les toxines diarrhéiques,
- la grande majorité des espèces productrices de phycotoxines polyéther sont photoautotrophes strictes ou facultatives.

On soupçonne d'autres rôles physiologiques (considérés comme peu convaincants par les auteurs), comme par exemple une éventuelle action de la saxitoxine sur l'organisation structurale des chromosomes de part leur localisation proche du noyau (*JM Frémy et al., 2001 p 232*).

Des rôles de défense :

- des propriétés antibactériennes et antifongiques,
- un rôle de défense chimique contre les herbivores,
- des potentialités allélopathiques (aptitude à inhiber la croissance d'espèces algales concurrentes pour un ou plusieurs facteurs du milieu environnant).

IV Conclusion de la partie.

Pour résumer, voici les différents paramètres à prendre en compte et à comprendre :

- Les relations intra et inter spécifiques : La cellule algale, la population et la communauté phytoplanctonique (communications cellulaires, interactions et compétitions entre espèces...) c'est-à-dire la compréhension de la production et de l'accumulation/libération d'une toxine au niveau cellulaire et la compréhension de la dominance d'une espèce par rapport à une autre.
- Les facteurs environnementaux (et leurs interactions) qui peuvent agir sur ces trois niveaux: facteurs physicochimiques et facteurs nutritionnels
- Les facteurs intrinsèques (déterminisme génétique) : le profil toxinique...
- Les interactions facteurs du milieu / proliférations cellulaires / réponses adaptatives

Ce schéma résume bien la grande complexité devant laquelle on se trouve lorsqu'on essaye de comprendre le déterminisme des HABs de microalgues toxiques.

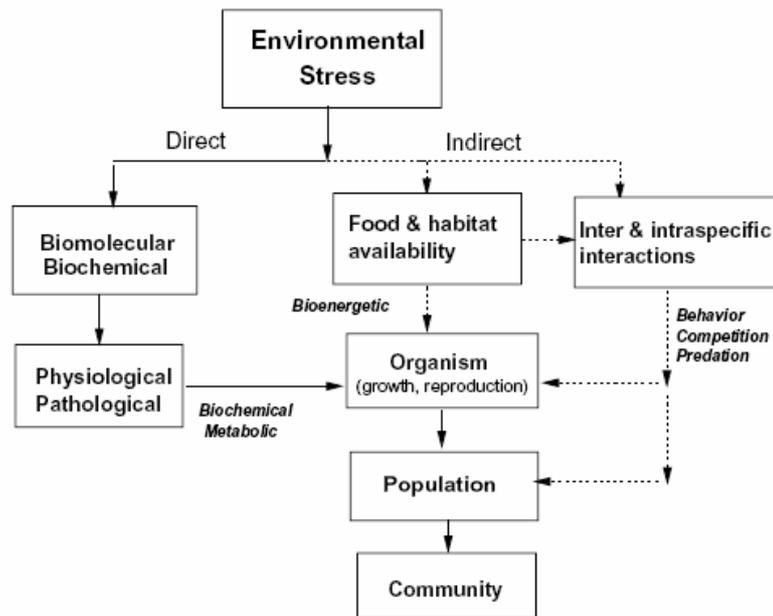


Figure 12 : Relationships between environmental stressors and direct and indirect effects on biological systems. Direct pathways affect organisms primarily through biochemical and metabolic processes and indirect pathways influence biota through effects on food and habitat availability intra- and interspecific interactions. (Selon S. Marshall Adams 2005*)

Partie 3: La population face au risque sanitaire

Après avoir cherché à comprendre les phénomènes à l'origine des épisodes toxiques, nous avons entrepris d'étudier l'exposition de la population à ce risque sanitaire.

I Voies d'exposition et population exposée

A. Voies d'exposition

Il existe trois voies d'exposition aux toxines marines pour l'homme.

1 L'ingestion

L'intoxication par ingestion se fait généralement par consommation de coquillages ou de poissons contaminés. C'est la voie principale d'exposition car les quantités de toxines ingérées peuvent être très importantes. En effet, lors de la chaîne trophique les toxines sont accumulées et concentrées successivement par les espèces de coquillages et de poissons.

De façon plus marginale, l'ingestion d'eau lors d'activités récréatives peut être une source d'exposition aux toxines marines.

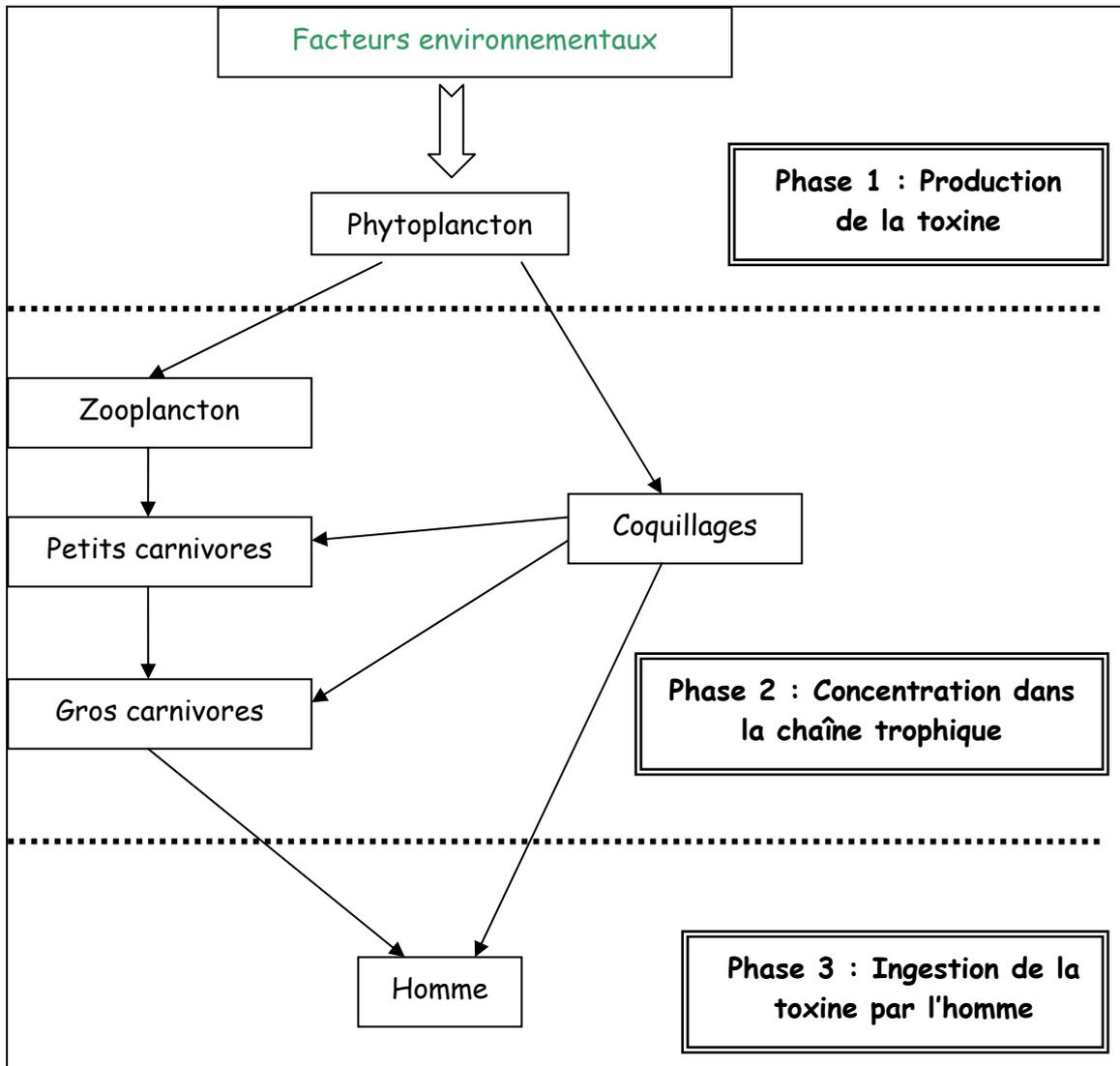


Figure 13: Chaîne de contamination par ingestion de coquillages

L'enquête inca sur les habitudes alimentaires des français indique une consommation chez l'adulte de 6 g/jour/personne de crustacés et mollusques pour un taux de consommateurs sur une semaine de 33% en 1999 et de 3 g/jour/personne chez l'enfant pour un taux de consommateurs de 21%. (AFSSA, 1999)

2. L'inhalation

Les toxines contenues dans le phytoplancton peuvent être libérées lors de la lyse de la cellule, et émises dans le milieu marin. Lors d'activités récréatives dans les zones côtières (promenades, baignades, activité nautique), les toxines peuvent être aéroportées par les embruns et pénétrer ainsi l'appareil respiratoire de l'homme. Plusieurs cas d'intoxication par inhalation de palytoxine (produites par *Ostreopsis*) ont été observés en Espagne et en Italie. Cette voie d'exposition n'est pas négligeable, malgré le manque d'attention que lui portent les autorités sanitaires.

Le manque d'information sur les mécanismes d'action et la difficulté de modéliser la formation des aérosols toxiques ne permet pas de définir avec précision des seuils de toxicité pour l'homme. En revanche ces événements sont facilement identifiables : les syndromes sont violents (mais de courtes durées) et facilement localisables sur le plan géographique.

3. Le contact cutané

Lors d'activités récréatives, notamment la baignade, les toxines marines peuvent présenter une toxicité cutanée. Ce phénomène intéresse depuis peu et les scientifiques n'ont pas le recul suffisant pour l'intégrer dans leurs études.

B. Population exposée

Chaque individu consommant des coquillages (consommation dans les restaurants, à domicile après achat ou pêche à pied) et chaque individu ayant une activité récréative en bord de mer est susceptible d'être exposé. La population susceptible d'être exposée est donc très importante.

Les populations exposées les plus sensibles sont les enfants, les femmes et les personnes âgées mais la variabilité inter-individuelle est également très importante en fonction de l'état physiologique et immunitaire. (voir chapitre données épidémiologiques).

II Données sanitaires

(Selon Vieille(La) et al. (2004), et JM Frémy et al (2001))

A Pourquoi s'intéresser aux données épidémiologiques ?

L'épidémiologie est une discipline fondamentale qui va intervenir à deux niveaux : l'analyse et la gestion du risque sanitaire lié aux phycotoxines marines.

En effet, les données épidémiologiques permettent :

- d'évaluer l'efficacité des réseaux de surveillance mis en place
- de remonter au produit responsable et d'établir la relation dose-effet (et de faire une corrélation entre les atteintes humaines et la toxicité évaluée sur les souris)
- d'argumenter pour des études toxicologiques plus poussées
- de mettre en évidence de nouvelles phycotoxines à surveiller
- Les points évoqués ci-dessus étant nécessaires pour l'évolution de la réglementation (seuils de tolérance, surveillance...)
- une description des symptômes qui peut améliorer le diagnostic

B Le recueil des données épidémiologiques

Le recueil des données épidémiologiques est très inégal selon la nature de l'intoxication, la situation géographique et le niveau de développement du réseau de surveillance.

Le recensement avec précision est quasiment impossible car :

- La mise en place d'un système de surveillance épidémiologique qui peut identifier ce type de pathologie peu spécifique est relativement récente.
- Les services de l'Etat (DDASS et DDSV) ont parfois connaissance de cas signalés par des consommateurs ou des professionnels pouvant évoquer une intoxication d'origine phycologique, sans qu'il soit possible de confirmer la nature et l'origine de la contamination.
- Pour les intoxications diarrhéiques, qui sont les plus fréquentes en France, les symptômes digestifs étant relativement bénins la personne intoxiquée ne consulte pas systématiquement le médecin et la symptomatologie est parfois confondue avec une affection bactérienne ou virale.

Cependant, nous avons des données épidémiologiques assez fiables pour le cas des intoxications paralysantes, puisqu'il s'agit de la plus ancienne et dangereuse des intoxications par les coquillages et que sa symptomatologie est assez caractéristique.

C L'exploitation des données épidémiologiques

Concernant les données sanitaires françaises, nous n'avons trouvé que le nombre de cas attribuables à l'ingestion de coquillages et non spécifiques aux phycotoxines. Sachant que le risque microbiologique est prépondérant, il n'est pas possible d'exploiter ces données.

A titre d'exemple pour les toxines paralysantes, ce sont des données épidémiologiques canadiennes qui nous apportent les informations les plus précises concernant le niveau de tolérance des humains vis-à-vis des toxines paralysantes (saxitoxines) et les facteurs de variabilité.

Voici les résultats d'une étude dans une communauté de la baie de Fundy (Canada) des réactions pathologiques dues à l'ingestion de doses variables de toxines paralysantes (*Prakash et al. 1971*)

- l'ingestion d'une certaine quantité de toxines paralysante s'est montrée fatale dans certains cas tandis que, dans d'autres, elle n'a provoqué aucun symptôme,
- la population locale est plus résistante que les consommateurs de passage
- la sensibilité est différente selon l'âge et le sexe des personnes,

- les enfants semblent particulièrement vulnérables,
- comparées aux hommes, les femmes présentent les mêmes symptômes avec des doses en toxines deux fois moindres.

Pour prendre en compte cette variabilité, il est donc préférable d'encadrer la dose létale par les valeurs extrêmes connues. Dans le cadre de cette étude, la dose létale serait comprise entre 456 et 12400 µg d'équivalent toxine.

Les chiffres moyens n'ont donc pas de signification en terme de santé publique car de grandes variations existent d'un individu à l'autre : en fonction de caractéristiques de lieu, d'âge, de sexe et de caractéristiques propres à chaque individu.

Le recueil des données épidémiologiques n'étant pas assez fiable pour les autres catégories de toxines, les enquêtes épidémiologiques permettant de faire la corrélation entre le niveau de gravité et les doses de toxines ingérées sont rares.

Lorsqu'il s'agit d'estimer des doses létales minimum pour l'homme, l'exploitation des données épidémiologiques s'avère donc difficile. Ceci met d'autant plus en évidence la nécessité de recourir à des données épidémiologiques en complément des données toxicologiques pour l'estimation des valeurs de référence.
(JM Frémy et al., 2001)

III Evolution du risque sanitaire : facteurs soupçonnés

Il nous a semblé pertinent de rechercher les facteurs soupçonnés dans l'évolution actuelle ou à venir du risque sanitaire lié aux toxines marines et de les étudier.

Nous nous sommes focalisés sur les eaux de ballast, le réchauffement climatique, la problématique des nitrates et les habitudes alimentaires.

A. Le problème des eaux de ballast

Chaque année, plus de 10 milliards de tonnes d'eau de ballast sont transvidées d'un endroit à l'autre dans le monde (*Tim Williams, 2000*), et peuvent transporter des milliers d'espèces différentes (crustacés, mollusques, phytoplanctons...). Le phytoplancton « voyage » ainsi dans les ballasts sous forme de kystes. Ils peuvent ainsi résister aux conditions de vie dans les ballasts, en particulier survivre au manque de lumière.

- Il y a plusieurs mesures possibles pour limiter l'entrée d'organismes par les eaux de ballastes. L'Organisation maritime internationale des Nations Unies (OMI) a établi des lignes directrices pour gérer les eaux de ballasts. Elle y préconise notamment :
- la réduction de capture d'organismes en choisissant le moment et le lieu où prendre l'eau
- le nettoyage périodique des ballasts
- la vidange de l'eau dans des installations de stockage à terre
- de changer l'eau des ballaste en mer, permettant ainsi un changement de salinité, si l'eau contenue dans les ballasts est douce ou saumâtre (les ports se trouvent souvent au niveau d'estuaire, dont la salinité est moins élevée qu'en haute mer).

Il existe d'autres méthodes plus efficaces mais difficiles à mettre en œuvre à l'heure actuelle : la filtration de l'eau, la stérilisation par rayonnement ultraviolet ou par biocides. Actuellement, l'application de ces recommandations est volontaire et rarement appliqué.

Ces recommandations contribuent à diminuer le risque mais ne le suppriment pas. Aucune étude ne peut réellement chiffrer l'impact de ce phénomène ni des mesures de diminution du risque. Il est à noter que la majeure partie des données sur ce thème provient des organismes de contrôle canadiens et américains (introduction d'espèces dans les eaux douces des grands lacs et sur le Saint-Laurent)

Actuellement en France et en Europe il n'existe pas de dispositif législatif restreignant de façon obligatoire l'utilisation des eaux de ballasts.

Par exemple, la saxitoxine pourrait être une toxine issue d'une espèce introduite. En effet, il a été montré en Australie que des kystes de cette espèce peuvent être transportés dans des eaux de ballast de navires, ou bien à l'intérieur de coquillages, lorsque ceux ci sont transférés d'une zone à une autre. En France, il ne s'agit à l'heure actuelle que d'une hypothèse, car aucune étude n'a été menée pour connaître l'origine de l'apparition d'*A. minutum* dans les eaux côtières de Bretagne-Nord. (*C. BELIN et al, 1998*)

B. Le réchauffement climatique

Le réchauffement climatique s'accompagne, de manière générale, de changements de la flore et de la faune marine.

A l'heure où le réchauffement de la planète devient une préoccupation environnementale de plus en plus importante, il est intéressant de rechercher des informations concernant l'impact éventuel du réchauffement climatique sur le risque sanitaire lié aux toxines marines.

Beaucoup d'articles mentionnent le risque d'augmentation des efflorescences de toxines marines liées à une augmentation de la température des eaux de mer, certains se focalisant sur l'évènement El Nino, mais peu d'articles sont entièrement consacrés au sujet.

Sachant que le réchauffement climatique et ses conséquences se déroulent sur le long terme, que ce phénomène est étudié depuis peu et que les connaissances fondamentales sont déjà insuffisantes pour expliquer clairement les dynamiques des populations phytoplanctoniques, nous manquons d'informations pour évaluer approximativement ce risque.

Certains scientifiques émettent également l'hypothèse qu'une augmentation de la température du globe pourrait se manifester par un arrêt du Gulf Stream et un refroidissement des eaux côtières de la France.

Des diatomées de régions d'eaux chaudes ont parfois été observées dans les eaux côtières atlantiques du Finistère. Généralement, elles sont présentes en automne en faible concentration (inférieure à 1000 cellules par litre d'eau de mer).

Ce fut le cas de :

- *Asteromphalus flabellatus* (1993, 1994, 1995),
- *Asteromphalus sarcophagus* (1993, 2001, 2002),
- *Hemiaulus sinensis* (1989, 1991, 1992, 2002),
- *Chaetoceros peruvianus* (1993, 2002)

Ces années n'étaient pas particulièrement chaudes, il n'est donc pas possible de faire un lien direct entre l'apparition de ces espèces et la température. On pourrait en effet supposer que ces espèces ont pu s'adapter à des climats tempérés.

Néanmoins, il peut paraître intéressant de rechercher l'existence d'observations 'anormales' réalisées pendant la canicule de l'été 2003.

1. Eté 2003 : la canicule

Concernant les espèces non toxiques :

En 2003, certaines des espèces citées ci-dessus se sont développées, au risque parfois de devenir nuisibles pour la faune marine : *A. sarcophagus* et *C. peruvianus* ont atteint des concentrations supérieures à celles auxquelles nous avons l'habitude de les rencontrer. En particulier, la concentration maximale (7 000 cell.L⁻¹) de *C. peruvianus*, relevée fin juillet en baie de Camaret, correspondait au signalement de mortalités de truites d'élevage dans cette même zone.

Mais il faut également signaler l'apparition de nouvelles espèces ; deux diatomées, *Eucampia cornuta* et *Chaetoceros rostratus*, ont été identifiées pour la première fois à l'automne.

Bien que toutes les espèces présentées ici ne soient pas connues pour être toxiques ou nuisibles, la vigilance reste de mise pour *C. peruvianus*.

La prolifération de ces diatomées d'eaux chaudes peut certainement s'expliquer en 2003 par la forte élévation des températures de l'eau de mer à la suite des ensoleillements exceptionnels du printemps et de la canicule de l'été.

Concernant les espèces toxiques :

La présence persistante de *Dinophysis* sur la pointe Saint-Cast, fin août 2003, certes avec des concentrations faibles, est une première, tant par l'ampleur que par la durée. Il faut surtout signaler de fortes concentrations dans le Calvados, en août et septembre, qui ont amené à l'interdiction de

ramassage et de commercialisation des coquillages entre l'estuaire de la Seine et la pointe de Tracy-sur-mer. (*M Houdart 2004*)

2. *L'augmentation du risque sanitaire, une des nombreuses conséquences du réchauffement climatique sur l'écosystème marin*

Le réchauffement climatique, si on sort du cadre 'risque sanitaire', est la cause possible d'autres problèmes très importants pour l'écosystème marin :

- la prolifération d'espèces phytoplanctoniques nocives : de fortes mortalités de poissons de toutes espèces dues à des proliférations de l'espèce *Karenia mikimoto* (voir le paragraphe sur la flore) ont perturbé la pêche, en août 2003, dans la zone de Saint-Cast/Saint-Brieuc ;
- Le taux de mortalité élevé de certains coquillages d'élevage (palourdes et coques dans les parcs et les gisements naturels de Bretagne-Sud, jusqu'au Croisic ; moules 'grillées' au nord de la Charente-Maritime...)

Le risque sanitaire pourrait augmenter dangereusement, mais avant cela, d'autres conséquences citées ci-dessus auront déjà pris une forte dimension.

La problématique globale de la conséquence du réchauffement climatique sur l'écosystème marin risque d'entraîner un impact économique considérable qui pourrait 'faire réagir' dans les années à venir.

C. Les nitrates

Comme expliqué précédemment, les eutrophisations littorales perturbent les écosystèmes, la biodiversité, parfois au profit d'espèces toxiques. La principale cause d'eutrophisation du littoral étant l'apport en quantités trop importantes de nitrates. Du point de vue de la réglementation, les actions de prévention de l'eutrophisation portent essentiellement sur l'assainissement (traitement des eaux usées) et sur la pollution diffuse d'origine agricole.

Avec la transposition de la **directive cadre sur l'Eau (2000/60/CE)** en droit français, une obligation de résultat, visant la qualité biologique et chimique des cours d'eau d'ici **2015**, s'impose.

La problématique des nitrates devient un « élément complémentaire à prendre en compte », il ne s'agit plus d'un critère 'primaire' :

« Objectifs de réduction de flux pour les nitrates, si nécessaire :

Pour les nitrates, fixer une valeur homogène sur l'ensemble du territoire ne répond pas à l'ensemble de la problématique. En effet, le raisonnement à leur égard ne peut pas se faire seulement à une échelle locale, en raison de leur facilité de migration. Il faut donc élargir la réflexion pour tenir compte des liens amont/aval : ce qui conduit à proposer, en complément, une logique d'estimation de flux venant de l'amont qui sont responsables de problèmes rencontrés à l'aval (eutrophisation, marées vertes, ...) et d'en déduire, si nécessaire, à l'échelle des bassins versants, des objectifs de réduction de flux en nitrates. In fine, ce sont les exigences les plus fortes qui seront retenues. »

(*Circulaire DCE 2005/12 n°14 du 28 juillet 2005*)

D'ici 2015, on peut donc espérer voir la situation s'améliorer.

D. Habitudes alimentaires

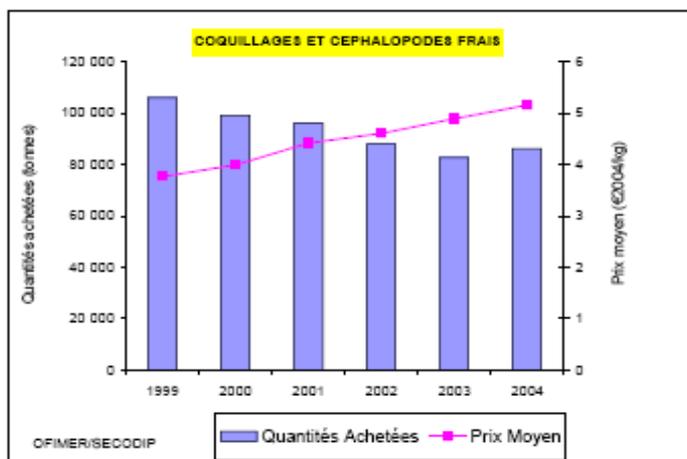
1. L'achat de coquillages

Plusieurs études liées à la consommation de produits issus de l'aquaculture ont été réalisées. Le « Bilan 2004 : consommation des produits de la pêche et de l'aquaculture » réalisé par l'OFIMER présente les données suivantes :

Tableau 2 : évolution des ventes de coquillages et céphalopodes frais de 1999 à 2004

Coquillages et céphalopodes frais	1999	2000	2001	2002	2003	2004
Quantités achetées (tonnes)	105 958	99 091	95 978	87 856	82 625	86 234
Prix moyen (€2004/Kg)	3,8	4	4,4	4,6	4,9	5,2
Valeur (K€ 2004)	398 490	395 493	424 197	404 288	404 217	444 450

Graph 1 : évolution des ventes et cours des coquillages et céphalopodes frais (particuliers)



(Bilan 2004 : consommation des produits de la pêche et de l'aquaculture, OFIMER)

Il apparaît une baisse globale de la consommation de coquillages (et de céphalopodes) depuis plusieurs années, peut être liée à l'augmentation du prix moyen.

Cependant, cette évolution de l'achat de coquillages ne semble pas suffisante pour avoir un impact significatif sur l'évolution du risque sanitaire lié à l'ingestion de toxines marines.

2. La pêche à pied

Un réseau de surveillance « zone de pêche à pied de loisirs » a été mis en place par les services santé environnement des DDASS. Sont surveillés les sites faisant l'objet d'une fréquentation habituelle par les amateurs de pêche à pied. Ce réseau a été mis en place en complémentarité de celui concernant les zones de production conchylicole exploitées par les professionnels qui font l'objet d'un suivi de l'Ifremer.

Néanmoins, les analyses effectuées portent sur les bactéries indicatrices de contamination fécale et ne permettent donc pas de repérer une contamination des coquillages par des phycotoxines marines.

Il serait intéressant que l'Ifremer, qui contrôle l'absence de phycotoxines dans les zones de production conchylicoles réalise également des analyses sur les coquillages des zones de pêche à pied très fréquentées.

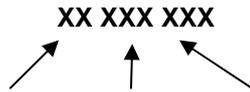
Une bonne communication sur le sujet reste donc actuellement la meilleure manière de limiter les intoxications alimentaires.

Cette activité continue à présenter des risques non négligeables puisque certaines personnes peuvent passer à côté, voir ignorer ces messages de prévention.

IV Potentialité de présence des toxines

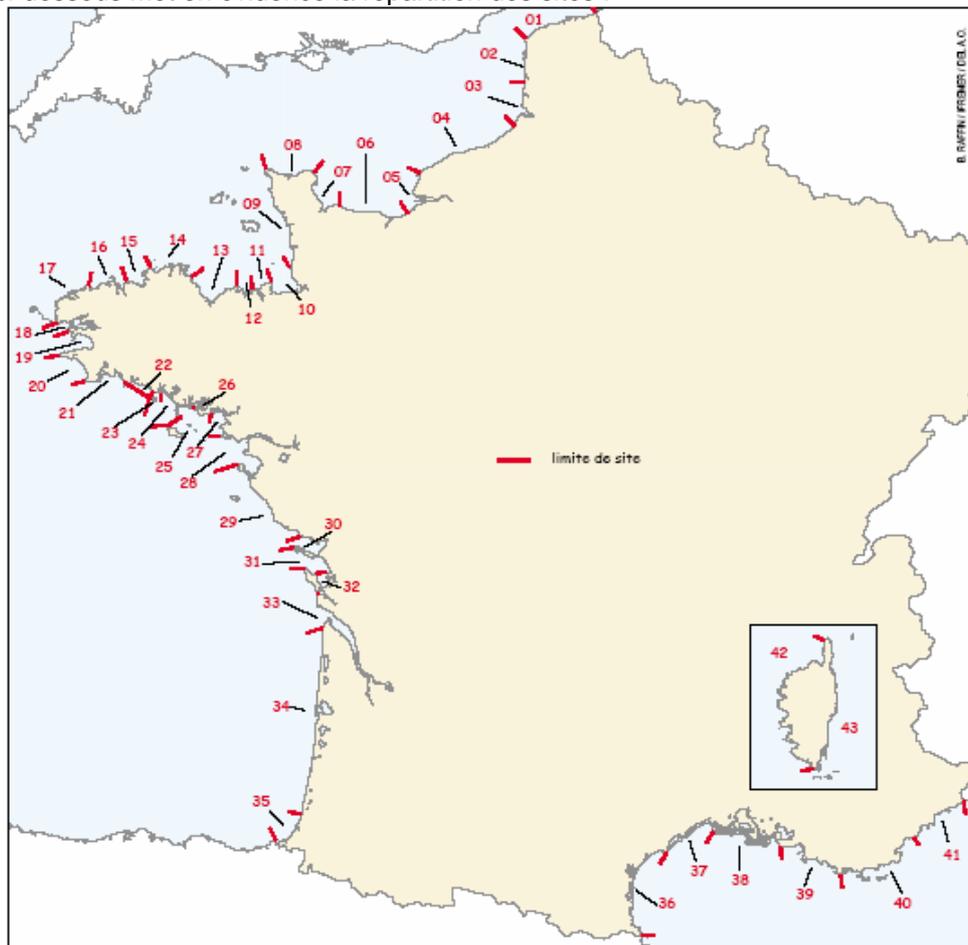
A. Actuellement sur les cotes françaises

Selon l'étude de C. Belin *et al.* (1998), le littoral français est découpé en 119 bassins hydrologiques regroupés en 43 sites contigus. Ceci implique une codification précise pour chaque bassin selon le système ci-dessous :



n° du site n° du bassin n° du point à l'intérieur du bassin

La carte ci-dessous met en évidence la répartition des sites :



Données QUADRIGE

Source: Bilan sur 20 ans des interdictions administratives de vente et de ramassage de coquillages pour présence de phycotoxines sur le littoral français 1984-2003. (Ifremer)

Figure 14: Découpage du littoral en sites

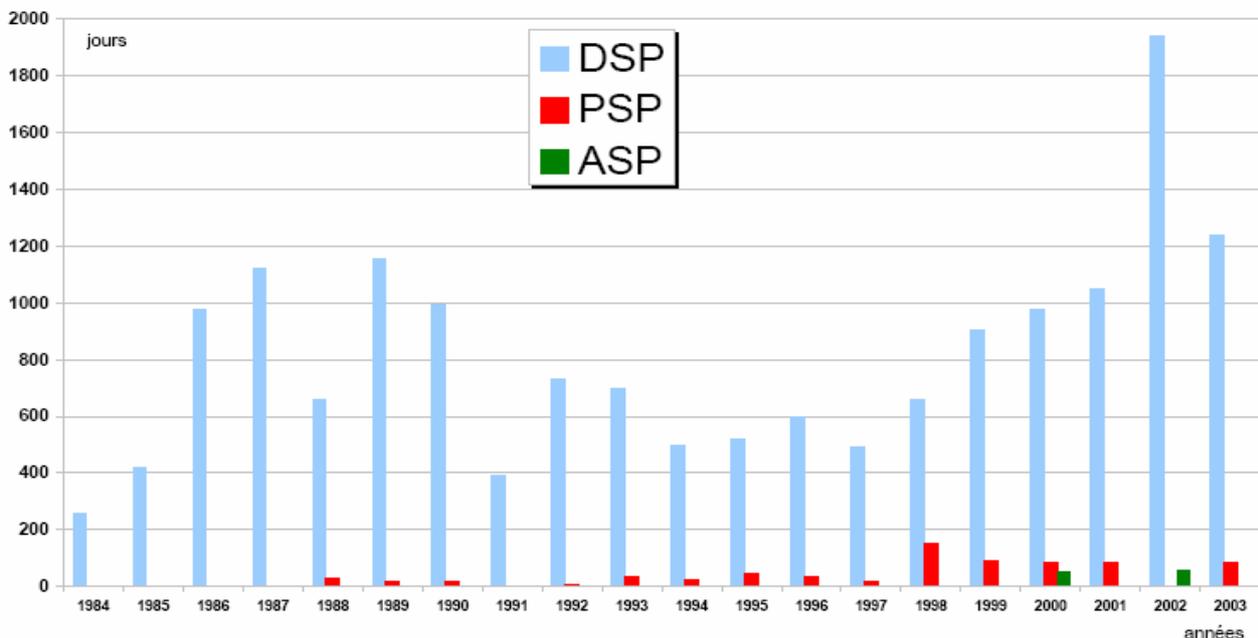
Depuis 1984, une quinzaine de bassins sont touchés en moyenne par an par une fermeture, pour cause de présence de toxines affectant une partie ou la totalité du bassin. Les fermetures pour cause de présence de toxines DSP sont beaucoup plus fréquentes que celles qui sont liées aux toxines PSP, puisque ces dernières n'ont affecté au maximum que deux bassins par an. C'est la raison pour laquelle dans ce qui suit, sont essentiellement évoqués les épisodes à DSP.

Quelques années ont été particulièrement touchées, de 1986 à 1990. Depuis, on constate une certaine stabilisation.

Certains bassins sont particulièrement touchés par des **durées de fermeture longues**. Ces fermetures sont dues à la présence de phycotoxines dans les coquillages en quantité dangereuse. C'est le cas d'Antifer (bassin 010) en Haute Normandie, qui a connu des durées de fermeture supérieures à deux mois durant cinq années. C'est également le cas pour la baie de Douarnenez (bassin 039) et la mer d'Iroise (bassin 036) en Bretagne ouest, touchées de façon récurrente et le plus souvent sur des périodes supérieures à deux mois. La baie de Douarnenez est l'unique bassin fermé systématiquement tous les ans.

Le plus souvent, ces longues périodes de fermeture s'expliquent par une présence prolongée de *Dinophysis* à des concentrations qui ne sont pas toujours très importantes, mais qui entretiennent la contamination des coquillages. Dans certains cas, néanmoins, des fermetures ont été prolongées longtemps après la disparition de *Dinophysis* dans l'eau. En 1989, par exemple, huit semaines ont été nécessaires pour que les moules des filières au large des côtes du Languedoc-Roussillon se décontaminent, alors que *Dinophysis* n'était plus présent dans l'eau.

Le graphe ci-dessous montre l'évolution de la durée cumulée par année des épisodes de fermeture de bassins sur le littoral français sur une période de 20 ans : 1984-2003.



Source: Bilan sur 20 ans des interdictions administratives de vente et de ramassage de coquillages, pour présence de phycotoxines sur le littoral français, 1984-2003. (Ifremer)

Graphe 2: Durée cumulée de fermeture, par année, sur tout le littoral français

Au vu de ce graphique, nous avons une « impression » de cyclicité de l'occurrence des épisodes à DSP. Il faudrait étendre les observations sur une période plus longue pour étudier cette question. A ce jour, aucun scientifique n'évoque cette hypothèse.

Ce graphique met en évidence l'émergence des toxines ASP (comme l'acide domoïque) dans les années 2000.

Il semble toutefois important de préciser qu'il existe une différence entre une fermeture de bassin et l'existence d'un risque. En effet, les bassins ne sont fermés que si des toxines (connues) ont été repérées. Certains bassins peuvent être contaminés par de nouvelles toxines sans que les prélèvements effectués les mettent en évidence. Ces zones présentent donc un risque mais ne sont pas fermées. Nous pouvons donc estimer une sous représentativité des épisodes toxiques dans ce graphe. Les épisodes de fermeture de bassins pour raisons inconnues se déroulent lorsqu'il y a eu des cas humains, et qu'un test souris positif a été effectué.

B. Nouvelles espèces

Par définition, une espèce émergente met du temps avant d'être reconnue par la communauté scientifique. En effet, ne peuvent être cherchées que les toxines déjà connues. C'est donc suite à ces événements particuliers que de nouvelles toxines sont déterminées. Voici un récapitulatif des dernières espèces recensées sur le littoral français.

C'est en 2001 que l'**azaspiracide** a été identifiée pour la première fois, suite à une anomalie dans les tests souris : les souris mourraient de symptômes inhabituels.

En 2002, des recherches ont permis de mettre en évidence la présence de nouvelles espèces de Dinophysis qui n'avaient jusqu'alors jamais été repérées comme pouvant présenter une menace sur le littoral français: **DTX-2 et DTX-3**.

En 2003, pour la première fois, l'examen de sédiments et d'une colonne d'eau a révélé la présence de 2 espèces d'**Ostreopsis** en Grèce (*O. ovata*, *O. siamensis*). D'autres Dinoflagellés du genre Prorocentrum et Amphidinium, ainsi que des diatomées ont été retrouvées. Ces espèces habituellement présentes dans les zones tropicales, et responsables de la ciguatera semblent s'installer dans l'est méditerranéen. A l'heure actuelle, aucun épisode de Ciguatera n'a été évoqué. En revanche, on dénombre des irritations ainsi que des problèmes respiratoires. En août 2006, c'est à Marseille qu'a été identifiée *Ostreopsis ovata*. La diffusion de ces espèces inquiète la communauté scientifique, puisque la majorité d'entre elles sont capables de produire des toxines. (K. Aligizaki et al., Sept 2005)

Suite à la canicule de 2003, des espèces de Dinophysis ont été repérées de façon anormalement prolongée. Les autres espèces repérées n'ont apparemment pas été toxiques pour l'homme. Elles n'auraient posé des problèmes qu'au niveau de la faune marine.

En 2004, ce sont des dérivés de **pecténotoxines (PTX2)** qui ont été retrouvés dans les étangs de Salses, Leucate et de Corse Ouest en relation avec le développement de *Dinophysis*.

En 2005, dans le Bassin d'Arcachon, des **spiroïdes** sont associées à la présence d'*Alexandrium ostenfeldii*. (Puisseux-Dao S., Septembre 2006)

C. Les espèces dangereuses dans le monde

Selon la revue vertigo (p.5) (*Chateau-Degat M.L., mai 2004*), il y a au total 4 espèces recensées qui sont susceptibles d'entraîner la mort :

- **Ciguatoxine**, mortalité < 0,1%
- **Acide domoïque**, mortalité de 3 %
- **Saxitoxine**, mortalité de 1 à 14 %,
- **Térodotoxine**, mortalité de 60%

Seules la Ciguatoxine et la Térodotoxine ne sont pas présentes actuellement sur nos côtes.

La térodotoxine, plus communément appelée la térodotoxine « Fugu », est une neurotoxine puissante (produite par 4 souches différentes de bactéries) repérée actuellement uniquement sur les côtes Japonaises et brésiliennes. C'est la seule toxine pouvant être qualifiée de vraiment dangereuse, de part la rapidité et la sévérité des ses effets.

Elle se concentre dans le foie de poissons bien particuliers : les tétraodontiformes. C'est donc via l'ingestion de ces poissons, que la térodotoxine présente un risque pour l'homme. Cette toxine a été identifiée dans plusieurs espèces animales notamment le triton de Californie, le poisson perroquet, l'étoile de mer, certaines espèces de grenouilles, de pieuvres et de crabes. Ces autres espèces animales pouvant contenir de la térodotoxine ne sont habituellement pas consommées par l'humain.

C'est au Japon, grand consommateur des produits de la mer, que l'on rapporte le plus grand nombre de cas, soit environ 200 intoxications annuellement (par ingestion de Fugu : poisson globe). Appelé aussi « TTX », ce poison contient 1/200 de cyanure de potassium et une dose de 0,5 à 1mg suffit à provoquer la mort. Lorsque on l'ingurgite, la vitesse d'empoisonnement est assez lente et les cas de sauvetages sont fréquents, mais en infiltration directe avec le sang, l'empoisonnement est très rapide : le système nerveux se paralyse et on meurt par asphyxie.

Le fugu et la tétrodoxine n'appartiennent pas aux écosystèmes marins de notre littoral ; et si la toxine arrivait sur nos côtes, il faudrait la présence du Fugu et sa consommation pour que la population soit exposée. Il apparaît peu probable d'assister prochainement à l'apparition d'un risque sanitaire induit par cette toxine en France.

La Ciguatera désigne la symptomatologie très caractéristique observée chez des personnes ayant ingéré des poissons tropicaux intoxiqués par la ciguatoxine (neurotoxine présente dans l'océan Pacifique). La ciguatera est rarement fatale (< 0,1%), avec un taux de mortalité bien inférieur à celui induit par la saxitoxine. Cependant, après une manifestation aiguë de la maladie, certains patients ressentent des symptômes qui peuvent persister pendant des mois. Cette symptomatologie chronique est très peu connue. De par son incidence importante, la Ciguatera est aussi une cause de morbidité significative dans les Caraïbes.

Selon le même raisonnement que précédemment, il apparaît peu probable d'imaginer être bientôt confrontée à cette toxine.

Les eaux de ballast et/ou le réchauffement climatique sont susceptibles de favoriser l'importation de nouvelles espèces et pourraient augmenter la fréquence des épisodes toxiques dus aux espèces algales déjà présentes sur nos côtes.

A contrario, la nouvelle Directive Cadre sur l'eau (2000/60/CE) instaure la notion d'objectifs de réduction des flux de nitrates qui va dans le sens d'une diminution des efflorescences. Quant aux habitudes alimentaires concernant les coquillages, elles n'évoluent pas de façon significative.

En parallèle, l'étude des données sanitaires et des espèces émergentes sur nos côtes nous amène à la conclusion que peu de cas d'intoxications graves (mortalité, séquelles) sont recensés, de plus, les phycotoxines très dangereuses pour l'homme sont actuellement en faible nombre et il y a peu de risques de les voir apparaître prochainement en France.

Nous nous intéressons par la suite à la gestion de ce risque sanitaire.

Partie 4 Gestion actuelle du risque lié aux toxines marines en France

I Surveillance mise en place

Selon la *saisine de l'Afssa n°2006-SA-0254*, le dispositif national s'est renforcé en 1998 par la mise en place de plans de surveillance de la salubrité des coquillages au stade de la mise sur le marché mis en œuvre par la DGAL.

Ce dispositif s'appuie sur 16 laboratoires répartis en 2 réseaux pour réaliser le contrôle de la salubrité des coquillages :

- Le Rephy, réseau IFREMER opéré par les 12 laboratoires côtiers répartis sur le long du littoral français pour le contrôle des zones de production, liés au laboratoire expert phycotoxines de Ifremer-Nantes, sous la maîtrise d'ouvrage de la DPMA. Ils assurent les prélèvements et analyses, la saisie des données, la valorisation et la diffusion des résultats au niveau régional. (C. *Belin et al*, 1998).
- Le réseau des laboratoires départementaux d'analyse répartis sur le territoire pour le contrôle des coquillages sur le marché dans le cadre des plans de surveillance de la DGAL.

Ces 2 réseaux sont coordonnés par le Laboratoire National de Référence (LNR) des bio-toxines marines de l'Afssa. Depuis ces dernières années, l'ensemble de ces laboratoires impliqués dans les analyses officielles participe aux essais Inter laboratoires d'Aptitude organisés annuellement par le LNR de manière à suivre la fiabilité des résultats produits.

Les autres laboratoires sont en processus d'accréditation. Par ailleurs, le LNR participe aux travaux coordonnés par le laboratoire communautaire de référence. Il est important de noter aussi que les scientifiques du LNR de l'Afssa et de l'Ifremer participent à plusieurs programmes de recherche engagés au niveau européen et international sur les efflorescences de micro algues toxiques et la salubrité des produits de la mer.

Au niveau Européen, La surveillance de toxines marines est effectuée dans un cadre réglementaire strict, dicté par la réglementation européenne (en particulier une directive de 1992 modifiée en 1997, et deux décisions de la Commission européenne datant de 2002). Les modalités de mise en oeuvre de cette réglementation, ainsi que les recommandations émises par le Laboratoire Communautaire de Référence (LCR) de Vigo en Espagne pour ces toxines, sont relayées à tous les organismes en charge de cette surveillance comme l'Ifremer par les LNR, en France l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA) à Maisons-Alfort. (*Puiseux-Dao S.*, *Septembre 2006*)

Ces dernières années, l'interaction entre les partenaires impliqués (DPMA, DGAL, LNR et Ifremer) s'est renforcée au travers de la constitution d'un groupe de travail qui se réunit en fonction des besoins et au minimum une fois par an. Cela permet d'améliorer la réactivité pour adapter le dispositif aux évolutions, que ce soit en réponse à des recommandations faites par l'OAV (Office de l'Alimentation et des affaires Vétérinaires) ou pour répondre à l'expansion des épisodes toxiques et l'apparition de nouvelles toxines.

A. Le Rephy

Créé par l'Ifremer en 1984 pour la surveillance du phytoplancton et des phycotoxines dans les zones de production, il est monté progressivement en puissance pour intégrer la prévention de nouveaux risques liés aux toxines (paralysantes, amnésiantes, lipophiles et les émergentes).

Il est l'un des premiers dispositifs européens mis en place pour prévenir le risque d'intoxication alimentaire par les phycotoxines. A ce titre, il a servi de référence pour l'élaboration de dispositifs dans d'autres pays. Il bénéficie aujourd'hui d'une importante base de données historique et scientifique sur les évolutions et l'expansion des épisodes toxiques ayant affecté nos côtes.

Le Rephy possède donc un double aspect patrimonial et réglementaire, puisque la constitution de séries temporelles de données sur les populations phytoplanctoniques des différentes façades

maritimes (aspect patrimonial), permet également la détection des espèces phytoplanctoniques particulières que sont les espèces toxiques et nuisibles. Le suivi de ces épisodes de toxicité détermine la prise de décisions administratives ; cet aspect réglementaire est désormais étroitement lié à des obligations communautaires. (C. Belin et al, 1998).

Procédures RePHY 2006

Ces procédures permettent la description des zones à risque et des périodes à risque pour chacune des phycotoxines présente sur le littoral français.

- **Zone à risque** : zone touchée au moins une fois par la présence de phycotoxines dans les coquillages à des concentrations supérieures au seuil de sécurité sanitaire, sur une période de référence définie comme les 6 dernières années d'observation.
- **Période à risque** : ensemble des mois concernés par la présence de ces toxines selon des règles particulières en fonction du type de toxine.

La zone et la période à risque sont actualisés annuellement et définissent les zones et périodes de contrôle.

Ces notions permettent de définir la fréquence de prélèvement :

- **Une fois par quinzaine en période normale avec prélèvements d'eau uniquement,**
- **Une fois par semaine dans les zones à risques en période de risque avec prélèvements d'eau et de coquillages en simultané.** (C. Belin et al, 1998).

Lors du prélèvement d'eau, ce sont les espèces toxiques qui sont recherchées (algues). Les coquillages du secteur concerné sont alors soumis à des analyses visant à évaluer leur toxicité.

B. La surveillance sur le marché

Selon la *saisine n°2006-SA-0254*, les plans de surveillance mis en place chaque année ont pour objectif d'évaluer la conformité des coquillages mis sur le marché en France. L'élaboration de ces plans sous la responsabilité de la DGAL, se fait en concertation avec le LNR de l'Afssa pour ce qui concerne les modalités de prélèvements, les méthodes d'analyse, la liste des laboratoires compétents. Le LNR n'est pas consulté jusqu'à présent sur les modalités d'échantillonnage.

Environ 500 échantillons par an sont prélevés de façon exclusivement aléatoire (règlement CE n°854/2004). Selon le rapport de 2004 fourni en septembre 2005, 100% des prélèvements étaient conformes vis à vis des toxines DSP et PSP. Par contre, un prélèvement n'était pas conforme au regard des toxines ASP. L'établissement a immédiatement été fermé (*Afssa, Septembre 2005 et La Vieille S. et al 2004*), ce plan vise également les coquillages d'autres Etats membres.

D'autres contrôles et analyses sont effectués en frontière sur les lots importés. Les règles d'importation sont d'ailleurs assez strictes, et seuls quelques pays ayant pu répondre aux exigences de la réglementation communautaire sont aujourd'hui autorisés. Le critère principal étant que seuls les pays ayant des règles identiques ou équivalents aux règles européennes peuvent exporter leurs produits vers l'Europe. Par ailleurs, tout prélèvement (consommation sur place ou exportation de naissains) est interdit lors d'épisodes toxiques.

Attention, il est important de distinguer le cadre de surveillance de celui de la vigilance. Le premier concerne le contrôle des niveaux de contamination des coquillages par les phycotoxines connues, alors que le second a pour objectif de repérer l'émergence de nouvelles substances potentiellement toxiques pour l'homme.

Le paquet hygiène

Il clarifie le partage des responsabilités entre l'exploitant et les services de contrôle en matière de sécurité sanitaire, ce qui se traduit notamment chez les exploitants par le passage d'une obligation de moyens à une obligation de résultats. Il se fonde sur une utilisation plus systématique de l'analyse des risques tant pour le gestionnaire que pour la profession. Les exploitants doivent notamment mettre en œuvre les bonnes pratiques d'hygiène complétées par des procédures fondées sur le principe de l'HACCP.

Le règlement (CE) n°178/2002 affirme l'obligation de traçabilité primaire des denrées à leur mise sur le marché. Le règlement (CE) n°853/2004 introduit la possibilité d'évolution de la réglementation, en coopération avec le Laboratoire Communautaire de Référence concerné, pour répondre à de nouvelles connaissances concernant de nouvelles toxines, virus, et tout autre risque pour la santé publique.

C. Le programme COSTE

Selon un article anonyme, dans L'officiel de la conchyliculture, avril/mai 2006, le COSTE (COMITE D'ORIENTATION SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE ET D'EVALUATION) est une structure ouverte mise en place le 24 janvier 2006. COSTE a pour objet de coordonner et d'accompagner dans une stratégie nationale, les actions de recherche et de développement, pour améliorer la connaissance des efflorescences toxiques et leur impact sur la conchyliculture, en transparence et en cohérence avec les besoins des professionnels. Il réunit sur un même plan l'ensemble des acteurs impliqués ou intervenant sur la thématique :

- les producteurs ou pêcheurs professionnels (CNC et SRC, CNPMM et CRPM),
- les autorités compétentes intervenant à la fois pour la gestion de la qualité des produits mais aussi de ces activités (DPMA, DGAL),
- les régions concernées par l'accompagnement et le développement de ces activités,
- les partenaires scientifiques ; IFREMER, AFSSA, organismes de développement (SMEL, CREEA, SMIDAP, CEPALMAR), universités...

Le comité restreint a été formé pour gérer et piloter le programme. Il s'est réuni pour la première fois le 6 avril et a mis en place un programme pour l'été 2006.

Le programme de ce comité s'articule autour de 3 thématiques principales pilotées par deux représentants du COSTE :

- la santé publique (AFSSA/CNC) ; la prise en compte des aspects épidémiologiques et toxicologiques nécessite la réflexion en amont,
- la filière de production (CNC/IFREMER) ; ce thème concerne les mollusques bivalves, les zones et les pratiques de production, les procédés et équipements ainsi que le volet socio-économique,
- l'environnement (Ifremer/ CNC); il s'agit de mieux connaître les paramètres influençant les interactions entre conchyliculture, phytoplancton et toxicité pour établir les schémas de prévision.

A ces trois thématiques s'ajoutent trois thèmes structurants :

- La réglementation
- Le diagnostic et la surveillance
- L'analyse du risque

II Techniques d'analyses des phycotoxines marines

A. Les méthodes

L'analyse des toxines s'effectue en deux étapes

- **L'extraction des toxines** : les toxines ne sont pas analysées directement dans l'eau, où elles sont présentes en faible concentration (sauf épisode exceptionnel) mais dans la chair des coquillages. Il faut donc extraire dans une première étape les toxines de cette matrice. Cette extraction peut se faire à partir des glandes digestives du coquillage ou bien de l'ensemble de la chair du coquillage. Les résultats ne sont donc pas les mêmes suivant la matrice utilisée pour l'extraction. Si l'on ne prend que les glandes digestives on va trouver des concentrations plus élevées que si l'on étudie l'ensemble du coquillage.
- **L'analyse proprement dite de la toxine** : à ce niveau, il existe deux possibilités, utiliser un test biologique sur des souris ou analyser et quantifier chimiquement la toxine. Ces méthodes peuvent très bien être complémentaires.

De façon générale la méthode d'analyse est commune aux toxines présentant des symptômes similaires :

- **Pour les toxines paralysantes** la méthode officielle d'évaluation des phycotoxines paralysantes est un test souris normalisé AOAC (Association of Official Analytical Chemist) référencée 959-08 (AOAC, 1995) : un extrait acide de chair total de coquillages est injecté à au moins trois souris par voie péritonéale. Les souris sont observées pendant une heure et le temps de survie médian sert à calculer le nombre d'unités souris, qui sera lui-même converti en microgrammes d'équivalent saxitoxine par 100g de chair. Cette méthode est considérée comme la méthode biologique de référence pour la détection des toxines PSP au niveau international. En effet, c'est une méthode standardisée puisqu'elle comprend le calcul d'un Facteur de Conversion (FC) qui tient compte des conditions expérimentales propres à chaque laboratoire. Les coquillages sont considérés contaminés lorsque l'échantillon analysé contient plus de **80 µg équivalent saxitoxine par 100 g de chair totale**. Le seuil de détection de la méthode étant de l'ordre de 38 µg (*Ifremer, , 2006, 3*).
- **Pour les toxines diarrhéique et associées**, le dépistage sur au moins trois souris des toxines liposolubles à partir de l'injection d'un extrait de glandes digestives de coquillages doit s'effectuer selon la méthode d'analyse dite de *Yasumoto et al. 1984* modifiée. Les coquillages sont considérés contaminés si on observe la **mort d'au moins deux souris sur trois**, suite à l'injection par voie intrapéritonéale d'extraits de glandes digestives des échantillons à tester sur une **période de 24 heures**. (*Ifremer, 2006, 2*)
- **Pour les toxines amnésiantes**, la méthode d'analyse des phycotoxines amnésiantes est celle de *Lawrence et al. 1991* (protocole validée AOAC 991.26, 1991) qui consiste en une analyse chromatographie liquide haute performance couplée à une détection par UV, après extraction méthanol-eau sur la chair totale de coquillages. Un résultat est considéré comme positif lorsque l'échantillon contient plus de **20 µg d'acide domoïque/g de chair** (seuil de détection de 0,15 µg). *Quilliam et al (1995)* ont développé une autre méthode plus performante puisqu'elle permet d'une part, d'analyser les échantillons de coquillages très peu contaminés, et d'autre part, mettre en évidence les isomères de l'acide domoïque, lorsqu'ils sont présents. Cette méthode est en cours de validation AOAC. (*Ifremer, 2006, 1*)

B. Critiques des bioessais sur les souris

Ces tests sur souris présentent des avantages certains : ils sont largement répandus et permettent ainsi de comparer les résultats de surveillance au niveau européen ou mondial. Ils donnent

chez l'animal test une **réponse toxicologique globale** et permettent également de détecter d'éventuelles toxines ou autres principes toxiques mal ou non encore identifiés.

Cependant, le test souris à lui seul ne donne pas d'indications sur la nature de la toxine présente : il ne présente **aucune spécificité**. Quand le test souris est positif et que les analyses phytoplanctoniques ne permettent pas d'attribuer clairement cette toxicité, l'utilisation d'analyse chimique s'avère indispensable. De plus la faible taille des populations de souris étudiées (trois pour le test de Yasumoto) et la durée de contrôle faible (24 heures) induisent une grande incertitude sur la signification du résultat.

C. Alternative au remplacement des bioessais sur les souris

La politique actuelle de la Commission européenne tend à supprimer le plus possible les tests toxicologiques sur les animaux. Cette démarche est liée à une volonté éthique (la prise en compte de la souffrance de l'animal) mais aussi à un souci d'efficacité accrue. En effet, les délais imposés par les bioessais (plusieurs jours pour des tests souris) limite la réactivité des organismes de contrôle en cas de résultat positif d'une analyse et sont entachés d'un doute quand à leur réelle extrapolation au cas humain et leur très faible spécificité.

Pour ces différentes raisons la Commission Européenne prévoit d'instaurer des tests chimiques harmonisés d'ici fin 2007 sur l'ensemble de son territoire (*Cultures MARINES n°196 - mai 2006*). Ces techniques chimiques permettraient de confirmer et/ou de quantifier telle ou telle toxine, à condition de disposer de molécules étalons. Ces techniques d'investigation peuvent être utilisées **en complément des bioessais sur souris** afin de contribuer, au-delà du risque toxicologique observé dans ces bioessais, à reconnaître la nature ou à apprécier la quantité de toxines présentes dans le coquillage.

Pour exemple, l'AFFSA a proposé en 2005 de remplacer, pour les toxines paralysantes (PSP), le test souris par l'analyse chromatographique liquide et ultraviolets en tant que méthode de référence.

Les travaux menés actuellement au niveau international et européen amèneront également à réviser les seuils réglementaires.

L'utilisation de cultures cellulaires pour la détection des toxines marines a déjà été étudiée. Elle pourrait présenter l'avantage d'être facilement mise en œuvre, d'être rapide et économique ainsi que de présenter une grande répétitivité des mesures (*JM Frémy et al. 2001*).

En attendant la directive de la Commission Européenne, le test sur les souris restera l'analyse de référence.

III Détoxification des coquillages

Un moyen efficace de lutter contre les toxines marines présentes dans les coquillages serait de les éliminer de manière naturelle ou provoquée (traitements divers). Diverses méthodes ont déjà été étudiées.

Il existe plusieurs procédés d'élimination des contaminants chez les coquillages. Le plus connu est l'épuration qui est un processus dynamique par lequel les coquillages se débarrassent eux-mêmes de leurs contaminants dans des sites naturels (reparcage) ou dans les unités d'épuration artificielle (purification).

A. Cadre réglementaire

La salubrité des coquillages ne s'inscrit dans un cadre réglementaire qu'en ce qui concerne les risques de contamination fécale. Dans ce cas, la purification des coquillages s'inscrit dans un cadre réglementaire précis. Les zones de production de coquillages sont classées selon 4 niveaux de salubrité, selon la directive de la communauté européenne du 15/07/91 (91/492/CEE) relative aux règles régissant la production et la mise sur le marché des mollusques bivalves vivants.

A chacune de ces 4 zones est associée une réglementation spécifique : la zone A, produits pouvant être expédiés directement pour la consommation humaine, **la zone B, impliquant une purification de la production avant consommation**, la zone C où l'élevage est interdit sauf dérogation pour l'élevage et/ou la pêche de juvéniles et la zone D où tous les usages sont interdits.

L'opération de purification consiste à immerger des coquillages vivants dans des bassins alimentés en eau de mer naturellement propre ou rendue propre par un traitement approprié, pendant le temps nécessaire à l'élimination des contaminants microbiologiques pour les rendre aptes à la consommation humaine immédiate. Par contre, nous ne sommes pas certains à ce jour de l'efficacité de ce procédé en ce qui concerne l'élimination des phycotoxines. (*Le Saux et al, janvier 2003*)

B. Cinétiques de détoxification

La détoxification est propre au type de toxine rencontrée. En effet, si la détoxification des coquillages contaminés par des toxines diarrhéiques est peu étudiée, les autres contaminations sont davantage documentées.

Il apparaît que les cinétiques de détoxification sont variables en fonction de la concentration initiale de toxine, mais aussi de l'espèce de coquillages concernée ainsi que de l'organe, de quelques jours à quelques mois voire quelques années. C'est le cas pour les toxines paralysantes, les neurotoxines et les toxines amnésiantes.

Les mécanismes mis en jeu lors de la détoxification restent peu connus, mais on peut supposer qu'il s'agit d'une excrétion de la toxine ou d'une biotransformation (les deux mécanismes étant suggérés lors des études) et que la détoxification se fait en deux phases (toxines diarrhéiques) : une première phase rapide et une seconde plus lente.

Par ailleurs, une étude comparative réalisée par *Marcaillout-le baut et al., (1990)* a montré qu'un lot de moules toxiques se décontaminait beaucoup plus lentement s'il était immergé dans un milieu naturellement pauvre en nutriment, que s'il était soumis en laboratoire à des apports réguliers en phytoplancton non toxique. Cette étude met en évidence un phénomène de « purge » du coquillage.

Le procédé d'auto épuration est remis en cause dans la mesure où la qualité du milieu est difficile à contrôler. D'autres procédés sont donc à étudier. (*JM Frémy et al, 2001*)

C. Procédés de détoxification alternatifs au reparcage

La purification dans des bassins d'eau traitée aux Ultra- Violets, le traitement thermique, le marinage ou l'irradiation sont des méthodes de purification des coquillages qui sont inutiles pour l'élimination des toxines.

- L'ozonation

Des expériences d'ozonation ont été faites en ce qui concerne les toxines paralysantes, et les neurotoxines. Il s'agit d'un procédé rapide. L'ozone provoque la formation d'acide hypochloreux, qui inactive la saxitoxine et ses dérivés. Ce procédé permet en outre de réduire de 3 logs la quantité totale de brevetoxines, en rompant les structures cycliques de cette toxine (ce qui modifie ses propriétés physiques).

Toutefois, ce procédé est très controversé, et son efficacité n'est pas prouvée dans la totalité des études à ce jour. (*JM Frémy et al, 2001*)

- L'ajout d'une microflore utilisant l'acide domoïque

Certaines études ont montré que la moule bleue est capable d'éliminer l'acide domoïque dans des conditions normales. Il est apparu que cette élimination était en réalité due à la présence d'une microflore capable d'utiliser cette toxine. Des méthodes de détoxification qui favoriseraient les bactéries utilisant l'acide domoïque et la saxitoxine sont alors envisageables (mais en contradiction avec les méthodes d'épuration actuelles qui ont tendance à éliminer toutes les bactéries présentes dans les coquillages). (*J.E. Stewart et al. date inconnue*)

IV La modélisation : futur outil de gestion ?

A. Modélisation prédictive

Il existe différents modèles d'explication et de prévision de bloom algal. Ils sont pour la plupart très spécifiques à des zones géographique données : par exemple la modélisation de la croissance du phytoplancton dans la Baie de Seine (*P. Cugier et al, 2005*) ou bien la modélisation de bloom algal dans la Baie de Biscay (*M. Huret et al, 2005*).

La complexité du phénomène, dépendant de très nombreux facteurs, n'a pas permis à ce jour de créer une modélisation applicable à différents types de littoral. Certains phénomènes comme l'agrégation du phytoplancton (*El Saadi et al, 2006*), ou bien la compétition de croissance des différentes espèces présentes dans un milieu (*P. Rivière, 2006*) ont été partiellement expliqués.

Aucune modélisation fiable ne permet de prédire la toxicité ou non d'un bloom algal. Des phénomènes sont certes suspectés, mais ils ne permettent pas une généralisation, applicable dans un modèle prédictif fiable.

B. Modélisation descriptive : mise en évidence du bloom algal

Différentes méthodes permettent de mettre en évidence l'activité du phytoplancton, notamment en utilisant l'imagerie par satellite. Grâce à cette technique, on peut repérer, notamment par rayonnement infrarouge, l'activité chlorophyllienne du phytoplancton et ainsi quantifier sa densité de présence. Ces méthodes ne sont évidemment pas spécifiques mais peuvent permettre d'établir une cartographie de l'activité phytoplanctonique. (*Francis Gohin, 2006*)

V La crise du bassin d’Arcachon

A. Description des faits

Des analyses ont été effectuées sur des huîtres prélevées le 28 Août 2006 dans le bassin d’Arcachon. Les tests réalisés par le laboratoire Ifremer de la Tremblade ont révélé que la toxicité des huîtres dépassait les seuils sanitaires d’interdiction. Plus concrètement, deux des trois souris utilisées lors du test sont mortes après injection d’extrait de glandes digestives d’huîtres par voie péritonéale. Le test n’étant pas spécifique, la cause des décès n’a pu être déterminée. Les analyses chimiques et biologiques complémentaires n’ont révélés ni la présence de Dinophysis dans les eaux du bassin d’Arcachon, ni la présence de toxines connues dépassant les seuils réglementaire.

Le 31 Août 2006, la vente d’huîtres et de moules provenant du bassin d’Arcachon a été interdite par arrêté préfectoral au nom du principe de précaution.

En plus de la surveillance des huîtres, les médecins de l’hôpital d’Arcachon ont déclaré la mort de deux personnes les 3 et 5 Septembre 2006 pour causes inconnues. Ces deux personnes auraient consommé des huîtres du bassin. Le ministre de l’agriculture Dominique Bussereau reçoit alors les ostréiculteurs le 6 Septembre pour les prévenir des deux morts suspectes pouvant être liées à la substance non identifiée ayant entraîné l’interdiction de vente depuis la fin Août.

Le 22 Septembre 2006, l’interdiction de commercialisation est levée car les tests biologiques sur les huîtres n’ont pas montré de signe négatifs depuis deux semaines.

Le 13 Novembre 2006, les huîtres du bassin d’Arcachon ont été mises hors de causes par l’enquête de la justice dans le cas des deux morts suspectes de Septembre 2006.

B. Analyses et critiques de la gestion de crise

La crise, commencée fin Août 2006 dans le bassin a révélé la complexité et la faiblesse de la gestion/communication de crise dans le domaine des toxines marines et plus particulièrement celui de la conchyliculture / ostréiculture.

Le manque de spécificité des tests biologiques et le flou quant à l’explication d’un résultat positif (au moins deux morts de souris sur trois) ont conduit les autorités à s’appuyer sur le principe de précaution et à interdire la commercialisation des coquillages. La communication sur le lien entre les décès et l’épisode toxique a créé une vive polémique. Les autorités auraient sûrement pu s’assurer de la cause des décès, avant de les communiquer, pour ne pas déclencher de polémique, sachant que, de toute façon, la commercialisation des huîtres était déjà interdite.

Partie 5 Discussion et propositions d'améliorations

Caractérisation du risque

La recherche fondamentale n'a pas encore permis la compréhension totale des phénomènes liés à l'apparition des HABs de micro algues toxiques. Quelles sont les conditions environnementales qui favorisent la production des toxines ? Quelles sont les cinétiques d'accumulation et d'épuration des toxines dans le coquillage ?...

Autant d'interrogations complexes qui nécessitent des réponses si l'on souhaite un jour pouvoir définir et prévenir le risque sanitaire lié aux toxines marines.

L'insuffisance des données épidémiologiques et des données toxicologiques limite l'élaboration de valeurs toxicologiques de référence et de valeurs réglementaires « au plus près de la réalité » et de ce fait une évaluation et une gestion « optimales » de ce risque sanitaire.

Dans la littérature, on trouve essentiellement des informations concernant les effets aigus liés au risque par ingestion. Depuis peu, les scientifiques soulèvent la question du risque chronique avec des recherches mettant en évidence le potentiel génotoxique de l'acide okadaïque. Ce risque chronique potentiel n'est pas encore pris en compte par les autorités sanitaires compte tenu de l'insuffisance des données toxicologiques.

Par ailleurs, il ne s'agit pas uniquement d'un risque alimentaire, mais aussi d'un risque lié à l'inhalation et au contact cutané, même si les effets associés semblent légers. Il existe peu de connaissance dans le domaine et le manque de retour d'expérience ne permet pas d'évaluer correctement leur impact. Enfin, il s'agit de toxines qui ne sont pas détruites lors de la cuisson des aliments.

Evolution du risque

L'évolution des zones de répartition géographique de algues marines, la modification des facteurs environnementaux qui régissent la production de phycotoxines, l'impact de l'apparition de nouvelles espèces et l'évolution de nos habitudes alimentaires seront, dans les années à venir, des enjeux de recherche et de connaissance majeurs dans la gestion du risque lié aux toxines marines.

Il existe un risque non négligeable d'importation de nouvelles espèces productrices de toxines et il est impossible d'agir efficacement sur certains phénomènes comme la contamination par les eaux de ballast ou la dispersion des espèces due au réchauffement climatique.

L'apparition de nouvelles espèces induisant des pathologies inconnues en France (avec un taux de mortalité élevé ou des séquelles graves) poserait davantage de problèmes en terme de gestion du risque que des toxines qui présentent des symptômes similaires à ceux rencontrés actuellement en France (par exemple, les toxines diarrhéiques). Les espèces apparues sur nos côtes, ces dix dernières années, ne sont pas responsables de nouvelles pathologies.

Les progrès et l'accessibilité de la médecine contribuent à diminuer la gravité de ces intoxications. Il existe de plus en plus de traitements symptomatiques, qui réduisent la mortalité par intoxication, ainsi que les séquelles.

De plus, la transposition de la directive cadre sur l'eau de 2000 impose des objectifs de réduction de flux pour les nitrates qui pourraient faire diminuer l'occurrence des épisodes toxiques et les habitudes alimentaires ne semblent pas évoluer significativement.

L'augmentation des épisodes toxiques observés peut être due au système de surveillance de plus en plus performant et non à une augmentation réelle des épisodes. En effet, ces dernières années, les moyens d'observation se sont perfectionnés, et nous pouvons penser que certaines espèces (ou certains événements) qui n'étaient pas observables par le passé le sont aujourd'hui. De la même manière, lorsque l'on constate un accroissement du nombre d'intoxication, il peut être envisageable de l'attribuer à une meilleure déclaration. Les progrès de la surveillance et de la

déclaration des intoxications peuvent constituer un biais pour la caractérisation de l'évolution du phénomène.

Gestion du risque

La gestion du risque sanitaire lié à la présence de phycotoxines marines est basée sur le principe de précaution. Ce système a déjà fait ses preuves depuis la mise en place du Rephy puisque même si le nombre d'épisodes toxiques détectés augmente et que la population susceptible d'être exposée est très importante, les intoxications mortelles sont rares.

Cependant, une critique majeure est que ce système repose sur le résultat d'un seul test : le test souris, qui n'est pas spécifique. Il n'est pas évident d'interpréter un test souris positifs et le principe de précaution impose de lancer une alerte, alors que les scientifiques ne sont pas certains que les souris soient mortes à cause d'une toxine.

Le principe de précaution, fréquemment utilisé en santé publique, est régulièrement remis en question lors des fermetures de bassin par les producteurs.

Toutefois, en attendant la mise au point de méthodes chimiques de détection des phycotoxines, fiables et complémentaires du test biologique, la fermeture des bassins reste la seule solution.

Le système opérationnel de surveillance, assuré par le Rephy, est quant à lui satisfaisant. Le développer pourrait s'avérer coûteux, sans entraîner un gain suffisant en terme d'impact. Les financements dans ce domaine devraient donc se concentrer sur le développement de nouvelles méthodes d'analyse moins limitées que le seul test souris.

Enjeux extérieurs au risque sanitaire

Au-delà du risque sanitaire, des enjeux socio-économiques et écologiques sont liés aux épisodes toxiques.

La France est un pays réputé pour sa gastronomie et les produits de la conchyliculture sont le reflet d'une image de marque qui fait partie intégrante du patrimoine culturel. De plus, la conchyliculture française se situe au 2ème rang européen avec une production annuelle moyenne de 200 000 tonnes de coquillages.

Des crises comme celle du bassin d'Arcachon en 2006 peuvent avoir un impact économique très important, lié à l'arrêt des ventes pendant la durée de fermeture d'un bassin (et aux indemnisations des producteurs) ou encore à la baisse de l'activité touristique d'une région (fréquentation en baisse, voir fermeture de plages).

L'introduction ou la présence d'une espèce en quantité anormale peut également déséquilibrer l'écosystème marin.

Enfin, la perception sociale du risque évolue et l'idée d'un risque sanitaire aussi minime soit-il devient inacceptable.

Propositions d'améliorations

- Il faut d'urgence mettre au point des méthodes de détection fiables et rapides des phycotoxines (analyse chimique) qui puissent être validées par les pouvoirs publics, en remplacement ou complément du test souris.

- Il ne semble pas pertinent de développer les méthodes de détoxification. Ces procédés sont complexes et peu fiables, il est préférable de prévenir la présence de toxines dans les coquillages que de les évacuer.

- La recherche fondamentale doit être développée autour des problématiques liées à la production de phycotoxines et à leur accumulation dans les coquillages, mais également sur le risque chronique. En effet, ce risque pourrait s'avérer important en terme d'impact car certaines personnes

ont une consommation très régulière de coquillages (populations défavorisées sur le littoral, professionnels de la conchyliculture).

- Il faut sensibiliser les médecins à l'importance de déclarer une intoxication liée aux toxines marines quand elle est repérée. La population doit également être mieux informée des symptômes associés à ces intoxications et du fait qu'il faut prévenir le médecin praticien ou le médecin de santé publique en cas de suspicion.

- Au cours de nos recherches, malgré d'importantes sources de données nous avons éprouvé de la difficulté à nous approprier facilement et rapidement des informations fiables et cohérentes. Ce constat montre la difficulté d'une coopération nationale dans la cohérence des programmes de recherches des divers organismes et dans le partage de données. On retrouve évidemment cette difficulté à un niveau international.

Toutefois, une coopération rigoureuse s'avère indispensable. Elle permettrait un partage des données, via l'uniformisation des protocoles et une cohérence entre les divers programmes de recherche.

- Une communication plus efficace des professionnels de santé sur les dangers qu'engendrent les phycotoxines marines serait nécessaire.

Le fond du message pourrait être le suivant : le risque zéro n'existe pas. Il est sans doute plus pertinent de communiquer ce message objectif plutôt que d'essayer de rassurer la population en expliquant qu'il n'y a aucun risque. La population risque de croire que les pouvoirs publics tentent de minimiser le problème.

Annexe : Informations complémentaires sur les toxines présentées

Nom de la toxine	Acide Okadaïque	Pecténotoxine	Azaspiracide
Formule Brute	C ₄₄ H ₆₈ O ₁₃	C ₄₇ H ₇₀ O ₁₅	C ₄₇ H ₇₁ N ₁ O ₁₂
Poids moléculaire	804,5	874	841
Absorbance (UV)	<220 nm		
Point de fusion	164-166°C		
n°CAS	78111-17-8	97564-90-4	214899-21-5
Dose Létale 50 par voie intra péritonéale (souris)	192 µg/kg (0.192mg/kg)	230 µg/kg	Par voie 200 µg/kg
Dose Létale 50 par voie orale (souris)	750 µg/kg		250 à 500 µg/kg
Valeur guide/ seuil maximal	0,16 mg/kg		0,16 mg/kg

Nom de la toxine	Saxitoxine (*)	Brévetoxine
Formule Brute	C ₁₀ -H ₁₇ N ₇ -O ₄	C ₅₀ -H ₇₀ -O ₁₄
Poids moléculaire		
Absorbance (UV)		
Point de fusion		
n°CAS	35523-89-8	98225-48-0
Dose Létale 50 par voie intrapéritonéale (souris)		500ug/kg
Dose Létale 50 par voie orale (souris)	263ug/kg	
Dose Létale 50 par voie orale (singe)	364ug/kg	
Valeur guide/ seuil maximal	0,8 mg/kg	0,8 mg/kg

Nom de la toxine	Ostréotoxine	Acide domoïque	Spirolide
Formule Brute	C ₁₂₉ -H ₂₂₁ -N ₃ -O ₅₃	C ₁₅ H ₂₁ NO ₆	C ₄₂ H ₆₃ NO ₇ (formule de base)
Poids moléculaire	2681	311	693.5
Absorbance (UV)	233 et 263 nm	<242 nm	
Point de fusion		216 °C	
n°CAS	11077-03-5	14277-97-5	
Dose Létale 50 par voie intra péritonéale (souris)	50 ng.kg ⁻¹	120 µg/Kg	DL50 des Spirolides A, B et D = 250 µg/Kg (voie inconnue)
Dose Létale 50 par voie orale (souris)			
Valeur guide / seuil maximal		20 mg/kg	

(*) : D'autres données toxicologiques sont disponibles pour la saxitoxine.

Source : <http://toxnet.nlm.nih.gov/index.html> , visité en mars 2007

Bibliographie

- Afssa, 1999, *Enquête INCA*,
- Afssa, 6 mars 2003, *Toxines de micro-algues et cyanobactéries, Journée scientifique d'échanges sur les biotoxines*
- Afssa, *Septembre 2005. Bilan sur le plan de contrôle et de surveillance des phycotoxines et des résidus chimiques dans les mollusques bivalves vivants in BILAN DES PLANS DE SURVEILLANCE ET DE CONTROLE MIS EN OEUVRE PAR LA DGAL EN 2004*,
- Afssa, 27 Octobre 2006 Saisine n°2006-SA-0254 : AVIS de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif 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,
- Aligizaki K., Nikolaidis G., Sept 2005. The presence of potentially toxic genera *Ostreopsis* and *Coolia* in the North Aegen Sea, Greece, in *Harmful Algae* 5 (2006) 717–730
- Amzil Z., Les principales classes de phycotoxines. In Frémy J-M, Lassus P., *Toxines d'algues dans l'alimentation*, Ed. Ifremer, 2001, pp. 371-89.
- Anonyme, avril/mai 2006. Coquillage et phycotoxines, un comité innovant de coordination in *L'officiel de la conchyliculture*, n°71.
- Baylet René, Elzière Panayota, Guyonnet Jean-Paul, 2004. Pathologies attribuables à la consommation de coquillages, in *Revue Française des Laboratoires*.
- Belin C., Raffin B., 1998. Les espèces phytoplanctoniques toxiques et nuisibles sur le littoral français de 1984 à 1995, résultats du REPHY Ed. Ifremer.
- *Bilan annuel 2004 : consommation des produits de la pêche et de l'aquaculture*, office national interprofessionnel des produits de la mer et de l'aquaculture, 2004.
- Bonnat Christine, 1995. Données actuelles des ichtyosarcotismes à la Réunion. Revue de 153 observations. Thèse pour le Doctorat en Médecine, Université Paris XI, Faculté de Médecine Paris-Sud.
- Bouchriti Nourredine, 1997. Risque lié à la consommation des mollusques bivalves, dans *AgroVet Magazine* n°16
- Brescianini C., Grillo C., Melchiorre N., Bertolotto R., Ferrari A., Vivaldi B., Icardi G., Gramaccioni L., Funari E., Scardala S., 2006. *Ostreopsis ovata* algal blooms affecting human health in Genova, Italy, 2005 and 2006.
- Caillères Jean-Philippe , 6-8 Avril 1992. Traitement de l'eau par ultraviolets : Application à la purification des coquillages, in Acte de congrès « Conférence internationale sur la Purification des Coquillages, Rennes (France).
- Chateau-Degat M.L, mai 2004, *Les toxines marines : problèmes de santé en émergence, Vertigo – La revue en sciences de l'environnement sur le WEB, Vol 4 No 1, mai 2003*.
- Choumet Valérie, 1999. Immunodétection des toxines « in vivo », , in *Avancées biotechnologiques associées aux toxines*.
- Circulaire DCE 2005/12 n°14 du 28 juillet 2005 relative à la définition du bon état et à la constitution

des référentiels pour les eaux douces de surface (cours d'eau, plans d'eau).

- Cugier P., Ménesguen A, J.F. Guillaud, février 2005, *Three-dimensional (3D) ecological modelling of the Bay of Seine*
- Cultures MARINES n°196 - mai 2006
- FAO-COI-OMS, 26-30 septembre 2004, Rapport de la consultation d'experts ad hoc mixte sur les biotoxines dans les mollusques bivalves, Oslo, Norvège
- France 3 aout 2006 Une algue irritante dans les eaux marseillaises, article lien internet : <http://mediterranee.france3.fr/dossiers/23421388-fr.php>
- Frémy JM, Lassus P.(coordinateurs), 2001.Toxines d'algues dans l'alimentation, ouvrage de 560 Pages.
- Gailhard I., 2003, *Analyse de la variabilité spacio-temporelle des populations microalgales côtières observées par le REPHY*, Thèse de doctorat, Université de la Méditerranée,.
- Gohin Francis, 2006, *Utilisation de l'imagerie satellitaire pour la surveillance de la chlorophylle et du phytoplancton*, Ifremer
- Grimmelt B., Nijjar MS, Brown J., Macnair N., Wagner S, Johnson GR et Amend JF, 1990, *between domoic acid levels in the blue mussel (Mytilus edulis) and toxicity in mice*, Medline
- Hall et al. 1990, Chemistry, and Pharmacology. In *Marine Toxins: origin, structure, and molecular pharmacology*, American Chemical Society, p. 29-65,.
- Houdart M., *Impacts des conditions climatiques de l'été 2003 sur la faune et la flore marines*, Ed. Ifremer, 2004.
- Huret Martin, Gohin Francis, Delmas Daniel, Lunven Michel, Garçon Véronique, juin 2005, *Use of SeaWiFS data for light availability and parameter estimation of a phytoplankton production model of the Bay of Biscay*, IFREMER
- Ifremer, juin 2005, *Le rephy, outil de surveillance nationale*, les nouvelles de l'IFREMER n°70
- Ifremer, 1^{er} février 2006 1, Guide d'information, Phycotoxines amnésiantes (ASP)
- Ifremer, 1^{er} février 2006 2, *Guide d'information, Complexe des toxines lipophiles : diarrhéiques (DSP) et associées*
- Ifremer, 1^{er} février 2006 3, *Guide d'information, Phycotoxines paralysantes (PSP)*
- Ifremer, 2006. Procédures Rephy 2006 : description des zones à risque et des périodes à risque pour chacune des phycotoxines présentes sur le littoral français.
- Institut National de Veille Sanitaire, mise à jour le 7 novembre 2001, *Guide pour l'intervention épidémiologique Saxitoxine*
- Krys.S et Frémy.J.M, décembre 2002, *Phycotoxines et produits de la mer : risques sanitaires associés et mesures de prévention*, *Revue française des laboratoires n°348*
- Leroux Solène, 2006. Microalgues Toxiques : de la surveillance à la prévision et la gestion de crise, in Cultures Marines n°196 .
- Marcaillou-Le Baut et al., Syndrômes observés et données épidémiologiques.In Frémy J-M, Lassus P., *Toxines d'algues dans l'alimentation*, Ed. Ifremer, 2001, pp.160-80.
- Marshall Adams S., 2005. Assessing cause and effect of multiple stressors on marine systems in *Marine Pollution Bulletin* 51 649–657.

- Meilert Kai and A. Brimble Margaret, Mai 2006, *Synthesis of the bis-spiroacetal moiety of the shellfish toxins spirolides B and D using an iterative oxidative radical cyclization strategy*
- Ménesguen Alain, janvier 2001. L'eutrophisation des eaux marines et saumâtres en Europe, en particulier en France. Rapport IFREMER DEL/EC/01.02
- Nadja El Saadi, Alassane Bah, juin 2006, *On phytoplankton aggregation: a view from an IBM approach*, Department of Computing, University Cheikh Anta Diop, Dakar Senegal
- Nonomura F., Iwata Y., Nakaya K., Sugitani A., 1983. An outbreak of food poisoning due to diarrhetic shellfish poison in Gifu Prefecture. *J. Food Hyg. Soc. Jpn.*, 24(6), 573-578
- Onuma Y., Satake M., Ukena T., Roux J., Chanteau S., Rasolofonirina N., Ratsimaloto M., Naoki H., Yasumoto T., 1999. Identification of putative palytoxin as the cause of clupetoxism, in *Toxicon* 37
- Prakash et al., *Paralytic shellfish poisoning in eastern Canada*, Bull. Fish. Res. Board Can. 1971
- Puech Lilian, 6 décembre 2000, Etude de l'acide okadaïque, une phycotoxine marine : développement de techniques analytiques et évaluation du potentiel génotoxique, Thèse en toxicologie environnementale
- Puiseux-Dao S., septembre 2006. Phytoplancton et phycotoxines: un problème de santé publique, in La Lettre de l'ARET.
- Riobó P., Paz B., Franco J.M., 2006. Analysis of palyoxin-like in *Ostreopsis* cultures by liquid chromatography with precolumn derivatization and fluorescence detection, in *Analytica Chimica Acta* 566.
- Rivière Pascal, Pondaven Philippe, 31 Janvier 2006, *Phytoplankton size classes competitions at sub-mesoscale in a frontal oceanic region*, Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin, Institut Universitaire Européen de la Mer
- Saux (Le) Jean-Claude, Pommepey Monique, Janvier 2003. La purification des coquillages, (Rephy) in Risques sanitaires liés aux coquillages, Dossier S.I.A - pour le F.C.D.
- Schrijver (de) K, Maes I., Man De L., Michelet J., 2002. Une épidémie d'intoxications diarrhéiques dues aux fruits de mer à Anvers, Belgique.
- Sournia et al., *Le phytoplancton nuisible des côtes de France*, Ed. Ifremer, 1991
- Stewart J.E. and Subba Rao D.V., date inconnue. Les phycotoxines : physiologie et production
- Vieille (La) Sébastien, Krys Sophie, Aubert Pierre, Belin Catherine, 2004. Prévention des par les phycotoxines marines en France en 2004, in *Le bulletin épidémiologique n°13 de l'Afssa*
- Williams Tim, 18 septembre 2000, *Espèces non indigènes envahissantes*, Division des sciences et de la technologie
- Yasumoto T., Oshima Y., Yamaguchi M., 1978. Occurrence of a new type of selfish poisoning in the Tohoku. District. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 44(11), 1249-1255