

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES.....	1
Table des figures :.....	4
Table des tableaux.....	5
Table des abréviations et des sigles.....	6
INTRODUCTION :.....	7
<u>I. ÉVALUATION QUALITATIVE DES RISQUES LIÉS A LA CONSOMMATION DE COQUILLAGES CONTAMINÉS PAR LES PHYCOTOXINES DANS L'UNION EUROPÉENNE.....</u>	<u>9</u>
A. Identification des dangers.....	11
1. Les toxines paralysantes.....	11
1.1. Historique.....	11
1.2. Espèces productrices de toxines paralysantes.....	11
1.3. Répartition géographique.....	18
1.4. Propriétés physico-chimiques des toxines paralysantes.....	19
1.5. Biosynthèse et biotransformations.....	20
1.6. Toxinogénèse.....	21
2. Les toxines diarrhéiques et associées.....	24
2.1. L'Acide Okadaïque et autres dinophysistoxines.....	24
2.2. Les pecténotoxines.....	35
2.3. Les yessotoxines.....	39
3. Les toxines neurologiques (brevétoxines).....	42
3.1. Historique.....	42
3.2. Caractéristiques de l'espèce <i>Gymnodinium breve</i> (<i>Karenia brevis</i>) et des espèces apparentées.....	42
3.3. Répartition géographique.....	43
3.4. Conditions d'étude de ces toxines au laboratoire.....	43
3.5. Propriétés physico-chimiques des toxines.....	44
3.6. Biosynthèse et biotransformations.....	45
3.7. Facteurs influençant la toxinogénèse.....	45
4. Les toxines amnésiantes (acide domoïque et dérivés).....	47
4.1. Historique.....	47
4.2. Répartition/biologie/écologie.....	47
4.3. Espèces productrices de toxines amnésiantes.....	47
4.4. Propriétés physico-chimiques.....	51
4.5. Biosynthèse.....	52
4.6. Facteurs influençant la toxinogénèse.....	53
5. Les Azaspiracides 56	
5.1. Découverte.....	56
5.2. Répartition.....	56
5.3. Espèces productrices d'AZ.....	56
5.4. Propriétés physico-chimiques des AZ.....	57

5.5. Contamination des vecteurs coquillages.....	58
6. Les toxines de découverte récente.....	59
6.1. Les toxines à cycle imine (autres que les azaspiracides).....	59
6.2. Autres phycotoxines, sources potentielles de nouveaux agents neurotoxiques.....	62
B. Caractérisation des dangers.....	65
1. Les toxines paralysantes.....	65
1.1. Toxicité/mécanisme d'action.....	65
1.2. Symptômes provoqués chez le consommateur.....	66
2. Les toxines diarrhéiques et associées.....	68
2.1. L'Acide Okadaïque et autres dinophysistoxines.....	68
2.2. Les pecténotoxines.....	74
2.3. Les yessotoxines.....	75
3. Les toxines neurologiques (brévétotoxines).....	76
3.1. Mécanisme d'action.....	76
3.2. Symptômes provoqués chez le consommateur.....	77
4. Les toxines amnésiantes (acide domoïque et dérivés).....	78
4.1. Mécanisme d'action.....	78
4.2. Symptômes provoqués chez le consommateur.....	78
5. Les Azaspiracides 80	
5.1. Toxicité	80
5.2. Symptômes provoqués chez le consommateur	80
C. Evaluation de l'exposition.....	81
1. Appréciation de l'émission.....	83
1.1. La probabilité d'émission est fonction de la prévalence et de l'intensité de la contamination	83
1.2. La probabilité d'émission est fonction de l'évolution de la contamination (transformation, préparation).....	84
1.3. Probabilité d'émission du danger.....	85
2. Evaluation de l'exposition.....	86
2.1. Nombre de produits consommés (fréquence de consommation), et de la quantité ingérée par repas.....	86
2.2. Sensibilité individuelle des consommateurs.....	86
2.3. Dose infectante.....	86
2.4. Probabilité d'exposition au danger.....	89
D. Caractérisation des risques.....	91
1. Probabilité de survenue du danger.....	91
2. Les conséquences 93	
2.1. Les conséquences sur la santé humaine.....	93
2.2. Les conséquences économiques.....	93
2.3. Appréciation globale des conséquences.....	94
3. Estimation du risque.....	95
II. GESTION DES RISQUES LIÉS À LA CONSOMMATION DE PRODUITS DE LA MER CONTAMINÉS PAR LES PHYCOTOXINES.....	97
A. Les mesures de prévention.....	97
B. La surveillance et la réglementation.....	98

1. Présentation de la Réglementation jusqu'au 31 décembre 2005.....	98
1.1. Réglementations européenne et française.....	98
1.2. Réglementation mondiale.....	100
2. Synthèse : Les phycotoxines réglementées au sein de l'Union Européenne	100
3. Les méthodes officielles d'analyse utilisées pour la recherche dans les coquillages.....	101
3.1. Méthodes biologiques.....	102
3.2. Méthodes de détection alternatives.....	102
4. Les plans nationaux de surveillance et de contrôle des phycotoxines marines dans les coquillages denrées de production nationale	103
4.1. Les plans de surveillance et de contrôle.....	103
4.2. Les laboratoires d'analyse et de référence.....	103
5. Surveillance des eaux du littoral.....	104
5.1. Présentation du Réphy.....	104
5.2. Fonctionnement opérationnel du Réphy.....	105
5.3. Paramètres mesurés et méthodes.....	107
6. Les coquillages-denrées d'importation.....	109
CONCLUSION.....	111
BIBLIOGRAPHIE.....	113
ANNEXE :	1
CLASSIFICATION DES DIFFÉRENTES ESPÈCES DE PLANCTON PRODUCTRICES DE PHYCOTOXINES.....	1

Table des figures :

Figure 1: <i>Alexandrium minutum</i> au MEB	14
Figure 2 : <i>Alexandrium tamarense</i> au MEB	15
Figure 3: <i>Gymnodinium catenatum</i> au microscope optique	16
Figure 4 : <i>Pyrodinium bahamense var. compressum</i> au MEB	17
Figure 5 : Structure des toxines paralysantes	20
Figure 6 : <i>Dinophysis acuminata</i> au MEB.	25
Figure 7 : <i>Prorocentrum lima</i> au MEB	26
Figure 8 : Structure de l'acide okadaïque et de ses dérivés	31
Figure 9 : <i>Dinophysis acuta</i> au MEB	36
Figure 10 : Structure des pecténotoxines	37
Figure 11 : Structure des acides séco-pecténotoxines-2	38
Figure 12 : <i>Lingulodinium polyedrum</i> au MEB	40
Figure 13 : <i>Protoceratium reticulatum</i> au MEB	40
Figure 14 : Structure de la yessotoxine et de ses dérivés (A) et de l'adriatoxine (B)	41
Figure 15 : <i>Gymnodinium breve</i> au MEB	43
Figure 16 : Structure des brevéttoxines	44
Figure 17 : <i>Pseudo-nitzschia pungens</i> au MEB	50
Figure 18 : Structure de l'acide domoïque et de ses dérivés	52
Figure 19 : <i>Protoperdinium crassipes</i> au MEB	57
Figure 20 : Structure des azaspiracides	58
Figure 21 : Structures des spirolides actifs (A) et inactifs (B)	60
Figure 22 : Structure de la gymnodimine	61
Figure 23 : Schéma événementiel qui conduit à l'intoxication des consommateurs	82
Figure 24 : Fermeture temporaire en raison de la présence de phycotoxines	106

Table des tableaux

Tableau 1 : Méthode permettant d'estimer la probabilité de survenue du danger	91
Tableau 2 : Méthode permettant d'estimer les conséquences inhérentes au danger	94
Tableau 3 : Méthode permettant d'estimer le risque final	95

Table des abréviations et des sigles

AD : Acide Domoïque
ADN : Acide Désoxyribo Nucléique
AESA : Autorité Européenne de Sécurité des Aliments
Afssa : Agence française de sécurité sanitaire des aliments
AMPA : alfa-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionate
AO : Acide Okadaïque
ASP : *Amnesic Shellfish Poisoning*
AZ : Azaspiracides
AZP : *Azaspiracid Poisoning*
CLHP : Chromatographie Liquide Haute Pression
DGAI : Direction Générale de l'Alimentation
DPMA : Direction des Pêches Maritimes et de l'Aquaculture
DSP : *Diarrheic Shellfish Poisoning*
DTXs : Dinophysistoxines
GPP : Géranyl Pyrophosphate
IAFM : Intoxication Amnésique par les Fruits de Mer
IDFM : Intoxication Diarrhéique par Fruits de Mer
Ifremer : Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer
INFM : Intoxication Neurologique par Fruits de Mer
IPFM : Intoxication Paralysante par les Fruits de Mer
JORF : Journal officiel de la République Française
MAAPR : Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation, de la Pêche et de la Ruralité
MEB : Microscope Electronique à Balayage
MPF : *Maturation Promoting Factor*
NMDA : N-méthyl-D-aspartate
NSP : *Neurologic Shellfish Poisoning*
PSP : *Paralytic Shellfish Poisoning*
PM : Poids Moléculaire
PPS : Protéines Phosphatases
PTXs : Pécetenotoxines
Réphy : Réseau de surveillance des phycotoxines
STX : Saxitoxine
TIAC : Toxi Infection Alimentaire Collective
UE: Union Européenne
VEGF : *vascular endothelial growth factor*
YTXs : Yessotoxines

INTRODUCTION :

Les phycotoxines sont des toxines produites par certaines espèces phytoplanctoniques. Le plancton (du grec *planctos* = errant) est l'ensemble des organismes vivants qui flottent dans les eaux, sans pouvoir s'opposer à leurs déplacements. Cette biomasse est constituée de gamètes, larves, animaux inaptes à lutter contre le courant (petits crustacés planctoniques et méduses), végétaux et algues microscopiques. Le plancton est opposé au necton (qui nage). Il est principalement pélagique (pélages = loin des côtes) mais certains sont benthiques, c'est-à-dire qu'ils vivent sur les fonds marins.

Au sein du plancton, on distingue le plancton végétal, ou phytoplancton, du plancton animal, ou zooplancton. Nous nous intéresserons exclusivement à la première catégorie, puisque seules certaines espèces de phytoplancton produisent des phycotoxines. Le phytoplancton est facilement différenciable du zooplancton car il présente des formes très simples (pas de pattes, pas d'antennes) et souvent géométriques (carré parfait, rond, ovale). Il existe environ 4000 espèces phytoplanctoniques au niveau mondial : certaines d'entre elles (environ 250) peuvent proliférer de façon importante en formant des eaux rouges, brunes ou vertes, et donc nuire potentiellement à l'équilibre des milieux, d'autres espèces (environ 70) sont directement toxiques, mais la plupart d'entre elles sont totalement inoffensives. Il n'est présent que dans les couches superficielles de la mer (entre 0 et 15 mètres de profondeur) où il accomplit sa photosynthèse, c'est-à-dire qu'il absorbe des sels minéraux et du carbone (sous forme de CO_2) pour rejeter de l'oxygène sous l'effet de la lumière. C'est le premier maillon de la chaîne alimentaire dans l'écosystème marin.

Les phycotoxines produites peuvent être filtrées et s'accumuler dans des coquillages, à savoir des mollusques (métazoaires triblastiques à symétrie bilatérale) qui possèdent une coquille, comme par exemple les moules, les huîtres, les palourdes, etc. Ces coquillages contaminés peuvent représenter un danger pour l'Homme s'ils sont consommés. En fonction des toxines, les symptômes associés sont essentiellement d'ordre digestif ou neurologique.

Certains aspects relatifs aux phycotoxines ne seront pas abordés dans cette thèse. Par exemple, certaines toxines (ciguatoxines) sont dangereuses pour le consommateur mais ce type de toxine n'est pas retrouvé sur les côtes européennes (récifs coralliens). Nous avons choisi de nous focaliser sur les denrées coquillages, dans un souci de cohérence. De plus, les phycotoxines peuvent représenter un danger pour la faune marine (poissons, coquillages) mais nous avons choisi de ne traiter que les dangers menaçant le consommateur.

L'importance de ce sujet est double. D'une part, les conséquences sur la santé humaine peuvent être très graves. En effet, les symptômes peuvent conduire à la mort, ou entraîner des séquelles graves chez les personnes intoxiquées. D'autre part, la gestion des malades peut représenter un coût non négligeable pour la société. Enfin, ces efflorescences, lorsqu'elles atteignent quelques millions de cellules, occasionnent régulièrement des interdictions préfectorales de commercialisation des mollusques filtreurs pouvant entraîner des pertes financières non négligeables pour les professionnels de la conchyliculture.

Pour traiter ce sujet, nous avons choisi de suivre la méthode de l'analyse des risques qui comporte trois volets: évaluation des risques, gestion des risques et communication sur les risques. Nous avons bien distingué la notion de danger, qui est un agent biologique, chimique ou physique pouvant avoir un effet adverse sur la santé, de la notion de risque, qui est fonction de la probabilité d'un effet adverse pour la santé et de sa gravité, du fait de la présence de danger et de l'exposition à un ou plusieurs dangers.

La communication sur les risques consiste en un échange interactif d'informations et d'opinions sur les risques et la gestion des risques entre les responsables de leur évaluation et de leur gestion, les consommateurs et les autres parties intéressées. Nous n'aborderons pas cet aspect de l'analyse des risques. Par contre, nous séparerons nettement l'aspect évaluation du risque et l'aspect gestion du risque, le premier étant effectué par des experts scientifiques, le second par les pouvoirs publics.

La première partie de la thèse sera consacrée à l'évaluation des risques liés à la consommation de coquillages contaminés par les phycotoxines. L'évaluation des risques est un processus à base scientifique comprenant les étapes suivantes: identification des dangers, caractérisation des dangers, évaluation de l'exposition et caractérisation des risques. L'évaluation menée sera de nature qualitative, et non quantitative.

Dans la seconde partie, nous exposerons la gestion des risques liés à la consommation de coquillages contaminés par les phycotoxines. Il s'agit d'un processus consistant à mettre en balance les différentes politiques possibles compte tenu des résultats de l'évaluation des risques et, au besoin, à choisir et mettre en œuvre des mesures de contrôle appropriées, y compris des mesures réglementaires. Le gestionnaire de risque va en effet comparer le risque évalué par les scientifiques au risque acceptable par notre société. S'il est supérieur, il va prendre des mesures afin de le ramener vers le risque acceptable.

I.ÉVALUATION QUALITATIVE DES RISQUES LIÉS A LA CONSOMMATION DE COQUILLAGES CONTAMINÉS PAR LES PHYCOTOXINES DANS L'UNION EUROPÉENNE

Au sein de la Communauté Européenne, l'évaluation des risques est confiée depuis peu à une agence : l'AESA (Autorité Européenne de Sécurité des Aliments) créée par la « food law », c'est-à-dire le règlement 178/2002. D'après ce règlement, « l'autorité fournit des avis scientifiques et une assistance scientifique et technique à la politique et à la législation de la Communauté dans tous les domaines ayant un impact direct ou indirect sur la sécurité des denrées alimentaires et des aliments pour animaux ». De plus, « elle agit en étroite coopération avec les instances compétentes des États Membres qui accomplissent des missions analogues à celles de l'Autorité ».

En effet, certains États Membres se sont dotés d'une agence chargée de l'évaluation des risques. En France, c'est le cas de l'Afssa (Agence française de sécurité sanitaire des aliments) qui a été créée le 1^{er} avril 1999. Elle résulte de la loi du 1^{er} juillet 1998 relative à la veille sanitaire et à la surveillance des produits destinés à l'Homme.

Avant de débiter cette étape d'évaluation des risques, il est intéressant de faire la différence entre le risque avéré et le risque potentiel.

Le risque avéré correspond à un événement qui s'est déjà produit. Ainsi, il est possible d'estimer une probabilité de survenue. Dans notre étude, les risques avérés concernent les intoxications aiguës chez l'Homme suite à la consommation de coquillages contaminés par les phycotoxines suivantes : les toxines diarrhéiques, les toxines paralysantes, les toxines neurologiques, les toxines amnésiantes et le azaspiracides.

Le risque potentiel correspond à un événement hypothétique, mais qui est crédible scientifiquement. Les connaissances concernant ce risque doivent être complétées. Dans notre étude, c'est le cas de l'intoxication chronique liée à l'ingestion de coquillages contaminés par les toxines diarrhéiques (consommation régulière de petites quantités de toxines), ainsi que les intoxications aiguës qui seraient liées à l'ingestion par l'Homme de phycotoxines dont la découverte est récente et dont les effets ne sont pas connus.

Le risque potentiel, contrairement au risque avéré, peut être nul. La démarche de l'analyse des risques ne peut être appliquée à des risques hypothétiques. En effet, on ne peut estimer ni l'émission de ce danger mal connu, ni l'exposition à ce danger, et encore moins les conséquences. Le gestionnaire du risque, par volonté de prévenir, peut appliquer le principe de précaution. Le principe de précaution a été au départ prévu pour les risques potentiels liés à l'environnement. Il a été énoncé ainsi en 1992 dans la loi Barnier : « L'absence de certitude, compte tenu des connaissances scientifiques et techniques du moment, ne doit pas retarder l'adoption de mesures effectives et proportionnées visant à prévenir un risque de dommages graves et irréversibles à l'environnement à un coût économiquement acceptable ».

Cette étape d'évaluation se doit d'être faite en groupe. En effet, on a besoin de réunir des personnes détenant des compétences verticales (les spécialistes de telle ou telle phycotoxine) et des personnes détenant des compétences horizontales (spécialistes en toxicologie, en épidémiologie, en hygiène alimentaire, etc.).

L'évaluation des risques qui est présentée ici ne remplit bien sûr pas cette condition indispensable. Il s'agit en fait d'une évaluation des risques très globale, qui a plutôt une vocation explicative.

L'évaluation qualitative des risques va porter sur les phycotoxines suivantes :

- les toxines paralysantes ;
- les toxines diarrhéiques ;
- les toxines neurologiques ;
- les toxines amnésiantes ;
- les azaspiracides ;
- les toxines de découverte récente.

Les noms donnés à ces toxines correspondent aux symptômes majoritaires qu'elles provoquent chez l'Homme.

A. Identification des dangers

L'identification des dangers correspond à « l'identification des agents biologiques, chimiques et physiques susceptibles de provoquer des effets adverses pour la santé et qui peuvent être présents dans un aliment donné ou un groupe d'aliments » (Codex Alimentarius, 1999).

Les données concernant cette étape d'identification des dangers peuvent avoir trois origines :

- les données épidémiologiques issues d'études d'épidémiologie descriptive ;
- les données issues des actions entreprises pour lutter (réseaux de surveillance, systèmes d'alerte) ;
- les données issues de la veille scientifique (experts, publications, etc.).

1. Les toxines paralysantes

L'intoxication appelée IPFM (Intoxication Paralysante par les Fruits de Mer) ou PSP (*Paralytic Shellfish Poisoning*) est celle qui a été la plus étudiée. D'une part, il s'agit de la plus ancienne des intoxications ayant pour origine des toxines d'algues. Elle a en effet été décrite pour la première fois dans les années 60. D'autre part, les conséquences de cette intoxication peuvent être particulièrement sérieuses chez le consommateur. Les symptômes sont de nature neurologique, et dans les cas les plus graves on observe une paralysie respiratoire pouvant conduire à la mort. Plusieurs décès ont été répertoriés (Krys et Frémy, 2002).

L'IPFM est une intoxication qui se déclenche chez l'Homme suite à la consommation de divers coquillages contaminés (moules, palourdes, coques, huîtres, coquilles Saint-Jacques, etc.), mais d'autres invertébrés marins peuvent être vecteurs, comme les crabes. Une vingtaine de molécules chimiquement proches forment la famille des toxines paralysantes. La molécule de base est la saxitoxine (STX).

Les dinoflagellés responsables de la production des toxines paralysantes appartiennent aux genres *Alexandrium*, *Gymnodinium* et *Pyrodinium*.

1.1. Historique

En 1793, l'équipage d'un bateau situé à Vancouver au Canada a été intoxiqué suite à la consommation de coquillages contaminés. D'après les symptômes décrits dans le rapport datant de 1798, cette intoxication correspondrait à une IPFM.

C'est avec Halstead, en 1965, que cette intoxication est pour la première fois précisément décrite. Il a recensé, entre 1689 et 1962, 957 cas d'empoisonnement dans le monde, dont 200 cas mortels.

1.2. Espèces productrices de toxines paralysantes

Les principaux agents étiologiques de l'IPFM sont des algues appartenant toutes à la classe des Dinoflagellés.

1.2.1. Présentation de la classe des Dinoflagellés (=Dinophycées)

Les dinoflagellés appartiennent au phytoplancton, ou plancton végétal. Au sein de cette classe, la majorité des espèces n'est pas toxique (il existe plus de 2000 espèces de Dinophycées). Pourtant, les toxines paralysantes, diarrhéiques et neurologiques sont toutes produites par des dinoflagellés (voir annexe : les espèces toxiques de phytoplancton).

1.2.1.1. L'appareil locomoteur

Ces microalgues sont caractérisées par le fait qu'elles possèdent deux flagelles dissemblables insérés dans deux sillons perpendiculaires de la cellule. Ces flagelles leur permettent d'être mobiles. Plus précisément, le flagelle appelé cingulum permet la propulsion de la cellule. Il est situé dans le sillon transversal. Par contre, le sulcus, qui est le flagelle situé dans le sillon longitudinal, permet à la cellule de se diriger. Notons que les Dinoflagellés dits « proro-centroïdes » possèdent une insertion particulière de leurs flagelles. Ceux-ci sont en effet tous les deux insérés sur la partie apicale de la cellule.

1.2.1.2. Support génétique

Au microscope photonique, il est assez facile de distinguer les Dinoflagellés des autres eucaryotes. En effet, on peut observer un noyau de grande taille dont les chromosomes, très nombreux et sans histones associées à l'ADN (Acide Désoxyribo Nucléique), restent condensés pendant l'interphase.

Le déroulement de la mitose est particulier. Contrairement à de nombreux eucaryotes, pendant cette phase du cycle, l'enveloppe nucléaire persiste.

1.2.1.3. L'enveloppe

Les dinoflagellés possèdent une enveloppe pluristratée appelée thèque. La thèque, qui assure la protection de la cellule, est un élément intéressant car elle donne sa forme caractéristique à la cellule, et servira donc pour la reconnaissance des espèces. Elle est constituée d'un empilement de membranes et de vésicules internes apposées.

Deux grandes catégories sont d'ailleurs distinguées :

- la catégorie des dinoflagellés nus chez lesquels la thèque est fine et peu ornementée, comme par exemple *Gymnodinium* ;
- la catégorie des dinoflagellés cuirassés chez lesquels la thèque est épaisse, renforcée par des plaques internes de cellulose (ou autre polysaccharide), comme par exemple *Alexandrium*.

La partie antérieure de la cellule située au-dessus du cingulum est appelée l'épithèque. À l'opposé se trouve l'hypothèque, où s'insère le sulcus. La thèque est particulièrement utilisée pour reconnaître les différents genres et espèces de Dinoflagellés cuirassés. La nomenclature - dite kofoidienne - est fondée sur le nombre, la forme et l'agencement des plaques constituant la tabulation. La reconnaissance peut s'effectuer au simple microscope photonique (Steidinger et Taugen, 1996). Cependant, pour la détermination d'espèces délicates (par exemple Gymnodiniales) ou difficiles (par exemple *Prorocentrum*), le MEB est de plus en plus utilisé.

1.2.1.4. Biologie

Si tous les dinoflagellés toxiques sont photosynthétiques, certaines espèces sont mixotrophes, c'est-à-dire qu'elles utilisent à la fois de l'énergie d'origine métabolique et de l'énergie d'origine photosynthétique.

Les espèces toxiques se retrouvent majoritairement au niveau des côtes. Elles sont pratiquement toutes capables de provoquer des efflorescences (également appelées blooms), voire des eaux colorées. On parle d'efflorescence ou de blooms lorsqu'il existe un dépôt poudreux à la surface de l'eau.

Les microalgues existent sous deux formes : les formes mobiles et les kystes.

1.2.1.5. Reconnaissance

Les espèces qui produisent des toxines paralysantes, diarrhéiques et neurologiques sont identiques à leurs congénères non toxiques des points de vue morphologique, cytologique et physiologique en général. La reconnaissance de ces organismes est donc délicate, mais fondamentale.

De multiples critères peuvent être utilisés pour reconnaître les différentes espèces de microalgues phytoplanctoniques : des critères morphologiques, des critères biologiques, des critères chimiotaxonomiques (liés aux catégories de toxines produites). Les méthodes de reconnaissance des différentes espèces seront détaillées dans la partie sur la surveillance des eaux du littoral dans la troisième section.

1.2.2. Présentations des espèces productrices de toxines paralysantes

Les principales espèces toxiques sont regroupées au sein de trois genres dans la classe des Dinoflagellés:

- pour le genre *Alexandrium* : *Alexandrium minutum* (= *A. lusitanicum*, Zardoya *et al.*, 1995), *Alexandrium ostenfeldii*, *Alexandrium tamarense* (qui produit aussi la tétrodotoxine), *Alexandrium andersonii* (récemment reconnu comme toxique dans l'Adriatique, Ciminiello *et al.*, 2000), *Alexandrium catenella*, *A. acatenella* et *A. fundyense*. Mais toutes les espèces appartenant au sous genre *Alexandrium*) sont considérées comme potentiellement toxiques pour l'Homme ;
- pour le genre *Gymnodinium* : *Gymnodinium catenatum* ;
- pour le genre *Pyrodinium* : *Pyrodinium bahamense var. compressum*.

Les toxines paralysantes ont été également identifiées dans certaines bactéries et cyanobactéries (Lagos *et al.*, 1999). Mais l'origine bactérienne des toxines n'a jamais été démontrée.

1.2.2.1. *Alexandrium* spp.

Alexandrium appartient à l'Ordre des Gonyaulacales. Ce sont des dinoflagellés cuirassés. Ils possèdent en effet une thèque apparente caractérisée par son type de tabulation.

Alexandrium appartient à la Famille des Goniodomacées.

Ce genre comprend environ 30 espèces, réparties dans le monde entier (Balech, 1995). Il représente un grand intérêt historique, et de nombreuses études lui ont été consacrées. Il

n'est donc pas étonnant qu'il existe de nombreux synonymes, comme par exemple *Protogonyaulax* pour ce genre (Steidinger et Tangen, 1996).

Alexandrium, est en fait divisé en deux sous-genres, *Alexandrium* et *Gessnerium*. En effet, c'est en analysant des détails très précis de leur tabulation que l'on peut les différencier. Il semblerait que *Gessnerium* ne renfermerait que des espèces ichtyotoxiques, comme par exemple *A. monilatum* et *A. pseudogonyaulax*. C'est dans le sous-genre *Alexandrium* que sont classées toutes les espèces productrices de toxines paralysantes dangereuses pour l'Homme. Dans ce contexte, l'ensemble des espèces du sous-genre *Alexandrium* est considéré comme potentiellement toxique.

En plus des principales espèces d'*Alexandrium* toxiques, on peut ajouter à la liste des espèces moins souvent citées comme *A. angustitabulatum* *A. tamiyavanichi*, espèce tropicale précédemment confondue avec *A. cohorticulata*.

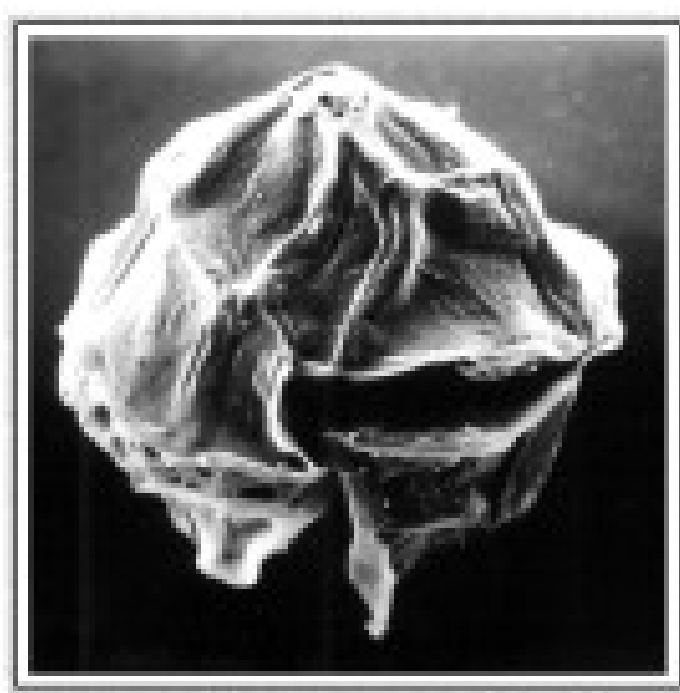
D'autres espèces comme *A. cohorticula* et *A. fraterculus* sont considérées comme douteuses. Dans le complexe « *tamarensis* » (*A. tamarense/catenella/fundyense* ; Medlin *et al.*, 1998), le problème a souvent été souligné de l'existence de clones toxiques ou non chez certaines de ces espèces qui serait différente selon les zones géographiques.

Parmi les producteurs de toxines paralysantes, *A. ostenfeldii* est également un agent responsable de la synthèse de spirolides (Cembella *et al.*, 2000) (voir le chapitre sur les nouvelles toxines).

Alexandrium est un genre essentiellement côtier, producteur de kystes benthiques.

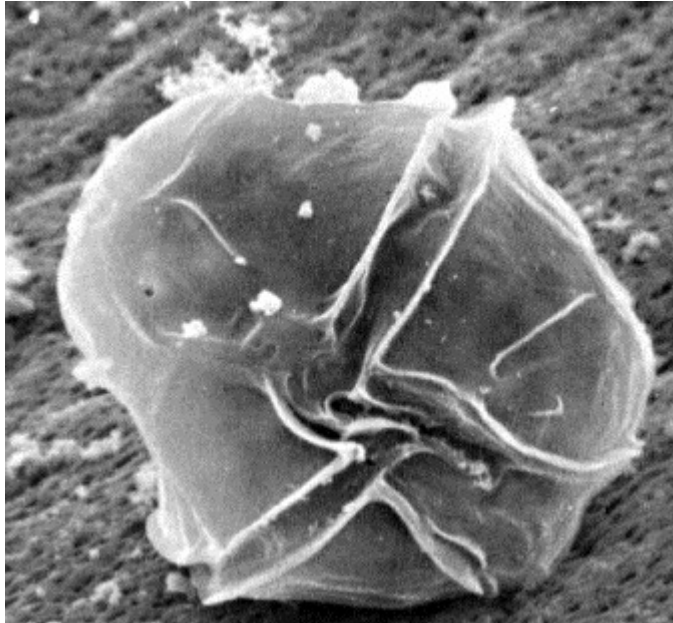
Les figures 1 et 2 présentent les photos de deux espèces d'*Alexandrium* reconnues comme étant toxiques.

Figure 1: *Alexandrium minutum* au MEB_ (source : site de l'Ifremer)



Echelle : 1 cm représente 3 µm.

Figure 2 : *Alexandrium tamarense* au MEB
(source : Site du bioberedskab, photo de L. Fritz)



Echelle : 1 cm représente 3 µm.

En France, plusieurs espèces d'*Alexandrium* sont présentes. Deux espèces reviennent de façon récurrente : *A. minutum* depuis 1988 et *A. tamarense* responsable (avec *A. catenella* ?) en 1998 de la contamination de l'étang de Thau.

1.2.2.2. Gymnodinium catenatum

Tout comme *Gymnodinium breve* qui synthétise des toxines neurologiques, l'espèce *Gymnodinium catenatum* appartient à :

- la Classe des Dinoflagellés,
- l'Ordre des Gymnodiniales qui regroupe des dinoflagellés nus à thèque sans tabulation mais à sillons bien marqués,
- la Famille des Gymnodiniacées.

Gymnodinium catenatum a récemment été renommée *Karenia selliformis*. Au sein de l'Ordre des Gymnodiniales, toutes les espèces productrices de phycotoxines susceptibles de s'accumuler dans les coquillages appartiennent à la Famille des Gymnodiniacées et au genre *Gymnodinium*. Ce genre comprend plus de 200 espèces, mais il devra certainement être subdivisé en plusieurs genres ou sections différents (Litaker *et al.*, 1999). La comparaison des deux principales espèces toxiques pour l'Homme (*G. catenatum* et *G. breve*, productrice de toxines neurologiques), souligne l'hétérogénéité du genre.

G. catenatum forme des chaînettes d'individus (4 à 64), et ne passe donc pas inaperçu. Ses cellules sont oviformes (et noyau central) à hypothèque plus allongée que l'épithèque.

Concernant sa reconnaissance, la plus grande difficulté correspond à sa ressemblance avec *Gyrodinium impudicum* qui est une espèce inoffensive, également coloniale, mais appartenant à un genre différent (Billard *et al.*, 2001). Pour différencier les deux genres voisins, *Gymnodinium* et *Gyrodinium*, il est utilisé comme critère le déplacement plus ou moins important du cingulum. D'après Steidinger, 1993, selon des études de séquençage moléculaire, il conviendrait de regrouper ces deux genres en un seul à l'avenir.

Au sein du genre *Gymnodinium*, les différences entre *G. catenatum* (figure 3) et *G. mikimotoi* et *G. breve* sont les suivantes :

- les caroténoïdes synthétisés sont différents ;
- *G. catenatum* est dépourvu du sillon linéaire apical caractérisant les espèces des complexes *G. mikimotoi* et *G. breve* ;
- *G. catenatum* ne synthétise pas de toxines polyéther comme *G. breve*, mais des composés azotés (cf : propriétés physico-chimiques) ;
- *G. catenatum* possède des kystes bruns sphériques à surface microréticulée très caractéristiques.

Deux autres espèces non toxiques de *Gymnodinium* solitaires, *G. nolleri* et *G. microreticulatum* possèdent le même type de kystes (Bolch *et al.*, 1999). Les trois espèces, *G. catenatum*, *G. nolleri* et *G. microreticulatum*, forment donc un autre complexe au sein du genre *Gymnodinium*. Au sein de ce complexe, *G. catenatum* est le seul producteur de toxines paralysantes. Une souche non toxique de *G. catenatum* a été signalée pour le moment (Oshima *et al.*, 1993).

Figure 3: *Gymnodinium catenatum* au microscope optique
(source: Site du OEAS, photo du Dr. Martina Doblin)



Echelle : 1 cm représente 1 μ m.

1.2.2.3. Pyrodinium bahamense var. compressum

Comme *Alexandrium*, *Pyrodinium* appartient à :

- La Classe des Dinophycées
- L'Ordre des Gonyaulacales
- La Famille des Goniodomacées

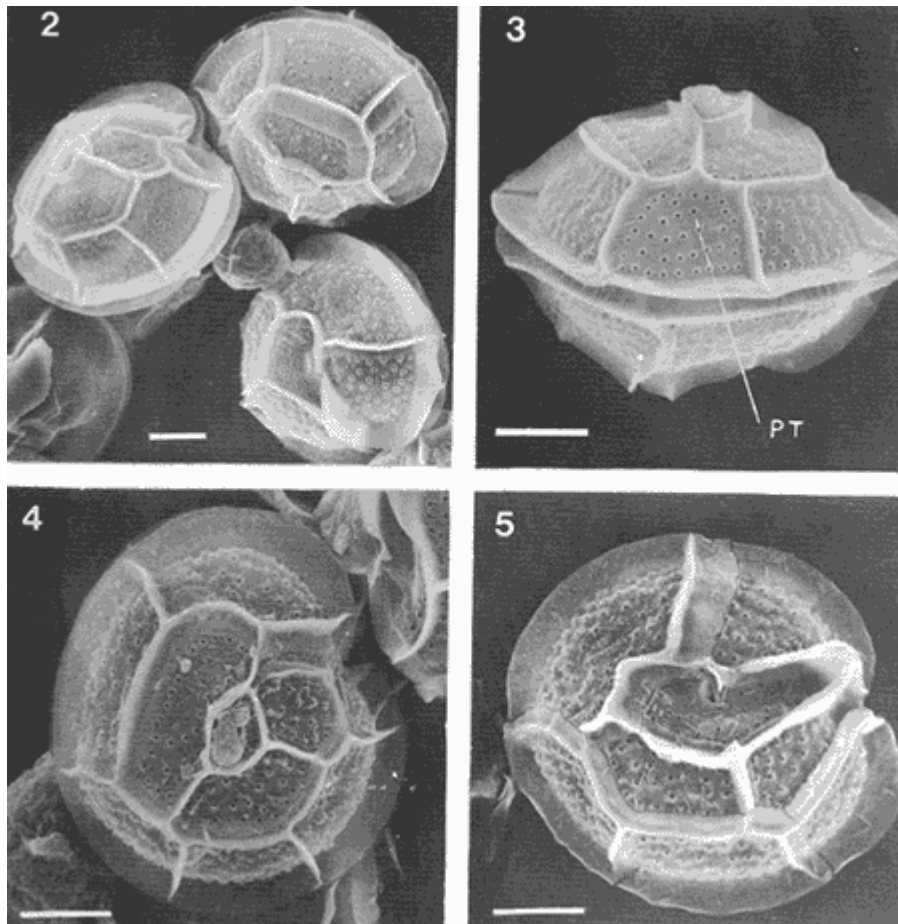
Alexandrium et *Pyrodinium* sont d'ailleurs les seuls Dinoflagellés cuirassés à produire des toxines paralysantes.

Pyrodinium est proche d'*Alexandrium* sous genre *Gessnerium*. La différence est faite grâce à la thèque : celle-ci est plus épaisse, garnie d'épines et d'extensions membraneuses au niveau des sillons et des sutures des plaques dans le genre *Pyrodinium*.

Deux variétés de *P. bahamense* ont été décrites : L'une, *P. bahamense* var. *bahamense* est présente dans l'Atlantique tropical (non bioluminescente), et l'autre, *P. bahamense* var. *compressum* dans les eaux tropicales du Pacifique, Nouvelle-Calédonie par exemple (bioluminescente). Seule la deuxième produit des toxines paralysantes de type IPFM (Streidinger, 1993). La figure 4 présente une photo de cette espèce.

Cette espèce très toxique semble actuellement en pleine extension (Hallegraeff, 1993). Elle peut former des kystes.

Figure 4 : *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* au MEB
(source : Site de l'UNAM)



Echelle : le trait blanc représente 10 μ m.

1.3. Répartition géographique

L'inventaire qui suit n'est pas exhaustif, mais les nombreux exemples présentés démontrent le caractère mondial de l'IPFM.

1.3.1. Côte nord-est du continent américain

La côte est du Canada - baie de Fundy et estuaire du Saint-Laurent en particulier - a connu de nombreuses intoxications depuis le début du 19^{ème} siècle, de nombreux rapports en attestent. Ces rapports sont à la base des connaissances épidémiologiques que nous possédons à ce jour. Prakash *et al.* (1971) estiment à 1600 le nombre de cas d'IPFM jusqu'en 1970.

De plus, on sait maintenant que la population indigène s'interdisait de consommer des coquillages à certaines périodes de l'année. Elle connaissait donc le risque.

Aujourd'hui encore, et ce malgré les mesures de surveillance mises en place depuis 1943, des accidents surviennent. Par exemple, en 2000, dans l'état de Washington, neuf personnes ont été intoxiquées suite à l'ingestion de moules.

1.3.2. Europe

Il existe moins de documents historiques concernant l'Europe. D'après Halstead (1965), le premier événement a eu lieu en 1689, en France. Il s'agissait d'une intoxication par des moules, et les symptômes faisaient penser à une IPFM.

Depuis, tous les pays européens - hormis la Belgique et les Pays-Bas - ont connu des cas d'IPFM. Les coquillages contaminés étaient souvent des moules récoltées localement ou importées. C'est au Royaume-Uni que le plus de cas ont été déclarés : on recense 150 à 200 cas d'intoxications entre 1814 et 1992, dont 21 décès.

1.3.3. Asie du Sud

Les informations concernant cette région sont beaucoup plus récentes. Elles datent de la mise en place du test de toxicité aiguë sur souris utilisé pour le contrôle de la toxicité des coquillages afin de protéger les consommateurs. La présence de toxines paralysantes a depuis cette époque été mise en évidence dans de nombreuses régions du monde.

En 1948, au Japon, une centaine de personnes a été intoxiquée suite à la consommation de coquilles Saint-Jacques contaminées par *A. tamarense*. Trois personnes sont décédées (Anraku, 1984).

Parmi les autres pays concernés, nous pouvons citer la Thaïlande, l'Indonésie, la Nouvelle-Guinée, les Philippines, etc.

1.3.4. Amérique du Sud

La plupart des pays côtiers sont concernés, comme par exemple le Chili, l'Argentine, le Guatemala, le Mexique (Orellana-Cepeda *et al.*, 1998). Les concentrations en toxines paralysantes dans les coquillages sont particulièrement élevées, jusqu'à 100 fois plus qu'en Europe. Aucune intoxication humaine n'a été officiellement recensée.

1.3.5. Océanie

Les espèces de Dinoflagellés producteurs de toxines paralysantes sont régulièrement détectées en Australie et en Nouvelle-Zélande. Pourtant, aucune intoxication humaine n'est rapportée. Les contrôles mis en place semblent être efficaces.

1.3.6. Afrique

Les seules données disponibles proviennent des pays du Maghreb et de l'Afrique du Sud qui ont mis en place des réseaux de surveillance. Par exemple, le Maroc a connu plusieurs épisodes toxiques en 1994 et en 1995. Plusieurs consommateurs sont décédés (Taleb *et al.*, 1998).

1.4. Propriétés physico-chimiques des toxines paralysantes

1.4.1. Structure

La saxitoxine (STX) a reçu son nom de sa capacité à être extraite du mollusque bivalve (clame) *Saxidomus giganteus*. Puis d'autres dérivés toxiques ont été extraits à partir de dinoflagellés du genre *Gonyaulax* (actuellement *Alexandrium*) : ce sont la néosaxitoxine (néoSTX) et les gonyautoxines (GTXs) (Shimizu *et al.*, 1985).

Les toxines paralysantes sont toutes des bases tétrahydropuriques substituées. Ce sont des toxines tricycliques à hétérocycles azotés. La communauté scientifique considère qu'il existe en fait deux molécules de base : la saxitoxine et la néosaxitoxine (N-hydroxysaxitoxine). Ces molécules peuvent être sulfatées sur plusieurs carbones, et ainsi donner naissance à de nombreux dérivés. La famille est constituée d'une vingtaine de toxines. Toutes ces toxines sont des cations divalents, tricycliques, comprenant chacun deux groupements guanidines (voir figure 5).

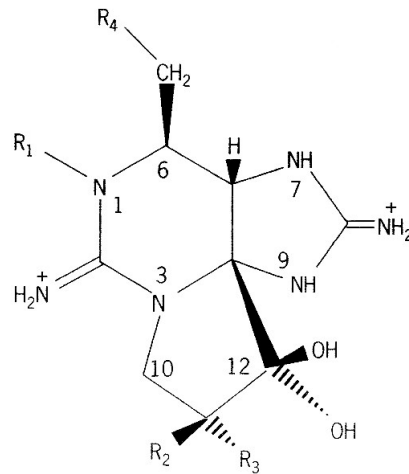
On peut classer les toxines paralysantes en trois classes selon leur structure (Cembella, 1998) :

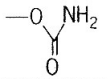
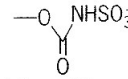
- les carbamates (STX, néoSTX, GTX1-GTX-4),
- les N-sulfocarbamoyles (B1-B2, C1-C4),
- les dérivés décarbamoyles (dc-analogues)

La saxitoxine, les gonyautoxines et les toxines C sont les plus fréquemment retrouvées dans les coquillages contaminés.

La STX et la dcSTX ne sont pas sulfonées. Les GTX sont des toxines 11- α,β -sulfonées. Les GTX 3 et les GTX 4 sont des 11- β -sulfonées (11- β -épimères) et les GTX1 et les GTX2 sont des 11- α - épimères. Les toxines C1,2 sont des N-sulfo- GTX2,3 (Grzebyk et Séchet, 2001).

Figure 5 :Structure des toxines paralysantes (variations au niveau des radicaux R1 à R4). (Amzil *et al.*, 2001a)



R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Toxines carbamates		Toxines N-sulfocarbamoyle		Toxines décarbamoyles (dc)	
					Poids moléculaire		Poids moléculaire	—OH	Poids moléculaire
H	H	H		STX	301,31	B1	380,36	dcSTX	258,28
H	H	OSO ₃		GTX2	396,36	C1	475,41	dcGTX2	353,33
H	OSO ₃	H		GTX3	396,36	C2	475,41	dcGTX3	353,33
OH	H	H		NEO	317,31	B2(GTX6)	396,36	dcNEO	274,28
OH	H	OSO ₃		GTX1	412,36	C3	491,41	dcGTX1	369,33
OH	OSO ₃	H		GTX4	412,36	C4	491,41	dcGTX4	369,33

STX : saxitoxine
 NEO : néosaxitoxine
 GTX : gonyautoxine

1.4.2. Propriétés

Elles sont hydrosolubles, thermostables (elles sont peu sensibles à l'appertisation) et stables en milieu acide. Ce caractère hydrophile est important car il signifie que les toxines circulent sous forme libre dans le sang.

Par contre, les toxines sont instables en milieu alcalin. Elles sont également sensibles aux oxydants. Elles se décomposent facilement lorsqu'on veut les mettre en évidence. Cela rend leur détection plus difficile.

1.5. Biosynthèse et biotransformations

Certaines de ces toxines paralysantes résultent d'une biotransformation des toxines algales par les coquillages. A cause de cela, il peut être difficile de doser les toxines dans des produits alimentaires.

D'après Cembella, 1998, la saxitoxine résulte de l'assemblage de quatre acides aminés (trois molécules d'arginine et une de méthionine) et d'un résidu d'acétate.

La synthèse des acides aminés se décompose ainsi :

- l'ion nitrate NO_3^- , d'origine minérale, est capté par la microalgue dans le milieu et est réduit en ions NH_4^+ ;
- les squelettes carbonés des acides aminés sont synthétisés en parallèle ;
- le NH_4^+ est incorporé à ce squelette pour former les acides aminés.

Ces trois étapes nécessitent de l'énergie d'origine photosynthétique et d'origine métabolique. Rappelons que toutes les souches toxiques sont photosynthétiques.

On ne connaît pas bien pour le moment le nombre et la suite de réactions enzymatiques qui conduisent, à partir de la toxine de base, à tous les autres composés. On sait que cela peut être des réactions d'oxydation, de réduction, et de sulfatation.

On ignore quelle est la toxine formée en premier.

Une fois synthétisées dans la cellule, les STXs ne sont pas facilement libérées dans le milieu.

1.6. Toxinogénèse

1.6.1. Généralités

Lorsqu'on étudie la toxinogénèse des cellules algales, il convient de classer les toxines produites en deux catégories :

- les toxines azotées. Elles comportent dans leur squelette à la fois des atomes de carbone et d'azote. Ce sont ces derniers qui vont être les plus limitants dans la toxinogénèse. En effet, l'azote est un élément nutritif plus difficile à trouver dans le milieu que le carbone. Les saxitoxines et ses dérivés appartiennent à cette catégorie.
- les toxines polyéther au squelette carboné. Seul l'élément carbone est présent.

Deux types de facteurs peuvent intervenir sur la production de toxines :

- les facteurs génétiques. En effet, la possibilité de produire des toxines est déterminée dans le génome des microalgues.
- les facteurs environnementaux. Les conditions environnementales vont influencer sur le cycle biologique des microalgues. Or, les organismes ne produisent pas des toxines à tous les stades.

La toxicité d'une souche dépend :

- de la concentration en toxines dans la cellule ;
- du profil toxinique (composition qualitative des différentes toxines) ;
- de la proportion de chaque toxine.

La toxinogénèse dépend de facteurs génétiques et environnementaux.

1.6.2. Facteurs génétiques

Selon Mackenzie et Berkett, 1997, le profil dépend uniquement de facteurs génétiques. Il est en effet spécifique à chaque souche. Par exemple, on sait qu'il existe une grande variabilité dans les toxicités des différentes souches d'*Alexandrium*. Les différentes expériences

effectuées n'ont jamais montré de variation en fonction du temps et des conditions environnementales.

De plus, certaines bactéries, lorsqu'elles sont associées à des souches toxiques de dinoflagellés, sont capables de synthétiser des STXs.

La question est de savoir si les toxines sont synthétisées seulement à partir du matériel génétique de la cellule algale ou si une autre source d'ADN intervient (plasmides, plages,...). On ne connaîtra probablement pas la réponse avant que les gènes responsables soient séquencés.

1.6.3. Facteurs environnementaux

La concentration en toxines et la proportion de chaque toxine varient en fonction de la phase du cycle cellulaire et des conditions environnementales.

D'après Taroncher-Oldenburg *et al.* (1997), la synthèse de la toxine a lieu pendant la phase G1 du cycle. Cette phase est en général la plus longue du cycle. La biomasse cellulaire augmente fortement, préparant ainsi une nouvelle division.

La production de toxine a donc lieu pendant cette phase exponentielle du cycle. Or, l'entrée ou non du cycle en G1 est dépendante de nombreux facteurs environnementaux.

La bibliographie met en évidence l'influence de facteurs abiotiques (température, salinité et lumière), et de facteurs nutritifs.

1.6.3.1. Influence de la température

La température conditionne la vitesse des réactions enzymatiques, et donc le métabolisme cellulaire. Si la température est inférieure à leur température optimale pour la biosynthèse, les enzymes catalysent moins bien les réactions. Et si la température est supérieure à la température optimale, les enzymes sont dégradées.

La température optimale des microalgues est d'environ 20°C (Grzesbyk et Séchet, 2001).

1.6.3.2. Influence de la salinité

La salinité du milieu va également avoir un effet sur les enzymes.

La concentration en sel fait varier les propriétés électriques du milieu. Les enzymes subissent des changements de conformation spatiale, et la vitesse des réactions est diminuée.

De plus, si la différence osmotique entre le milieu et l'intérieur de la cellule est trop importante, la cellule dépense de l'énergie pour maintenir un équilibre osmotique compatible avec sa survie.

Ainsi, si la salinité du milieu s'éloigne de la salinité optimale de la cellule, la production de toxine devrait être limitée. En fait, aucune expérimentation n'a pour le moment démontré une telle relation.

1.6.3.3. Influence de la lumière

La cellule algale a besoin d'énergie d'origine photosynthétique au cours de la biosynthèse de la toxine. La production de toxine ne se fait par conséquent que pendant la phase éclairée.

Comme pour la température et la salinité, il existe un optimal d'éclairement pour la cellule, et une plage de tolérance. En dehors de cette plage, aucune toxine n'est produite.

1.6.3.4.Facteurs nutritifs : influence de l'azote et du phosphore minéraux

Les composés saxitoxiniques sont riches en azote (rapport dans les molécules C/N = 1,4). Ainsi, la teneur du milieu en azote est un facteur prépondérant. On considère que le rapport optimum N/P doit être de 16 dans les cellules pour avoir une production de toxines optimale (Grzebyk et Séchet, 2001).

Des expériences (Parkhill et Cembella, 1999) ont montré que :

- dans un milieu riche en P et limitant en N, les cellules se divisent encore un peu, mais la production de toxine est bloquée.
- dans un milieu riche en P et limitant en N, la croissance est arrêtée mais la biomasse continue à augmenter car la cellule continue à produire la toxine. Ce phénomène s'explique par le fait que le P soit un constituant important de l'ADN.

D'après Grzebyk et Séchet, 2001, les cellules pourraient produire des toxines grâce à une nutrition hétérotrophe par prédation de microorganismes. Mais cela dépendrait de la nature de la matière organique mise à la disposition de la cellule.

2. Les toxines diarrhéiques et associées

Sont regroupées sous la dénomination toxines diarrhéiques les toxines synthétisées par le phytoplancton. Elles sont à l'origine de l'IDFM (Intoxication Diarrhéique par Fruits de Mer). Le terme anglo-saxon de DSP (*Diarrheic Shellfish Poisoning*) est synonyme de l'IDFM.

L'acide okadaïque (AO) et ses analogues (dinophysistoxines ou DTXs) sont les principaux représentants des toxines diarrhéiques. Les péctenotoxines (PTXs) et les yessotoxines (YTXs) sont également assimilées à ce groupe.

2.1. L'Acide Okadaïque et autres dinophysistoxines

Certaines espèces de phytoplancton appartenant aux genres *Dinophysis* et *Prorocentrum* produisent des dinophysistoxines qui peuvent être toxiques pour l'Homme. L'acide okadaïque (AO) est le chef de file des phycotoxines diarrhéiques.

Les mollusques bivalves (moules, coquilles saint jacques, huîtres, clams, palourdes...) peuvent filtrer ces toxines. La consommation de coquillages contaminés entraîne des symptômes de type diarrhéique.

2.1.1. Découverte/historique

La reconnaissance du syndrome DSP est plus récente que celle du syndrome PSP. Le premier cas d'intoxications gastro-intestinales liés à la consommation de coquillages contaminés par des dinoflagellés a été rapporté par Kat en 1979. Ces intoxications ont eu lieu aux Pays-Bas dans les années 60.

Mais l'IDFM doit exister depuis plus longtemps. En effet, les symptômes d'une IDFM sont principalement digestifs et peuvent donc se confondre avec une affection d'origine bactérienne ou virale. La surveillance sanitaire était moins rigoureuse que de nos jours (Amzil *et al.*, 2001a).

A la suite d'épisodes toxiques survenus en 1976 et 1977 au Japon, la liaison entre la contamination des coquillages et la présence du dinoflagellé *Dinophysis fortii* a été démontrée. La toxine responsable, isolée à partir des coquillages, a été baptisée dinophysistoxine-1 (DTX-1) (Yasumoto *et al.*, 1978).

La DTX-2 a été mise en évidence bien plus tard, dans les années 90 en Irlande. En Effet, elle a été isolée à partir des coquillages contaminés par *Dynophysis acuta*.

2.1.2. Espèces productrices de toxines diarrhéiques

D'après Billard *et al.* (2001), les principales espèces toxiques sont :

- *Dinophysis acuminata* (= *D. lachmanii*, *D. skagii*);
- *D. acuta* (= *D. dens*);
- *D. caudata* (= *D. diegensis*);
- *D. fortii*;
- *D. norvegica*;
- *D. tripos*;
- *D. sacculus* (= *D. pavillardii*);
- *Prorocentrum arenarium*;
- *P. belizeanum*;

- *P. faustiae*;
- *P. hoffmannianum*;
- *P. lima*;
- *P. maculosum*;
- *P. concavum*.

Les sept premières appartiennent à la classe des Dinoflagellés (= Dinophycées), à l'ordre des Dinophysiales, à la famille des Dinophysacées et au genre *Dinophysis*. Les six autres appartiennent à la classe des Dinoflagellés (= Dinophycées), à l'ordre des Prorocentrales, à la famille des Prorocentracées et au genre *Prorocentrum* (voir annexe).

Sur la centaine d'espèces de *Dinophysis* actuellement décrite, une partie devrait disparaître, comme appartenant à une seule espèce. En effet, ces espèces ne sont pas cultivables et il est donc difficile de reconnaître facilement les différentes formes que peut prendre une espèce. Le dimorphisme sexuel peut être très important.

Au contraire, si on observe le nombre de publications à ce sujet, le nombre d'espèces toxiques de *Prorocentrum* devrait s'allonger (par exemple, *P. borbonicum*, Hong-Nong Chou et Chung-Kuang Lu, 2000).

2.1.2.1. Ordre des Dinophysiales

Ces dinoflagellés sont tous « cuirassés ». Leur thèque est aplatie latéralement et constituée de plusieurs plaques. Les collerettes et les ailettes soulignent respectivement le cingulum et le sulcus.

Les espèces toxiques appartiennent toutes à la famille des Dinophysacées (Billard *et al.*, 2001).

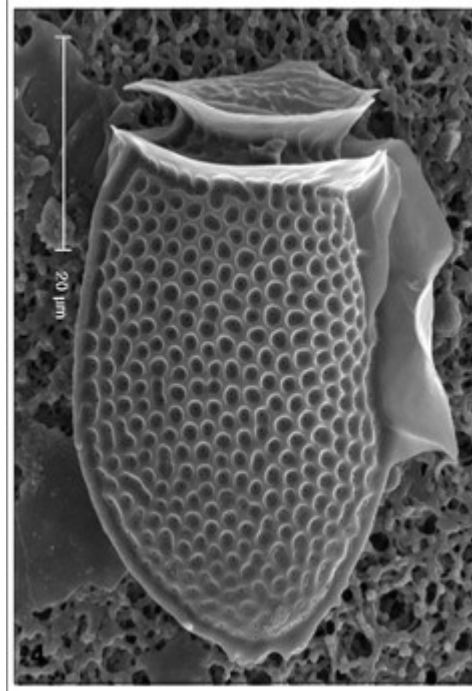
2.1.2.2. Genre *Dinophysis* spp.

Le genre *Dinophysis* est caractérisé par un cingulum antérieur avec de larges collerettes en forme d'entonnoir masquant l'épithèque. Il existe un genre voisin au genre *Dinophysis*, *Phalacroma*, chez lequel l'épithèque est visible, les collerettes cingulaires étant typiquement moins développées (Billard *et al.*, 2001). Certains considèrent que ces deux genres devraient être confondus. D'après Hallegraeff et Lucas (1988), même si les deux genres sont très proches, la distinction mérite d'être maintenue. En effet, en plus de quelques différences morphologiques, tous les *Dinophysis* sont photoautotrophes et néritiques (synonyme de côtières) alors que les *Phalacroma* sont hétérotrophes et océaniques.

Enfin, tous les producteurs de toxines diarrhéiques responsables de l'IDFM appartiennent au genre *Dinophysis sensu stricto*.

Les chloroplastes ont une composition originale avec à la fois péridinine et phycoerythrine parmi les pigments accessoires. La figure 6 présente une photo de *Dinophysis acuminata*.

Figure 6 : *Dinophysis acuminata* au MEB
(source : Site de l'Université de Liverpool)



Echelle : le trait blanc représente 20 μm.

2.1.2.3. Ordre des Prorocentrales

Comme les Dinophysiales, ces dinoflagellés sont aplatis latéralement. Par contre, ils possèdent une morphologie prorocentroïde, sans cingulum ni sulcus, et une thèque apparente faite de deux plaques principales (valves), et deux flagelles en position apicale.

Toutes les espèces appartenant à l'ordre des Prorocentrales sont photosynthétiques. Cet ordre ne comporte qu'une famille (Prorocentracées). D'après Fensome *et al.*, 1993, cet ordre est certainement affilié à l'ordre des Dinophysiales. En effet, plusieurs espèces de *Prorocentrum* produisent de l'acide okadaïque ou ses dérivés, tout comme certaines espèces de *Dinophysis*.

2.1.2.4. Prorocentrum spp.

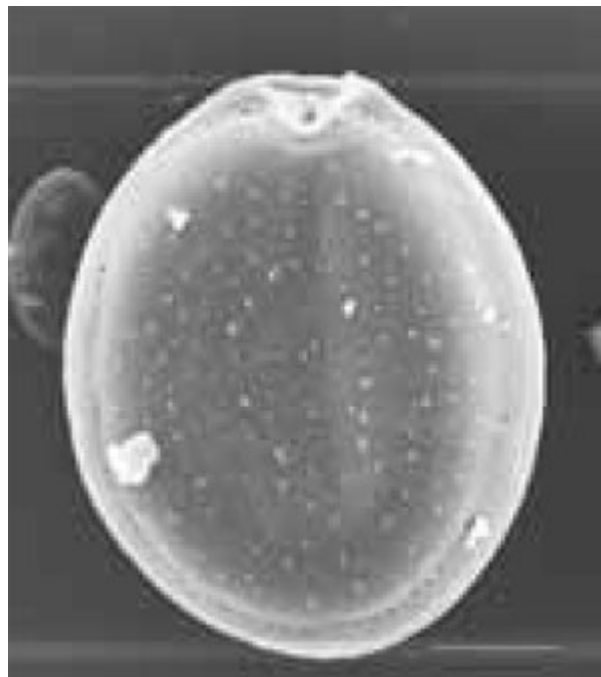
Prorocentrum, le genre principal de l'ordre, comporte plus de 50 espèces décrites dont les dernières (surtout des espèces benthiques) sont déterminées à partir d'études au Microscope Electronique à Balayage ou MEB (Billard *et al.*, 2001). Il est à première vue assez hétérogène avec des espèces soit planctoniques, soit benthiques, épiphytes ou psammophiles. Un organisme psammophile est un organisme qui vit sur et/ou dans les substrats sableux. La distinction n'est pas si tranchée puisque certaines espèces sont qualifiées de benthoplanctoniques (Grzebyk *et al.*, 1998). Par exemple, *P. lima*, réputé benthique, se montre parfois abondant dans le plancton.

La forme générale de la thèque montre également deux tendances, des espèces étant ovales à partie postérieure arrondie (par exemple, *P. lima*, *P. mexicanum*, *P. minimum*), d'autres étant postérieurement pointues ou effilées (par exemple, *P. micans*, type du genre). Si les

premières sont souvent benthiques, certaines sont nettement planctoniques (par exemple, *P. mexicanum*, *P. minimum*). La figure 7 représente une vue de *P. lima* au MEB.

Les récentes études de séquençage moléculaire, quoique parfois conflictuelles, soulignent aussi cette hétérogénéité (Grzebyk *et al.*, 1998). *Prorocentrum* comporte en effet plusieurs espèces toxiques et la stabilité nomenclaturale est importante. L'utilisation de « sections » (sans valeur taxonomique) est préconisée pour désigner des clades révélés par les analyses moléculaires (Elbrächter *et al.*, 2000) Un clade (du grec clados, qui signifie « branche ») est un taxon strictement monophylétique, c'est-à-dire une branche contenant un ancêtre et tous ses descendants..

Figure 7 : *Prorocentrum lima* au MEB
(source : Site de la bibliothèque de la fondation nipponne)



Echelle : 1 cm représente 6 μ m.

2.1.3. Biologie

Prorocentrum et *Dinophysis* sont proches phylogénétiquement et sont cosmopolites tous les deux. Par contre, si *Dinophysis* est exclusivement planctonique, les espèces toxiques de *Prorocentrum* sont le plus souvent benthiques/épiphytes et ont été détectées dans les régions tropicales et subtropicales. D'une façon générale, les dinoflagellés benthiques sont sous échantillonnés en zone tempérée et leur répartition mériterait d'être mieux connue et prise en compte par les réseaux de surveillance (Billard *et al.*, 2001).

Il est important de retenir que tous les dinoflagellés toxiques sont photosynthétiques même si certaines espèces sont mixotrophes.

La réserve principale des cellules est constituée par l'amidon, stocké sous forme de grains dans le cytoplasme et réagissant au lugol accompagné de lipides.

Les dinoflagellés sont des organismes haploïdes, le zygote seul étant diploïde et pouvant constituer une phase non mobile et benthique du cycle. Morphologiquement très différent du stade flagellé, ce zygote à paroi renforcée et très résistante, est appelé hypnozygote ou kyste. Il peut rester enfoui dans les sédiments pendant une période plus ou moins longue (parfois des années) avant de « germer » et de libérer à nouveau des cellules flagellées planctoniques. Un système de classification et un vocabulaire spécifiques existent d'ailleurs pour ces kystes qui intéressent également les paléontologues puisque ces structures très résistantes sont fossilisables. Ces kystes constituent une population « refuge » benthique très importante à considérer dans le cas des dinoflagellés toxiques. Ils sont, par exemple, susceptibles d'être propagés par les opérations de dragage (Érard-Le Denn, 1999) mais aussi transportés et disséminés *via* les eaux de ballast des navires (Hallegraeff, 1993).

Parmi les espèces toxiques de *Prorocentrum* (Ten-Hage *et al.*, 2000), on peut distinguer des espèces majoritairement benthiques et productrices de toxines diarrhéiques : *P. arenarium*, *P. belizeanum*, *P. faustiae*, *P. hoffmannianum*, *P. lima* et *P. maculosum*. *P. lima*, *P. hoffmannianum* et *P. maculosum* sont à la fois producteurs de toxines diarrhéiques et de neurotoxines à action rapide (prorocentrolides). D'autres espèces de *Prorocentrum* planctoniques, telles *P. mexicanum* et *P. minimum* ne synthétisent ni acide okadaïque ni dinophysistoxines mais des composés hémolytiques ou cytotoxiques (Billard *et al.*, 2001). Les toxines de *P. cassubicum* n'ont pas été analysées.

Les espèces toxiques sont surtout benthiques et tropicales, ce qui a conduit à les considérer comme des contributeurs potentiels au syndrome ciguatérique. Par contre, des espèces cosmopolites comme *P. lima* sont des agents potentiels de l'IDFM aussi importants à considérer dans les eaux tempérées que les *Dinophysis* planctoniques (Billard *et al.*, 2001).

P. lima produit des kystes zygotiques, mais leur période de dormance est très courte (une semaine). Il est donc peu probable que ces kystes constituent vraisemblablement une population refuge pour l'espèce.

2.1.4. Répartition géographique

Les espèces de phytoplancton sont cosmopolites. Les toxines diarrhéiques sont donc trouvées dans de nombreuses régions du globe.

2.1.4.1. Europe

La synthèse de Van Egmond *et al.* (1993) montre que tous les pays européens - mis à part l'Allemagne - ont déclaré des épisodes d'IDFM.

Le premier épisode toxique recensé en France a eu lieu en 1983, dans le sud de la Bretagne. 3000 personnes environ ont été intoxiquées. En Espagne, qui est un pays grand producteur et consommateur de coquillages, une prolifération à *D. acuta* en 1981 va faire 5 000 victimes réparties dans tout le pays. Les pays d'Europe du Nord ne sont pas épargnés : dans les années quatre-vingts, des centaines d'intoxications dues à des moules contaminées par des toxines de type diarrhéique ont eu lieu.

Les toxines mises en évidence en France métropolitaine pour le moment sont l'AO, DTX-1 et DTX-3. Les autres molécules du complexe diarrhéique ont été retrouvées dans d'autres Etats membres de l'Union Européenne.

En France métropolitaine, quatre espèces potentiellement toxiques ont été identifiées dans des prélèvements d'eau dont *P. lima* (Site de l'Ifremer).

2.1.4.2. Amérique du Nord

Le problème lié à l'IDFM semble être moins important en Amérique qu'en Europe. Quelques cas ont cependant été recensés (Amzil *et al.*, 2001a).

2.1.4.3. Asie et Amérique du Sud

Les informations concernant l'IDFM sont plus rares en Asie et en Amérique du Sud. Cependant, les publications faisant état de proliférations à *Dinophysis* spp. deviennent de plus en plus nombreuses. Amzil *et al.* (2001a) citent la Thaïlande avec *D. caudata*, la côte ouest de l'Inde de 1984 à 1986, avec la même espèce et le Chili en 1979 avec *D. acuta*.

2.1.5. Conditions d'étude de ces toxines en laboratoire

Pour le moment, toutes les tentatives de synthèse des DTXs ont échoué.

Afin d'obtenir des sources de standard de toxine en quantité importante, on pratique la culture en masse de *P. concavum*, *P. maculosum* et *P. lima* (Amzil, 1993). C'est avec ces espèces que sont obtenus les taux de croissance les plus importants parmi les espèces produisant des toxines diarrhéiques. Mais ces taux restent cependant assez faibles. En effet, les espèces de *Prorocentrum* sont benthique/épiphyte et ne se développent qu'agrégées sur des supports avec des taux de croissance assez faibles.

Les *Dinophysis* ne sont pas pour le moment cultivables en laboratoire.

Il est important d'avoir des toxines en nombre suffisant pour pouvoir faire des études toxicologiques complètes, mais également pour pouvoir valider les méthodes de détection et de quantification.

Les toxines diarrhéiques sont quantifiées par CLHP (Chromatographie Liquide Haute Pression) en routine. Le développement nécessaire de la CL-SM pour la détection des polyéthers n'est survenu que récemment (Frémy *et al.*, 2001).

2.1.6. Propriétés physico-chimiques

2.1.6.1. Structure

Les toxines diarrhéiques appartiennent à la famille des phycotoxines polyéthers et leur structure est constituée d'une longue chaîne carbonée, associée à des hétérocycles oxygénés. Leur structure est beaucoup plus complexe que celle des toxines azotées. La famille des DTXs est caractérisée par son caractère acide.

Contrairement à certaines toxines découvertes récemment (voir les chapitres concernant les spiroïdes, les prorocentrolides et les pecténotoxines), les DTXs sont des polyéthers linéaires, et non pas des polyéthers macrocycliques.

Le chef de file de cette famille est l'acide okadaïque (AO). La DTX-1 (dinophysistoxine-1) est un dérivé méthylé de l'AO, et la DTX-2 (dinophysistoxine-2), un isomère de l'AO. Les structures de l'AO et de ses dérivés sont présentées dans la figure 8.

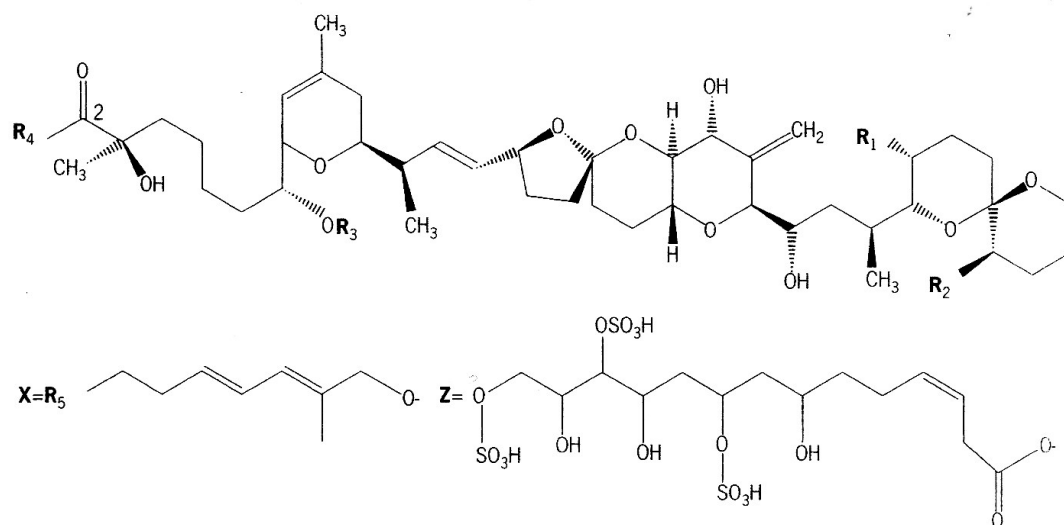
La structure chimique de la DTX-1 a été déterminée à la suite de la purification et de l'élucidation structurale de l'acide okadaïque (AO). L'AO a été isolé à partir des éponges

Halichondria okadaï (dont il a gardé le nom), provenant de la côte pacifique du Japon, et de l'espèce *H. melanodocia*, provenant de la côte de Floride (Tachibana *et al.*, 1981).

L'AO, la DTX-1 et la DTX-2 peuvent faire l'objet d'une acylation au niveau de l'hydroxyle du carbone 7 de la molécule (7-O-AO/DTXs) qui se traduit par la fixation de chaînes d'acides gras saturés ou insaturés (acyles) conduisant à la formation d'un groupe de dérivés toxiques appelés les acyles-esters (DTX-3). Les acyles typiques des DTX-3 sont représentés sur la figure 8. L'AO, la DTX-1, la DTX-2 et la DTX-3 ont été isolés dans les coquillages (Amzil *et al.*, 2001a).

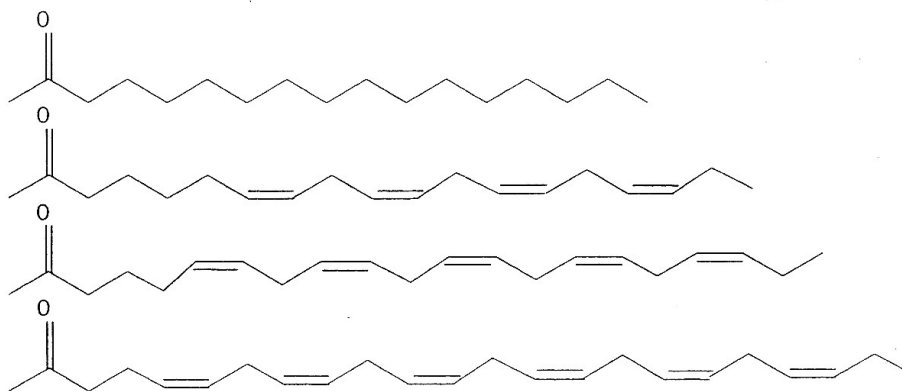
Les DTX-4 et les DTX-5, qui ne semblent pas être directement toxiques, et qui ont seulement été retrouvées dans le phytoplancton, ont pu être caractérisées grâce au développement récent d'outils analytiques performants comme la spectrométrie de masse (Wright *et al.*, 1996). Il s'avère que ce sont des composés sulfatés hydrosolubles. Ils semblent être hydrolysés en diols-esters, puis en AO (voir le chapitre biosynthèse et biotransformation). Ces composés sont synthétisés par les cellules de *Prorocentrum*.

Figure 8 : Structure de l'acide okadaïque et de ses dérivés (Amzil *et al.*, 2001a).



	R1	R2	R3	R4	R5	Poids moléculaire
Acide okadaïque (AO)	CH ₃	H	H	OH	-	804,5
Dinophysistoxine-1 (DTX1)	CH ₃	CH ₃	H	OH	-	818,5
Dinophysistoxine-2 (DTX2)	H	CH ₃	H	OH	-	804,5
Dinophysistoxine-3 (DTX3)	(CH ₃ ou H)	(CH ₃ ou H)	Acyle	OH	-	1014 - 1082
Diol-ester d'AO	CH ₃	H	H	X	OH	928,5
Dinophysistoxine-4 (DTX4)	CH ₃	H	H	X	Z	1472,6

Acyles typiques de la DTX3



2.1.6.2. Propriétés

Comme les PTXs et les YTXs (voir les chapitres suivants), les DTXs sont des polyéthers moyennement polaires et liposolubles. Ces trois familles de toxines possèdent les propriétés suivantes : elles sont solubles dans l'acétone, le dichlorométhane, le chloroforme et le méthanol.

Les poids moléculaires sont présentés dans le tableau de la figure 8. On peut remarquer que ce sont de grosses molécules d'au moins 800 Dalton.

L'AO est une molécule très hydrophobe. En solution, il se comporte plus comme un ester que comme un acide libre. Il possède une région où plusieurs atomes d'oxygène forment un environnement hydrophile. Cet environnement n'influence pas sa fluidité et l'AO pénètre rapidement et librement à travers la membrane. Nishio *et al.* (1990) ont montré que

l'accumulation de l'AO dans les cellules s'effectue rapidement et que l'efflux est lent en raison de sa liaison à un substrat intracellulaire.

La pénétration de l'AO à travers les membranes biologiques peut être affectée par le pH ou la température (Amzil *et al.*, 2001a).

2.1.7. Biosynthèse et biotransformations

La biosynthèse des toxines polyéther n'est pas bien connue. La structure générale de ces composés, un long squelette carboné, a d'abord suggéré un assemblage par une addition successive d'unités acétate.

Une autre hypothèse serait que l'assemblage se ferait à partir de précurseurs décarboxyliques.

Mais des expériences récentes ont montré que le squelette carboné des toxines provenait uniquement de l'assemblage d'unités acétate dont deux seraient fournies sous la forme de deux molécules de glycolate nécessaires pour le processus d'assemblage (Wright et Cembella, 1998). De plus, d'après Wright *et al.* (1996), les délétions de carbone d'unités acétate sur le squelette des molécules diarrhéiques (pour la formation des groupements méthyles latéraux) feraient intervenir un réarrangement opéré par une enzyme monooxygénase.

La biosynthèse des polykétides présente une particularité chez les dinoflagellés : la condensation des groupements méthyles opposés attachés à la chaîne est de type aldol. Egalement, la présence conjointe des processus de délétion de carbone et de méthylation aldol serait caractéristique des dinoflagellés (Wright et Cembella, 1998). Les polykétides sont des molécules complexes produites par des microorganismes. De nombreux polykétides ont trouvé une utilisation pharmaceutique (exemple : adriamycine, tétracycline).

La DTX4 est un composé polaire majeur. Elle a été mise en évidence à partir de *Prorocentrum lima*. Les DTX5, découverts ensuite, sont des composés polaires dérivés de la DTX4.

Il semble que les DTX5 soient stockées dans les cellules sous forme DTX4 (Hu *et al.*, 1995). Ils ont en effet été retrouvés en forte concentration dans les cellules. Une réaction enzymatique d'hydrolyse transforme la DTX4 en diol-ester d'AO. Ensuite, les diols ester d'AO sont lentement hydrolysés en AO. Les DTX4 ne sont pas des inhibiteurs des enzymes protéines phosphatases, ou très peu. Ce n'est pas le cas pour l'AO ou la DTX1.

Le stockage de la toxine sous la forme DTX4 protégerait donc la cellule algale de l'autotoxicité. Ce sont des organismes cibles (microalgues et/ou brouteurs) qui métaboliseraient la DTX4 en AO et ses dérivés (Windust *et al.*, 2000).

Lorsqu'on extrait les toxines des coquillages, il se produit une hydrolyse rapide de la DTX-4 en dérivés diols-esters qui sont à leur tour hydrolysés lentement en acide okadaïque. Cette hydrolyse semble se faire par une voie enzymatique impliquant une estérase à la suite de la lyse des cellules algales (Hu *et al.*, 1995). En fait, la présence de l'AO séquestré dans les cellules sous des formes sulfatées inactives de type DTX-4 est un moyen de protection pour les dinoflagellés producteurs de toxines diarrhéiques (Barbier *et al.*, 1999).

Les acyles-esters (DTX3) ont été isolés à partir des glandes digestives de coquillages contaminés et n'ont jamais été détectés dans le phytoplancton. Par conséquent, ils se

forment probablement dans les coquillages (Suzuki *et al.*, 1999). Leur toxicité dépend du degré de saturation de l'acide gras impliqué dans l'acylation.

2.1.8. Facteurs influençant la toxinogénèse

Les toxines diarrhéiques sont des produits du système photosynthétique. Mais le rôle de certaines bactéries endosymbiotiques n'est pas à exclure. La production toxinique par espèce de phytoplancton est fonction des facteurs environnementaux d'une part, et de l'origine géographique de la cellule algale d'autre part.

2.1.8.1. Toxinogénèse et facteurs génétiques

La capacité des microalgues à produire certaines toxines polyéther est conditionnée par des facteurs génétiques. Ceux-ci influent à la fois sur les quantités de toxines produites et sur les profils toxiques, qui peuvent être modulés en fonction de la phase de croissance ou des conditions environnementales.

Le profil toxinique d'une espèce de *Dinophysis* dans des populations naturelles peut varier considérablement d'une région à l'autre (Cembella, 1998). En Europe et au Japon, il existe de très fortes variations saisonnières et géographiques de *Dinophysis* (Lee *et al.*, 1989). Par exemple, au Nord du Japon, certaines populations de *Dinophysis* synthétisent des DTX1. Par contre, au Sud du Japon, aucune population de *Dinophysis* n'a été trouvée comme étant apte à synthétiser ce composé.

Sur la côte atlantique du Canada, des différences géographiques importantes ont été retrouvées pour des populations de *D. norvegica* et de *D. acuminata*. En fait, suivant la région où elles se trouvent, les espèces de *Dinophysis* synthétisent plus ou moins d'AO et de DTX.

Les toxines responsables de l'IDFM sont différentes d'une région à l'autre. Par exemple, en France, la toxine principale est l'AO, en Irlande la DTX-2, alors qu'au Japon et en Amérique du Nord c'est la DTX-1 (Amzil *et al.*, 2001b).

La diversité génétique de la production de toxines (OA, DTX1) par *Prorocentrum lima* a également été clairement démontrée (Billard *et al.*, 2001).

2.1.8.2. Toxinogénèse et cycle cellulaire

La production des toxines polyéthers a lieu pendant la phase de croissance des microalgues et elle se prolonge au début de la phase stationnaire. La toxicité cellulaire est à son maximum en fin de phase de croissance ou en début de phase stationnaire (Sperr et Doucette, 1996). Le profil toxinique varie également en fonction de la phase du cycle. Ainsi, en phase stationnaire, des toxines non produites en phase de croissance apparaissent.

2.1.8.3. Toxinogénèse et facteurs environnementaux

2.1.8.3.1 La lumière

Toutes les espèces de Dinoflagellés qui produisent des toxines diarrhéiques – à l'exception de *Dinophysis rotundata* – sont photoautotrophes. La lumière leur est donc indispensable pour produire des toxines. Pan *et al.* (1999) ont montré que dans des cultures de *P. lima* maintenues pendant une période prolongée à l'obscurité (17 jours), aucune production de toxine n'est observée.

La lumière a également une influence sur les types de toxines qui sont synthétisées. Pan *et al.* (1999) ont montré que les DTX4 étaient synthétisées plutôt en début de période éclairée, alors que les cellules se trouvent en phase G1. La concentration en AO et en DTX1 augmente en fin de période éclairée, alors que les cellules sont plutôt dans la phase S (réplication de l'ADN) ou G2 (période pré mitotique).

2.1.8.3.2 La température

A des températures basses, la toxicité augmente. D'après Grzebyk et Séchet (2001), cela est dû à une réduction du taux de division cellulaire et non à une augmentation de la biosynthèse des toxines.

Il semble qu'il y ait des interactions entre les facteurs températures et éclairement. En effet, si la température est basse et l'éclairage faible, la toxicité semble être plutôt inversement liée au taux de croissance, et si les températures sont élevées et l'éclairage fort, la toxicité est plutôt positivement liée au taux de croissance.

2.2. Les pecténotoxines

Les pecténotoxines (PTXs) sont actuellement classées dans le groupe des toxines diarrhéiques. Contrairement aux yessotoxines (YTXs), les PTXs ont été associées directement à des intoxications alimentaires. Il existe en effet un témoignage très récent de toxi-infection due à ces composés (Eaglesham *et al.*, 2000).

Mais dans la quasi-totalité des cas, les PTXs ont été trouvées associées de façon minoritaire à l'AO ou à l'un de ses dérivés. Il est alors difficile de savoir si ces toxines possèdent une toxicité propre. Toutefois, occasionnellement, les PTXs ont été mises en évidence comme toxines majoritaires (Draisci *et al.*, 1996).

En plus du fait que les PTXs entraînent chez l'Homme des symptômes de type diarrhéique, elles sont, comme les DTXs, lipophiles. Pour ces deux raisons (similarité des symptômes, propriétés physico-chimiques voisines), les PTXs sont classées dans la même catégorie que les DTXs. Mais cela est très discuté. Pour le moment, et en attendant des données toxicologiques plus précises, le groupe de travail européen réunissant les laboratoires communautaires de référence (LCR) a décidé de les maintenir dans le groupe des toxines diarrhéiques (Amzil *et al.*, 2001a).

Deux raisons ont été invoquées : la première est que les PTXs sont conservées lors des phases d'extraction acétonique mises en oeuvre pour la réalisation des tests officiels de détection des toxines diarrhéiques, les bioessais sur souris (Yasumoto *et al.*, 1984). Cela entraîne un problème pour la surveillance car il est fort probable que les PTXs interfèrent avec les dinophysistoxines dans le test souris qui sert à la décision.

La deuxième est que la présence des PTXs dans les coquillages a tendance à s'étendre.

Enfin, il n'existe pas pour le moment de standards de PTXs commercialement disponibles. Par conséquent, il est difficile de mener des études toxicologiques complètes, et de valider des méthodes de détection pour ces molécules.

Cette situation est imparfaite car on est susceptible de prendre plus de précaution que nécessaire. Mais c'est celle qui, en l'état actuel des connaissances, garantit un haut niveau de sécurité pour les consommateurs.

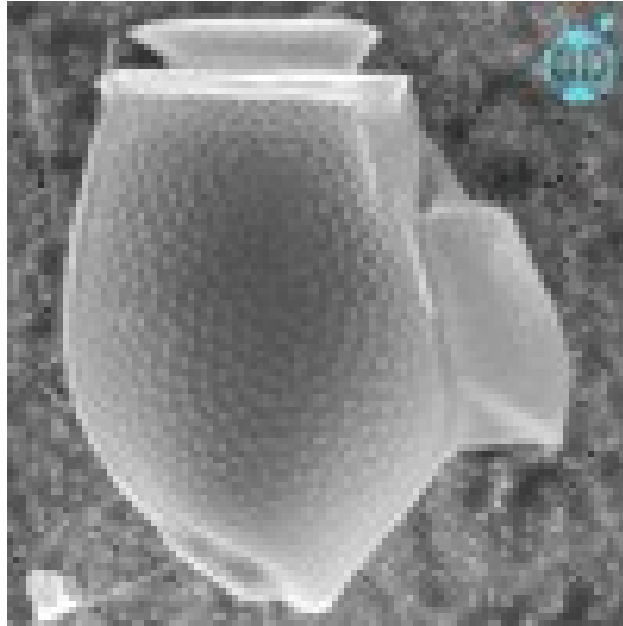
2.2.1. Découverte

Les pecténotoxines (PTXs) ont été découvertes dans des pectinidés au Japon dans les années 80 lors de la prolifération de *Dinophysis*.

2.2.2. Espèces productrices de toxines PTXs

Les espèces de Dinoflagellés *D. fortii* et *D. acuta* (figure 9) ne synthétisent pas uniquement des DTXs, mais également des PTXs.

Figure 9 : *Dinophysis acuta* au MEB
(source : Site de l'Université de Liverpool)



Echelle : 1 cm représente 10 μm .

2.2.3. Répartition géographique

Les PTXs auraient été responsables d'intoxications de consommateurs en Italie et en Australie.

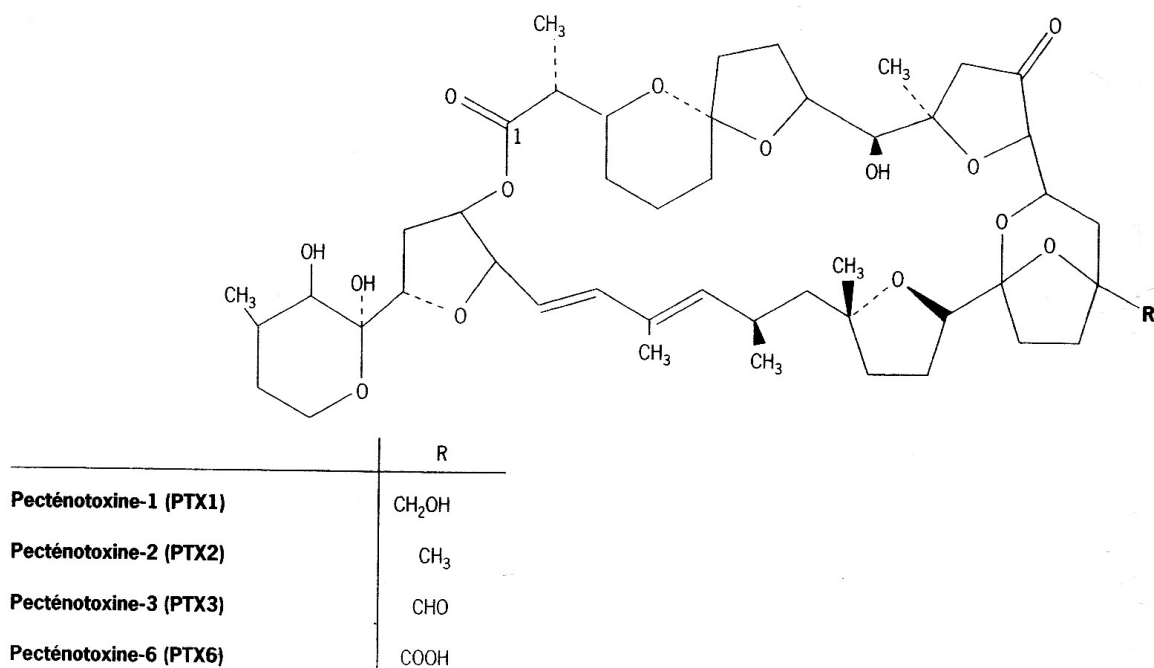
En effet, en Italie, les PTXs ont été détectées dans du phytoplancton riche en *D. fortii*, responsable de la toxicité des moules au nord de la mer Adriatique (Amzil *et al.*, 2001a).

En Australie, c'est en 1997 que des personnes ayant consommé des petits coquillages (*Plebidonax* sp.) ont manifesté des symptômes typiques de l'intoxication diarrhéique (nausées, vomissements, diarrhées). Or, les seules toxines qui ont été retrouvées dans les mollusques et dans des prélèvements de phytoplancton étaient la PTX2 et ses homologues acides, séco-pecténotoxine 2 (toxines AC) (Eaglesham *et al.*, 2000). Cela suggère fortement leur toxicité pour l'Homme.

2.2.4. Propriétés physico chimiques

Les pecténotoxines (PTX) sont, comme les DTXs, des polyéthers liposolubles. Elles sont chimiquement neutres et ont un squelette de base commun. Elles ont été isolées à partir de coquillages japonais (palourdes, pétoncles). La figure 10 présente les différentes pecténotoxines identifiées (Yasumoto *et al.*, 1989).

Figure 10 : Structure des pecténotoxines (Amzil *et al.*, 2001a)



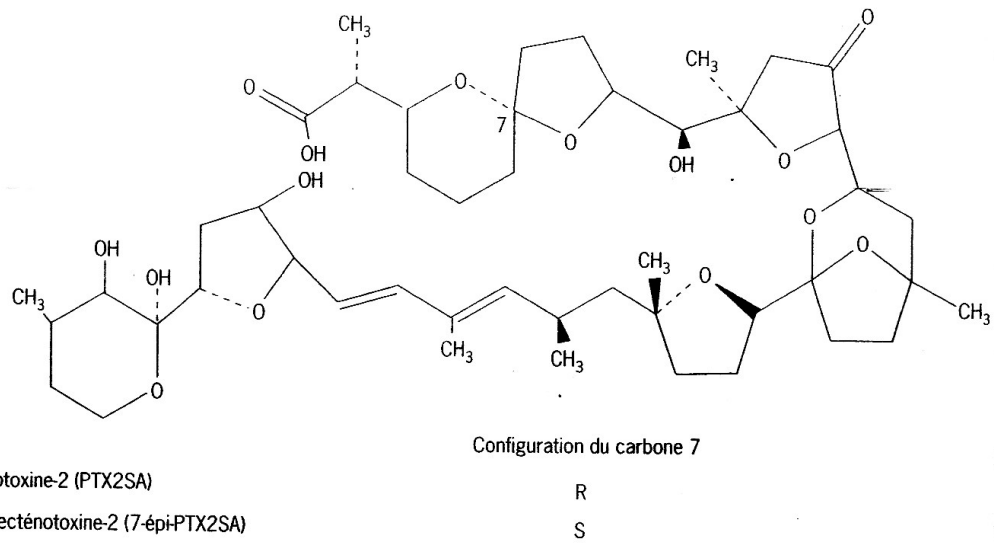
Les PTXs sont des composés polyéther macrocycliques ou macrolides. Ils sont semblables aux chaînes linéaires des DTXs, mais ils sont condensés par la formation d'une lactone macrocyclique, probablement par l'intervention de réactions enzymatiques. Les pecténotoxines sont des polyéthers cyclisés, contrairement aux toxines du type acide okadaïque et ses dérivés (dinophysistoxines) qui sont des polyéthers linéaires.

Ces composés présentent des similitudes avec d'autres polyéthers macrocycliques produits par des cyanobactéries, des actinomycètes ou des myxobactéries. Par contre, certaines différences structurales suggèrent des différences dans les processus de biosynthèse ou d'assemblage (Frémy *et al.*, 2001).

Parmi les PTXs, seule la PTX2 a été retrouvée dans les microalgues. D'après Suzuki *et al.*, 1998, les autres PTXs sont métabolisées par les coquillages. Elles proviennent d'oxydations successives et rapides du groupement méthyle situé en C43. La PTX2 a été détectée chez l'espèce *Dinophysis fortii* en plus de la DTX1, au Japon et en Italie (Draisici *et al.*, 1996).

La figure 11 présente des homologues de la PTX2 qui ont été découverts récemment. Il s'agit de l'acide séco-pecténotoxine-2 (PTX2SA) et son épimère, l'acide 7-épi-séco-pecténotoxine-2 (7-épi-PTX2SA). Ils ont été isolés en Nouvelle-Zélande à partir des moules, lors d'épisodes d'efflorescences de *D. acuta*.

Figure 11 : Structure des acides séco-pecténotoxines-2 (Amzil *et al.*, 2001a)



En fait, dans les coquillages, c'est l'acide séco-PTX2 et son épière qui dominent alors que, dans le phytoplancton (*D. acuta*), c'est la PTX2 qui est majoritaire. Il semble qu'il s'agit d'une bioconversion de la PTX2 en acide séco-PTX2 dans les coquillages (Suzuki *et al.*, 2001).

D'après Yasumoto *et al.* (1989) et Suzuki *et al.* (1998), il semblerait que le groupe méthyle du carbone 43 de la PTX2 subisse une série d'oxydation dans l'hépatopancréas des coquillages, donnant les autres pecténotoxines.

2.3. Les yessotoxines

Tout comme les PTXs, les yessotoxines (YTXs) sont classées dans le groupe des toxines diarrhéiques. Pourtant, elles ne provoquent pas de diarrhées et ne sont pas des inhibiteurs des protéines phosphatases. Leur toxicité pour l'Homme n'a pas pu être démontrée jusqu'à présent (Tubaro *et al.*, 1998).

2.3.1. Découverte

La première yessotoxine a été mise en évidence en 1986 au Japon, après extraction acétonique de glandes digestives de coquilles Saint-Jacques, *Palinopenen yessoensis* (Amzil *et al.*, 2001a).

2.3.2. Répartition géographique

Les yessotoxines ont été détectées au Japon, en Norvège, au Chili, en mer Adriatique et en Nouvelle-Zélande. Ces épisodes n'ont pas entraîné d'intoxications alimentaires (Amzil *et al.*, 2001a).

2.3.3. Espèces de phytoplancton productrices de YTXs

En Nouvelle-Zélande, d'après Satake *et al.* (1997), l'espèce de phytoplancton qui produit les YTXs responsables de la contamination des coquillages est le dinoflagellé *Protoceratium reticulatum* (*Gonyaulax grindleyi*). Il est présenté en figure 13

Par contre, en Italie, d'après Draisci *et al.* (1999), l'espèce de phytoplancton qui produit de l' homoYTXs responsable de la contamination des coquillages est le dinoflagellé *Lingulodinium polyedrum* (*Gonyaulax polyedra*). Il est présenté en figure 12.

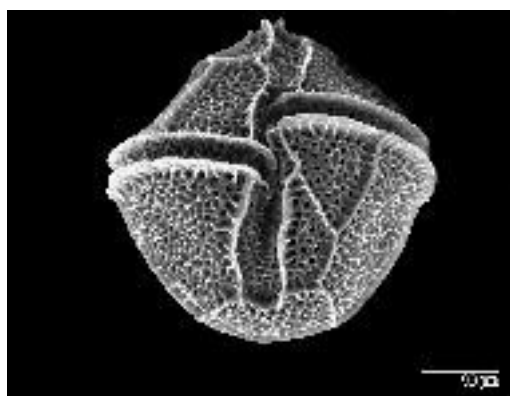
Protoceratium reticulatum et *Lingulodinium polyedrum* appartiennent tous les deux à :

- la Classe des Dinophycées : voir le chapitre sur les toxines paralysantes.
- l'Ordre des Gonyaulacales : les Gonyaulacales possèdent des formes très variées avec une thèque apparente caractérisée par son type de tabulation
- la Famille des Gonyaulacacées

Protoceratium reticulatum et *Lingulodinium polyedrum* possèdent une thèque robuste avec un sulcus s'élargissant vers l'extrémité de l'hypothèque. On peut les différencier grâce à leurs tabulations respectives. Ces deux espèces produisent des kystes épineux caractéristiques.

Les efflorescences de *Protoceratium reticulatum* et de *Lingulodinium polyedrum* ont lieu en zone néritique. L'aire de répartition de ces deux espèces est très large. Elles ont d'ailleurs été retrouvés en France.

Figure 12 : *Lingulodinium polyedrum* au MEB
(source : Site du NMNH)



Echelle : 1 cm représente 12 μ m.

Figure 13 : *Protoceratium reticulatum* au MEB
(source : Site du NMNH)



Echelle : 1 cm représente 12 μ m.

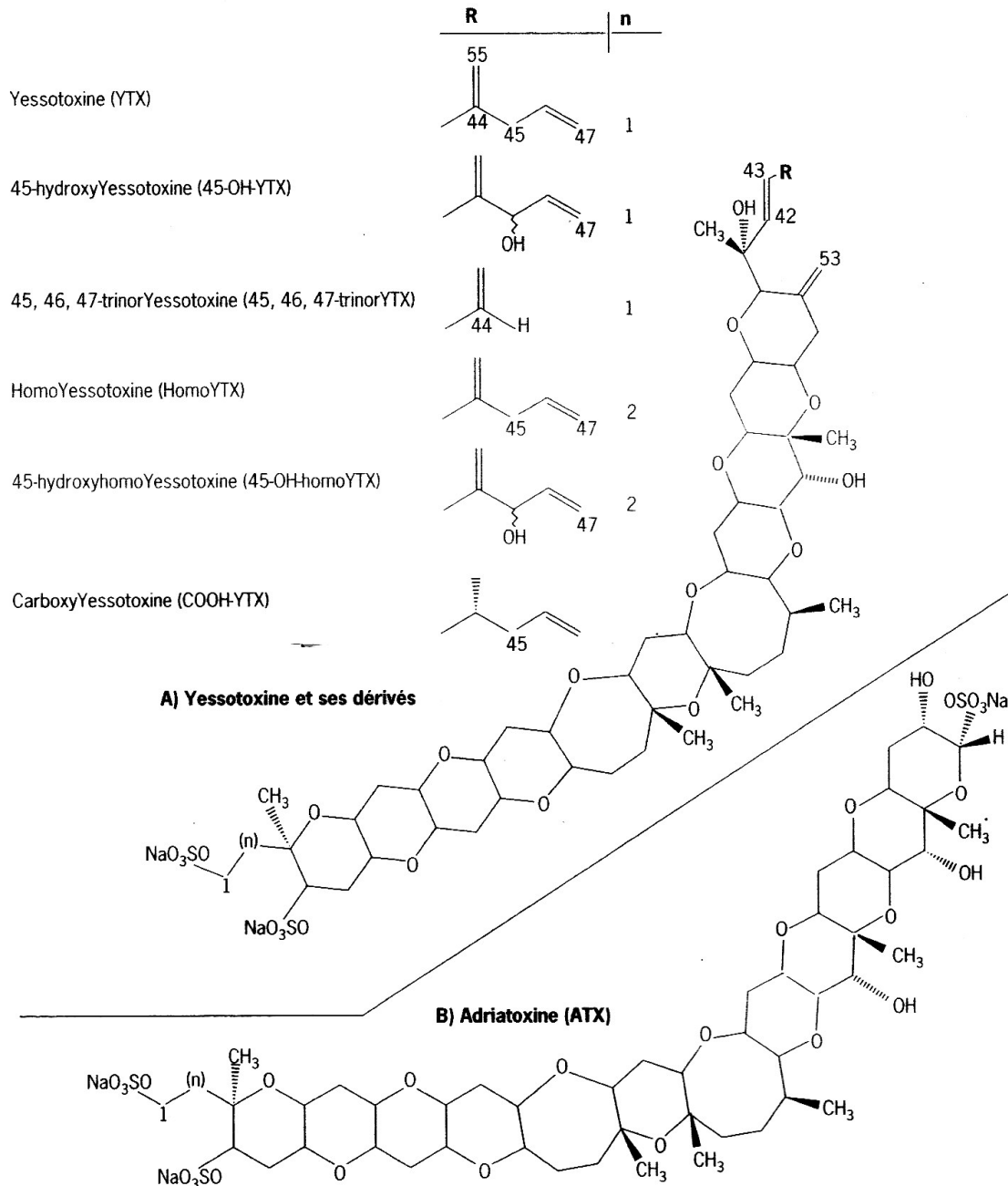
2.3.4. Propriétés physico-chimiques

Les yessotoxines sont des toxines polyéther non diarrhéiques du même groupe que les toxines ciguatériques ou les brevétoxines. Ce sont en effet des polyéthers à membrure en échelle, de 55 carbones, de nature lipophile. En effet, contrairement aux DTXs qui sont des polyéthers linéaires et qui ont une structure architecturale en chaîne, ils sont constitués d'hétérocycles oxygénés accolés souvent substitués par des groupements méthyl. Ils possèdent une structure rigide en échelle. Les toxines sont formées de 10 ou 11 cycles contigus.

La yessotoxine, YTX, ($C_{55}H_{80}O_{21}S_2Na_2$, poids moléculaire 1186) et la 45-hydroxy-YTX ($C_{55}H_{80}O_{22}S_2Na_2$, PM 1202) ont été mises en évidence dans des moules de Norvège, dans la région de Sogndal (Lee *et al.*, 1989). Une forme analogue, l'adriatoxine (ATX) a été isolée dans la mer Adriatique. Les structures de ces différentes molécules sont présentées sur la figure 14.

La mise en évidence d'homoYTX en Italie suggère que les formes hydroxylées, retrouvées uniquement dans les coquillages, proviennent de l'oxydation des toxines algales par le métabolisme des coquillages (Satake *et al.*, 1997).

Figure 14 : Structure de la yessotoxine et de ses dérivés (A) et de l'adriatoxine (B) (Amzil *et al.*, 2001a).



3. Les toxines neurologiques (brévéttoxines)

Le syndrome NSP (*Neurologic Shellfish Poisoning*) ou INFM (Intoxication Neurologique par Fruits de Mer) est provoqué suite à l'ingestion d'invertébrés marins contaminés incluant principalement des coquillages bivalves (huîtres, clams, moules) et des bulots. Les toxines responsables sont appelées les brevéttoxines, et sont synthétisées par un dinoflagellé, *Gymnodinium breve*. Les symptômes rencontrés sont des troubles gastro-intestinaux et neurologiques, avec surtout des paresthésies. Aucun décès n'a été reporté.

Chez l'Homme, les toxines neurologiques ne sont pas uniquement responsables de l'INFM. En effet, l'inhalation d'embruns chargés de microalgues et portés par le vent de mer peuvent provoquer des irritations des voies respiratoires hautes (Amzil *et al.*, 2001a).

Ces toxines ont également un fort potentiel ichtyotoxique. Les efflorescences à *G. breve* provoquent une importante mortalité de poissons. Via la chaîne alimentaire, des invertébrés, des oiseaux et peut-être des mammifères marins peuvent également être intoxiqués (Steidinger, 1993).

Ainsi, les morts massives de poissons, très visibles, et les problèmes respiratoires des baigneurs alertent de façon efficace et rapide la population. C'est pourquoi l'intoxication neurologique est assez rare et peu grave.

3.1. Historique

La première description de l'intoxication d'animaux marins par des toxines neurologiques semble remonter à 1844 en Floride.

Concernant les intoxications humaines, Pierce, en 1986, rapporte que la première description d'une intoxication humaine des voies respiratoires date de 1917 sur la côte ouest de Floride.

L'espèce responsable de la synthèse des brevéttoxines a changé de nom plusieurs fois. Elle s'est d'abord appelée *Gymnodinium breve*, puis *Ptychodiscus brevis* en 1979, puis à nouveau *Gymnodinium breve*. Elle a été récemment renommée *Karenia brevis* (Krys et Frémy, 2002). Cela illustre les difficultés taxonomiques inhérentes aux microalgues.

3.2. Caractéristiques de l'espèce *Gymnodinium breve* (*Karenia brevis*) et des espèces apparentées

Tout comme *G. catenatum* (= *Karenia selliformis*) qui synthétise des toxines paralysantes, l'espèce *Gymnodinium breve* (= *Karenia brevis*) appartient à :

- la Classe des Dinoflagellés,
- l'Ordre des Gymnodiniales,
- la Famille des Gymnodiniacées.

Les caractéristiques morphologiques de cette espèce sont les suivantes : « la cellule est aplatie dorso-ventralement avec une épithèque arrondie surmontée d'une carène rabattue ventralement et fendue par un sillon apical linéaire » (Billard *et al.*, 2001).

G. breve est considérée comme l'espèce authentique. C'est la seule espèce qui est reconnue à ce jour comme étant responsable de l'INFM. Sa localisation géographique actuelle est presque exclusivement les eaux chaudes de l'Atlantique Nord.

Par contre, des cellules *Gymnodinium breve-like* ont été mises en évidence dans les eaux d'autres régions du monde. D'après Billard *et al.*, 2001, ces cellules ont été trouvées en Espagne et en France. Elles n'ont jamais provoqué de toxicité, ni pour les animaux, ni pour l'Homme. La communauté scientifique émet deux hypothèses : il peut s'agir soit d'un complexe d'espèces morphologiquement proches de *G. breve* à mieux séparer, soit de l'espèce *Gymnodinium breve*. Dans ce dernier cas, cela signifierait que *G. breve* pourrait comporter des écotypes non toxiques.

L'espèce *Gymnodinium brevisulcatum* produit des gymnodimines, qui sont très toxiques pour la faune et la flore marine, mais ne provoque pas d'INFM (cf les toxines de découverte récente).

La figure 15 présente une photo de *Gymnodinium breve*.

Figure 15 : *Gymnodinium breve* au MEB
(source : Site du OEAS)



Echelle : 1 cm représente 8 μ m.

3.3. Répartition géographique

La zone du golfe du Mexique, avec essentiellement la Floride et le Texas, est la plus concernée. La Floride apparaît comme la région la plus touchée. Elle a connu deux épisodes particulièrement graves en 1946-1947 et 1953-1955.

Ces dernières années, des efflorescences de *G. breve* ont été détectées en Nouvelle-Zélande, en Caroline du Nord, et même en Espagne.

3.4. Conditions d'étude de ces toxines au laboratoire

Gymnodinium breve est assez facilement cultivable. De plus, en culture, il produit une grande quantité de brévotoxines. Certaines brévotoxines sont disponibles dans le commerce. Cet aspect a rendu plus facile leur étude.

3.5. Propriétés physico-chimiques des toxines

3.5.1. Structure

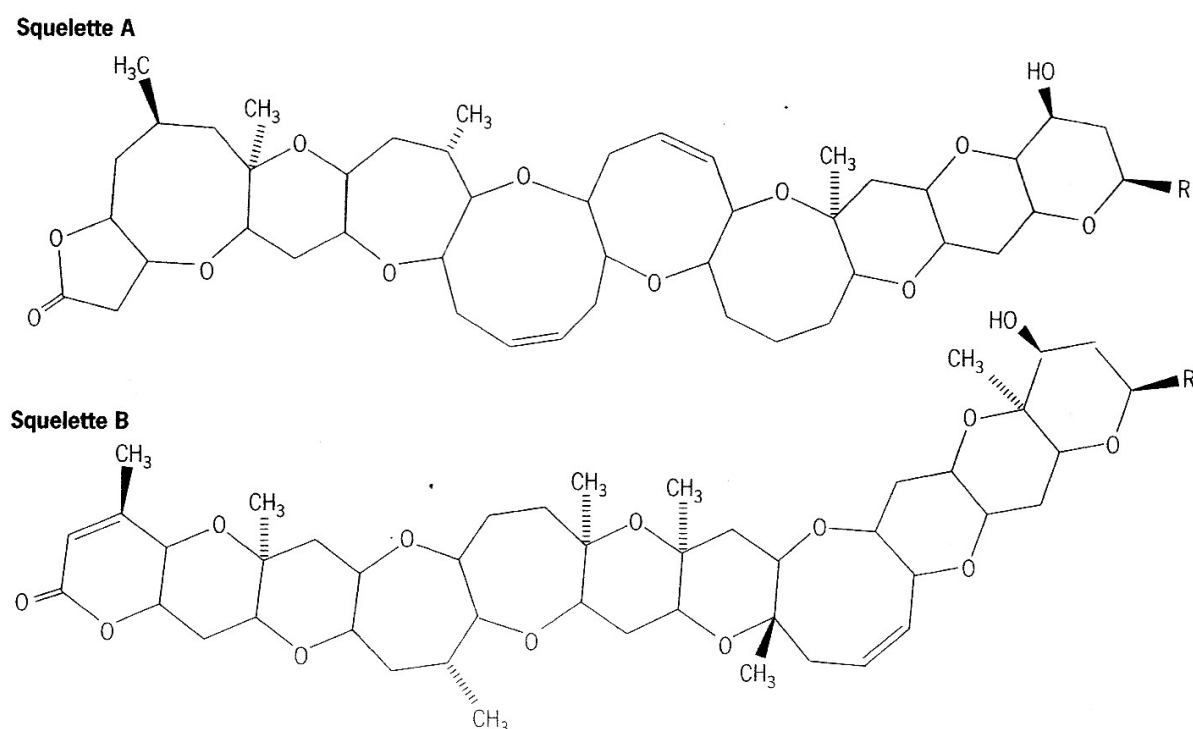
Les brevéttoxines appartiennent à la famille des toxines polyéthers. Elles sont constituées d'une longue chaîne carbonée. Tout comme les DTXs, leur structure est très complexe.

Plus précisément, ce sont des polyéthers à membrure en échelle, comme les yessotoxines.

La culture aisée de *Gymnodinium breve* permet d'obtenir une grande quantité de brevéttoxines. Les structures de ces toxines ont été étudiées essentiellement par cristallographie aux rayons X. Actuellement, deux squelettes de base différents sont connus (A et B). Les structures de sept toxines sur dix ont été élucidées. Ces structures sont présentées sur la figure 16.

La première structure élucidée fut celle de la brevéttoxine B. Sa formule est $C_{50}H_{70}O_{14}$. Or ce type de structure est unique dans le monde des produits naturels. En effet, seuls les dinoflagellés synthétisent des polyéthers cycliques (Lin *et al.*, 1981). La résolution de la structure de la brevéttoxine B a facilité les résolutions ultérieures de toutes les structures apparentées découvertes ensuite.

Figure 16 : Structure des brevéttoxines (Amzil *et al.*, 2001a).



Squelette A	R	Squelette B	R
Brevéttoxine-1 (PbTX1)	CH ₂ C(=CH ₂)CHO	Brevéttoxine-2 (PbTX2)	CH ₂ C(=CH ₂)CHO
Brevéttoxine-7 (PbTX7)	CH ₂ C(=CH ₂)CH ₂ OH	Brevéttoxine-3 (PbTX3)	CH ₂ C(=CH ₂)CH ₂ OH
Brevéttoxine-10 (PbTX10)	CH ₂ CH(CH ₃)CH ₂ OH	Brevéttoxine-9 (PbTX9)	CH ₂ CH(CH ₃)CH ₂ OH
		Brevéttoxine-8 (PbTX8)	CH ₂ COCH ₂ Cl

3.5.2. Propriétés

Les brevéttoxines sont liposolubles. Ceci a été mis en évidence par Mac Farren *et al.* dès 1965 dans des huîtres.

3.6. Biosynthèse et biotransformations

Comme pour les DTXs, la biosynthèse de ces toxines polyéthers n'est pas bien connue.

Les polyéthers à membrure en échelle ne sont pas seulement synthétisés par des dinoflagellés marins. Cette architecture chimique est également retrouvée chez deux autres classes de microalgales, les raphidophytes et les haptophytes. Cette constatation donne des indices quant à l'origine phylogénétique des gènes impliqués dans la biosynthèse des brevéttoxines.

Le fait que ces molécules soient composées d'un long squelette carboné a pendant longtemps suggéré un assemblage par une addition successive d'unités acétate, selon le schéma de biosynthèse des polykétides. Ce type d'assemblage est contrôlé par des polykétides synthétases (Frémy *et al.*, 2001).

Or, des expériences avec de l'acétate marqué ont conduit à des schémas d'incorporation inexpliqués. L'acétate pourrait donc être incorporé dans des acides dicarboxyliques avant d'être utilisé dans la synthèse des toxines. De même, les branchements méthyls latéraux semblent dérivés du groupe méthyl d'unités acétate.

En conséquence, un nouveau type de biosynthèse des polykétides a été proposé pour la synthèse des brevéttoxines, impliquant des acides monocarboxyliques (unités acétates ou propionates) et des acides dicarboxyliques (succinate, hydroxyméthylglutarate et α -cétoglutarate). D'après Frémy *et al.*, 2001, certains précurseurs monocarboxyliques et dicarboxyliques des brevéttoxines pourraient aussi provenir de la désamination et de la transformation d'acides aminés tels que l'aspartate et la leucine.

En ce qui concerne la biotransformation des toxines, Satake *et al.* ont montré en 1996 qu'un certain nombre de métabolites étaient formés dans les coquillages, en particulier dans les coques et les moules.

3.7. Facteurs influençant la toxinogénèse

3.7.1. Toxinogénèse et facteurs génétiques

La variabilité génétique des différentes espèces de *G. breve* conditionne à la fois la quantité de toxines produites et les profils toxiques.

3.7.2. Toxinogénèse et phase du cycle

Comme toutes les toxines polyéthers, les brevéttoxines sont produites au cours de la phase de croissance des microalgues et au début de la phase stationnaire.

3.7.3. Facteurs environnementaux

3.7.3.1. La lumière

G. breve est photoautotrophe. Par conséquent, il lui faut de la lumière pour produire des brevétoxines.

4. Les toxines amnésiantes (acide domoïque et dérivés)

L'ASP (*Amnesic Shellfish Poisoning*), ou IPFM (Intoxication Amnésique par les Fruits de Mer), est une intoxication qui a été découverte assez récemment. Cette intoxication entraîne, entre autres, des pertes de mémoire chez le consommateur.

Cette intoxication est due notamment à l'ingestion de coquillages contaminés par une neurotoxine amnésiante, l'acide domoïque (AD), produit par un genre de diatomée pennée, *Pseudo-nitzschia* (Amzil *et al.*, 2001a). Les conséquences peuvent être particulièrement graves pour le consommateur, puisque des décès ont été répertoriés.

Jusqu'en 1987 (date de la description de la première intoxication amnésiante), la communauté scientifique pensait que parmi les microalgues marines, seuls les dinoflagellés étaient responsables de la production de phycotoxines. Cette découverte a donc été perçue comme une révolution dans les connaissances concernant cette catégorie de toxines. En effet, avant cela, on considérait qu'après la décroissance des dinoflagellés, les coquillages pouvaient être consommés sans risque. La surveillance ne prenait pas en compte les diatomées.

4.1. Historique

C'est dans l'estuaire de l'Île-du-Prince Édouard (Canada), en 1987, que les premiers cas d'intoxications amnésiantes se sont déclarés. Les vecteurs de l'intoxication étaient des moules. Les consommateurs atteints présentaient des troubles digestifs, neurologiques et surtout une perte de mémoire (Smith, 1993). Sur les 110 personnes gravement atteintes, trois personnes sont décédées. Ces signes cliniques n'avaient pas été répertoriés auparavant. La microalgue associée était *Pseudo-nitzschia pungens f. multiseriis* (Bates, 1989).

Quelques années plus tard, après des recherches intensives, la phycotoxine responsable de ce nouveau syndrome a été identifiée comme étant l'acide domoïque (Wright *et al.*, 1989). Ce composé avait été isolé précédemment au Japon à partir de l'algue rouge *Chondria armata domoi*, car il était utilisé comme vermifuge (Takemoto et Daigo, 1958).

4.2. Répartition/biologie/écologie

Depuis l'épisode toxique découvert au Canada en 1987, de nombreux cas ont été décrits dans le monde entier.

Par exemple, de l'acide domoïque a été trouvé dans différentes espèces de diatomées du genre *Nitzschia* [spp. et](#) *Pseudo-nitzschia* [spp. et](#)/ou dans des coquillages dans les régions suivantes:

- en Europe, notamment au Danemark, en Espagne et en France ;
- à l'ouest des Etats-Unis ;
- au Japon ;
- en Nouvelle-Zélande ;
- dans le golfe de Mexico.

4.3. Espèces productrices de toxines amnésiantes

Les espèces responsables de la production d'acide domoïque sont des diatomées appartenant au genre *Nitzschia* spp. ou *Pseudo-nitzschia* [spp. et](#) non un dinoflagellé comme pour les autres intoxications. D'ailleurs, ces espèces toxiques ne produisent qu'un seul type de toxine, l'AD (voir annexe).

4.3.1. Présentation de la classe des Diatomophycées (=Diatomées)

Il existe un grand nombre d'espèces appartenant à cette classe. Elles occupent des biotopes terrestres multiples.

Les espèces qui nous intéressent dans le cadre des IAFM sont celles qui vont être capables, en plus de la production de l'AD, de proliférer en milieu côtier. Ce sont donc des espèces côtières planctoniques susceptibles de provoquer des efflorescences.

L'AD pourrait être produit par plus d'espèces qu'on ne le pense, mais si ces espèces ne prolifèrent pas sur les côtes, cela n'a pas d'incidence. C'est le cas par exemple d'une espèce de phytoplancton appartenant au genre *Amphora*. Il s'agit d'une diatomée pennée productrice d'acide domoïque, mais qui appartient aux espèces benthiques non proliférantes du genre (Billard *et al.*, 2001).

Sournia (1995) estime qu'au sein de cette classe, il existe environ 1300 espèces planctoniques et marines et parmi celles-ci, on dénombre seulement 300 espèces de Diatomophycées pennées. Par contre, les espèces appartenant à cette dernière catégorie sont surtout benthiques, et plus représentées dans les eaux continentales.

4.3.1.1. Importance de l'enveloppe dans la reconnaissance des espèces

Il existe deux grands types de Diatomophycées : les Diatomophycées centriques, chez lesquelles on ne connaît aucune espèce toxique, et les Diatomophycées pennées, qui sont considérées comme phylogénétiquement plus évoluées.

Les cellules sont protégées par un frustule, également appelé thèque. Il s'agit d'une capsule extracellulaire résistante de nature siliceuse constituée de deux parties emboîtées l'une dans l'autre, l'épithèque et l'hypothèque.

La forme de ce frustule est à la base de la classification des différentes espèces de diatomées. On distingue deux groupes:

- les diatomées centriques (Biddulphiales ou centrales) à symétrie axiale ou par rapport à un point plus ou moins central ;
- les diatomées pennées (Bacillariales ou pennaes) à symétrie bilatérale ou par rapport à une ligne.

Le microscope photonique est utilisé pour l'identification des espèces sur des frustules vides et nettoyés (Hasle et Syvertsen, 1996). Mais pour certaines espèces délicates, comme par exemple *Pseudo-nitzschia*, on a souvent recours au MEB.

4.3.1.2. Appareil locomoteur

Contrairement aux Dinophycées, les Diatomées sont des algues unicellulaires, souvent coloniales. De plus, elles ne sont jamais flagellées pendant leur phase végétative. Seuls les gamètes mâles des diatomées centriques possèdent un flagelle locomoteur.

4.3.1.3. Cycle cellulaire

Suite à la division végétative, chaque cellule fille emporte une moitié du frustule parental qui constituera son épithèque. Elle resynthétise l'hypothèque manquante. La taille des microalgues diminue au cours des mitoses successives. Cette diminution est régulièrement

compensée par le phénomène complexe de l'auxosporulation. En fait, la cellule va se détacher entièrement de son frustule d'origine et synthétiser une nouvelle capsule siliceuse plus grande (Davidovich et Bates, 1998).

4.3.1.4. Biologie

Les diatomées sont photoautotrophes. Leurs réserves, constituées d'un polysaccharide, la chrysolaminarine, sont stockées dans les vacuoles.

4.3.2. Présentation des espèces productrices de toxines ASP

Au sein des diatomées pennées, les espèces toxiques appartiennent toutes à la famille des Bacillariales (=Nitzschiacées). Au sein de cette famille, il n'existe que six genres planctoniques.

Jusqu'à une époque récente, un seul genre, *Pseudo-nitzschia*, était concerné. Ce n'est que récemment qu'a été découverte une espèce de phytoplancton appartenant au genre *Nitzschia* capable de produire de l'AD.

Actuellement sept espèces de *Pseudo-nitzschia* sont connues pour produire de l'AD (Sarno et Dahlmann, 2000)

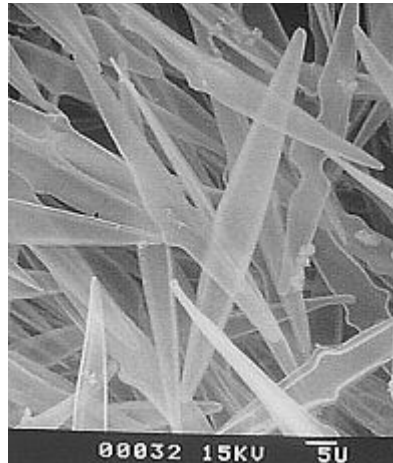
- *P. multiseriata* (= *P. pungens* f. *multiseriata*) ;
- *P. pungens* (figure 17);
- *P. seriata* ;
- *P. australis* ;
- *P. delicatissima* ;
- *P. pseudodelicatissima* ;
- *P. multistriata*.

Une seule espèce appartenant au genre *Nitzschia* est pour le moment connue pour produire de l'AD : *N. navis-varingica* (Billard *et al.*, 2001). Elle a été découverte au Vietnam.

4.3.3. *Pseudo-nitzschia* spp.

Pseudo-nitzschia se différencie du genre *Nitzschia* par des cellules fusiformes formant des colonies en escalier, par adhérence des parties apicales des valves. Les longs filaments formés sont reconnaissables. La figure 17 présente une espèce de *Pseudo-nitzschia*.

Figure 17 : *Pseudo-nitzschia pungens* au MEB
(source : Site du MBARI)



Echelle : 1 cm représente 20 μm .

Ces colonies ont une motilité relative. Cette motilité, fréquente chez les diatomées pennées, est due à l'expulsion périodique de mucilage *via* le raphé,.

Chez *Pseudo-nitzschia*, le raphé, à savoir la fente longitudinale qui parcourt le frustule, est excentré. Les espèces se différencient par la largeur et la robustesse des valves ainsi que par leur ornementation fine (stries et sporulations). Celle-ci est visible au MEB (Hasle et Syvertsen, 1996).

Le genre est cosmopolite, et comporte une vingtaine d'espèces exclusivement marines. La capacité à produire de l'acide domoïque est plus ou moins forte selon les espèces et certaines peuvent, par ailleurs, présenter des clones apparemment non toxiques.

Les espèces les plus toxiques pour l'environnement sont *P. australis* et *P. multiseriis* suivies de *P. pseudodelicatissima*. Responsables du syndrome IAFM, ces algues (*P. australis* en particulier) sont également néfastes pour les vertébrés marins, provoquant des mortalités importantes notamment chez les oiseaux et des mammifères marins tels les phoques (Scholin *et al.*, 2000). Dans ces cas, les poissons herbivores comme les anchois sont les principaux vecteurs de ces algues.

Les efflorescences à *Pseudo-nitzschia* semblent favorisées par les apports d'eaux douces riches en silicate (Scholin *et al.*, 2000) et l'augmentation de ces proliférations est peut-être en rapport avec l'eutrophisation des eaux côtières.

On remarquera qu'en France, aucune efflorescence massive à *Pseudo-nitzschia* n'avait été signalée avant 1998 et que, cette année-là coïncide avec la mise en évidence de coquillages contaminés dans différents secteurs des côtes de la Manche suite à des proliférations de *P. pseudodelicatissima* (Amzil *et al.*, 2001b).

Outre celle-ci, *P. multiseriis*, responsable de la contamination de coquillages en 1999 (Amzil *et al.*, 2001b), ainsi que *P. pungens*, *P. delicatissima* et *P. fraudulenta*, ont été identifiées en France. *P. fraudulenta* n'est pas réputée toxique. Parmi les autres espèces toxiques connues, une espèce d'eaux froides, *P. seriata*, n'a pas été observée à ce jour en France, de même que *P. australis*, espèce d'eaux chaudes.

4.3.4. Nitzschia spp.

Ce genre morphologiquement proche du précédent ne forme pas de colonies et s'en distingue par des détails d'ornementation de ses frustules (Hasle et Syversten, 1996). Il est réputé benthique, parfois épiphyte et ne comporte que très peu d'espèces planctoniques, en général mal connues.

Il s'agit d'un genre composé de plus de 900 espèces (majoritairement dulçaquicoles). On estime qu'il est possible de découvrir à l'avenir d'autres espèces toxiques appartenant à ce genre.

4.4. Propriétés physico-chimiques

4.4.1. Structure

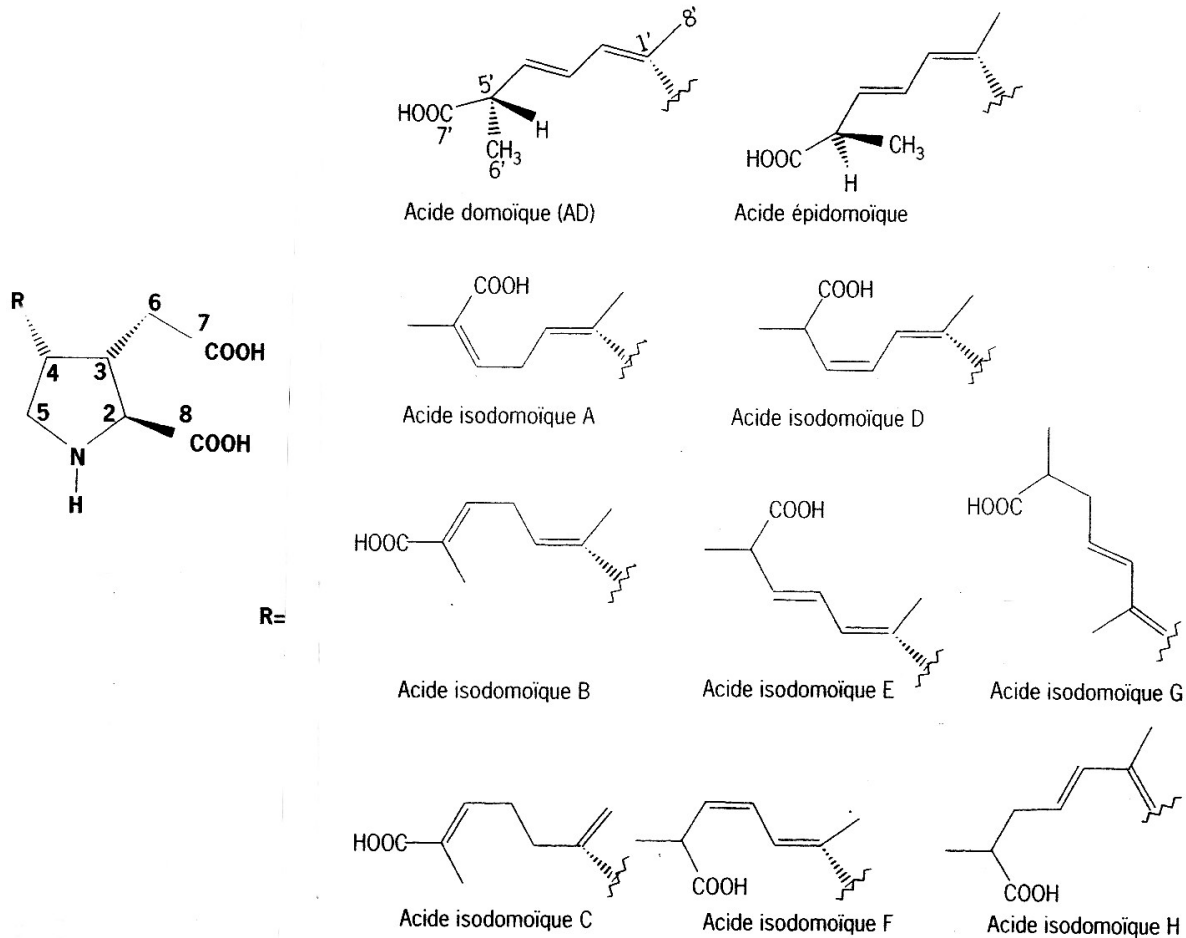
L'acide domoïque est un acide aminé secondaire tricarboxylique de formule $C_{15}H_{21}NO_6$ comprenant 15 atomes de carbone et dont la chaîne latérale possède deux liaisons éthyléniques (voir la figure 18)

L'acide domoïque appartient au groupe des neurotoxines de type acide kaïnique. En effet, il est structurellement proche de l'acide glutamique (neurotransmetteur) et de l'acide kaïnique (neuroexcitateur). Cet élément est très important pour expliquer le mécanisme d'action de l'acide domoïque (voir le chapitre « mécanisme d'action de l'acide domoïque »).

À des températures élevées (> à 50 °C), il se produit une isomérisation progressive de l'acide domoïque pour donner principalement son épimère, l'acide épidoïmoïque. En plus de ce dernier, seuls les acides isodomoïque D, E et F sont impliqués dans les intoxications amnésiantes.

L'AD est prépondérant par rapport à ses sept isomères dans 95 % des cas (Krys et Frémy, 2002).

Figure 18 : Structure de l'acide domoïque et de ses dérivés (Amzil *et al.*, 2001a).
La structure de base est présentée à gauche de la figure.



4.4.2. Propriétés

Les propriétés physico-chimiques de l'acide domoïque révèlent un point de fusion à 216 °C, un pouvoir optique rotatoire $[\alpha]_D$ égal à - 120,5°, un poids moléculaire de 311 et une absorbance en UV à 242 nanomètres.

L'acide domoïque est thermostable, soluble dans les solvants aqueux et instable en milieu acide.

4.5. Biosynthèse

L'AD est formé à partir de deux précurseurs issus de la photosynthèse :

- un acide aminé, le glutamate,
- le géranyl pyrophosphate (GPP), qui est un composé isoprénoïde monoterpénique, c'est-à-dire une chaîne polymérique biméthylée à 10 atomes de carbone.

Ces deux composés sont assemblés par condensation entre l'extrémité aminée du glutamate et celle pyrophosphatée du géranyl, pour former le cycle proline de la molécule d'AD (Bates,

1998). On ignore encore où s'effectue cet assemblage dans la cellule (cytoplasme ou chloroplaste) et quelles enzymes y contribuent.

4.6.Facteurs influençant la toxinogénèse

L'AD appartient à la famille des toxines azotées, tout comme les saxitoxines. Mais la toxinogénèse de l'AD est moins bien connue que celle des STX. En effet, les STX ont été découvertes depuis plus longtemps, et dans le monde, les épisodes de d'IPFM sont plus nombreux que les épisodes d'IAFM.

La production d'AD par les diatomées a été décrite pour la première fois en 1989, par Bates *et al.*

4.6.1.Facteurs génétiques

Des différences clonales ont été observées concernant la capacité de production d'AD, certains clones en produisant plus ou moins et d'autres non. Des cultures axéniques, exemptes de bactéries, continuent de produire de l'AD. À ce jour, aucune bactérie intracellulaire n'a été trouvée dans les souches toxiques de *Pseudo-nitzschia*, de même qu'aucune bactérie libre n'est actuellement connue comme produisant de l'AD (Bates, 1998). La capacité de synthèse serait alors inscrite dans le génome de ces diatomées, sinon dans celui de leurs chloroplastes.

4.6.2.Reproduction des diatomées

Le cycle biologique des cellules a un rôle important sur la production d'AD. Au cours de la reproduction sexuée des diatomées, les cellules deviennent de plus en plus petites. Or, les petites cellules contiennent jusqu'à 100 fois moins d'AD que les grosses cellules. Lorsque ces petites cellules atteignent une taille critique, elles deviennent aptes à la reproduction sexuée. Les grandes cellules obtenues synthétisent au début peu de toxines, mais leur capacité à produire des toxines croît jusqu'à devenir maximale au bout de quelques mois. La reproduction des *Pseudo-nitzschia* est par conséquent un élément à prendre en compte lorsqu'on cherche à déterminer la toxicité d'une souche.

4.6.3.Toxinogénèse et cycle cellulaire

Plusieurs études (Grzebyk et Séchet, 2001) ont montré que la production de toxine se fait mal pendant la phase de croissance, un peu pendant la phase stationnaire, et beaucoup au cours de la phase de sénescence.

En fait, d'après ces travaux, il semble que les cellules produisent massivement de l'AD quand leur taux de croissance décroît en dessous d'un certain seuil situé vers $0,3-0,4 \text{ j}^{-1}$ et sous certaines conditions environnementales.

4.6.4.Toxinogénèse et facteurs environnementaux

L'AD sort facilement des cellules algales pour se retrouver dans le milieu. On ignore si le mécanisme responsable de la sortie des toxines est actif ou passif. Par contre, on sait que la quantité de toxines qui se retrouve dans le milieu dépend de facteurs environnementaux. Or, c'est la concentration en toxines dans la cellule qui est responsable de la toxicité des coquillages.

4.6.4.1. Température

D'après Grzebyk et Séchet (2001), à basse température, la production d'AD est diminuée. Par contre, la proportion d'AD libérée dans le milieu augmente. Cela expliquerait l'apparition de coquillages toxiques lors de floraisons hivernales de *Pseudo-nitzschia*.

4.6.4.2. Salinité

L'influence de la salinité sur la croissance des microalgues et de la production de toxines n'a pas fait l'objet d'expériences précises pour le moment.

4.6.4.3. Lumière

Une diminution de l'éclairement ralentit la photosynthèse et entraîne une diminution du taux de croissance de *Pseudo-nitzschia*, et donc une diminution de la production d'AD.

4.6.4.4. Teneur du milieu en nutriments

La teneur en azote dans le milieu influence la quantité d'AD produite. En effet, nous l'avons vu, l'AD est une toxine azotée. L'épuisement du milieu en azote entraîne une baisse importante de la production d'AD, mais ne la bloque pas complètement.

La teneur en phosphore et en silice du milieu a l'effet inverse. C'est dans les milieux pauvres en phosphore et en silice que les cellules algales produisent de l'AD.

Il est difficile de savoir précisément à quel(s) moment(s) du cycle a lieu la production d'AD. En effet, la progression dans le cycle cellulaire des diatomées peut être arrêtée à deux moments différents. La déficience des cellules en phosphore provoque l'arrêt de la croissance algale, vraisemblablement pendant la phase G1 du cycle cellulaire avant la phase S. La déficience des diatomées pennées en silice arrête la progression du cycle cellulaire à deux moments différents (Grzebyk et Séchet, 2001). Le premier se situe à la limite des phases G1 et S, juste avant la réplication de l'ADN, laquelle serait dépendant d'une certaine quantité de silice intracellulaire. Le deuxième point d'arrêt du cycle cellulaire se situe après la phase S, en fin de phase G2 ou pendant la mitose (phase M), au moment de la formation du nouveau frustule précédant la séparation des deux cellules filles. Cependant, il est difficile de dire si ces deux moments d'arrêt liés à la déficience en silice sont à rapprocher des deux phases de production d'AD observées par Grzebyk et Séchet (2001).

4.6.5. Rôle des bactéries extracellulaires dans la toxinogénèse.

Certaines espèces de bactéries semblent avoir un rôle important dans la production d'AD. En effet, Osada et Stewart (1997) ont montré que chez les différentes souches de *P. multiseriis*, la capacité de production d'AD en condition axénique est conservée mais elle est beaucoup plus faible que dans des cultures non axéniques.

Une explication a été avancée par Osada et Stewart (1997). Les *Pseudo-nitzschia* synthétisent plus d'AD en présence d'acide gluconique et de gluconolactone. Or, certaines souches de bactéries isolées de *P. multiseriis* produisent ces deux composés à partir de glucose.

En fin de phase de croissance, la communauté bactérienne associée à une population microalgale change en réponse à l'excrétion de composés organiques par les microalgues. On peut faire l'hypothèse suivante : les souches bactériennes qui favorisent la production

d'AD se développeraient principalement lorsque la population de *Pseudo-nitzschia* arrive en phase stationnaire.

5. Les Azaspiracides

Les azaspiracides (AZ) possèdent des propriétés originales. Cela a conduit les scientifiques à définir une nouvelle intoxication : l'AZP (Azaspiracid Poisoning) (James *et al.*, 2000).

Malgré le fait que les AZ entraînent des symptômes de type diarrhéique chez l'Homme, ils n'ont pas été classés dans la catégorie des toxines diarrhéiques, car ils ne possèdent pas le même mécanisme d'action.

5.1. Découverte

L'AZ a été découverte en 1995 suite à l'intoxication d'une dizaine de consommateurs néerlandais qui avaient consommé des moules irlandaises.

Les symptômes que présentaient ces consommateurs ressemblaient beaucoup à ceux d'une IDFM, à savoir (Marcaillou-Le Baut *et al.*, 2001) :

- des nausées ;
- des vomissements ;
- des diarrhées sévères ;
- des douleurs stomacales.

Ces symptômes régressaient en 3 à 5 jours.

Or, ces moules avaient été déclarées indemnes de toxines diarrhéiques.

Un bioessai sur souris a alors été effectué, et les extraits de moules présentaient une forte toxicité pour les animaux.

Les toxines diarrhéiques ont alors été recherchées par des méthodes physico-chimiques : la DTX2 et l'AO ont été retrouvées à l'état de trace. Cela ne pouvait donc pas expliquer la forte toxicité observée sur les souris. Les travaux de purification ont conduit à l'isolement d'une nouvelle toxine : l'AZ.

5.2. Répartition

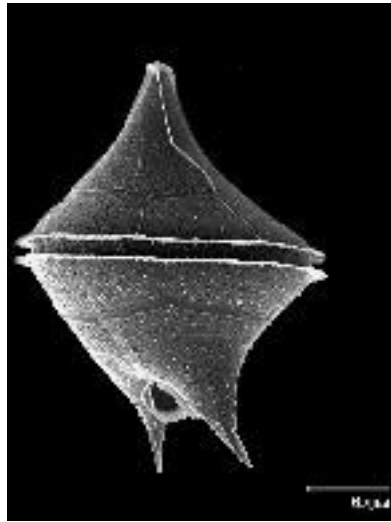
Pour le moment, ces intoxications AZP n'ont été décrites qu'en Europe (Irlande, France, Pays-Bas, Italie, Royaume-Uni) (James *et al.*, 2000).

5.3. Espèces productrices d'AZ

La preuve de la production d'AZ par une espèce de microalgue n'a pas été démontrée à ce jour.

Par contre, comme les AZ sont des toxines polyéthers, on émet l'hypothèse que l'espèce productrice appartiendrait à la classe des Dinoflagellés. L'espèce en cause serait *Protoperdinium crassipes* (figure 19) (Cembella *et al.*, 2000).

Figure 19 : *Protoperidinium crassipes* au MEB
(source : Site du NMNH)



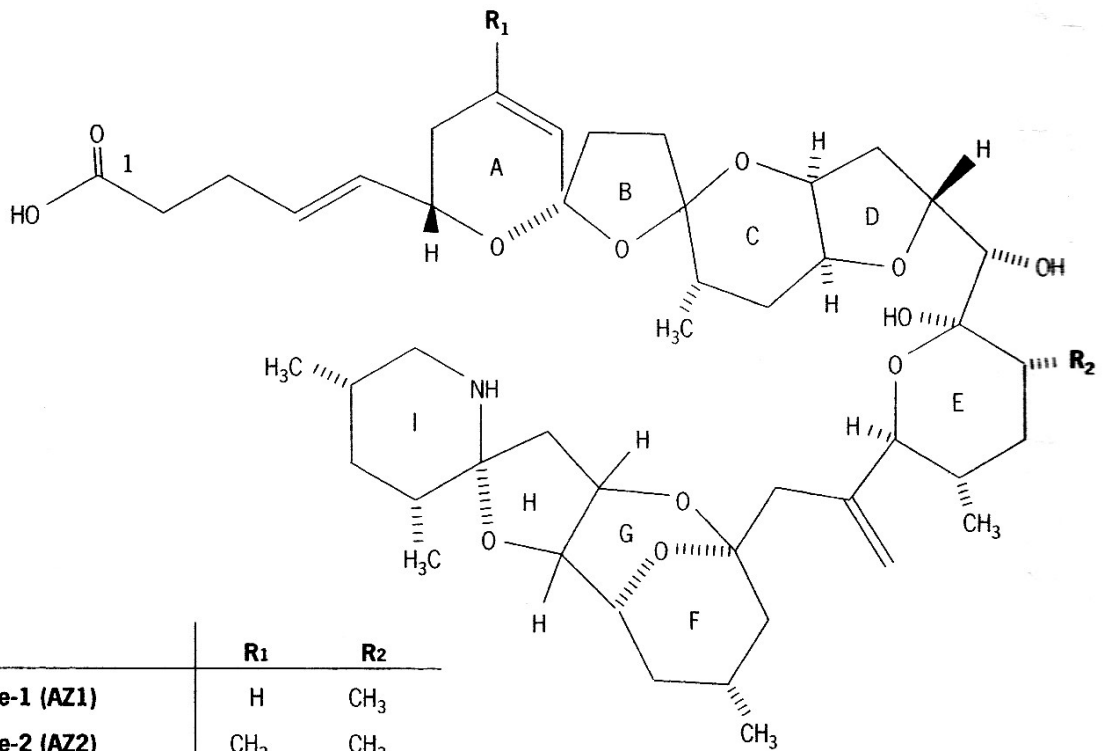
Echelle : le trait blanc représente 10 μm .

5.4. Propriétés physico-chimiques des AZ

Les azaspiracides 1, 2 et 3 sont des molécules à squelette polycyclique oxygéné à 40 carbones diversement méthylés, de type polyéther, à chaîne carbonée terminale porteuse d'une fonction acide carboxylique et d'une fonction imine cyclique.

La famille des azaspiracides est composée de trois toxines (fig.20): l'azaspiracide-1 (AZ1, $\text{C}_{47}\text{H}_{71}\text{NO}_{12}$, PM 841) et ses dérivés (AZ3 $\text{C}_{46}\text{H}_{69}\text{NO}_{12}$ PM 855) correspondant respectivement aux analogues de l'AZ1 méthylé et déméthylé (substitution d'un hydrogène par un méthyle et inversement) (Ofuji *et al.*, 1999).

Figure 20 : Structure des azaspiracides (Amzil *et al.*, 2001a).



	R ₁	R ₂
Azaspiracide-1 (AZ1)	H	CH ₃
Azaspiracide-2 (AZ2)	CH ₃	CH ₃
Azaspiracide-3 (AZ3)	H	H

Il existe cinq autres analogues de l'AZ mais ils ne sont pas pris en compte sur le plan de la santé publique.

5.5. Contamination des vecteurs coquillages

A la différence des autres toxines diarrhéiques, les huîtres sont contaminées à des niveaux équivalents à ceux des moules et la détoxification des coquillages est très longue (8 mois environ). De plus, l'azaspiracide est présent de façon uniforme dans l'ensemble du corps des coquillages et non pas concentré dans l'hépatopancréas (Marcaillou-Le Baut *et al.*, 2001).

6. Les toxines de découverte récente

De nombreuses phycotoxines ont été isolées, soit directement dans les coquillages, soit dans le phytoplancton, soit les deux.

L'objectif d'une énumération est double :

- montrer la nécessité d'utiliser des tests peu spécifiques comme les bioessais sur souris qui permettent de ne pas passer à côté de nouvelles toxines, qui pourraient être dangereuses pour l'Homme ;
- montrer l'importance de la veille scientifique, des réseaux de surveillance, de la recherche en général, notamment pour déterminer si ces toxines sont dangereuses pour l'Homme.

Toutes ces toxines sont des dangers potentiels, contrairement aux toxines vues précédemment qui sont des dangers avérés.

6.1. Les toxines à cycle imine (autres que les azaspiracides)

Dans les années quatre-vingt-dix, trois familles de toxines ayant en commun un cycle imine dans leurs molécules (spiroolides, gymnodimines, azaspiracides) ont été isolées à partir de coquillages ayant provoqué une toxicité aiguë sur souris avec des symptômes de type neurologique.

Seule la présence des azaspiracides dans les bivalves a été liée à des intoxications pour les consommateurs, c'est pour cela qu'ils ont fait l'objet d'une partie séparée.

6.1.1. Les spiroolides

Les spiroolides constituent une autre catégorie de phycotoxines pouvant s'accumuler dans les coquillages. A ce jour, la toxicité éventuelle pour l'Homme n'est pas connue.

Elles ont été mises en évidence en France lors de l'épisode toxique qui a eu lieu en avril mai 2005 en baie d'Arcachon et qui a entraîné la fermeture de cette zone pendant plusieurs semaines. L'espèce *Alexandrium ostenfeldii* a été détectée, en plus des *Dinophysis*. Elles étaient associées à la présence de toxines diarrhéiques.

6.1.1.1. Découverte

Les spiroolides sont des neurotoxines macrocycliques mises en évidence en 1991 dans les coquillages (moules, coquilles Saint-Jacques) en Nouvelle-Écosse (Canada) lors des contrôles de routine pour le dépistage des toxines diarrhéiques (Hu *et al.*, 1995).

6.1.1.2. Espèces productrices de spiroolides

La répartition spatio-temporelle de ces toxines coïncide avec les proliférations phytoplanctoniques estivales (mai à juillet) mais leur origine exacte n'a été élucidée qu'en 1998. Elles ont été attribuées au dinoflagellé *Alexandrium ostenfeldii* producteur également de toxines paralysantes. D'ailleurs, des traces de ces dernières ont été trouvées en même temps que les spiroolides dans les extraits de coquillages (Cembella *et al.*, 2000).

A. ostenfeldii est une Gymnodiniale qui produit également des toxines paralysantes. On peut se demander s'il existe un lien entre la production des spiroolides et des toxines paralysantes. Or, d'après Cembella *et al.*, 2000, la production de spiroolides en culture n'a pour l'instant été démontrée que chez *A. ostenfeldii* (souches du Canada et du Danemark) et elle est

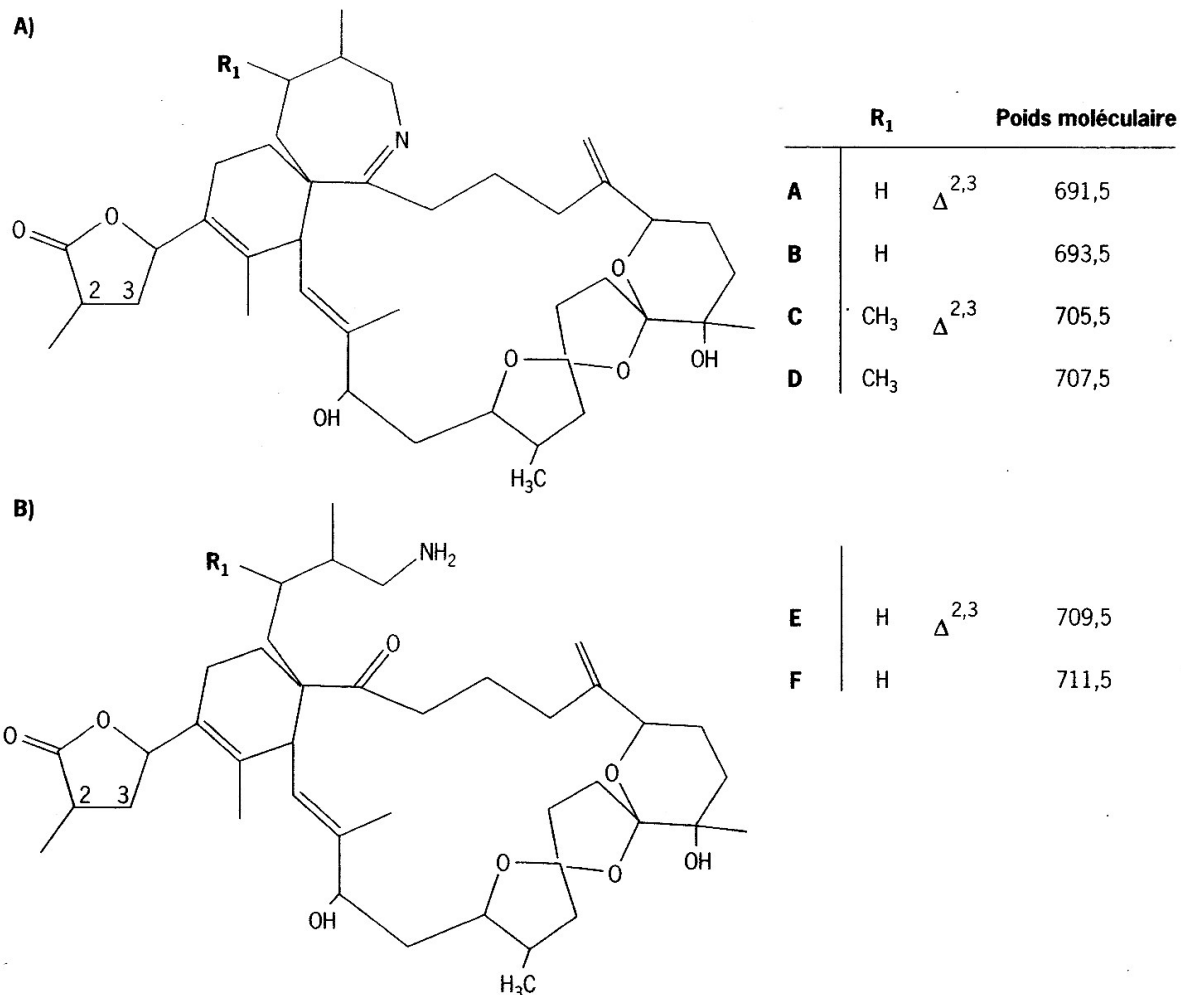
notoirement absente chez un clone toxique d'*A. tamarense*. Il n'y a semble-t-il aucun lien entre la production de toxines paralysantes et de spirolides.

6.1.1.3. Propriétés physico-chimiques des toxines

Les spirolides (A à F) constituent – comme les PTXs – une famille de polyéthers macrocycliques ou macrolides.

Les structures des formes actives A,B,C,D et inactives E,F n'ont été identifiées qu'en 1995 (fig. 21). La structure de base des formes actives est $C_{42}H_{63}NO_7$ (PM 693,5), chaque forme diffère des autres par la substitution d'un hydrogène par un méthyle (Hu *et al.*, 1996). Comme les spirolides inactifs E,F ont été extraits uniquement à partir des coquillages, ils pourraient être des produits de dégradation formés lors du métabolisme des formes actives dans les coquillages. Il semblerait que l'activité des spirolides soit due à la présence du cycle imine puisqu'il est absent dans les formes inactives.

Figure 21 : Structure des spirolides actifs (A) et inactifs (B) (Amzil *et al.*, 2001a).



Δ^{2,3} : double liaison entre les carbones 2 et 3

6.1.1.4. Mécanisme d'action

Bien que les spirolides provoquent des symptômes caractéristiques chez la souris impliquant une activité au niveau du système nerveux central (Hu *et al.*, 1996), les études pharmacologiques des effets de ces toxines n'ont pas permis, là encore, de préciser leur mode d'action au niveau cellulaire. En effet, aucun effet des spirolides n'a pu être mis en évidence *in vitro*, que ce soit sur les récepteurs NMDA, AMPA et kaïnate, les canaux sodium activés par le potentiel de membrane ou encore les protéines phosphatases PP1 et PPA2 si ce n'est une faible activation des canaux calcium de type L dépendants du potentiel de membrane.

6.1.2. La gymnodimine

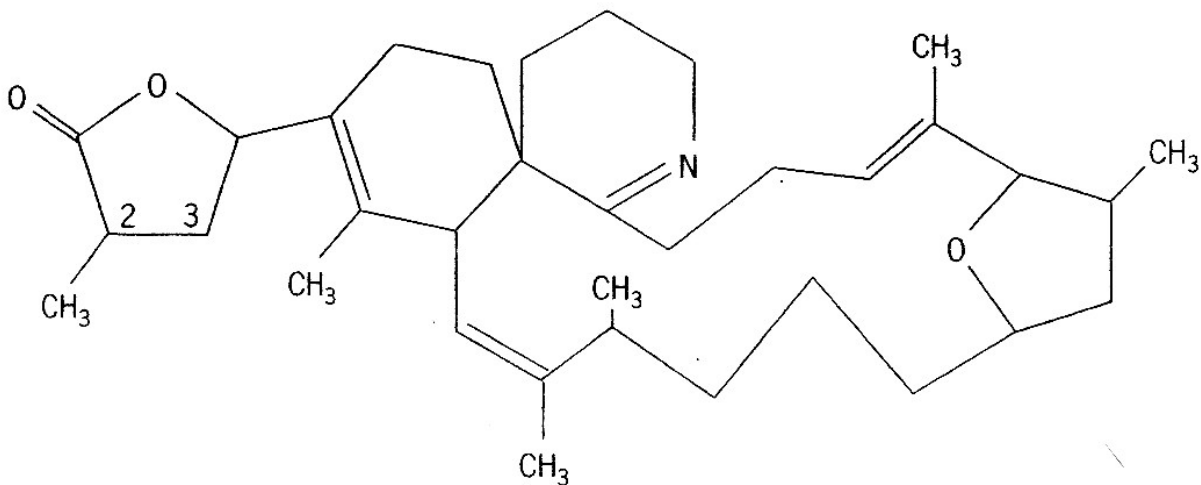
La dernière toxine à cycle imine est la gymnodimine. C'est une toxine qui a été trouvée dans des coquillages, sans provoquer jusqu'à présent d'intoxication alimentaire.

En 1993, des extraits d'huîtres de Nouvelle-Zélande, testés dans le cadre du contrôle de la salubrité des coquillages, ont présenté une forte toxicité sur souris avec des symptômes neurologiques, sans qu'aucune intoxication humaine ne soit signalée. Elles ont été isolées à partir d'huîtres contaminées (Seki *et al.*, 1995).

La gymnodimine a été récemment identifiée en Tunisie et au Canada (Munday *et al.*, 2004).

Les travaux d'isolement du principe actif à partir des huîtres collectées ont conduit à l'identification d'une nouvelle neurotoxine marine baptisée « gymnodimine » de structure $C_{32}H_{45}NO_4$ de PM 507 (fig. 22) (Seki *et al.*, 1995). La gymnodimine est un polyéther pentacyclique complexe.

Figure 22 : Structure de la gymnodimine (Amzil *et al.*, 2001a).



L'origine de cette toxine a été attribuée au dinoflagellé *Gymnodinium* cf. *mikimotoi* puisque, d'une part, une efflorescence de ce dernier a été observée à la même période et, d'autre part, la gymnodimine a été également isolée en culture à partir de cette souche. Cet organisme a été récemment renommé *Karenia selliformis* (Krys et Frémy, 2002).

Karenia selliformis (= *Gymnodinium mikimotoi*) appartient au même genre que *Karenia brevis* (= *G. brevis*), producteur de brevétoxines (toxines neurologiques). En fait, *Karenia selliformis* s'apparente aux brevétoxines de *Karenia brevis* mais avec une structure moins complexe.

La gymnodimine que produit *Karenia selliformis* est particulièrement toxique pour la faune et la flore marines. Il produit également des aérosols pouvant être toxiques pour l'Homme, mais pas d'intoxication alimentaire.

L'injection intrapéritonéale de doses létales chez la souris provoque des troubles neurologiques (queue incurvée, hyperactivité, paralysie et détresse respiratoire) conduisant à la mort de l'animal en 3 à 15 minutes (Puisseux-Dao *et al.*, 2001). Les études pharmacologiques des effets de la gymnodimine n'ont pas permis de préciser son mode d'action au niveau cellulaire. En effet, aucune activation de canaux ioniques ne semble être impliquée dans l'activité de la toxine qui, de plus, a été décrite comme n'étant ni hémolytique ni cytotoxique.

De nombreuses études sur la toxicologie de ces toxines ont été menées pour connaître la dangerosité de la gymnodimine chez le consommateur pour deux raisons (Amzil *et al.*, 2001a):

- d'une part, la toxine n'est pas seulement présente dans les glandes digestives des coquillages, mais dans l'ensemble de l'organisme,
- d'autre part, on n'arrive pas à effectuer une détoxification efficace des coquillages vis-à-vis de cette toxine. De plus, la gymnodimine peut rester plusieurs années dans les huîtres.

Munday *et al.*, 2004, ont réalisé une étude afin de déterminer la toxicité sur des souris par injection de gymnodimine intrapéritonéale et par voie orale. Ils ont trouvé une toxicité élevée par voie intrapéritonéale (DL₅₀ 96 µg/kg). La gymnodimine présentait également une toxicité assez élevée lorsqu'ils ont gavé les souris (DL₅₀ 755 µg/kg). Par contre, lorsque la toxine était mélangée à de la nourriture, aucun signe de toxicité n'a été trouvé. Selon eux, cela montre que le risque que la gymnodimine soit dangereuse lorsqu'elle est ingérée par l'Homme par le biais des coquillages est très faible.

6.2. Autres phycotoxines, sources potentielles de nouveaux agents neurotoxiques

6.2.1. Les prorocontrolides

Prorocentrum lima et *Prorocentrum maculosum* ne synthétisent pas seulement des toxines diarrhéiques. Ils produisent, pour le premier, la prorocontrolide, et pour le deuxième, la prorocontrolide B. On ignore si ces toxines peuvent provoquer des intoxications alimentaires chez l'Homme.

Comme les PTXs et les spirolides, ce sont des polyéthers macrocycliques ou macrolides.

Torigoe *et al* ont montré en 1998 que ces toxines, lorsqu'elles sont injectées par voie intrapéritonéale à des doses létales, provoquent la mort des souris en quelques minutes seulement.

Au niveau du mécanisme d'action, il est intéressant de noter que les prorocontrolides n'exercent aucune activité d'inhibition des phosphatases (Hu *et al.*, 1996).

6.2.2. La cooliatoxine

La cooliatoxine a été purifiée à partir de cultures du dinoflagellé benthique *Coolia monotis*.

C'est un polyéther supposé être un analogue monosulfaté des yessotoxines, d'après la caractérisation partielle de sa structure chimique.

De plus, les injections intrapéritonéales de doses létales de cooliatoxine chez la souris provoquent, après un long délai, des symptômes similaires à ceux décrits pour les yessotoxines, à savoir une hypothermie, une détresse respiratoire et des convulsions qui précèdent la mort de l'animal (Puisseux-Dao *et al.*, 2001).

6.2.3. La goniodomine A

Isolée et purifiée à partir du dinoflagellé *Alexandrium pseudogonyaulax*, la goniodomine A est un polyéther macrocyclique qui, comme les pecténotoxines, interagit directement avec l'actine (Matsunaga *et al.*, 1999).

6.2.4. Les amphidinolides et le caribénolide I

Les amphidinolides et le caribénolide I, polyéthers macrocycliques, isolés à partir des dinoflagellés du genre *Amphidinium*, sont connus pour exercer une activité cytotoxique au niveau des cellules cancéreuses, le caribénolide I étant environ 100 fois plus efficace que les amphidinolides (Tsuda *et al.*, 2000). De plus, il a été montré que les amphidinolides, comme les pecténotoxines et la goniodomine A, interagissent avec l'actine.

Les amphidinolides accroissent la contraction musculaire (Puisseux-Dao *et al.*, 2001).

En conclusion de cette partie, la dénomination « phycotoxines » renferme en fait de nombreuses toxines. Leur structure, qu'elle soit azotée (toxines paralysantes et amnésiantes) ou polyéthers (toxines diarrhéiques et neurologiques) est toujours complexe. Les propriétés de ces toxines diffèrent également. Par exemple, les toxines paralysantes et les toxines amnésiantes sont hydrophiles, alors que les toxines diarrhéiques et les toxines neurologiques sont hydrophobes. Elles sont toutes thermostables, et ne s'éliminent pas lors de processus d'appertisation. Une phycotoxine donne souvent naissance à de nombreux dérivés, de toxicité variable.

La plupart des phycotoxines sont synthétisées par des espèces de phytoplancton appartenant à l'ordre des Dinophysiales, à l'exception des toxines amnésiantes qui sont synthétisées par des espèces de phytoplancton appartenant à l'ordre des Diatomées. Dans la plupart des cas, une même phycotoxine peut être synthétisée par des espèces de phytoplancton différentes.

La liste des phycotoxines n'est pas figée : de nouvelles toxines sont régulièrement découvertes.

Il est important d'avoir à l'esprit l'ensemble de ces caractéristiques avant d'aborder la caractérisation des dangers que représentent ces toxines.

B. Caractérisation des dangers

L'étape de caractérisation des dangers consiste à évaluer la nature des effets adverses pour la santé associés au danger (Codex Alimentarius, 1999). Il s'agit de la deuxième étape de l'évaluation des risques.

1. Les toxines paralysantes

1.1. Toxicité/mécanisme d'action

1.1.1. Toxicité des différents composés

D'après Cembella (1998), les composés les plus toxiques sont les carbamates, et les moins toxiques les N-sulfocarbamoyles. Les dérivés décarbamoyles possèdent une toxicité intermédiaire.

1.1.2. Mécanisme d'action

Les saxitoxines (STXs) et les gonyautoxines (GTXs) appartiennent à la famille des phycotoxines guanidiniques, tout comme les tétrodoxines, qui sont produites par des poissons. Cette famille de toxines a pour principal mécanisme le blocage des canaux sodium. Ces toxines sont toutes neurotoxiques.

Les toxines paralysantes vont agir sur les canaux sodium. Les canaux sodium sont des protéines situées dans la membrane plasmique des cellules nerveuses. Des mouvements d'ions, essentiellement sodium, ont lieu à cet endroit. Ces canaux ont un rôle fondamental dans la genèse et dans la propagation de l'influx nerveux. En effet, leur activation provoque leur ouverture, et correspond à la phase ascendante du potentiel d'action. A l'inverse, leur inhibition provoque la fermeture des canaux et correspond à la phase décroissante du potentiel d'action (Krys *et al.*, 2001).

Six sites récepteurs ont été identifiés sur ces canaux. De nombreuses toxines peuvent interagir avec sur un ou plusieurs de ces sites pour altérer l'activité de ces canaux.

Plusieurs expériences ont démontré que la cible moléculaire des toxines guanidiniques – auxquelles appartiennent les toxines paralysantes – est le récepteur 1 des canaux sodium. L'affinité de ces toxines pour les canaux est grande. L'interaction est liée aux groupements guanidinium et certains groupes hydroxyl des toxines (Benoit et Dubois, 1990).

Cette interaction des toxines paralysantes avec les canaux sodium entraîne leur blocage.

De nombreuses données suggèrent fortement que le blocage du canal sodium par les toxines guanidiniques ne consiste pas en une simple obstruction du pore par les toxines elles-mêmes mais résulte d'un mécanisme plus complexe basé sur une localisation externe, à proximité et non pas à l'intérieur du pore, d'un ou de deux site(s) récepteur(s), l'obstruction du pore étant produite par une partie des molécules toxiques et ou par un changement de conformation du canal (Puisseux-Dao *et al.*, 2001).

En conséquence, les toxines guanidiniques inhibent la genèse des potentiels d'action et, en particulier, empêchent leur propagation le long des axones, des terminaisons nerveuses et

des fibres musculaires. De ce fait, au niveau des synapses chimiques, et notamment au niveau de la jonction neuromusculaire, ces toxines bloquent la libération de neurotransmetteurs provoquée par l'impulsion nerveuse et ce, sans affecter leur libération spontanée.

Ce mécanisme d'action permet d'expliquer les symptômes de nature neurologique rencontrés lors d'une IPFM chez l'Homme.

1.2.Symptômes provoqués chez le consommateur

Les symptômes qui accompagnent ce type d'intoxication sont assez caractéristiques : ils consistent en des troubles digestifs précoces suivis par des troubles neurologiques graves (fatigabilité musculaire importante, convulsions et paralysies flasques avec détresse respiratoire). Ils ne peuvent pas être confondus avec ceux présentés lors d'une allergie ou d'une infection virale ou bactérienne.

Les premiers signes l'intoxication apparaissent peu de temps après l'ingestion des coquillages, de 30 à 120 minutes (Marcaillou-Le Baut *et al.*, 2001). Ils se développent en quelques heures suivant une séquence de signes pathologiques dont la gravité dépend de la dose ingérée et de la sensibilité individuelle.

Dans la plupart des cas, le rétablissement est total en quelques jours mais, dans les cas les plus graves, la survenue de paralysie respiratoire peut entraîner la mort. La synthèse des descriptions de ces symptômes a été résumée par Tréguer, en 1998 qui, comme la plupart des auteurs, distingue trois niveaux de gravité :

- l'intoxication moyenne : les signes de début sont des paresthésies buccales, parfois isolées qui peuvent cependant s'étendre au visage et au cou, ainsi qu'aux extrémités des doigts et des orteils; on peut observer des céphalées, des nausées, des vomissements;
- l'intoxication sévère : la paresthésie s'étend aux quatre membres et s'accompagne d'une sensation d'engourdissement et de faiblesse musculaire et d'une sensation subjective de flottement. On observe aussi des troubles de la parole avec dysarthrie, une ataxie importante, une incoordination motrice. À ce stade, on note des difficultés respiratoires avec des sensations d'étouffement;
- l'intoxication extrême : le syndrome s'aggrave par apparition de paralysies périphériques dont des paralysies respiratoires qui peuvent conduire à la mort s'il n'y a pas une assistance médicale précoce. Malgré une bonne connaissance du mode d'action, il n'y a pas d'antidote à cette intoxication. L'intervention la plus efficace est la vidange gastrique en urgence ou l'administration de charbon actif ou de boissons alcalines qui favoriseront l'inactivation des toxines et leur élimination par les urines. Les cas graves sont mis sous assistance respiratoire pour compenser les effets paralysants.

Le taux de létalité est très variable suivant les épisodes et il tend à diminuer avec le niveau d'information des populations exposées.

Par exemple, Prakash *et al.* (1971) recensent 21 morts sur 107 cas authentifiés dans la région du Saint-Laurent entre 1880 et 1970, ce qui donne environ 20 % de létalité. Pour la baie de Fundy, il relève trois morts sur 80 cas entre 1889 et 1961.

Toutefois, depuis les années quatre-vingt, on assiste à une diminution des intoxications - même s'il y a encore des accidents isolés - bien que les proliférations des espèces

productrices de toxines paralysantes semblent s'étendre dans le monde. Cette amélioration du point de vue de la santé publique est le résultat de la mise en place des réseaux de surveillance et d'une meilleure diffusion de l'information.

2. Les toxines diarrhéiques et associées

2.1. L'Acide Okadaïque et autres dinophysistoxines

2.1.1. Mécanisme d'action des toxines

2.1.1.1. Inhibition de protéines phosphatases

La majorité des données que nous possédons ne concerne que l'AO, et très peu les dinophysistoxines.

Le mécanisme d'action de l'AO, de la DTX1 et de la DTX2 est le suivant : ils inhibent certaines protéines phosphatases spécifiques de résidus sérine et thréonine. Les phosphatases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse d'un groupe phosphorylate d'un acide aminé situé à l'extrémité d'une chaîne protéique. La réaction inverse est assurée par les kinases (Mestrovic et Pavela-Vrancic, 2003).

Les sérine/thréonine phosphatases sont classées en quatre sous-unités : PP1, PP2A, PP2B et PP2C, selon leurs caractéristiques biochimiques (sensibilité à des inhibiteurs spécifiques et spécificité de leur substrat).

Des études utilisant des enzymes purifiées (Bialojan et Takai, 1988) ont montré que l'AO a une forte affinité pour la PP2A et la PP1 qui sont très proches structurellement; l'affinité est moindre pour la PP2B et nulle pour la PP2C. Par ailleurs, l'AO n'a pas (ou peu) d'affinité pour les phosphatases acides *et alcalines* (Bialojan et Takai, 1988).

Seules les PPs à sérine/thréonine sont inhibées et plus particulièrement les PP1, 2A, (4, 5 et 6) tandis que les PP2B (et 7) sont relativement résistantes. Ces résultats seraient liés à une conformation différente des deux types de PP, avec pour les PP1, une certaine obstruction du site de liaison avec la partie catalytique de l'enzyme. Par contre, la liaison sur les PP1 et 2A est de type non compétitive; des modifications de la structure chimique (perte du groupement carboxyle, réduction en okadaol ou estérification) provoquent une diminution d'affinité. La sensibilité vis-à-vis de ces 2 PPs semble remarquablement bien conservée chez les eucaryotes (Bialojan et Takai, 1988) tandis que les PPs des cellules procaryotes sont résistantes. Au niveau de la PP2A, les carbones 2, 7, 24 et 27 jouent un rôle important pour l'interaction de l'AO avec sa cible. Ces interactions seraient de nature hydrophobes.

Des travaux réalisés avec la PP1 montrent que la structure et la conformation de la boucle β 12- β 13 sont très importantes pour le contrôle de ses fonctions (Puisseux-Dao *et al.*, 2001).

L'AO et les DTXs se fixent à des protéines phosphatases (PPs) intracellulaires et provoquent une inhibition de leur activité, avec des potentialités différentes en fonction des toxines.

En fait, il semble que la fonction carboxylique soit impliquée dans l'activité des dinophysistoxines puisque son acylation se traduit par une perte de l'effet inhibiteur. (Amzil *et al.*, 2001b).

Contrairement à l'AO, la DTX-4 et les diols-esters ne sont pas des inhibiteurs des protéines phosphatases. Les dérivés sulfatés DTX4 et 5 inhibent faiblement les PP1 et 2A *in vitro* (environ 50 fois moins efficaces que l'AO) et sont facilement hydrolysés en AO (Hu *et al.*, 1995).

2.1.1.2. Les conséquences de l'hyperphosphorylation des protéines intracellulaires

Les conséquences qui suivent ont été observées sur de nombreux types cellulaires (hépatocytes, adipocytes, fibroblastes, etc.).

Le mécanisme de phosphorylation des protéines entre en jeu dans de nombreuses régulations. Par conséquent, les voies d'action de l'AO sont très nombreuses.

Les protéines phosphatases (PPs) sont des enzymes essentielles, impliquées dans les mécanismes de régulation de la physiologie cellulaire (transduction de signaux métaboliques, division cellulaire, élaboration de la structure du cytosquelette...) et des échanges membranaires (libération de neurotransmetteurs, activité des canaux ioniques, contraction des muscles lisses...). Ainsi, l'altération de ces enzymes ou de leur activité entraîne des troubles importants et c'est par cette action qu'on explique l'effet aigu (désordres intestinaux) et chronique de l'AO (promotion tumorale). Il se produit une accumulation de protéines phosphorylées qui se traduit par plusieurs effets biologiques : activité promotrice tumorale et effet contracteur des muscles lisses. Ce dernier effet semble être à l'origine des diarrhées et des douleurs abdominales (Cohen *et al.*, 1990).

2.1.1.2.1 Modification du cytosquelette

Les trois composantes du cytosquelette (microfilaments, microtubules et filaments intermédiaires) subissent des hyperphosphorylations. Suite à ce phénomène, la cellule va s'arrondir, et par conséquent se détacher du substrat (Kim *et al.*, 1999). Le développement d'un fuseau mitotique anormal peut se produire.

D'après Mistry *et al.* (1998), la stathmine, qui est une protéine associée aux microtubules, reste phosphorylée en présence d'AO : ce phénomène empêche son effet de dépolymérisation du réseau et donc la migration des chromatides.

Concernant les filaments intermédiaires, des perturbations du réseau de fibres ont été rapportées, souvent caractérisées par un écroulement de la structure fibrillaire et la formation d'amas autour du noyau, que ce soit pour la vimentine, les neurofilaments ou les cytokératines (Puisseux-Dao *et al.*, 2001).

Ainsi, la désorganisation du squelette d'actine sur les cellules intestinales peut expliquer la perte des jonctions serrées *in vivo*, nombreuses au niveau de la barrière de l'épithélium intestinal (Puisseux-Dao *et al.*, 2001).

2.1.1.2.2 Perturbation de la transduction des signaux

En effet, l'AO peut intervenir directement ou indirectement sur un certain nombre d'étapes des cascades de phosphorylations-déphosphorylations impliquées dans la transduction des signaux.

2.1.1.2.3 Perturbation des régulation cellulaires

Divers auteurs ont montré que Rb et p53, à savoir les protéines des deux gènes suppresseurs de tumeurs les plus connus, sont hyperphosphorylées par traitement à l'AO. Ces modifications sont importantes pour l'activité de ces protéines qui ont un rôle important dans la régulation cellulaire.

2.1.1.2.4 Modification de l'expression génique

De nombreux auteurs rapportent des effets de l'AO sur différents gènes et en particulier sur des gènes dits de réponse précoce ainsi que sur certains de réponse plus tardive (Guy *et al.*, 1992).

Des gènes codant pour des facteurs de croissance sont également stimulés par traitement à l'AO : le gène de l'HGF est ainsi régulé de façon positive par l'AO (Gohda *et al.*, 2000); de même que celui du VEGF (*vascular endothelial growth factor*), facteur qui joue un rôle important dans le mécanisme d'angiogenèse au cours du développement cancéreux.

2.1.1.2.5 Entrée en mitose et apoptose

L'inhibition des protéines phosphatases par l'AO pousse souvent les cellules à entrer en phase de mitose.

De multiples hypothèses existent pour expliquer le blocage des cellules en mitose par l'AO. Ce phénomène pourrait être lié, par exemple :

- A une activation du facteur MPF (*Maturation Promoting Factor*), un des principaux facteurs de contrôle d'entrée en mitose ;
- à un échec d'assemblage du fuseau ;
- à un blocage de la PP2A nécessaire pour la transition métaphase-anaphase par activation de la cdc25 ;
- en empêchant la dégradation de la cycline B, inhibant ainsi la sortie de la mitose (Lerga *et al.*, 1999) ;
- A une hyperphosphorylation de la stathmine.

Deux issues sont possibles pour ces cellules ainsi entrées en mitose : si la concentration en toxine est assez faible, les cellules peuvent échapper au blocage et donner naissance à des cellules multinucléées. Par contre, dans la majorité des cas, la progression du cycle se termine en un processus d'apoptose (Lerga *et al.*, 1999).

D'après Lerga *et al.*, (1999), les mécanismes entraînant l'arrêt mitotique et l'apoptose pourraient être indépendants. Il est possible que l'AO empêche la déphosphorylation de certaines protéines essentielles au processus apoptotique.

L'apoptose serait également liée à l'hyperphosphorylation des histones H1 et H3, car cela entraîne une déstabilisation de la structure chromatinienne (hypercondensation des chromosomes, modification de la texture de la chromatine, etc.). Des anomalies du fuseau sont aussi observées (Puisseux-Dao *et al.*, 2001).

2.1.1.3. Les capacités mutagènes et génotoxiques de l'acide okadaïque

Diverses études ont été réalisées dans ce domaine mais les résultats sont difficilement interprétables en raison des conditions variées de réalisation des expériences.

Les résultats obtenus par l'étude des échanges de chromatides soeurs montrent que l'AO induit une augmentation de ce phénomène dans les cellules traitées à des concentrations allant de 2 à 10 nM pendant environ 24 heures. Cependant, ce processus nécessite, à la différence des agents endommageant directement l'ADN, la présence de BrdU au cours du

traitement (Tohda *et al.*, 1993). Un effet médié par une augmentation d'activité topoisomérase I par phosphorylation sur résidus Ser/Thr est suggéré.

Des expériences réalisées sur cellules de mammifère en culture ont montré un effet mutagène en absence d'activation métabolique. Cependant, Puiseux-Dao *et al.* (2001) suggèrent que les cellules résistantes à la toxine diphtérique observées après traitement à l'AO sont en réalité générées par un mécanisme épigénétique, c'est-à-dire non par mutation dans le gène mais par altération de la phosphorylation de la protéine EF-2.

La fragmentation de chromosomes induite par l'AO et signalée par Tohda *et al.* (1993), associée à une capacité à provoquer des cassures doubles brins pourrait contribuer, au moins en partie, à la formation d'échanges de chromatides soeurs qu'ils ont rapportée.

L'AO induit la formation de diplochromosomes, processus qui semble du à un échec de la séparation entre chromatides soeurs. Ce phénomène a été rapporté par Nuydens *et al.* (1998) qui montrent l'apparition de cellules multinucléées provenant de la formation d'un fuseau irrégulier. Pour Puiseux-Dao *et al.* (2001), l'AO provoque des changements chromosomiques. Ils suggèrent une action mutagène des inhibiteurs de phosphatases dans les cellules en arrêt de croissance sans qu'il y ait d'effet sur les cellules en division. De même, Puiseux-Dao *et al.* (2001) ont montré que l'AO, en faibles concentrations, augmente l'instabilité caryotypique du chromosome X inactif.

2.1.1.4. L'acide okadaïque et la DTX1, promoteurs tumoraux

2.1.1.4.1 Études in vivo

Plusieurs études de cancérogenèse ont démontré un potentiel promoteur de l'AO.

Des études à court terme sur peau de souris ont mis en évidence que l'AO et la DTX1, appliqués régulièrement (10 µg, 2 fois par semaine), provoquent l'irritation de l'oreille et l'activation de l'ornithine décarboxylase. Le même phénomène d'activation de l'ornithine décarboxylase a été obtenu ultérieurement dans l'estomac glandulaire 4 h après intubation de 10 à 30 µg d'AO. Pour les deux tissus, la courbe dose-réponse est biphasique.

Des études à moyen terme de cancérogenèse en deux étapes prouvent que l'AO et la DTX1 induisent des tumeurs au niveau de la peau après initiation au DMBA (7-,12diméthylbenzoanthracène, (Puiseux-Dao *et al.*, 2001) tandis que, par voie orale (administration dans l'eau de boisson entre 10 et 20 µg d'AO/rat/jour), des tumeurs de la partie glandulaire de l'estomac sont observées chez le rat après traitement à la MNNG (N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine); Les tumeurs sont essentiellement des papillomes (ou hyperplasies adénomateuses pour l'estomac), un faible pourcentage de carcinomes ou adénocarcinomes étant généré.

Certains auteurs ont suggéré que la consommation chronique de produits contaminés avec les toxines diarrhéiques pouvaient être reliée à l'augmentation du cancer du tube digestif observée dans certains pays consommateurs de produits de la mer comme le Japon ou le Chili (Puiseux-Dao *et al.*, 2001).

2.1.1.4.2 Induction de la promotion tumorale par l'acide okadaïque

La promotion tumorale consiste en une prolifération cellulaire non contrôlée et ce phénomène peut être généré de diverses manières. Les effets de l'AO sur certains processus mis en jeu sont cités ci-dessous.

Guy *et al.*, 1992 ont montré que l'AO et certaines dinophysistoxines induisent l'expression d'oncogènes précoces. La transcription de ces gènes précoces semble s'effectuer également *via* le mécanisme du TNF. L'AO provoque ainsi une expression élevée et soutenue du gène *c-fos* ; or sa surexposition augmente le taux spontané d'aberrations chromosomiques.

À la différence des oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeurs ont pour fonction de réguler la croissance cellulaire de façon négative et cette inhibition de prolifération peut être levée lorsque ces protéines sont modifiées. Divers auteurs ont montré, comme signalé précédemment, que Rb et p53, protéines des deux gènes suppresseurs de tumeurs les plus connus, sont hyperphosphorylées par traitement à l'AO. Or, ces protéines sont inactives sous forme hyperphosphorylée. Puiseux-Dao *et al.* (2001) ont observé que l'hyperphosphorylation de la p53 rendait la protéine plus stable mais qu'elle atténuait sa fonction d'activation de la transcription.

L'activité télomérase n'est généralement pas détectée dans les cellules somatiques normales mais elle s'observe dans des cellules cancéreuses. Dans une lignée cellulaire cancéreuse, l'AO empêche l'inhibition de l'activité télomérase par la PP2A (Li *et al.*, 1997).

Mais ces expériences ont été menées en utilisant des doses élevées de toxines par rapport au poids de l'animal. Il faudrait donc des données complémentaires pour conclure sur la toxicité chez l'Homme.

2.1.2.Toxicité chez l'animal

2.1.2.1.Distribution dans l'organisme

Après administration intragastrique d'AO radiomarqué, la répartition est telle que la majeure partie (> 77 %) reste dans le tractus gastrointestinal. Une petite quantité (1 %) se retrouve dans le foie tandis qu'une partie (30 %) est éliminée dans les fèces. Par injection intrapéritonéale, par contre, une plus large quantité (27 %) se retrouve au niveau du foie et suggère une élimination par la circulation biliaire (Fujiki et Suganuma, 1993).

2.1.2.2.Toxicité aiguë

Après administration orale (750 µg/kg), l'AO et les DTX1,3 induisent, suite à leur absorption, des changements macroscopiques limités au duodénum et à la partie supérieure du jéjunum. Dix minutes environ après ingestion, la destruction des villi commence. Elle est de plus en plus sévère au cours du temps, résultant en une lamina propria nue suite à l'élimination des villi dans le lumen et provoque ainsi l'exposition de la portion supérieure des cellules des cryptes intestinales. Le dommage est maximal à 30 minutes, puis on observe un début de récupération à 60 minutes avec un épithélium discontinu en régénération. La récupération paraît complète en 48 h (Ito et Terao, 1994).

Pour des doses plus faibles d'AO (130 et 300 µg/kg), les changements histopathologiques sont graduels et la récupération a lieu en moins de 24 heures.

Des effets similaires ont été obtenus par administration de plus faibles quantités d'AO (1 à 5 µg) directement au sein d'une boucle intestinale de rat, avec des altérations plus sévères de la muqueuse en fonction de la dose administrée. Il semble cependant que les cellules en gobelet restent attachées et forment une ligne recouvrant la surface du côté lumen. Aucun signe de réaction d'inflammation ou d'hémorragie n'est rapporté et les régions des cryptes ne semblent pas affectées par le traitement. L'altération de la muqueuse intestinale est associée à une sécrétion accrue de fluide (Lange *et al.*, 1990). Le même genre de résultats est obtenu après administration intragastrique (1 à 4 µg/g) avec une désorganisation de la muqueuse intestinale en aval.

Avec un certain délai (4 h après l'administration), l'accumulation de fluide apparaît aussi au niveau du colon; les changements morphologiques restent peu importants même si des signes de régénération sont évidents pour des temps de 24 à 48 heures. Les rats d'ailleurs développent une diarrhée en un à trois jours. Aucun symptôme au niveau du foie n'est détecté avec ce genre d'administration. En administration intrapéritonéale, contrairement à l'AO et à la DTX 1, la DTX3 ne provoque pas de sérieux dommages intestinaux; la présence du radical acyl sur la toxine pourrait en effet être responsable d'une plus faible absorption par le péritoine (Ito et Terao, 1994). Une administration intraveineuse (0,2 à 0,5 µg/g) a moins d'effet sur l'intestin (Lange *et al.*, 1990) mais produit une dissolution rapide des gaines d'actine des canalicules biliaires hépatiques avec congestion de sang dans le foie, hypotension et mort à forte dose (Berven *et al.*, 2001).

Après ingestion orale, des effets plutôt moins spectaculaires sont également observés au niveau de l'oesophage et de l'estomac avec inflammation, éventuellement érosion des muqueuses, conduisant pour l'estomac glandulaire à une évolution analogue à celle du petit intestin. Les populations cellulaires en prolifération semblent être plus sensibles que celles du foie et des reins, non proliférantes. Ainsi, il pourrait y avoir une spécificité tissulaire importante pour les effets cytotoxiques ou modulateurs de la physiologie cellulaire.

Concernant l'accumulation de fluide au niveau intestinal, l'AO n'apparaît pas agir comme un ségrétagogue, mais il perturbe la fonction de la barrière intestinale en détériorant les jonctions serrées. L'altération de la physiologie de l'épithélium intestinal par augmentation, par exemple, de la perméabilité paracellulaire peut contribuer au phénomène de diarrhée rapporté lors des contaminations avec ces toxines (Puisseux-Dao *et al.*, 2001).

2.1.3. Symptômes provoqués chez le consommateur

Les symptômes de l'IDFM sont les mêmes que ceux habituellement observés lors d'une intoxication alimentaire d'origine bactérienne ou virale. Il est néanmoins possible de faire le diagnostic différentiel car les délais d'apparition et la durée de l'intoxication sont différents.

Une récapitulation des signes cliniques décrits dans la littérature nous indique qu'ils apparaissent en moyenne quatre heures après l'ingestion des coquillages contaminés (l'écart se situant entre 30 min et 12 h) et qu'ils s'accompagnent de diarrhées, de vomissements, de douleurs abdominales dans la grande majorité des cas et de symptômes nerveux d'une manière plus aléatoire (Marcaillou-Le Baut *et al.*, 2001).

Les symptômes disparaissent en trois jours sans nécessiter d'intervention médicale particulière et la guérison est totale, sans séquelle et, jusqu'à présent, aucun décès n'a été signalé.

2.2. Les pecténotoxines

Les effets sur l'Homme de ces PTXs ne sont pas élucidés à ce jour.

Les PTXs possèdent des activités biologiques différentes des DTXs (Amzil *et al.*, 2001b). Les PTXs n'ont qu'une faible, voire aucune, activité diarrhéique chez la souris. Elles ont plutôt une activité hépatotoxique chez la souris (Krys et Frémy, 2002).

L'administration orale de PTX1 et PTX2 à des rongeurs (rats et souris) n'a qu'un effet diarrhéique mineur mais entraîne une oedémation importante des villosités de l'intestin grêle. La toxicité orale de la PTX2 est de l'ordre de 200 µg/kg chez la souris.

Les doses létales chez la souris, par voie intrapéritonéale, sont indiquées dans le tableau 3. La spiroisomérisation du carbone 7 (PTX1 ---> PTX4; PTX6 ----PTX7) ou la présence d'un cycle pyranne à la place d'un cycle furanne (PTX8 et PTX9) se traduisent par une chute, voire une disparition de toxicité, suggérant que ces modifications provoquent un changement conformationnel notable (Sasaki *et al.*, 1998).

Des études histopathologiques, après injections intrapérionéales, ont démontré que les principales atteintes provoquées par les PTXs n'étaient pas localisées dans le tractus digestif mais dans le foie : d'une façon comparable à ce qui est observé avec des toxines du macromycètes (phalloïdine) et de micromycètes (cyclochlorotine), la lésion principale est la formation de vacuoles non grasses dans les hépatocytes situés en région périportale suivie de la nécrose de ces cellules. Cette vacuolisation apparaît associée à une invagination des membranes cytoplasmiques des hépatocytes. Hori *et al.* (1999) suggèrent que la PTX2 provoquerait la dépolymérisation de l'actine, réaction observée dans de nombreuses intoxications .

Des effets cytotoxiques ont été notés sur différentes lignées cellulaires cancéreuses humaines pour des concentrations de l'ordre du nanomolaire, tout particulièrement sur des cellules de carcinomes du colon (HT-29), du poumon (A-549) et du sein (MCF-7).

2.3. Les yessotoxines

2.3.1. Mécanisme d'action et toxicité chez l'animal

Le mécanisme d'action de ces toxines n'est pas connu. En dépit de leur ressemblance structurale avec d'autres phycotoxines (ciguatoxines et brevététoxine), les YTXs n'induisent pas d'activation des canaux à sodium membranaires.

Par contre, Alfonso *et al.* (2000) décrivent une augmentation du calcium intracellulaire provenant à la fois des réservoirs intracytoplasmiques et du milieu extracellulaire.

Il ressort de la neuvième conférence sur le phytoplancton toxique, qui eut lieu en Tasmanie en février 2000, que l'extension de ces deux dernières familles de toxines et les niveaux atteints nécessitent que l'on y porte une attention particulière en termes de recherche et de réglementation.

Il est même question de mettre en place une nouvelle classification des trois groupes de toxines diarrhéiques (dinophysistoxines, pecténotoxines et yessotoxines) basée probablement sur l'évaluation de l'activité toxique réelle de chaque groupe, ce qui permettrait de mettre en place des procédures réglementaires adaptées pour chaque type de toxines.

2.3.1.1. Toxicité chez l'animal

Contrairement aux DTXs et aux PTXs pour lesquelles les toxicités *per os* et par voie intrapéritonéale sont proches, les YTXs sont peu toxiques par voie orale (pas de mortalité observée pour 1 mg/kg chez la souris) et n'ont aucun effet diarrhéique (Ogino *et al.*, 1997).

L'analyse microscopique des organes de souris, après injection intrapéritonéale de YTX, a montré une atteinte cardiaque très importante avec dégénérescence des cellules endothéliales des capillaires, arrondissement des mitochondries et gonflement de la quasi-totalité des cellules cardiaques (Puisseux-Dao *et al.*, 2001).

3. Les toxines neurologiques (brevétoxines)

3.1. Mécanisme d'action

Le mécanisme d'action des brevétoxines repose sur l'activation des canaux sodium. Les ciguatoxines ont le même mécanisme d'action.

Des expériences biochimiques de fixation directe, utilisant les brevétoxines tritiées, ont montré que la cible moléculaire des brevétoxines est le site récepteur 5 des canaux sodium sensibles au potentiel de membrane. Elles interagissent en effet fortement avec celui-ci.

Les études électrophysiologiques du mode d'action des brevétoxines montrent qu'elles activent le canal sodium sensible au potentiel de membrane (Lewis *et al.*, 2000).

L'activation de ces canaux sodium a pour conséquences :

- l'augmentation de la perméabilité membranaire au sodium

L'action des brevétoxines a pour conséquence un déplacement de l'activation du courant sodium vers des potentiels de membrane plus négatifs. Ainsi, la perméabilité au sodium de la membrane au repos est augmentée (Huang *et al.*, 1984).

- l'augmentation de l'excitabilité membranaire

Les études des effets des brevétoxines sur le potentiel de membrane, réalisées en utilisant la technique conventionnelle du courant imposé, montrent que ces toxines produisent une dépolarisation de la membrane des cellules nerveuses et des fibres musculaires squelettiques. Cette dépolarisation est suffisante pour que le potentiel membranaire se rapproche de sa valeur seuil, ce qui provoque l'apparition de décharges spontanées et répétitives de potentiels d'action à une fréquence pouvant atteindre 100 Hz (Molgo *et al.*, 1990).

Les études réalisées sur l'axone géant de calmar montrent que les décharges de potentiels d'action n'apparaissent que transitoirement et sont suivies par un blocage de l'excitabilité. En effet, la dépolarisation membranaire devient trop importante.

Les anesthésiques locaux, l'augmentation de la concentration externe d'ions calcium et les solutions externes hyperosmotiques sont capables de contrebalancer les effets des brevétoxines sur le potentiel de membrane en rétablissant une excitabilité normale (Huang *et al.*, 1984).

- l'altération de la libération de neurotransmetteurs

L'augmentation de l'excitabilité de la membrane des axones et des terminaisons nerveuses motrices entraîne une augmentation de la libération de neurotransmetteurs au niveau des synapses à médiation chimique et des terminaisons nerveuses sécrétrices.

Les expériences effectuées au niveau de la jonction neuromusculaire squelettique de Vertébrés montrent que l'augmentation de la concentration en neurotransmetteur dans la jonction est liée à deux phénomènes : non seulement le nombre de libérations du neurotransmetteur est augmenté, mais en plus le contenu quantique moyen des réponses synaptiques est plus important (Molgo *et al.*, 1990). Puis, lorsque la dépolarisation membranaire devient trop importante, les potentiels d'action sont bloqués, et la libération de neurotransmetteurs également.

- l'augmentation du volume cellulaire

Les brevétotoxines provoquent une augmentation importante du volume non seulement des noeuds de Ranvier des fibres nerveuses myélinisées et des terminaisons nerveuses motrices innervant le muscle squelettique, mais également des cellules de Schwann non myélinisantes périssynaptiques, ce qui permet de supposer qu'elles possèdent des canaux sodium activés par ces phycotoxines (Molgo *et al.*, 1994).

Deux explications sont avancées pour expliquer ce phénomène :

- D'une part, comme nous l'avons vu, les brevétotoxines favorisent l'entrée d'ions sodium dans les terminaisons. L'équilibre osmotique s'en trouve perturbé. Ainsi, pour compenser ce déséquilibre, des mouvements d'eau du compartiment extracellulaire vers le compartiment intracellulaire ont lieu, entraînant une augmentation du volume cellulaire;

- D'autre part, lors de la libération accrue du neurotransmetteur par les brevétotoxines, les vésicules synaptiques fusionnent avec l'axolemme terminal, ce qui permet l'incorporation des membranes vésiculaires à la membrane présynaptique (Molgo *et al.*, 1994).

3.2.Symptômes provoqués chez le consommateur

Il existe deux voies de contamination de l'Homme: l'intoxication par ingestion de coquillages contaminés et celle par contact direct. Ce deuxième aspect ne concerne pas le consommateur.

Dans le premier cas, les symptômes se définissent par deux syndromes, l'un neurologique, l'autre gastro-intestinal, qui se produisent concomitamment et apparaissent généralement entre une à trois heures après l'ingestion des coquillages.

Le syndrome neurologique est constitué de paresthésie (sensation de picotements et d'engourdissement) autour de la bouche, du visage et de la gorge, s'étendant à l'ensemble du corps, de douleurs musculaires, d'une ataxie (perte de coordination, sensation d'ébriété), d'une sensation de froid, d'une inversion des sensations du chaud et du froid au toucher, d'une diminution du rythme cardiaque et d'une dilatation des pupilles.

Le syndrome gastro-intestinal qui l'accompagne comporte des douleurs abdominales, des nausées, des diarrhées. Les malades recouvrent généralement leur état normal entre 24 et 48 h après l'ingestion. Aucun décès n'a jamais été reporté après une intoxication humaine par les coquillages contenant des brevétotoxines.

Dans le second cas, les cellules de *G. breve*, rendues fragiles parce qu'elles ne possèdent pas de thèque, se lysent facilement pendant le remous et libèrent leurs toxines qui sont mises en suspension dans l'air sous forme d'aérosols. Transportées par le vent, les toxines en suspension peuvent atteindre les personnes présentes sur le littoral et engendrer des symptômes tels que des irritations des voies respiratoires (toux, sensations de brûlures) et des irritations de la conjonctive (Marcaillou-Le Baut *et al.*, 2001).

4. Les toxines amnésiantes (acide domoïque et dérivés)

4.1. Mécanisme d'action

Lorsqu'il est ingéré, l'acide domoïque (AD) est absorbé par la muqueuse gastro-intestinale et atteint lentement sa cible au niveau du système nerveux central. La structure de l'AD est proche de celle de l'acide glutamique et de l'acide kaïnique. Il existe plusieurs types de récepteurs synaptiques activés par le glutamate. Ils tiennent leur nom de leur agoniste le plus spécifique.

Il s'agit des récepteurs glutaminergiques suivants :

- AMPA (alfa-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionate),
- Kaïnate,
- NMDA (N-méthyl-D-aspartate).

Or, des expériences montrent que les courants macroscopiques activés par le domoate présentent une similarité notoire avec les courants activés par le kaïnate.

Au niveau du récepteur kaïnate, l'activité des agonistes est la suivante (par ordre décroissant d'efficacité) : domoate > kaïnate > glutamate > AMPA. L'AD est un récepteur très sélectif des récepteurs kaïnate (Hampson *et al.* 1992).

L'activation des récepteurs kaïnate par l'AD va entraîner une excitotoxicité cellulaire, qui conduit à une dépolarisation membranaire et à l'entrée d'ions sodium et calcium dont les conséquences intracellulaires sont nombreuses.

Mais le domoate active aussi les récepteurs AMPA impliqués dans la transmission synaptique rapide dans la plupart des synapses excitatrices du système nerveux central (Puisseux-Dao *et al.*, 2001). Par contre, il ne semble pas activer les récepteurs NMDA.

L'acide domoïque a donc des effets neurotoxiques. Ils se manifestent dans les régions suivantes du système nerveux central :

- l'hippocampe,
- les couches profondes du cortex,
- le striatum,
- la couche granuleuse du cervelet.

Les mécanismes mis en jeu sont multiples et complexes. Ils sont fonction du type de neurone et du type de récepteur glutamatergique impliqué.

Enfin, il est extrêmement difficile de mettre en relation ces différents effets neurotoxiques de l'AD et ses conséquences sur des processus cognitifs complexes comme la mémoire.

4.2. Symptômes provoqués chez le consommateur

Les symptômes immédiats chez l'Homme sont caractérisés par des vomissements, des crampes abdominales, des diarrhées, des nausées et des maux de tête. Les symptômes tardifs et excitotoxiques (Marcaillou-Le Baut *et al.*, 2001), qui apparaissent dans les 24 à 48 h, se

manifestent par une désorientation et une confusion, une perte de mémoire, des dommages cérébraux, des convulsions et un coma pouvant conduire à la mort.

L'épisode canadien permet d'avoir une idée des conséquences qu'une telle intoxication peut entraîner chez l'Homme (Marcaillou-Le Baut *et al.*, 2001). Parmi les 107 victimes, 19 personnes ont dû être hospitalisées et, parmi elles, on comptait surtout des hommes âgés. Pour la majorité d'entre elles, la récupération se fit dans un délai variable d'un jour à quatre mois, selon les cas. Cependant, on a déploré quatre morts parmi les malades atteints de convulsions graves. Par ailleurs, l'intoxication a laissé des séquelles touchant à la mémoire chez certains malades. De nombreux examens médicaux ont été effectués chez les patients mais nous mentionnerons seulement ceux relevés à l'autopsie des quatre personnes décédées ; ils ont permis de relever des lésions de type nécrotique ou de perte neuronale prédominantes au niveau de l'hippocampe et des noyaux amygdaliens.

Il est important de noter que les troubles neurologiques peuvent persister plusieurs semaines après l'intoxication (Krys et Frémy, 2002). Ceci est dû au fait que les toxines amnésiantes se fixent sur les récepteurs, parfois de manière irréversible.

5. Les Azaspiracides

5.1. Toxicité

Il est important de noter que les symptômes de nature neurotoxique observés chez l'animal sont très différents de ceux de l'IDFM : à faible dose, les animaux meurent en deux ou trois jours à l'issue d'une paralysie progressive; à forte dose, les animaux se paralysent rapidement des membres postérieurs, ont des difficultés respiratoires et meurent dans un délai de 5 à 60 min après de violents soubresauts.

Les doses létales chez la souris sont respectivement de 200 et 500 µg/kg après administration par voies intrapéritonéale (Satake *et al.*, 1998) et orale (Ito *et al.*, 2000).

Outre l'intestin, les azaspiracides affectent d'autres organes tel que le système immunitaire, ce qui constituerait un risque plus important pour l'Homme (Ito *et al.*, 2000).

Une étude récente (Colman *et al.*, 2005) a montré que l'AZ1 était tératogène pour les embryons de poissons. De plus, la toxicité des AZ1 sur les embryons donne les mêmes résultats à des doses similaires avec l'OA et la DTX2.

5.2. Symptômes provoqués chez le consommateur

Ces toxines entraînent chez l'Homme un syndrome gastro-intestinal. Mais le mécanisme d'action est différent des toxines diarrhéiques, et les AZ affectent également le système immunitaire.

En résumé, les effets néfastes sur la santé de l'Homme sont soit d'ordre digestif, soit d'ordre neurologique. Les symptômes neurologiques peuvent être particulièrement graves. Mais quel est le niveau d'exposition du consommateur européen à ces différentes toxines ? L'étape d'évaluation de l'exposition suivante va tenter de répondre à cette question.

C.Évaluation de l'exposition

Cette étape, la troisième de l'évaluation des risques, constitue une évaluation de l'ingestion probable de phycotoxines par le biais des coquillages-denrées (Codex Alimentarius, 1999). L'exposition à d'autres sources ne sera pas étudiée.

L'exposition est dépendante de deux facteurs : l'émission du danger et l'exposition du consommateur à ce danger. En multipliant la probabilité d'émission du danger et la probabilité d'exposition du consommateur à ce danger, on obtient la probabilité de survenue du danger. Cette probabilité de survenue du danger constitue la première étape de la caractérisation des risques.

Chaque paramètre va être analysé, tout d'abord en le décrivant, puis en faisant une évaluation argumentée de la probabilité de survenue de chaque paramètre.

L'analyse aboutira à l'une des cinq appréciations utilisées traditionnellement à l'Afssa (Dufour B., 2006, communication personnelle) :

- élevée : la probabilité de survenue constitue nettement une possibilité
- modérée : l'événement est possible
- faible : la probabilité de survenue est peu élevée mais possible dans certains cas
- négligeable : la survenue de l'événement est possible dans des circonstances exceptionnelles.
- nulle : l'événement ne peut pas se produire.

Lorsque plusieurs probabilités sont combinées, il faut se rapprocher des résultats obtenus lors d'une analyse quantitative. Par exemple, si la probabilité d'émission du danger est de 10^{-3} et la probabilité d'exposition de 10^{-4} , la probabilité de survenue du danger est de 10^{-7} . La probabilité finale est plus faible que les deux premières.

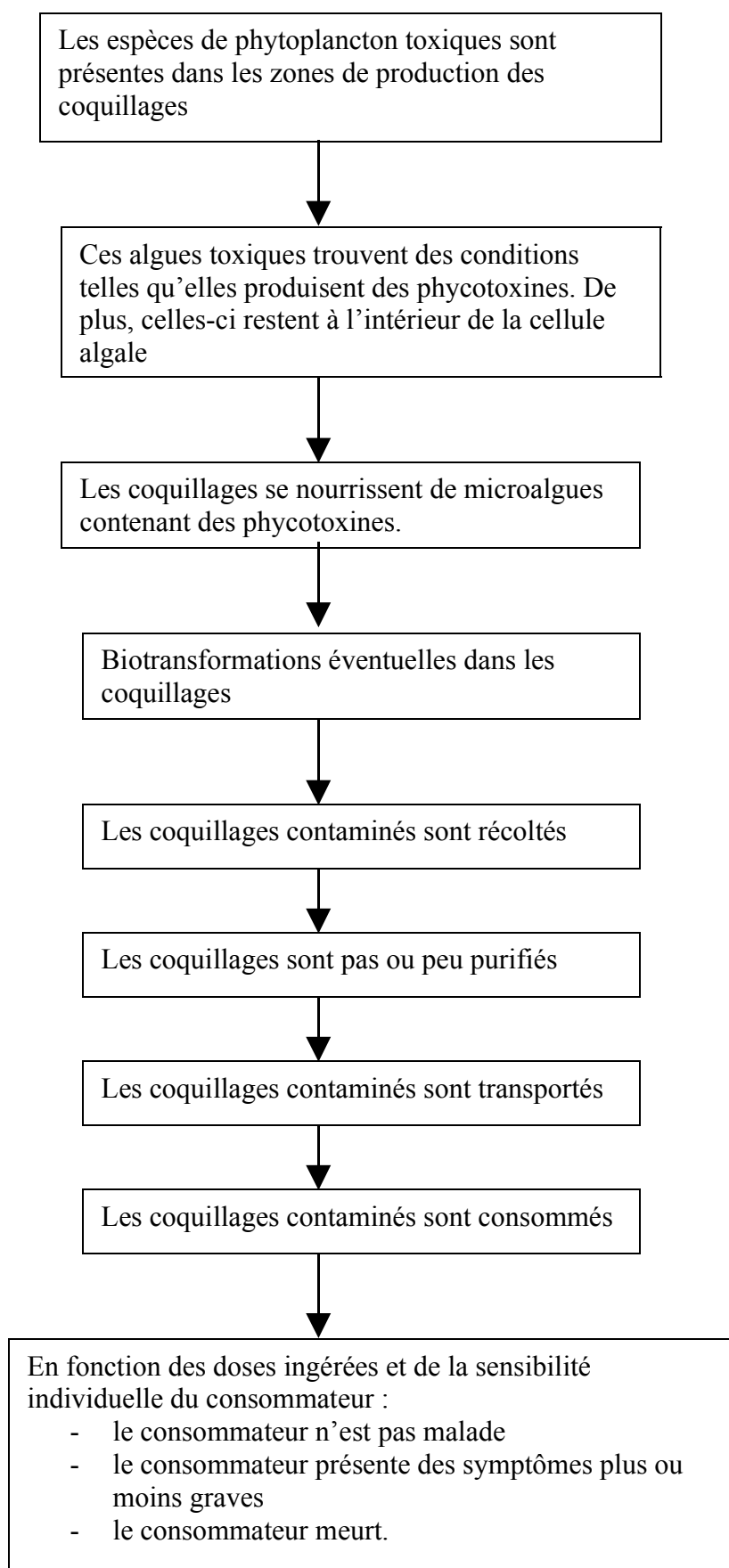
Le principe du croisement sera donc utilisé lorsque que deux probabilités seront multipliées:

- Si les deux qualificatifs sont identiques : on obtient le qualificatif immédiatement inférieur. Ex : Modéré x Modéré = Faible. La seule exception concerne le cas Élevé x Élevé. Dans ce cas, la résultante est qualifiée d'Élevée.
- Si les deux qualificatifs sont voisins : on retient le qualificatif le plus faible. Ex : Élevé x Modéré = Modéré
- Si les deux qualificatifs ne sont pas voisins : on retient le qualificatif le plus faible. Ex : Élevé x Faible = Faible.

De nombreuses approximations sont faites lorsqu'on suit cette méthode. Pour le faire apparaître, il est important d'introduire des intervalles dans les appréciations du risque. Ex : la probabilité de survenue est jugée « nulle à négligeable ».

Avant de commencer, il convient de déterminer le schéma événementiel.

Figure 23 : Schéma événementiel qui conduit à l'intoxication des consommateurs



1. Appréciation de l'émission

L'appréciation de l'émission consiste à décrire la production du danger. On ne quantifie pas les paramètres.

La fréquence ainsi que l'intensité des contaminations des coquillages par les différentes catégories de phycotoxines seront estimées. Pour cela, il faut connaître les prévalences de ces phénomènes. On se heurte aux difficultés de l'épidémiologie descriptive : l'échantillonnage, la fiabilité des collectes sur le terrain.

La probabilité d'émission du danger dépend de plusieurs facteurs.

1.1. La probabilité d'émission est fonction de la prévalence et de l'intensité de la contamination

Pour éviter toute confusion, il y a lieu de bien différencier un « épisode toxique » - qui 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 – d'un « épisode d'intoxication alimentaire » par les fruits de mer, qui correspond à l'observation d'une toxi-infection alimentaire et donc de désordre sanitaire.

Depuis une vingtaine d'années, on constate une extension mondiale du nombre d'épisodes toxiques, une extension des zones touchées, et une multiplicité des toxines. En effet, à côté des toxines connues que l'on retrouve de plus en plus fréquemment, de nouvelles substances toxiques sont mises en évidence, et des zones marines surveillées de longue date et exemptes d'épisodes, en sont devenues subitement le siège.

Néanmoins, devant les nombreux cas d'efflorescences toxiques répertoriées dans le monde, les contributions respectives des épisodes réellement nouveaux et de ceux qui paraissent nouveaux en raison de l'attention croissante que l'on porte au milieu marin sont difficiles à estimer.

Pour chaque toxine, une illustration de ce phénomène sera faite en prenant des exemples en Europe, et surtout en France.

1.1.1. Toxines paralysantes

Les épisodes toxiques se manifestent dans le monde entier. En Europe, tous les pays ayant une façade maritime ont enregistré des épisodes toxiques.

En France, c'est en 1988 que s'est déclaré le premier épisode à toxines paralysantes. Une souche toxique d'*Alexandrium minutum* a en effet été signalée en Bretagne Nord, puis en baie de Morlaix en 1989.

La présence de toxines paralysantes a par la suite été démontrée dans des moules du littoral vendéen en novembre 1992, sans que l'algue productrice ne soit identifiée.

Une autre souche d'*Alexandrium minutum* prolifère sporadiquement en baie de Toulon depuis 1990. La toxicité de cette souche n'a pas pu être testée pour l'instant, mais les coquillages de ce secteur ont montré des concentrations parfois dangereuses pour le consommateur.

Enfin, en fin d'année 1998, une forte contamination des coquillages de l'étang de Thau a été observée suite à une efflorescence d'*Alexandrium tamarense*, espèce minoritaire en France jusqu'à cet épisode. Ce dernier épisode est particulièrement marquant, car l'efflorescence toxique est apparue en automne, saison considérée comme peu propice au développement algal, dans une zone indemne jusqu'alors, et associée à une nouvelle espèce toxique.

1.1.2. Toxines diarrhéiques

Des épisodes toxiques ont lieu dans le monde entier.

En France, les dinoflagellés du genre *Dinophysis* producteurs de phycotoxines diarrhéiques ont été identifiés dès le début des investigations en 1983, uniquement en baies de Vilaine et de Douarnenez, en Bretagne. Depuis 1985, ce genre a progressé vers le Nord en direction de la Normandie, puis vers le Sud jusqu'au bassin d'Arcachon. Il est signalé depuis 1987 en Méditerranée, dans le Golfe du Lion.

Ces efflorescences épisodiques surviennent en général de mai à août, et durent plusieurs semaines.

L'évolution annuelle de la dispersion de *Dinophysis* fait apparaître une extension géographique de ce genre sur le littoral atlantique depuis 1984.

1.1.3. Toxines neurologiques

Les épisodes toxiques ne se manifestent que dans le golfe du Mexique et en Nouvelle-Zélande.

1.1.4. Toxines amnésiantes

Depuis sa mise en évidence au Canada en 1987, l'Acide Domoïque a provoqué quelques intoxications aux États-unis. Des épisodes toxiques ont été rapportés en Europe (Danemark, Espagne, Écosse).

En France, le premier épisode toxique présentant un risque sanitaire pour le consommateur et entraînant une fermeture de la zone de production s'est produit en mai 2000 en mer d'Iroise (Finistère).

1.1.5. Azaspiracides

Les azaspiracides ont été retrouvées dans de nombreux pays d'Europe, mais pas dans le reste du monde.

En France, en 2000, des traces d'AZ ont été mises en évidence dans deux échantillons de coquillages.

1.2. La probabilité d'émission est fonction de l'évolution de la contamination (transformation, préparation)

Les phycotoxines sont thermostables et ne sont pas détruites par les traitements technologiques tels que la cuisson ou la congélation (Marcaillou-Le Baut *et al.*, 2001).

Le temps de réduction décimale des phycotoxines paralysantes à 121,1°C est de 71 min, ce qui interdit l'appertisation pour détoxifier les coquillages. De plus, la cuisson induit des interconversions entre les toxines (perte de radicaux) qui se traduisent souvent par une augmentation de la toxicité (Dragacci *et al.*, 2001).

Ainsi, il n'est pas possible d'éliminer les toxines, d'autant que les coquillages sont des aliments qui se consomment souvent crus ou très peu cuits.

1.3. Probabilité d'émission du danger

- La probabilité d'émission des toxines paralysantes est modérée à élevée,
- La probabilité d'émission des toxines diarrhéiques est modérée à élevée,
- La probabilité d'émission des toxines neurologiques est faible,
- La probabilité d'émission des toxines amnésiantes est modérée à élevée,
- La probabilité d'émission des azaspiracides est modérée à élevée.

La probabilité d'émission est cependant plus importante (élevée) pour les produits importés et transformés.

2. Evaluation de l'exposition

L'exposition dépend de plusieurs facteurs.

Les coquillages contaminés par les phycotoxines ne sont pas affectés par celles-ci et ne présentent donc aucun signe visible qui les différencie des produits non contaminés. Ils offrent l'image d'un produit salubre (Krys et Frémy, 2002).

2.1. Nombre de produits consommés (fréquence de consommation), et de la quantité ingérée par repas

Il faudrait disposer d'études de consommation précises.

Mais nous pouvons nous baser sur les habitudes culinaires connues des français :

- D'une part, les plus gros consommateurs réguliers sont ceux qui habitent au bord de la mer. C'est la population la plus exposée.
- Lors des fêtes de fin d'année, la consommation de coquillages augmente de façon exponentielle. Mais les blooms de phytoxines toxiques n'ont pas lieu pendant l'hiver, sauf en méditerranée où les blooms apparaissent toute l'année.
- Enfin, en été, les touristes affluent sur les littoraux français. Ils constituent alors une population très exposée,
- Les produits transformés et importés peuvent être utilisés pour faire des plats cuisinés à l'avance, par exemple la pølla.

2.2. Sensibilité individuelle des consommateurs

Il existe de grandes variations dans la sensibilité des consommateurs.

Ceci est bien documenté en ce qui concerne les toxines paralysantes. En utilisant des données épidémiologiques, il apparaît que la population locale est plus résistante que les consommateurs de passage (exemple des non résidents) et que la sensibilité est différente selon l'âge et le sexe des personnes. Les enfants semblent particulièrement vulnérables : la victime d'intoxication sévère, âgée de deux ans, avait seulement absorbé l'équivalent de 98 µg de toxine ; en 1987, au Guatemala, après un épisode toxique qui fit 187 victimes, il y eut 26 morts dont 50 % d'enfants (Van Egmond *et al.*, 1993). En revanche, on rapporte le cas d'un Homme de 65 ans qui ne fut pas malade bien qu'il ait consommé deux douzaines de clams contenant près de 8 300 µg de toxines. Enfin, comparées aux hommes, les femmes présentent les mêmes symptômes avec des doses en toxines deux fois moindres.

2.3. Dose infectante

La dose infectante, à savoir la dose qui provoque chez le consommateur les premiers symptômes, est souvent déterminée grâce aux enquêtes épidémiologiques effectuées suite à une intoxication liée aux phycotoxines.

2.3.1. Toxines paralysantes

L'analyse de ces composés dans les échantillons naturellement contaminés est délicate du fait, d'une part, de la possibilité de transformation chimique au cours des processus de préparation des

échantillons et de stockage et/ou, d'autre part, d'une interbioconversion qui peut se produire dans les coquillages.

Ce sont les données canadiennes qui nous apportent les informations les plus précises concernant le niveau de tolérance des humains vis-à-vis des toxines paralysantes et les facteurs de variabilité (Prakash et al., 1971).

Les renseignements recueillis auprès de chaque cas permettent d'estimer une dose moyenne de toxine pour chaque niveau d'intoxication soit respectivement 1000, 1 900, 2 000 µg pour des intoxications moyenne, sévère et extrême.

La dose létale minimale pour l'Homme serait de 500 µg mais elle est très discutée. Par exemple, l'ingestion de 300 µg de toxines paralysantes s'est montrée fatale dans certains cas tandis que, dans d'autres, des doses de 320 µg de toxines paralysantes n'ont provoqué aucun symptôme. De même, la dose minimale ingérée provoquant l'apparition des symptômes varie entre 144 et 1660 µg d'équivalent STX (Marcaillou-Le Baut *et al.*, 2001).°

Pour prendre en compte la variabilité individuelle, il serait préférable d'encadrer la dose létale par les valeurs extrêmes connues qui seraient 456 et 12400 µg d'équivalent saxitoxine (Van Egmond *et al.*, 1993).

2.3.2. Toxines diarrhéiques

Les enquêtes épidémiologiques permettant de faire la corrélation entre le niveau de gravité et les doses de toxines ingérées sont extrêmement rares car le caractère relativement bénin n'incite pas à la consultation ni au questionnement précis de la part du médecin.

En 1978, Yasumoto et ses collaborateurs observaient les premiers symptômes à partir de 12 US, soit environ 48 µg d'AO (l'unité souris (US) étant égale à 4 µg d'AO). De plus, une équipe japonaise a publié ses observations lors d'une IDFM due à des coquilles Saint-Jacques, en 1982, dans la préfecture de Gifu (Nonomura *et al.*, 1983). D'après cette enquête, on observe que la dose minimale ingérée entraînant des signes cliniques est de 18 unités souris, soit environ 72 µg d'équivalent en acide okadaïque.

2.3.3. Toxines neurologiques

Nous disposons des données résultant des enquêtes épidémiologiques qui ont eu lieu après les trois épisodes d'intoxication suivants :

- En décembre 1962 dans la baie de Sarasota en Floride ;
- En 1987 sur les côtes de Caroline du Nord ;
- En janvier 1993 en Nouvelle-Zélande.

2.3.3.1. Floride (1962)

En décembre 1962, une toxine trouvée dans des huîtres (*Crassostrea virginica*) et des clams (*Venus mercenaria campechiensis*) de la baie de Sarasota en Floride a été à l'origine de plusieurs cas d'intoxication humaine avec des symptômes proches de ceux de la ciguatéra et appelée « ciguatéra-like » à cette époque.

Les données de ces enquêtes montrent qu'une personne de sexe féminin, âgée de 43 ans a ressenti des signes d'intoxication (picotements dans la bouche) après avoir consommé

uniquement deux à trois huîtres correspondant à une toxicité de 54 à 81 unités souris. Ainsi, une dose faible est capable de produire les premiers signes d'intoxication. D'après les autres cas, il ressort qu'à partir de 400 à 500 unités souris, l'intoxication peut être qualifiée de modérée. En considérant que des individus peuvent consommer une plus grande quantité de coquillages, avoir une plus grande sensibilité, il a alors été considéré qu'un dixième de cette quantité, soit de 40 à 50 unités souris, correspond à des coquillages insalubres (Mac Farren *et al.*, 1965).

2.3.3.2. Caroline du Nord (1987)

La première efflorescence de *G. breve* survenue sur les côtes de Caroline du Nord a été importante géographiquement et persistante puisqu'elle a provoqué la fermeture progressive de plus de 145 ha de zones de production de coquillages entre le 2 novembre 1987 et le 21 janvier 1988, affectant la production de clams (*Mercenaria Mercenaria*) et d'huîtres (*Crassostrea virginica*), la première étant la plus touchée.

Cette efflorescence a été à l'origine d'intoxications humaines dues aux embruns toxiques et à la consommation de coquillages contaminés récoltés durant la pêche à pied. Dans ce dernier cas, 35 personnes des 48 intoxiquées avaient consommé les coquillages avant que l'interdiction ait été annoncée et sept personnes sur les treize restantes les avaient consommés dans les premiers jours du mois de novembre. Bien que des analyses de coquillages n'aient pas été effectuées jusqu'à la fin de l'efflorescence, un échantillon d'huître testé sur souris révéla une teneur de 180 unités souris pour 100 g de chair (Marcaillou-Le Baut *et al.*, 2001).

Après une enquête épidémiologique, les auteurs ont compté 85 personnes ayant mangé 20 menus différents (19 à base d'huîtres, un à base d'huîtres et de clams) et pris en considération 48 malades, ce qui correspond à un taux de maladie de 56 pour cent. Il a été établi que le nombre d'huîtres mangé est en relation avec le risque de développer les troubles. Les huîtres correspondant aux repas de quatre personnes malades ont été analysées et ont montré des toxicités de 35 et 60 unités souris pour 100 grammes. D'autres analyses d'huîtres prélevées dans les mêmes zones de production ont donné des valeurs comprises entre 48 et 170 unités souris, avec une moyenne de 62.

2.3.3.3. Nouvelle-Zélande (1993)

Une toxi-infection alimentaire collective (TIAC) provoquée par des coquillages contaminés par les brevétocines s'est produite pour la première fois en dehors des États-Unis, sur la côte nord-est de la Nouvelle-Zélande en janvier 1993. Cet épisode toxique toucha 116 personnes qui présentèrent les symptômes typiques gastro-intestinaux et neurologiques des INFM tandis que d'autres personnes souffraient de troubles des voies respiratoires après avoir été exposées à des toxines transportées par l'air en bordure de mer. Les recherches de la toxicité de coquillages ont montré, pour les valeurs les plus hautes, entre 160 et 230 unités souris dans les moules (Marcaillou-Le Baut *et al.*, 2001).

2.3.4. Toxines amnésiantes

Chez l'Homme, comme chez les mammifères marins et les animaux de laboratoire, le degré de toxicité de l'acide domoïque dépend de la quantité ingérée et des degrés d'élimination et de biotransformation de ce produit naturel. Lors des intoxications humaines, les moules incriminées contenaient de 300 à 1200 µg/g de chair.

À partir des données disponibles, Todd a pu mettre en relation les symptômes des patients et les doses ingérées. Elles s'étalent de 15 à 20 mg d'AD pour les personnes non affectées jusqu'à 295 mg pour un cas sévèrement intoxiqué. Ces données permettent d'évaluer la dose sans effet qui serait autour de 0,2 à 0,3 mg/kg de poids corporel. A partir de 60 à 110 mg (ou 0,9 à 2,0 mg/kg de poids corporel), on observe des troubles gastro-intestinaux. Les cas les plus atteints, qui sont tous des hommes, ont consommé 135 à 295 mg (1,9 à 4,2 mg/kg).

Cependant, lors de l'épisode toxique enregistré aux États-Unis en 1991 et du à des couteaux, les premiers symptômes sont apparus pour une dose maximum de 0,4 mg/kg de poids corporel (moyenne : 0,16 mg/kg). On ne connaît pas la raison de cet écart de toxicité.

2.4. Probabilité d'exposition au danger

la probabilité d'exposition aux toxines paralysantes est modérée,
la probabilité d'exposition aux toxines diarrhéiques est modérée,
la probabilité d'exposition aux toxines neurologiques est faible,
la probabilité d'exposition aux toxines amnésiantes est modérée,
la probabilité d'exposition aux azaspiracides est modérée.
La probabilité d'exposition pour les produits importés et transformés est modérée.

En résumé, la probabilité d'exposition aux phycotoxines d'un consommateur européen est modérée pour l'ensemble des phycotoxines, à l'exception des toxines neurologiques pour lesquelles la probabilité est faible. Mais il convient d'analyser d'autres paramètres afin d'évaluer le risque pour la santé publique.

D.Caractérisation des risques

Cette quatrième et dernière étape de l'évaluation des risques vise à déterminer une estimation, compte tenu des incertitudes inhérentes à l'évaluation, de la probabilité de la fréquence et de la gravité des effets adverses connus ou potentiels sur la santé susceptibles de se produire dans une population donnée, sur la base de l'identification des dangers, de la caractérisation des dangers et de l'évaluation de l'exposition (Codex Alimentarius, 1999).

1.Probabilité de survenue du danger

Probabilité de survenue du danger = Probabilité d'émission du danger x probabilité d'exposition.

Dans l'approche qualitative, la probabilité de survenue du danger peut être appréciée en suivant ce tableau :

Tableau 1 : Méthode permettant d'estimer la probabilité de survenue du danger (Dufour B., 2006, communication personnelle)

	Probabilité d'émission									
Probabilité D'exposition		Nu	Nu à N	N à F	F	F à M	M	M à E	E	
	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu
	Nu à N	Nu	Nu à N	Nu à N	Nu à N	Nu à N	Nu à N	N	N	N
	N	Nu	Nu à N	Nu à N	Nu à N	Nu à N	N	N	N	N à F
	N à F	Nu	Nu à N	Nu à N	Nu à N	N	N	N	N à F	F
	F	Nu	Nu à N	Nu à N	N	N	N	N à F	F	F
	F à M	Nu	Nu à N	N	N	N	N à F	F	F	F
	M	Nu	N	N	N	N à F	F	F	F à M	M à E
	M à E	Nu	N	N	N à F	F	F	F	M à E	M
	E	Nu	N	N à F	F	F	F	M à E	M	E

Légende : Nu=Nulle, N=Négligeable, F=Faible, M=Modérée, E=Elevée.

- la probabilité de survenue du danger « toxines paralysantes » est faible à modérée,
- la probabilité de survenue du danger « toxines diarrhéiques » est faible à modérée,
- la probabilité de survenue du danger « toxines neurologiques » est négligeable,
- la probabilité de survenue du danger « toxines amnésiantes » est faible à modérée,
- la probabilité de survenue du danger « azaspiracides » est faible à modérée.

La probabilité de survenue du danger pour les produits importés et transformés est modérée à élevée.

2. Les conséquences

Les conséquences envisagées sont de deux types : les conséquences sur la santé humaine, et les conséquences économiques.

2.1. Les conséquences sur la santé humaine

Quelle que soit la famille de toxines et l'atteinte de la santé de l'Homme, il n'existe pas de traitement médical ou d'antidote spécifique. Le traitement est uniquement symptomatique.

Les toxines se fixent de manière réversible sur les récepteurs. Sauf pour les toxines amnésiantes, les lésions observées sont donc réversibles. Les conséquences prises en compte sont seulement celles intervenant à court terme.

Les conséquences sur la santé des toxines paralysantes sont élevées.

Les conséquences sur la santé des toxines diarrhéiques sont faibles.

Les conséquences sur la santé des toxines neurologiques sont négligeables.

Les conséquences sur la santé des toxines amnésiantes sont élevées.

Les conséquences sur la santé des azaspiracides sont modérées.

2.2. Les conséquences économiques

Les conséquences économiques des phycotoxines sont de deux ordres :

- D'une part, les conséquences économiques sont liées aux épisodes d'intoxications alimentaires. En effet, les intoxications entraînent des visites médicales, des arrêts de travail, des hospitalisations, etc. Cela représente un coût non négligeable pour la société. De plus, la filière peut alors véhiculer une image négative, et la consommation de coquillages peut brutalement chuter, entraînant des pertes économiques importantes.
- D'autre part, lors d'épisodes toxiques, la fermeture des zones concernées est effectuée. Les personnes vivant de la conchyliculture sont alors obligées de cesser complètement leur activité. Ceci peut engendrer des pertes importantes, surtout si la fermeture de la zone est longue. Pour illustrer cela, nous pouvons prendre l'exemple de l'épisode toxique qui a eu lieu en baie d'Arcachon, et qui a entraîné la fermeture de la zone du 29 avril au 3 juin 2005. 376 entreprises de conchyliculture, employant environ 1000 personnes, ont dû cesser leur activité pendant 5 semaines. Or, ils ont estimé entre 500 000 et 800 000 euros de pertes par jour. L'État a dû débloquer une aide de 2,5 millions d'euros.

Les conséquences économiques sont équivalentes pour les cinq classes de toxines, et elles sont modérées.

Tableau 2 : Méthode permettant d'estimer les conséquences inhérentes au danger (Dufour B., 2006, communication personnelle)

	Conséquences économiques									
Conséquences		Nu	Nu à N	N	N à F	F	F à M	M	M à E	E
Sur la santé humaine	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu
	Nu à N	Nu	Nu à N	Nu à N	Nu à N	Nu à N	Nu à N	Nu à N	N	N
	N	Nu	Nu à N	Nu à N	Nu à N	Nu à N	Nu à N	N	N	N à F
	N à F	Nu	Nu à N	Nu à N	Nu à N	N	N	N	N à F	F
	F	Nu	Nu à N	Nu à N	N	N	N	N à F	F	F
	F à M	Nu	Nu à N	N	N	N	N à F	F	F	F
	M	Nu	N	N	N	N à F	F	F	F à M	M à E
	M à E	Nu	N	N	N à F	F	F	F	M à E	M
	E	Nu	N	N à F	F	F	F	M à E	M	E

Légende : Nu=Nulle, N=Négligeable, F=Faible, M=Modérée, E=Elevée.

2.3. Appréciation globale des conséquences

- les conséquences liées aux toxines paralysantes sont modérées à élevées,
- les conséquences liées aux toxines diarrhéiques sont négligeables à faibles,
- les conséquences liées aux toxines neurologiques sont négligeables,
- les conséquences liées aux toxines amnésiantes sont modérées à élevées,
- les conséquences liées aux azaspiracides sont faibles.

Les conséquences concernant les produits importés et transformés dépend des toxines retrouvées, et sont les mêmes que celles indiquées ci-dessus, sauf pour les AZ où le risque global peut être considéré nul à négligeable car le phénomène n'a été décrit qu'en Europe.

3. Estimation du risque

Pour estimer le risque, on croise la probabilité de survenue du danger avec les conséquences.

Tableau 3 : Méthode permettant d'estimer le risque final (Dufour B., 2006, communication personnelle)

Conséquences	Probabilité de survenue du danger									
		Nu	Nu à N	N à F	F	F à M	M	M à E	E	
	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu	Nu
	Nu à N	Nu	Nu à N	Nu à N	Nu à N	Nu à N	Nu à N	N	N	N
	N	Nu	Nu à N	Nu à N	Nu à N	Nu à N	N	N	N	N à F
	N à F	Nu	Nu à N	Nu à N	Nu à N	N	N	N	N à F	F
	F	Nu	Nu à N	Nu à N	N	N	N	N à F	F	F
	F à M	Nu	Nu à N	N	N	N	N à F	F	F	F
	M	Nu	N	N	N	N à F	F	F	F	M à E
	M à E	Nu	N	N	N à F	F	F	F	M à E	M
	E	Nu	N	N à F	F	F	F	M à E	M	E

Légende : Nu=Nulle, N=Négligeable, F=Faible, M=Modérée, E=Elevée.

L'estimation finale du risque lié aux toxines paralysantes est modérée à élevée.
 L'estimation finale du risque lié aux toxines diarrhéiques est négligeable à faible.
 L'estimation finale du risque lié aux toxines neurologiques est nulle à négligeable.
 L'estimation finale du risque lié aux toxines amnésiantes est modérée à élevée.
 L'estimation finale du risque lié aux azaspiracides est négligeable.

Concernant les produits importés et transformés, le risque lié :

- aux toxines paralysantes est modéré à élevé,
- aux toxines diarrhéiques est nul à faible,
- aux toxines neurologiques est négligeable,
- aux toxines amnésiantes est modéré à élevé,
- aux azaspiracides est négligeable.

En résumé de l'évaluation qualitative des risques, les différentes classes de phycotoxines ne représentent pas le même risque pour le consommateur européen. En effet, les toxines les plus à risque sont les toxines paralysantes et amnésiantes. Viennent ensuite les toxines diarrhéiques, les azaspiracides, et enfin, les toxines neurologiques. Est-ce que les mesures de gestion mises en place correspondent à cette observation ?

II. GESTION DES RISQUES LIÉS À LA CONSOMMATION DE PRODUITS DE LA MER CONTAMINÉS PAR LES PHYCOTOXINES

La gestion des risques consiste à réduire le risque à un niveau acceptable. Le gestionnaire du risque va comparer le résultat de l'évaluation scientifique des risques avec un niveau de risque jugé acceptable par la société.

Le risque acceptable est fonction de la perception du risque. Cette perception est fonction :

- du degré de contrôle sur le risque (actif ou passif),
- de la représentation du risque,
- de l'immédiateté du risque,
- du bénéfice attendu,
- de l'incertitude (perçue comme un risque),
- de l'aversion du risque.

Le risque acceptable est souvent déterminé par les médias.

En Europe, et plus particulièrement en France où la consommation de coquillages relève d'une vraie coutume culinaire, le risque lié aux phycotoxines dans les coquillages est mal accepté. Ceci est accentué par le fait que les coquillages qui contiennent des phycotoxines sont apparemment sains. Le gestionnaire du risque dans l'Union Européenne a donc pris des mesures.

Dans une première partie, il sera fait état de la difficulté de mettre en place des mesures de prévention.

Puis la surveillance et la réglementation seront exposées. La réglementation en vigueur dans l'Union Européenne poursuit deux objectifs :

- d'une part, limiter la présence ou la quantité de toxines dans les denrées alimentaires,
- d'autre part, contrôler les eaux du littoral et en particulier les zones de conchyliculture.

Les textes réglementaires précisent également les types de méthodes d'analyse ou de détection des phycotoxines à utiliser dans la surveillance. Ils donnent les grandes lignes concernant l'échantillonnage.

A. Les mesures de prévention

Il existe malheureusement peu de moyens de prévenir la contamination des coquillages par les phycotoxines.

D'une part, les proliférations cellulaires et la toxinogénèse sont des phénomènes très complexes, difficiles à prédire. Même si certains facteurs du milieu (luminosité, salinité, etc.) sont connus, il est difficile d'appréhender les interactions qui existent entre ces facteurs. Même si des épisodes historiques montrent que, pour une zone touchée, les épisodes sont souvent récurrents d'une saison sur l'autre, on ne peut rien prédire avec certitude. Pour le moment, il n'est pas possible de maîtriser suffisamment bien les paramètres pour pouvoir les éviter.

D'autre part, tous les épisodes toxiques sont différents. En effet, à chaque fois, la nature des toxines et le profil toxinique peuvent varier. Le niveau de toxicité atteint dans des coquillages dépend du profil toxinique de l'épisode, mais également de la nature même du coquillage et de son stade physiologique. A la fin d'un épisode, les coquillages se dépurent, mais selon des cinétiques variables et différentes selon les espèces.

En conclusion de cette partie, comme il est difficile de prévenir la contamination des coquillages, il est nécessaire de surveiller les zones de production et les coquillages mis sur le marché. De plus, il est nécessaire de surveiller les nouvelles toxines.

B.La surveillance et la réglementation

1.Présentation de la Réglementation jusqu'au 31 décembre 2005

La réglementation qui est présentée ci-après est en vigueur jusqu'au 31 décembre 2005. En effet, un changement majeur de réglementation va avoir lieu à partir du 01 janvier 2006, date d'entrée en vigueur du Paquet Hygiène. Le Paquet Hygiène est constitué d'un ensemble de règlements communautaires, il est donc d'applicabilité directe dans les différents Etats Membres de l'Union Européenne. Ces règlements concernent l'hygiène alimentaire dans son ensemble, à savoir « *de la fourche à la fourchette* ».

L'objectif poursuivi est de garantir une meilleure sécurité pour le consommateur, et ce en clarifiant la réglementation existante. La responsabilité pour le producteur sera de plus en plus une responsabilité de résultat, et non plus une responsabilité de moyens comme c'était le cas auparavant. En conséquence, le droit national va être refondu afin de correspondre à ces nouveaux règlements. Mais de nombreux éléments de l'ancienne réglementation persisteront, c'est pourquoi elle est présentée ci-après.

1.1.Réglementations européenne et française

Jusqu'au 31 décembre 2005, la réglementation européenne concernant les mollusques bivalves vivants figure dans la directive 91/492/CEE du 15 juillet 1991 complétée par la directive 97/61/CEE du 20 octobre 1997.

Etant donné que ce sont des directives, elles nécessitaient d'être transposées dans le droit national pour être applicables. Il s'agit du décret 94/340 du 28 avril 1994 complété notamment par l'arrêté du 2 juillet 1996 (JO du 19 juillet 1996) modifié le 25 novembre 1999 (JO du 8 décembre 1999).

La directive 91/493/CEE du 22 juillet 1991 régit les autres produits de la pêche.

Enfin, l'arrêté du 29 décembre 1992 (JO du 9 janvier 1993) et l'arrêté du 6 juin 1994, (JO du 24 juin 1994) concernent les produits français et européens et les produits importés de pays tiers.

1.1.1.Directive 91/492/CEE du 15 juillet 1991

Cette directive fixe les règles sanitaires régissant la production et la mise sur le marché de mollusques bivalves vivants destinés à être directement consommés ou être transformés avant consommation. Elle s'applique également aux échinodermes, tuniciers et gastéropodes marins. Elle doit être transcrite dans le droit des différents Etats Membres pour être applicable.

Cette directive est très importante car elle précise un certain nombre de critères de salubrité auxquels doivent répondre les mollusques bivalves vivants, parmi lesquels les critères relatifs aux phycotoxines.

Cette directive indique également que, même si les produits sont destinés à être transformés, ils doivent répondre aux mêmes exigences. Cela est logique pour les phycotoxines étant donné que ce sont des molécules très stables, qui ne seront pas ou peu éliminées par des processus de transformation.

Cette directive détaille également les critères d'une surveillance périodique des zones de production et de reparcage des mollusques. Dans un premier temps, les Etats Membres doivent contrôler la présence éventuelle de plancton toxique dans les eaux de production et de reparcage.

En cas de présence de phytoplancton toxigène et donc en cas de suspicion d'accumulation de toxines dans la chair des mollusques, cette disposition précise qu'un contrôle renforcé doit être entrepris :

- sur le phytoplancton (augmentation du nombre de points de prélèvements d'eau et du nombre d'échantillons) ;
- sur les coquillages de la zone affectée (augmentation du nombre des tests de toxicité).

Dans le droit national français, c'est l'arrêté du 2 juillet 1996 (JORF du 19 juillet 1996) qui reprend l'ensemble de ces prescriptions, et fixe les critères sanitaires auxquels doivent satisfaire les coquillages vivants destinés à la consommation humaine quelle que soit l'origine des produits.

1.1.2. Directive 97/61/CEE du 20 octobre 1997

Cette directive modifie la directive 91/492/CEE du 15 juillet 1991. Elle introduit une nouvelle famille de toxines à contrôler, à savoir les phycotoxines responsables de l'IAFM.

Par conséquent, l'arrêté du 2 juillet 1996 a lui aussi été modifié, et ce par l'arrêté du 25 novembre 1999 (JORF du 8 décembre 1999).

1.1.3. Décision communautaire 2002/225/CE du 15 mars 2002

Cette décision fixe les modalités d'application de la directive 91/492/CEE du Conseil en ce qui concerne les limites maximales et les méthodes d'analyse de certaines phycotoxines marines dans les mollusques bivalves, les échinodermes, les tuniciers et les gastéropodes marins.

Elle renforce la réglementation existante en y incluant la surveillance des coquillages vis-à-vis des azaspiracides.

1.1.4. Décision communautaire 2002/226/CE du 15 mars 2002

Cette décision instaure des contrôles sanitaires spéciaux pour la récolte et le traitement de certains mollusques bivalves présentant un taux de toxines amnésiantes supérieur à la limite fixée par la directive 91/492/CEE du Conseil.

1.1.5. Directive 91/493/CEE du 22 juillet 1991

Cette directive, assez générale, fixe les règles sanitaires régissant la production et la mise sur le marché des produits de la mer. Elle concerne plus particulièrement les poissons et le syndrome ciguatérique. Elle a été reprise dans l'arrêté du 29 décembre 1992 (JORF du 9 janvier 1993).

1.2.Réglementation mondiale

D'après Van Egmond *et al.* (1993), il existe dans le monde seulement une vingtaine de pays possédant une législation sur les phycotoxines. En général, cette législation concerne les toxines diarrhéiques et paralysantes. D'après Dragacci et Belin (2001), la situation a peu évolué depuis.

1.2.1.Toxines diarrhéiques

Une douzaine de pays possèdent une réglementation où le seuil de salubrité repose parfois sur la limite des méthodes d'analyse. La méthode d'analyse employée est souvent un bioessai sur rongeur (souris ou rat). Le résultat est considéré comme positif si on a une réponse positive chez l'animal test.

Parfois, une équivalence de ce seuil est exprimée en unités souris pour 100 g d'hépatopancréas ou bien en équivalent acide okadaïque en microgrammes pour 100 g d'hépatopancréas, soit un seuil de positivité de 5 unités souris pour 100 g d'hépatopancréas ou 40-60 µg en équivalent acide okadaïque pour 100 g d'hépatopancréas (Dragacci et Belin, 2001).

1.2.2.Toxines paralysantes

Un nombre plus important de pays (21) ont une réglementation dans les coquillages avec un seuil fixé à 40 ou 80 µg d'équivalent saxitoxine ou de phycotoxines paralysantes pour 100 g de chair totale ou bien exprimé en unités souris (400 unités souris pour 100 g de chair totale). Un bioessai sur souris pour la recherche de toxines paralysantes a pu être standardisé de telle façon qu'une table de conversion donne une équivalence entre la réponse biologique de l'animal test et la quantité supposée de toxines présentes dans l'extrait injecté aux animaux tests.

Mais certains pays se fondent sur la quantification qui peut être effectuée par CLHP couplée à la fluorimétrie.

Il n'existe pas de correspondance entre la toxicité évaluée sur animaux et la quantité de toxines déterminée par méthode physicochimique comme la CLHP.

1.2.3.Toxines amnésiantes

Le Canada fut le premier pays à réglementer ces toxines au début des années 1990., suite à un épisode toxique. La teneur maximale d'acide domoïque dans la chair totale des coquillages était fixée à 20 microgrammes par gramme.

Par la suite, les États-Unis, l'Australie, la Nouvelle-Zélande, le Japon puis l'Europe ont repris dans leur législation cette proposition. Les coquilles Saint-Jacques, les pétoncles et les moules sont principalement concernés par cette réglementation.

2.Synthèse : Les phycotoxines réglementées au sein de l'Union Européenne

Au sein de l'Union Européenne, le gestionnaire du risque a réglementé les phycotoxines marines présentes dans les coquillages entrant dans l'alimentation humaine en raison et en fonction de leur toxicité aiguë, et non pas en fonction de leur toxicité chronique.

La réglementation ne concerne pas une ou plusieurs molécules précises, mais bien des familles entières de phycotoxines. Il existe une exception pour les toxines amnésiantes. En effet, seul l'acide domoïque, toxine largement majoritaire (à plus de 95%) et la plus toxique, est réglementé.

Les familles de phycotoxines concernées par la réglementation européenne sont les suivantes:

- les phycotoxines paralysantes (saxitoxine, néo-saxitoxine, gonyautoxines) ;
- les phycotoxines diarrhéiques (acide okadaïque, dinophysistoxines) ;
- les yessotoxines et pecténotoxines ;
- les phycotoxines amnésiantes (acide domoïque) ;
- les azaspiracides.

Il est important de remarquer que les toxines neurologiques ne sont pas réglementées au sein de l'Union Européenne. Cela correspond aux résultats de l'évaluation scientifique des risques. En effet, la commission européenne a considéré que, comme les toxines neurologiques n'ont jamais été retrouvées en Europe, et que leur ichtyotoxicité importante permet une bonne détection, celles-ci ne présentaient pas un risque important pour la Santé Publique.

L'analyse des parties comestibles des mollusques par méthode biologique (test souris) pour détecter le syndrome diarrhéique ne doit pas donner de réaction positive chez l'animal test. Il s'agit de la méthode référence. De plus, la teneur en phycotoxines induisant le syndrome diarrhéique présente dans les parties comestibles des mollusques (corps entier ou toute partie consommable séparément) ne doit pas dépasser 160 µg pour 100 g en équivalent acide okadaïque, en ce qui concerne l'acide okadaïque, les DTXs et les pecténotoxines. Il s'agit d'une teneur globale. Concernant les yessotoxines, la teneur présente dans les parties comestibles des mollusques (corps entier ou toute partie consommable séparément) ne doit pas dépasser 1mg/kg en équivalent yessotoxine. Ces teneurs sont déterminées par la méthode d'analyse biologique, ou par des méthodes alternatives.

La teneur en phycotoxines induisant le syndrome paralytique présente dans les parties comestibles des mollusques (corps entier ou toute partie consommable séparément) ne doit pas dépasser 80 µg pour 100 g, teneur déterminée par la méthode d'analyse biologique (ou toute autre méthode recommandée par l'Union Européenne). Cette analyse peut être complétée le cas échéant par une méthode reposant sur l'analyse chimique de la saxitoxine, qui est la molécule de référence pour exprimer la toxicité. La réglementation précise qu'en cas de contestation, la méthode d'analyse biologique fera foi puisqu'elle est normalisée au niveau international.

Concernant les toxines amnésiantes, la teneur en acide domoïque ne doit pas dépasser 20 µg/g dans les parties comestibles (corps entier ou partie consommable) telle que mesurée par méthode CLPH, qui est une méthode d'analyse physicochimique de quantification.

Concernant les azaspiracides, la limite maximale globale tolérée dans le corps entier ou toute partie consommable est fixée à 160 µg pour 100 g en équivalent azaspiracide. Les méthodes de détection utilisées peuvent être des méthodes biologiques ou alternatives.

3. Les méthodes officielles d'analyse utilisées pour la recherche dans les coquillages

Il est important que le législateur soit le plus précis possible quand il décrit les méthodes d'analyses utilisées dans les contrôles officiels. En général, une méthode officielle va être définie. A défaut, le législateur va préciser les critères de performance ou les caractéristiques auxquels la méthode d'analyse doit répondre pour être employée dans le cadre des contrôles officiels.

3.1.Méthodes biologiques

Les méthodes biologiques, à savoir les bioessais sur rongeurs en ce qui concerne les phycotoxines, possèdent une caractéristique très intéressante : la réponse de l'analyse est globale et de nature toxicologique. En effet, à l'exception des toxines amnésiantes où l'on ne recherche que l'acide domoïque, il existe de nombreuses molécules appartenant à une même famille de phycotoxines, et leur toxicité est variable. Il serait à la fois fastidieux et hasardeux de rechercher chaque molécule séparément. De plus, ces bioessais permettent de détecter, par réaction de l'animal test, d'éventuelles toxines ou autres principes toxiques mal ou non encore identifiés. L'utilisation de méthodes biologiques concourt à assurer un haut niveau de sécurité pour le consommateur.

Mais ces méthodes possèdent des inconvénients : d'une part, le fait de travailler sur des animaux vivants peut donner une certaine variabilité dans les résultats. Il est très important que les analyses soient parfaitement codifiées. D'autre part, d'un point de vue éthique, il n'est pas satisfaisant d'avoir recours à des animaux vivants.

Les méthodes officielles ou recommandées par l'Union Européenne ont été particulièrement étudiées quant à leur performance en termes de fiabilité et robustesse, et ont fait l'objet, dans certains cas, d'une validation par analyse d'intercomparaison interlaboratoire.

3.1.1.Recherche des phycotoxines diarrhéiques

La recherche des phycotoxines diarrhéiques doit s'effectuer par la méthode biologique de référence recommandée au plan communautaire (Yasumoto *et al.*, 1978). Le résultat est considéré comme positif si on observe la mort de deux souris sur trois dans un délai de 24 h après l'injection d'extraits d'hépatopancreas des échantillons à tester.

3.1.2.Recherche des phycotoxines paralysantes

La méthode officielle choisie par l'Union Européenne est également une méthode biologique. Elle donne une approximation de la quantification en équivalent saxitoxine (molécule la plus toxique de la famille des phycotoxines paralysantes et disponible en quantité suffisante dans le commerce) évaluée par le délai de survie des souris après injection intrapéritonéale d'un extrait d'un broyat de chair totale de l'échantillon, en tenant compte de tables de conversion qui ont été préalablement définies.

Les souris sont observées pendant une heure et le temps de survie médian sert à calculer le nombre d'unités souris. Le résultat est converti en microgrammes d'équivalent saxitoxine par 100 g de chair. Le seuil de détection de la méthode est de l'ordre de 38 µg, donc bien inférieur au seuil réglementaire.

3.1.3.Recherche des phycotoxines amnésiantes

La méthode officielle est une analyse en CLHP couplée à une détection par UV. Des techniques d'extraction différentes peuvent être utilisées : celle de Lawrence *et al.* (1991) et celle de Quilliam *et al.* (1995).

3.2.Méthodes de détection alternatives

Il existe un certain nombre d'autres techniques, notamment des techniques physicochimiques par CLHP couplées ou non à la spectrométrie de masse, et les immuno-essais. Ces méthodes d'analyses permettent de déterminer avec précision la présence de telles ou telles toxines, et de les quantifier. Mais il est nécessaire de posséder les molécules étalons correspondantes.

En général, ces méthodes de détection alternatives sont utilisées en complément des bioessais par les laboratoires de référence afin de contribuer, au-delà du risque toxicologique observé dans les bioessais, à reconnaître la nature ou à apprécier la quantité de toxines présentes dans le coquillage (Frémy *et al.*, 2001).

4. Les plans nationaux de surveillance et de contrôle des phycotoxines marines dans les coquillages denrées de production nationale

En France, le contrôle des coquillages denrées est sous la responsabilité de la Direction Générale de l'Alimentation (DGAL) avec le concours de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa). Cette direction générale dépend du Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation, de la Pêche et de la Ruralité (MAAPR).

4.1. Les plans de surveillance et de contrôle

La Direction Générale de l'Alimentation programme chaque année des plans nationaux de surveillance et de contrôle. Il s'agit de campagnes de prélèvements d'échantillons de coquillages-denrées analysés par les laboratoires d'application.

L'objectif des plans de surveillance est d'avoir une idée de la contamination globale des denrées mises sur le marché par les phycotoxines. L'échantillonnage est alors aléatoire.

Par contre, l'échantillonnage des plans de contrôle n'est pas aléatoire, mais orienté. Il s'agit en effet de vérifier que les denrées mises sur le marché sont conformes à la réglementation. Les autorités effectuent des prélèvements dès qu'il existe un doute de la probable contamination des denrées. De plus, les denrées considérées « à risque » en fonction par exemple de leur nature ou de leur provenance, vont subir une pression d'analyse plus importante.

Si la suspicion de contamination des denrées est suffisamment forte, les échantillons sont consignés, et on parle alors de contrôle renforcé. Dans le cas contraire, il s'agit d'un simple contrôle orienté.

Dans tous les cas, si les seuils réglementaires sont dépassés, une enquête épidémiologique est effectuée par les autorités afin de rechercher la cause de la contamination. De même, dès qu'un cas de TIAC dont l'origine pourrait être une intoxication à des phycotoxines (symptômes apparaissant quelques heures après l'ingestion des coquillages) est déclaré, une analyse pour la recherche d'éventuelles toxines est commandée et, en cas de positivité, une enquête rétrospective est lancée afin de déterminer la nature et l'origine de la contamination.

Des règles d'échantillonnage sont définies au niveau européen; elles tiennent notamment compte de la production nationale et de la répartition locale. Rappelons que les plans de contrôle sont une obligation communautaire (directive 96/23/CEE du Conseil du 29 avril 1996).

En France, ces plans nationaux concernent chaque année plusieurs centaines de prélèvements. Les analyses des échantillons sont effectuées par le réseau des laboratoires départementaux vétérinaires agréés et encadrés par le laboratoire national de référence, lequel réalisera les analyses de confirmation en cas de résultats positifs.

4.2. Les laboratoires d'analyse et de référence

L'Union Européenne s'est dotée d'un laboratoire communautaire de référence (LCR) le 14 juin 1993, le laboratoire des biotoxines marines du ministère de la Santé, situé à Vigo (Espagne). Il

s'agissait de la décision n° 93/383/CEE du Conseil. De plus, chaque Etat Membre s'est doté d'un LNR (Laboratoire national de référence).

Les LCR sont chargés de coordonner la recherche vis-à-vis des nouvelles méthodes analytiques, de s'impliquer dans le règlement des différends entre Etats Membres, d'assister les services de la Commission (avis scientifique et technique). Ils doivent également aider les LNR (Laboratoire Nationaux de Référence) par la mise à disposition de méthodes de routine, par le support technique (avis) et par l'organisation d'essais inter laboratoires. Ces essais permettent de vérifier que les mêmes résultats sont obtenus à partir d'un même échantillon dans les différents laboratoires.

Les LNR sont chargés dans leurs pays respectifs de coordonner les activités des laboratoires d'application chargés des analyses sur les phycotoxines, d'organiser des essais d'aptitude à leur intention, d'assurer la diffusion des informations fournies par le LCR aux autorités du pays et aux laboratoires d'application et, enfin, d'assister les autorités du pays pour la mise en place de plans de contrôle appropriés. En France, un réseau de dix laboratoires départementaux vétérinaires a été formé à la pratique des méthodes officielles d'analyse sur les phycotoxines par le LNR qui appartient à l'Afssa.

Il existe de nombreuses variantes parmi les bioessais existants. Afin de sélectionner les protocoles analytiques et de les harmoniser, un groupe de travail comprenant les représentants des LNR des Etats membres et coordonné par le LCR a été créé. Leurs recommandations peuvent être reprises dans la réglementation européenne après examen.

5. Surveillance des eaux du littoral

Chaque Etat Membre est chargé d'organiser la surveillance des phycotoxines réglementées dans les eaux du littoral. La réglementation définit avec précision les règles d'ouverture et de fermeture à la récolte ou au ramassage des coquillages.

En France, cette surveillance est sous la responsabilité du Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation, de la Pêche et de la Ruralité (MAAPR). Au sein de ce ministère, la surveillance est organisée par la Direction des Pêches Maritimes et de l'Aquaculture (DPMA). Elle s'appuie sur l'Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer (Ifremer), qui a été créé en 1984, et qui est sous la tutelle conjointe des ministères chargés de la Recherche, de l'Agriculture, et de la Pêche, de l'Equipement, des Transports et du logement, et de l'Environnement.

Le réseau de surveillance du phytoplancton et des phycotoxines s'appelle le réseau Réphy.

L'Ifremer n'assure pas seulement la surveillance des espèces phytoplanctoniques présentes sur l'ensemble du littoral français métropolitain. Elle effectue également le suivi des toxines s'accumulant dans les coquillages, mais ce seulement dans leur milieu naturel (parcs, gisements).

5.1. Présentation du Réphy

Suite à de nombreuses intoxications de type diarrhéique chez les consommateurs de coquillages, en 1983 et 1984, sur les côtes bretonnes, l'Ifremer a créé le réseau Réphy. Ces intoxications avaient pour origine le développement dans le milieu littoral de *Dinophysis*.

Depuis sa mise en place, les objectifs du Réphy sont :

- la connaissance de la distribution spatio-temporelle des différentes espèces phytoplanctoniques des eaux côtières et lagunaires, et le recensement des événements tels que les eaux colorées, les efflorescences exceptionnelles et les développements de toutes espèces toxiques ou nuisibles susceptibles d'affecter la faune marine;
- la protection des consommateurs, assurée par la détection des espèces phytoplanctoniques productrices de toxines, et la recherche de ces toxines dans les coquillages.

Le Réphy effectue deux types de prélèvements pour répondre à ces objectifs : des prélèvements d'eau permettant la détection des espèces toxiques et nuisibles, et des prélèvements de coquillages pour le suivi des toxines dans les produits consommables.

En fait, la stratégie est la suivante : la surveillance est axée sur la détection des espèces toxiques dans l'eau. La recherche des phycotoxines dans les coquillages est déclenchée uniquement si cela s'avère nécessaire. Ce système permet de mieux cibler l'échantillonnage sur les coquillages. Cela est beaucoup plus efficace que si cet échantillonnage était effectué en aveugle. La stratégie choisie semble efficace. En effet, le nombre d'intoxications enregistrées depuis une dizaine d'années est faible.

Jusqu'en 1988, en France, seules les espèces de *Dinophysis* pouvant entraîner la contamination des coquillages et entraîner des IDFM chez les consommateurs étaient surveillées. En 1988, la première mise en évidence de toxines paralysantes dans des coquillages de Bretagne Nord-Ouest, suite à la prolifération de l'espèce *Alexandrium minutum*, a conduit à la mise en place de la surveillance des toxines paralysantes et des espèces les produisant.

La directive 97/61/CEE du 20 octobre 1997 a imposé la prise en compte des toxines amnésiantes dans la surveillance, suite à des épisodes toxiques survenus dans certains pays de l'Union européenne. La mise en place de la surveillance des toxines amnésiantes, et des espèces les produisant, a démarré en 1999 dans le cadre du Réphy et la première mise en évidence de ces toxines en quantité dangereuse dans des coquillages a eu lieu au printemps 2000 en Bretagne Ouest.

Le réseau Réphy ne s'occupe pas des azaspiracides. En effet, la recherche des espèces productrices d'AZ dans les eaux du littoral n'est pas imposée par la réglementation. Il est vrai que nous ne connaissons pas avec certitude l'espèce de phytoplancton responsable.

5.2.Fonctionnement opérationnel du Réphy

Douze laboratoires côtiers d'Ifremer assurent les prélèvements, les observations et analyses, la saisie des données, la valorisation et la diffusion des résultats au niveau régional. Ils sont répartis sur les côtes de la mer du Nord, de la Manche, de l'Atlantique et de la Méditerranée.

Il existe une soixantaine de points de prélèvement répartis sur l'ensemble du littoral. Les prélèvements d'eau sont réalisés régulièrement toute l'année. Selon les points, soit toutes les espèces phytoplanctoniques présentes sont observées, soit seulement les espèces toxiques et nuisibles. Si des espèces toxiques sont détectées, la surveillance est renforcée. En effet, la surveillance de points supplémentaires est activée (200 points mobilisables au total) et la fréquence des prélèvements d'eau est augmentée. Bien sûr, les coquillages du secteur concerné sont simultanément prélevés et soumis à des analyses visant à évaluer leur toxicité.

Un seuil d'alerte est défini pour chaque espèce toxique, et ce en fonction de plusieurs aspects : le principe de précaution, l'analyse des données acquises antérieurement sur l'ensemble du littoral, et les seuils retenus dans d'autres pays européens.

Les seuils d'alerte actuellement retenus sont (Dragacci et Belin, 2001):

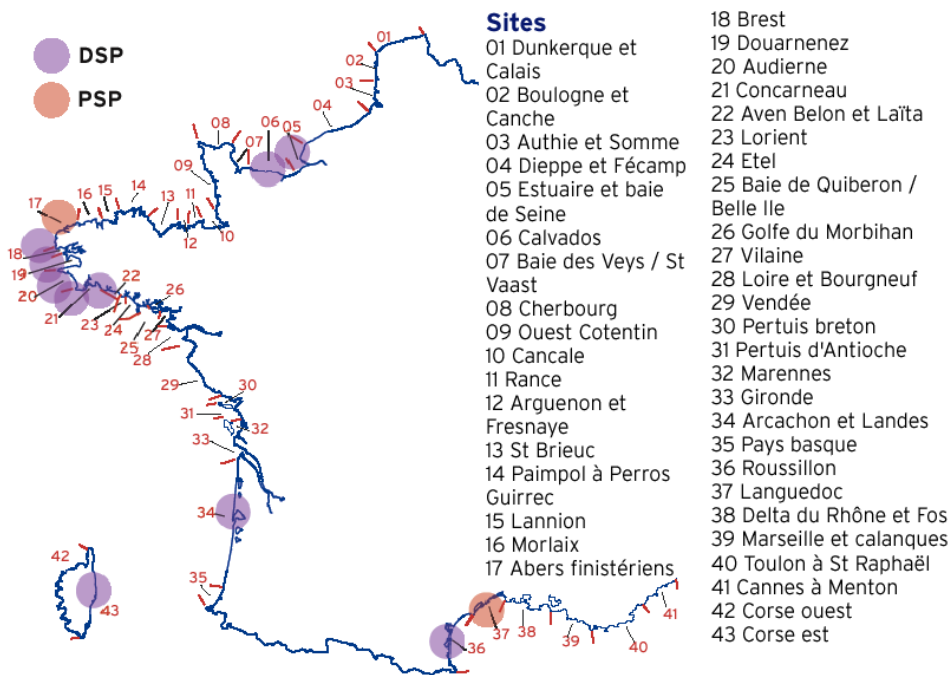
- pour *Dinophysis*, dès détection dans l'eau ;
- pour *Alexandrium* une concentration supérieure à un seuil pouvant varier de 5 000 à 50 000 cellules par litre selon les zones;
- pour *Pseudo-nitzschia* une concentration supérieure à 100000 cellules par litre.

Ces seuils sont sujets à évolution pour *Alexandrium* et *Pseudo-nitzschia*, étant donné les incertitudes relatives aux toxicités comparées des différentes espèces et souches d'*Alexandrium*, et le peu de recul vis-à-vis du phénomène *Pseudo-nitzschia*.

Les fréquences de prélèvement sont d'une fois par quinzaine en période normale, et d'une fois par semaine dans les zones à risque (zones qui ont été touchées au moins une fois par des épisodes toxiques) et en période de risque (prélèvements d'eau et de coquillages). La période de risque est variable selon les zones : au printemps et en été en Manche et Atlantique, très variable et souvent toute l'année en Méditerranée.

Les résultats sont transmis à la préfecture du département. C'est en effet du ressort du préfet de prendre toute mesure relative à la sécurité des personnes dans son département. Il peut s'agir d'arrêtés préfectoraux pour interdire la vente et le ramassage des coquillages devenus impropres à la consommation (ou bien pour lever l'interdiction quand il n'y a plus de risque), d'information des conchyliculteurs et pêcheurs professionnels concernés, d'information du public par différentes voies (médias, affichage sur les plages et en mairie, etc). Il existe bien une séparation nette entre la surveillance et la décision finale. La figure 24 présente les zones qui ont fait l'objet d'une fermeture temporaire.

Figure 24 : Fermeture temporaire en raison de la présence de phycotoxines, au 15 novembre 2003. (source : La Vieille *et al.*, 2004).



5.3. Paramètres mesurés et méthodes

5.3.1. Reconnaissance des espèces toxiques dans l'eau de mer

5.3.1.1. Echantillonnage

Il existe deux types d'échantillonnage :

- un échantillonnage dit « régulier » (tous les 15 jours) permet de suivre l'évolution des populations naturelles mais,
- un échantillonnage dit « épisodique » plus serré lorsque des espèces toxiques sont détectées, et ce tant que les toxines sont présentes dans les coquillages.

Les prélèvements d'eau sont systématiquement accompagnés de la mesure de quelques paramètres comme la température, la salinité, et turbidité, et ce afin d'avoir les informations minimales sur le contexte environnemental.

5.3.1.2. Les analyses de routine

Les échantillons d'eau sont d'abord mis à décanter dans une cuve d'eau.

Ensuite, l'identification des espèces peut être faite sur le vivant ou sur des échantillons fixés par le lugol. La quantification se fait par comptage au microscope inversé selon la méthode d'Utermöhl. Les concentrations sont données en cellules par litre, le seuil de détection des espèces sous surveillance étant fixé à 100 cellules par litre (Billard *et al.*, 2001).

5.3.1.3. Autres méthodes de recherche

Même pour un taxonomiste confirmé, la reconnaissance de certaines espèces est parfois très délicate, comme par exemple les espèces de *Pseudo-nitzschia*. C'est pourquoi il est parfois nécessaire d'avoir recours à d'autres méthodes afin de reconnaître les espèces.

5.3.1.3.1 Microscopie

Pour plus de sûreté, afin d'identifier des espèces de *Pseudo-nitzschia*, il convient d'effectuer une observation en microscopie électronique, à balayage ou à transmission, après nettoyage à l'acide des frustules. Cette méthode a l'avantage de permettre la visualisation des ornements fins caractéristiques de l'espèce. Par contre, cette procédure nécessite une infrastructure importante qui n'est pas disponible dans tous les centres d'analyse du réseau Réphy. Elle ne peut donc pas être effectuée facilement en routine.

5.3.1.3.2 Biologie moléculaire

L'utilisation de la biologie moléculaire peut être envisagée pour la détection des espèces toxiques. En effet, un certain nombre d'avancées ont été réalisées par le marquage fluorescent de cellules à l'aide de sondes. Une sonde est un outil moléculaire destiné à révéler la présence d'une espèce particulière.

Il existe trois types de sondes:

- les lectines. Ces protéines ont une affinité connue pour des résidus glucidiques. Elles sont utilisées pour détecter des glycoprotéines et des glycolipides de surface. Elles sont particulièrement intéressantes pour reconnaître certains stades enkystés par exemple, pour lesquels les autres marqueurs ne fonctionnent pas;
- les anticorps. Ils se fixent de façon spécifique sur des antigènes, à savoir des protéines, des polysaccharides, des acides nucléiques ou des toxines. Mais les phycotoxines sont souvent des petites molécules non peptidiques non immunogéniques. Il faut qu'ils soient associés à des protéines pour le devenir.
- les sondes nucléotidiques. Leur séquence est complémentaire de celle de l'acide nucléique recherché. On peut ajouter un marqueur fluorescent sur ces sondes (Billard *et al*, 2001).

Il faut que ces sondes soient marquées pour pouvoir être repérées. Les marqueurs peuvent être des radioisotopes, des molécules fluorescentes ou enfin des enzymes.

La plupart des anticorps et toutes les lectines visent des molécules associées à la surface des cellules. Beaucoup d'anticorps sont également élaborés contre les toxines. Les sondes nucléotidiques sont a priori et, dans le cas des espèces toxiques, plus spécifiques, et leur développement est plus récent.

Si le nombre de sondes a progressé rapidement ces dernières années, car de nombreux laboratoires s'y sont intéressés, elles ne sont généralement pas disponibles dans le commerce et ne sont pas encore utilisées en routine. Le passage de l'expérimentation sur cultures au milieu naturel ne se fait pas sans difficulté. En [effet](#), la sonde doit être assez bonne pour marquer de façon reproductible les espèces cibles dans des conditions naturelles mais il ne doit pas y avoir de réaction avec une autre espèce présente dans le prélèvement et non testée en culture. De même, une réponse négative ne doit pas être obtenue sur un mutant ou une souche d'origine géographique lointaine de celle testée en culture et qui peut s'avérer

génétiqnement différente. Il est ainsi nécessaire de faire des séries d'expérimentations sur le milieu naturel pour vérifier la qualité des sondes utilisées et valider les résultats.

Une alternative ou un complément à l'utilisation des sondes est la recherche des espèces par une analyse rapide de réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Cette technique a été appliquée avec succès pour *Dinophysis* et *Alexandrium*. Elle est basée sur la reconnaissance de l'ADN ribosomique de ces dinoflagellés et permettrait la détection d'une faible quantité de cellules dans l'échantillon par amplification du signal à partir d'une amorce spécifique de l'ADN.

Ces résultats sont encourageants mais il reste encore tout un travail de recherche fondamentale à accomplir avant de pouvoir utiliser sur le terrain ces nouvelles méthodes. Cependant, les possibilités d'automatisation des comptages, la sensibilité et la fiabilité des résultats sont autant de promesses qui suscitent un intérêt grandissant et constituent un des enjeux technologiques majeurs actuels dans les programmes de surveillance des eaux côtières.

5.3.2.Reconnaissance dans les coquillages

Les méthodes utilisées et les seuils de salubrité reconnus sont ceux qui sont définis dans les listes réglementaires. Il s'agit des méthodes de détection qui sont également utilisées dans le cadre des plans de surveillance et de contrôle des coquillages denrées.

La seule exception concerne les toxines diarrhéiques et associées. Dans ce cas, le seuil de salubrité utilisé dans la surveillance des zones de production (observations sur 5 heures) et dans la surveillance de coquillages denrées (observations sur 24 heures) n'est pas identiques.

6.Les coquillages-denrées d'importation

La directive 91/492/CEE du 15 juillet 1991 précise que « *les dispositions appliquées aux importations de mollusques bivalves vivants en provenance de pays tiers doivent être au moins équivalentes à celles mises en place pour les produits communautaires* ». Le pays tiers doit notamment mentionner à la Communauté européenne la présence éventuelle de toxines dans les zones de récolte de plancton et notamment d'espèces n'existant pas dans les eaux communautaires.

Il existe une liste de pays tiers qui répondent à ces exigences. Malheureusement, la liste est courte car il existe peu de pays qui peuvent fournir les garanties suffisantes.

Les marchandises peuvent circuler librement au sein de l'Union Européenne, ce qui signifie qu'une fois qu'un produit a franchi la frontière d'un des pays membres, il peut être transporté dans tous les Etats Membres. L'union s'est donc dotée de Postes d'Inspections Frontalières (PIF). Toutes les denrées doivent passer par ces PIF (qui peuvent être situés dans des aéroports, des ports, etc.). Les denrées y subissent un contrôle documentaire et physique. Des plans de contrôle à l'importation y sont mis en place.

CONCLUSION

En conclusion, le problème des phycotoxines s'accumulant dans les coquillages est bien un problème émergent. D'une part, les zones concernées par les efflorescences d'algues toxiques ont tendance à s'étendre. D'autre part, la liste des toxines dangereuses, et des espèces de microalgues les produisant, ont tendance à s'allonger.

L'évaluation qualitative des risques que nous avons approchée a fait apparaître la réalité du risque associé à la consommation de coquillages contaminés par les phycotoxines en Europe, même si, bien sûr, les niveaux de risque sont différents selon les toxines.

Or, dans notre société, le niveau de protection du consommateur exigé est très élevé. Cela a été mis en exergue lors de la crise de la vache folle. Ainsi, le gestionnaire du risque, tant au niveau européen que national, a pris des dispositions appropriées afin de garantir un niveau élevé de protection du consommateur.

L'accent est mis sur la surveillance, étant donné qu'il est difficile de prévoir les contaminations des coquillages. L'approche adoptée pour la détection de la plupart des phycotoxines est particulièrement intéressante. Il s'agit en effet d'une approche globale basée sur l'effet biologique des toxines, et non sur la recherche des toxines en elles-mêmes. Cela permet de ne pas passer à côté de phycotoxines non ou mal connues potentiellement dangereuses.

Quoi qu'il en soit, la recherche dans le domaine des phycotoxines mérite d'être poursuivie et encouragée, et ce afin de mieux adapter les mesures de gestion du risque.

BIBLIOGRAPHIE

- Alfonso A., De La Rosa L.A., Vieytes M.R., Botana L.M. (2000). Yessotoxin : a powerful new tool for the study of signal transduction. *In: Proc. 9th Int. Conf. Harmful algal blooms*, 7-11 février, Hobart, Tasmania.
- Amzil Z. (1993). Phycotoxines des efflorescences algales, l'acide okadaïque : optimisation de la purification - nouvelle méthode de détection biologique. Thèse de doctorat de l'université de Nantes, école doctorale chimie-biologie.
- Amzil Z., Vernoux J.P., Pottier I. (2001a). Les principales classes de phycotoxines. *In: Toxines d'algues dans l'alimentation*. Frémy J.P., Lassus P. *et al.* Ifremer, 159-188.
- Amzil Z., Fresnel J., Le Gal D., Billard C. (2001b). Domoic acid accumulation in French shellfish in relation to toxic species of *Pseudonitzschia multiseries* and *P. Pseudodelicatissima*. *Toxicon*, **37**, 1711-1719.
- Anraku M., 1984. Shellfish poisoning in Japanese waters. *In: Toxic red tides and shellfish toxicity in southeast Asia*. White A.W., Anraku M. et Hooi K.K. (eds). Proceeding of a consultative meeting held in Singapore, 11-14 September, 105-109.
- Barbier M., Amzil Z., Mondeguer F., Bhaud Y., Soyer-Gobillard M.O., Lassus P. (1999). Okadaic acid and PP2A cellular immunolocalization in *Prorocentrum lima* (Dinophyceae). *Phycologia*, **38**(1), 41-46
- Bates S.S. (1989). Pennate diatom *Nitzschia pungens* as the primary source of domoic acid, a toxin in shellfish from eastern Prince Edward Island, Canada. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **46**, 1203-1215.
- Bates S.S., Garrison D.L., Horner R.A. (1998). Blooms dynamics and physiology of domoic-acid-producing *Pseudo-nitzschia* species. *In: Physiological ecology of harmful algal blooms*. Anderson D.M., Cembella A.D., Hallegraeff G.M. (eds). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 267-292.
- Balech E. (1995). The genus *Alexandrium* Halim (Dinoflagellata). Sherkin Island Marine Station, Sherkin Island, Co. Cork, Ireland, 151p.
- Benoit E., Dubois J.M. (1990). Modèles moléculaires d'interactions entre la tétrodoxine et le canal sodium. *Rev.Sci. Tech. Défense*, **9**, 125-134.
- Berven G., Saetre F., Harlvorsen K., Selgen P.O. (2001). Effects of the diarrhetic shellfish toxin, okadaic acid, on cytoskeletal elements, viability and functionary of rat liver and intestinal cells. *Toxicon*, **39**, 349-362.
- Billard C., Fresnel J., Chrétiennot-Dinet M.J. (2001). Les espèces productrices de phycotoxines marines et leur détection. *In: Toxines d'algues dans l'alimentation*. Frémy J.P., Lassus P. *et al.* Ifremer, 129-156.
- Bolch C.J.S., Negri A.P., Hallegraeff G.M. (1999). *Gymnodinium microreticulatum* sp. nov. (Dinophysaceae): a naked, microreticulate cystproducing dinoflagellate, distinct from *Gymnodinium catenatum* and *Gymnodinium nolleri*. *Phycologia*, 9-74.

- Bialojan C. et Takai A. (1988). Inhibitory effect of a marine sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. *Specificity and kinetics. J. Biochem.*, **256**(1), 283-290.
- Cembella A.D. (1998). Ecophysiology and metabolism of paralytic shellfish toxins in marine microalgae. *In: NATO ASI Ser. G.*, **41**, 381-403.
- Cembella A.D., Lewis N.I. Quilliam M.A. (2000). The marine dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophysaceae) as the causative organism of spirolide shellfish toxins. *Phycologia*, **39**, 67-74.
- Ciminiello P, Fattorusso E., Fiorino M., Montresor M. (2000). Saxitoxin and neosaxitoxin as toxic principles of *Alexandrium andersonii* (Dinophysaceae) from the Gulf of Naples, Italy. *Toxicon*, **38**, 1871-1877.
- Codex Alimentarius (1999). Principes et directives régissant la conduite de l'évaluation des risques microbiologiques.
- Cohen P., Holmes C.F.B., Tsukitani Y. (1990). Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation. *Trends Biochem. Sci.*, **15**, 98-102.
- Colman J.R., Twiner M.J., Hess P., McMahon T., Satake M, Yasumoto T, Doucette G.J., Ramsdell J.S. (2005). Teratogenic effects of azaspiracid-1 identified by microinjection of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) embryos. *Toxicon*, 1-10.
- Davidovich N.A., Bates S.S. (1998). Sexual reproduction in the pennate diatoms *Pseudonitschia multiseriata* and *P. Pseudodelicatissima* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.*, **34**, 126-137.
- Draisci R., Lucentini L., Giannetti L., Boria P., Poletti R. (1996). First report of Pectenotoxin-2 (PTX2) in algae (*Dinophysis fortii*) related to seafood poisoning in Europe. *Toxicon*, **34**(8), 923-935.
- Draisci R., Ferretti E., Palleschi L., Marchiafava C., Poletti R., Milandri A., Ceredi A., Pompei M. (1999). High levels of yessotoxin in mussels and presence of phycotoxin and homoyessotoxin in dinoflagellates of the Adriatic Sea. *Toxicon*, **37**, 1187-1193.
- Dragacci S., Belin C. (2001). La réglementation et la surveillance. *In: Toxines d'algues dans l'alimentation*. Frémy J.P., Lassus P. *et al.* Ifremer, 527-544.
- Dufour B. (2006). Maître de conférence à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort.. Communication personnelle.
- Eaglesham G.K, Brett S.J., Davis B.C., Holling N. (2000). Detection of pectenotoxin 2 and pectenotoxin 2 seco acids in phytoplankton and shellfish from the Ballina region of New South Wales, Australia. 10th Int., IUPAC Symp. Mycotoxins and Phycotoxins, Sao Paulo, Brazil, May 21-25.
- Elbrächter M., Medlin L., Lange M., Donner G., Schweikert M. (2000). On identification and classification of *Prorocentrum*-species (Prorocentrales, Dinophysaceae) with special emphasis on toxic species. *Proc. 9th Int. Conf. Harmful algal blooms*, February 7-11, Hobart, Tasmania, abstract book, 15.
- Érard -Le Denn E. (1999). Phytoplankton toxique et sédiments. *In : Dragages et environnement marin. Etat des connaissances*. Alzieu C. (coord.), Ed. Ifremer, 48-56.

- Fensome R.A., Taylor F.J.R., Norris G., Sarjeant W.A.S., Wharton D.J., Williams G.L. (1993). A classification of living and fossil dinoflagellates. *Micropaleontol. Spec. Publ.* 7, Sheridan Press, Hanover, Pennsylvania, 351p.
- Fujiki H., Suganuma M. (1993). Tumor promotion by inhibitors of protein phosphatases 1 and 2A: the okadaic class of compounds. *Adv. Cancer Res.*, **61**, 143-194.
- Frémy J.M., Amzil Z., Puech L. (2001). Techniques d'analyse basées sur la structure moléculaire. *In: Toxines d'algues dans l'alimentation*. Frémy J.P., Lassus P. *et al.* Ifremer, 483-523.
- Gohda E., Nagao T., Yamamoto I. (2000). Simulation of hepatocyte growth factor production in human fibroblasts by the protein phosphatase inhibitor okadaic acid. *Biochem. Pharmacol.*, **60**(10), 1531-1537.
- Guy G.R., Cao X., Chua S.P., Tan Y.H. (1992). Okadaic acid mimics multiple changes in early protein phosphorylation and gene expression induced by tumor necrosis factor or interleukin-1. *J. Biol. Chem.*, **267**(3), 1846-1852.
- Grzebyk D., Séchet V. (2001). Toxicogénèse et physiologie cellulaire. *In: Toxines d'algues dans l'alimentation*. Frémy J.P., Lassus P. *et al.* Ifremer, 191-228.
- Grzebyk D., Sako Y., Berland B. (1998). Phylogenetic analysis of nine species of *Prorocentrum* (Dinophyceae) inferred from 18S ribosomal DNA sequences, morphological comparisons, and description of *Prorocentrum panamensis* sp. Nov. *J. Phycol.*, **34**, 1055-1068.
- Hallegraeff G.M. (1993). A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia*, **32**, 79-99.
- Hallegraeff G.M., Lucas I.A.N. (1988). The marine dinoflagellate genus *Dinophysis* (Dinophysaceae): photosynthetic, neritic and non-photosynthetic, oceanic species. *Phycologia*, **27**, 25-42.
- Halstead B.W. (1965). Poisonous and venomous marine animals of the world. United States Government, Printing Office, Washington, DC, **1**, 184-189.
- Hampson D.R., Huang X.P., Wells J.W., Walter J.A., Wright J.L.C. (1992). Interaction of domoic acid and several derivatives with kainic acid and AMPA binding sites in rat brain. *Eur. J. Pharmacol.*, **218**, 1-8.
- Hasle G.R., Syvertsen E.E. (1996). Marine diatoms. *In: Identifying Marine Diatoms and dinoflagellates*. Thomas C.R. (ed.). Academic Press, San Diego, 5-385.
- Hong-Nong Chou, Chung-Kuang Lu, (2000). Spiro-prorocentrimine, a novel macrocyclic lactone from benthic *Prorocentrum* sp. *Proc. 9th Int. Conf. Harmful algal blooms*, February 7-11, Hobart, Tasmania, abstract book, 25.
- Hori M., Matsuura Y., Yoshimoto R., Ozaki H., Yasumoto T., Karaki H. (1999). Actin depolymerizing action by marine toxin, pectenotoxin-2. *Nippon Yakurigaku Zasshi*, **114**, 225-229.
- Hu T., Curtis J.M., Walter J.A., McLachlan J.L., Wright J.L.C. (1995). Two new water-soluble DSP toxin derivatives from the Dinoflagellate *Prorocentrum maculosum*: possible storage and excretion products. *Tetrahedron Lett.*, **36**(51), 9273-9276.

Hu T., Curtis J.M., Walter J.A., Wright J.L.C. (1996). Characterization of biologically inactive spirolides E and F: identification of the spirolides pharmacophore. *Tetrahedron Lett.*, **37**(43), 7671-7674.

Huang J.M., Wu C.H., Baden D.G. (1984). Depolarizing action of a red-tide dinoflagellate brevetoxin on axonal membranes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **229**, 615-621.

Ito E., Terao K. (1994). Injury and recovery process of intestine caused by okadaic acid and related compounds. *Nat. Toxins*, **2**, 371-377.

Ito E., Satake M., Ofuji K., Kurita N., Mc Mahon T., James K., Yasumoto T. (2000). Multiple organ damage caused by a new toxin azaspiracid, isolated from mussels produced in Ireland. *Toxicon*, **38**(7), 917-930.

James K.J., Furey A., satake M., Yasumoto T. (2000). Aaspiracid poisoning (AZP): a new shellfish toxic syndrome in Europe. *Proc. 9th Int. Conf. Harmful algal blooms*, February 7-11, Hobart, Tasmania, abstract book, 102.

Kat M. (1979). The occurrence of *Prorocentrum* species and coincidental gastrointestinal illness of mussel consumers. In: *Toxic dinoflagellates blooms*. Taylor D.L. et Seliger H.H. (eds). Elsevier, Amsterdam, 215-220.

Kim D., Su J., Cotman C.W. (1999). Sequence of neurogeneration and accumulation of phosphorylated tau in cultured neurons after okadaic acid treatment. *Brain Res.*, **839**(2), 253-262.

Krys S., Frémy J.M. (2002). Phycotoxines et produits de la mer : risques sanitaires associés et mesures de prévention. *Revue française des Laboratoires*, **348**, 29-38.

Krys S., Marcaillou-Le Baut C., Fessard V., Vernoux J.P. (2001). Les méthodes analytiques basées sur le mode d'action. In: *Toxines d'algues dans l'alimentation*. Frémy J.P., Lassus P. et al. Ifremer, 449-480.

Lagos N., Onodera H., Zagatto P.A., Andrinolo D., Azevedo S.M., Oshima Y., 1999. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the fresh water cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brasil. *Toxicon*, **37**, 1359-1373.

Lange S., Anderson G.L., Jennische E., Lönnroth I., Li X.P., Edebo L. (1990). Okadaic acid produces drastic histopatologic changes of the rat intestinal mucosa and with concomittant hypersecretion. In: *Toxin marine phytoplankton*. Granéli E., Sundström B., Edler L., Anderson D.M. (eds).Elsevier, New-York, 356-361.

La Vieille S., Krys S., Aubert P., Belin C. (2004). Prévention des intoxications par les phycotoxines marines en 2004. In : *Bulletin Epidémiologique*, **13**, 3-5.

Lawrence J.F., Ménard C., Charbonneau C.F., Hall S. (2001). A study of ten toxins associated with paralytic shellfish poison using pre-chromatographic oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection. *J. AOAC Int*, **74**(2), 404-409.

Lee J.S., Igarashi T., Fraga S, Dahl E., Hovgaard P., Yasumoto T. (1989). Determination of diarrhoeic shellfish toxins in various dinoflagellate species. *J. Appl. Phycol.*, **1**, 147-152.

- Lerga A., Richard C., Delgado M.D., Canelles M., Frade P., Cuadrado M.A., Leon J. (1999). Apoptosis and mitotic effects of the protein phosphatases inhibitor okadaic acid in K562 leukemia cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **260**, 256-264.
- Lewis R.J., Molgo J., Adams D.J. (2000). Ciguatera toxins: pharmacology of toxins involved in ciguatera and related fish poisonings. In: *Seafood toxicity*. Botana L. (ed.). Marcel Dekker, New York, Chapter 20, 419-447.
- Li H., Zhao L.L., Funder J.W., Liu J.P. (1997). Protein phosphatase 2A inhibits nuclear telomerase activity in human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.*, **272**(27), 16729-16732.
- Lin Y., Risk M., Ray S.M., Van Engen D., Clardy J., Golik J., James J.C., Nakanishi K. (1981). Isolation and structure of brevetoxin B from the "red tide" dinoflagellate *Ptychodiscus brevis* (*Gymnodinium breve*). *J. Amer. Chem. Soc.*, **103**, 6773-6775.
- Litaker R.W., Tester P.A., Levy M.G., Noga E.J. (1999). The phylogenetic relationship of *Pfiesteria piscida*, *Cryptoperidiniopsis sp.*, *Amyloodinium ocellatum* and a *Pfiesteria*-like dinoflagellate to other dinoflagellates and apicomplexans. *J. Phycol.*, **35**, 1379-1389.
- Mac Farren E.F., Tanabe H., Silva F.J., Wilson W.B., Campbell J.E., Lewis K.H. (1965). The occurrence of ciguatera-like poison in oysters, clams and *Gonyaulax breve* cultures. *Toxicon*, **3**, 111-123.
- Mackenzie L., Berkett N. (1997). Cell morphology and PSP-toxin profiles of *Alexandrium minutum* in the Malborough Sounds, New Zealand. *N.Z. J. Mar. Freshw. Res.*, **31**, 403-409.
- Maranda L., Anderson D.M., Shimizu Y. (1985). Comparison of toxicity between populations of *Gonyaulax tamarensis* of eastern North American waters. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, **21**, 401-410.
- Maranda L., Chan C., Martin C. (1999). *Prorocentrum lima* (Dinophyceae) in waters of the great South Channel near Georges Bank. *J. Phycol.*, **35**, 1158-1161.
- Marcaillou-Le Baut C., Krysz S., Bourdeau P. (2001). Syndromes observés et données épidémiologiques. In: *Toxines d'algues dans l'alimentation*. Frémy J.P., Lassus P. et al. Ifremer, 371-399.
- Matsunaga K., Nakatani K., Murakami M., Yamagushi K., Ohizumi Y. (1999). Powerful activation of skeletal muscle actomyosin ATPase by goniiodomin A is highly sensitive to troponin/tropomyosin complex. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **291**, 1121-1126.
- Medlin L., Lange M., Wellbrock U., Donner G., Elbrächter M., Hummert C., Lukas B. (1998). Sequence comparisons link toxic European isolates of *Alexandrium tamarense* from the Orkney islands to the toxic North American stocks. *Eur. J. Protistol.*, **34**, 329-335.
- Mestrovic V., Pavela-Vrancic M. (2003). Inhibition of alkaline phosphatase activity by okadaic acid, a protein phosphatase inhibitor. *Biochimie*, **85**, 647-650.
- Mistry S.J., Li H.C., Atweh G.F. (1998). Role of protein phosphatases in the cell-cycle-regulated phosphorylation of stathmin. *Biochem. J.*, **334**, 23-29.
- Molgo J., Cmella J.X., Legrand A.M. (1990). Ciguatoxin enhances quantal transmitter release from frog motor nerve terminals. *Brit. J. Pharmacol.*, **99**, 695-700.

- Molgo J., Juzans P., Legrand A.M. (1994). Confocal laser scanning microscopy: a new tool for studying the effects of ciguatoxin (CTX-1b) and mannitol at motor nerve terminals of the neuromuscular junction *in situ*. *Mem. Queensl. Mus.*, **34**, 577-585.
- Munday R., Towers N.R., Mackenzie L., Beuzenberg V., Holland P.T., Miles C.O. (2004). Acute toxicity of gymnodimine to mice. *Toxicon*, **44**, 173-178.
- Nishio N., Sugimoto Y., Nakagawa K., Niimi S., Fujiwara Y., Bungo M., Kasahara K., Fujiki H., Saijo N. (1990). Cross-resistance to tumor promoters in human cancer cell lines resistant to adriamycin or cisplatin. *Brit. J. Cancer*, **62**, 415-419.
- 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.
- Nuydens R., De Jong M., Van Den Kieboom G., Heers C., Dispersyn G., Cornelissen F., Nuyens R., Borgers M., Geerts H. (1998). Okadaic acid-induced apoptosis in neuronal cells: evidence for an abortive mitotic attempt. *J. Neurochem.*, **70**(3), 1124-1133.
- Ofuji K., Satake M., McMahon T., Slike J., James K.J., Naoki H., Oshima Y., Yasumoto T. (1999). Two analogs of azspiracid isolated from mussels, *Mytilus edulis*, involved in human intoxication in Ireland. *Nat. Toxins*, **7**, 99-102.
- Ogino H., Kumagai M., Yasumoto T. (1997). Toxicologic evaluation of yessotoxin. *Nat. Toxins*, **5**, 255-259.
- Orellana-Cepeda E., Martínez-Romero E., Muñoz-Cabrera L., López Ramirez P., Cabrera-Mancilla E., Ramírez-Camarena C. (1998). Toxicity associated with blooms of *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* in Southwestern Mexico. In: *Proc. 8th Int. Conf. Harmful algae*, Vigo, Spain. Regura B., Blanco J., Fernández M.L. et Wyatt T. (eds). Xunta de Galicia-IOC/Unesco, p. 60.
- Osada M., Stewart J.E., (1997). Gluconic acid/gluconolactone: physiological influences on domoic acid production by bacteria associated with *Pseudo-nitzschia multiseries*. *Aquat. Microb. Ecol.*, **12**, 203-209.
- Oshima Y., Itakura H., Lee K.C., Yasimoto T., Blackburns S., Hallegraef G.M. (1993). Toxin production by the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. In: *Toxic phytoplankton blooms in the sea*. Smayda T.J. and Shimizu Y. (eds). Elsevier, New York, 907-912.
- Pan Y., Cembella A.D., Quilliam M.A. (1999). Cell cycle and toxin production in the benthic dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Mar. Biol.*, **134**, 541-549.
- Parkhill J.P., Cembella A.D. (1999). Effects of salinity, light and inorganic nitrogen on growth and toxigenicity of the marine dinoflagellate *Alexandrium tamarens* from northeastern Canada. *J. Plankton Res.*, **21**, 939-955.
- Pierce R.H. (1986). Red tide (*Ptychodiscus brevis*) toxin aerosol, a review. *Toxicon*, **24**, 955-965.
- Prakash A., Medcof J.C., Tennant A.D. (1971). Paralytic shellfish poisoning in eastern Canada. *Bull. Fisc. Res. Board Can.*, 177.
- Puiseux-Dao S., Molgo J., Benoit E., Fessard V., Puech L., Ten-Hage L. (2001). Toxicologie. In: *Toxines d'algues dans l'alimentation*. Frémy J.P., Lassus P. et al. Ifremer, 301-369.

Quilliam M.A. (1995). Analysis of diarrhetic shellfish poisoning toxins in shellfish tissue by liquid chromatography with fluorometric and mass spectrometric detection. *J. AOAC Int.*, **78**(2), 555-569.

Sarno D., Dahlmann J. (2000). Production of domoic acid in another species of *Pseudo-nitzschia*: *P. multiseriata* in the Gulf of Naples (Mediterranean Sea). *Harmful Algal News*, **21**, 5.

Sasaki K., Wright J.L.C., Yasumoto T. (1998). Identification and characterization of pectenotoxin (PTX) 4 and PTX-7 as spiroketal stereoisomers of two previously reported pectenotoxins. *J. Org. Chem.*, **63**, 2475-2480.

Satake M., Morohashi A., Murata K., Kaspar H.F., Yasumoto T. (1996). Chemical studies on the NSP toxins in the greenshell mussels from New Zealand. In: *Harmful and toxic algal blooms*. Yasumoto T., Oshima Y et Fukuyo Y. (eds). IOC/Unesco, Paris, France, 487-490.

Satake M., Mackenzie L., Yasumoto T. (1997). Identification of *Protoceratium reticulatum* as the biogenetic origin of yessotoxin. *Nat. Toxins*, **5**, 164-167.

Satake M., Ofuji K., James K., Furey A., Yasumoto T. (1998). New toxic event caused by Irish mussels. In: *Proc. 8th Int. Conf. Harmful algae*, Vigo, Spain. Reguera B., Blanco J., Fernandez M.L., Wyatt T. (eds). Xunta de Galicia-IOC/Unesco, 468-469.

Scholich C.A., Gulland F., Doucette G.J., Benson S., Busman M., Chavez F.P., Cordaro J., DeLong R., De Vogelare A., Harvey J., Haulena M., Lefebvre K., Lipscomb T., Loscutoff S., Lowenstine L.J., Martin III R., Miller P.E., McLellan W.A., Moeller P.D.R., Powell C.R., Rowles T., Silvagni P., Silver M., Sprakeer T., Trainer V., Van Dolah F.M. (2000). Mortality of sea lions along the central California coast linked to a toxic diatom bloom. *Nature*, **403**, 80-84.

Seki T., Satake M., Mackenzie L., Kaspar H.F., Yasumoto T. (1995). Gymnodimine, a new marine toxin of unprecedented structure isolated from New Zealand oysters and the dinoflagellate, *Gymnodinium spp.* *Tetrahedron Lett.*, **36**(39), 7093-7096.

Shimizu Y., Gupta S., Norte M., Hori A., Genenah A., Kobayashi M. (1985). Biosynthesis of paralytic shellfish toxins. In: *Toxic dinoflagellates*. Elsevier, Amsterdam, 271-274.

Smith J.C. (1993). Toxicity and *Pseudo-nitzschia pungens* in Prince Edward Island, 1987-1992. *Harmful Algal News*, **6**, 1-8.

Sournia A. (1995). Red tide and toxic marine phytoplankton of the world: an inquiry into biodiversity. In: *Harmful marine algal blooms*. Lassus P., Arzul G., Erard-Le Denn E., Gentien P., Marcaillou-Le Baut C. (eds). Lavoisier-Intercept Ltd, Paris, 103-112.

Sperr A.E., Doucette G.J. (1996). Variation in growth rate and ciguatera toxin production among geographically distinct isolates of *Gambierdiscus toxicus*. In: *Harmful and toxic algal blooms*. Yasumoto T., Oshima Y, Fukuyo Y. (eds.). IOC/UNESCO, Paris, France, 309-312.

Steidinger K.A. (1993). Some taxonomic and biologic aspects of toxic dinoflagellates. In: *Algal toxins in seafood and drinking water*. Falconer I.R. (ed.). Academic Press, London, 1-28.

- Steidinger K.A., Tangen K. (1996). Dinoflagellates. *In: Identifying Marine Diatoms and dinoflagellates*. Tomas C.R. (ed.). Academic Press, San Diego, 387-598.
- Suzuki T., Mitsuya T., Matsubara H., Yamasaki M. (1998). Determination of pectenotoxin-2 after solid phase extraction from seawater and from the dinoflagellate *Dinophysis fortii* by liquid chromatography with electrospray mass spectrometry and ultraviolet detection: evidence of oxidation of pectenotoxin-2 to pectenotoxin-b in scallops. *J. Chromatogr. A.*, **815**, 155-160.
- Suzuki T., Ota H., Yamasaki M. (1999). Direct evidence of transformation of dinophysistoxin-1 to 7-O-acyl-dinophysistoxin-1 (dinophysistoxin-3) in the scallop *Patinopecten yessoensis*. *Toxicon*, **37**(1), 187-198.
- Suzuki T., Mackenzie L., Stirling D., Adamson J. (2001). Pectenotoxin-2 seco acid: a toxin converted from pectenotoxin-2 by the New Zealand Greenshell mussel, *Perna canaliculus*. *Toxicon*, **39**, 507-514.
- Tachibana V., Scheuner P.J., Tsukitani Y., Kikuchi H., Vanenden D., Clardy J., Gopichand Y., Schmitz F.J. (1981). Okadaic acid, a cytotoxic polyether from two sponges of the genus *Halichondria*. *J. Amer. Chem. Soc.*, **103**, 2469-2471.
- Takemoto T., Daigo K. (1958). Constituents of *Chondria armata*. *Chem. Pharm. Bull.*, **6**, 578-580.
- Taleb H., Idrissi H., Blaghen M. (1998). Seasonality of PSP toxicity in shellfish from the Atlantic and mediterranean coasts of Morocco. *In: Proc. 8th Int. Conf. Harmful algae*, Vigo, Spain. Reguera B., Blanco J., Fernández M.L. et Wyatt T. (eds). Xunta de Galicia-IOC/Unesco, 68-69.
- Taroncher-Oldenburg G., Kulis D.M., Anderson D.M. (1997). Toxin variability during the cell cycle of the dinoflagellate *Alexandrium fundyense*. *Limnol. Oceanogr.*, **42**, 1178-1188.
- Ten-Hage L., Turquet J., Quod J.P., Couté A. (2000). An overview of the biodiversity of benthic dinoflagellates from La Réunion Island (France, South West Indian Ocean). *Proc. 9th Int. Conf. Harmful algal blooms*, February 7-11, Hobart, Tasmania, abstract book, 232.
- Tohda H., Nagao M., Sugimuta T., Oikawa A. (1993). Okadaic acid, a protein phosphatase inhibitor, induces sister-chromatid exchanges depending on the presence of bromodeoxyuridine. *Mutat. Res.*, **289**, 275-280.
- Tréguer P.Y. (1998). Les intoxications alimentaires humaines causées par les algues phytoplanctoniques toxiques. *Med. Nut.*, **4**, 145-159.
- Tsuda M., Endo T., Kobayashi J. (2000). Amphilinolide T, novel 19-membered macrolide from marine dinoflagellate *Amphidinium* sp. *J. Org. Chem.*, **65**, 1349-1352.
- Tubaro A., Sidari L., Della Loggia R., Yasumoto T. (1998). Occurrence of yessotoxin-like toxins in phytoplankton and mussels from northern Adriatic sea. *In: Proc. 8th Int. Conf. Harmful algae*, Vigo, Spain. Reguera B., Blanco J., Fernandez M.L. et Wyatt T. (eds). Xunta de Galicia-IOC/Unesco, 470-472.
- Van Egmond H.P., Aune T., Lassus P., Speijers G.J.A., Waldock M. (1993). Paralytic and diarrhoeic shellfish poisons : occurrence in Europe, toxicity, analysis and regulation. *J. Nat. Toxins*, **2**(1), 41-82.

Windust A.J., Hu T., Wright J.L.C., Quilliam M.A., McLachlan J.L. (2000). Oxidative metabolism by *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyceae) of a diol-ester of okadaic acid, the diarrhetic shellfish poisoning toxin. *J. Phycol.*, **36**, 342-350.

Wright J.L.C., Cembella A.D. (1998). Ecophysiology and Biosynthesis of polyether marine biotoxins. *NATO ASI Ser. G.*, **41**, 427-451.

Wright J.L.C., Boyd R.K., Defreitas A.S.W., Falk M., Foxall R.A., Jamieson W.D., Laycock M.V., McMulloch A.W., McInnes A.G., Odense P. *et al.* (1989). Identification of domoic acid, a neuroexcitatory amino acid, in toxic mussels from eastern Pacific East Indies. *Cari. J. Chem.*, **67**, 481-490.

Wright J.L.C., Hu T., McLachlan J.L., Needham J., Walter J.A. (1996). Biosynthesis of DTX4 : confirmation of polyketide pathway, proof of a baeyer-villiger oxidation step, and evidence for an unusual carbon deletion process. *J. Amer. Chem. Soc.*, **118**(36), 8757-8758.

Yasumoto T., Oshima Y., Yamaguchi M. (1978). Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the Tohoku. District. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **44**(11), 1249-1255.

Yasumoto T., Rai U., Bagnis R. (1984). Seafood poisonings in tropical regions. Laboratory of Food Hygiene, Faculty of Agriculture, Tohoku University, 1-74.

Yasumoto T., Murata M., Lee J.S., Torigoe K. (1989). Polyether toxins produced by dinoflagellates. In: *Mycotoxins and phycotoxins*, 88. Natori S., Hashimoto K. et Veno T. (eds). Elsevier, Amsterdam, 375-382.

Zardoya R., Costas E., Lopez-Rodas V., Garrido-Pertierra A., Bautista J.M. (1995). Revised dinoflagellate phylogeny inferred from molecular analysis of large-subunit ribosomal RNA gene sequences. *J. Mol. Evol.*, **41**, 637-645.

Sites WEB consultés

Center for Biologisk Beredskab. *Site du bioberedskab* [en-ligne], Mise à jour le 24 Juillet 2002 [<http://www.bioberedskab.dk>], (consulté le 03 Février 2006).

Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer. *Site de l'Ifremer* [en-ligne], Mise à jour le 20 Février 2006 [<http://www.ifremer.fr>], (consulté le 26 Février 2006).

Monterey bay aquarium research institute. *Site du MBARI* [en-ligne], Mise à jour le 15 Février 2006 [<http://www.mbari.org/>], (consulté le 26 Février 2006).

Ocean, Earth and Atmospheric Science. *Site du OEAS* [en-ligne], Mise à jour le 05 Juillet 2005 [<http://www.odu.edu>], (consulté le 15 janvier 2006).

Smithsonian National Museum of Natural History. *Site du NMNH* [en-ligne], Mise à jour le 05 Décembre 2005 [<http://www.odu.edu>], (consulté le 17 janvier 2006).

The Nippon Fondation Library. *Site de la bibliothèque de la fondation nipponne* [en-ligne], Mise à jour le 10 Janvier 2006 [<http://www.nippon.zaidan.info>], (consulté le 09 Février 2006).

Universidad Nacional Autónoma de México. *Site de l'UNAM* [en-ligne], Mise à jour le 15 Février 2006 [<http://www.biblioweb.dgsca.unam.mx>], (consulté le 18 Février 2006).

University of Liverpool. *Site de l'Université de Liverpool* [en-ligne], Mise à jour le 31 Janvier 2006 [<http://www.liv.ac.uk>], (consulté le 18 Février 2006).

ANNEXE :

CLASSIFICATION DES DIFFÉRENTES ESPÈCES DE PLANCTON
PRODUCTRICES DE PHYCOTOXINES

Rapport-gratuit.com 
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

