

anses

agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail



Connaître, évaluer, protéger

Risques liés aux pinnatoxines dans les coquillages

Avis de l'Anses
Rapport d'expertise collective

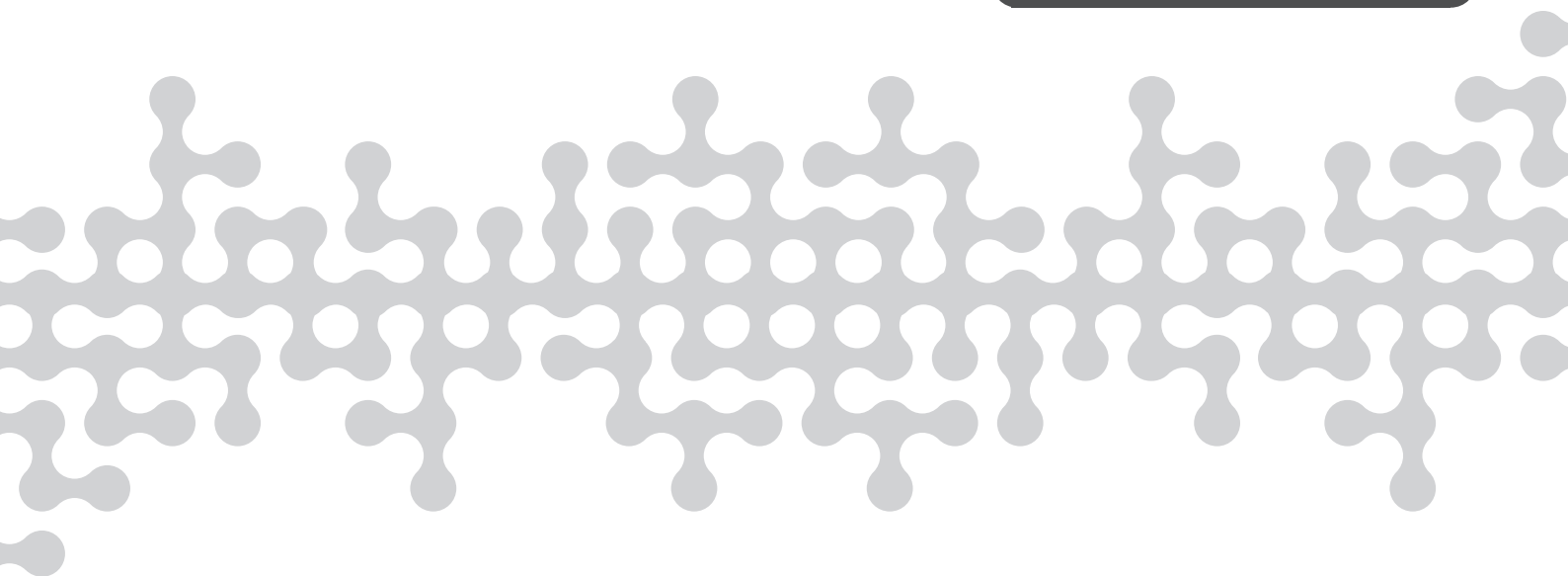
Mars 2019 - Édition scientifique



Risques liés aux pinnatoxines dans les coquillages

Avis de l'Anses
Rapport d'expertise collective

Mars 2019 - Édition scientifique



Le directeur général

Maisons-Alfort, le 12 mars 2019

AVIS **de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation,** **de l'environnement et du travail**

relatif à l'évaluation des risques sanitaires liés aux pinnatoxines **dans les coquillages**

L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.

L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.

Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part à l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.

Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L.1313-1 du code de la santé publique).

Ses avis sont publiés sur son site internet.

L'Anses a été saisie le 11 janvier 2016 par la Direction générale de l'alimentation (DGAL) et la Direction générale de la santé (DGS) pour la réalisation de l'expertise suivante : Demande d'avis relatif à la toxicité aiguë et chronique des pinnatoxines.

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Dans un rapport de 2012, l'Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer (Ifremer) mettait en évidence la présence de pinnatoxines (PnTX), produites par le dinoflagellé *Vulcanodinium rugosum*, dans des moules de l'étang d'Ingril (Hérault). Les concentrations variaient fortement selon les années (2010, 2011 et 2012), avec un maximum de 1244 µg de PnTX G par kg de coquillages en poids frais en 2010 (rapport Ifremer, septembre 2012, Pinnatoxines en lien avec l'espèce *Vulcanodinium rugosum*). En juillet 2015, une concentration de 1143 µg de PnTX G par kg de coquillages a été rapportée par l'Ifremer.

La présence de ces toxines pourrait expliquer des cas de discordance entre les résultats obtenus par le bioessai sur souris et ceux obtenus par analyse chimique (LC-MS/MS) observés dans les moules de l'étang d'Ingril dans le cadre du dispositif de vigilance pour les biotoxines marines lipophiles dans les coquillages, piloté par la DGAL.

Par ailleurs, des travaux de l'Université de Trieste, menés en collaboration avec le CNRS (Gif-sur-Yvette) et l'Anses (Fougères) ont établi une dose létale à 50% (DL₅₀) d'environ 200 µg/kg pc chez la souris par gavage (rapport Anses-Université de Trieste-CNRS 2014).

Dans ce contexte, l'Anses a été saisie le 11 janvier 2016 par la DGAL et la DGS afin de répondre aux questions suivantes :

1) Existe-t-il des données toxicologiques pour les pinnatoxines et notamment, pour les effets aigus, une DL₅₀ reconnue ? Existe-t-il des données pour le risque chronique sous la forme d'une valeur toxicologique de référence (VTR) ?

2) Compte tenu de ces données toxicologiques, et au vu du contexte, existe-t-il une préoccupation de santé publique aux niveaux de contamination identifiés par l'Ifremer dans certaines zones de production conchylicole françaises ?

3) Quelles modalités de suivi des pinnatoxines dans le milieu marin pourraient être recommandées, en vue d'une prise en compte de ces toxines dans le dispositif de vigilance pour les biotoxines marines lipophiles dans les coquillages, piloté par la DGAL ?

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

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

L'expertise relève du domaine de compétences du Comité d'experts spécialisé « Evaluation des risques physico-chimiques dans les aliments » (CES ERCA). L'Anses a confié l'instruction de cette saisine au groupe de travail « Pinnatoxines », constitué par décision du 14 novembre 2017 suite à un appel à candidatures.

Les travaux d'expertise du groupe de travail « Pinnatoxines » ont été soumis régulièrement au CES ERCA (tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques) lors des réunions plénières du 15 mars, 18 octobre, 14 décembre 2018, et du 25 janvier 2019. Le rapport produit par le groupe de travail tient compte des observations et éléments complémentaires transmis par les membres du CES et les relecteurs. Les travaux d'expertise ont été adoptés par le CES ERCA le 25 janvier 2019 par l'ensemble des experts présents à l'exception d'un expert, qui s'est abstenu¹.

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise.

Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet de l'Anses (www.anses.fr).

En raison de la propriété d'un brevet portant sur la détection des pinnatoxines, M. Jordi Molgó n'a pas été retenu pour être membre du groupe de travail. Compte tenu de ses compétences spécifiques, il a été nommé rapporteur pour contribuer aux travaux relatifs à l'identification et à la caractérisation des dangers. Il n'a pas participé aux échanges ni à l'établissement des conclusions portant sur la surveillance des pinnatoxines et autres toxines apparentées.

Mme Valérie Fessard (Anses, laboratoire de Fougères), membre du groupe de travail « Pinnatoxines », n'a pas été impliquée dans l'étude *in vivo* décrite dans le rapport Anses-Université de Trieste-CNRS 2014.

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU GT « PINNATOXINES » ET DU CES ERCA

Le comité d'experts spécialisé « Evaluation des risques physico-chimiques dans les aliments » (CES ERCA) a adopté le rapport d'expertise collective réalisé par le groupe de travail « Pinnatoxines » dont une synthèse est présentée ci-après.

3.1. Identification des dangers

3.1.1. Caractérisation chimique des toxines produites par *Vulcanodinium rugosum*

Dans le cadre de cette expertise, l'identification des dangers prend en compte les toxines produites par le dinoflagellé *V. rugosum*.

¹ Considérant que son agenda personnel ne lui a pas permis d'assister à plusieurs réunions du CES ERCA au cours desquelles ce dossier a été présenté et débattu, considérant également que la seule lecture des documents communiqués aux membres du CES ne constitue pas, selon cet expert, un socle suffisant pour former un jugement pleinement motivé sur ce dossier, l'expert a jugé opportun de s'abstenir.

Les pinnatoxines (PnTX) appartiennent au groupe des imines cycliques et macrocycliques qui, à ce jour, comprend 40 molécules, sans prendre en compte les esters acylés, produits du métabolisme des coquillages. Ce groupe inclut différentes familles selon leurs caractéristiques structurales : les prorocontrolides, la spiro-prorocentrimine, les gymnodimines (GYM), les spiroolides (SPX), les pinnatoxines (PnTX) et les ptériatoxines (PtTX), ainsi que la portimine.

Les PnTX sont solubles dans les solvants comme l'acétone, l'isopropanol, ou le méthanol (Zendong *et al.* 2014). Ce sont des composés amphotères, c'est-à-dire à la fois acides et basiques, donc ionisés, ce qui explique également leur caractère hydrosoluble relatif. Elles présentent aussi des propriétés lipophiles, d'où leur détection lors du bioessai sur souris pour la recherche de toxines lipophiles.

Une fois absorbées par les mollusques, certaines toxines marines peuvent subir des réactions métaboliques entraînant une modification de leur structure chimique notamment sous la forme de dérivés acylés. Par analogie aux dinophysistoxines 3 (DTX3), le GT suppose qu'une hydrolyse alcaline de leur liaison ester permet de libérer le composé parent. Les PtTX sont très probablement des métabolites de certaines PnTX. Les métabolites auraient une toxicité qui peut varier par rapport à leur précurseur.

S'appuyant sur les coquillages consommés et sur les toxines produites par *Vulcanodinium rugosum*, le GT « Pinnatoxines » a retenu les PnTX, les PtTX et la portimine comme dangers à prendre en compte dans le cadre de cette expertise.

3.1.2. Méthodes analytiques

Parmi les différentes méthodes mises en œuvre pour l'analyse des toxines produites par *V. rugosum*, la plupart concerne les PnTX. Il s'agit majoritairement de méthodes physico-chimiques par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). Des méthodes biologiques (bioessais sur souris) ou biochimiques (tests fonctionnels) permettent également l'analyse de ces toxines.

Aucune méthode n'a encore fait l'objet d'une validation inter-laboratoires, ni d'une normalisation. De plus, la faible disponibilité d'étalons de ces toxines (substances de référence) limite et complique leur détection et leur quantification. En effet à ce jour, seules les PnTX A et G sont commercialisées comme solution d'étalonnage et la PnTX G est la seule certifiée (CRM-PnTX G). Le tableau 1 présente les différentes méthodes d'analyse mises en œuvre pour la détection des toxines produites par *V. rugosum* en indiquant leurs performances et avantages/inconvénients.

Tableau 1 : Tableau de synthèse des méthodes d'analyse pour la détection des toxines de *V. rugosum*

Type de méthode	Sensibilité et rendement d'extraction	Avantages	Inconvénients
Méthodes chimiques : LC-MS/MS et LC-HRMS	Limite de détection : 0,09 à 0,5 µg/kg de chair de coquillages Limite de quantification : 0,9 à 3 µg/kg de chair de coquillages Rendement d'extraction (PnTX G) : moules : 78% à 94% huîtres : 67%	- Spécificité élevée de la séparation chromatographique des toxines et la détection par spectrométrie de masse - Très bonne sensibilité	- Coût de l'équipement et personnel qualifié - Absence de validation inter-laboratoires pour les PnTX - Faible disponibilité des standards (seules les PnTX A et G sont commercialisées comme solution d'étalonnage) - La spécificité en spectrométrie de masse peut être un point critique pour certaines toxines : une confusion est possible entre la PnTX G et le spiroolide B ou le 13-desméthyle spiroolide D dans certaines conditions (co-élution de ces toxines et absence de transition ou de méthodes de confirmation)

Type de méthode	Sensibilité et rendement d'extraction	Avantages	Inconvénients
Méthode biologique : Bioessai sur souris	Limite de détection : 13 à 40 µg/kg de chair de coquillages	- Mesure de la toxicité globale basée sur la réponse biologique de l'animal - Facile à mettre en œuvre - Faible coût de l'équipement	- Méthode qualitative - Manque de spécificité, cette méthode ne permet pas d'identifier les PnTX - Raisons éthiques (règle des 3R) - Absence de validation inter-laboratoires pour les PnTX
Méthode biochimique : test de liaison aux récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine (RnACh)	Limite de quantification : 2,2 à 7,2 µg/kg de chair de coquillages Rendement d'extraction (PnTX A) coquillages : 82%	- Facile à mettre en œuvre - Faible coût de l'équipement - Méthode rapide	- Absence de validation inter-laboratoires pour les PnTX - Manque de spécificité, cette méthode ne permet pas d'obtenir d'informations sur les analogues de PnTX présents, elle ne permet pas non plus de distinguer les PnTX des autres composés qui agissent aussi sur les RnACh.

3.2. *Vulcanodinium rugosum*

Vulcanodinium rugosum est le dinoflagellé producteur de PnTX identifié par l'Ifremer en 2009, à partir d'échantillons d'eau d'Ingril. Il s'agit d'une nouvelle espèce appartenant à un nouveau genre (Nézan et Chomérat, 2011).

L'origine de l'identification de ce dinoflagellé en France repose sur une situation atypique survenue en 2006, dans le cadre de la surveillance officielle des zones de production des coquillages (http://envlit.ifremer.fr/infos/rephy_info_toxines). Le bioessai sur souris pour la recherche de toxines lipophiles avait révélé des effets neurotoxiques, après l'injection d'extraits de moules de l'étang d'Ingril (mer Méditerranée, à l'est de l'étang de Thau, Hérault). Ce fait est inhabituel car les effets observés pour les toxines lipophiles sont diarrhéiques, pas neurotoxiques. Cette neurotoxicité n'a pas pu être expliquée par la présence de toxines réglementées (ASP², PSP³, DSP⁴) recherchées par analyse chimique. De plus, les observations des échantillons d'eau n'ont pas permis d'identifier d'espèces de micro-algues connues comme productrices de neurotoxines.

Depuis l'identification de *V. rugosum* en 2009, des concentrations élevées en PnTX sont mesurées dans les moules de la lagune d'Ingril chaque année pendant plusieurs mois. Pour autant, *V. rugosum* est rarement détecté dans les prélèvements d'eau réalisés dans le cadre de la surveillance (dans la colonne l'eau), ce qui peut s'expliquer par le caractère benthique de ce dinoflagellé. Il est important de signaler que l'étang d'Ingril est physiquement relié à l'étang de Thau (4^{ième} zone ostréicole de France) par l'intermédiaire du canal du Rhône à Sète.

Situées à l'interface entre mer et bassins versants, les lagunes côtières ont été décrites comme des réservoirs d'une biodiversité remarquable (Cognetti et Maltagliati, 2000 ; Costanza *et al.*, 1998). Ces écosystèmes jouent un rôle de filtre et de tampon en piégeant une large fraction des apports naturels ou anthropiques issus des bassins versants.

Les lagunes sont souvent présentées comme des écosystèmes fortement producteurs de phytoplancton, de 200 à 400 g de carbone par m² et par an selon Nixon (1981), et qui subissent d'importantes fluctuations environnementales. Par leur fonctionnement particulier, elles sont régulièrement confrontées à des épisodes d'efflorescences de phytoplancton pouvant inclure des espèces de dinoflagellés toxiques qui affectent les usages de ces milieux. Ce phénomène mondial impacte les côtes européennes ainsi que les espaces côtiers méditerranéens (Penna *et al.*, 2005 ; Sournia *et al.*, 1992).

² ASP : Amnesic shellfish poisoning, toxines amnésiantes, acide domoïque

³ PSP : Paralytic shellfish poisoning, toxines paralysantes de la famille de la saxitoxine.

⁴ DSP : Diarrhetic Shellfish Poison, toxines diarrhéiques de la famille de l'acide okadaïque.

- Cycle de vie de *V. rugosum*

Comme pour la quasi-totalité des espèces appartenant au groupe des dinoflagellés, *V. rugosum* est supposé avoir deux phases distinctes : une phase de multiplication végétative (reproduction asexuée) et une phase sexuée. La phase asexuée correspondrait à la phase pélagique, lorsque les cellules sont présentes dans la colonne d'eau. Le cycle comprend également une phase benthique. La phase de reproduction sexuée aboutit à la formation d'un planozygote qui donne un kyste de résistance. Les phases pélagiques et benthiques sont étroitement liées mais les facteurs environnementaux et/ou physiologiques contrôlant le passage de l'une à l'autre ne sont pas encore connus.

La formation de kystes de résistance qui peut intervenir à la fin de la reproduction sexuée est une étape importante pour la survie dans des conditions environnementales défavorables grâce au brassage chromosomique qui augmente la diversité génétique intraspécifique.

Les kystes représentent également une source de dissémination de l'espèce par transfert de sédiments ou de coquillages d'une zone à une autre (les kystes étant présents dans le tractus gastro-intestinal et dans l'eau intervalvaire) mais également par les eaux de ballast des bateaux (Garrett *et al.*, 2014). L'identification des formes de résistance et la connaissance de leurs aires de répartition sont donc importantes afin de prévenir les risques de dissémination et de contamination. De même, la détermination des facteurs clés de la croissance et de la production de toxines par *V. rugosum* est primordiale pour mieux appréhender le risque lié à cette nouvelle espèce.

- Facteurs influençant la croissance de *V. rugosum* et la production de toxines

La température est le facteur le plus important pour la croissance de *V. rugosum* (Abadie *et al.*, 2016). Les données suggèrent que *V. rugosum* est une espèce thermophile, ce qui expliquerait son développement dans la lagune d'Ingril de juin à septembre et les concentrations les plus élevées en PnTX G trouvées dans les moules pendant cette période.

Enfin, il faut noter qu'aucune autre espèce phytoplanctonique n'a été rapportée comme pouvant produire des PnTX, à la date de la littérature disponible pour le GT « Pinnatoxines » (dernière mise à jour de la recherche bibliographique : septembre 2018).

3.3. Caractérisation du danger lié aux toxines produites par *V. rugosum*

Pour la caractérisation du danger, le groupe de travail a utilisé l'ensemble des données publiées sur la toxicité *in vitro*, *ex vivo* (sur hémi-diaphragme de souris) et *in vivo*, par voie intrapéritonéale et par voie orale (gavage et nourriture).

3.3.1. Toxicité aiguë *in vivo*

- Extraits de *V. rugosum*

Des extraits de cultures de *V. rugosum*, souches isolées au niveau du port de Rangaunu (Nouvelle-Zélande), du port de Franklin (Australie) ou de l'étang d'Ingril (France), ont été testés par voie orale ou intrapéritonéale chez la souris (Rhodes *et al.*, 2010, 2011 ; Rapport Anses-Université de Trieste-CNRS, 2014). Les résultats de ces études montrent que les composés contenus dans les extraits méthanoliques de culture de *V. rugosum* présentent une toxicité aiguë chez la souris par voie orale et par voie intrapéritonéale, conduisant à leur mort par un arrêt respiratoire. Les principaux signes de toxicité précédant la mort des souris observés dans l'étude du Rapport Anses-Université de Trieste-CNRS (2014) étaient : piloérection, prostration, hypothermie, paralysie des membres inférieurs, respiration abdominale et cyanose.

Le GT « Pinnatoxines » a souligné l'intérêt limité de ce type d'études réalisées avec des extraits de *V. rugosum* (dont la composition n'est pas connue) pour caractériser le danger et qu'il est plus approprié de prendre en compte des études utilisant des toxines purifiées.

- Toxines purifiées : pinnatoxines, ptériatoxines et portimine

Les études de toxicité aiguë *in vivo* avec des toxines purifiées ont fait l'objet d'une grille de lecture et d'une évaluation de leur qualité avec l'outil ToxRTool, qui permet de les classer selon la cotation de Klimisch.

Les données sur la toxicité aiguë des PnTX purifiées sont très limitées. En effet, les études disponibles n'ont été réalisées que chez une seule espèce (la souris), un seul sexe (les femelles, considérées comme plus sensibles que les mâles) et avec très peu d'animaux testés par dose.

Par voie orale, seules 3 études sont disponibles et se sont intéressées aux PnTX E, F, G et H (Munday *et al.*, 2012 ; Rapport Anses-Université de Trieste-CNRS, 2014 ; Selwood *et al.*, 2014). Le GT n'a trouvé aucune information concernant les PtTX et la portimine par voie orale. Les études de Munday *et al.* (2012) et celle décrite dans le Rapport Anses-Université de Trieste-CNRS (2014), d'importance majeure pour la caractérisation du danger, ont été revues en détail, collectivement par le GT « Pinnatoxines ».

Par voie intrapéritonéale (i.p.), 4 études ont été publiées et ont porté sur les PnTX E, F, G, H et la portimine (Munday *et al.*, 2012 ; Selwood *et al.*, 2010, 2013, 2014). Le GT a identifié des informations complémentaires non encore publiées concernant la PnTX A (communication personnelle de J. Molgo). Concernant les PtTX, le GT n'a identifié aucune information robuste.

Malgré ce nombre limité d'études et de souris testées par dose pour chacune des PnTX, il ressort un ensemble d'informations cohérent permettant de dessiner les grandes caractéristiques de la toxicité aiguë de cette famille de toxines.

En premier lieu, la toxicité des PnTX est rapide, puisque les symptômes apparaissent quelques minutes après l'administration (qu'elle soit orale ou i.p.). Ce fait est connu, puisque les PnTX (comme les autres imines cycliques) font partie du groupe des Fast Acting Toxins (toxines à action rapide).

Le second point caractéristique est l'apparition de symptômes neurotoxiques, conduisant rapidement la souris à la mort par arrêt respiratoire (voir 3.3.4). Les signes cliniques de toxicité, quels que soient la voie d'administration et l'analogue de PnTX, comprennent une diminution de la mobilité (parfois précédée d'une première phase d'hyperactivité juste après l'administration), une paralysie des membres postérieurs et des difficultés respiratoires (Munday *et al.*, 2012), des tremblements et des sauts sont aussi rapportés (Rapport Anses-Université de Trieste-CNRS, 2014). Dans l'étude de Munday *et al.* (2012), les auteurs signalent qu'à des doses sublétales (sans préciser lesquelles), des souris ont récupéré complètement après avoir présenté des symptômes.

Les valeurs de DL₅₀ varient selon l'analogue de PnTX et la voie d'administration (tableau 2). Par voie orale, les DL₅₀ sont comprises entre 25 et 2800 µg/kg de poids corporel (pc) (respectivement pour la PnTX F et la PnTX E). Les analogues testés peuvent être classés de la manière suivante par ordre décroissant de toxicité : PnTX F > PnTX G ~ PnTX H >> PnTX E. Par voie i.p., elles sont comprises entre 13 et 115 µg/kg pc (respectivement pour la PnTX F et la PnTX A) et les analogues peuvent être classés comme suit : PnTX F > PnTX G > PnTX E > PnTX H > PnTX A.

Des valeurs de DL₉₉ pour quelques PnTX et PtTX sont rapportées dans la littérature, mais le GT a considéré que ces données étaient peu fiables, en raison du manque d'informations sur le protocole (Uemura *et al.*, 1995 ; Chou *et al.*, 1996 ; McCauley *et al.*, 1998 ; Takada *et al.*, 2001).

La portimine présente une toxicité aiguë par voie i.p. plus faible que celle des PnTX, avec une DL₅₀ estimée à 1570 µg/kg pc. Aucun effet n'a été observé à 500 et 700 µg/kg pc (Selwood *et al.*, 2013). Les auteurs indiquent que les signes de toxicité précédant la mort des souris apparaissent moins rapidement après l'administration i.p. comparativement aux PnTX (sans toutefois mentionner les signes de toxicité observés). La toxicité par administration orale n'est pas connue.

Tableau 2 : Toxicité aiguë *in vivo* chez la souris des PnTX et de la portimine

Administration orale

Toxine (pureté)	Voie d'administration et nombre de souris	DL ₅₀ (µg/kg pc)	DMT (µg/kg pc)	Références	Qualité de l'étude
PnTX E*	Gavage Nombre de souris non précisé (LD OCDE 425) Souris non à jeun	2800 IC95 : 2380-3000	600	Munday <i>et al.</i> , 2012	ToxRTool : 13 Klimisch : 2
PnTX F*	Gavage Nombre de souris non précisé (LD OCDE 425) Souris non à jeun Souris à jeun de 16h	25 IC95 : 19,1-35,1 29,9 IC95 : 25-32	9,9 Non déterminée	Munday <i>et al.</i> , 2012	ToxRTool : 13 Klimisch : 2
PnTX F*	Dans du fromage à tartiner Nombre d'animaux non précisé (LD OCDE 425) Souris non à jeun Dans du beurre de cacahuète Nombre de souris non précisé (LD OCDE 425) Souris non à jeun Dans de la nourriture pour souris. Nombre de souris non précisé (LD OCDE 425) Souris à jeun de 16h Dans du fromage à tartiner, souris à jeun de 16h Dans du beurre de cacahuète, souris à jeun de 16h	50 IC95 : 39,4-62,8 50 IC95 : 37,9-71,5 50 IC95 : 37,9-71,5 77 IC95 : non calculé 50 IC95 : 39,4-62,8	16,0 Non déterminée Non déterminée Non déterminée Non déterminée	Munday <i>et al.</i> , 2012	ToxRTool : 13 Klimisch : 2
PnTX G*	Gavage Nombre de souris non précisé (LD OCDE 425) Souris non à jeun	150 IC95 : 105-100	75	Munday <i>et al.</i> , 2012	ToxRTool : 13 Klimisch : 2
PnTX G (pureté annoncée de 100%)	Gavage Groupes de 3 à 8 souris (8 pour le groupe témoin ; 3 pour les doses 8, 20, 50, 120 µg/kg pc; 5 pour les doses 220, 300, 370, 400 µg/kg pc) Souris à jeun 3h avant administration	208 IC95 : 155-281	120	Rapport Anses-Université de Trieste-CNRS 2014	ToxRTool : 17 Klimisch : 2
PnTX G*	Dans du fromage à tartiner Nombre de souris non précisé (LD OCDE 425) Souris non à jeun	400 IC95 : 380-470	153	Munday <i>et al.</i> , 2012	ToxRTool : 13 Klimisch : 2
PnTX H*	Gavage Nombre d'animaux non précisé Jeûne non précisé	163 IC95 : 139-175		Selwood <i>et al.</i> , 2014	ToxRTool : 4 Car peu de détails dans l'article, mais cette équipe a déjà décrit le protocole pour d'autres PnTX

*pureté vérifié par RMN selon les auteurs mais pourcentage non mentionné dans la publication.

IC95 : intervalle de confiance à 95%.

DMT (Dose Maximale Tolérée) : dose à laquelle aucune mortalité n'est observée, ni signe clinique.

Administration par voie intrapéritonéale (i.p.)

Toxine (pureté)	Voie d'administration et nombre de souris	DL ₅₀ (µg/kg pc)	DMT (µg/kg pc)	Références	Qualité de l'étude
PnTX A de synthèse (> 97% de pureté)	i.p n=18 souris, 9 doses testées (1 à 3 souris/dose) souris non à jeun	114,8		J. Molgó (communication personnelle)	ToxRTool : 16
PnTX E*	i.p Nombre d'animaux non précisé (LD OCDE 425)	57 (non à jeun) IC95 : 39,7-75,3 48 (à jeun de 16h) IC95 : 33,5-63,5	22 Non déterminée	Munday <i>et al.</i> , 2012	ToxRTool : 13
	i.p (LD OCDE 425) n=2 à 36 µg/kg, n=3 à 45 µg/kg, n=1 à 54 µg/kg, n=1 à 60 µg/kg.	45 (non à jeun) IC95 : 32-58		Selwood <i>et al.</i> , 2010	ToxRTool : 15
PnTX F*	i.p Nombre d'animaux non précisé (LD OCDE 425)	12,7 (non à jeun) IC95 : 9,5-14,6 14,9 (à jeun de 16h) IC95 : 12,6-15,8	3,2 Non déterminée	Munday <i>et al.</i> , 2012	ToxRTool : 13
	i.p (LD OCDE 425) n=1 à 10,1 µg/kg, n=1 à 12,7 µg/kg, n=3 à 16 µg/kg, n=2 à 20,1 µg/kg.	16 (non à jeun) IC95 : 12-23		Selwood <i>et al.</i> , 2010	ToxRTool : 15
PnTX G*	i.p Nombre d'animaux non précisé (LD OCDE 425)	48 (non à jeun) IC95 : 36,3-68,1 42,7 (à jeun de 16h) IC95 : 40-50	18,8 Non déterminée	Munday <i>et al.</i> , 2012	ToxRTool : 13
PnTX G*	i.p (LD OCDE 425) n=2 à 40 µg/kg, n=3 à 50 µg/kg, n=1 à 60 µg/kg.	50 (non à jeun) IC95 : 35-66		Selwood <i>et al.</i> , 2010	ToxRTool : 15
PnTX G de synthèse (pureté > 97%)	i.p. Nombre d'animaux non précisé	65,8		J. Molgó (communication personnelle)	ToxRTool : 16
PnTX H*	i.p. Nombre d'animaux non précisé Jeûne non précisé	67 IC95 : 63-79		Selwood <i>et al.</i> , 2014	ToxRTool : 4 Car peu de détails dans l'article, mais cette équipe a déjà décrit le protocole pour d'autres PnTX
Portimine*	i.p. Nombre d'animaux non précisé Jeûne non précisé	1570 IC95 : 1269–3080	Aucun effet à 500 et 700	Selwood <i>et al.</i> , 2013	ToxRTool : 4 Car peu de détails dans l'article, mais cette équipe a déjà décrit le protocole pour d'autres PnTX

*pureté vérifié par RMN selon les auteurs mais pourcentage non mentionné dans la publication.

IC95 : intervalle de confiance à 95%.

DMT (Dose Maximale Tolérée) : dose à laquelle aucune mortalité n'est observée, ni signe clinique.

Comme mentionné précédemment, le mode d'action *in vivo* des PnTX est rapide, la mort des souris survenant en quelques minutes (moins de 30 minutes) après administration, qu'elle soit par voie i.p. ou orale. Les symptômes observés sont de type neurotoxiques (paralysie, détresse respiratoire). Le GT souligne que la PnTX F semble être l'analogue présentant la toxicité la plus élevée.

3.3.2. Toxicité aiguë *ex vivo* et *in vitro*

Des études portant sur la toxicité *ex vivo* (hémi-diaphragme de souris) et *in vitro* ont également été revues par le GT « Pinnatoxines » et sont décrites dans le rapport d'expertise.

3.3.3. Toxicités subchronique et chronique

Aucune étude sur la toxicité par administration répétée n'a été identifiée dans la littérature.

3.3.4. Mode d'action et cible cellulaire

- Acétylcholine et réseaux cholinergiques

L'acétylcholine (ACh) est le principal neurotransmetteur du système nerveux périphérique des vertébrés, cette molécule est également présente dans le système nerveux central.

En périphérie, les réseaux cholinergiques concernent principalement :

- i. le système nerveux végétatif (dit autonome), c'est-à-dire la transmission ganglionnaire des voies sympathiques et parasympathiques ;
- ii. le système musculaire (les muscles squelettiques) ;
- iii. la glande médullo-surrénale dont les synapses cholinergiques contrôlent la sécrétion de catécholamines.

Au niveau du système nerveux central, l'ACh exerce une fonction de neurotransmetteur excitateur via les récepteurs nicotiniques (RnACh), et inhibiteur via les récepteurs cholinergiques muscariniques (RmACh). Les réseaux cholinergiques centraux sont nombreux et diffus, se projetant dans différentes régions du cerveau, comme l'hippocampe, le cortex cérébral, l'amygdale. Ils concernent notamment les fonctions cognitives (mémoire et apprentissage), le système limbique (émotions, humeur, comportement) et le contrôle de la motricité.

- Cibles physiologiques et moléculaires des PnTX

Les données de la littérature suggèrent que les PnTX partagent un mode d'action commun et il semble peu probable que certaines d'entre elles puissent exercer des effets sur une cible moléculaire ou physiologique qui serait différente de celle des autres (Araoz *et al.*, 2011). La caractérisation du mode d'action des PnTX a révélé de manière non ambiguë qu'elles ciblent les RnACh du muscle squelettique en provoquant un blocage concentration-dépendant de la contraction musculaire provoquée par la stimulation nerveuse. Les PnTX E, F et G bloquent la contraction musculaire induite par stimulation nerveuse, sans pour autant modifier la contraction musculaire provoquée par stimulation directe des muscles isolés de rongeur adulte (Hellyer *et al.*, 2013). Cette paralysie musculaire est due à l'effet antagoniste des PnTX sur les RnACh.

3.3.5. Elaboration de la valeur sanitaire

Le GT a suivi la méthodologie présentée dans le guide d'élaboration des VTR de l'Anses (2017a).

- Choix de l'étude clé

Le GT a identifié 2 études de toxicité aiguë par voie orale réalisées chez la souris avec de la PnTX G purifiée (Munday *et al.*, 2012 ; Rapport Anses-Université de Trieste-CNRS, 2014).

Le GT a retenu comme étude clé celle réalisée par le Département des Sciences du vivant de l'Université de Trieste dans le cadre d'un financement par la DGAL et la DGS (Rapport Anses-

Université de Trieste-CNRS, 2014), qui a obtenu un score de 17 sur 21 selon l'outil ToxRTool, correspondant à une cotation 2 selon Klimisch (valide avec restrictions).

Dans cette étude, des groupes de 3 à 5 souris femelles SD-1 âgées de 4 semaines ont reçu par gavage une administration unique de PnTX G purifiée à la dose de 8, 20, 50, 120, 220, 300, 370 ou 450 µg/kg pc. Un groupe témoin était constitué de 8 souris. Les souris ont été mises à jeun 3h avant le gavage, la nourriture a été redonnée 2h après l'administration *ad libitum* pendant la période d'observation de 24h. Les paramètres étudiés incluaient la létalité, les signes cliniques de toxicité, une analyse histologique de certains organes, des analyses sanguines biochimiques.

Les résultats concernant la létalité et les symptômes observés sont présentés dans le tableau 3.

L'administration de PnTX G a entraîné une létalité des souris à partir de 220 µg PnTX G/kg pc (3/5 souris, en 22 min). Aucune létalité n'a été observée aux doses de 8, 20, 50 et 120 µg/kg pc. Toutes les souris (5/5) sont mortes à la dose de 370 µg/kg pc (temps de survie égal ou inférieur à 18 min). La DL₅₀ de la PnTX G a été calculée à 208 µg/kg pc (intervalle de confiance à 95% = 155-281 µg/kg pc).

Avant la mort, les principaux signes de toxicité ont été : prostration, tremblements, sauts, respiration abdominale, hypothermie, paralysie des membres inférieurs et cyanose.

Aucun changement macroscopique des organes n'a été observé lors de la nécropsie des souris traitées avec la PnTX G.

L'analyse histologique des principaux organes et tissus n'a révélé que des changements mineurs dans l'intestin grêle des souris ayant reçu la PnTX G à des doses égales ou supérieures à 300 µg/kg pc (dégénérescence modérée de la muqueuse, atrophie des villosités).

Aucune différence dans les paramètres sanguins biochimiques n'a été mise en évidence entre les souris traitées et témoins.

Tableau 3 : Létalité et signes cliniques de toxicité chez la souris après administration unique par gavage de PnTX G purifiée (Rapport Anses-Université de Trieste-CNRS, 2014)

Dose de PnTX G purifiée	Létalité	Temps de survie (h:min)	Signes cliniques de toxicité
Témoin	0/8	-	-
8 µg/kg pc	0/3	-	-
20 µg/kg pc	0/3	-	-
50 µg/kg pc	0/3	-	-
120 µg/kg pc	0/3	-	-
220 µg/kg pc	3/5	00:20 ; 00:22 ; 00:22	prostration, tremblements, sauts, respiration abdominale, hypothermie, paralysie des membres inférieurs, cyanose
300 µg/kg pc	4/5	00:12 ; 00:13 ; 00:17 ; 00:23	prostration, tremblements, sauts, respiration abdominale, hypothermie, paralysie des membres inférieurs, cyanose
370 µg/kg pc	5/5	00:13 ; 00:15 ; 00:16 ; 00:17 ; 00:18	prostration, tremblements, sauts, respiration abdominale, hypothermie, paralysie des membres inférieurs, cyanose
450 µg/kg pc	5/5	00:12 ; 00:12 ; 00:15 ; 00:16 ; 00:29	prostration, tremblements, sauts, respiration abdominale, hypothermie, paralysie des membres inférieurs, cyanose

- Choix de la dose critique

A partir des données de l'étude clé, deux approches ont été explorées :

- 1^{ère} approche : la dose de **120 µg PnTX G/kg pc** a été retenue comme dose maximale tolérée (DMT), c'est-à-dire la dose à laquelle aucun effet n'est observé dans les paramètres étudiés sur une période de 24h après traitement.

- 2^{de} approche : calcul d'une benchmark dose⁵ à partir d'un niveau de réponse de 10% de mortalité (logiciel PROAST web RIVM, v. 65.2). Le modèle qui s'adapte le mieux aux données expérimentales selon le critère d'Akaike (AIC) est le modèle probit, pour lequel la BMDL à 95% est de **69,1 µg PnTX G/kg pc** de souris.

Le CES ERCA signale le caractère inhabituel d'utiliser des données de mortalité chez la souris en administration orale unique pour dériver une valeur sanitaire de référence. Cela se justifie par le fait que la mortalité des souris survient rapidement et que l'écart est très étroit entre une dose sans signe de toxicité et une dose létale.

Un niveau de réponse de 10% (pour la létalité) est jugé élevé mais il a été exceptionnellement retenu dans le cadre de cette expertise car les résultats obtenus avec un niveau de réponse de 1% ont été jugés trop incertains en raison du faible nombre de souris testées dans l'étude.

Le GT a noté et tenu compte des résultats obtenus dans l'autre étude de toxicité aiguë par voie orale chez la souris non à jeun avec de la PnTX G purifiée (Munday *et al.*, 2012) car cohérents avec ceux de l'étude réalisée par le Département des Sciences du vivant de l'Université de Trieste :

- i. la DL₅₀ est de 150 µg PnTX G/kg pc (IC à 95% = 105-199 µg/kg pc) ;
- ii. la dose testée sans létalité et sans signe apparent de neurotoxicité est de 75 µg PnTX G/kg pc.

- Choix des facteurs d'incertitude

Des facteurs d'incertitude ont été identifiés pour les 2 approches explorées dans l'établissement de la dose critique :

- 1^{ère} approche : la dose de 120 µg PnTX G/kg pc a été retenue comme dose maximale tolérée (DMT). Le facteur d'incertitude global associé est de 900 :
 - o facteur d'incertitude inter-espèces : $UF_A = 10$
 - o facteur d'incertitude interindividuel : $UF_H = 10$
 - o autres facteurs : $UF_D = 3$ (insuffisance de données) et 3 (pour tenir compte de la sévérité et de l'allure de la courbe dose-réponse).
- 2^{de} approche : la BMDL de 69,1 µg PnTX G/kg pc de souris a été retenue comme point de départ. Le facteur d'incertitude global associé est de 525 :
 - o facteur d'ajustement allométrique : 7 pour la souris
 - o $UF_A = 2,5$ pour la composante toxicodynamique
 - o $UF_H = 10$
 - o $UF_D = 3$ (insuffisance de données).

- Proposition de valeur repère aiguë provisoire

La terminologie usuelle « dose de référence aiguë (ARfD) » n'a pas été retenue dans le cadre de cette expertise pour éviter toute confusion avec l'usage réglementaire qui en est fait, notamment dans le cadre des substances phytopharmaceutiques ou biocides.

En raison de l'insuffisance des données pour la caractérisation des dangers de la PnTX G, la valeur élaborée pour caractériser le risque a été nommée **valeur repère aiguë provisoire**.

La valeur repère aiguë provisoire est de **0,13 µg PnTX G/kg pc**, quelle que soit l'approche suivie⁶ (DMT et BMDL).

⁵ La benchmark dose est une dose produisant un effet mesurable correspondant à un niveau de réponse donné par rapport à un groupe témoin. Le plus souvent, la limite inférieure de son intervalle de confiance à 95% ou 90% (BMDL_{95%} ou BMDL_{90%}) est utilisée. Cette approche repose sur une modélisation des données expérimentales prenant en compte l'ensemble de la courbe dose-réponse (Anses 2017a).

⁶ Approche DMT : $(120 \text{ µg PnTX G/kg pc}) / (10 \times 10 \times 3 \times 3) = 120/900 = 0,1333 \text{ µg PnTX G/kg pc}$
Approche BMDL : $69,1 \text{ µg PnTX G/kg pc} / (7 \times 2,5 \times 10 \times 3) = 69,1/525 = 0,1316 \text{ µg PnTX G/kg pc}$

- Proposition de concentration maximale tolérable de PnTX G dans les coquillages

A partir de la valeur repère aiguë provisoire de 0,13 µg PnTX G/kg pc, d'une taille de portion par défaut de 400 g de coquillages (EFSA 2010) et d'un poids corporel par défaut de 70 kg, la concentration à ne pas dépasser dans les coquillages serait **de 23 µg PnTX G/kg de chair totale**.

- Niveau de confiance

Un niveau de confiance global **moyen** a été attribué à la valeur repère aiguë provisoire en se basant sur les critères suivants :

- Niveau de confiance dans la nature et la qualité du corpus de données : **Faible**

L'analyse bibliographique a révélé qu'il existait peu de données sur la toxicité aiguë par voie orale des PnTX purifiées et aucune par administration répétée. Le GT a identifié seulement 2 études de toxicité aiguë par voie orale chez une seule espèce (souris) et pour un seul sexe (les femelles, considérées comme plus sensibles que les mâles) pour la caractérisation du danger. Le CES ERCA souligne le manque de données chez une autre espèce de rongeur (le rat) ainsi que le manque de connaissances sur la toxicocinétique et la toxicodynamie des PnTX.

- Niveau de confiance dans le choix de l'effet critique et le mode d'action : **Moyen**

L'étude clé est une étude de toxicité aiguë avec une administration unique par voie orale. Elle avait pour objectif d'étudier la mortalité des souris et de définir une dose létale à 50% (DL₅₀). Des signes de toxicité neurologique ont également été observés et sont cohérents avec le mode d'action connu des PnTX.

Le CES ERCA souligne le caractère inhabituel d'utiliser des données de mortalité chez la souris en administration orale unique pour dériver une valeur sanitaire de référence. Cela se justifie par le fait que la mortalité des souris survient rapidement et que l'écart est très étroit entre une dose sans signe de toxicité et une dose létale.

- Niveau de confiance dans le choix de l'étude clé : **Moyen / Fort**

L'étude clé a été analysée selon l'outil ToxRTool et a obtenu un score total de 17 (sur 21), correspondant à une cotation 2 selon la méthode de Klimisch (étude valide avec restrictions).

- Niveau de confiance dans le choix de la dose critique : **Fort**

Deux approches ont été explorées pour la sélection de la dose critique à partir des données de l'étude clé. La 1^{ère} approche a retenu une dose maximale tolérée (DMT), dose à laquelle il n'y a ni mortalité ni signe de toxicité des souris au cours de la période d'observation de 24h (qui est jugée suffisante car les PnTX sont des toxines à action rapide, les signes neurotoxiques chez la souris survenant dans les 30 minutes après administration). La 2^{nde} approche a modélisé la relation dose-réponse (létalité) pour calculer une BMDL.

Ce niveau de confiance global pourra être réévalué lorsque de nouvelles données de toxicité aiguë par voie orale seront disponibles pour la PnTX G ou pour d'autres toxines produites par *V. rugosum*.

- Faute de données disponibles par administration orale répétée chez l'animal de laboratoire avec de la PnTX purifiée, le GT n'a pas pu proposer de valeur toxicologique de référence chronique.

Tableau 4 : Tableau de synthèse de l'élaboration de la valeur repère aiguë provisoire pour la PnTX G

	Effet critique Etude clé	Dose critique pour la souris	UF	Valeur repère aiguë provisoire pour l'Homme	Niveau de confiance
1 ^{ère} approche	<i>Effet critique :</i> absence de mortalité et de symptômes chez la souris 24h après l'administration orale par gavage de PnTX G purifiée	Dose maximale tolérée de 120 µg PnTX G/kg pc	Facteur total : 900 UF _A = 10 UF _H = 10 UF _D = 9 (3 pour insuffisance de données et 3 pour la sévérité et l'allure de la courbe dose- effet).	0,13 µg PnTX G/kg pc	Moyen
2 ^{nde} approche	<i>Etude clé :</i> Rapport Anses- Université de Trieste- CNRS 2014	BMDL de 69,1 µg PnTX G/kg pc	Facteur total : 525 Ajustement allométrique : 7 pour la souris UF _A = 2,5 UF _H = 10 UF _D = 3 pour insuffisance de données	0,13 µg PnTX G/kg pc	Moyen

3.3.6. Transposition à l'Homme

Il n'existe pas à ce jour de cas rapportés d'intoxication humaine par des PnTX. Cette partie a donc pour objectif de décrire les effets cliniques observés chez l'Homme après exposition à des molécules (médicaments, toxines naturelles) ayant une pharmacologie comparable à celle des pinnatoxines. De la même façon, une description ciblée de certaines pathologies (myasthénie, canalopathies...) et de leurs symptomatologies, qui pourraient être observées après exposition à des PnTX, a été réalisée sur la base des études de pharmacologie moléculaire et de toxicologie *in vivo*.

- Signes cliniques de toxicité chez la souris et correspondance possible chez l'Homme

Les signes cliniques de toxicité rapportés chez l'animal sont issus de publications (Munday 2008 ; Selwood *et al.*, 2010 ; Munday *et al.*, 2012 ; Anses-Université de Trieste-CNRS, 2014). Ces signes sont similaires selon les études mais sont insuffisamment décrits et dans la plupart des études il n'y avait pas de groupe témoin.

Le tableau 5 propose une correspondance possible chez l'Homme des signes de toxicité rapportés lors d'exposition chez la souris.

Tableau 5 : Signes cliniques de toxicité chez la souris et correspondance possible chez l'Homme

Signes cliniques de toxicité chez la souris	Support anatomique ou physiologique	Correspondance possible chez l'Homme
Hyperactivité Agitation	Début d'atteinte respiratoire et agitation hypercapnique ? Début de crise d'épilepsie ?	Agitation motrice de la crise d'épilepsie frontale ? Agitation confusionnelle centrale comme lors de l'intoxication par cytosine ?
Perte de l'activité motrice	Atteinte de la jonction neuromusculaire	Syndrome myasthénique avec analogie à la maladie <i>myasthenia gravis</i> Paralysie flasque des curares
Dépression respiratoire	Atteinte du couple nerf diaphragmatique - muscle diaphragmatique	Atteinte respiratoire de la myasthénie
Arrêt respiratoire	Bloc complet sur le couple nerf diaphragmatique - muscle diaphragmatique	Arrêt respiratoire correspondant à la crise myasthénique
Epilepsie	Atteinte centrale par les récepteurs nicotiniques	Epilepsie par libération du GABA ou par mutation héréditaire
Extension de la patte	Atteinte des interneurons médullaires Atteinte centrale	Syndrome pyramidal Signe de Babinski

Signes cliniques de toxicité chez la souris	Support anatomique ou physiologique	Correspondance possible chez l'Homme
Réversibilité si absence de décès ou si injection de prostigmine	Levée du bloc neuromusculaire post synaptique	Fluctuation de l'atteinte du syndrome myasthénique Ou levée transitoire du bloc par la prostigmine Levée d'action des curares
Exophtalmie	Augmentation de la pression intraoculaire	Action du curare-like suxaméthonium Action des lupins

- Effets connus des antagonistes nicotiniques médicamenteux et ou toxiques (curares-like et molécules ganglioplégiques)

Les antagonistes des RnACh musculaires sont des curarisants qui peuvent être utilisés en thérapeutique pour provoquer un relâchement des muscles squelettiques pendant les interventions chirurgicales, pour l'intubation trachéale, et en réanimation pour faciliter la ventilation artificielle dans certains cas difficiles. Ces molécules ne passent pas la barrière hémato encéphalique.

Les molécules ganglioplégiques exercent une inhibition de l'influence du système nerveux végétatif (orthosympathique et parasympathique) sur les organes qu'il innerve.

Ces molécules ont principalement été utilisées en thérapeutique comme anti-hypertenseurs. Les molécules naturelles à effets ganglioplégiques sont des alcaloïdes de la famille des quinolizidines, comme la spartéine ou la pipéridine. On retrouve ces molécules notamment dans les plantes de la famille des fabacées comme les cytises (genêts), ainsi que dans les graines de lupins.

Les curares-like se fixent comme les PnTX sur la sous-unité alpha 7 du récepteur de l'acétylcholine. Les effets sont modifiés par des facteurs physiologiques, pathologiques, les interactions médicamenteuses. Ils donnent une paralysie musculaire flasque conduisant à l'arrêt respiratoire. L'aspect ganglioplégique des curares montre des signes de choc anaphylactique allergique de réactions histaminoides cutanées ou systémiques, d'atteinte ganglioplégiques, bradycardie, tachycardie, troubles du rythme cardiaque, hypertension artérielle, œdème pulmonaire et bronchospasme.

L'exposition aux médicaments et aux alcaloïdes naturels à effets ganglioplégiques entraîne une dysautonomie, incluant des variations de la tension artérielle et du rythme cardiaque. Une exposition à des doses importantes peut entraîner le décès du patient par arrêt cardio-respiratoire. Des effets de toxicité chronique ont également été rapportés et se traduiraient par des pathologies neuromusculaires. Enfin, certains alcaloïdes passeraient dans le lait maternel chez l'animal et entraîneraient des troubles développementaux chez l'enfant exposé.

- Effets connus des antagonistes des récepteurs nicotiniques auto-immuns : l'anticorps anti récepteur de l'acétylcholine et la maladie myasthénie

La myasthénie (*myasthenia gravis*) est la conséquence d'un bloc neuromusculaire postsynaptique. La myasthénie, dont il existe un modèle expérimental obtenu en utilisant le RACH comme antigène, est une maladie auto-immune provoquée par des anticorps anti-RACH. Il s'agit d'anticorps qui se fixent sur le RACH, pour la plupart en dehors du site de liaison à l'ACh. Le mode d'action de ces anticorps est complexe.

Les symptômes de la myasthénie sont moteurs purs, fluctuants, aggravés par l'effort, améliorés par le repos. Les symptômes sont déclenchés par la perte de la marge de sécurité au niveau d'un couple nerf muscle : le potentiel de plaque devient inférieur au seuil nécessaire pour déclencher le potentiel d'action. Dans près de la moitié des cas, les premières manifestations sont purement oculaires avec ptosis et diplopie, mais après un an d'évolution chez 80 à 90% des patients, d'autres territoires sont affectés, muscles pharyngo-laryngés et/ou muscles des membres et/ou muscles respiratoires : la myasthénie est alors généralisée. La fluctuation des symptômes, la possible normalité de l'examen clinique amènent à banaliser les signes et à une errance diagnostique importante, d'autant que la fatigue est un signe banal de motif de consultation en médecine générale.

La maladie de la jonction neuromusculaire myasthénie est le modèle clinique le plus vraisemblable qui pourrait correspondre à l'intoxication par les PnTX. Les signes cliniques de la myasthénie sont ceux d'un déficit moteur fluctuant aggravé par l'effort. Le risque du retard diagnostique est la détresse respiratoire, d'autant que le patient est à risque. Le diagnostic est difficile et nécessite un plateau technique d'hôpital.

- Effets connus en central chez l'humain des mutations des récepteurs nicotiniques

Une canalopathie liée à une mutation du récepteur nicotinique alpha 7 est à l'origine de crise d'épilepsie. Par analogie, le blocage du récepteur alpha 7 par les PnTX pourrait entraîner une crise convulsive chez l'Homme comme observé dans les études de toxicité chez la souris.

- Effets connus en central et périphérique de l'activation sur la moelle épinière

Le blocage des RnACh en intramédullaire pourrait générer chez l'animal une extension de la patte (équivalent d'un signe pyramidal ou signe de Babinski) accompagnée d'une dérégulation de la tension artérielle. Dans les études de toxicité de la PnTX G chez la souris, une extension de la patte est observée.

3.4. Contamination du milieu par *V. rugosum* et les PnTX

3.4.1. Distribution géographique de *V. rugosum* et des PnTX

La répartition mondiale de *V. rugosum* et des PnTX rapportée à ce jour est illustrée dans la figure 1.

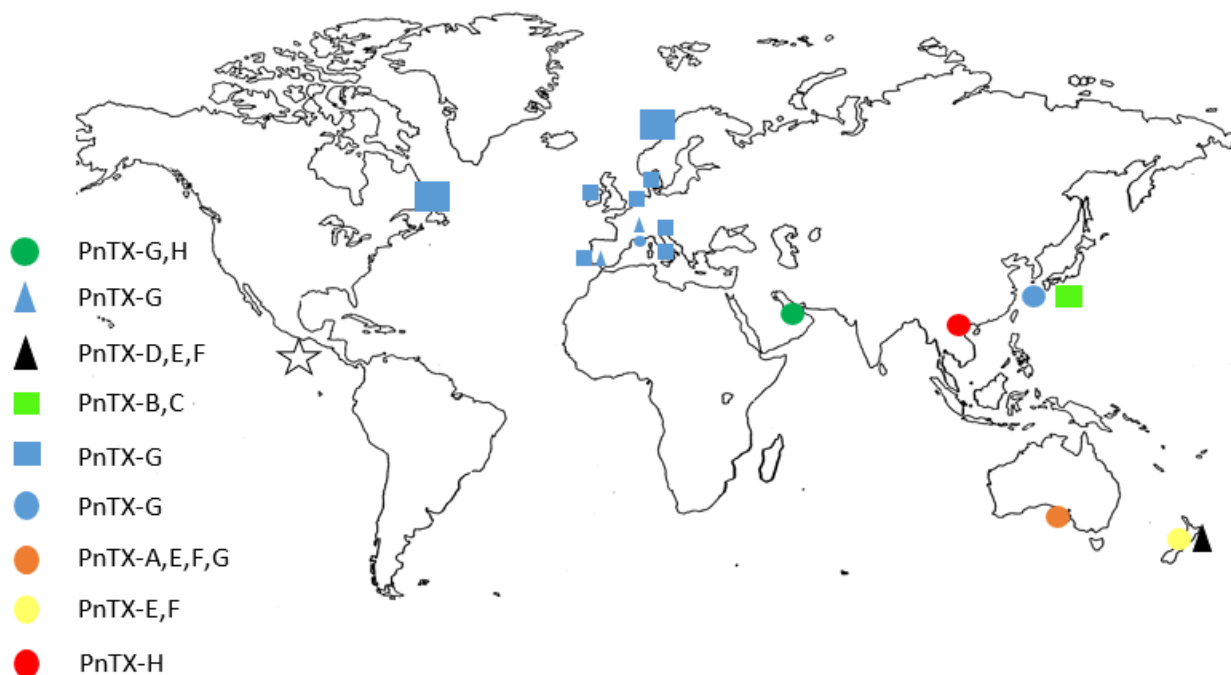


Figure 1 : Présence rapportée de PnTX et/ou de *Vulcanodinium rugosum* dans le monde (modifié de E. Abadie, Ifremer)

Les couleurs des symboles sur la carte indiquent quelle PnTX (PnTX A à H) est détectée dans les cellules de *V. rugosum* dans la zone géographique étudiée (ronds), seulement dans les coquillages (carrés), seulement dans les échantillonneurs passifs (triangles). Les étoiles marquent la présence de cellules de *V. rugosum* mais aucune analyse de PnTX n'a été réalisée.

3.4.2. Etang d'Ingril

En juin 2006, dans le cadre de la surveillance officielle des zones de production de coquillages (REPHY), des bioessais sur souris ont été réalisés sur des échantillons de moules de cette lagune

lors d'une alerte liée à la présence de *Dinophysis acuminata*, espèce productrice de toxines lipophiles (DSP).

Le temps de survie des souris était compris entre 27 et 32 minutes avec des symptômes neurologiques (différents de ceux observés lors des épisodes à toxines paralysantes PSP). Le phénomène a été observé pendant 4 semaines. Aucune espèce de microalgue dont les toxines pourraient expliquer les symptômes des souris (de type neurologique) n'a pu être identifiée dans les échantillons d'eau.

Du fait de cette toxicité de type neurotoxique, il a été décidé de réaliser en 2007, dès le début du mois de juin, des bioessais sur souris pour suivre un éventuel épisode de contamination et ce même en l'absence d'espèce phytoplanctonique potentiellement toxique (dérogation au protocole REPHY). Le phénomène de neurotoxicité chez les souris a été détecté jusqu'au 10 septembre 2007. Aucune espèce phytoplanctonique toxique pouvant expliquer ce phénomène n'a pu être mise en évidence.

Les années suivantes (2008 et 2009) n'ont fait que confirmer le phénomène et montrer son expansion temporelle (allongement vers la période automnale et de début d'hiver). En effet, en 2008 cette toxicité a été détectée du 19 mai au 4 novembre et pour 2009 du 15 juin au 17 novembre (fréquence d'analyse hebdomadaire pendant toute la période où le bioessai sur souris provoquait la mort des souris). Le début du phénomène semble être limité par des températures de l'eau inférieures à 20 °C.

Le bioessai sur souris a été arrêté au 1^{er} janvier 2010 dans le cadre de la surveillance officielle mais il a été conservé jusqu'au 31 décembre 2017 dans le cadre de la veille d'émergence des biotoxines marines.

Dès l'identification de la PnTX G en 2011, une analyse rétrospective des échantillons de 2009 à 2012 a permis d'observer une cinétique de la contamination des coquillages en fonction du temps. Les concentrations maximales annuelles ont été de 261, 1244, 568 et 652 µg/kg chair totale de moules pour 2009, 2010, 2011 et 2012 respectivement. Les concentrations dans les moules sont supérieures à celles observées dans les palourdes, lorsque les coquillages sont prélevés simultanément.

Pour permettre de suivre ce phénomène et de maintenir une veille sur les PnTX, un prélèvement mensuel de moules d'Ingril a été réalisé entre 2013 et 2017. Les résultats montrent que les pics de PnTX G sont observés entre juin et septembre mais les maxima varient selon l'année (887 en 2013, 918 en 2014, 1143 en 2015, 600 en 2016, 640 en 2017, teneur exprimée en µg/kg de chair totale).

3.4.3. Autres lagunes méditerranéennes

En complément du suivi conduit sur l'étang d'Ingril, la recherche de PnTX G dans des échantillons de moules sauvages a été réalisée dans quatre autres lagunes méditerranéennes en 2013.

Une différence statistiquement significative de la concentration en PnTX G selon les lagunes a été observée, avec des valeurs maximales croissantes dans le sens Parc Leucate (11 µg/kg de chair totale) → Thau (15 µg/kg) → Prévost (54 µg/kg) → Vic (89 µg/kg) → Ingril (887 µg/kg).

3.4.4. Côte atlantique et corse

Un dispositif de « Veille d'émergence des biotoxines marines dans les coquillages » (EMERGTOX) a été mis en place par la DGAL en complément des dispositifs nationaux de surveillance des toxines réglementées (REPHYTOX, plan de surveillance de la DGAL). Il a pour objet la mise en évidence d'un éventuel danger lié à la présence dans les coquillages de toxines lipophiles connues réglementées et non réglementées, répertoriées en France ou pouvant être introduites en France via les eaux de ballast ou les échanges commerciaux entre pays.

Sur les onze zones suivies, trois (Ingril, Le Scoré en Bretagne et l'étang de Diana en Corse) ont été concernées par la présence de PnTX en 2018, majoritairement la PnTX G et faiblement par la PnTX A (uniquement à Ingril). Des trois zones impactées, la lagune d'Ingril reste la zone la plus fortement contaminée (avec des concentrations détectées tous les mois, variant de 40 à 2614 µg PnTX G/kg

de glande digestive). Les teneurs trouvées au Scoré et à Diana sont faibles (maximum autour de 10 µg PnTX G/kg de glande digestive). Les concentrations en PnTX A détectées à Ingril varient entre 6 et 32 µg/kg de glande digestive.

Il apparaît important au GT de signaler que la présence de PnTX en France ne se limite pas aux lagunes méditerranéennes. Et compte tenu du réchauffement climatique rendant les conditions écophysiologiques favorables au développement de *V. rugosum*, il convient de rester vigilant pour la côte atlantique puisque la détection de PnTX dans les moules traduit la présence de ce dinoflagellé dans ces eaux.

3.4.5. Hors de France

L'analyse bibliographique menée par le GT a identifié très peu de données publiées sur les teneurs en PnTX dans les coquillages, provenant d'Europe du nord et du sud, du Canada et de Nouvelle-Zélande.

Parmi les 6 études examinées, les teneurs en PnTX G les plus élevées rapportées dans des moules sont de 115 µg/kg en Norvège (Rundberget *et al.*, 2011), 83 µg/kg au Canada (Mc Carron *et al.*, 2012) et 59 µg/kg en Espagne (Garcia-Altare *et al.*, 2014). Ces teneurs sont plus faibles que les teneurs maximales annuelles rapportées en France dans la lagune d'Ingril (entre 261 et 1244 µg/kg selon les années).

Il convient de noter que l'étude de Rambla-Alegre *et al.* (2018) rapporte la persistance de PnTX G dans des échantillons de moules en conserve (jusqu'à 12 µg/kg).

Enfin, l'Anses a adressé un questionnaire au réseau des points focaux de l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) le 15 février 2018, auquel 16 Etats membres ont répondu. Au moment de la demande, aucune agence sanitaire ayant répondu n'avait conduit d'évaluation des risques sanitaires liés aux PnTX. En complément de publications déjà identifiées par le GT, il a été fait mention de données non publiées de contamination dans les coquillages, sans qu'il soit possible par le GT d'évaluer la fiabilité des méthodes analytiques employées.

En conclusion, les concentrations en PnTX G mesurées dans des moules d'Ingril sont les plus élevées rapportées à ce jour dans le monde.

3.5. Exposition alimentaire

3.5.1. Données de consommation alimentaire

Trois études de consommation alimentaire ont été utilisées pour le calcul de l'exposition alimentaire.

- i. Population générale : INCA3. La 3^{ème} étude Individuelle Nationale des Consommations Alimentaires (INCA3) est une enquête transversale visant à estimer les consommations alimentaires et les comportements en matière d'alimentation des individus vivant en France. Elle a été réalisée auprès de 3157 adultes et 2698 enfants âgés de 0 à 17 ans, entre février 2014 et septembre 2015.
- ii. Forts consommateurs de produits de la mer : CALIPSO. L'étude CALIPSO (2006) a été réalisée auprès de 1011 individus de plus de 18 ans forts consommateurs de produits de la mer (au moins 2 fois par semaine) et résidant dans l'un des 4 sites côtiers et ses environs (sur un rayon de 20-25 km) sélectionnés pour l'enquête : Le Havre, Toulon-Hyères, La Rochelle et Lorient.
- iii. Consommateurs côtiers de produits de la mer : CONSOMER. Une étude de consommation sur les produits de la mer (CONSOMER) a été menée en 2016-2017 dans le cadre d'une convention de recherche entre l'Anses et le CREDOC (2015-CRD-25). L'objectif de l'étude était d'évaluer la consommation de produits de la mer d'une population adulte (de plus de 18 ans), en région côtière, pouvant s'approvisionner de façon locale.

3.5.2. Données de contamination

Des données de concentrations en PnTX dans des moules et des palourdes dans plusieurs lagunes méditerranéennes de 2010 à 2017 a été transmis à l'Anses par l'Ifremer.

Deux valeurs de contamination ont été calculées pour les moules d'une part, pour les palourdes d'autre part : la contamination moyenne et le 95^{ème} percentile (P95) de la distribution (la valeur à laquelle 95% des contaminations mesurées sont inférieures et 5% supérieures).

Trois scénarios ont été retenus, en fonction du site dans lequel ont été effectuées les mesures :

- **Scénario « Toutes lagunes »** : moyenne / P95 des contaminations de toutes les moules d'une part, de toutes les palourdes d'autre part (issues de toutes les lagunes étudiées) ;
- **Scénario « Ingril »** : moyenne / P95 des contaminations mesurées dans la lagune d'Ingril aux points « Ingril – Port des Pauvres » et « Ingril Sud », pour les moules d'une part, les palourdes d'autre part ;
- **Scénario « Sauf Ingril »** : moyenne / P95 des contaminations mesurées dans toutes les lagunes SAUF « Ingril – Port des Pauvres » et « Ingril Sud », pour les moules uniquement (pas de mesure de contamination de palourdes hors Ingril).

3.6. Caractérisation du risque

3.6.1. Calcul de l'exposition

• Méthode

A partir des données de consommation individuelle et des données de contamination, l'exposition a été calculée selon l'équation suivante :

$$E_i = \sum_{k=1}^n \frac{C_{i,k} \times L_k}{PC_i}$$

où :

- E_i est l'exposition journalière totale de l'individu i associée à la consommation de l'aliment k ($\mu\text{g/kg}$ de poids corporel/j) ;
- $C_{i,k}$ est la consommation de l'aliment k par l'individu i (kg/j) (soit la taille de portion, soit la consommation journalière) ;
- L_k est la contamination en PnTX G de l'aliment k ($\mu\text{g/kg}$ de poids frais) (soit la contamination moyenne, soit le P95 selon l'exposition calculée) ;
- PC_i est le poids corporel de l'individu i (kg).

• Scénarios testés

Pour les expositions aiguës, une comparaison a été faite avec la valeur repère aiguë provisoire de $0,13 \mu\text{g PnTX G/kg}$ de poids corporel. En fonction du scénario de contamination envisagé, un pourcentage de la population dépassant cette valeur a été calculé dans la population totale de chaque étude d'une part, chez les seuls consommateurs d'autre part. À noter que, concernant la population totale, il s'agit en réalité de la population méditerranéenne (sauf dans le cas d'INCA3). Les différents scénarios étudiés en fonction des études de consommation sont résumés dans le tableau 6.

Tableau 6 : Résumé des populations et scénarios étudiés en fonction des études de consommation

	Population		Site	Consommation	
	Adultes	Enfants	Méditerranée	Moules	Moules + Palourdes
INCA3	X	X		X	
CONSUMER	X		X	X	X
CALIPSO	X		X	X	X

3.6.2. Résultats

L'ensemble des résultats est présenté en détail dans le rapport du GT.

Le tableau 7 présente les résultats du scénario d'exposition aiguë associée à la consommation de moules et palourdes des adultes, issues des données CONSOMER (zone méditerranéenne), qui sont les données jugées les plus représentatives pour la présente évaluation des risques.

Tableau 7 : Exposition aiguë associée à la consommation de moules et palourdes (CONSOMER, zone méditerranéenne) pour les adultes (en µg PnTX G/kg pc)

	Population totale (zone méditerranéenne)			Seuls consommateurs (zone méditerranéenne)			Dépassement de la valeur repère aiguë provisoire (VRAP)	
	n	Moy_pop	P95_pop	n_cons	Moy_cons	P95_cons	% > VRAP	% > VRAP_cons
Toutes lagunes	821	0,590	1,572	591	0,816	1,733	71	100
Ingril	821	0,663	1,767	591	0,917	1,946	71	100
Sauf Ingril (que moules*)	821	0,056	0,149	582	0,079	0,167	7,3	10,23

* des analyses de palourdes ont uniquement été réalisées pour l'étang d'Ingril.

n : nombre d'individus adultes dans la population et suivis pendant l'enquête (cette population inclut les consommateurs et les non consommateurs des produits de la 1^{ère} colonne).

Moy_pop : exposition moyenne dans la population (qu'ils soient consommateurs ou non) (µg/kg pc).

P95_pop : exposition au 95^{ème} percentile calculée dans la population (µg/kg de pc/j).

n_cons : nombre d'individus adultes consommateurs du produit de la 1^{ère} colonne (seuls consommateurs).

Moy_cons : exposition moyenne dans la population des seuls consommateurs (µg/kg de pc/j)

P95_cons : exposition au 95^{ème} percentile calculée dans la population des seuls consommateurs (µg/kg pc/j)

% > VRAP : pourcentage de la population générale dépassant la valeur repère aiguë provisoire de 0,13 µg/kg pc.

% > VRAP_cons : pourcentage des seuls consommateurs dépassant la valeur repère aiguë provisoire de 0,13 µg/kg pc.

Ces résultats montrent que, dans les scénarios testés incluant les données de contamination de l'étang d'Ingril, un dépassement de la valeur repère aiguë provisoire serait observé pour 71% des adultes selon les données de consommation de l'étude CONSOMER pour la zone méditerranéenne (dans le cas du scénario incluant les non-consommateurs de moules et palourdes). Si l'on considère uniquement les individus consommateurs de moules et de palourdes, cette proportion augmente à 100%.

Dans le scénario testé excluant les données de contamination de l'étang d'Ingril, le dépassement serait de 7% pour la population totale méditerranéenne et de 10% pour les seuls consommateurs.

3.6.3. Conclusion en termes de préoccupation sanitaire

Compte tenu des dépassements de la valeur repère aiguë provisoire observés dans le scénario « sauf Ingril », le GT estime qu'il peut exister une préoccupation sanitaire liée à la consommation de coquillages contaminés par les PnTX provenant de ces lagunes méditerranéennes.

Les estimations n'ont pas été réalisées pour les autres sites français où des PnTX ont été détectées dans des moules (Le Scoré, Diana) car les analyses ont porté sur les glandes digestives et la répartition des PnTX entre la glande digestive et la chair totale n'est pas connue.

3.7. Recommandations pour la surveillance

3.7.1. Surveillance environnementale

Plusieurs études sur l'écologie du dinoflagellé *V. rugosum* ont été menées *in vitro* et *in situ*. Pour autant, son origine et le déterminisme de ses efflorescences dans les milieux naturels restent à élucider.

Si la contamination de mollusques par les PnTX dans certaines zones est indéniable, la relation avec les efflorescences à *V. rugosum* reste difficile à établir. En effet, la phase pélagique de cette espèce est difficilement observable dans la colonne d'eau. De ce fait, la surveillance officielle des

zones de production de coquillages basée sur l'identification et le dénombrement des espèces phytoplanctoniques toxiques dans la colonne d'eau est peu adaptée à cette espèce.

Plusieurs pistes de surveillance peuvent être proposées :

- 1) Pour la surveillance du dinoflagellé, il est important de mettre en place, dans les zones à risque, un suivi de la population benthique de cet organisme. Il est indispensable d'échantillonner les macroalgues présentes dans la zone pour récolter les cellules de ce dinoflagellé. Le protocole de type « *Ostreopsis* » expérimenté dans l'étude d'Abadie *et al.* (2018) montre qu'une telle surveillance est possible.
- 2) En parallèle de ce suivi de *V. rugosum*, une surveillance plus systématique de la présence des PnTX A et G dans les mollusques doit être envisagée. Le protocole d'extraction des PnTX est identique à celui des toxines lipophiles actuellement recherchées dans le REPHYTOX. Seule une étape supplémentaire de dosage par LC-MS/MS est à envisager pour un coût analytique qui restera modéré. Il pourrait être procédé à la recherche systématique des PnTX (dans la chair totale) au cours des analyses des toxines lipophiles du REPHYTOX (et pas seulement des échantillons prélevés dans le cadre du dispositif EMERGTOX dont les analyses portent sur la glande digestive).

Cela permettrait d'estimer et de surveiller la présence des PnTX dans les mollusques bivalves des zones de production nationales.

3.7.2. Veille Sanitaire, déclaration et modalités

- Que signaler ?

L'association ganglioplégie/signes neuromusculaires fluctuant de type myasthénie chez l'Homme doit pouvoir interpeller le clinicien, surtout si des signes centraux tel qu'un syndrome pyramidal et/ou des crises d'épilepsie sont associés.

Définition de cas suspect humain : toute personne ayant consommé dans les dernières 24 h des coquillages cuits ou crus (huîtres, moules, palourdes...) ou ayant été en contact direct (baignade, plongée) ou à proximité immédiate des zones lagunaires (pêche à la ligne, plaisance, kayak, plongée, planche à voile, kitesurf) et ayant présenté jusqu'à 24 h après ce contact (eau de mer ou embruns) au moins un des symptômes suivants :

- faiblesse musculaire (myasthénie)
- troubles respiratoires (difficultés à respirer)
- somnolence
- syndrome anticholinergique (bouche sèche, constipation, abolition des bruits intestinaux, mydriase, troubles de l'accommodation, élévation de la pression intra-oculaire, diminution de la sécrétion lacrymale, tachycardie sinusale, rétention urinaire)
- hypo/hypertension artérielle
- brady/tachycardie
- syndrome pyramidal
- épilepsie.

Ces symptômes secondaires à une ingestion de coquillages contaminés par des PnTX correspondent à une intoxication par des antagonistes des récepteurs cholinergiques nicotiniques (curarisant +/- ganglioplégiques).

A ce jour, en Méditerranée, aucune intoxication alimentaire par les PnTX n'a été détectée. Si de tels cas d'intoxications graves (hospitalisation) survenaient, ils devraient être déclarés sans délai à un Centre Antipoison et de Toxicovigilance (CAPTV) et à l'ARS.

- Qui signale ?

Les usagers directement concernés ainsi que les professionnels de santé libéraux, hospitaliers, urgentistes et pharmacies du bord de mer qui sont susceptibles de recevoir les patients suspects (troubles respiratoires, faiblesse musculaire) et de les signaler à un CAPTV.

- A qui signaler ?

Pour tous les cas, à un Centre Antipoison et de Toxicovigilance (CAPTV).

Pour les départements de l'Hérault et de l'Aude, dans lesquels se situent les étangs palavasiens particulièrement concernés, il s'agit du CAPTV de Toulouse au : 05 61 77 74 47 et sur le portail des signalements à l'adresse suivante : <http://www.signalement-sante.gouv.fr>

Le CAPTV de Toulouse est chargé de la vérification et de la confirmation du signalement des cas groupés suspects et transmet ces informations (nombre de cas et localisation géographique) à l'ARS Occitanie.

3.8. Conclusions et recommandations du groupe de travail et du CES ERCA

3.8.1. Existe-t-il des données toxicologiques pour les PnTX et notamment, pour les effets aigus, une DL₅₀ reconnue ? Existe-t-il des données pour le risque chronique sous la forme d'une valeur toxicologique de référence (VTR) ?

Les PnTX sont un groupe de 8 toxines (PnTX A à H) parmi lesquelles la PnTX G est prise pour référence parce qu'elle est celle quasi-exclusivement retrouvée dans les coquillages en France (à l'exception de la PnTX A aussi détectée à Ingril en faibles concentrations). Il est à noter que des différences de toxicité aiguë ont été observées selon les analogues et que la PnTX G n'est pas considérée comme la plus toxique. En l'état actuel des connaissances, la PnTX F semble la plus toxique.

Suite à l'analyse de la littérature, des données toxicologiques aiguës montrent la neurotoxicité des PnTX, qui de ce fait constituent un danger potentiel pour l'Homme. Deux études expérimentales ont permis d'évaluer une DL₅₀, chez la souris, par voie orale.

Les données de ces études ont été utilisées pour proposer une valeur repère aiguë provisoire de 0,13 µg PnTX G/kg de poids corporel. A partir de cette valeur, d'une taille de portion par défaut de 400 g de coquillages (EFSA, 2010b) et d'un poids corporel par défaut de 70 kg, la concentration à ne pas dépasser dans les coquillages serait de 23 µg PnTX G/kg de chair totale.

A la connaissance du GT, aucune étude de toxicité par administration orale répétée n'est disponible, il n'est donc pas possible de proposer une VTR chronique.

La portimine, produite en quantité importante par les souches méditerranéennes de *Vulcanodinium rugosum*, est associée à la problématique considérée. Cette toxine serait très faiblement accumulée dans les coquillages. Les données toxicologiques concernant la portimine sont plus limitées et elle semble moins toxique que les PnTX chez la souris par voie intrapéritonéale.

Les PtTX, identifiées au nombre de 3 (A à C) sont des analogues structuraux appartenant au groupe des PnTX, mais les données disponibles au sein de la littérature sont insuffisantes pour pouvoir les prendre en compte dans cette évaluation de risque.

3.8.2. Compte tenu de ces données toxicologiques, et au vu du contexte, existe-t-il une préoccupation de santé publique aux niveaux de contamination identifiés par l'Ifremer dans certaines zones de production conchylicole françaises ?

Depuis la mise en évidence de la PnTX G en 2012 dans l'étang d'Ingril par l'Ifremer, cette toxine a été observée tous les ans, au moment des efflorescences de *Vulcanodinium rugosum*, dans les échantillons de moules (jusqu'à 1244 µg/kg de chair totale) et de palourdes (jusqu'à 95 µg/kg de chair totale). En France, seules ces deux espèces de mollusques ont été étudiées et il n'y a pas de données disponibles pour les autres espèces consommées.

Les études menées ponctuellement en 2012-2014 ont montré la présence de PnTX G également dans les autres lagunes méditerranéennes.

Enfin, le dispositif de veille d'émergence des biotoxines marines dans les coquillages (EMERGTOX) a mis en évidence la présence de PnTX G sur la côte atlantique et corse.

Le mode d'action des PnTX établi *in vivo* et *in vitro* (signes cliniques de toxicité et létalité, mécanistique) a permis aux experts de proposer des hypothèses de transposition à l'Homme.

A partir des données de consommation disponibles (INCA3, CONSOMER et CALIPSO), l'exposition alimentaire a été estimée selon divers scénarios. Les résultats obtenus montrent que, dans certains cas (forte consommation et/ou forte contamination), la valeur repère aiguë provisoire peut être dépassée.

En conséquence, le GT estime qu'il peut exister une préoccupation sanitaire liée à la consommation de coquillages contaminés par les PnTX provenant des lagunes méditerranéennes. Cette préoccupation est surtout marquée pour la zone d'Ingril même si à la connaissance du GT, il n'y a pas de production conchylicole destinée à la commercialisation. Néanmoins, le GT recommande d'éviter toute consommation de coquillages provenant de cette zone.

3.8.3. Quelles modalités de suivi des PnTX dans le milieu marin pourraient être recommandées, en vue d'une prise en compte de ces toxines dans le dispositif de vigilance pour les biotoxines marines lipophiles dans les coquillages, piloté par la DGAL ?

Le GT recommande d'intégrer la recherche des PnTX à l'analyse des toxines lipophiles dans les coquillages conduites dans le cadre de la surveillance officielle des zones de production (REPHYTOX) et de mettre en place une surveillance du dinoflagellé *Vulcanodinium rugosum* dans sa phase benthique au sein du REPHY sanitaire.

3.8.4. Perspectives de recherche

3.8.4.1. Améliorer les connaissances sur l'écologie de *Vulcanodinium rugosum* et l'accumulation de ses toxines dans la chaîne alimentaire

Des études complémentaires devraient être conduites sur :

- La recherche de la distribution tissulaire des PnTX dans les mollusques : en effet, des résultats préliminaires non publiés de l'Ifremer montrent que, contrairement à d'autres toxines comme l'acide okadaïque, les PnTX ne se concentreraient pas majoritairement dans la glande digestive.
- La contamination d'autres organismes marins : l'analyse de la littérature (MacKenzie *et al.*, 2011) a permis d'identifier que les gastéropodes présentent des concentrations en PnTX E et F très élevées (>1000 µg/kg de chair totale). Des études complémentaires dans les zones à risque (étangs palavasiens) pourraient être mises en place sachant que certains de ces gastéropodes sont consommés.
- L'accumulation des différentes toxines produites par *V. rugosum* le long de la chaîne alimentaire marine.
- Les cinétiques d'accumulation et de détoxification chez les mollusques, et évaluer si une phase de dépuraison est envisageable.
- Les métabolites des PnTX produits par les mollusques et leur toxicité potentielle.
- La contamination par les PnTX des coquillages prélevés sur les côtes françaises pour affiner les estimations d'exposition alimentaire réalisées dans le cadre de cette expertise, qui se sont basées sur des données acquises entre 2010 et 2014 (2017 pour Ingril).
- L'étude de la stabilité thermique des PnTX (effet de la cuisson).

3.8.4.2. Toxicologie

- Caractériser le devenir des PnTX après ingestion (ADME⁷)

Des résultats non publiés (communications personnelles de V. Fessard et J. Molgó) indiquent que les PnTX ont la capacité de franchir la plupart des barrières biologiques (barrière intestinale, hémato-encéphalique, placentaire). Cependant, les paramètres ADME pourraient dépendre de

⁷ ADME : absorption, distribution, métabolisme, excrétion.

l'analogue considéré. Ces résultats préliminaires devraient être complétés par des études cinétiques *in vivo* en prenant en compte les divers analogues. Des données concernant le métabolisme et la distribution de ces toxines sont nécessaires.

Le GT recommande dans un premier temps de se focaliser sur la PnTX G et dans un second temps sur les autres analogues et sur la portimine.

- Mieux caractériser la toxicité des toxines produites par *V. rugosum* par administration orale

Le GT recommande que soit réalisée une étude de toxicité orale aiguë étendue (incluant la description des symptômes cliniques, l'évaluation de paramètres biologiques, hématologiques et anatomopathologiques comme dans les études par administrations répétées, pour une gamme de doses proches de la dose maximale tolérée dans l'étude du rapport Anses-Université de Trieste-CNRS 2014) de la PnTX G chez le rongeur, avec une période d'observation de 14 jours.

Le GT recommande que soit réalisée une étude par administration orale répétée de 28 jours (ligne directrice OCDE 407) voire de 90 jours (ligne directrice OCDE 408). Compte-tenu des données disponibles à ce jour, le GT recommande de compléter ces études en recherchant les effets neurotoxiques centraux et périphériques ainsi que les effets sur le système cardio-vasculaire. La réalisation d'une étude de neurotoxicité suivant la ligne directrice OCDE 424 est préconisée.

Cette recommandation s'applique en priorité à la PnTX G et dans un second temps aux autres PnTX et toxines associées identifiés dans les coquillages crus ou cuits (selon les résultats de l'étude de thermostabilité).

Les résultats préliminaires (Couesnon *et al.*, 2014) ainsi que les communications personnelles sur des expositions *in ovo* de poulet suggèrent que les PnTX pourraient affecter la croissance de l'embryon. Le GT recommande d'étudier les effets potentiels sur la descendance, en suivant la ligne directrice de l'OCDE 422.

- Epidémiologie humaine

En fonction des résultats obtenus dans les études de toxicocinétique chez le rongeur, il pourrait être intéressant de rechercher les PnTX dans le sang, les urines, les fèces, des populations habitant à proximité des étangs palavasiens et consommant les moules et les palourdes.

Le GT recommande également de conduire une étude des cas d'intoxication dans la zone concernée, impliquant les centres hospitaliers à proximité des étangs palavasiens, et les cabinets des médecins généralistes du secteur. Cette étude, coordonnée par la toxicovigilance, pourra se baser sur la fiche de signalement proposée par le GT et impliquer l'Ifremer pour l'analyse des toxines dans les coquillages pour la période concernée.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) endosse les conclusions du groupe de travail « Pinnatoxines » (PnTX) et du Comité d'experts spécialisé « Evaluation des risques physico-chimiques dans les aliments » (CES ERCA).

Ces travaux d'expertise constituent une avancée pour la prise en compte du danger émergent que représentent les PnTX. L'analyse des données disponibles de la littérature a permis de proposer une valeur repère aiguë provisoire pour la PnTX G, identifiée comme étant celle majoritairement détectée dans les coquillages français. Cette valeur a permis de caractériser le risque pour le consommateur pour différents scénarios : l'exposition liée à la consommation de coquillages a ainsi été estimée à partir de données de contamination en PnTX G dans des moules et des palourdes provenant des lagunes méditerranéennes et de données de consommation disponibles à l'Anses et représentatives de la population adulte de cette zone géographique. L'expertise a mis en évidence que selon les scénarios testés il peut exister une préoccupation sanitaire en cas de forte consommation et/ou de forte contamination. Cette préoccupation est particulièrement marquée pour des coquillages qui proviendraient de la zone d'Ingril. A la connaissance de l'Anses, il n'y a pas de production conchylicole destinée à la commercialisation issue de cette zone. Néanmoins, l'Anses

recommande aux pouvoirs publics de faire en sorte d'éviter toute consommation de coquillages provenant de cette zone.

L'évaluation des risques qui sous-tend cette conclusion s'appuie sur un scénario maximaliste d'estimation de l'exposition à la PnTX G, en retenant le 95^{ème} percentile de la contamination des coquillages. Une évaluation plus réaliste des risques pourrait être conduite selon une approche probabiliste (prenant en compte la distribution de l'ensemble des données, aussi bien de contamination que de consommation), approche qui nécessiterait l'acquisition de plus de données de contamination dans les coquillages, en particulier dans les huîtres.

L'Anses souligne :

- 1/ les inconnues quant à la répartition spatiale de *Vulcanodinium rugosum* et quant à sa présence dans les zones de productions conchylicoles en France métropolitaine d'une part et son caractère ubiquitaire avéré en Europe, de la côte Atlantique sud de l'Espagne jusqu'aux côtes norvégiennes d'autre part ;
- 2/ les inconnues sur la capacité de toxinogénèse de *V. rugosum* dans la plupart des zones de production conchylicole en France métropolitaine ;
- 3/ l'observation avérée d'une capacité de production de toxines par certains *V. rugosum* toxinogènes, à des niveaux de préoccupation sanitaire révélés par l'évaluation des risques, en zone « Etang d'Ingril », qui constitue une zone hydrographique continue avec le bassin de forte production conchylicole de l'étang de Thau (Hérault).

Dans ce contexte, l'Anses recommande :

- 1/ à Ingril et Thau, la mise en place d'une surveillance régulière du dinoflagellé et le suivi analytique des concentrations de PnTX dans les coquillages dont la production est autorisée, selon des modalités à établir par les gestionnaires de risque, notamment s'agissant de la fixation d'une valeur-guide de contamination acceptable. A partir de la valeur repère aiguë provisoire et d'une taille de portion par défaut de 400 g de coquillages, l'Anses a identifié que la concentration à ne pas dépasser dans les coquillages serait de 23 µg PnTX G/kg de chair totale.
- 2/ Pour les autres zones de production (voire de pêche de loisir), une réflexion, notamment dans le cadre des comités de pilotage des dispositifs REPHYTOX et EMERGTOX, pour l'établissement d'une cartographie de l'implantation de *V. rugosum* en zone benthique de toutes les zones conchylicoles des côtes métropolitaines en vue d'une surveillance régulière. Compte tenu du potentiel avéré d'implantation pérenne du dinoflagellé dans le milieu et de sa capacité de toxinogénèse dans des environnements de type lagunaire méditerranéens, il conviendrait de porter particulièrement l'effort de surveillance sur ces zones.

Enfin, l'Anses souligne l'importance d'engager des travaux de recherche visant à compléter les connaissances sur les PnTX et les autres toxines produites par *V. rugosum*, en particulier des études sur leur toxicité et leur accumulation dans les espèces de coquillages consommés par l'Homme.

Dr Roger Genet

MOTS-CLÉS

Pinnatoxines, Ptériatoxines, Portimine, *Vulcanodinium rugosum*, Imines cycliques, Toxines émergentes, Coquillages
Pinnatoxins, Pteriattoxins, Portimine, *Vulcanodinium rugosum*, Cyclic imines, Emerging toxins, Shellfish

Evaluation des risques liés aux pinnatoxines dans les coquillages

Saisine « 2016-SA-0013 »

RAPPORT d'expertise collective

**Comité d'experts spécialisé
« Evaluation des risques physico-chimiques dans les aliments »**

Groupe de travail « Pinnatoxines »

Janvier 2019

Mots clés

Pinnatoxines, Ptériatoxines, Portimine, *Vulcanodinium rugosum*, Imines cycliques, Toxines émergentes, Coquillages

Pinnatoxins, Pteriattoxins, Portimine, *Vulcanodinium rugosum*, Cyclic imines, Emerging toxins, Shellfish

Présentation des intervenants

PRÉAMBULE : Les experts membres de comités d'experts spécialisés, de groupes de travail ou désignés rapporteurs sont tous nommés à titre personnel, *intuitu personae*, et ne représentent pas leur organisme d'appartenance.

GROUPE DE TRAVAIL

Président

M. César MATTEI – Maître de conférence des universités, Université d'Angers – Compétences en toxicologie, neurosciences

Membres

M. Eric ABADIE – Ifremer – Compétences en chimie analytique, culture de souches toxiques, *Vulcanodinium rugosum* et pinnatoxines.

M. Nicolas DELCOURT – Maître conférence universitaire, Centre antipoison et de toxicovigilance – Compétences en biochimie et toxicologie clinique

Mme Valérie FESSARD – Cheffe d'unité Toxicologie des contaminants – Compétences en toxicologie environnementale, toxicité des cyanotoxines, des phycotoxines et des pinnatoxines.

M. Jean-Marc FREMY – Chercheur analyste retraité – Compétences en chimie analytique, toxicologie, phycotoxines et évaluation du risque sanitaire

M. Philipp HESS – Ifremer – Compétences en chimie analytique, phycotoxines et pinnatoxines. Membre du GT du 14 novembre 2017 au 24 août 2018

M. Vincent HORT – Laboratoire nationale de référence pour les biotoxines marines – Compétences en chimie analytique, biotoxines marines

Mme Emmeline LAGRANGE-GUILLON – Neurologue, Chef de service des maladies rares et centre SLA – Compétences en médecine humaine, neurologie, maladies de la jonction neuromusculaire

M. Jean-Paul VERNOUX – Professeur émérite – Compétences en toxicologie, biotoxines marines

CONTRIBUTION SCIENTIFIQUE AUX TRAVAUX DU GT

M. Jordi MOLGÓ – Directeur de Recherche Émérite CNRS – Compétences en toxicologie des toxines, neurosciences, contribution en tant que rapporteur pour les aspects relatifs à l'identification et à la caractérisation des dangers

RELECTEURS

Mme Martine CLAUW – Professeur en Pharmacie-Toxicologie à l'ENVT – Compétences en toxicologie

Mme Emilie LANCE – Maître de conférence, Université de Reims – Compétences en écotoxicologie et cyanotoxines

M. Alain-Claude ROUDOT – Professeur des universités – Compétences en modélisation mathématique, expologie

COMITÉ D'EXPERTS SPÉCIALISÉ

Les travaux, objets du présent rapport ont été suivis et adoptés par le CES « Evaluation des risques physico-chimiques dans les aliments » (CES ERCA) :

- **Mandat 2015-2018**, date : 15 mars 2018

Président

M. Cyril FEIDT – Professeur des universités – Compétences en transfert des contaminants

Membres

M. Claude ATGIE – Professeur des universités – Compétences en toxicologie
M. Pierre-Marie BADOT – Professeur des universités – Compétences en transfert des contaminants
Mme Valérie CAMEL – Professeur des universités – Compétences en chimie analytique
Mme Martine CLAUW – Professeur des universités – Compétences en toxicologie
M. Guillaume DUFLOS – Responsable de laboratoire – Compétences en chimie analytique
Mme Camille DUMAT – Professeur des universités – Compétences en chimie analytique
M. Jérôme GAY-QUEHEILLARD – Maître de conférence des universités – Compétences en impacts digestifs et métabolisme
M. Thierry GUERIN – Directeur de recherche – Compétences en chimie analytique
Mme Nicole HAGEN-PICARD – Professeur des universités – Compétences en toxicologie
Mme Laila LAKHAL – Ingénieur animateur de projets – Compétences en toxicologie
M. Claude LAMBRE – Retraité – Compétences en toxicologie
M. Bruno LE BIZEC – Professeur des universités – Compétences en chimie analytique
Mme Raphaële LE GARREC – Maître de conférences des universités – Compétences en toxicologie
M. Eric MARCHIONI – Professeur des universités – Compétences en chimie analytique
M. César MATTEI – Maître de conférence des universités – Compétences en toxicologie
Mme Sakina MHAOUTY-KODJA – Directeur de recherche – Compétences en toxicologie
M. Fabrice NESSLANY – Directeur de laboratoire – Compétences en toxicologie
M. Alain-Claude ROUDOT – Professeur des universités – Compétences en modélisation mathématique
Mme Karine TACK – Responsable de laboratoire – Compétences en chimie analytique
Mme Paule VASSEUR – Professeur émérite – Compétences en toxicologie
M. Eric VERDON – Responsable de laboratoire – Compétences en chimie analytique
M. Jean-Paul VERNOUX – Professeur émérite – Compétences en toxicologie

- **Mandat 2018-2021**, dates : 18 octobre 2018, 14 décembre 2018 et 25 janvier 2019

Président

M. Bruno LE BIZEC - Professeur des universités - Compétences en chimie analytique

Vice-présidents

M. Fabrice NESSLANY - Directeur de laboratoire - Compétences en toxicologie
Mme Karine TACK - Chercheuse - Compétences en chimie analytique et environnementale, évaluation des risques sanitaires

Membres

M. Claude ATGIE – Professeur des universités – Compétences en toxicologie

M. Pierre-Marie BADOT - Professeur des universités – Compétences en transfert de contaminants et écotoxicologie

Mme Marie-Yasmine DECHRAOUI BOTTEIN – Chercheuse en toxicologie environnementale – Compétences en biotoxines marines

Mme Martine CLAUW - Professeur des universités - Compétences en toxicologie

M. Nicolas DELCOURT – Maître de conférences des universités, pharmacien hospitalier – Compétences en biochimie et toxicologie clinique

Mme Christine DEMEILLIERS – Maître de conférences des universités – Compétences en toxicologie

M. Erwan ENGEL – Directeur de recherche – Compétences en chimie analytique

M. Jérôme GAY- QUEHEILLARD - Maître de conférences des universités - Compétences en impacts digestifs et métabolisme

M. Petru JITARU – Responsable de Laboratoire – Compétences en chimie analytique

Mme Sonia KHIER – Maître de conférences des universités – Compétences en pharmacocinétique

Mme Emilie LANCE – Maître de conférences des universités – Compétences en écotoxicologie et cyanotoxines

Mme Caroline LANIER – Maître de conférences des universités – Compétences en évaluation des risques sanitaires liés à l'environnement et l'alimentation

Mme Raphaële LE GARREC - Maître de conférences des universités - Compétences en toxicologie

M. Ludovic LE HEGARAT – Chef d'unité adjoint – Compétences en toxicologie

M. Nicolas LOISEAU – Chargé de recherche – Compétences en toxicologie

M. David MAKOWSKI – Directeur de recherche – Compétences en statistiques, modélisation

M. Eric MARCHIONI - Professeur des universités - Compétences en chimie analytique

M. Jean-François MASFARAUD – Maître de conférences des universités – Compétences en transfert de contaminants et écotoxicologie

M. César MATTEI - Maître de conférences des universités - Compétences en toxicologie

M. Alain-Claude ROUDOT - Professeur des universités - Compétences en modélisation mathématique, expologie

M. Yann SIVRY – Maître de conférences des universités – Compétences en chimie analytique

Mme Paule VASSEUR - Professeur des universités, émérite - Compétences en toxicologie

PARTICIPATION ANSES

Coordination scientifique

Mme Marie-Bénédicte PEYRAT – Cheffe de projet – Unité d'Evaluation des risques liés aux aliments – Direction de l'Evaluation des Risques

Mme Nathalie ARNICH – Adjointe au chef de l'unité d'Evaluation des risques liés aux aliments – Direction de l'Evaluation des Risques

M. Thomas MAIGNIEN – Chargé de projets – Unité d'Evaluation des risques liés aux aliments – Direction de l'Evaluation des Risques

Contribution scientifique

Mme Nawel BEMRAH – Cheffe de projets – Unité d'Evaluation des risques liés aux aliments – Direction de l'Evaluation des Risques

M. Mathias LUNGHI – Chargé de projets – Unité d'Evaluation des risques liés aux aliments – Direction de l'Evaluation des Risques

Mme Anne THEBAULT – Cheffe de projets – Unité Méthodologie et Etudes – Direction de l'Evaluation des Risques

Secrétariat administratif

Mme Angélique LAURENT – Service Appui à l'expertise – Direction de l'Evaluation des Risques

AUDITION DE PERSONNALITÉS EXTÉRIEURES

Mme Catherine ESCRIOU – Maître de conférence à Vet Agro Sup

CONTRIBUTIONS EXTÉRIEURES AU(X) COLLECTIF(S)

L'Anses a adressé un questionnaire au réseau des points focaux de l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) le 15 février 2018, auquel 16 Etats membres ont répondu.

Les questions étaient les suivantes :

Have your national agency/authority already conducted a risk assessment on Pinnatoxins for human health?

Would you have any data to share with Anses on Pinnatoxins, Pteriattoxins, Portimine: occurrence in shellfish ? other seafood products? toxicity data *in vitro* or *in vivo*?

Are Pinnatoxins included in your national monitoring for shellfish safety or other kind of survey?

Do you have guidance values for Pinnatoxins in shellfish for human safety?

Data on *Vulcanidinium rugosum* (the producer of these toxins) are also welcome.

SOMMAIRE

Présentation des intervenants	3
1 Contexte, objet et modalités de réalisation de l'expertise	14
1.1 Contexte	14
1.2 Objet de la saisine	14
1.3 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation	14
1.4 Collectes des données	15
1.4.1 Revue bibliographique	15
1.4.2 Données de consommation	15
1.5 Prévention des risques de conflits d'intérêts.	16
2 Identification des dangers	17
2.1 Caractérisation chimique des toxines produites par <i>Vulcanodinium rugosum</i>	17
2.1.1 Caractéristiques structurales et moléculaires	19
2.1.2 Caractéristiques physico-chimiques	21
2.1.3 Métabolisation par les coquillages	21
2.1.4 Conclusion	22
2.2 Méthodes analytiques	22
2.2.1 Inventaire des méthodes de dosage utilisées pour les études d'occurrence citées dans la littérature	22
2.2.1.1 Méthodes biologiques	23
2.2.1.2 Méthodes physico-chimiques	23
2.2.2 Extraction des toxines produites par <i>Vulcanodinium rugosum</i>	24
2.2.2.1 Organismes aquatiques : coquillages, crustacés	24
2.2.2.2 Autres matrices	25
2.2.3 Détection des toxines par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse	25
2.2.3.1 Séparation par chromatographie liquide	25
2.2.3.2 Détection, identification et quantification par spectrométrie de masse	25
2.2.4 Méthodes biochimiques	27
2.2.5 Recommandations du GT pour les méthodes analytiques	29
3 <i>Vulcanodinium rugosum</i>	30
3.1 Morphologie et taxonomie de <i>Vulcanodinium rugosum</i>	32
3.2 Cycle de vie de <i>Vulcanodinium rugosum</i>	33
3.3 Facteurs biotiques influençant la croissance de <i>V. rugosum</i> et la production de toxines	35
3.3.1 Rôle des nutriments azotés	35
3.3.2 Rôle de la température et de la salinité	35
3.4 Autres espèces de phytoplancton susceptibles de produire des pinnatoxines	35

4	Caractérisation du danger lié aux toxines produites par <i>Vulcanodinium rugosum</i>	36
4.1	Toxicité aiguë <i>in vivo</i>	36
4.1.1	Extraits de <i>V. rugosum</i>	36
4.2	Toxicités subchronique et chronique	42
4.3	Toxicité <i>ex vivo</i>	42
4.4	Toxicité <i>in vitro</i>	43
4.4.1	Cytotoxicité	43
4.4.1.1	Pinnatoxines	43
4.4.1.2	Portimine	43
4.4.2	Absorption <i>in vitro</i> / Passage de la barrière intestinale	44
4.5	Mécanistique et cibles cellulaires	44
4.5.1	Rappel : acétylcholine et réseaux cholinergiques	44
4.5.2	Les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine (RnACh)	46
4.5.2.1	Les RnACh neuronaux	46
4.5.2.2	Les RnACh musculaires	47
4.5.3	Cibles physiologiques et moléculaires des PnTX	48
4.6	Elaboration de la valeur sanitaire	48
4.6.1	Choix de l'étude clé	48
4.6.2	Choix de la dose critique	49
4.6.3	Choix des facteurs d'incertitude	50
4.6.4	Proposition de valeur repère aiguë provisoire	51
4.6.5	Proposition de concentration maximale tolérable de PnTX G dans les coquillages	51
4.6.6	Niveau de confiance	51
4.7	Transposition à l'Homme	52
4.7.1	Effets connus des antagonistes nicotiniques médicamenteux et ou toxiques	53
4.7.1.1	Les curares-like	53
4.7.1.2	Les molécules ganglioplégiques	55
4.7.1.2.1	Les médicaments ganglioplégiques	55
4.7.1.2.2	Les molécules naturelles à effets ganglioplégiques	55
4.7.2	Effets connus des antagonistes des récepteurs nicotiniques auto-immun : l'anticorps anti récepteur de l'acétylcholine et la maladie myasthénie	56
4.7.3	Effets connus en central chez l'humain des mutations des récepteurs nicotiniques	56
4.7.4	Effets connus en central et périphérique de l'activation sur la moelle épinière	57
5	Contamination du milieu par <i>Vulcanodinium rugosum</i> et les pinnatoxines	58
5.1	Distribution géographique de <i>Vulcanodinium rugosum</i> et des pinnatoxines	58
5.1.1	Etang d'Ingril	59
5.1.2	Autres lagunes méditerranéennes	62
5.1.3	Cote atlantique et Corse	64
5.1.4	Hors de France	65
5.2	Echantillonneurs passifs	68

6	Exposition alimentaire.....	70
6.1	Données de consommation alimentaire	70
6.1.1	Population générale : INCA3	70
6.1.2	Forts consommateurs de produits de la mer : CALIPSO	70
6.1.3	Consommateurs côtiers de produits de la mer : CONSOMER.....	70
6.2	Données de contamination.....	71
6.3	Hypothèses de calcul des consommations.....	72
6.4	Méthode de calculs de l'exposition	72
6.5	Scénarios testés	73
6.6	Résultats	73
6.6.1	Expositions aiguës et chroniques ($\mu\text{g/kg pc/j}$) associées aux consommations de moules des enfants, issues d'INCA3.....	74
6.6.2	Expositions aiguës et chroniques ($\mu\text{g/kg pc/j}$) associées aux consommations de moules des adultes, issues d'INCA3.....	74
6.6.3	Expositions aiguës et chroniques ($\mu\text{g/kg pc/j}$) associées aux consommations de moules des adultes, issues de CALIPSO (site de Toulon)	75
6.6.4	Expositions aiguës et chroniques ($\mu\text{g/kg pc/j}$) associées aux consommations de moules et de palourdes des adultes, issues de CALIPSO (site de Toulon)	75
6.6.5	Expositions aiguës et chroniques ($\mu\text{g/kg pc/j}$) associées aux consommations de moules des adultes, issues de CONSOMER (zone méditerranéenne)	76
6.6.6	Expositions aiguës et chroniques ($\mu\text{g/kg pc/j}$) associées aux consommations de moules et de palourdes des adultes, issues de CONSOMER (zone méditerranéenne)	76
6.7	Etude de Rambla-Alegre et al. (2018)	77
7	Caractérisation du risque	78
	Conclusions du GT en termes de préoccupation sanitaire	78
8	Recommandations pour la surveillance.....	79
8.1	Surveillance environnementale.....	79
8.2	Veille sanitaire, déclaration et modalités	79
8.2.1	Que signaler ?.....	79
8.2.2	Qui signale ?	80
8.2.3	A qui signaler ?	80
9	Conclusions et recommandations du groupe de travail.....	81
9.1	Existe-t-il des données toxicologiques pour les PnTX et notamment, pour les effets aigus, une DL_{50} reconnue ? Existe-t-il des données pour le risque chronique sous la forme d'une valeur toxicologique de référence (VTR) ?.....	81
9.2	Compte tenu de ces données toxicologiques, et au vu du contexte, existe-t-il une préoccupation de santé publique aux niveaux de contamination identifiés par l'Ifremer dans certaines zones de production conchylicole françaises ?	81

9.3	Quelles modalités de suivi des PnTX dans le milieu marin pourraient être recommandées, en vue d'une prise en compte de ces toxines dans le dispositif de vigilance pour les biotoxines marines lipophiles dans les coquillages piloté par la DGAL ?	82
10	Perspectives de recherche	83
10.1	Améliorer les connaissances sur l'écologie de <i>Vulcanodinium rugosum</i> et l'accumulation de ses toxines dans la chaîne alimentaire	83
10.2	Toxicologie	83
10.2.1	Caractériser le devenir des PnTX après ingestion (ADME).....	83
10.2.2	Mieux caractériser la toxicité des toxines de <i>V. rugosum</i> par administration orale	83
10.2.3	Epidémiologie humaine	84
11	Bibliographie	85
ANNEXES.....		91
Annexe 1 : Lettre de saisine		92
Annexe 2 : Grilles de lecture des études clés identifiées par le GT		95

Sigles et abréviations

BES	Bioessai souris
Da	Dalton
DGAL	Direction générale de l'alimentation
DGS	Direction générale de la santé
DL50	Dose létale à 50%
DTX	Dynophysistoxine
FAT	Fast Acting Toxins
GD	Glande digestive
GT	Groupe de travail
GYM	Gymnodimine
Ifremer	l'Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer (Ifremer)
IP	Intrapéritonéale
LC-MS/MS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem
LC-HRMS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution
PnTX	Pinnatoxine
PtTX	Ptériatoxine
REPHY	Réseau de surveillance du phytoplacton et des phycotoxines
RMN	Résonnance magnétique nucléaire
RnACh	Récepteur nicotonique de l'acétylcholine
RmACh	Récepteur muscarinique de l'acétylcholine
SPATT	Solid phase adsorption toxin tracking (échantillonneur assif)
SPX	Spirolide
VRAP	Valeur repère aiguë provisoire
VTR	Valeur toxicologique de référence

Liste des tableaux

Tableau 1 : Formules moléculaires et masses molaires des PnTX, des PtTX, du spirolide B et du 13-desméthyle spirolide D	26
Tableau 2 : Synthèse des méthodes d'analyse pour la détection des toxines de <i>V. rugosum</i>	28
Tableau 3 : Toxicité <i>in vivo</i> chez la souris d'extraits de cultures de <i>V. rugosum</i>	36
Tableau 4 : Interprétation du score de qualité d'une étude <i>in vivo</i> avec l'outil ToxRTool	38
Tableau 5 : Toxicité aiguë <i>in vivo</i> chez la souris des PnTX et de la portimine	40
Tableau 6 : Résultats de toxicité cellulaire des PnTX	43
Tableau 7 : Résultats de toxicité cellulaire de la portimine	44
Tableau 8 : Létalité et signes cliniques de toxicité chez la souris après administration unique par gavage de PnTX G purifiée (Rapport Anses-Université de Trieste-CNRS 2014)	49
Tableau 9 : Modélisation de la dose-réponse à partir des données de l'étude de toxicité aiguë par voie orale réalisées chez la souris avec de la PnTX G purifiée (Rapport Anses-Université de Trieste-CNRS, 2014)	50
Tableau 10 : Tableau de synthèse pour l'élaboration de la valeur repère aiguë provisoire pour la PnTXG	52
Tableau 11 : Symptômes observés chez la souris et correspondance possible chez l'Homme.....	53
Tableau 12 : Teneurs en PnTX G dans la chair totale de moules d'Ingril, de 2010 à 2017.....	60
Tableau 13 : Teneurs en PnTX G dans la chair totale de moules d'Ingril par mois de 2010 à 2017	61
Tableau 14 : Tableau des comparaisons entre mois selon la méthode de Dunn	61
Tableau 15 : Teneurs en PnTX G dans la chair totale de moules et de palourdes d'Ingril de 2010 à 2012	62
Tableau 16 : Teneurs en PnTX G dans la chair totale de moules prélevées dans différentes lagunes méditerranéennes en 2013	62
Tableau 17 : Tableau de comparaisons entre lagunes, méthode de Dunn	63
Tableau 18 : Teneurs en PnTX dans les coquillages (données de la littérature)	65
Tableau 19 : Contamination moyenne et 95 ^{ème} percentile (P95) pour les moules et les palourdes	71
Tableau 20 : Résumé des populations et scénarios étudiés en fonction des études de consommation.....	73
Tableau 21 : Exposition aiguë - Moules - Enfants - Données INCA3 – en µg/kg pc/j.....	74
Tableau 22 : Exposition chronique - Moules - Enfants - Données INCA3 – en µg/kg pc/j.....	74
Tableau 23 : Exposition aiguë - Moules - Adultes - Données INCA3 – en µg/kg pc/j.....	74
Tableau 24 : Exposition chronique - Moules - Adultes - Données INCA3 – en µg/kg pc/j.....	74
Tableau 25 : Exposition aiguë - Moules - Données CALIPSO – en µg/kg pc/j	75
Tableau 26 : Exposition chronique - Moules - Données CALIPSO – en µg/kg pc/j	75
Tableau 27 : Exposition aiguë - Moules + Palourdes - Données CALIPSO – en µg/kg pc/j.....	75
Tableau 28 : Exposition chronique - Moules + Palourdes - Données CALIPSO – en µg/kg pc/j.....	75
Tableau 29 : Exposition aiguë - Moules - Données CONSOMER – en µg/kg pc/j.....	76
Tableau 30 : Exposition chronique - Moules - Données CONSOMER – en µg/kg pc/j.....	76
Tableau 31 : Exposition aiguë - Moules + Palourdes - Données CONSOMER – en µg/kg pc/j	76
Tableau 32 : Exposition chronique - Moules + Palourdes - Données CONSOMER – en µg/kg pc/j	76

Liste des figures

Figure 1 : Structures chimiques de toxines marines appartenant aux différentes familles d'imines cycliques	18
Figure 2 : Structure chimique des PnTX et des PtTX avec numérotation des carbones de 1 à 35 et des cycles de A à G	19
Figure 3 : Structure des PnTX et PtTX connues	20
Figure 4 : Voies métaboliques des PnTX et des PtTX proposées par Selwood <i>et al.</i> (2010).....	22
Figure 5 : Schéma général des procédures analytiques mises en œuvre pour l'analyse des toxines produites par <i>Vulcanodinium rugosum</i>	24
Figure 6 : Cartes des étangs palavasiens	31
Figure 7 : <i>V. rugosum</i> en microscopie électronique à balayage	32
Figure 8 : Phylogénie de <i>Vulcanodinium rugosum</i> et des espèces apparentées	33
Figure 9 : Proposition de cycle de vie de <i>Vulcanodinium rugosum</i>	34
Figure 10 : Représentation du système cholinergique	45
Figure 11 : Modèle de l'activation des RnACh par le ligand naturel (ACh) et les trois états du canal central	45
Figure 12 : Représentation schématique d'une synapse neuronale cholinergique de mammifère	46
Figure 13 : Principaux RnACh en fonction de leur composition en sous-unités. (A) RnACh neuronaux ganglionnaires et médullo-surréaliens. (B) RnACh neuronaux du SNC.....	46
Figure 14 : Représentations schématiques d'une jonction neuromusculaire de mammifère, en microscopie optique (image du haut), et en microscopie électronique (image du bas).	47
Figure 15 : Allure de la courbe dose-réponse avec le modèle Probit, à partir des données de l'étude de toxicité aiguë par voie orale réalisées chez la souris avec de la PnTX G purifiée (Rapport Anses-Université de Trieste-CNRS, 2014)	50
Figure 16 : Mode d'action des curares non dépolarisants au niveau de la jonction neuromusculaire	54
Figure 17 : Présence rapportée de PnTX et/ou de <i>Vulcanodinium rugosum</i> dans le monde	58
Figure 18 : Teneur en PnTX G dans la chair totale de moule par an de 2010 à 2017	60
Figure 19 : Teneurs en PnTX G dans la chair totale de moules d'ingril par mois de 2010 à 2017	61
Figure 20 : Teneurs en PnTX G dans la chair totale de moules et de palourdes d'Ingril de 2010 à 2012	62
Figure 21 : Teneurs en PnTX G dans la chair totale de moules sauvages en 2013 dans différentes lagunes méditerranéennes	63
Figure 22 : Cartographie des teneurs maximales en PnTX G dans la chair totale de moules sauvages en 2013.....	64
Figure 23 : Teneurs en PnTX G dans les glandes digestives de moules prélevées dans le cadre du suivi EMERGTOX 2018	65
Figure 24 : Concentration en PnTX G d'août 2007 à avril 2009 dans des huîtres de plusieurs sites australiens.....	68

1 Contexte, objet et modalités de réalisation de l'expertise

1.1 Contexte

Dans un rapport de 2012, l'Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer (Ifremer) mettait en évidence la présence de pinnatoxines (PnTX), produites par le dinoflagellé *Vulcanodinium rugosum*, dans des moules de l'étang d'Ingril (Hérault). Les concentrations variaient fortement selon les années (2010, 2011 et 2012), avec un maximum de 1244 µg de PnTX G par kg de coquillages en poids frais en 2010 (rapport Ifremer, septembre 2012, Pinnatoxines en lien avec l'espèce *Vulcanodinium rugosum*). En juillet 2015, une concentration de 1143 µg de PnTX G par kg de coquillages a été rapportée par l'Ifremer.

La présence de ces toxines pourrait expliquer des cas de discordance entre les résultats obtenus par le bioessai sur souris et ceux obtenus par analyse chimique (LC-MS/MS) observés dans les moules de l'étang d'Ingril dans le cadre du dispositif de vigilance pour les biotoxines marines lipophiles dans les coquillages, piloté par la DGAL.

Par ailleurs, des travaux de l'Université de Trieste, menés en collaboration avec le CNRS (Gif-sur-Yvette) et l'Anses (Fougères), ont établi une dose létale à 50% (DL₅₀) d'environ 200 µg/kg pc chez la souris par gavage (rapport Anses-Université de Trieste-CNRS 2014).

1.2 Objet de la saisine

Dans ce contexte, l'Anses a été saisie le 11 janvier 2016 par la Direction générale de l'alimentation (DGAL) et la direction générale de la santé (DGS) afin de répondre aux questions suivantes :

- 1) Existe-t-il des données toxicologiques pour les pinnatoxines et notamment, pour les effets aigus, une DL₅₀ reconnue ? Existe-t-il des données pour le risque chronique sous la forme d'une valeur toxicologique de référence (VTR) ?
- 2) Compte tenu de ces données toxicologiques, et au vu du contexte, existe-t-il une préoccupation de santé publique aux niveaux de contamination identifiés par l'Ifremer dans certaines zones de production conchylicole françaises ?
- 3) Quelles modalités de suivi des pinnatoxines dans le milieu marin pourraient être recommandées, en vue d'une prise en compte de ces toxines dans le dispositif de vigilance pour les biotoxines marines lipophiles dans les coquillages, piloté par la DGAL ?

1.3 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation

L'expertise relève du domaine de compétences du Comité d'experts spécialisé « Evaluation des risques physico-chimiques dans les aliments » (CES ERCA). L'Anses a confié l'instruction de cette saisine au groupe de travail « Pinnatoxines », constitué par décision du 14 novembre 2017 suite à un appel à candidatures.

Les travaux d'expertise du groupe de travail « Pinnatoxines » ont été soumis régulièrement au CES ERCA (tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques) lors des réunions plénières du 15 mars 2018, 18 octobre 2018, 14 décembre 2018, et 25 janvier 2019. Le rapport produit par le groupe de travail tient compte des observations et éléments complémentaires transmis par les

membres du CES et les relecteurs. Les travaux d'expertise ont été adoptés par le CES ERCA le 25 janvier 2019 par l'ensemble des experts présents à l'exception d'un expert, qui s'est abstenu¹.

Ces travaux sont ainsi issus d'un collectif d'experts aux compétences complémentaires.

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

1.4 Collectes des données

1.4.1 Revue bibliographique

Afin de réaliser la recherche bibliographique la plus exhaustive possible concernant les articles traitant de l'analyse des toxines produites par *Vulcanodinium rugosum*, une revue systématique de trois bases de données a été réalisée : Scopus, Pubmed et Web of Science. Après concertation avec l'ensemble des membres du GT afin d'harmoniser le processus de recherche bibliographique, chacune de ces trois bases de données a été interrogée en utilisant la phrase de recherche suivante : « Pinnatoxin* OR Portimin* OR Pteriatoxin* OR Vulcanodinium ». Les champs qui ont été interrogés sont les titres, résumés et mots clés. Cette recherche a permis d'identifier 492 articles. Tous les doublons (360) ont été retirés. L'ensemble des publications trouvées a ensuite été trié sur la base des titres et résumés.

Les articles ont été classés selon les thèmes suivants :

1. *Vulcanodinium rugosum* (écologie, toxicogénèse) : 20 articles
2. Caractérisation des toxines (méthodes analytiques) : 43 articles
3. Toxicité (*in vivo*, *in vitro*...) : 38 articles
4. Contamination (environnement et produits de la mer) : 17 articles
5. Hors sujet (par exemple : synthèse chimique) : 64 articles.

Une mise à jour de la recherche bibliographique a été réalisée en septembre 2018 avec les mêmes mots clés sur les bases de données Scopus et Pubmed et a permis d'identifier 5 publications supplémentaires. Pour les articles portant sur les méthodes analytiques, seules les publications décrivant des méthodes d'analyse d'échantillons prélevés dans le milieu marin ont été conservées. Les articles de revues ont permis de compléter la bibliographie.

Les articles relatifs à la toxicité *in vivo* des pinnatoxines purifiées ont fait l'objet d'une grille de lecture et d'une analyse avec l'outil ToxRTool (détails dans le chapitre 4.1.2).

1.4.2 Données de consommation

Les données de consommation sont issues de 3 études :

- INCA3 : 3^{ème} étude Individuelle Nationale des Consommations Alimentaires (2014-2015) ;
- CALIPSO : réalisée auprès d'individus de plus de 18 ans forts consommateurs de produits de la mer (2006) ;
- CONSOMER : étude de consommation sur les produits de la mer (CONSOMER) (2016-2017).

La description détaillée de ces bases de données de consommation est présentée dans le chapitre 6 « Exposition alimentaire ».

¹ Considérant que son agenda personnel ne lui a pas permis d'assister à plusieurs réunions du CES ERCA au cours desquelles ce dossier a été présenté et débattu, considérant également que la seule lecture des documents communiqués aux membres du CES ne constitue pas, selon cet expert, un socle suffisant pour former un jugement pleinement motivé sur ce dossier, l'expert a jugé opportun de s'abstenir.

1.5 Prévention des risques de conflits d'intérêts.

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise.

Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet de l'agence (www.anses.fr).

En raison de la propriété d'un brevet portant sur la détection des pinnatoxines, M. Jordi Molgó n'a pas été retenu pour être membre du groupe de travail. Compte tenu de ses compétences spécifiques, il a été nommé rapporteur pour contribuer aux travaux relatifs à l'identification et à la caractérisation des dangers. Il n'a pas participé aux échanges ni à l'établissement des conclusions portant sur la surveillance des pinnatoxines et autres toxines apparentées.

Mme Valérie Fessard (Anses, laboratoire de Fougères), membre du groupe de travail « Pinnatoxines », n'a pas été impliquée dans l'étude *in vivo* décrite dans le rapport Anses-Université de Trieste-CNRS 2014.

2 Identification des dangers

Dans le cadre de cette expertise, l'identification des dangers prend en compte les toxines produites par le dinoflagellé *Vulcanodinium rugosum*.

2.1 Caractérisation chimique des toxines produites par *Vulcanodinium rugosum*

En 1990, un composé nommé « pinnatoxine » a été isolé pour la première fois à partir du mollusque bivalve *Pinna attenuata* prélevé en mer de Chine méridionale (Zheng *et al.*, 1990). Cette substance n'avait alors pas pu être caractérisée. Cinq ans plus tard, la pinnatoxine A (PnTX A) a été isolée et sa structure déterminée à partir de la nacre de *Pinna muricata* prélevée sur l'île d'Okinawa au Japon (Uemura *et al.*, 1995). Ce type de toxines a donc été identifié depuis plus de 30 ans et les connaissances sont actualisées dans la littérature notamment dans le cadre d'articles de revue (Gueret *et al.*, 2010 ; Molgo *et al.*, 2007 ; Stivala *et al.*, 2015).

Les PnTX appartiennent au groupe des imines cycliques et macrocycliques qui, à ce jour, comprend 40 molécules, sans prendre en compte les esters acylés produits du métabolisme des coquillages (voir § 2.1.3). Ce groupe inclut différentes familles selon leurs caractéristiques structurales : les prorocentrolides, la spiro-prorocentrimine, les gymnodimines (GYM), les spiroolides (SPX), les pinnatoxines (PnTX) et les pteriatoxines (PtTX), ainsi que la portimine (Figure 1). Les PnTX et PtTX présentent de nombreuses similarités structurales, tandis que, parmi les autres composés, ce sont les spiroolides qui sont structurellement les plus proches des PnTX (voir structure du spiroolide A, Figure 1) (Selwood *et al.*, 2010). Ces molécules ont été retrouvées dans des extraits de plancton et des extraits de coquillages – principalement des mollusques bivalves – mais aussi sous formes estérifiées résultant du métabolisme des toxines par le coquillage via la formation d'acyl esters avec les acides gras (voir § 2.1.3).

Vulcanodinium rugosum est le seul producteur identifié à ce jour des PnTX et de la portimine. Les dinoflagellés *Karenia selliformis*, *Alexandrium ostenfeldii* et *A. peruvianum* ont été décrits comme impliqués dans la biosynthèse des gymnodimines et des spiroolides. Parmi les espèces du genre *Prorocentrum*, *P. lima* et *P. maculosum* sont concernées par la production des prorocentrolides A et B et de la spiro-prorocentrimine (Hu *et al.*, 1996 ; Lu *et al.*, 2001 ; Torigoe *et al.*, 1988).

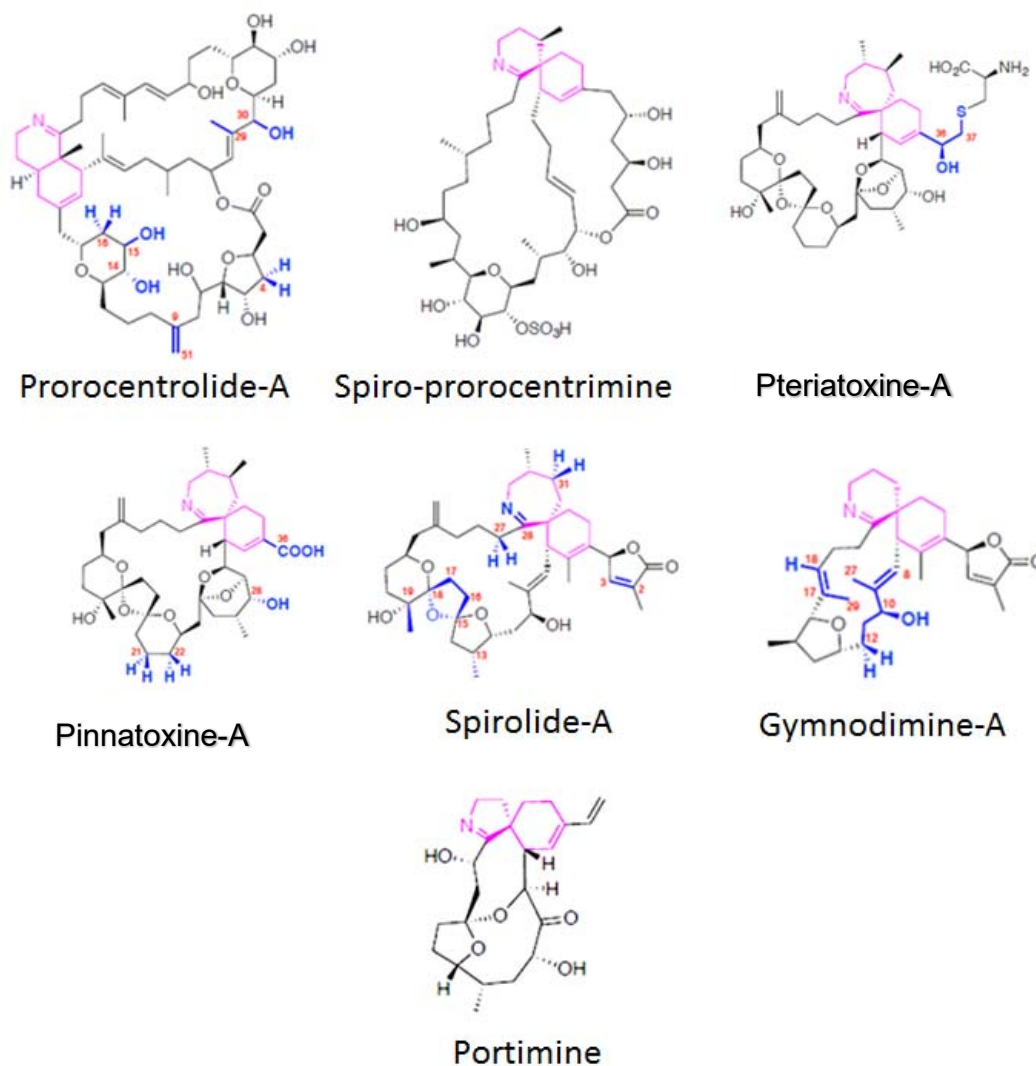


Figure 1 : Structures chimiques de toxines marines appartenant aux différentes familles d'imines cycliques (modifié d'après Molgo *et al.*, 2017)

2.1.1 Caractéristiques structurales et moléculaires

Les PnTX se caractérisent par un squelette central invariant et commun avec 4 radicaux extérieurs variables selon les congénères (R1 à R4, Figure 2). Ce squelette central est une structure macrocyclique amphotérique composée de plusieurs cycles de type 6,7-spiro (cycles A et G), 5,6-bicyclo (cycles E et F pontés) et 6,5,6-trispiro acétaliques (cycles B, C et D) (Takada *et al.*, 2001).

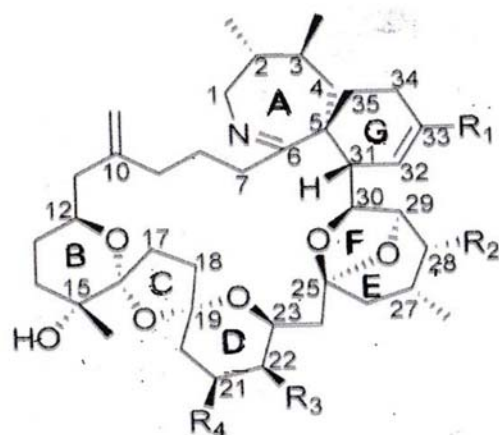


Figure 2 : Structure chimique des PnTX et des PtTX avec numérotation des carbones de 1 à 35 et des cycles de A à G (source Takada *et al.*, 2001)

Les PtTX appartiennent au groupe des PnTX, toutefois elles portent un nom différent pour des raisons historiques : leur isolement et leur caractérisation datent de 2001 et furent réalisés à partir de la chair d'un mollusque bivalve appelé *Pteria penguin* prélevé sur l'île d'Okinawa au Japon sans qu'un lien n'ait pu être établi avec le dinoflagellé producteur à cette époque (Takada *et al.*, 2001).

La liste des différentes PnTX connues à ce jour est rapportée en Figure 3. Les poids moléculaires sont compris entre 712 et 831 Da avec une chaîne carbonée ininterrompue allant de 36 à 39 carbones et quelques ponts diéthers caractéristiques des structures synthétisées par les dinoflagellés. On peut noter que les PnTX B et C sont des diastéréoisomères (carbone C-36). C'est également le cas des PtTX B et C. La PnTX H a été récemment incluse dans cette famille (Selwood *et al.*, 2014). Elle est proche de la PnTX G mais diffère par les trois radicaux de substitution en R2, R3 et R4.

La portimine (Figure 1) a été mise en évidence dans des cultures de *V. rugosum* en Nouvelle Zélande (Selwood *et al.*, 2013). Elle a ensuite été retrouvée dans des souches méditerranéennes de *V. rugosum* (Abadie *et al.*, 2016). Elle est produite en quantité importante par le dinoflagellé. Du fait de sa découverte récente (2013), les données la concernant sont à ce jour très parcellaires.

La fonction imine cyclique est composée d'un cycle à 5 côtés (contre 7 côtés pour les PnTX) et le reste de la molécule n'a pas les mêmes caractéristiques structurales que les PnTX (Figure 1).

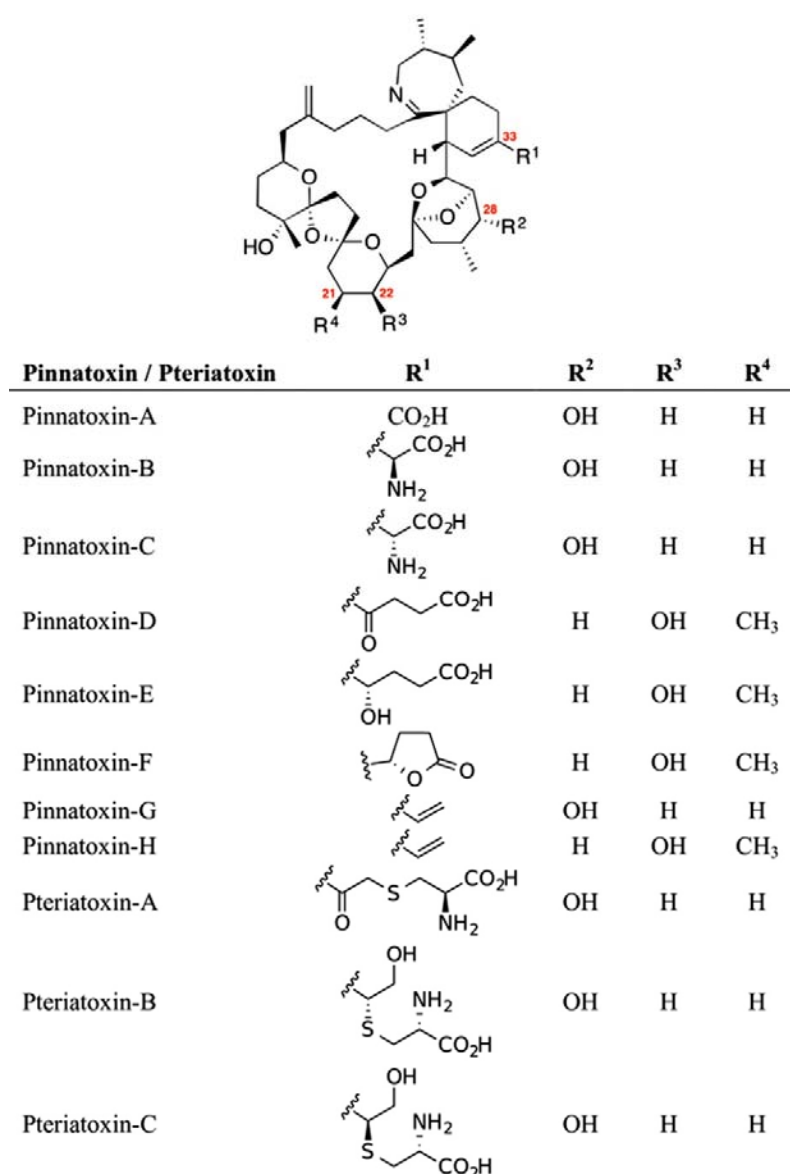


Figure 3 : Structure des PnTX et PtTX connues (source J. Molgó).

Il apparaît probable que la PnTX F soit le précurseur des PnTX D et E et que la PnTX G soit le précurseur à la fois des PnTX A et C et des PtTX A et C, via des transformations métaboliques et hydrolytiques dans les coquillages (Selwood *et al.*, 2010). Il existerait une interconversion possible entre les PnTX E et F, la seconde étant la forme cyclisée de la première.

D'autre part, certaines toxines étant des isomères, il est possible de les confondre en masse. La PnTX G, l'une des principales PnTX, a la même formule chimique (C₄₂H₆₃NO₇) que d'autres imines cycliques, le spirolide B et le 13-desméthylspirolide D (Hess *et al.*, 2013).

2.1.2 Caractéristiques physico-chimiques

Les PnTX sont solubles dans les solvants comme l'acétone, l'isopropanol, ou le méthanol (Zendong *et al.*, 2014). Ce sont des composés amphotères, c'est-à-dire à la fois acides et basiques, donc ionisés, ce qui explique également leur caractère hydrosoluble relatif. Elles présentent aussi des propriétés lipophiles, d'où leur détection lors du bioessai souris pour la recherche de toxines lipophiles. A la différence des spirolides, les PnTX sont des composés chimiques plutôt stables : ils résistent à l'hydrolyse alcaline dans le méthanol aqueux, à 76°C pendant 40 min et à l'HCl aqueux (pH 1,5) à 40°C pendant 24 h (Hess *et al.*, 2013 ; Jackson *et al.*, 2012 ; Rundberget *et al.*, 2011). L'interconversion avec ouverture du cycle imine est possible au laboratoire avec des produits de synthèse (comme la PnTX A de synthèse), mais non confirmée dans des extraits biologiques. Or, l'ouverture du cycle peut avoir des implications du point de vue de la biodisponibilité et de la toxicité d'une telle molécule. Le groupement spiro-imine de la PnTX A est très résistant à l'hydrolyse (Molgó *et al.*, 2016). Cela est confirmé par des expérimentations *in vitro* effectuées dans des conditions permettant d'assurer sa stabilité et aussi par des études *in silico* de modélisation informatique dans l'espace (Jackson *et al.*, 2012). Le fragment spiro-imine semble essentiel pour l'activité de la PnTX A, puisque la forme ouverte amino-cétone dérivée n'a pas d'action sur les différents récepteurs à l'acétylcholine (Molgo *et al.*, 2017).

2.1.3 Métabolisation par les coquillages

Une fois absorbées par les mollusques, certaines toxines marines peuvent subir des réactions métaboliques entraînant une modification de leur structure chimique. Les métabolites ont une toxicité qui peut varier par rapport à leurs précurseurs. Comme évoqué précédemment, l'étude de Selwood *et al.* (2010) s'est intéressée à la possible métabolisation des PnTX et des PtTX dans les coquillages. Cette étude a nécessité l'analyse d'échantillons environnementaux prélevés à Franklin Harbour (Australie) et l'élucidation structurale des toxines par RMN : elle propose que les PnTX B, C, D et les PtTX A, B, C seraient des métabolites issus des précurseurs PnTX E, F et G (Figure 4).

Le métabolisme des mollusques bivalves peut également être responsable d'une estérification de certaines toxines marines au niveau d'un groupement -OH. Ces biotoxines marines subissent ainsi une acylation. Le cas le plus connu est celui de l'acide okadaïque (AO), et des dinophysistoxines 1 et 2 (DTX1 et DTX2). Après métabolisation, elles peuvent former des dérivés acylés, les dinophysistoxines 3 (DTX3). Une hydrolyse alcaline de leur liaison ester permet de libérer le composé parent (en fonction l'AO, la DTX1 et/ou la DTX2).

L'hydrolyse d'un extrait d'huîtres du Pacifique (*Crassostrea gigas*) n'a pas permis de mettre en évidence l'existence de dérivés acylés via la libération de PnTX G. Le même constat a été effectué à partir d'un extrait de moules (*Mytilus edulis*) contenant de la PnTX G (Rundberget *et al.*, 2011). Une seule étude à ce jour a mis en évidence des dérivés acylés des PnTX (McCarron *et al.*, 2012). Plusieurs extraits de moules (*Mytilus edulis*) prélevés sur la côte Est canadienne, dans lesquels la PnTX G a été détectée et quantifiée, ont été hydrolysés : l'augmentation de la teneur en PnTX G d'un facteur proche de 3 a alors été constatée (McCarron *et al.*, 2012). En plus de l'augmentation de l'aire du pic de PnTX G, l'un des extraits hydrolysés a permis de constater la disparition d'une série de pics à des temps de rétention différents lors de l'analyse chromatographique. Ces pics correspondent à des esters d'acyles de la PnTX G. Plusieurs expériences en spectrométrie de masse ont ensuite été menées afin d'obtenir des informations structurales. Plus de 20 esters d'acyles de la PnTX G (28-O-acyl esters) ont ainsi été identifiés avec des chaînes allant de C14 à C24, les esters d'acyles majoritaires étant les suivants : 22:6, 16:0, 16:1, 20:1, 17:0, 18:1 et 20:5. La faible quantité d'échantillon n'a pas permis d'effectuer une élucidation structurale par RMN.

Dans l'étude de Garcia-Altares *et al.* (2014), l'hydrolyse de 3 extraits de moules (*Mytilus galloprovincialis*) a entraîné une augmentation non significative de la teneur en ester d'acyle (environ 20%) bien moindre que celle observée par McCarron *et al.* (2012). Des investigations en spectrométrie de masse n'ont pas permis de mettre en évidence la présence de dérivés acylés de PnTX et donc de confirmer les résultats obtenus en 2012. A ce jour, l'existence de dérivés acylés reste donc à confirmer et leur structure à élucider.

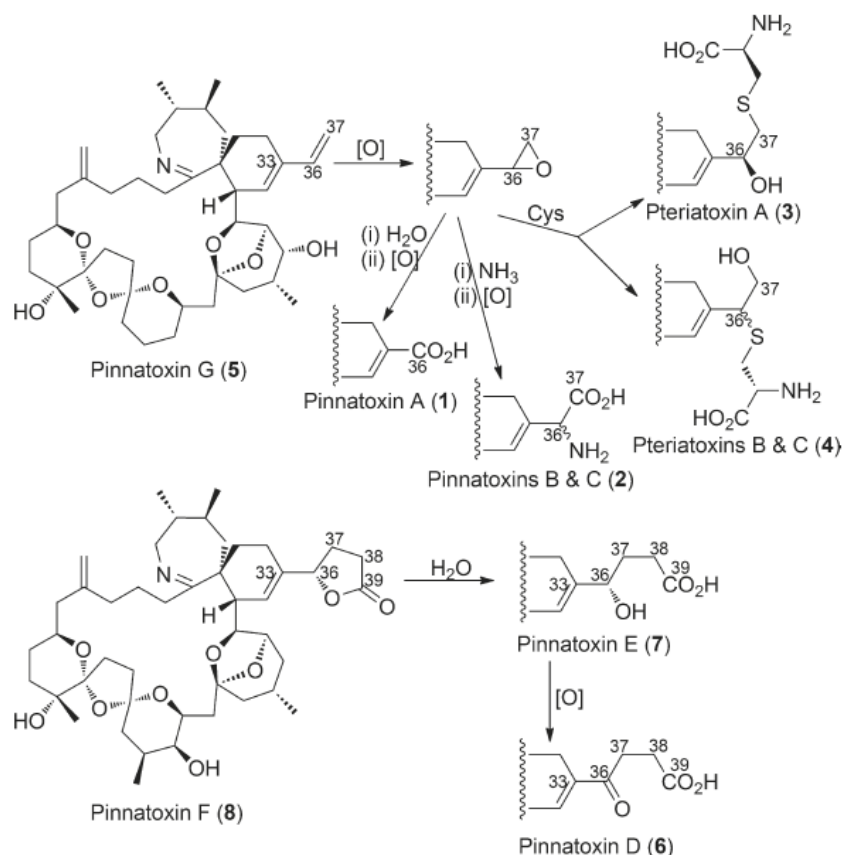


Figure 4 : Voies métaboliques des PnTX et des PtTX proposées par Selwood *et al.* (2010)

2.1.4 Conclusion

S'appuyant sur les coquillages consommés et sur les toxines produites par *Vulcanodinium rugosum*, le GT « Pinnatoxines » a retenu les PnTX, les PtTX et la portimine comme dangers à prendre en compte dans le cadre de cette expertise.

2.2 Méthodes analytiques

2.2.1 Inventaire des méthodes de dosage utilisées pour les études d'occurrence citées dans la littérature

Parmi les différentes méthodes mises en œuvre pour l'analyse des toxines produites par *Vulcanodinium rugosum*, la plupart concerne les PnTX. Il s'agit majoritairement de méthodes physico-chimiques par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). Des méthodes biologiques (bioessais sur souris) ou biochimiques (tests fonctionnels) permettent également l'analyse de ces toxines.

Aucune méthode n'a encore fait l'objet d'une validation inter-laboratoires, ni d'une normalisation. De plus, la faible disponibilité d'étalons de ces toxines (substances de référence) limite et complique leur détection et leur quantification. En effet à ce jour, seules les PnTX A et G sont commercialisées comme solution d'étalonnage et la PnTX G est la seule certifiée (CRM-PnTX G).

2.2.1.1 Méthodes biologiques

En France, de 2003 à 2008, environ 25% des résultats des bioessais sur souris pour les toxines lipophiles n'étaient pas expliqués par les analyses physico-chimiques pour la recherche des toxines réglementées (Belin *et al.*, 2009). A cette époque, 2 méthodes du Laboratoire National de Référence (LNR) « Biotoxines marines » étaient mises en œuvre pour la recherche des biotoxines marines lipophiles dans le cadre des analyses de surveillance. L'une, basée sur les travaux de Yasumoto (Yasumoto *et al.*, 1978, 1984) était appliquée sur glande digestive. L'autre, basée sur les travaux d'Hannah *et al.* (1995) permettait d'effectuer une analyse sur chair totale. Dans les deux cas, le principe de ces méthodes reposait sur une extraction de la prise d'essai à l'acétone suivie d'une séparation liquide/liquide entre le dichlorométhane et l'eau. Après évaporation de la phase organique, le résidu est repris dans une solution de Tween 60 à 1%. L'extrait de glande digestive ou de chair totale est ensuite injecté par voie intrapéritonéale à 3 souris. Le test était déclaré positif si au moins 2 souris sur 3 mouraient dans les 24h suivant l'injection. Il s'agissait de méthodes d'analyses qualitatives globales ne permettant pas d'identifier la nature des éventuelles toxines présentes dans l'échantillon. De par le solvant organique moyennement polaire utilisé - l'acétone - ces méthodes possèdent une forte capacité à extraire les composés liposolubles. Des investigations menées par l'Ifremer (combinant à la fois analyses par bioessais sur souris et par LC-MS/MS) sur l'étang d'Ingril entre 2006 et 2013 ont permis d'identifier pour la première fois en France la PnTX G comme toxine responsable des résultats positifs dans les bioessais (Hess *et al.*, 2013).

Une autre méthode par bioessai sur souris a montré son efficacité pour la détection des PnTX. Elle est inspirée de celle d'Hannah *et al.* (1995). Cette méthode, qui utilise également l'acétone comme solvant d'extraction, a été adaptée par McNabb *et al.* (2012) afin d'obtenir un résultat quantitatif. La comparaison des résultats obtenus avec les résultats d'analyses par LC-MS/MS a permis de mettre en évidence l'existence d'une corrélation significative.

Le bioessai sur souris présente l'avantage de mesurer une toxicité globale basée sur la réponse biologique de l'animal, d'être simple à mettre en œuvre, de ne pas nécessiter de lourds investissements. Toutefois, la mise en œuvre du bioessai sur souris nécessite une certaine expertise et des autorisations d'expérimentation animale. Cette méthode est particulièrement décriée pour des raisons éthiques (règle des 3R : réduire, raffiner, remplacer) (Hess *et al.*, 2006). En 2010 (1^{er} janvier), un changement majeur dans la stratégie de surveillance réglementaire des toxines lipophiles est intervenu au niveau national, avec le remplacement des méthodes d'analyses par bioessai sur souris par une analyse chimique en LC-MS/MS (DGAL 2009). Un an plus tard, les tests par bioessai sur souris, qui étaient jusqu'ici définis dans la réglementation européenne comme méthode de référence pour l'analyse des toxines lipophiles, ont été remplacés par la méthode chimique (Règlement UE n° 15/2011). Toutefois, les bioessais sur souris ont été conservés jusqu'au 31 décembre 2017 dans le cadre de la veille d'urgence visant à détecter de nouvelles biotoxines marines dans les coquillages.

2.2.1.2 Méthodes physico-chimiques

La figure 5 présente le schéma général de l'analyse des toxines produites par *Vulcanodinium rugosum* selon les différentes procédures décrites dans la littérature. Pour la portimine, il n'y a pas encore de méthode d'analyse décrite dans la littérature.

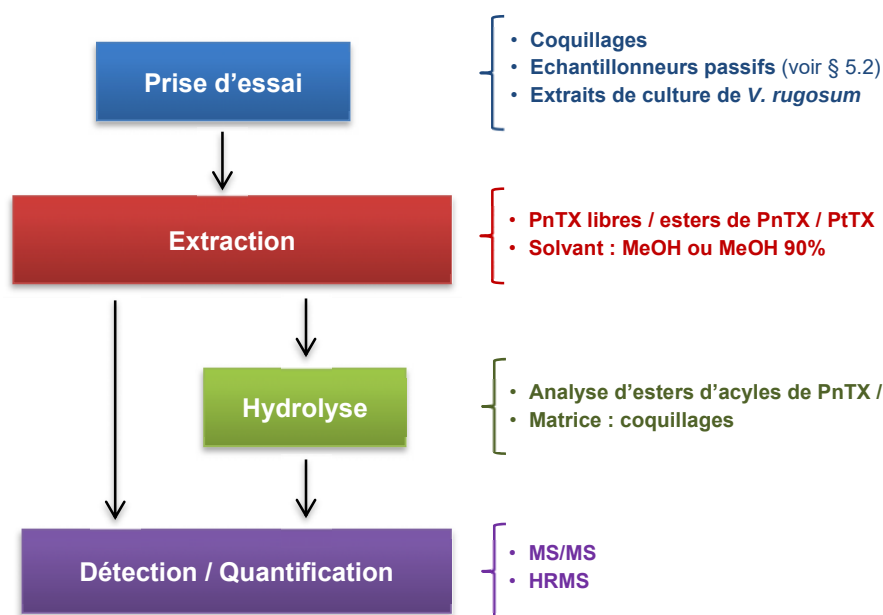


Figure 5 : Schéma général des procédures analytiques mises en œuvre pour l'analyse des toxines produites par *Vulcanodinium rugosum*

2.2.2 Extraction des toxines produites par *Vulcanodinium rugosum*

2.2.2.1 Organismes aquatiques : coquillages, crustacés

La procédure opérationnelle normalisée du Laboratoire de Référence de l'Union Européenne (LRUE - Vigo, Espagne) pour le dosage des biotoxines marines lipophiles dans les mollusques par LC-MS/SM est la méthode de référence européenne, mise en œuvre dans le cadre du contrôle officiel pour l'analyse des toxines lipophiles réglementées. Cette méthode a fait l'objet d'une validation inter-laboratoires (Villar-Gonzalez *et al.*, 2011). Bien que les PnTX n'aient pas été prises en compte lors de cette validation, plusieurs auteurs l'ont utilisé pour l'analyse de ces toxines (Darius *et al.*, 2018 ; Hess *et al.*, 2013 ; McCarron *et al.*, 2012 ; Zendong *et al.*, 2015). Le principe de cette méthode repose sur une double extraction d'une prise d'essai de 2 g de chair totale avec du méthanol (MeOH). Après centrifugation et collecte des surnageants dans une fiole de 20 mL, cette dernière est complétée jusqu'au trait de jauge. L'extrait est ensuite filtré.

Des variantes ont été apportées à ce protocole par d'autres équipes. En se basant sur la méthode de Gerssen *et al.* (2009), initialement mise au point pour l'analyse des toxines lipophiles réglementées, on procède à une triple extraction au méthanol (MeOH) d'une prise d'essai de 1 g de chair totale avec un ajustement ultérieur dans une fiole à 10 ml (Garcia-Altares *et al.*, 2014 ; Li *et al.*, 2016 ; Rambla-Alegre *et al.*, 2018 ; Rundberget *et al.*, 2011).

D'autres équipes ont préféré opter pour l'utilisation comme solvant d'extraction d'un mélange MeOH/H₂O (90:10, v/v) (McNabb *et al.*, 2012 ; Selwood *et al.*, 2010 ; Zendong *et al.*, 2014).

Concernant l'analyse des dérivés acylés des PnTX, les protocoles d'extraction mis en œuvre sont généralement basés sur celui mis au point par Mountfort *et al.* (2001) pour l'analyse des DTX3. Il s'agit d'un protocole repris dans la méthode de référence européenne et appliqué aux analyses de contrôle officiel des toxines lipophiles réglementées. De la soude (NaOH) 2,5 M est ajoutée à un aliquot de l'extrait obtenu à l'issue de l'extraction. Le mélange est chauffé pendant 40 min à 76°C. L'extrait est ensuite neutralisé avec de l'acide chlorhydrique (HCl) 2,5 M avant d'être filtré. Le rapport volumétrique « Extrait / NaOH 2,5M / HCl 2,5M » est de 1 / 0,125 / 0,125. Quelques auteurs ont opté pour des protocoles légèrement différents. Rundberget *et al.* (2011) ont préféré employer de la soude à la place de l'hydroxyde de potassium (KOH) et le rapport volumétrique « Extrait /

KOH 2,5M / HCl 2,5M » appliqué est de 1 / 0,250 / 0,260. McNabb *et al.* (2012) ont opté pour l'utilisation d'acide acétique plutôt que de l'acide chlorhydrique.

2.2.2.2 Autres matrices

De nombreux auteurs se sont intéressés à la production de PnTX par *Vulcanodinium rugosum*. Très souvent, des analyses en Lc-MS/MS ont été effectuées à partir de cultures de micro-algues. Dans la majorité des cas, le milieu de culture est centrifugé et le culot est extrait avec du méthanol à 2 ou 3 reprises. L'extrait est ensuite filtré avant d'être injecté (Abadie *et al.* 2015, 2016 ; Geiger *et al.*, 2013 ; Rhodes *et al.*, 2010 ; Zeng *et al.*, 2012). En 2014, Garrett *et al.* ont mis en œuvre un protocole sensiblement différent. Les cellules ont été récoltées du milieu de culture avec une pipette avant d'être congelées pendant 72h puis extraites à 2 reprises avec du méthanol.

Selwood *et al.* (2010) se sont également intéressés à l'analyse des PnTX dans de l'eau et des sédiments. Les échantillons d'eau ont été filtrés successivement à travers des filets à plancton de 45 µm puis de 20 µm. Les différentes fractions obtenues ont ensuite été centrifugées. Le culot a été extrait avec du MeOH par ultrasonication puis centrifugé avant analyse. Pour les sédiments, le protocole d'extraction appliqué est très proche de celui mis en œuvre pour la préparation d'échantillons de coquillages. L'extraction par Ultra-turrax a été remplacée par une extraction par vortex.

2.2.3 **Détection des toxines par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse**

2.2.3.1 Séparation par chromatographie liquide

En raison des caractéristiques lipophiles des toxines produites par *Vulcanodinium rugosum*, leur séparation chromatographique est systématiquement effectuée par chromatographie liquide en phase inverse avec des colonnes greffées en C8 ou C18. Compte tenu des propriétés physico-chimiques de ces toxines, le pH des phases mobiles utilisé peut-être acide ou basique. La méthode de référence pour le dosage des biotoxines marines lipophiles réglementées dans les mollusques par Lc-MS/MS, laisse la possibilité de choisir entre ces 2 types de conditions. Les conditions acides proposées sont les suivantes :

- Phase mobile A : H₂O, 50 mM acide formique, 2 mM formiate d'ammonium
- Phase mobile B : 95% ACN, 5% H₂O, 50 mM acide formique, 2 mM formiate d'ammonium.

Ces conditions ont été reprises par plusieurs auteurs pour la détection et la quantification des PnTX (Hess *et al.*, 2013 ; McCarron *et al.*, 2014 ; Zendong *et al.*, 2015)

Parmi les compositions de phases mobiles basiques proposées dans la méthode de référence, figurent celles optimisées par Gerssen *et al.* (2009) :

- Phase mobile A : H₂O, 6,7 mM d'ammoniaque
- Phase mobile B : ACN/ H₂O 90/10 (v:v), 6,7 mM d'ammoniaque.

Ces conditions permettent d'obtenir une séparation chromatographique satisfaisante (Garcia-Altares *et al.*, 2014 ; McCarthy *et al.*, 2015 ; Rambla-Alegre *et al.*, 2018 ; Rundberget *et al.*, 2011). D'autres auteurs ont fait le choix de conditions acides sensiblement différentes (Geiger *et al.*, 2013 ; Li *et al.*, 2016 ; McCarron *et al.*, 2014). La phase mobile A est seulement constituée d'eau. La phase mobile B reste identique à celle définie dans la procédure opérationnelle normalisée. Enfin dans plusieurs travaux, seul de l'acide acétique ou formique à 0,1% est ajouté à la phase aqueuse et/ou organique (Abadie *et al.*, 2018 ; Garrett *et al.*, 2014 ; Rhodes *et al.*, 2010 ; Zendong *et al.*, 2014).

2.2.3.2 Détection, identification et quantification par spectrométrie de masse

La détection, l'identification et la quantification physico-chimiques des toxines produites par *Vulcanodinium rugosum* s'effectuent en couplant la CL à la spectrométrie de masse. La LC-MS/MS

a l'avantage de permettre une analyse spécifique des toxines dans des matrices biologiques pouvant contenir des composés interférents qui possèdent un temps de rétention très proche des toxines d'intérêt et qui pourraient générer des faux-positifs ou des surestimations de concentrations.

Deux catégories d'instruments sont utilisées :

- Les spectromètres de masse triples quadripôles (QQQ) ou hybride quadripôle/piège à ions quadripolaire (QTrap). Un mode de balayage Multiple Reaction Monitoring (MRM) est alors choisi. L'ion parent à étudier est sélectionné par le premier analyseur puis fragmenté dans la cellule de collision. Le second analyseur est focalisé sur l'ion produit. Ce mode de balayage permet d'obtenir une sensibilité élevée par rapport à d'autres modes, ce qui en fait un mode de choix pour la quantification. De plus, la MRM offre une double sélectivité due à la sélection de l'ion parent et de l'un de ses ions produits. Toutefois, cela n'est pas toujours suffisant pour garantir une identification correcte de certaines PnTXs. Plusieurs auteurs ont fait le choix de la transition m/z 694 $[M+H]^+$ /164 pour la détection de la PnTX G. Or, cette transition est partagée avec le 13-desmethyl spiroside D. La transition m/z 694 $[M+H]^+$ /676 (perte d'eau) a parfois également été choisie. Cette transition est commune avec le spiroside B et le 13-desmethyl spiroside D. Ces 2 transitions ne sont donc pas spécifiques et, comme il n'existe pas de standard pour ces analogues de spiroside, il est impossible de savoir si elles sont coélues avec la PnTX G. Toutefois, l'utilisation d'une ou de plusieurs autres transitions spécifiques de la PnTX G et le contrôle de leurs ratios d'ions peut permettre d'augmenter le niveau de confiance dans l'identification de cette toxine (Garcia-Altares *et al.*, 2014 ; Geiger *et al.*, 2013 ; Li *et al.*, 2016 ; McCarron *et al.*, 2012, 2014 ; McCarthy *et al.*, 2015). Il est également possible de compléter l'acquisition MRM par une acquisition MS/MS. Le spectre obtenu peut alors permettre de confirmer l'identité des toxines via la comparaison avec des spectres de masses de référence, répertoriés dans une librairie (McCarron *et al.*, 2012, 2014 ; Rhodes *et al.*, 2011 ; Rundberget *et al.*, 2011 ; Selwood *et al.*, 2010).

Tableau 1 : Formules moléculaires et masses molaires des PnTX, des PtTX, du spiroside B et du 13-desmethyl spiroside D (source : Garcia-Altares *et al.*, 2014 ; Selwood *et al.*, 2013 ; Gates, 2015)

Toxines	Formule moléculaire	Ion précurseur $[M+H]^+$ (m/z)	Fragments issus de pertes d'eau (m/z)	Fragments de carbocycles
Pinnatoxine A	$C_{41}H_{61}NO_9$	712,4419	694, 676, 658	458, 440, 432, 249, 230, 206, 177, 164
Pinnatoxine B	$C_{42}H_{64}N_2O$	741,4707	/	697, 668, 458, 432, 320, 258, 220, 177, 164
Pinnatoxine C	$C_{42}H_{64}N_2O$	741,4707	/	697, 668, 458, 432, 320, 258, 220, 177, 164
Pinnatoxine D	$C_{45}H_{67}NO_{10}$	782,4845	764, 746, 728, 710	488, 470, 452, 446, 230, 220, 206, 177, 164
Pinnatoxine E	$C_{45}H_{69}NO_{10}$	784,5008	766, 748, 730, 712	488, 470, 452, 446, 230, 220, 206, 177, 164
Pinnatoxine F	$C_{45}H_{67}NO_9$	766, 4889	748, 730, 712, 694	488, 470, 452, 446, 230, 220, 206, 177, 164
Pinnatoxine G	$C_{42}H_{63}NO_7$	694,4677	676, 658, 640	572, 458, 440, 342, 258, 220, 206, 164
Ptériatoxine A	$C_{45}H_{70}N_2O_{10}S$	831,4824	342, 258, 230	787, 744, 694, 542, 458, 320, 220, 177, 164

Toxines	Formule moléculaire	Ion précurseur [M+H] ⁺ (m/z)	Fragments issus de pertes d'eau (m/z)	Fragments de carbocycles
Ptériatoxine B	C ₄₅ H ₇₀ N ₂ O ₁₀ S	831,4824	342, 258, 230	787, 744, 712, 710, 542, 458, 320, 177, 164
Ptériatoxine C	C ₄₅ H ₇₀ N ₂ O ₁₀ S	831,4813	342, 258, 230	787, 744, 712, 710, 542, 458, 320, 177, 164
Portimine	C ₂₃ H ₃₁ NO ₅	402,2267	/	/
Spirolide B	C ₄₂ H ₆₄ NO ₇	694,4677	676, 658, 640	444, 426, 150, 95
13-desméthyle spirolide D	C ₄₂ H ₆₄ NO ₇	694,4677	676, 658, 640	446, 428, 206, 164

- Les spectromètres de masse haute résolution de type Orbitrap ou quadripôle/temps de vol (Q-TOF). Ces détecteurs peuvent être utilisés pour effectuer une analyse quantitative (McCarthy *et al.*, 2015 ; Rambla-Alegre *et al.*, 2018 ; Zendong *et al.*, 2014 ; Zendong *et al.*, 2015). La haute résolution présente également un grand intérêt comme technique de confirmation en complément d'une analyse MRM en QQQ ou QTrap (Garcia-Altares *et al.*, 2014 ; Hess *et al.*, 2013 ; McCarron *et al.*, 2012). Là encore, la distinction en mode full scan entre la PnTX G, le spirolide B et le 13-desméthyle spirolide D est impossible puisque ces toxines ont toutes la même formule moléculaire et donc le même ion moléculaire (m/z 694,4677 [M+H]⁺) (Garcia-Altares *et al.*, 2014). Néanmoins, une acquisition des spectres SM/SM est très souvent mise en œuvre afin de confirmer l'identité des toxines (Hess *et al.*, 2013 ; McCarron *et al.*, 2012, 2014 ; Rambla-Alegre *et al.*, 2018 ; Zendong *et al.*, 2015).

Comparées aux autres techniques d'analyses, les méthodes par LC-MS/MS et LC-HRMS présentent l'avantage d'être particulièrement sensibles. Les limites de détection sont généralement comprises entre 0,09 à 0,5 µg/kg et les limites de quantification entre 0,9 et 3,0 µg/kg (Hess *et al.*, 2013 ; McCarron *et al.*, 2012, 2014 ; Rambla-Alegre *et al.*, 2018 ; Zendong *et al.*, 2015).

Les taux de récupération (rendement d'extraction) observés pour la PnTX G à partir d'un échantillon de moules supplémenté sont compris entre 78 et 94% (Garcia-Altares *et al.*, 2014 ; McCarron *et al.*, 2014). Sur la matrice huître, un taux de récupération de 67% a été obtenu par (Garcia-Altares *et al.*, 2014). Les résultats présentés ne sont pas corrigés par les taux de récupération.

- Point de vigilance

Les études de passage de la barrière intestinale des PnTX pures à l'aide de modèles cellulaires *in vitro* ont soulevé des difficultés pour le dosage de certaines PnTX et en particulier de la PnTX A par LC-MS/MS dans le milieu utilisé pour ces essais (Rapport Anses-Université de Trieste-CNRS, 2014). Il n'est pas établi pour le moment si les problèmes rencontrés sont dus à des interactions des toxines avec le milieu utilisé (Hanks Balanced Sodium salt), avec le matériel plastique utilisé pour la culture cellulaire ou bien à d'autres effets.

2.2.4 Méthodes biochimiques

L'interaction sélective des PnTX avec les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine (RnCh) a conduit à la mise au point de méthodes dites fonctionnelles. Le « Microplate Receptor Binding Assay » ou « Microtiter Plate Receptor Binding Assay » est un test d'inhibition basé sur la compétition entre l'α-bungarotoxine et les PnTX (A et G) pour se lier aux récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine immobilisés sur des plaques. Ces récepteurs sont obtenus via l'isolement d'électrocytes présents dans les membranes de l'organe électrique de *Torpedo marmorata*.

L'extrait à tester et la biotine- α -bungarotoxine sont mis à incuber avec les RnACh. Les PnTX sont alors en compétition avec la biotine- α -bungarotoxine pour les sites de liaison. Après une étape de lavage, une solution de streptavidin-HRP (Horse Radish Peroxidase) est incubée afin de faciliter la détection des PnTX. Après une seconde étape de lavage, un substrat chromophore est ajouté. Un lecteur de microplaque permet ensuite la détection des PnTX (longueur d'onde $\lambda = 450$ nm).

Cette méthode a été appliquée à des échantillons d'eau et de coquillages (moules, huîtres, coquilles Saint-Jacques, coques). Les performances obtenues par Rubio *et al.* (2014), sont très satisfaisantes en termes de justesse et de fidélité. Araoz *et al.* (2012) se sont intéressés à la sensibilité de cette méthode pour l'analyse pour ces mêmes espèces de coquillages. Bien que les limites de quantification soient plus élevées que celles obtenues avec des méthodes chimiques, elles restent tout à fait acceptables (PnTX G : 2,2 $\mu\text{g/kg}$ (LOQ), PnTX A : 7,2 $\mu\text{g/kg}$ (LOQ)). Cette méthode présente l'avantage d'être simple, rapide (détection à haut débit), et peu coûteuse. Elle permet de détecter d'autres toxines agissant sur les RnACh dont certaines cyanotoxines (anatoxine A et homoanatoxine-A) et plusieurs autres imines cycliques (spiroïdes, gymnodimines) (Araoz *et al.*, 2012). Toutefois, cette méthode ne permet pas de distinguer les PnTX de ces autres toxines. Compte tenu de ce manque de spécificité, une analyse de confirmation en LC-MS/MS reste indispensable.

Tableau 2 : Synthèse des méthodes d'analyse pour la détection des toxines de *V. rugosum*

Type de méthode	Sensibilité et rendement d'extraction	Avantages	Inconvénients
Méthode biologique : Bioessai sur souris	Limite de détection (EFSA, 2010a) : 13 à 40 $\mu\text{g/kg}$ de chair de coquillages	- Mesure de la toxicité globale basée sur la réponse biologique de l'animal - Facile à mettre en œuvre - Faible coût de l'équipement	- Méthode qualitative - Manque de spécificité, cette méthode ne permet pas d'identifier les PnTX - Raisons éthiques (règle des 3R) - Absence de validation inter-laboratoires pour les PnTX
Méthodes chimiques : LC-MS/MS & LC-HRMS	Sensibilité (Hess <i>et al.</i> , 2013 ; McCarron <i>et al.</i> , 2012, 2014 ; Rambla-Alegre <i>et al.</i> , 2018 ; Zeng <i>et al.</i> , 2015) : Limite de détection : 0,09 à 0,5 $\mu\text{g/kg}$ de chair de coquillages Limite de quantification : 0,9 à 3 $\mu\text{g/kg}$ de chair de coquillages Rendement d'extraction pour la PnTX G (García-Altares <i>et al.</i> , 2014 ; McCarron <i>et al.</i> , 2014) : Moules : 78% à 94% Huîtres : 67%	- Spécificité élevée de par la séparation chromatographique des toxines et la détection par spectrométrie de masse - Très bonne sensibilité	- Coût de l'équipement et personnel qualifié - Absence de validation inter-laboratoires pour les PnTX - Disponibilité des standards (seules les PnTX A et G sont commercialisées comme solution d'étalonnage) - La spécificité en spectrométrie de masse peut être un point critique pour certaines toxines : une confusion est possible entre la PnTX G et le spiroïde B ou le 13-desméthyle spiroïde D dans certaines conditions (co-élution de ces toxines et absence de transition ou de méthodes de confirmation)
Méthode biochimique : test de liaison aux récepteurs nicotiniques de l'écétylcholine (RnACh)	Limite de quantification : 2,2 à 7,2 $\mu\text{g/kg}$ de chair de coquillages (Araoz <i>et al.</i> , 2012) Rendement d'extraction (PnTX A, coquillages) : 82% (Rubio <i>et al.</i> , 2014)	- Facile à mettre en œuvre - Faible coût de l'équipement - Méthode rapide	- Absence de validation inter-laboratoires pour les PnTX - Manque de spécificité, cette méthode ne permet pas d'obtenir d'informations sur les analogues de PnTX présents, elle ne permet pas non plus de distinguer les PnTX des autres composés qui agissent aussi sur les RnACh.

2.2.5 Recommandations du GT pour les méthodes analytiques

Les méthodes mises en œuvre pour l'analyse des PnTX n'ont pas toutes le même niveau de fiabilité. Le GT recommande de prendre en compte les critères suivants pour les méthodes par LC-MS/MS :

- la mention du temps de rétention permettant d'attester la séparation des toxines ;
- le suivi des transitions spécifiques des toxines afin de les différencier les unes des autres ;
- l'utilisation d'au moins une transition de confirmation en mode de scan MRM ou la mise en œuvre d'une méthode de confirmation ;
- la mention des limites de détection et/ou de quantification dans la matrice ;
- la mention du rendement d'extraction ;
- le ratio d'ions, élément optionnel mais qui permet de conforter l'identification des toxines ;
- D'autres critères quantitatifs optionnels confortant la confiance dans la démarche analytique tels que la présence d'informations concernant le domaine de linéarité, la fidélité, la spécificité, l'étude des effets matrice, etc.

3 *Vulcanodinium rugosum*

Vulcanodinium rugosum est le dinoflagellé producteur de PnTX identifié par l'Ifremer en 2009, à partir d'échantillons d'eau d'Ingril. Il s'agit d'une nouvelle espèce appartenant à un nouveau genre (Nézan et Chomérat 2011).

En 2009, des scientifiques néo-zélandais avaient isolé un dinoflagellé producteur de neurotoxines (PnTX E et F) à partir d'échantillons d'eau du port de Rangaunu, mais ils ne l'avaient pas identifié. La toxicité de ces neurotoxines avait été démontrée chez la souris (Rhodes *et al.*, 2010).

L'origine de l'identification de ce dinoflagellé en France repose sur une situation atypique survenue en 2006, dans le cadre de la surveillance officielle des zones de production des coquillages (http://enviit.ifremer.fr/infos/rephy_info_toxines). Le bioessai sur souris pour la recherche de toxines lipophiles avait révélé des effets neurotoxiques, après l'injection d'extraits de moules de l'étang d'Ingril (mer Méditerranée, à l'est de l'étang de Thau, Hérault – Figure 6). Ce fait est inhabituel car les effets observés pour les toxines lipophiles sont diarrhéiques, pas neurotoxiques. Cette neurotoxicité n'a pas pu être expliquée par la présence de toxines réglementées (ASP², PSP³, DSP⁴) recherchées par analyse chimique. De plus, les observations des échantillons d'eau n'ont pas permis d'identifier d'espèces de micro-algues connues comme productrices de neurotoxines.

Depuis l'identification de *V. rugosum* en 2009, des concentrations élevées en PnTX sont mesurées dans les moules de la lagune d'Ingril chaque année pendant plusieurs mois. Pour autant, *V. rugosum* est rarement détecté dans les prélèvements d'eau réalisés dans le cadre de la surveillance (dans la colonne l'eau), ce qui peut s'expliquer par le caractère benthique de ce dinoflagellé. Il est important de signaler que l'étang d'Ingril est physiquement relié à l'étang de Thau (4^{ième} zone ostréicole de France) par l'intermédiaire du canal du Rhône à Sète.

La carte des lagunes palavasiennes est présentée dans la figure 6.

Situées à l'interface entre mer et bassins versants, les lagunes côtières ont été décrites comme des réservoirs d'une très grande biodiversité (Cognetti et Maltagliati, 2000 ; Costanza *et al.*, 1998). Ces écosystèmes jouent un rôle de filtre et de tampon en piégeant une large fraction des apports naturels ou anthropiques issus des bassins versants. Un accroissement des forçages physiques, chimiques et biologiques y est partout constaté : les lagunes côtières font partie des zones les plus sensibles et les plus durement touchées par l'anthropisation (PNUE 2007). Zones d'interface et de transition, les écosystèmes lagunaires sont l'objet de nombreuses contraintes d'origine anthropique, associées à la richesse et à la diversité des potentialités qu'ils offrent. Les zones côtières et donc les espaces lagunaires sont des zones fortement urbanisées et qui font face à un accroissement constant de population. Cette anthropisation importante affecte parfois le fonctionnement écologique de ces milieux par l'apport de rejets urbains ou agricoles mal maîtrisés (phénomène d'eutrophisation, contamination chimique industrielle). Depuis quelques années, de nombreuses études sont menées pour évaluer l'impact des changements globaux sur le fonctionnement de ces écosystèmes sensibles.

Les lagunes sont souvent présentées comme des écosystèmes fortement producteurs de phytoplancton, de 200 à 400 g de carbone par m² et par an selon Nixon (1981) et qui subissent d'importantes fluctuations environnementales. Par leur fonctionnement particulier, elles sont régulièrement confrontées à des épisodes d'efflorescences de phytoplancton pouvant inclure des espèces de dinoflagellés toxiques qui affectent les usages de ces milieux. Ce phénomène mondial impacte les côtes européennes ainsi que les espaces côtiers méditerranéens (Penna *et al.*, 2005 ; Sournia *et al.*, 1992).

² ASP : Amnesic shellfish poisoning, toxines amnésiantes, acide domoïque

³ PSP : Paralytic shellfish poisoning, toxines paralysantes de la famille de la saxitoxine

⁴ DSP : Diarrhetic Shellfish Poison, toxines diarrhéiques de la famille de l'acide okadaïque.

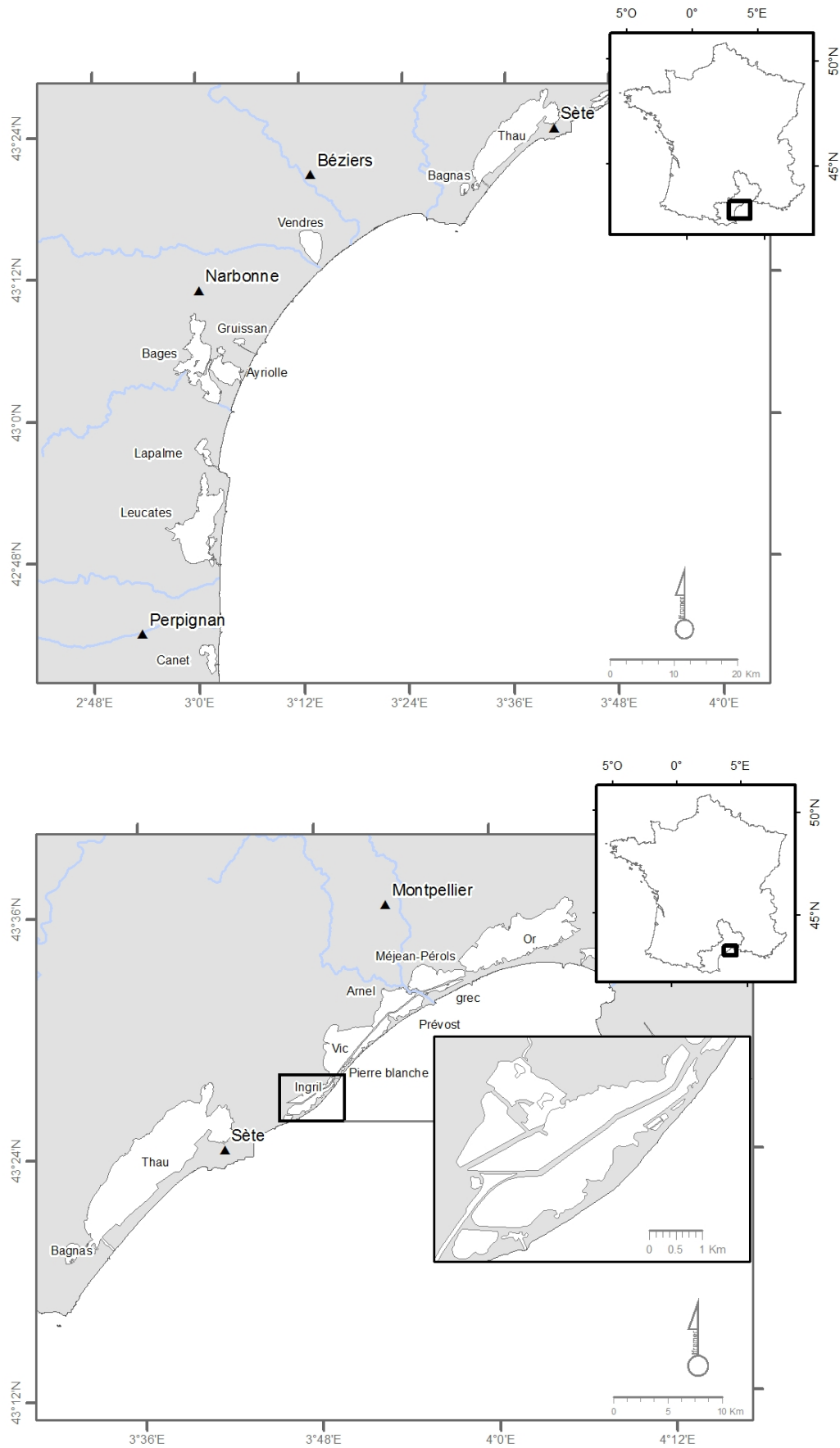
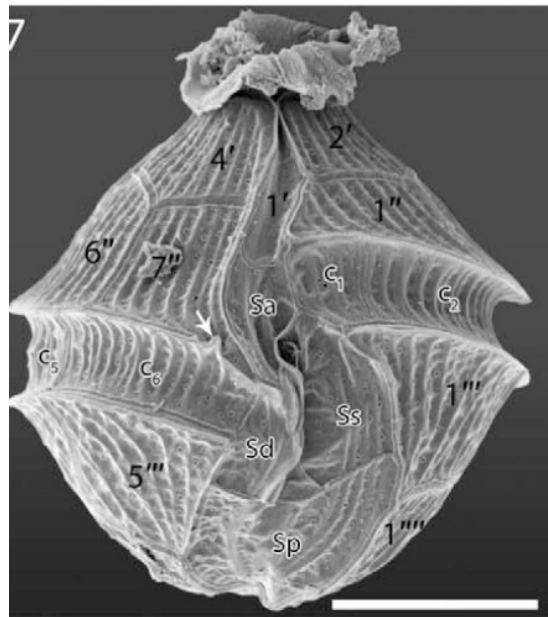


Figure 6 : Cartes des étangs palavasiennes (Abadie et al., 2016)

3.1 Morphologie et taxonomie de *Vulcanodinium rugosum*

Pour parvenir à l'identification de cette nouvelle espèce, *Vulcanodinium rugosum*, Nézan et Chomérat (2011) ont effectué des études morphologique et phylogénétique. L'étude morphologique a mis en évidence une épithèque particulière qui est un élément caractéristique des cellules mobiles. Les cellules présentent une forme biconique à ronde, subcirculaire en vue apicale, avec une longueur et une largeur comprises entre 24 et 30 µm. La figure 7 montre *V. rugosum* en microscopie électronique à balayage. L'épithèque (thèque supérieure) est de forme conique à hémisphérique, tronquée à l'apex. L'hypothèque (thèque inférieure) est de forme trapézoïdale à hémisphérique, elle aussi tronquée à l'apex. Le cingulum est large, descendant de 1,5 à 2 fois sa propre largeur. Le sulcus présente une forme sigmoïde, antérieurement étroite et postérieurement plus large jusqu'à atteindre l'antapex.



échelle 10 µm

Figure 7 : *V. rugosum* en microscopie électronique à balayage (Nézan et Chomérat, 2011)

Les analyses phylogénétiques ont été réalisées sur un fragment partiel du LSU rDNA de 635 caractères, correspondant aux domaines D1-D2 et excluant la zone hypervariable. Le résultat de ces analyses est présenté dans les arbres phylogénétiques de la figure 8.

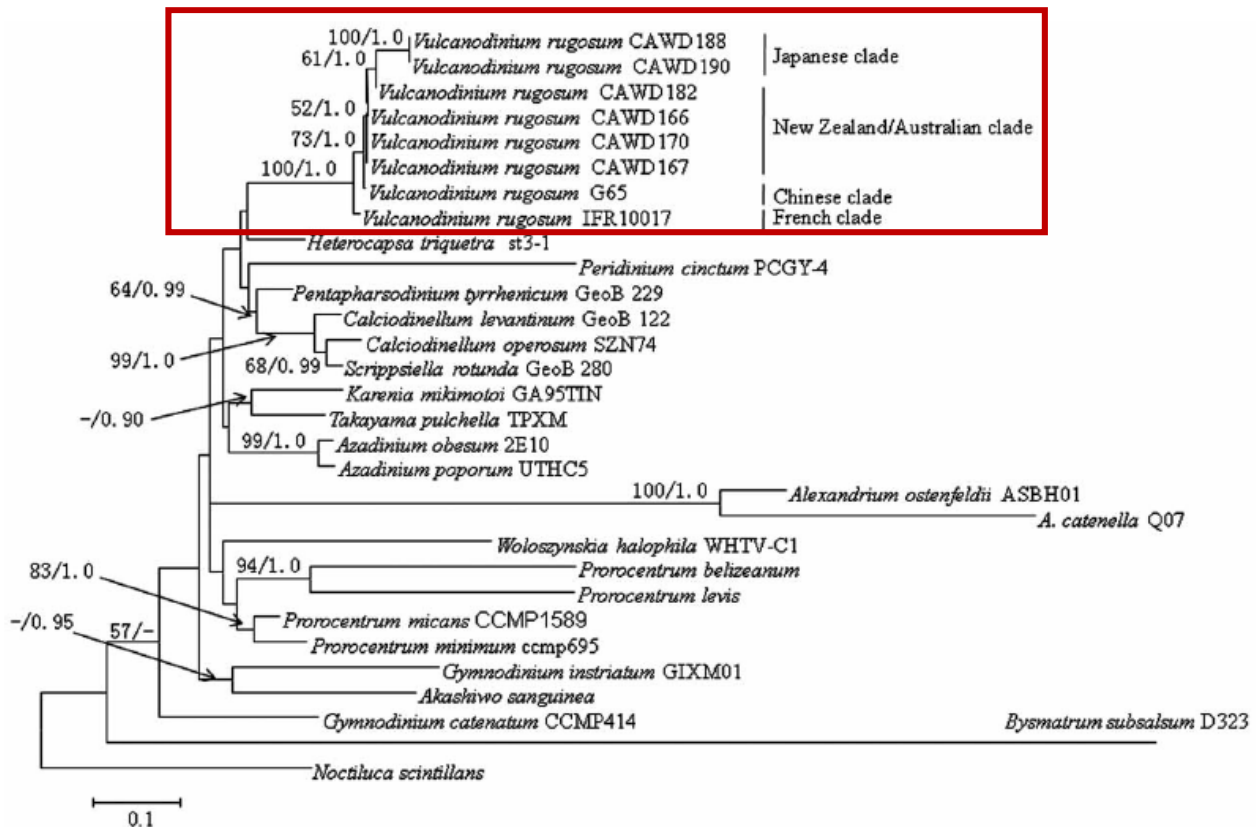


Figure 8: Phylogénie de *Vulcanodinium rugosum* et des espèces apparentées, établie à partir de la région ITS et des domaines 1 à 2 du LSU (basée sur la vraisemblance maximale (ML) et l'inférence bayésienne (BI)) (Zeng *et al.*, 2012).

3.2 Cycle de vie de *Vulcanodinium rugosum*

Comme pour la quasi-totalité des espèces appartenant au groupe des dinoflagellés, *V. rugosum* est supposé avoir deux phases distinctes : une phase de multiplication végétative (reproduction asexuée) et une phase sexuée. La phase asexuée correspondrait à la phase planctonique, lorsque les cellules sont présentes dans la colonne d'eau. Le cycle comprend également une phase benthique. La phase de reproduction sexuée, étape très importante dans le cycle de vie des dinoflagellés aboutit à la formation d'un planozygote qui donne un kyste de résistance. Cette phase est marquée par la transition d'une phase de vie haploïde (n chromosomes) vers une phase diploïde ($2n$ chromosomes). Pour *V. rugosum*, les études rapportant les différentes étapes de son cycle sont rares. Zeng *et al.* (2012) ont proposé un cycle incomplet mettant en évidence l'existence d'un cycle planctonique, d'une reproduction sexuée hypothétique et d'un cycle benthique non mobile (Figure 9). Les deux cycles sont étroitement liés mais les facteurs environnementaux et/ou physiologiques contrôlant le passage de l'un à l'autre ne sont pas encore connus.

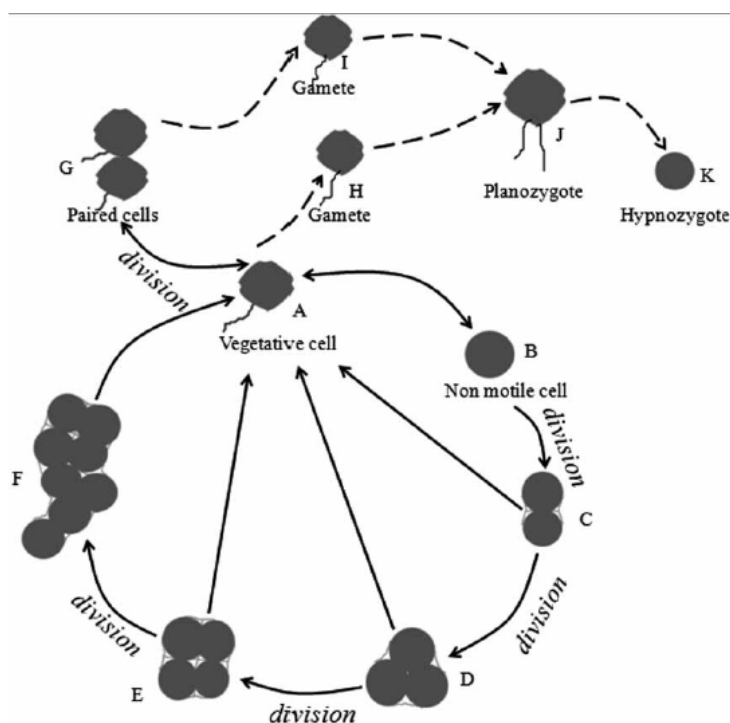


Figure 9 : Proposition de cycle de vie de *Vulcanodinium rugosum*

Ce diagramme présente les phases confirmées (lignes pleines) et hypothétiques (lignes en pointillés). A : cellule végétative. B : kyste temporaire ou cellule non motile. C : deux cellules filles non motiles. D : trois cellules filles non motiles. E : quatre cellules filles non motiles. F : huit cellules filles non motiles. G : cellules appariées juste divisées. I et H : deux gamètes. J : planozygote. K : hypnozygote (source : Zeng *et al.*, 2012).

En complément des observations de Zeng *et al.* (2012), des travaux de l'Ifremer réalisés en laboratoire avec des cultures de la souche IFR-VRU-01, isolée en 2010 (Nézan et Chomérat 2011) à partir d'eau de la lagune d'Ingril, ont permis d'observer chez *V. rugosum* la formation de gamètes et un début de fusion devant donner un planozygote, qui n'a pas pu être mis en évidence. Comme dans l'étude de Zeng *et al.* (2012), il n'a pas été possible d'obtenir (ou d'observer) de kyste de résistance de *V. rugosum*. Cependant, il a été observé l'émergence d'une cellule végétative à partir d'un kyste temporaire et déterminé les différentes étapes de division des kystes temporaires.

La formation de kystes de résistance qui peut intervenir à la fin de la reproduction sexuée est une étape importante pour la survie dans des conditions environnementales défavorables grâce au brassage chromosomique qui augmente la diversité génétique intraspécifique. Ces kystes, qui se trouvent dans le sédiment, constitueront alors une réserve d'individus à 2n chromosomes (banque de kystes), qui germeront et donneront des cellules végétatives (n chromosomes après méiose) lorsque les conditions environnementales redeviennent favorables.

Les kystes représentent également une source de dissémination de l'espèce par transfert de sédiments ou de coquillages d'une zone à une autre (les kystes étant présents dans le tractus gastro-intestinal et dans l'eau intervalvaire) mais également par les eaux de ballast des bateaux (Garrett *et al.*, 2014). L'identification des formes de résistance et la connaissance de leurs aires de répartition sont donc importantes afin de prévenir les risques de dissémination et de contamination. De même la détermination des facteurs clés de la croissance et de la production de toxines par *V. rugosum* est primordiale pour mieux appréhender le risque lié à cette nouvelle espèce.

3.3 Facteurs biotiques influençant la croissance de *V. rugosum* et la production de toxines

3.3.1 Rôle des nutriments azotés

La disponibilité en nutriments et leur nature sont considérées comme des éléments clés pouvant expliquer le développement et la prolifération des efflorescences d'algues toxiques (HAB, harmful algal blooms) dans un écosystème marin donné. Cependant le nombre d'études montrant une relation directe entre la concentration de ces nutriments et la prolifération des HAB sont peu nombreuses. Cette relation semble complexe et plusieurs paramètres interviennent en même temps. Il est cependant admis que les dinoflagellés ont développé des adaptations physiologiques à des milieux pauvres en nutriments azotés et/ou en phosphore comme, par exemple, leur propension à être mixotrophes. L'impact des éléments nutritifs sur la prolifération de dinoflagellés benthiques est certainement spécifique. Très peu d'études ont abordé l'écophysiologie de ce type de dinoflagellés (Cohu *et al.*, 2013). Afin de mieux cerner les éléments clés influençant le développement de ce dinoflagellé dans son milieu naturel, l'effet d'une forme organique de l'azote (urée) et de deux formes inorganiques (ammonium et nitrates) sur la croissance et la production de toxines d'une souche de *V. rugosum* isolée de l'étang d'Ingril a été étudié au laboratoire (Abadie *et al.* 2015). Les résultats montrent que l'ammonium est assimilé rapidement par les cellules. *V. rugosum* qui utilise indifféremment les trois formes d'azote indiquant que cette espèce est osmotrophe, ce qui peut contribuer à la croissance de ce dinoflagellé dans un milieu pauvre en éléments nutritifs inorganiques. La production de la PnTX G est significativement moins élevée avec l'urée comme source d'azote, ce qui suggère que les conditions nutritives dans les milieux, au moment des efflorescences peuvent déterminer le contenu cellulaire en toxines et donc la toxicité mesurée dans les mollusques.

3.3.2 Rôle de la température et de la salinité

Ces deux facteurs environnementaux sont connus pour être de forts déterminants de la distribution des microalgues. Ainsi, la distribution spatio-temporelle des organismes dépend, entre autres, de leur capacité d'acclimatation aux variations de ces deux paramètres.

Dans l'étude conduite par Abadie *et al.* (2016), les gammes de températures et salinités ont été choisies en fonction des conditions présentes dans la lagune d'Ingril. Les résultats ont montré que *V. rugosum* peut se développer pour une température comprise entre 20 et 30°C et une salinité entre 20 et 40 g/L. La combinaison optimale pour la croissance ($0,39 \pm 0,11 \text{ d}^{-1}$) consiste en une température de 25°C et une salinité de 40 g/L.

Les résultats montrent que la température est le facteur le plus important pour la croissance de *V. rugosum*. Ces données suggèrent que *V. rugosum* est une espèce thermophile, ce qui expliquerait son développement dans la lagune d'Ingril de juin à septembre et les concentrations les plus élevées en PnTX G trouvées dans les moules pendant cette période. Les caractéristiques écophysiologiques de *V. rugosum* mises en évidence grâce à cette étude suggèrent aussi que cette espèce est capable de se répandre dans les autres lagunes méditerranéennes (à ce jour, la présence de *V. rugosum* n'a pas été confirmée dans l'eau des autres lagunes qu'Ingril toutefois de la PnTX G a été quantifiées dans les coquillages de ces lagunes, voir § 5.1.2).

3.4 Autres espèces de phytoplancton susceptibles de produire des pinnatoxines

Aucune autre espèce phytoplanctonique n'a été rapportée comme pouvant produire des PnTX, à la date de la revue de la littérature disponible pour le groupe de travail (dernière mise à jour de la recherche bibliographique : septembre 2018).

4 Caractérisation du danger lié aux toxines produites par *Vulcanodinium rugosum*

Pour la caractérisation du danger, le groupe de travail a utilisé l'ensemble des données publiées sur la toxicité *in vitro*, *ex vivo* (sur hémidiaphragme de souris) et *in vivo*, par voie intrapéritonéale et par voie orale (gavage et nourriture).

4.1 Toxicité aiguë *in vivo*

4.1.1 Extraits de *V. rugosum*

Des extraits de cultures de *V. rugosum*, souches isolées au niveau du port de Rangaunu (Nouvelle-Zélande), du port de Franklin (Australie) ou de l'étang d'Ingril (France) ont été testés par voie orale ou intrapéritonéale chez la souris. Les résultats de ces essais sont présentés dans le tableau 3.

Tableau 3 : Toxicité *in vivo* chez la souris d'extraits de cultures de *V. rugosum*

Extrait	Voie d'administration et nombre de souris	DL ₅₀ (mg d'extrait de cultures/kg pc)	Dose maximale tolérée (DMT)	Références
Extrait éthanolique et méthanolique de <i>V. rugosum</i> de Nouvelle-Zélande produisant de la PnTX E et F (comportant environ 10 µg de PnTX par mg d'extrait)	i.p. Nombre de souris et sexe non précisés (LD OCDE 425) Souris non à jeun	1,33 IC95 : 1,25-1,58 mg d'extrait/kg pc	Non déterminée	Rhodes <i>et al.</i> , 2010
	Gavage Nombre de souris et sexe non précisés (LD OCDE 425) Souris à jeun de 16h	2,33 IC95 : 1,98-2,50 mg d'extrait/kg pc		
	Dans du fromage à tartiner Nombre de souris et sexe non précisés (LD OCDE 425) Souris à jeun de 16h	5,95 IC95 : 4,50-8,51 mg d'extrait/kg pc		
Extrait éthanolique et méthanolique de <i>V. rugosum</i> d'Australie produisant de la PnTX E, F, G et très faiblement de la PnTX A (comportant environ 3 µg PnTX G/mg d'extrait, 0,1 µg PnTX E/mg d'extrait, 0,6 µg PnTX F/mg d'extrait)	i.p. Nombre de souris et sexe non précisés (LD OCDE 425) Souris non à jeun	7,6 IC95 : 5,3-10,1 mg d'extrait/kg pc	Non déterminée	Rhodes <i>et al.</i> , 2011
	Gavage Nombre de souris et sexe non précisés (LD OCDE 425) Souris à jeun de 16h	22,2 IC95 : 18,9-23,8 mg d'extrait/kg pc		
	Dans du fromage à tartiner Nombre de souris et sexe non précisés (LD OCDE 425) Souris à jeun de 16h	59,3 IC95 : 50,0-63,0 mg d'extrait/kg pc		
Extrait éthanolique et méthanolique de <i>V. rugosum</i> d'Australie (produisant de la PnTX G et très faiblement de la PnTX F)	i.p. Nombre de souris et sexe non précisés (LD OCDE 425) Souris non à jeun	2,0 IC95 : 1,7-2,4 mg d'extrait/kg pc	Non déterminée	Rhodes <i>et al.</i> , 2011
	Gavage Nombre de souris et sexe non précisés (LD OCDE 425) Souris à jeun de 16h	5,5 IC95 : 4,4-6,9 mg d'extrait/kg pc		

Extrait	Voie d'administration et nombre de souris	DL ₅₀ (mg d'extrait de cultures/kg pc)	Dose maximale tolérée (DMT)	Références
	Dans du fromage à tartiner Nombre de souris et sexe non précisés (LD OCDE 425) Souris à jeun de 16h	28 IC95 : 20-37 mg d'extrait/kg pc		
Extrait méthanolique de <i>V. rugosum</i> d'Ingril (Ifremer, France) contenant 0,03% de PnTX G	Gavage 3 souris femelles/dose (25, 65, 160, 400 ou 1000 mg d'extrait/kg pc), groupe témoin de 8 souris. Souris à jeun 3h avant administration	Non déterminée. Mort de 2/3 souris à la dose de 1000 mg d'extrait/kg pc (22h après administration), correspondant à 300 µg PnTX G/kg pc	400 mg d'extrait/kg pc	Rapport Anses-Université de Trieste-CNRS 2014
Fraction purifiée de l'extrait méthanolique de <i>V. rugosum</i> d'Ingril (Ifremer, France) contenant 2% de PnTX G	Gavage 3 souris femelles/dose (0,40 ; 0,95 ; 2,4 ; 6 ou 15 mg d'extrait/kg pc), groupe témoin de 8 souris. Souris à jeun 3h avant administration	Non déterminée	15 mg d'extrait/kg pc, correspondant à 300 µg PnTX G/kg pc	Rapport Anses-Université de Trieste-CNRS 2014

IC95 : intervalle de confiance à 95% ; DMT (Dose Maximale Tolérée) : dose à laquelle aucune mortalité n'est observée, ni signe clinique.

Les résultats de ces études montrent que les composés contenus dans les extraits méthanoliques de culture de *V. rugosum* présentent une toxicité aiguë chez la souris par voie orale et par voie intrapéritonéale, conduisant à leur mort par arrêt respiratoire. Les principaux signes de toxicité précédant la mort des souris observés dans l'étude du Rapport Anses-Université de Trieste-CNRS (2014) étaient : piloérection, prostration, hypothermie, paralysie des membres inférieurs, respiration abdominale et cyanose. L'autopsie des souris mortes a révélé des rougeurs au niveau de l'estomac non-glandulaire et du jéjunum ainsi qu'une accumulation de fluide dans le jéjunum. La fraction purifiée n'a produit aucun signe de toxicité aux doses testées. Les analyses sanguines biochimiques des souris traitées n'ont montré aucune différence par rapport au groupe de souris témoin. Les analyses histologiques n'ont mis en évidence que de faibles changements tissulaires dans l'intestin grêle des souris traitées à la dose de 1000 mg d'extrait/kg pc (dégénérescence modérée de la muqueuse et atrophie des villosités) (Rapport Anses-Université de Trieste-CNRS, 2014).

Le GT souligne l'intérêt limité de ce type d'études réalisées avec des extraits de *V. rugosum* (dont la composition n'est pas connue) pour caractériser le danger et qu'il est plus approprié de prendre en compte des études utilisant des toxines purifiées.

4.1.2 Toxines purifiées : pinnatoxines, ptériatoxines et portimine

La qualité des études de toxicité aiguë *in vivo* avec des toxines purifiées a été évaluée avec l'outil ToxRTool (Toxicological data Reliability assessment Tool, <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/toxrtool>), suivant les recommandations du guide d'élaboration des valeurs toxicologiques de référence de l'Anses (2017a).

Cet outil est proposé par la Commission Européenne pour permettre une évaluation harmonisée et objective de la qualité des données toxicologiques. Il s'agit d'un fichier Excel dans lequel des questions sont posées afin d'évaluer différents critères. Ces critères sont divisés en cinq groupes : identification de la substance testée, caractérisation de l'animal testé, description du protocole de l'étude, description des résultats et plausibilité du protocole de l'étude et des résultats. L'évaluateur doit répondre à chaque question en lui attribuant une valeur de 0 ou 1 (absence ou présence de l'information). Les scores attribués aux études ont été discutés collectivement en réunion du GT.

Le score maximal est de 21. Ce score permet de déterminer la cotation de l'étude selon Klimisch *et al.* (1997).

Tableau 4 : Interprétation du score de qualité d'une étude *in vivo* avec l'outil ToxRTool

Cotation de Klimisch	Score ToxRTool	Interprétation	Conséquence (proposée)
1	18-21	Valide sans restriction	Utile, vérifier la pertinence selon l'objectif visé
2	13-17	Valide avec restriction	Potentiellement utile, vérifier la pertinence selon l'objectif visé
3	<13 ou critères rouges pas tout remplis	Non valide	Généralement ne doit pas être utilisée comme étude clé mais en fonction des lacunes de l'étude peut être utile dans les approches du poids de la preuve ou comme information de soutien
4		Non évaluable	Généralement ne doit pas être utilisé comme étude clé mais en fonction des lacunes de l'étude peut être utile dans les approches du poids de la preuve ou comme information de soutien (cette catégorie n'est pas un résultat de cet outil d'évaluation)

Dans l'approche de Klimisch *et al.* (1997), lorsque l'étude ne répond pas aux protocoles standardisés de l'OCDE, sa fiabilité est déterminée selon les critères suivants :

- Type d'animaux testés (espèces, souches, sexe, âge) ;
- Composition, pureté et origine de la substance ;
- But des investigations (observations histopathologiques, cliniques, etc.) ;
- Précision de la description des lésions observées ;
- Présence d'un groupe contrôle ou contrôle historique ;
- Description des conditions du test ;
- Description des voies et doses administrées ;
- Identification d'une relation dose-réponse si possible ;
- Description et pertinence des méthodes statistiques utilisées ;
- Informations sur la période d'investigation pendant la vie de l'animal ;
- Informations sur les conditions de vie des animaux (notamment alimentation).

Klimisch *et al.* (1997) ont alors établi une cotation des études expérimentales en prenant en compte la fiabilité des études (méthodes standardisées, BPL (Bonnes Pratiques de Laboratoire)), le détail de description de la publication ainsi que la pertinence et l'utilité des données dans le cadre de l'évaluation du risque. Cette cotation est comprise entre 1 et 4.

- Cotation 1 : Valide sans restriction
- Cotation 2 : Valide avec restrictions
- Cotation 3 : Non valide
- Cotation 4 : Non évaluable

Les études les plus pertinentes décrivent avec précision la nature de l'effet toxique, le nombre et le pourcentage d'animaux concernés par les effets observés ainsi que les conditions de l'exposition (durée - concentration).

Lors de la construction des VTR, les études expérimentales retenues, mais ne suivant pas les lignes directrices de l'OCDE, doivent être examinées et cotées selon la méthode de Klimisch. Il est alors conseillé de prendre en compte uniquement les études expérimentales cotées 1 et 2.

Les données sur la toxicité aiguë des PnTX purifiées sont très limitées. En effet, les études disponibles n'ont été réalisées que chez une seule espèce (la souris), un seul sexe (les femelles, considérées comme plus sensibles que les mâles) et avec très peu d'animaux testés par dose.

Par voie orale, seules 3 études sont disponibles et se sont intéressées aux PnTX E, F, G et H (Munday *et al.* 2012, Rapport Anses-Université de Trieste-CNRS 2014, Selwood *et al.* 2014). Le GT n'a trouvé aucune information concernant les PtTX et la portimine. Les études de Munday *et al.* (2012) et celle décrite dans le Rapport Anses-Université de Trieste-CNRS (2014), d'importance majeure pour la caractérisation du danger, ont fait l'objet d'une grille de lecture présentée en annexe 2.

Par voie intrapéritonéale, 4 études ont été publiées et ont porté sur les PnTX E, F, G, H et la portimine (Munday *et al.*, 2012, Selwood *et al.* 2010, 2013, 2014). Le GT a identifié des informations complémentaires non encore publiées concernant la PnTX A (communication personnelle de J. Molgo). Concernant les PtTX, le GT n'a identifié aucune information robuste.

Malgré ce nombre limité d'études et de souris testées par dose pour chacune des PnTX, il ressort un ensemble d'informations cohérent permettant de dessiner les grandes caractéristiques de la toxicité aiguë de cette famille de toxines.

En premier lieu, la toxicité des PnTX est rapide, puisque les symptômes apparaissent quelques minutes après l'administration (qu'elle soit orale ou i.p.). Ce fait est connu, puisque les PnTX (comme les autres imines cycliques) font partie du groupe des Fast Acting Toxins (toxines à action rapide).

Le second point caractéristique est l'apparition de symptômes neurotoxiques, conduisant rapidement la souris à la mort par arrêt respiratoire. Les signes cliniques de toxicité, quelle que soit la voie d'administration et l'analogue de PnTX, comprennent une diminution de la mobilité (parfois précédée d'une première phase très active juste après l'administration), une paralysie des membres postérieurs et des difficultés respiratoires (Munday *et al.*, 2012), des tremblements et des sauts sont aussi rapportés (Rapport Anses-Université de Trieste-CNRS, 2014).

A des doses sub-létales (non précisées par les auteurs), les mêmes effets sur l'activité et la respiration sont observés mais après 1h, la respiration revient à la normale. Certains auteurs constatent un état léthargique avec pilo-érection avant une récupération complète 2 à 3 heures après intoxication (Munday *et al.*, 2012). De manière générale, les études rapportent que lorsque les souris ne meurent pas en quelques minutes, elles récupèrent rapidement et complètement (Munday *et al.*, 2012 ; Selwood *et al.*, 2010, 2014).

Aucune anomalie macroscopique des organes n'est constatée à la nécropsie (Munday *et al.*, 2012 ; Selwood *et al.*, 2010, 2014).

Seule l'étude décrite dans le Rapport Anses-Université de Trieste-CNRS (2014), une analyse histologique des principaux organes ainsi que des analyses sanguines biochimiques ont été réalisées. De faibles changements tissulaires ont été observés dans l'intestin grêle des souris exposées à des doses létales de PnTX G (dégénérescence modérée de la muqueuse, atrophie des villosités) tandis qu'aucun effet n'a été observé aux doses non létales. Les analyses sanguines biochimiques n'ont montré aucune différence par rapport au groupe témoin.

Les valeurs de DL₅₀ varient selon l'analogue de PnTX et la voie d'administration (tableau 5). Par voie orale, les DL₅₀ sont comprises entre 25 et 2800 µg/kg de poids corporel (pc) (respectivement pour la PnTX F et la PnTX E). Les analogues testés peuvent être classés de la manière suivante par ordre décroissant de toxicité : PnTX F > PnTX G ~ PnTX H >> PnTX E. Par voie i.p., elles sont comprises entre 13 et 115 µg/kg p.c. (respectivement pour la PnTX F et la PnTX A) et les analogues peuvent être classés comme suit : PnTX F > PnTX G > PnTX E > PnTX H > PnTX A.

Des valeurs de DL₉₉ pour quelques PnTX et PtTX sont rapportées dans la littérature, mais le GT a considéré que ces données étaient peu fiables, en raison du manque d'informations sur le protocole (Uemura *et al.*, 1995 ; Chou *et al.*, 1996 ; McCauley *et al.*, 1998 ; Takada *et al.*, 2001).

Certaines des études ont été conduites avec des souris non à jeun (Munday *et al.*, 2012 ; Selwood *et al.*, 2010), après un jeun de 3h comme recommandé dans les lignes directrices de l'OCDE (Rapport Anses-Université de Trieste-CNRS, 2014) ou après un jeun de 16h (Munday *et al.*, 2012). Les experts du CES ERCA déplorent les conditions non éthiques d'un jeun prolongé de 16h, qui peut résulter en des résultats biaisés dus à des modifications du métabolisme de la souris.

Toutefois, le jeûne semble peu influencer les résultats de DL₅₀, par voie i.p. et par voie orale. Par exemple, pour la PnTX G, la DL₅₀ par voie i.p. est de 48 µg/kg pc chez les souris non à jeun et de 42,7 µg/kg pc après un jeun de 16h. Par gavage, les DL₅₀ pour la PnTX F sont de 25 et 29,9 µg/kg pc respectivement chez les souris non à jeun et à jeun de 16h (Munday *et al.*, 2012).

Munday *et al.* (2012) ont étudié la toxicité des PnTX F et G administrées dans différents types de nourriture pour obtenir des souris une administration volontaire. Pour la PnTX F, la valeur de DL₅₀ est la même (50 µg/kg pc) que celle-ci soit placée dans du fromage à tartiner, du beurre de cacahuète ou de la nourriture pour souris. La toxicité est plus faible comparée à une administration par gavage (DL₅₀ de 25 à 29,9 µg/kg pc). La PnTX G n'a été testée que dans du fromage à tartiner et la DL₅₀ obtenue (400 µg/kg pc) montre une toxicité plus faible que celle par gavage (150 µg/kg pc).

Le GT a relevé que la concentration en éthanol utilisées dans l'étude de Munday *et al.* (2012) était élevée (12,5% en gavage). Toutefois, après audition d'une vétérinaire sur ce point, il a été conclu que cela ne remettait pas en cause les résultats observés.

La portimine présente une toxicité aiguë par voie i.p. plus faible que celle des PnTX, avec une DL₅₀ estimée à 1570 µg/kg pc. Aucun effet n'a été observé à 500 et 700 µg/kg pc (Selwood *et al.*, 2013). Les auteurs indiquent que les signes de toxicité précédant la mort des souris apparaissent moins rapidement après l'administration, comparativement aux PnTX (les signes de toxicité observés ne sont pas précisés). La toxicité par administration orale n'est pas connue.

Tableau 5 : Toxicité aiguë *in vivo* chez la souris des PnTX et de la portimine

Administration orale

Toxine (pureté)	Voie d'administration et nombre de souris	DL ₅₀ (µg/kg pc)	DMT (µg/kg pc)	Références	Qualité de l'étude
PnTX E*	Gavage Nombre de souris non précisé (LD OCDE 425) Souris non à jeun	2800 IC95 : 2380-3000	600	Munday <i>et al.</i> , 2012	ToxRTool : 13 Klimisch : 2
PnTX F*	Gavage Nombre de souris non précisé (LD OCDE 425) Souris non à jeun	25 IC95 : 19,1-35,1	9,9	Munday <i>et al.</i> , 2012	ToxRTool : 13 Klimisch : 2
	Souris à jeun de 16h	29,9 IC95 : 25-32	Non déterminée		
	Dans du fromage à tartiner Nombre d'animaux non précisé (LD OCDE 425) Souris non à jeun	50 IC95 : 39,4-62,8	16,0	Munday <i>et al.</i> , 2012	ToxRTool : 13 Klimisch : 2
	Dans du beurre de cacahuète Nombre de souris non précisé (LD OCDE 425) Souris non à jeun	50 IC95 : 37,9-71,5	Non déterminée		
	Dans de la nourriture pour souris. Nombre de souris non précisé (LD OCDE 425) Souris à jeun de 16h	50 IC95 : 37,9-71,5	Non déterminée		
	Dans du fromage à tartiner, souris à jeun de 16h	77 IC95 : non calculé	Non déterminée		
PnTX-G*	Dans du beurre de cacahuète, souris à jeun de 16h	50 IC95 : 39,4-62,8	Non déterminée	Munday <i>et al.</i> , 2012	ToxRTool : 13 Klimisch : 2
	Gavage Nombre de souris non précisé (LD OCDE 425) Souris non à jeun	150 IC95 : 105-100	75		

Toxine (pureté)	Voie d'administration et nombre de souris	DL ₅₀ (µg/kg pc)	DMT (µg/kg pc)	Références	Qualité de l'étude
PnTX-G (pureté annoncée de 100%)	Gavage Groupes de 3 à 8 souris (8 pour le groupe témoin ; 3 pour les doses 8, 20, 50, 120 µg/kg ; 5 pour les doses 220, 300, 370, 400 µg/kg) Souris à jeun 3h avant administration	208 IC95 : 155-281	120	Rapport Anses-Université de Trieste-CNRS 2014	ToxRTool : 17 Klimisch : 2
PnTX-G*	Dans du fromage à tartiner Nombre de souris non précisé (LD OCDE 425) Souris non à jeun	400 IC95 : 380-470	153	Munday <i>et al.</i> , 2012	ToxRTool : 13 Klimisch : 2
PnTX H*	Gavage Nombre d'animaux non précisé Jeûne non précisé	163 IC95 : 139-175		Selwood <i>et al.</i> 2014	ToxRTool : 4 Car peu de détails dans l'article, mais cette équipe a déjà décrit le protocole pour d'autres PnTX

*pureté vérifiée par RMN selon les auteurs, mais pourcentage non mentionné dans la publication

IC95 : intervalle de confiance à 95% ;

DMT (Dose Maximale Tolérée) : dose à laquelle aucune mortalité n'est observée, ni signe clinique

Administration par voie intrapéritonéale (i.p.)

Toxine (pureté)	Voie d'administration et nombre d'animaux	DL ₅₀ (µg/kg pc)	DMT (µg/kg pc)	Références	Qualité de l'étude
PnTX A de synthèse (>97% de pureté)	i.p. n=18 souris, 9 doses testées (1 à 3 souris/dose) souris non à jeun	114,8		J. Molgó (communication personnelle)	ToxRTool : 16
PnTX E*	i.p. Nombre d'animaux non précisé (LD OCDE 425)	57 (non à jeun) IC95 : 39,7-75,3 48 (à jeun de 16h) IC95 : 33,5-63,5	22 Non déterminée	Munday <i>et al.</i> 2012	ToxRTool : 13
	i.p. (LD OCDE 425) n=2 à 36 µg/kg, n=3 à 45 µg/kg, n=1 à 54 µg/kg, n=1 à 60 µg/kg.	45 (non à jeun) IC95 : 32-58		Selwood <i>et al.</i> , 2010	ToxRTool : 15
PnTX F*	i.p. Nombre d'animaux non précisé (LD OCDE 425)	12,7 (non à jeun) IC95 : 9,5-14,6 14,9 (à jeun de 16h) IC95 : 12,6-15,8	3,2 Non déterminée	Munday <i>et al.</i> , 2012	ToxRTool : 13
	i.p. (LD OCDE 425) n=1 à 10,1 µg/kg, n=1 à 12,7 µg/kg, n=3 à 16 µg/kg, n=2 à 20,1 µg/kg.	16 (non à jeun) IC95 : 12-23		Selwood <i>et al.</i> , 2010	ToxRTool : 15

Toxine (pureté)	Voie d'administration et nombre d'animaux	DL ₅₀ (µg/kg pc)	DMT (µg/kg pc)	Références	Qualité de l'étude
PnTX G*	i.p. Nombre d'animaux non précisé (LD OCDE 425)	48 (non à jeun) IC95 : 36,3-68,1 42,7 (à jeun de 16h) IC95 : 40-50	18,8 Non déterminée	Munday <i>et al.</i> , 2012	ToxRTool : 13
PnTX G*	i.p (LD OCDE 425) n=2 à 40 µg/kg, n=3 à 50 µg/kg, n=1 à 60 µg/kg.	50 (non à jeun) IC95 : 35-66		Selwood <i>et al.</i> , 2010	ToxRTool : 15
PnTX G de synthèse (>97% de pureté)	i.p ; Nombre d'animaux non précisé	65,8		J. Molgó (communication personnelle)	ToxRTool : 16
PnTX H*	i.p. Nombre d'animaux non précisé Jeûne non précisé	67 IC95 : 63-79		Selwood <i>et al.</i> , 2014	ToxRTool : 4 Car peu de détails dans l'article, mais cette équipe a déjà décrit le protocole pour d'autres PnTX
Portimine*	i.p. Nombre d'animaux non précisé Jeûne non précisé	1570 IC95 : 1269–3080	Aucun effet à 500 et 700	Selwood <i>et al.</i> , 2013	ToxRTool : 4 Car peu de détails dans l'article, mais cette équipe a déjà décrit le protocole pour d'autres PnTX

*pureté vérifiée par RMN selon les auteurs, mais pourcentage non mentionné dans la publication.

En conclusion, le mode d'action *in vivo* des PnTX est rapide, la mort des souris survenant en quelques minutes (moins de 30 minutes) après administration, qu'elle soit par voie i.p. ou orale. Les symptômes observés sont de type neurotoxiques (paralysie, détresse respiratoire).

Le GT souligne que la PnTX F semble être l'analogue présentant la toxicité la plus élevée.

4.2 Toxicités subchronique et chronique

Aucune étude sur la toxicité par administration répétée n'a été identifiée dans la littérature.

4.3 Toxicité *ex vivo*

Sur l'hémi-diaphragme de rat, la PnTX F seule (130-520 nM) ou en mélange avec la PnTX E inhibent le potentiel d'action composé induit par stimulation du nerf phrénique, sans affecter ce potentiel d'action induit par stimulation directe du muscle. Cet effet n'a pu être aboli par addition d'un anti-cholinestérasique, la néostigmine (Hellyer *et al.*, 2011). Cette inhibition de l'excitabilité musculaire a été corrélée à l'inhibition de la contraction musculaire. En effet, les PnTX E, F et G réduisent drastiquement la contraction musculaire de l'hémi-diaphragme de rat (CI₅₀ de 11 à 53 nM). Les PnTX F et G réduisent l'amplitude des potentiels de plaque miniatures (libération spontanée d'ACh) et des potentiels de plaque motrice (libération évoquée d'ACh), sans dépolariser les fibres musculaires (Hellyer *et al.*, 2013). Ces résultats montrent clairement la capacité des PnTX à bloquer à des concentrations nanomolaires la transmission neuromusculaire et peuvent s'expliquer par l'effet antagoniste des PnTX à l'égard des RnACh. Ce mode d'action explique la paralysie musculaire lors des expérimentations *in vivo*. De plus, des données préliminaires *in ovo* indiquent un effet inhibiteur de la PnTX A sur le développement du squelette et l'appareil musculaire de l'embryon de poulet (Couesnon *et al.*, 2014).

4.4 Toxicité *in vitro*

4.4.1 Cytotoxicité

4.4.1.1 Pinnatoxines

Les PnTX A et G ne sont pas cytotoxiques sur 3 types cellulaires testés (neuro2A, Caco2 et KB) jusqu'à 30 nM après 24h de traitement (Geiger *et al.*, 2013 ; Rapport Anses-Université de Trieste-CNRS, 2014). Seul un léger effet cytotoxique (27%) est observé sur les cellules KB après 72h de traitement à 58 µM (Geiger *et al.*, 2013). De même, aucun effet n'a été observé après 24h de traitement des cellules Caco2 sur la libération d'IL8 (cytokine proinflammatoire), sur le marquage Ki67 (marqueur de prolifération cellulaire) et sur la phosphorylation de H2Ax (marqueur de cassures double brins de l'ADN) (Rapport Anses-Université de Trieste-CNRS, 2014).

Tableau 6 : Résultats de toxicité cellulaire des PnTX

Pinnatoxines	Modèle cellulaire	Test de cytotoxicité	Temps d'exposition	Cytotoxicité	Référence
PnTX-A ^a	Caco2 différenciées	NRU	24h	Pas d'effet jusqu'à 30 nM	Rapport Anses-Université de Trieste-CNRS, 2014
PnTX-A ^a	Neuro2A	NRU	24h	Pas d'effet jusqu'à 30 nM	Rapport Anses-Université de Trieste-CNRS, 2014
PnTx G ^b	Caco2 différenciées	NRU	24h	Pas d'effet jusqu'à 30 nM	Rapport Anses-Université de Trieste-CNRS, 2014
PnTx G ^b	Caco2 non différenciées	MTT	48h	Pas d'effet jusqu'à 30 nM	Geiger <i>et al.</i> , 2013
PnTX-G ^b	Neuro2A	NRU/MTT	24h	Pas d'effet jusqu'à 30 nM	Geiger <i>et al.</i> , 2013 ; Rapport Anses-Université de Trieste-CNRS, 2014
PnTx G ^b	KB	XTT	72h	27% à 58 µM	Geiger <i>et al.</i> , 2013

^a, pureté >97 %, produit de synthèse fourni par A. Zakarian (UCSB, Santa Barbara, California, USA)

^b pureté > 99% obtenue par le National Research Council of Canada

NRU : Neutral Red Uptake assay

MTT : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay

XTT : 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium assay

CI : concentration inhibitrice

4.4.1.2 Portimine

L'affinité est 10 000 fois plus faible pour la portimine. La portimine est rapportée pour générer des effets apoptotiques (Cuddihy *et al.*, 2016 ; Selwood *et al.*, 2013). L'activation de la caspase 3 est impliquée dans la réponse de la portimine avec un effet dès les premières heures de contact (Cuddihy *et al.*, 2016 ; Selwood *et al.*, 2013). Les effets de la portimine semblent correspondre à une action via des ligands pro-apoptotiques tels que Fas, TNF et TRAIL (Cuddihy *et al.*, 2016).

Des fractions obtenues à partir de cultures de *Vulcanodinium rugosum* (souche IFR-VRU-01 isolée de l'étang d'Ingril, France) et qui contenaient de la portimine n'ont montré qu'un effet cytotoxique limité sur des cellules intestinales Caco2. Cependant, avec ces mêmes fractions, une forte réponse sur l'induction de cassures double brin de l'ADN et sur le blocage du cycle cellulaire a été rapportée (marquage Ki67) (Geiger *et al.*, 2013). Des effets similaires sont observés avec l'extrait brut et avec l'extrait aqueux méthanolique alors que la PnTX G ne provoque pas ces modifications.

Du fait de ses propriétés apoptotiques, un brevet a été déposé sur l'utilisation de portimine comme thérapie anticancéreuse (Hampton *et al.*, 2014).

Tableau 7 : Résultats de toxicité cellulaire de la portimine

Cellules	Temps de contact	CI ₅₀	Observations	Référence
P388 (macrophages de souris)	72 h	2,7 nM	Activation de la caspase-3, indicateur d'apoptose, après 12 h d'exposition IC ₅₀ PnTx F >1 µM	Shi, 2012
Vero (cellules épithéliales de rein de singe)	72 h	3 nM		Selwood <i>et al.</i> , 2013
Jurkat T (lymphocytes humains)	48 h	6 nM	Pas de toxicité de PnTx F et G jusqu'à 1 µM	Cuddihy <i>et al.</i> , 2016
Jurkat T (lymphocytes humains) surexprimant Bcl-2 (anti-apoptotique)	48 h		Pas de toxicité jusqu'à 1 µM	
MEFs (fibroblastes embryonnaires de souris)	48 h	2.5 nM		
MEFs Bax/bak - /-(fibroblastes embryonnaires de souris)			Pas de toxicité jusqu'à 1 µM	

CI₅₀ : concentration inhibitrice à 50% ; pureté de la portimine non renseignée

4.4.2 Absorption *in vitro* / Passage de la barrière intestinale

Un modèle cellulaire mimant la barrière intestinale (Caco-2 différenciée en insert) a été utilisé pour évaluer le passage des PnTX A et G. Les données indiquent un passage modéré de la PnTX G (environ 20% de la quantité déposée à 24h) à travers les cellules Caco-2. Même si les résultats avec la PnTX A signalent que celle-ci serait moins bien absorbée, ces données sont à prendre avec précaution en raison des difficultés analytiques rencontrées avec ce congénère (Rapport Anses-Université de Trieste-CNRS, 2014). Des résultats préliminaires non publiés indiquent que le passage de la barrière intestinale *in vitro* dépend du variant considéré (PnTX E, F et G) (communication personnelle de V. Fessard).

4.5 Mécanistique et cibles cellulaires

4.5.1 Rappel : acétylcholine et réseaux cholinergiques

L'acétylcholine (ACh) est le principal neurotransmetteur du système nerveux périphérique des vertébrés, cette molécule est également présente dans le système nerveux central (Figure 10).

En périphérie, les réseaux cholinergiques concernent principalement :

- le système nerveux végétatif (dit autonome), c'est-à-dire la transmission ganglionnaire des voies sympathiques et parasympathiques ;
- le système musculaire (les muscles squelettiques) ;
- la glande médullo-surrénale dont les synapses cholinergiques contrôlent la sécrétion de catécholamines.

Au niveau du système nerveux central, l'ACh exerce une fonction de neurotransmetteur excitateur via les récepteurs nicotiniques (RnACh), et inhibiteur via les récepteurs muscariniques de l'acétylcholine (RmACh). Les réseaux cholinergiques centraux sont nombreux et diffus, se projetant dans différentes régions du cerveau, comme l'hippocampe, le cortex cérébral, l'amygdale. Ils concernent notamment les fonctions cognitives (mémoire et apprentissage), le système limbique (émotions, humeur, comportement) et le contrôle de la motricité. Des afférences cholinergiques se projettent sur le thalamus depuis l'arc ponto-mésencéphalo-segmental (Landry et Gies, 2014).

Système cholinergique

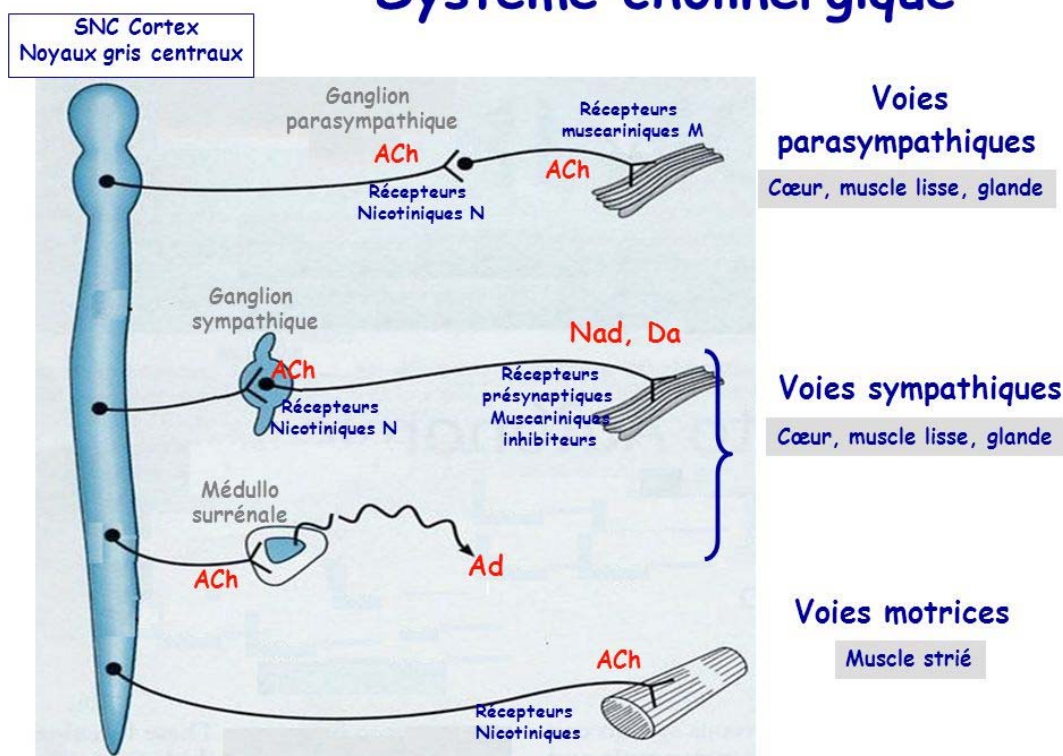


Figure 10 : Représentation du système cholinergique (Source : Dr Eric Pussard cours DCEM1 faculté de pharmacie Toulouse)

La figure 11 illustre les 3 états du canal central : fermé (F), ouvert (O), et désensibilisé (D). Des états intermédiaires peuvent également exister. Les PnTx, en se fixant sur les sites de liaison de l'ACh de façon compétitive, empêchent le changement de conductance, soit partiellement, sans pour autant modifier l'état de désensibilisation, soit complètement. La réversibilité des états du canal dépend du sous-type de RnACh.

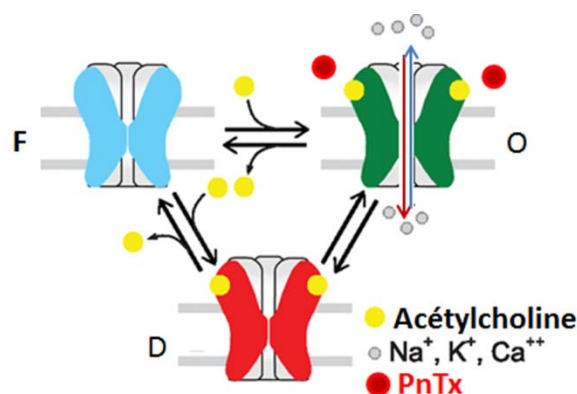


Figure 11 : Modèle de l'activation des RnACh par le ligand naturel (ACh) et les trois états du canal central (figure modifiée d'après Corradi et Bouzat, 2016)

Les récepteurs cholinergiques sont soit ionotropiques, c'est-à-dire couplés à une activité de canal – on parle alors des récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine (RnACh) – ou métabotropiques, c'est-à-dire couplés à une protéine G et activateur ou inhibiteur d'une voie de signalisation intracellulaire (RmACh). Globalement, l'ACh joue un rôle excitateur lorsqu'elle active les RnACh et un rôle modulateur lorsqu'elle active les RmACh. Les RnACh sont présents au niveau des plaques motrices des fibres musculaires squelettiques (jonction neuromusculaire) et dans les neurones du SNC et du SNP, notamment les neurones post-ganglionnaires des réseaux orthosympathiques et parasympathiques. L'activation des RnACh induit l'ouverture transitoire et

rapide d'un canal perméable aux ions Na^+ et Ca^{2+} , responsable d'une dépolarisation de la cellule post-synaptique et son excitation. L'activation des RnACh suit une cinétique plus lente de type « interrupteur moléculaire » impliquant une voie de signalisation intracellulaire et l'intervention d'un ou de plusieurs seconds messagers cytoplasmiques, aboutissant à l'excitation ou l'inhibition de la cellule post-synaptique (Figure 12)

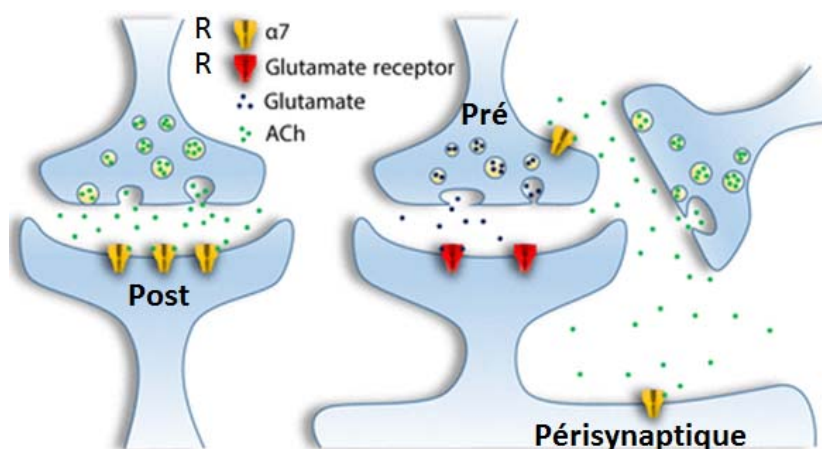


Figure 12 : Représentation schématique d'une synapse neuronale cholinergique de mammifère (figure modifiée d'après Corradi et Bouzat, 2016)

4.5.2 Les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine (RnACh)

Il existe plusieurs types de RnACh. Cette hétérogénéité a été initialement mise en évidence par la sélectivité de divers ligands pour les ganglions du système nerveux végétatif et pour les fibres musculaires squelettiques. Ces affinités différentielles s'expliquent par la stoechiométrie des RnACh : tous sont des pentamères, c'est-à-dire constitués de cinq sous-unités identiques (homopentamère) ou différentes (hétéropentamère). Dix-sept sous-unités sont répertoriées : $\alpha 1$ -10, $\beta 1$ -4, γ , δ et ϵ . Les récepteurs s'assemblent selon une dizaine de conformations stoechiométriques différentes, caractéristiques de leur expression neuronale ou musculaire (Figure 13).

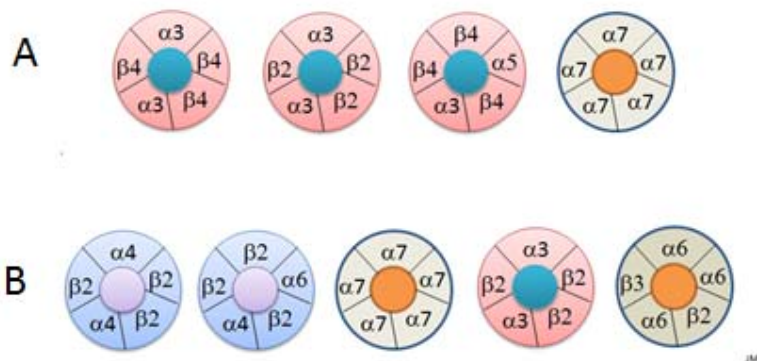


Figure 13 : Principaux RnACh en fonction de leur composition en sous-unités. (A) RnACh neuronaux ganglionnaires et médullo-surréaliens. (B) RnACh neuronaux du SNC (source J. Molgo).

4.5.2.1 Les RnACh neuronaux

Ces sont des récepteurs hétéropentamériques combinant deux sous-unités α ($\alpha 2$ à $\alpha 10$) et trois sous-unités β ($\beta 2$ à $\beta 4$), ou homopentamérique avec la sous-unité $\alpha 7$. Les hétéropentamères présentent deux sites de liaison à l'ACh, les homopentamères en possèdent cinq. Dans le SNC, les sous-unités $\alpha 4$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\beta 2$ et $\beta 3$ sont majoritaires (Gotti *et al.*, 2006). Les RnACh des ganglions orthosympathiques et parasymphatiques expriment les sous-unités $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$ et $\beta 4$. L'activation des RnACh centraux aboutit à l'ouverture du canal cationique central et l'influx d'ions Na^+ et Ca^{2+} . Cette dépolarisation membranaire est susceptible de conduire à la genèse d'un potentiel d'action neuronal qui aboutit à la libération de neurotransmetteur au niveau de la terminaison nerveuse.

4.5.2.2 Les RnACh musculaires

Les RnACh présents dans les fibres musculaires ont été caractérisés initialement par leur extraction à partir de l'organe électrique de torpille (*Torpedo marmorata*) où leur densité est importante. Ce sont des hétéropentamères de type $(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta$ [chez l'embryon] ou $(\alpha 1)_2\beta 1\epsilon\delta$ [chez l'adulte]. Ces récepteurs sont activés par la liaison de deux molécules d'ACh à des sites distincts, à l'interface $\alpha 1$ - γ , $\alpha 1$ - δ et $\alpha 1$ - ϵ . La libération d'ACh par un motoneurone permet l'activation des RnACh. La dépolarisation membranaire qui s'ensuit favorise l'ouverture massive des canaux Na^+ et la naissance de potentiels d'action musculaires. Ceux-ci permettent l'ouverture de canaux calcium et l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire, via la mobilisation des réserves calciques du réticulum sarcoplasmique. Les fibres musculaires se contractent.

Les PnTX, en se fixant sur les sites de liaison de l'ACh de façon compétitive, empêchent le changement de conductance, soit partiellement sans pour autant modifier l'état de désensibilisation, soit complètement. La réversibilité des états du canal dépend des sous-types de RnACh.

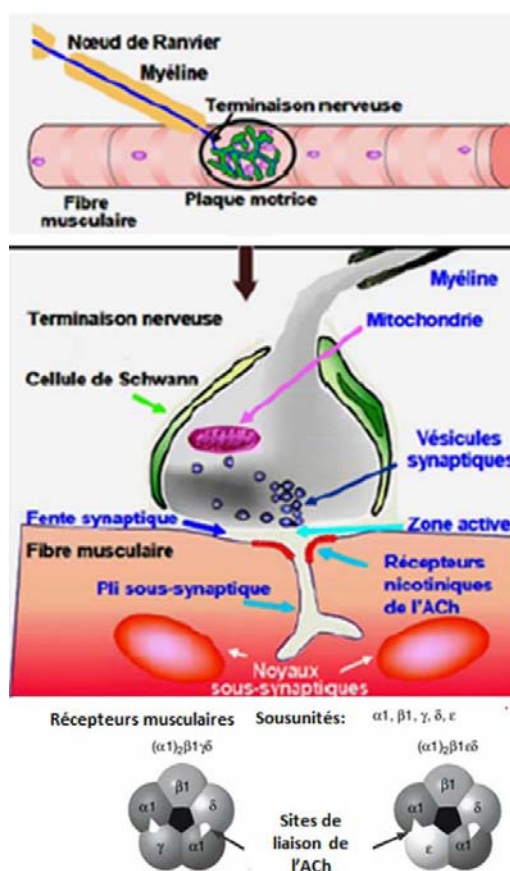


Figure 14 : Représentations schématiques d'une jonction neuromusculaire de mammifère, en microscopie optique (image du haut), et en microscopie électronique (image du bas). Source J. Molgo, coupes pratiquées dans l'axe du rameau nerveux et perpendiculaires à la fente synaptique).

La jonction neuromusculaire squelettique est un modèle de synapse à transmission chimique en raison de son organisation relativement simple (Figure 14). Elle est composée de trois partenaires qui incluent la terminaison nerveuse du motoneurone, les cellules de Schwann périssynaptiques et une région spécialisée de la fibre musculaire, la plaque motrice. La terminaison nerveuse motrice présente de nombreuses vésicules synaptiques contenant le neurotransmetteur, l'acétylcholine (ACh), l'ATP, des mitochondries et les zones actives de la libération de l'ACh, indiquées par des flèches. La fente synaptique qui sépare l'élément pré-synaptique de l'élément post-synaptique contient la lame basale qui sert à l'ancrage de l'acétylcholinestérase, enzyme permettant l'hydrolyse de l'ACh. Cette lame basale est présente aussi au niveau des plis sous-synaptiques qui s'ouvrent en face des zones actives de l'élément pré-synaptique. C'est au sommet de ces plis que se trouve la plus forte densité de RnACh. Les canaux sodium dépendants du potentiel (Nav1.4) s'accumulent au fond de ces plis sous-synaptiques. Des noyaux sous-synaptiques sont aussi situés dans les

régions jonctionnelle et juxtajonctionnelle. Ces noyaux jouent un rôle dans la transcription, en exprimant des gènes qui codent pour des protéines synaptiques et musculaires. Les myofibrilles et myofilaments contractiles ne sont pas montrés dans ce schéma. Dans la partie inférieure de la figure sont montrées les sous-unités formant une part du pentamère des RnACh musculaires, dans leur forme embryonnaire et adulte, ainsi que les sites de liaison de l'ACh. Les PnTX interagissent avec ces deux types de récepteurs.

4.5.3 Cibles physiologiques et moléculaires des PnTX

Les données de la littérature suggèrent que les PnTX partagent un mode d'action commun, et il semble peu probable que certaines d'entre elles puissent exercer des effets sur une cible moléculaire ou physiologique qui serait différente de celle des autres (Araoz *et al.*, 2011). La caractérisation du mode d'action des PnTX a révélé de manière non ambiguë qu'elles ciblent les RnACh du muscle squelettique en provoquant un blocage concentration-dépendant de la contraction musculaire provoquée par la stimulation nerveuse. Les PnTX E, F et G bloquent en effet la contraction musculaire induite par stimulation nerveuse, sans pour autant modifier la contraction musculaire provoquée par stimulation directe des muscles isolés de rongeur adulte (Hellyer *et al.*, 2013). Cette paralysie musculaire est due à l'effet antagoniste des PnTX sur les RnACh. En effet, les PnTX A et G bloquent de manière réversible les RnACh, avec un effet différent selon qu'il s'agit de récepteurs musculaires ou de récepteurs neuronaux, et ces derniers en fonction de la stœchiométrie contrôlée de certains de ces récepteurs. Cet effet a été mis en évidence *in vitro*, par expression hétérologue de RnACh (sous forme d'ADNc ou d'ARNm) ou par microtransplantation de membranes purifiées de l'organe électrique de la Torpille (*Torpedo marmorata*) dans l'ovocyte de xénope en utilisant la technique du potentiel imposé (voltage-clamp). Pour approfondir les connaissances du mode d'action des PnTX, des tests de liaison compétitive et de déplacement d'un radioligand de haute affinité ont été réalisés sur des cellules HEK-203 transfectées avec différents sous-types de récepteurs humains ou de poulet.

Les récepteurs testés sont les suivants : $\alpha 7$ homomérique (type neuronal), $\alpha 4\beta 2$ et $\alpha 3\beta 2$ hétéromériques (type neuronal), $\alpha 1\beta 1\gamma\delta$ hétéromérique (type musculaire de Torpille) (Molgo *et al.*, 2017). La valeur des K_i (liaison aux récepteurs) et Cl_{50} (effet antagoniste en électrophysiologie) des études de liaison et d'électrophysiologie montrent que les PnTX se lient aux RnACh musculaires et neuronaux ($\alpha 7$ et $\alpha 4\beta 2$) avec une haute affinité (ordre d'affinité : récepteur musculaire > $\alpha 7$ > $\alpha 4\beta 2$ ~ $\alpha 3\beta 2$). De plus, la sélectivité des PnTX sur les RnACh a été prouvée en analysant par liaison compétitive les éventuels effets sur des nombreux autres récepteurs, transporteurs et canaux ioniques (Araoz *et al.*, 2011).

4.6 Elaboration de la valeur sanitaire

Le GT a suivi la méthodologie présentée dans le guide d'élaboration des VTR de l'Anses (2017a).

4.6.1 Choix de l'étude clé

Le GT a identifié 2 études de toxicité aiguë par voie orale réalisées chez la souris avec de la PnTX G purifiée (Munday *et al.*, 2012 ; Rapport Anses-Université de Trieste-CNRS 2014). Ces 2 études ont fait l'objet d'une grille de lecture détaillée présentée en annexe (Annexe 2).

Le GT a retenu comme étude clé celle réalisée par le Département des Sciences du vivant de l'Université de Trieste dans le cadre d'un financement par la DGAL et la DGS (Rapport Anses-Université de Trieste-CNRS 2014), qui a obtenu un score de 17 sur 21 selon l'outil ToxRTool, correspondant à une cotation 2 selon Klimisch (valable avec restrictions).

Dans cette étude, des groupes de 3 à 5 souris femelles SD-1 âgées de 4 semaines ont reçu par gavage une administration unique de PnTX G purifiée à la dose de 8, 20, 50, 120, 220, 300, 370 ou 450 $\mu\text{g/kg pc}$. Un groupe témoin était constitué de 8 souris. Les souris ont été mises à jeun 3h avant le gavage, la nourriture a été redonnée 2h après l'administration *ad libitum* pendant toute la période d'observation qui était de 24 h en continu après le traitement. Les paramètres étudiés incluaient la létalité, les signes cliniques de toxicité, une analyse histologique de certains organes, des analyses sanguines biochimiques.

Les résultats concernant la létalité et les symptômes observés sont présentés dans le tableau 8.

L'administration de PnTX G a entraîné une mortalité des souris à partir de 220 $\mu\text{g PnTX G/kg pc}$ (3/5 souris, en 22 min). Aucune mortalité n'a été observée aux doses de 8, 20, 50 et 120 $\mu\text{g/kg pc}$. Toutes les souris (5/5)

sont mortes à la dose de 370 µg/kg pc (temps de survie égal ou inférieur à 18 min). La DL50 de la PnTX-G a été calculée à 208 µg/kg pc (intervalle de confiance à 95% = 155-281 µg/kg pc).

Avant la mort, les principaux signes de toxicité ont été : prostration, tremblements, sauts, respiration abdominale, hypothermie, paralysie des membres inférieurs et cyanose.

Aucun changement macroscopique des organes n'a été observé lors de la nécropsie des souris traitées avec la PnTX G.

L'analyse histologique des principaux organes et tissus n'a révélé que des changements mineurs dans l'intestin grêle des souris ayant reçu la PnTX G à des doses égales ou supérieures à 300 µg/kg pc (dégénérescence modérée de la muqueuse, atrophie des villosités).

Aucune différence dans les paramètres sanguins biochimiques n'a été mise en évidence entre les souris traitées et témoins.

Tableau 8 : Létalité et signes cliniques de toxicité chez la souris après administration unique par gavage de PnTX G purifiée (Rapport Anses-Université de Trieste-CNRS 2014)

Dose de PnTX G purifiée	Létalité	Temps de survie (h:min)	Signes cliniques de toxicité
Témoin	0/8	-	-
8 µg/kg pc	0/3	-	-
20 µg/kg pc	0/3	-	-
50 µg/kg pc	0/3	-	-
120 µg/kg pc	0/3	-	-
220 µg/kg pc	3/5	00:20 ; 00:22 ; 00:22	prostration, tremblements, sauts, respiration abdominale, hypothermie, paralysie des membres inférieurs, cyanose
300 µg/kg pc	4/5	00:12 ; 00:13 ; 00:17 ; 00:23	prostration, tremblements, sauts, respiration abdominale, hypothermie, paralysie des membres inférieurs, cyanose
370 µg/kg pc	5/5	00:13 ; 00:15 ; 00:16 ; 00:17 ; 00:18	prostration, tremblements, sauts, respiration abdominale, hypothermie, paralysie des membres inférieurs, cyanose
450 µg/kg pc	5/5	00:12 ; 00:12 ; 00:15 ; 00:16 ; 00:29	prostration, tremblements, sauts, respiration abdominale, hypothermie, paralysie des membres inférieurs, cyanose

4.6.2 Choix de la dose critique

A partir des données de l'étude clé, deux approches ont été explorées :

- 1^{ère} approche : la dose de **120 µg PnTX G/kg pc** a été retenue comme dose maximale tolérée (DMT), c'est-à-dire la dose à laquelle aucun effet n'est observé dans les paramètres étudiés sur une période de 24h après traitement.
- 2^{de} approche : calcul d'une benchmark dose⁵ à partir d'un niveau de réponse de 10% de mortalité (logiciel PROAST web RIVM, v. 65.2). Selon le tableau 9, le modèle qui s'adapte le mieux aux données expérimentales selon le critère d'Akaike (AIC) est le modèle probit, pour lequel la BMDL à 95% est de **69,1 µg PnTX G/kg pc** de souris.

Le CES ERCA signal le caractère inhabituel d'utiliser des données de mortalité chez la souris en administration orale unique pour dériver une valeur sanitaire de référence. Cela se justifie par le fait que la mortalité des souris survient rapidement et que l'écart est très étroit entre une dose sans symptôme et une dose létale. Un niveau de réponse de 10% (pour la mortalité) est jugé élevé mais il a été exceptionnellement retenu dans le cadre de cette expertise car les résultats obtenus avec un niveau de réponse de 1% ont été jugés trop incertains en raison du faible nombre de souris testées dans l'étude.

⁵ La benchmark dose est une dose produisant un effet mesurable correspondant à un niveau de réponse donné par rapport à un groupe témoin. Le plus souvent, la limite inférieure de son intervalle de confiance à 95% ou 90% (BMDL_{95%} ou BMDL_{90%}) est utilisée. Cette approche repose sur une modélisation des données expérimentales prenant en compte l'ensemble de la courbe dose-réponse (Anses, 2017a).

Tableau 9 : Modélisation de la dose-réponse à partir des données de l'étude de toxicité aiguë par voie orale réalisées chez la souris avec de la PnTX G purifiée (Rapport Anses-Université de Trieste-CNRS, 2014)

Modèle	Nb paramètres	loglik	AIC	Accepté	BMDL	BMD
null	1	-22.12	46,24		NA	NA
full	8	-5.87	27,74		NA	NA
two.stage	3	-7.35	20,70	non	NA	74
log.logist	3	-6.37	18,74	oui	80.7	150
Weibull	3	-6.39	18,78	oui	60.4	130
log_prob	3	-6.26	18,52	oui	81.9	150
gamma	3	-6.28	18,56	oui	71.2	150
logistic	2	-6.51	17,02	oui	74.0	140
probit	2	-6.39	16,78	oui	69.1	140
LVM: Expon. m3-	3	-6.31	18,62	oui	63.4	140
LVM: Hill m3-	3	-6.28	18,56	oui	69.9	150

AIC : Akaike information criterion (critère d'Akaike), NA : non applicable ; BMDL : limite inférieure de l'intervalle de confiance à 95% de la benchmark dose associée à 10% de réponse

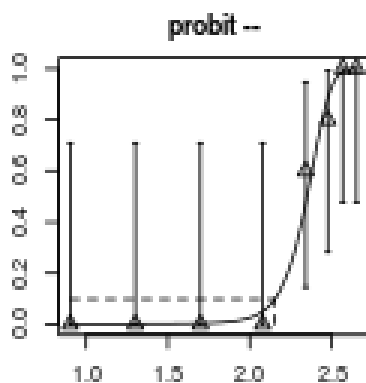


Figure 15 : Allure de la courbe dose-réponse avec le modèle Probit, à partir des données de l'étude de toxicité aiguë par voie orale réalisées chez la souris avec de la PnTX G purifiée (Rapport Anses-Université de Trieste-CNRS, 2014)

Le GT a noté et tenu compte des résultats obtenus dans l'autre étude de toxicité aiguë par voie orale chez la souris non à jeun avec de la PnTX G purifiée (Munday *et al.*, 2012) car cohérents avec ceux de l'étude réalisés par le Département des sciences du vivant de l'université de Trieste :

- i. la DL_{50} est de 150 μg PnTX G/kg pc (IC à 95% = 105-199 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pc) ;
- ii. la dose testée sans mortalité et sans signe apparent de neurotoxicité est de 75 μg PnTX G/kg pc.

4.6.3 Choix des facteurs d'incertitude

Des facteurs d'incertitude ont été identifiés pour les 2 approches explorées dans l'établissement de la dose critique :

- 1^{ère} approche : la dose de 120 μg PnTX G/kg pc a été retenue comme dose maximale tolérée (DMT). Le facteur d'incertitude global associé est de 900 :
 - o facteur d'incertitude inter-espèces : $UF_A = 10$
 - o facteur d'incertitude interindividuel : $UF_H = 10$
 - o autres facteurs : $UF_D = 3$ (insuffisance de données) et 3 (pour tenir compte de la sévérité et de l'allure de la courbe dose-réponse).

- 2^{de} approche : la BMDL de 69,1 µg PnTX G/kg pc de souris a été retenue comme point de départ. Le facteur d'incertitude global associé est de 525 :
 - o Facteur d'ajustement allométrique : 7 pour la souris
 - o $UF_A = 2,5$ pour la composante toxicodynamique
 - o $UF_H = 10$
 - o $UF_D = 3$ (insuffisance de données).

4.6.4 Proposition de valeur repère aiguë provisoire

La terminologie usuelle « dose de référence aiguë (ARfD) » n'a pas été retenue dans le cadre de cette expertise pour éviter toute confusion avec l'usage réglementaire qui en est fait, notamment dans le cadre des substances phytopharmaceutiques ou biocides.

En raison de l'insuffisance des données pour la caractérisation des dangers de la PnTX G, la valeur élaborée pour caractériser le risque a été nommée valeur repère aiguë provisoire.

La valeur repère provisoire aiguë est de **0,13 µg PnTX G/kg pc**, quelle que soit l'approche suivie⁶ (DMT et BMDL).

4.6.5 Proposition de concentration maximale tolérable de PnTX G dans les coquillages

A partir de la valeur repère aiguë provisoire de 0,13 µg PnTX G/kg pc, d'une taille de portion par défaut de 400 g de coquillages (EFSA 2010b) et d'un poids corporel par défaut de 70 kg, la concentration à ne pas dépasser dans les coquillages serait de **23 µg PnTX G/kg de chair totale**.

4.6.6 Niveau de confiance

Un niveau de confiance global **moyen** a été attribué à la valeur repère aiguë provisoire en se basant sur les critères suivants :

- Niveau de confiance dans la nature et la qualité du corpus de données : **Faible**

L'analyse bibliographique a révélé qu'il existait peu de données sur la toxicité aiguë par voie orale des PnTX purifiées et aucune par administration répétée. Le GT a identifié seulement 2 études de toxicité aiguë par voie orale chez une seule espèce et pour un seul sexe (les femelles, considérées comme plus sensibles que les mâles) pour la caractérisation du danger. Le CES ERCA souligne le manque de données chez une autre espèce de rongeur (le rat) ainsi que le manque de connaissances sur la toxicocinétique et la toxicodynamie des PnTX.

- Niveau de confiance dans le choix de l'effet critique et le mode d'action : **Moyen**

L'étude clé est une étude de toxicité aiguë avec une administration unique par voie orale. Elle avait pour objectif d'étudier la mortalité des souris et de définir une dose létale à 50% (DL₅₀). Des symptômes neurologiques ont également été observés et sont cohérents avec le mode d'action connu des PnTX.

Le CER ERCA souligne le caractère inhabituel d'utiliser des données de mortalité chez la souris en administration orale unique pour dériver une valeur sanitaire de référence. Cela se justifie par le fait que la mortalité des souris survient rapidement et que l'écart est très étroit entre une dose sans symptôme et une dose létale.

- Niveau de confiance dans le choix de l'étude clé : **Moyen / Fort**

L'étude clé a été analysée selon l'outil ToxRTool et a obtenu un score total de 17 (sur 21), correspondant à une cotation 2 selon la méthode de Klimisch (étude valide avec restrictions).

⁶ Approche DMT : $(120 \text{ µg PnTX G/kg pc}) / (10 \times 10 \times 3 \times 3) = 120/900 = 0,1333 \text{ µg PnTX G/kg pc}$
Approche BMDL : $69,1 \text{ µg PnTX G/kg pc} / (7 \times 2,5 \times 10 \times 3) = 69,1/525 = 0,1316 \text{ µg PnTX G/kg pc}$

- Niveau de confiance dans le choix de la dose critique : **Fort**

Deux approches ont été explorées pour la sélection de la dose critique à partir des données de l'étude clé. La 1^{ère} approche a retenu une dose maximale tolérée (DMT), dose à laquelle il n'y a ni mortalité ni symptôme des souris au cours de la période d'observation de 24h (qui est jugée suffisante car les PnTX sont des toxines à action rapide, les signes neurotoxiques chez la souris survenant dans les 30 minutes après administration). La 2^{de} approche a modélisé la relation dose-réponse pour calculer une BMDL.

Ce niveau de confiance global pourra être réévalué lorsque de nouvelles données de toxicité aiguë par voie orale seront disponibles pour la PnTX G ou pour d'autres toxines produites par *V. rugosum*.

- Faute de données disponibles par administration orale répétée chez l'animal de laboratoire avec de la PnTX purifiée, le GT n'a pas pu proposer de valeur toxicologique de référence chronique.

Tableau 10 : Tableau de synthèse pour l'élaboration de la valeur repère aiguë provisoire pour la PnTXG

	Effet critique Etude clé	Dose critique pour la souris	UF	Valeur repère aiguë provisoire pour l'Homme	Niveau de confiance
1 ^{ère} approche	<i>Effet critique</i> : absence de mortalité et de symptômes chez la souris 24h après l'administration orale par gavage de PnTX G purifiée <i>Référence de l'étude</i> : Rapport Anses- Université de Trieste- CNRS, 2014	Dose maximale tolérée de 120 µg PnTX G/kg pc	Facteur total : 900 UF _A = 10 UF _H = 10 UF _D = 9 (3 pour insuffisance de données et 3 pour la sévérité et l'allure de la courbe dose-effet).	0,13 µg PnTX G/kg pc	Moyen
2 ^{de} approche		BMDL de 69,1 µg PnTX G/kg pc	Facteur total : 525 Ajustement allométrique : 7 pour la souris UF _A = 2,5 UF _H = 10 UF _D = 3 pour insuffisance de données	0,13 µg PnTX G/kg pc	Moyen

4.7 Transposition à l'Homme

Il n'existe pas à ce jour de cas rapportés d'intoxication humaine par des PnTX. Cette partie a donc pour objectif de décrire les effets cliniques observés chez l'Homme après exposition à des molécules (médicaments, toxines naturelles) ayant une pharmacologie comparable à celle des pinnatoxines. De la même façon, une description ciblée de certaines pathologies (myasthénie, canalopathies...) et de leurs symptomatologies, qui pourraient être observées après exposition à des pinnatoxines, a été réalisée sur la base des études de pharmacologie moléculaire et de toxicologie *in vivo*.

Une enquête auprès de résidents du port de Rangaunu en Nouvelle-Zélande n'a révélé aucune maladie associée à la consommation de fruits de mer, malgré des concentrations élevées de PnTX dans cette zone (200 µg/kg de chair de mollusque). L'étude est possiblement biaisée par un recueil rétrospectif sur les quinze dernières années de 1993 à 2008, les données cliniques ne reposant que sur la base d'entretiens téléphoniques de 22 personnes. Les fichiers médicaux, les données d'hospitalisation en service d'urgences ne sont pas prises en compte. Les résidents étaient choisis car consommateurs réguliers soit 2,6 fois par semaine sur 29 ans de produits de la mer (McNabb *et al.*, 2012).

Les symptômes rapportés chez l'animal sont issus des publications (Munday, 2008 ; Munday *et al.*, 2012 ; Selwood *et al.*, 2010). Les symptômes rapportés, même si similaires, restent frustrés dans leur description et dans la plupart des études il n'y avait pas de groupe témoin.

Le tableau 11 propose une correspondance possible chez l'Homme des symptômes rapportées lors d'exposition chez la souris (Munday, 2008 ; Munday *et al.*, 2012 ; Selwood *et al.*, 2010)

Tableau 11 : Symptômes observés chez la souris et correspondance possible chez l'Homme

Symptômes observés chez la souris	Support anatomique ou physiologique	Correspondance possible chez l'Homme
Hyperactivité Agitation	Début d'atteinte respiratoire et agitation hypercapnique ? Début de crise d'épilepsie ?	Agitation motrice de la crise d'épilepsie frontale ? Agitation confusionnelle centrale comme lors de l'intoxication par cytisine ?
Perte de l'activité motrice	Atteinte de la jonction neuromusculaire	Syndrome myasthénique avec analogie à la maladie <i>myasthenia gravis</i> Paralysie flasque des curares
Dépression respiratoire	Atteinte du couple nerf diaphragmatique - muscle diaphragmatique	Atteinte respiratoire de la myasthénie
Arrêt respiratoire	Bloc complet sur le couple nerf diaphragmatique muscle diaphragmatique	Arrêt respiratoire correspondant à la crise myasthénique
Epilepsie	Atteinte centrale par les récepteurs nicotiniques	Epilepsie par libération du GABA ou par mutation héréditaire
Extension de la patte	Atteinte des interneurons médullaires Atteinte centrale	Syndrome pyramidal Signe de Babinski
Réversibilité si absence de décès Ou si injection de prostigmine	Levée du bloc neuromusculaire post synaptique	Fluctuation de l'atteinte du syndrome myasthénique Ou levée transitoire du bloc par la prostigmine Levée d'action des curares
Exophtalmie	Augmentation de la pression intra oculaire	Action du curare-like suxaméthonium Action des lupins

4.7.1 Effets connus des antagonistes nicotiniques médicamenteux et ou toxiques

Les PnTX sont des antagonistes des récepteurs nicotiniques de la jonction neuromusculaire $\alpha 12\beta\gamma\delta$ post synaptique et des récepteurs centraux ($\alpha 7$ et $\alpha 4\beta 2$) et ganglionnaires ($\alpha 3\beta 2 \sim \alpha 4\beta 2$). Les affinités sont de l'ordre $\alpha 12\beta\gamma\delta > \alpha 7 > \alpha 3\beta 2 \sim \alpha 4\beta 2$.

Les antagonistes de ces récepteurs nicotiniques sont connus dans la pharmacopée ou dans l'alimentation. Les molécules agissant sur la jonction neuromusculaire en $\alpha 12\beta\gamma\delta$ post synaptique sont dites « curare-like », les molécules agissant sur les récepteurs des ganglions sympathiques sont dites ganglioplégiques.

4.7.1.1 Les curares-like

Les antagonistes réversibles des RnACh musculaires sont des curarisants qui peuvent être utilisés en thérapeutique pour provoquer un relâchement des muscles squelettiques pendant les interventions chirurgicales, pour l'intubation trachéale, et en réanimation pour faciliter la ventilation artificielle dans certains cas difficiles. Ces molécules ne passent pas la barrière hémato encéphalique.

Parmi le groupe des curares-like, on distingue plusieurs types de molécules : les agonistes dépolarisants (succinylcholine Célocurine R, suxaméthatium) et les antagonistes compétitifs non dépolarisants (groupe des aminostéroïdes : pancuronium, vécuronium rocuronium, pipécuronium / groupe des benzylisoquinolines : atracurium cisatracurium, doxacurium, mivacurium). Deux de ces curares, le doxacurium et le pipécuronium ne sont pas disponibles en France (Haberer, 2017).

Les « curares » dépolarisants comme la succinylcholine induisent une dépolarisation maintenue des fibres musculaires squelettiques et désensibilise les RnACh (Figure 16). Sa durée d'action est rapide et courte, car elle est dégradée par les cholinestérases synaptiques (butyrylcholinestérase).

Les agents dépolarisants reproduisent ce que font des doses fortes d'ACh sans dégradation par l'acétylcholinestérase. Des produits comme le décāméthonium, produit abandonné de la pharmacopée en raison des effets secondaires, sont des agonistes partiels du RnACh.

Ces agents non dépolarisants prennent la place de l'acétylcholine sur les récepteurs cholinergiques, au niveau de la sous-unité alpha. Ils empêchent ainsi l'ouverture des canaux et la dépolarisation du muscle. Les effets des curares non dépolarisants peuvent être inhibés ou neutralisés par l'administration d'anticholinestérasiques tels que la néostigmine. La tubocurarine est le composant majeur du curare. C'est une toxine végétale, qui a servi de base moléculaire à la synthèse d'analogues utilisés en anesthésie, comme l'atracurium.

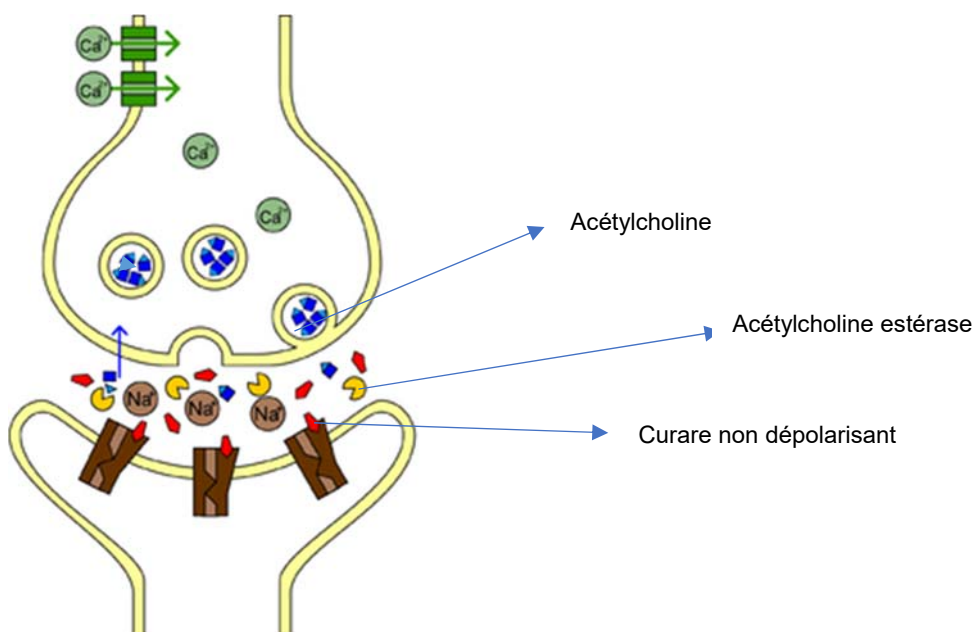


Figure 16 : Mode d'action des curares non dépolarisants au niveau de la jonction neuromusculaire

Les curares peuvent être également bloqueurs du système vagal par blocage des RmACh, stimulants de la libération d'histamine par blocage des ganglions du système nerveux autonome.

La pharmacocinétique et la pharmacodynamie des curares sont modifiées par des facteurs physiologiques (âge, grossesse) et pathologiques (insuffisance rénale, insuffisance hépatique, obésité). De nombreux médicaments interfèrent avec l'action des curares, les plus fréquents sont les anesthésiques halogénés, les antibiotiques et le magnésium.

L'autre variabilité de l'effet des curares est la sensibilité du muscle cible. Les curares bloquent la transmission au niveau de la jonction neuromusculaire des muscles squelettiques respiratoires mais le diaphragme est toutefois résistant aux effets des curares non dépolarisants, tout comme le sont d'ailleurs les muscles adducteurs des cordes vocales. Les muscles des voies aériennes supérieures, qui assurent leur perméabilité, sont sensibles aux effets des curares (Eikermann *et al.*, 2007; Plaud *et al.*, 2001).

Les curares sont hautement allergènes avec des chocs anaphylactiques possibles. Dans 17 à 30% des cas de réactions anaphylactiques aux curares, il n'y a pas eu de contact préalable avec ces molécules pouvant expliquer la sensibilisation. L'histaminolibération provient de l'action directe des mastocytes et non de la production d'IgE (Widmer *et al.*, 1988).

La troisième cause de variabilité de l'effet des curares est liée au terrain du patient, ou facteurs favorisants : existence d'une hypoxie, d'une hypercapnie, la prise préalable de digitaliques, d'aminophylline ou encore l'utilisation conjointe d'halothane.

Les effets indésirables des curares résultent pour partie de la modulation des RnACh ainsi que de propriétés ganglioplégiques. Les effets sont variables en fonction des molécules. Ils se traduisent surtout par des actions vagolytiques telles que tachycardie et hypertension. Des molécules peuvent avoir des effets spécifiques : ainsi, la tachycardie observée au décours de l'administration du pancuronium résulte de l'antagonisme des récepteurs muscariniques cardiaques. L'exophtalmie est notée avec certains curares (suxaméthonium).

Un tableau récapitulatif des curares utilisés en France (collège national des enseignants du DES d'anesthésie réanimation cnear) est présenté en annexe 3.

4.7.1.2 Les molécules ganglioplégiques

Les molécules ganglioplégiques exercent une inhibition de l'influence du système nerveux végétatif (orthosympathique et parasymphathique) sur les organes qu'il innerve. Après administration d'un ganglioplégique à dose suffisante, l'excitation des fibres pré-synaptiques sympathiques et parasymphathiques devient inactive alors que l'excitation des fibres post-synaptiques entraîne une réponse de l'effecteur. Les effets observés sur les différents organes dépendent de la prédominance de l'effet sympathique ou parasymphathique : si le tonus sympathique prédomine sur le tonus parasymphathique, la suppression des deux influences se manifestera par des effets de type parasymphathique (vasodilatation = hypoTA). Inversement, si le tonus parasymphathique prédomine sur le tonus sympathique, la ganglioplégie entraînera un effet de type sympathique (tachycardie, mydriase, constipation, rétention urinaire).

Si la plupart des molécules connues ayant une action ganglioplégique sont des molécules naturelles, ces propriétés ont également intéressé l'industrie pharmaceutique pour leurs effets anti-hypertenseurs (Senanayake et Roman, 1992).

4.7.1.2.1 Les médicaments ganglioplégiques

Les médicaments à visée ganglioplégique sont principalement l'hexaméthonium, la pempidine, le pentolinium, le triméthaphan et la mécamylamine.

Ces molécules ont principalement été utilisées en thérapeutique comme anti-hypertenseurs. La plus utilisée a été la mécamylamine, avec une indication pour le traitement de l'hypertension artérielle modérée à sévère, et qui intéresse aujourd'hui l'industrie pour ses propriétés de blocage des effets récompenses de la nicotine (Nickell *et al.*, 2013). Les principaux effets indésirables de ces médicaments sont l'hypotension artérielle, tachycardie, sécheresse des muqueuses, constipation, nausées, hyperglycémie, hypokaliémie, diplopie, mydriase, somnolence, asthénie. En cas de surdosage, une majoration des effets indésirables survient, pouvant s'accompagner de crises convulsives (Young *et al.*, 2001).

4.7.1.2.2 Les molécules naturelles à effets ganglioplégiques

Les principales molécules naturelles exerçant un effet ganglioplégique sont des alcaloïdes de la famille des quinolizidines, comme la spartéine ou la pipéridine. On retrouve ces molécules notamment dans les plantes de la famille des fabacées comme les cytises (genêts...), ainsi que dans les graines de lupins.

La cytisine est cardio et neurotoxique, elle peut théoriquement être à l'origine d'une symptomatologie proche du syndrome cholinergique. En pratique, l'ingestion de graines n'est habituellement suivie que de vomissements isolés. Le délai d'apparition des symptômes est de 1 à 6 heures après l'ingestion.

Les signes cliniques les plus fréquemment rapportés sont : bouche sèche, constipation, abolition des bruits intestinaux, mydriase, troubles de l'accommodation, élévation de la pression intra-oculaire, diminution de la sécrétion lacrymale, tachycardie sinusale, risque de rétention urinaire, et de glaucome aigu en cas de glaucome à angle fermé. En cas de doses massives, excitation, confusion mentale, hallucination, hyperthermie, coma et dépression respiratoire ont été décrits. La dose létale est estimée à environ 10 g de graines, soit 100 mg d'alcaloïdes (Litkey et Dailey, 2007).

Il est intéressant de noter qu'une exposition chronique est neurotoxique et peut entraîner le développement de pathologies du motoneurone. De plus, des effets tératogènes ont été rapportés chez l'animal, ainsi que chez un enfant nourri au lait de chèvre ayant une nourriture à base de graines de lupins (aplasie lignée rouge, anomalies vasculaires et dyskinésie) (Ortega et Lazerson, 1987 ; Panter *et al.*, 1999).

A retenir :

Les curares-like se fixent comme la pinnatoxine sur la sous-unité alpha 7 du récepteur de l'actéylcholine. Les effets sont modifiés par des facteurs physiologiques, pathologiques, les interactions médicamenteuses. Ils donnent une paralysie musculaire flasque conduisant à l'arrêt respiratoire. L'aspect ganglioplégique des curares montre des signes de choc anaphylactique allergique de réactions histaminoides cutanées ou systémiques, d'atteinte ganglioplégiques, bradycardie, tachycardie, troubles du rythme cardiaque, hypertension artérielle, œdème pulmonaire et bronchospasme.

L'exposition aux médicaments et aux alcaloïdes naturels à effets ganglioplégiques entraîne une dysautonomie, incluant des variations de la tension artérielle et du rythme cardiaque. Une exposition à des doses importantes peut entraîner le décès du patient par arrêt cardio-respiratoire. Des notions de toxicités chroniques ont également été rapportées, et se traduiraient par des pathologies neuro-musculaires. Enfin, certains alcaloïdes passeraient dans le lait maternel chez l'animal, et entraîneraient des troubles développementaux, y compris chez l'enfant exposé.

4.7.2 Effets connus des antagonistes des récepteurs nicotiniques auto-immun : l'anticorps anti récepteur de l'acétylcholine et la maladie myasthénie

La myasthénie (*myasthenia gravis*) est la conséquence d'un bloc neuromusculaire postsynaptique. La cause en est une maladie auto-immune dont la cible est le RACH, récepteur de l'acétylcholine (Ito *et al.*, 1976 ; Vincent *et al.*, 1978 ; Vincent *et al.*, 2018). Les anticorps se fixent sur le RACH, pour la plupart en dehors du site de liaison à l'ACh. Le mode d'action de ces anticorps est complexe. Sur le versant présynaptique, la synthèse et le stockage de l'ACh s'effectuent normalement, de même que la sortie des quanta d'ACh dont la teneur en molécules d'ACh est normale. En revanche, il existe des anomalies post-synaptiques responsables d'une diminution de l'amplitude des potentiels de plaque motrice miniature dont la sommation ne parvient plus à provoquer un potentiel de plaque motrice suffisant pour déclencher un potentiel d'action musculaire : il y a perte de la marge de sécurité (Heinemann *et al.*, 1978 ; Lindstrom, 1978).

Par ailleurs il existe des myasthénies séronégatives dans lesquelles les anticorps anti-RACH, dont la présence est suggérée par des arguments indirects (transfert passif du bloc neuromusculaire à l'animal, efficacité des échanges plasmatiques), ne peuvent être mis en évidence par les méthodes habituelles de dosage.

Les symptômes de la myasthénie sont moteurs purs, fluctuants, aggravés par l'effort, améliorés par le repos. Les symptômes sont déclenchés par la perte de la marge de sécurité au niveau d'un couple nerf muscle : le potentiel de plaque devient inférieur au seuil nécessaire pour déclencher le potentiel d'action. Dans près de la moitié des cas, les premières manifestations sont purement oculaires avec ptosis et diplopie, mais après un an d'évolution chez 80 à 90% des patients, d'autres territoires sont affectés, muscles pharyngo-laryngés et/ou muscles des membres et/ou muscles respiratoires : la myasthénie est alors généralisée. La fluctuation des symptômes, la normalité de l'examen clinique possible amènent à banaliser les signes et à une errance diagnostique importante, d'autant que la fatigue est un signe banal de motif de consultation en médecine générale (Engstrom, 2004 ; Newsom-Davis, 2004 ; Scherer *et al.*, 2005).

Le terrain ou la situation clinique sous-jacente est un facteur de susceptibilité à la présentation des signes cliniques d'atteinte de la jonction neuromusculaire. Certains médicaments sont connus comme aggravants la maladie (plus de 200), et pourraient être facteurs de susceptibilité vis-à-vis de la toxine, dont les bêtabloquants et les benzodiazépines (https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_2048404/fr/pnds-myasthenie-autoimmune)

La femme enceinte court un risque d'arthrogrypose pour l'enfant à venir (Barnes *et al.* 1995, Dinger et Prager 1993). Le taux d'anticorps maternel n'est pas lié au risque d'arthrogrypose, un antécédent de naissance avec arthrogrypose majore le risque pour les grossesses suivantes.

Sur le long terme des tableaux d'atteinte du muscle se développent, camptocormie, amyotrophie de la langue (Farrugia *et al.* 2006).

A retenir :

La maladie de la jonction neuromusculaire myasthénie est le modèle clinique le plus vraisemblable qui pourrait correspondre à l'intoxication par les PnTX. Les signes cliniques de la myasthénie sont ceux d'un déficit moteur fluctuant aggravé par l'effort. Le risque du retard diagnostic est la détresse respiratoire, d'autant que le patient est à risque. Le diagnostic est difficile et nécessite un plateau technique d'hôpital. La maladie myasthénie ne comporte pas de signes de dysautonomie.

L'association ganglioplégie signes neuromusculaires fluctuants chez l'Homme, de type myasthénie, doit pouvoir interpeller le clinicien sur une possible cause des symptômes liée à une toxine.

4.7.3 Effets connus en central chez l'humain des mutations des récepteurs nicotiniques

Les PnTX sont des ligands des récepteurs centraux $\alpha 7$ en pré-synaptique, avec un effet antagoniste. Les RnACh $\alpha 7$ sont fortement exprimés dans l'hippocampe, où ils sont retrouvés en pré-synaptique sur des interneurons GABAergiques ainsi que sur des cellules pyramidales glutamatergiques. Dans l'hippocampe, ainsi que dans d'autres zones du cerveau, les récepteurs $\alpha 7$ pré-synaptiques facilitent la libération du glutamate ; ce sont les seuls nAChR qui modulent la libération de ce neurotransmetteur. Cette augmentation de la libération de neurotransmetteurs est due en partie à l'afflux de Ca^{2+} à travers le canal $\alpha 7$ hautement perméable lui-même, et aussi par l'initiation de la libération de calcium induite par le calcium à partir des réserves internes. Le glutamate neurotransmetteur excitateur est impliqué dans la genèse des crises d'épilepsie (Conroy *et al.*, 1992 ; Galzi *et al.*, 1991 ; Harsing *et al.*, 1992).

Les récepteurs $\alpha 4\beta 2$ modulent la libération de dopamine et sont impliqués dans la dépendance à la nicotine. Les récepteurs $\alpha 4\beta 2$ modulent également la libération de GABA à la fois dans l'hippocampe et dans la zone tegmentale ventrale. Ce contrôle de la neurotransmission inhibitrice peut expliquer le rôle joué par les récepteurs $\alpha 4\beta 2$ dans l'épilepsie (Klink *et al.*, 2001 ; Raggenbass et Bertrand, 2002).

L'épilepsie est liée aux récepteurs nicotiniques.

A retenir :

Une canalopathie liée à une mutation du récepteur nicotinique alpha 7 est à l'origine de crise d'épilepsie. Par analogie, le blocage du récepteur alpha 7 par les pinnatoxines pourrait entraîner une crise convulsive chez l'Homme comme observé dans les études de toxicité chez la souris (paragraphe 4.1.2)

4.7.4 Effets connus en central et périphérique de l'activation sur la moelle épinière

Les récepteurs $\alpha 4\beta 2$ et l' $\alpha 7$ semblent se trouver dans les neurones pyramidaux qui se projettent vers des cibles sous-corticales. L'ACh pourrait ainsi avoir un rôle facilitateur de la libération glutamatergique excitatrice du cortex et de la cellule de Renshaw, un interneurone GABAergique localisé dans la moelle épinière, qui présente des réponses nicotiniques synaptiques, provoquées par une stimulation cholinergique en provenance du motoneurone (Bravo et Karten, 1992 ; Dourado et Sargent, 2002).

Les interneurons cholinergiques de la moelle sont capables de générer l'activité locomotrice. Adjacents à ce système somatique, sont situés des neurones de sortie du système nerveux sympathique appelés neurones sympathiques intermédiolatéraux ou IML qui, entre autres organes cibles, connectent les fibres lisses des artères (Sourioux *et al.*, 2018). L'activation de neurones cholinergiques intraspinaux, en produisant un rythme lent commun aux deux types de neurones, serait responsable de la mise en cohérence « activités somatiques et autonomes ». L'administration d'acétylcholine ou d'agoniste des RnACh, en intramédullaire, engendre une fusion des activités motoneurones et neurones sympathiques contribuant à la régulation de la pression artérielle lors d'un exercice.

A retenir :

Le blocage des RnACh en intramédullaire pourrait générer chez l'animal une extension de la patte (équivalent d'un signe pyramidal ou signe de Babinski) accompagnée d'une dérégulation de la tension artérielle. Dans les études de toxicité de la PnTX G chez la souris, une extension de la patte est observée.

5 Contamination du milieu par *Vulcanodinium rugosum* et les pinnatoxines

5.1 Distribution géographique de *Vulcanodinium rugosum* et des pinnatoxines

Après avoir été observé en Nouvelle Zélande (Port de Rangaunu), en France (lagune d'Ingril), *V. rugosum* a été retrouvé dans des échantillons de sédiments et sur des macrophytes de l'île d'Okinawa au Japon (Smith *et al.*, 2011). Dans le même temps, cet organisme a été décrit dans les eaux australiennes (Port de Franklin) en 2011 et 2012 (Munday *et al.*, 2012 ; Rhodes *et al.*, 2011). En 2012, Zeng *et al.* (2012) ont identifié *V. rugosum* dans le sud de la Mer de Chine à partir d'échantillon de sédiments. Plus récemment en 2013, *V. rugosum* a été observé dans les eaux de l'océan Pacifique au Mexique (Hernandez-Becerril *et al.*, 2013).

Bien que le dinoflagellé n'ait pas été observé, *V. rugosum* est suspecté être à l'origine de la contamination par des PnTX de coquillages des côtes norvégiennes (Rundberget *et al.*, 2011) et de la côte est du Canada (McCarron *et al.*, 2012).

Suite à une intoxication alimentaire collective survenue sur la côte ouest du Canada en 2011 après consommation de moules (*Mytilus californianus*) une investigation a été menée pour tenter d'identifier l'agent causal. La contamination de ces moules a été reliée à une efflorescence de *Dinophysis* spp. L'analyse a permis d'identifier la présence en majorité de DTX1, mais le cortège toxique comportait des traces de GYM, SPX1 et peut être de la PnTX G. Néanmoins, du fait de sa faible teneur, les auteurs ont précisé que l'identité de PnTX G n'a pas pu être confirmée « sans ambiguïté » (McCarron *et al.* 2014).

En 2013, *V. rugosum* a été identifié dans le Golfe Persique (Al Muftah *et al.*, 2016) et en 2015 à Cuba dans la baie de Cienfuegos (Moreira-Gonzalez *et al.*, 2018). Il est suspecté d'être à l'origine de lésions cutanées de baigneurs.

Par ailleurs, les PnTX ont également été mises en évidence en 2010, en Irlande, sur des échantillonneurs passifs (McCarthy *et al.*, 2015) sans que la micro-algue productrice n'ait été observée.

Enfin, Rambla-Alegre *et al.* (2018) ont analysé 96 échantillons de coquillages mis sur le marché dans plusieurs pays d'Europe et ont quantifié de la PnTX G dans des moules, des huîtres, des palourdes, à l'état frais ou transformé, provenant d'Espagne, Slovaquie, Italie, Irlande et de Norvège (détails dans le tableau 18).

La répartition mondiale *V. rugosum* et des PnTX rapportée à ce jour est illustrée dans la figure 17.



Figure 17 : Présence rapportée de PnTX et/ou de *Vulcanodinium rugosum* dans le monde (modifié d'E. Abadie, Ifremer)

Les couleurs des symboles sur la carte indiquent quelle PnTX (PnTX A à H) est détectée dans les cellules de *V. rugosum* dans la zone géographique étudiée (ronds), seulement dans les coquillages (carrés), seulement dans les échantillonneurs (triangles).

passifs (triangles). Les étoiles marquent la présence de cellules de *V. rugosum* mais aucune analyse de PnTX n'a été réalisée.

5.1.1 Etang d'Ingril

En juin 2006, dans le cadre de la surveillance officielle des zones de production de coquillages (REPHY), des bioessais sur souris ont été réalisés sur des échantillons de moules de cette lagune lors d'une alerte liée à la présence de *Dinophysis acuminata*, espèce productrice de toxines lipophiles (DSP). La méthode utilisée était issue du protocole mis au point par Yasumoto et modifiée pour éviter les interférences avec d'éventuelles toxines de type PSP (Yasumoto *et al.*, 1978). Le temps de survie des souris était compris entre 27 et 32 minutes avec des symptômes neurologiques (différents de ceux observés lors des épisodes à toxines PSP). Le phénomène a été observé pendant 4 semaines. Aucune espèce de microalgue dont les toxines pourraient expliquer les symptômes des souris (de type neurologique) n'a pu être identifiée dans les échantillons d'eau.

Du fait de cette toxicité de type neurotoxique, il a été décidé de réaliser en 2007, dès le début du mois de juin, des bioessais sur souris pour suivre un éventuel épisode de contamination, et ce même en l'absence d'espèce phytoplanctonique potentiellement toxique (dérogation au protocole REPHY). Le phénomène de la neurotoxicité chez les souris a été détecté jusqu'au 10 septembre 2007. Aucune espèce phytoplanctonique toxique pouvant expliquer ce phénomène n'a pu être mise en évidence.

Les années suivantes (2008 et 2009) n'ont fait que confirmer le phénomène et montrer son expansion temporelle (allongement vers la période automnale et de début d'hiver). En effet, en 2008 cette toxicité a été détectée du 19 mai au 4 novembre et pour 2009 du 15 juin au 17 novembre (fréquence d'analyse hebdomadaire pendant toute la période où le bioessai sur souris provoquait la mort des souris). Le bioessai sur souris a été arrêté au 1^{er} janvier 2010 dans le cadre de la surveillance officielle (REPHY) mais il a été conservé jusqu'au 31 décembre 2017 dans le cadre de la veille d'urgence des biotoxines marines.

Le début du phénomène semble être limité par une température de l'eau trop faible (inférieure à 20°C). En moyenne, la température atteint 20°C au mois de mai dans la lagune d'Ingril (Abadie *et al.*, 2016). Or, cette température seuil de 20°C a été décrite comme la température limite basse de croissance de *V. rugosum* (Abadie *et al.*, 2016). Par contre, l'allongement du phénomène alors que les eaux sont redevenues fraîches (inférieures à 20 °C entre les mois septembre et octobre) laisse à penser que la question de la décontamination naturelle des moules se pose.

Dès l'identification de la PnTX G en 2011, une analyse rétrospective des échantillons de 2009 à 2012 a permis d'observer une cinétique de la contamination des coquillages en fonction du temps. Les concentrations maximales annuelles ont été de 261, 1244, 568 et 652 µg/kg chair totale de moules pour 2009, 2010, 2011 et 2012 respectivement. Les concentrations dans les moules sont supérieures à celles observées dans les palourdes, lorsque les coquillages sont prélevés simultanément.

Ces résultats confirment l'hypothèse que l'allongement temporel du phénomène de mortalité des souris avec des signes neurotoxiques était lié en grande partie à la présence de la PnTX G en concentration supérieure à la limite de détection par le bioessai sur souris (40 µg/kg de chair totale de coquillage) et que les valeurs en PnTX dans les coquillages sont très élevées.

Cette lagune a fait l'objet d'un suivi hors protocole REPHY en 2013. Les teneurs en PnTX ont été mesurées dans la chair de moule. Les résultats montrent que le phénomène est installé dans cette lagune et que les teneurs en PnTX G restent très importantes avec une valeur maximale de 887 µg/kg de chair totale mesurée en septembre 2013. Le réseau de veille sanitaire, informé des résultats, n'a pas détecté d'intoxication particulière dans le périmètre de cette lagune. Mais la ressource en moules étant très limitée, cette absence d'effet rapporté chez l'Homme pourrait être due à la non consommation des moules ou au fait que la survenue de symptômes de type neurotoxique ne soit pas associée à la consommation de moules par le malade et/ou le médecin.

Pour permettre de suivre ce phénomène et de maintenir une veille sur les PnTX, un prélèvement mensuel de moules d'Ingril a été réalisé entre 2013 et 2017. Les résultats montrent que les pics de PnTX sont observés entre juin et septembre mais les maxima varient selon l'année (887 en 2013, 918 en 2014, 1143 en 2015, 600 en 2016 et 640 en 2017 ; teneur exprimée en µg/kg de chair totale).

Des analyses statistiques ont été réalisées avec les données de PnTX G dans les moules d'Ingril de 2010 à 2017 (0 à 5 prélèvements mensuels selon les années).

- Les résultats (Tableau 12, Figure 18) ne montrent pas de différence statistiquement significative entre les années ($p = 0,403$, test non paramétrique de Kruskal-Wallis ($\alpha = 5\%$) avec Sigmaplot V12.5).

Tableau 12 : Teneurs en PnTX G dans la chair totale de moules d'Ingril, de 2010 à 2017

Année	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
Nb valeur	30	32	24	12	27	2	13	10
min	45,38	36,60	10,99	49,46	22,55	572	43,98	52,90
max	1244,00	567,64	652,04	886,73	918,00	1143	600,39	640,00
moyenne	223,12	226,96	208,89	292,84	247,00	857,5	277,88	294,26
mediane	103,49	194,77	139,44	225,15	136,10	-	270,60	209,82

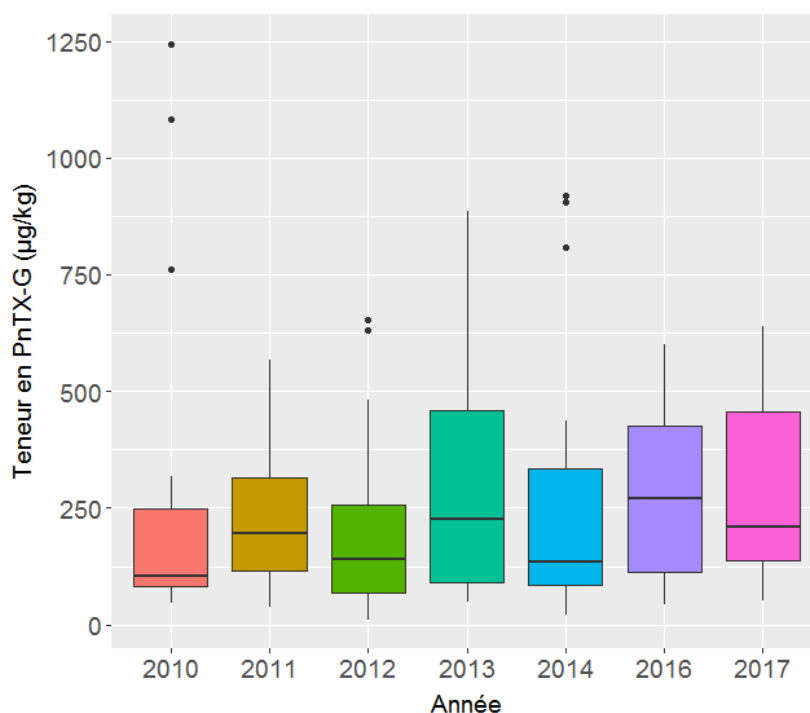
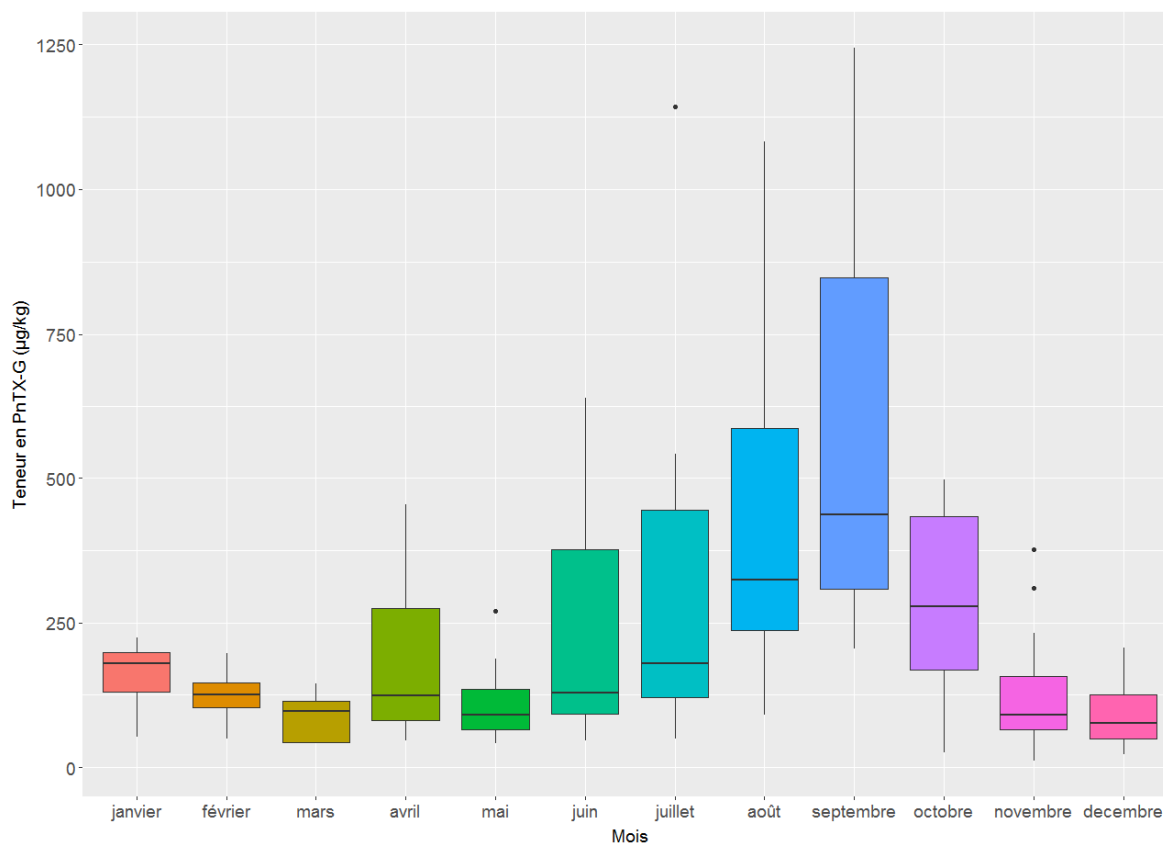


Figure 18 : Teneur en PnTX G dans la chair totale de moule par an de 2010 à 2017. La boîte à moustaches représente la médiane, le P25 et le P75. L'Année 2015 n'est pas représentée car elle ne comportait que 2 valeurs.

- Les résultats montrent une différence statistiquement significative entre les mois (Tableaux 13 et 14, Figure 19). Cependant, cette différence statistique n'a pas nécessairement de réalité « terrain » ($p < 0,001$, comparaison deux à deux méthode de Dunn).

Tableau 13 : Teneurs en PnTX G dans la chair totale de moules d'Ingril par mois de 2010 à 2017

Mois	Janvier	Février	Mars	Avril	Mai	Juin	Juillet	Août	Septembre	Octobre	Novembre	Décembre
Nb valeur	7	4	5	5	18	19	14	15	15	19	17	12
min	52.01	49.79	42.70	45.45	41.72	45.38	49.46	90.22	204.86	25.49	10.99	22.55
max	224.06	196.72	145.00	454.00	270.60	640.00	1143.00	1082.00	1244.00	496.49	376.53	207.05
moyenne	159.23	124.14	88.47	195.92	106.09	239.36	311.15	413.76	570.91	293.59	123.45	94.12
mediane	180.00	125.03	97.39	123.85	90.17	128.87	179.89	324.04	437.00	278.00	91.10	76.86

**Figure 19 : Teneurs en PnTX G dans la chair totale de moules d'ingril par mois de 2010 à 2017****Tableau 14 : Tableau des comparaisons entre mois selon la méthode de Dunn (** significatif p<0,05)**

groupe	janvier	février	mars	avril	mai	juin	juillet	août	septembre	octobre	novembre	décembre
janvier												
février												
mars									**			
avril												
mai							**	**	**			
juin			**		**		**	**	**	**	**	**
juillet			**		**			**	**	**	**	**
août					**					**	**	**
septembre			**		**	**	**			**	**	**
octobre					**						**	**
novembre							**	**	**			
décembre							**	**	**			

- Les résultats montrent une différence statistiquement significative entre les saisons. Les teneurs sont significativement plus élevées en été (juillet, août, septembre) par rapport au trois autres saisons : hiver (janvier, février, mars), printemps (avril, mai et juin), automne (octobre, novembre et décembre) (p <0,001).

Parallèlement à ces suivis dans les moules, une recherche de PnTX G a été réalisée dans quelques échantillons de palourdes d'Ingril (n = 20) prélevés en 2010 (mai à novembre), 2011 (juillet à décembre) et 2012 (mars). Les résultats montrent que les palourdes accumulent moins la PnTX G que les moules, entre 7 et 8 fois moins pour les mêmes dates de prélèvement (Hess *et al.*, 2013). Cela confirme le rôle sentinelle des moules pour la surveillance.

- Les teneurs en PnTX G sont statistiquement plus élevées ($p < 0,05$) (voir annexe 5) dans les moules que dans les palourdes d'Ingril (Tableau 15 et Figure 20).

Tableau 15 : Teneurs en PnTX G dans la chair totale de moules et de palourdes d'Ingril de 2010 à 2012

Matrice	Moules	Palourdes
Nb valeurs	150	20
min	10,99	13,56
max	1244,00	95,34
moyenne	249,49	28,09
mediane	158,52	23,25

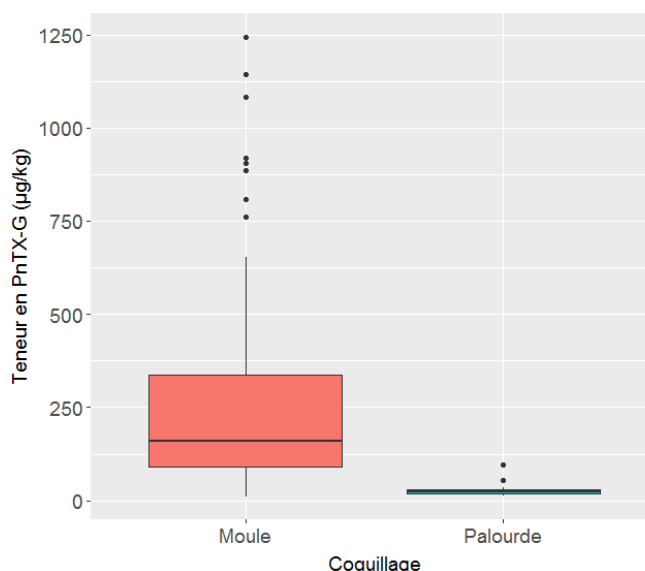


Figure 20 : Teneurs en PnTX G dans la chair totale de moules et de palourdes d'Ingril de 2010 à 2012

5.1.2 Autres lagunes méditerranéennes

En complément du suivi conduit sur l'étang d'Ingril, la PnTX G a été recherchée dans des échantillons de moules sauvages de quatre autres lagunes méditerranéennes en 2013 (Tableaux 16 et 17, Figure 21).

Une différence statistiquement significative de la concentration en PnTX G selon les lagunes a été observée, avec des valeurs maximales croissantes dans le sens Parc Leucate (11 µgkg de chair totale) → Thau (15 µgkg) → Prévost (54 µgkg) → Vic (89 µgkg) → Ingril (887 µgkg).

Tableau 16 : Teneurs en PnTX G dans la chair totale de moules prélevées dans différentes lagunes méditerranéennes en 2013

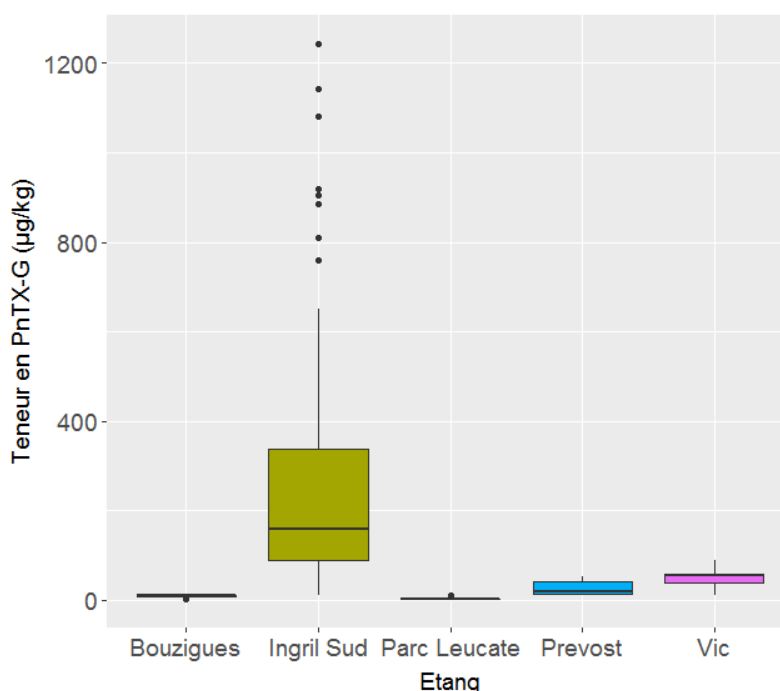
Lagune	Vic	Prévost	Parc Leucate	Thau (Bouzigues)	Ingril
Nb valeurs	11	12	12	11	12
min	12,29	11,77	0,68	1,40	49,46
max	88,98	53,87	10,71	14,72	886,73
moyenne	48,40	26,18	3,39	10,02	292,84
mediane	55,45	19,83	2,68	10,54	225,15

Tableau 17 : Tableau de comparaisons entre lagunes, méthode de Dunn (significatif p value <0.05)**

	Vic	Prévost	Parc Leucate	Bouzigues	Ingril
Vic			**	**	
Prévost			**		**
Parc Leucate	**	**			**
Thau	**				**
Ingril		**	**	**	

Le GT souligne que des concentrations quantifiables dans les moules ont été trouvées dans toutes les lagunes. Les concentrations les plus faibles détectées à Thau et à Leucate suggèrent que la taille de la lagune ou la situation du point de prélèvement (en pleine eau) influence l'accumulation. L'étang d'Ingril étant la lagune la moins profonde, les températures y sont plus fortes en été permettant ainsi un développement plus intense de *V. rugosum*.

Il est intéressant de rappeler que les lagunes de Thau, Vic et Prévost sont en relation avec la lagune d'Ingril via le Canal du Rhône à Sète. L'étang de Leucate n'est pas en relation direct avec les autres lagunes mais du fait de l'activité conchylicole qui s'y opère, les relations avec Thau sont nombreuses. L'étang d'Ingril ne possède pas de parc d'élevage comme la lagune de Thau. Cependant, des quantités non négligeables de palourdes sont pêchées dans cette lagune (pêche professionnelle). Elles sont régulièrement stockées en bassins à terre situés autour de la lagune de Thau. Ces bassins pompent de l'eau de Thau en continu et rejettent en continu cette eau. De plus, il existe aussi dans Ingril une activité dite de pré-grossissement des huîtres creuses qui sont destinées aux ostréiculteurs de Thau. En considérant que les échanges entre Thau et Leucate sont nombreux et fréquents, la dissémination de *V. rugosum* à Leucate est possible.

**Figure 21 : Teneurs en PnTX G dans la chair totale de moules sauvages en 2013 dans différentes lagunes méditerranéennes**

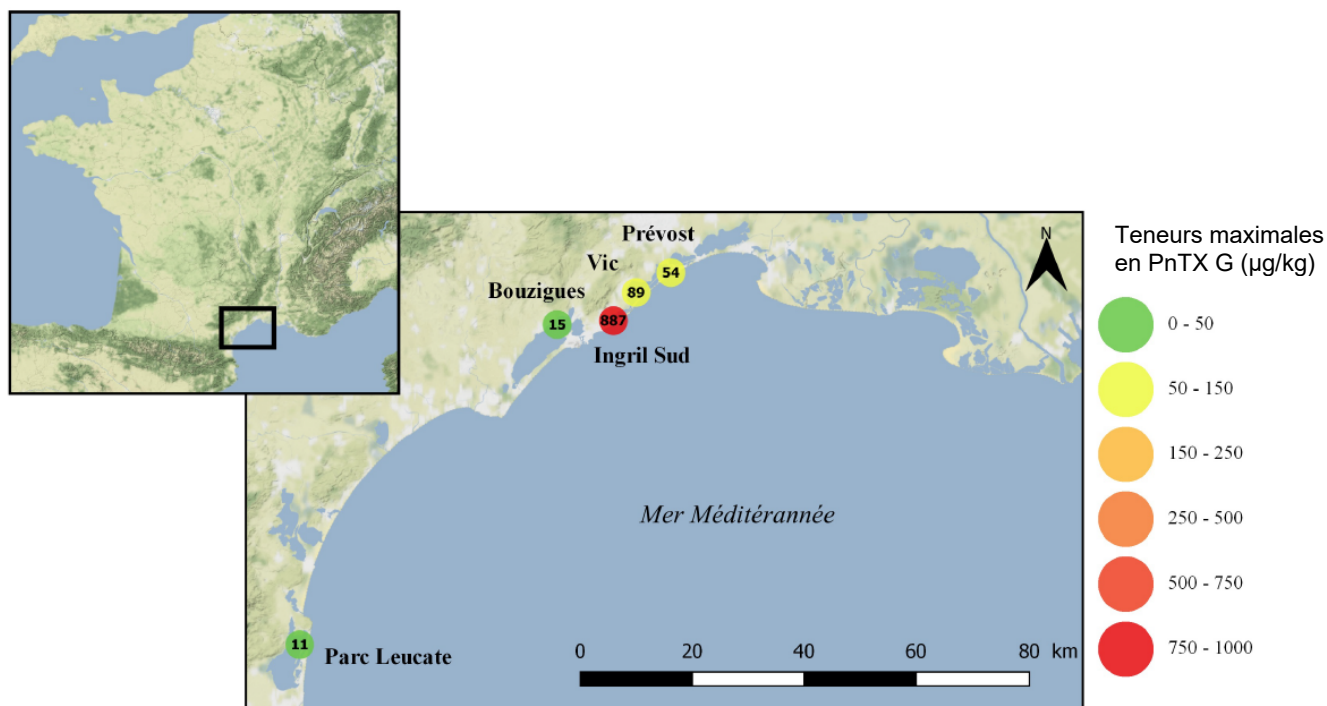


Figure 22 : Cartographie des teneurs maximales en PnTX G dans la chair totale de moules sauvages en 2013

5.1.3 Cote atlantique et Corse

Un dispositif de « Veille d'émergence des biotoxines marines dans les coquillages » (EMERGTOX) a été mis en place par la DGAL en complément des dispositifs nationaux de surveillance des toxines réglementées (REPHYTOX, plan de surveillance de la DGAL). Il a pour objet la mise en évidence d'un éventuel danger lié à la présence dans les coquillages de toxines connues réglementées et non réglementées, répertoriées en France ou pouvant être introduites en France via les eaux de ballast ou les échanges commerciaux entre pays. Ce dispositif concerne onze zones de production de mollusques bivalves réparties sur tout le littoral français métropolitain.

Dans le cadre de ce dispositif, depuis le 1^{er} janvier 2018, les PnTX A, E, F et G sont systématiquement recherchées mensuellement dans les glandes digestives (GD) de mollusques bivalves (huîtres ou moules).

Sur les onze zones suivies, trois (Ingril, Le Scoré en Bretagne et l'étang de Diana en Corse) ont été concernées par la présence de PnTX en 2018, majoritairement la PnTX G et faiblement par la PnTX A (uniquement à Ingril). Des trois zones impactées, la lagune d'Ingril reste la zone la plus fortement contaminée (avec des concentrations détectées tous les mois, variant de 40 à 2614 µg PnTX G/kg GD). Les teneurs trouvées au Scoré et à Diana sont faibles (maximum autour de 10 µg PnTX G/kg GD). Les concentrations en PnTX A détectées à Ingril varient entre 6 et 32 µg/kg GD.

Il apparaît important au GT de signaler que la présence de PnTX en France ne se limite pas aux lagunes méditerranéennes. Et compte tenu du réchauffement climatique rendant les conditions écophysiologiques favorables au développement de *V. rugosum*, il convient de rester vigilant pour la côte atlantique puisque la détection de PnTX dans les moules traduit la présence de ce dinoflagellé dans ces eaux.

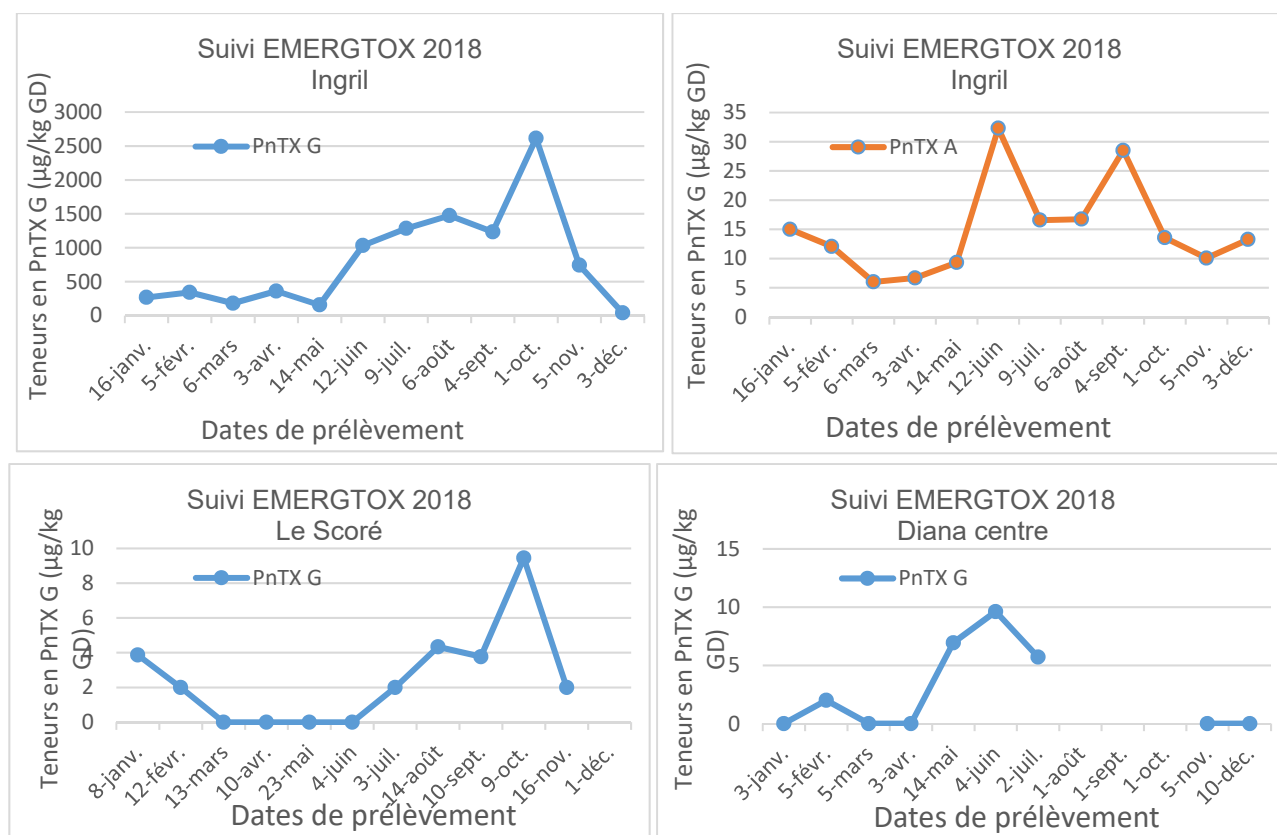


Figure 23 : Teneurs en PnTX G dans les glandes digestives de moules prélevées dans le cadre du suivi EMERGTOX 2018

5.1.4 Hors de France

L'analyse bibliographique menée par le GT a identifié très peu de données publiées sur les teneurs en PnTX dans les coquillages, provenant d'Europe du nord et du sud, du Canada et de Nouvelle-Zélande (Tableau 18).

Tableau 18 : Teneurs en PnTX dans les coquillages (données de la littérature)

Référence	PnTX	Espèces	Origine	Concentrations µg/kg poids frais
Mc Kenzie et al., 2011	PnTX A PnTX D PnTX E PnTX F PnTX G	Huîtres creuses (<i>Crassostrea gigas</i>), n = 3 Gastéropodes (nombre d'échantillons non précisé) : Lièvre de mer (<i>Bursatella leachii</i>) Buccin (<i>Cominella glandiformis</i>) Escargot de mer (<i>Zeacumantus lutulentus</i>)	Nouvelle Zélande	Huîtres : PnTX E : teneur moyenne d'environ 100 µg/kg PnTX F : teneur moyenne d'environ 100 µg/kg PnTX D : traces détectées à 3 µg/kg. Lièvre de mer (un seul résultat présenté) : PnTX E : 1391 µg/kg PnTX F : 1186 µg/kg PnTX D : traces détectées à 1 µg/kg. Buccin (un seul résultat présenté) : PnTX E : 169 µg/kg PnTX F : 119 µg/kg PnTX D : 50 µg/kg Escargot de mer (un seul résultat présenté) : PnTX E : 385 µg/kg PnTX F : 102 µg/kg PnTX D : 29 µg/kg Limites de détection/quantification non renseignées PnTX G et A non quantifiées

Référence	PnTX	Espèces	Origine	Concentrations µg/kg poids frais
Rundberget, et al., 2011	PnTX G	Moules communes (<i>Mytilus edulis</i>), n = 166 Plus de 30 points de prélèvement (programme national de surveillance des zones de production)	Norvège	PnTX G détectée dans 69% des échantillons, 23% > 10 µg/kg Moyenne : 8 µg PnTX G /kg Maximum : 115 µg PnTX G/kg PnTX A : teneurs correspondant à environ 1% celles de PnTX G Limites de quantification : 0,5 µg/kg
Mc Carron et al., 2012	PnTX G PnTX A	Moules communes (<i>Mytilus edulis</i>) de la côte atlantique, programme national de surveillance des coquillages, n = 1010, de 97 zones de production de coquillages Analyses par pool de 12 moules	Canada	PnTX G : détectée dans 100% des échantillons Moyenne = 12 µg/kg Maximum : 83 µg/kg 16 échantillons ont été re-analysés avant et après hydrolyse. Selon les zones de production, teneurs de 0,3 à 41 µg/kg avant hydrolyse et de 0,7 à 108 µg/kg après hydrolyse PnTX A : détectée dans 87,5% des échantillons PnTX A : environ 3% de teneurs de PnTX G 16 échantillons ont été re-analysés avant et après hydrolyse Selon les zones de production, teneurs de « non détecté » à 1,6 µg/kg avant hydrolyse et de non détecté à 42 µg/kg après hydrolyse Limite de quantification ≈ 1 µg/kg
Mc Nabb et al., 2012	PnTX A PnTX D PnTX E PnTX F PnTX G	Huîtres creuses (<i>Crassostrea gigas</i>), n = 11 échantillons de 1993 à 2008, du programme national de surveillance ayant montré des effets neurotoxiques dans le bioessai sur souris	Nouvelle Zélande	PnTX D : 0,8 à 3,9 µg/kg PnTX E : 10 à 126 µg/kg PnTX F : 1,6 à 68 µg/kg PnTX G et A < 10 µg/kg Limites de détection/quantification non renseignées
Garcia-Altares et al., 2014	PnTX G	Moules (<i>Mytilus galloprovincialis</i>) n=14 Huîtres (<i>Crassostrea gigas</i>) n=8	Catalogne Espagne	PnTX G détectées dans 7/14 échantillons de moules, aucun des 8 échantillons d'huîtres Dans les 7 échantillons avec PnTX G : teneurs comprises entre 2,2 et 59 µg/kg Limite de quantification : 0,3 µg/kg (moules), 0,9 µg/kg (huîtres)
Rambla Alegre et al., 2018	PnTX G PnTX A PnTX E PnTX F PtTX	46 échantillons frais : Huîtres du pacifique (<i>C. gigas</i>) n=4 Huîtres plates (<i>O. edulis</i>) n=6 Palourdes japonaises (<i>V. philippinarum</i>) n=5 Palourdes (<i>R. decussatus</i>) n=1 Patagos (<i>S. solida</i>) n=3 Moules (<i>M. galloprovincialis</i>) n=7 Moules communes (<i>M. edulis</i>) n=10 Coques (<i>C. edule</i>) n=4 Pétoncle (<i>A. irradians</i>) n=2 Couteau (<i>E. arcuatus</i>) n=1 + 50 produits transformés : Moules (<i>M. Galloprovincialis</i>), congelées, fumée et en conserve, en saumure, à la tomate, n= 9 Moules communes (<i>M. edulis</i>) congelées, fumée et en conserve, en saumure, en sauce tomate, n= 12	Irlande Pays-bas Danemark Norvège Italie Portugal Espagne Slovénie	PnTX G quantifiée dans 4,2% des échantillons, non quantifiée dans 31,2% des échantillons Limite de quantification PnTX G = 3 µg/kg Dans les coquillages frais : Moule d'Espagne : 4 µg/kg Huître de Slovénie : 4 µg/kg Palourde d'Italie : 4 µg/kg Moule d'Irlande : 4,6 µg/kg Moules de Norvège : 3,5 et 5,1 µg/kg Dans les produits transformés (conserves / surgelées / saumure/ fumaison) : Moules surgelées/conserves d'Italie : 3 et 4 µg/kg Moules surgelées/conserves e Slovénie : 3 µg/kg Moules surgelées/conserves d'Espagne : 4 µg/kg Moules à la tomate en conserve de Slovénie : 5 et 12 µg/kg Moules en eau salée en conserve d'Espagne : 6 µg/kg PnTX A détectée dans un seul échantillon de moule d'Irlande à 0,3 µg/kg PnTX E et F : non détectées dans les échantillons PtTX : non détectées dans les échantillons

Référence	PnTX	Espèces	Origine	Concentrations µg/kg poids frais
		Huîtres (<i>C. gigas</i>) congelées/ fumées/ conserves n=7 Crabes du Vietnam (en conserves), n=1 Patagos (<i>S. solida</i>) n=1 Moules (<i>M. galloprovincialis</i>) n=7 Moules communes (<i>M.</i> <i>edulis</i>), n=10 Coques (<i>C. edule</i>) n=1 Pétoncle (<i>A. irradians</i>) n=2 Couteau (<i>E. arcuatus</i>) n=1 Palourdes congelées (<i>R.</i> <i>decussatus</i>) n=11 Moules congelées (<i>Perna</i> <i>canaliculus</i>) n=1 Palourdes japonnaises en saumure (<i>V. philippinarum</i>), n=6		

Parmi les 6 études examinées, les teneurs en PnTX G les plus élevées rapportées dans des moules sont de 115 µg/kg en Norvège (Rundberget *et al.*, 2011), 83 µg/kg au Canada (Mc Carron *et al.*, 2012) et 59 µg/kg en Espagne (Garcia-Altare *et al.*, 2014). Ces teneurs sont plus faibles que les teneurs maximales annuelles rapportées en France dans la lagune d'Ingril (entre 261 et 1244 µg/kg selon les années).

Il convient de noter que l'étude de Rambla-Alegre *et al.* (2018) rapporte la persistance de PnTX G dans des échantillons de moules en conserve (jusqu'à 12 µg/kg).

La présence de PnTX E et PnTX F dans des huîtres en Nouvelle-Zélande, environ 100 µg/kg dans l'étude de MacKenzie *et al.* (2011) et jusqu'à 126 µg PnTX E/kg dans l'étude de Mc Nabb *et al.* (2012), souligne l'intérêt de surveiller la présence de ces toxines dans les huîtres produites en France. A noter qu'en Nouvelle-Zélande, les huîtres ne contenaient pas de PnTX G ni de PnTX A.

Enfin, les teneurs élevées de PnTX E et F observées dans certains gastéropodes de Nouvelle-Zélande (jusqu'à 1391 et 1186 µg/kg respectivement, MacKenzie *et al.*, 2011) indiquent que d'autres organismes marins que les mollusques bivalves sont capables de concentrer ces toxines.

Le GT a eu accès à des données non publiées fournies par les autorités australiennes. Une étude conduite entre 2007 et 2009 a recherché les teneurs en PnTX (A, D, E et G) sur quinze sites contenant des huîtres creuses. Les PnTX G et F sont les deux toxines les plus fréquemment observées. La PnTX G présente la teneur maximale sur la période avec 210 µg/kg suivie par la PnTX D avec 140 µg/kg, la PnTX F avec 90 µg/kg, la PnTX E avec 78 µg/kg et la PnTX A avec 55 µg/kg. La figure 24 illustre la variabilité des teneurs dans les huîtres pour la PnTX G, qui est importante entre les sites et entre les années. Toutefois, les teneurs les plus élevées sont observées pendant l'été austral.

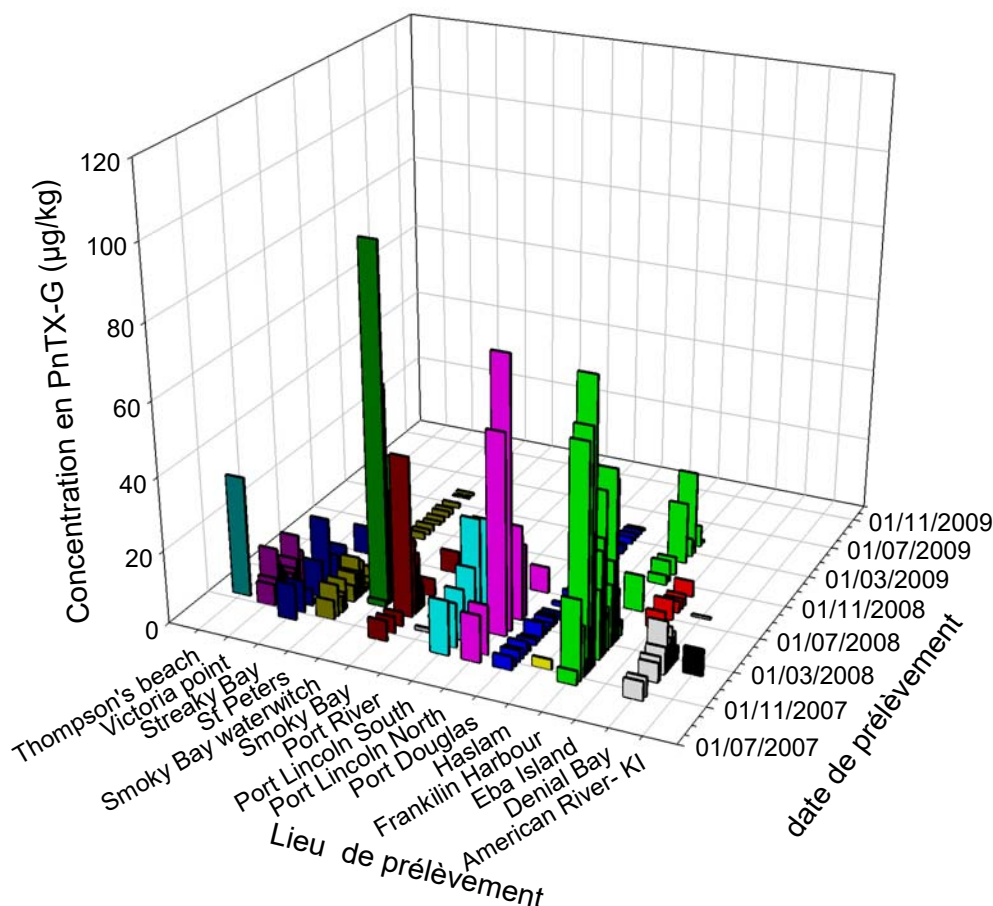


Figure 24 : Concentration en PnTX G d'août 2007 à avril 2009 dans des huîtres de plusieurs sites australiens (Communication Clinton Wilkinson South Australian Shellfish Quality Assurance Program, analyses réalisées par le Cawthron Institute NZ)

Enfin, l'Anses a adressé un questionnaire au réseau des points focaux de l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) le 15 février 2018, auquel 16 Etats membres ont répondu. Au moment de la demande, aucune agence sanitaire ayant répondu n'avait conduit d'évaluation des risques liés aux PnTX. En complément de publications déjà identifiées par le GT, il a été fait mention de données non publiées de contamination dans les coquillages, sans qu'il soit possible par le GT d'évaluer la fiabilité des méthodes employées : la Grèce a évoqué la présence PnTX G dans les coquillages de 0,2 à 3,5 µg/kg (jusqu'à 6,2 µg/kg pendant l'hiver), plus rarement la PnTX E (de 0,2 à 2,0 µg/kg) et la PnTX F (de 0,1 à 0,4 µg/kg en hiver). L'Italie a mentionné la présence de PnTX G à 7,3 µg/kg dans un échantillon de moules de l'est de la Sardaigne en 2016. L'Irlande rapporte avoir détecté des traces de PnTX G dans des coquillages (valeurs et espèce de coquillage non transmises).

En conclusion, les concentrations en PnTX G mesurées dans des moules d'Ingril sont les plus élevées rapportées à ce jour dans le monde.

5.2 Echantillonneurs passifs

Les échantillonneurs passifs, aussi appelés SPATT (Solid Phase Adsorption Toxin Tracking), sont des dispositifs permettent de détecter des biotoxines marines sous forme dissoute dans leur environnement aquatique. Comme les extraits obtenus sont beaucoup moins complexes que les extraits de coquillages, l'analyse des toxines par Lc-MS/MS s'en trouve simplifiée. Néanmoins, les toxines adsorbées ne sont pas bio-transformées par les coquillages et ne sont donc pas toujours représentatives de l'exposition du consommateur.

La surveillance à l'aide de SPATT permet de compléter ponctuellement le dispositif officiel reposant sur un comptage algal des organismes producteurs de toxines et sur l'analyse des biotoxines marines dans les coquillages.

Les SPATT sont constitués de sachets renfermant une résine. Avant d'être introduite dans les sachets, la résine est généralement rincée avec du méthanol afin d'éliminer les matériaux lixiviables puis hydratée par trempage dans de l'eau ultrapure. La résine est ensuite distribuée dans les sachets. Les échantillonneurs sont ensuite placés à la profondeur souhaitée pour une durée généralement comprise entre 1 à 2 semaines (MacKenzie, 2010 ; MacKenzie *et al.*, 2011) ; McCarthy *et al.*, 2015 ; Rundberget *et al.*, 2011 ; Zendong *et al.*, 2014). La résine est ensuite récupérée, rincée avec de l'eau puis déposée dans un réservoir d'extraction en phase solide (Solid Phase Extraction, SPE) vide afin d'en extraire les toxines avec du MeOH.

Les sachets utilisés pour préparer les SPATT sont généralement composés de mailles de polyester (80 à 100 µm). A ce jour, la résine Diaion HP-20 (Supelco) est majoritairement utilisée avec des quantités allant de 0,3 mg à 5 g. Zendong *et al.* (2014) ont testé, évalué et comparé plusieurs autres résines en termes d'efficacité et de vitesse d'accumulation. Les résines Strata-X et Oasis HLB seraient des accumulateurs rapides, certainement plus adaptés pour une détection quotidienne de la présence des PnTX. La résine Diaion HP-20 serait un accumulateur plus lent et donc plus adaptée sur des périodes d'expositions supérieures à 5 jours. La résine Diaion HP-20 a également été comparée à l'Amberlite® XAD761 et s'est montrée plus efficace pour l'adsorption de la PnTX G (McCarthy *et al.*, 2015).

Par ailleurs, des bandes en polymère LDPE (polyéthylène basse densité) et PDMS (polydiméthylsiloxane) ont également été étudiées par Zendong *et al.* (2014). Des essais en réservoirs expérimentaux, après 24 heures d'immersion dans de l'eau de mer supplémentée en PnTX G, ont montré un taux récupération d'environ 70%.

MacKenzie *et al.* (2011) ont utilisé des SPATT dans 2 zones de production en Nouvelle-Zélande. Les concentrations en PnTX adsorbées sur la résine étaient comprises entre non détecté et 3 µg/kg de poids sec pour la PnTX D, 46 et 226 µg/kg de poids sec pour la PnTX E et 2 et 107 µg/kg de poids sec pour la PnTX F.

6 Exposition alimentaire

6.1 Données de consommation alimentaire

6.1.1 Population générale : INCA3

La 3^{ème} étude Individuelle Nationale des Consommations Alimentaires (INCA3) est une enquête transversale visant à estimer les consommations alimentaires et les comportements en matière d'alimentation des individus vivant en France (Anses, 2017b). L'étude a été menée entre février 2014 et septembre 2015 auprès d'un échantillon représentatif d'individus vivant en France métropolitaine (hors Corse). Au total, 5 855 individus, répartis en 2 698 enfants de la naissance à 17 ans et 3 157 adultes âgés de 18 à 79 ans ont participé à l'étude.

Les individus ont été sélectionnés selon un plan de sondage aléatoire à trois degrés (unités géographiques, logements puis individus), à partir du recensement annuel de la population de 2011, en respectant une stratification géographique (région, taille d'agglomération) afin d'assurer la représentativité sur l'ensemble du territoire. Deux échantillons indépendants ont été constitués : un échantillon « Enfants » (0-17 ans) et un échantillon « Adultes » (18-79 ans).

Les données recueillies dans l'étude portent sur diverses thématiques en lien avec l'évaluation des risques nutritionnels ou sanitaires liés à l'alimentation : consommations d'aliments, de boissons et de compléments alimentaires, habitudes alimentaires (occasions et lieux de consommation, autoconsommation, mode de production des aliments, etc.), pratiques potentiellement à risque au niveau sanitaire (préparation, conservation, consommation de denrées animales crues, etc.), connaissances et comportements en matière d'alimentation. Des données sur les pratiques d'activité physique et de niveau de sédentarité ainsi que sur les caractéristiques socio-démographiques, anthropométriques et de niveau de vie ont également été recueillies.

Afin d'assurer la représentativité nationale des résultats présentés, les individus/ménages participants ont fait l'objet d'un redressement. Ce redressement a été réalisé séparément chez les enfants et chez les adultes en tenant compte de variables géographiques et socio-économiques. A chaque individu est donc associée une pondération prise systématiquement en compte pour les analyses.

Les consommations alimentaires des individus ont été recueillies sur 3 jours non consécutifs (2 jours de semaine et 1 jour de week-end) répartis sur environ 3 semaines, par la méthode des rappels de 24 heures pour les individus âgés de 15 à 79 ans et par la méthode des enregistrements de 24 h (via un carnet alimentaire) pour les individus âgés de 0 à 14 ans. Pour les 3 jours sélectionnés, les individus devaient décrire leurs consommations alimentaires en identifiant tous les aliments et boissons consommés dans la journée et la nuit précédentes. Ils devaient les décrire de façon aussi détaillée que possible et les quantifier à l'aide notamment d'un cahier de photographies de portions alimentaires et de mesures ménagères. Quel que soit l'âge, les interviews étaient conduites par téléphone, à l'aide du logiciel standardisé GloboDiet, par des enquêteurs professionnels spécifiquement formés aux méthodes mises en œuvre et à l'utilisation du logiciel. Parmi les 5 855 individus inclus dans l'étude, 4 114 (2 121 adultes et 1 993 enfants) ont validé le volet consommation en répondant à au moins 2 interviews alimentaires.

6.1.2 Forts consommateurs de produits de la mer : CALIPSO

L'étude CALIPSO (2006) a été réalisée auprès de 1011 individus de plus de 18 ans forts consommateurs de produits de la mer (au moins 2 fois par semaine) et résidant dans l'un des 4 sites côtiers et ses environs (sur un rayon de 20-25 km) sélectionnés pour l'enquête : Le Havre, Toulon-Hyères, La Rochelle et Lorient. Cette étude est basée sur un questionnaire de fréquence de consommation validé lors de l'enquête pilote par un carnet de consommation de 7 jours. Les tailles de portion habituellement consommées ont été estimées par un cahier photographique (Manuel photos de l'Etude SU.VI.MAX). Les consommations sont décrites uniquement pour 996 individus (exclusion de 15 sujets pour données aberrantes concernant les consommations).

6.1.3 Consommateurs côtiers de produits de la mer : CONSOMER

Une étude de consommation sur les produits de la mer (CONSOMER) a été menée en 2016-2017 dans le cadre d'une convention de recherche entre l'Anses et le CREDOC (2015-CRD-25). L'objectif de l'étude était d'évaluer la consommation de produits de la mer d'une population adulte (de plus de 18 ans), en région côtière, pouvant s'approvisionner de façon locale. Cette étude doit permettre de faciliter des évaluations de risque portant sur des produits de la mer précis (par exemple portant sur une espèce particulière de poisson ou de coquillages) dans le domaine du risque aigu et chronique, pour des contaminants microbiologiques ou

chimiques. L'enquête a été réalisée par internet auprès d'un panel de consommateurs selon la méthode des quotas (basés sur des données INSEE). Tous les départements côtiers de France métropolitaine disposant d'une halle à marée ont été inclus dans l'étude. Les départements côtiers concernés sont pour la façade Nord-France Manche les départements : 62, 59, 76, 14, 50, 35, 22, la façade Atlantique les départements : 29, 56, 44, 85, 17, 33, 64, et la façade méditerranéenne les départements : 11, 34, 30, 13, 2A et 2B. Ces vingt départements représentent environ 30 % de la population adulte française.

Aucun critère d'exclusion ne portait sur la consommation : les non-consommateurs étaient aussi inclus afin de déterminer les fréquences des consommateurs et leurs motivations de non-consommation. Afin de prendre en compte la saisonnalité de consommation, l'enquête a été menée en deux vagues, la première en novembre 2016 et la seconde en mai-juin 2017. Le questionnaire est de type fréquentiel. Le questionnaire décrit essentiellement les fréquences et quantités usuelles de consommation et les sources d'approvisionnement. Le dernier acte de consommation de produits de la mer a été détaillé afin de décrire principalement les pratiques de stockage, de préparation et de cuisson. Afin de garder à l'échantillon les caractéristiques de la population d'origine, l'échantillon a été redressé, permettant d'associer à chaque individu une pondération spécifique qui est prise en compte systématiquement dans les analyses. Cette pondération est basée sur différentes variables (âge, sexe, caractéristiques géographiques et socioprofessionnelles) à partir des estimations INSEE des caractéristiques de population en 2017. Différentes pondérations permettent d'évaluer les résultats obtenus à l'échelle côtière pour trois grandes régions côtières séparément (Manche, façade Atlantique et Méditerranée) et pour l'échelle nationale des départements côtiers disposant d'une halle à marée. Les réponses de 2481 consommateurs sont actuellement en cours d'analyse à l'Anses.

6.2 Données de contamination

Des données de concentrations en PnTX dans des moules et des palourdes dans plusieurs lagunes méditerranéennes de 2010 à 2017 ont été transmises à l'Anses par l'Ifremer. Il a été acté par le groupe de travail que seules les données de contamination analysées sur chair totale seront utilisées pour ce calcul d'exposition (la grille de donnée de l'Ifremer a été nettoyée en ce sens). En effet, contrairement aux toxines lipophiles dont la majorité se concentre dans la glande digestive, les PnTX sont présentes dans le reste des tissus mais avec une répartition extrêmement variable selon les individus. Il serait donc très difficile d'extrapoler la teneur des PnTX à partir des seuls dosages pratiqués sur glande digestive.

Deux valeurs de contamination ont été calculées pour les moules d'une part, pour les palourdes d'autre part (Tableaux 19a et b) : la contamination moyenne et le 95^{ème} percentile (P95) de la distribution (i.e. la valeur à laquelle 95% des contaminations mesurées sont inférieures et 5% supérieures).

Trois scénarios ont été retenus, en fonction du site dans lequel ont été effectuées les mesures :

- **Scénario « Toutes lagunes »** : moyenne / P95 des contaminations de toutes les moules d'une part, de toutes les palourdes d'autre part (i.e. issues de toutes les lagunes étudiées) ;
- **Scénario « Ingril »** : moyenne / P95 des contaminations dans la lagune d'Ingril aux points « Ingril – Port des Pauvres » et « Ingril Sud », pour les moules d'une part, les palourdes d'autre part ;
- **Scénario « Sauf Ingril »** : moyenne / P95 des contaminations dans toutes les lagunes SAUF « Ingril – Port des Pauvres » et « Ingril Sud », pour les moules uniquement (pas de mesure de contamination de palourdes hors Ingril).

Tableau 19 : Contamination moyenne et 95^{ème} percentile (P95) pour les moules et les palourdes

	Moules (en µg/kg de chair totale)	
	Moyenne	P95
Toute lagune	196	633
Ingril	249	712
Sauf Ingril	21,7	60,3
	Palourdes (en µg/kg de chair totale)	
	Moyenne	P95
Toute lagune	28,1	57
Ingril	28,1	57
Sauf Ingril	Pas de données	Pas de données

6.3 Hypothèses de calcul des consommations

Pour chaque étude, deux paramètres de consommation ont été relevés :

- La taille de portion, correspondant à la quantité déclarée par un consommateur lors d'un acte de consommation ;
- La consommation journalière, correspondant au produit de la taille de portion par la fréquence de consommation, rapportée en g/j.

Les données de consommation issues de l'étude INCA3 ayant été recueillies sur plusieurs jours, certains consommateurs ont pu déclarer plusieurs poids de portion pour le même produit. Les calculs d'exposition nécessitant une seule valeur de poids de portion par consommateur, les valeurs suivantes ont été retenues :

- La portion maximale pour le calcul de l'exposition aiguë ;
- La moyenne des portions pour le calcul de l'exposition chronique.

Afin de calculer la consommation journalière en g/j, les portions relevées dans les rappels de 24 h ont été rapprochées de la fréquence déclarée dans le fréquentiel alimentaire à la ligne « Mollusques & coquillages : moules, huîtres, coquilles St Jacques, bulots, bigorneaux, coques, clams, calamars, poulpe... ». Les individus ayant déclaré une consommation de moules ou de palourdes mais n'ayant pas rempli la ligne correspondante dans le fréquentiel alimentaire ont été considérés comme non-consommateurs lors du calcul de l'exposition chronique (concerne 3 adultes et 3 enfants).

La population totale de l'étude a été prise en compte car trop peu de données de consommations étaient disponibles pour les seuls individus méditerranéens (4 actes de consommation chez les adultes méditerranéens, un seul chez les enfants méditerranéens).

Les calculs d'exposition ont été effectués pour les enfants d'une part, pour les adultes d'autre part.

La population des enfants âgés de 0 à 3 ans n'a pas pu être étudiée séparément car trop peu de données de consommations de moules étaient disponibles (un seul acte relevé).

Les actes de consommation de palourdes n'ont pas été pris en compte car en trop faible nombre (3 actes relevés chez les adultes, 3 chez les enfants).

Concernant l'étude CONSOMER, seules les données des consommateurs méditerranéens ont été utilisées dans les calculs.

Les consommateurs corses ont été exclus de l'étude car trop faiblement représentés et afin de faciliter la comparaison avec INCA3 (21 individus exclus).

L'étude ne concernant que des adultes, aucune exposition des enfants n'a pu être calculée.

Concernant l'étude CALIPSO, seules les données du site de Toulon ont été utilisées dans les calculs. L'étude ne concernant que des adultes, aucune exposition des enfants n'a pu être calculée.

6.4 Méthode de calculs de l'exposition

A partir des données de consommation individuelle et des données de contamination, l'exposition a été calculée selon l'équation suivante :

$$E_i = \sum_{k=1}^n \frac{C_{i,k} \times L_k}{PC_i}$$

Où :

- E_i est l'exposition journalière totale de l'individu i associée à la consommation de l'aliment k ($\mu\text{g/kg}$ de poids corporel/j) ;
- $C_{i,k}$ est la consommation de l'aliment k par l'individu i (kg/j) (soit la taille de portion, soit la consommation journalière) ;
- L_k est la contamination en PnTX G de l'aliment k ($\mu\text{g/kg}$ de poids frais) (soit la contamination moyenne, soit le P95 selon l'exposition calculée) ;
- PC_i est le poids corporel de l'individu i (kg).

Par ailleurs, deux types d'exposition ont été calculés :

- D'une part, l'exposition chronique : en prenant comme paramètre de consommation la consommation journalière (en prenant en compte la fréquence) et comme paramètre de contamination la teneur moyenne. L'exposition chronique correspond à la quantité de substance qu'un individu peut ingérer

quotidiennement tout au long de sa vie sans risque appréciable sur sa santé, l'effet toxicologique se manifestant tardivement.

- D'autre part, **l'exposition aiguë** : en prenant comme paramètre de consommation la taille de portion (sans prendre en compte la fréquence) et comme paramètre de contamination le 95^e percentile (P95). L'exposition aiguë correspond à un effet toxicologique se manifestant rapidement, dès la première ingestion.

Ainsi, chaque individu se voit attribuer deux valeurs d'exposition aiguë et deux valeurs d'exposition chronique : l'une associée à la consommation de moules, l'autre associée à la consommation de palourdes.

Les non-consommateurs d'un produit se voient attribuer la valeur 0 pour les expositions associées à la consommation du produit non consommé.

Les moyennes et P95 des distributions d'exposition ont été calculés dans la population totale de chaque étude d'une part (en intégrant les non-consommateurs), uniquement chez les consommateurs d'autre part (en supprimant toutes les expositions nulles).

Pour les consommateurs de moules ET de palourdes, une exposition cumulée a été calculée, résultat de la somme des deux expositions (associées à la consommation de moules d'une part, de palourdes d'autre part).

6.5 Scénarios testés

Pour les expositions aiguës uniquement, une comparaison a été faite avec la valeur repère aiguë provisoire de 0,13 µg PnTX G/kg pc. En fonction du scénario de contamination envisagé, un pourcentage de la population dépassant cette valeur a été calculé dans la population totale de chaque étude d'une part, chez les seuls consommateurs d'autre part. À noter que, concernant la population totale, il s'agit en réalité de la population méditerranéenne (sauf dans le cas d'INCA3). Les différents scénarios étudiés en fonction des études de consommation sont résumés dans le Tableau 20.

Tableau 20 : Résumé des populations et scénarios étudiés en fonction des études de consommation

	Population		Site	Consommation	
	Adultes	Enfants	Méditerranée	Moules	Moules + Palourdes
INCA3	X	X		X	
CONSOMER	X		X	X	X
CALIPSO	X		X	X	X

6.6 Résultats

Les résultats des expositions sont présentés ci-dessous. Tous les tableaux ont la même structure.

n : nombre total d'individus adultes dans la population et suivis pendant l'enquête (cette population inclut les consommateurs et les non consommateurs des produits de la 1^{ère} colonne).

Moy_pop : exposition moyenne dans la population (qu'ils soient consommateurs ou non) (µg/kg pc/j).

P95_pop : exposition au 95^{ème} percentile calculée dans la population (µg/kg pc/j).

n_cons : nombre d'individus adultes consommateurs du produit de la 1^{ère} colonne (seuls consommateurs).

Moy_cons : exposition moyenne dans la population des seuls consommateurs (µg/kg pc/j)

P95_cons : exposition au 95^{ème} percentile calculée dans la population des seuls consommateurs (µg/kg pc/j)

% > VRAP : pourcentage de la population dépassant la valeur repère aiguë provisoire de 0,13 µg/kg pc.

% > VRAP_cons : pourcentage des seuls consommateurs dépassant la valeur repère aiguë provisoire de 0,13 µg/kg pc.

6.6.1 Expositions aiguës et chroniques ($\mu\text{g/kg pc/j}$) associées aux consommations de moules des enfants, issues d'INCA3

Tableau 21 : Exposition aiguë - Moules - Enfants - Données INCA3 – en $\mu\text{g/kg pc/j}$

	Population totale			Seuls consommateurs			Dépassement de la valeur repère aiguë provisoire (VRAP)	
	n	Moy_pop	P95_pop	n_cons	Moy_cons	P95_cons	% > VRAP	% > VRAP_cons
Toutes lagunes	1993	0,012	0	20	1,004	1,828	1,18	100
Ingril	1993	0,013	0	20	1,128	2,055	1,18	100
Sauf Ingril	1993	0,001	0	20	0,095	0,174	0,21	17,46

Tableau 22 : Exposition chronique - Moules - Enfants - Données INCA3 – en $\mu\text{g/kg pc/j}$

	Population totale			Seuls consommateurs		
	n	Moy_pop	P95_pop	n_cons	Moy_cons	P95_cons
Toutes lagunes	1993	0	0	17	0,008	0,018
Ingril	1993	0	0	17	0,010	0,023
Sauf Ingril	1993	0	0	17	0,001	0,002

6.6.2 Expositions aiguës et chroniques ($\mu\text{g/kg pc/j}$) associées aux consommations de moules des adultes, issues d'INCA3

Tableau 23 : Exposition aiguë - Moules - Adultes - Données INCA3 – en $\mu\text{g/kg pc/j}$

	Population totale			Seuls consommateurs			Dépassement de la valeur repère aiguë provisoire (VRAP)	
	n	Moy_pop	P95_pop	n_cons	Moy_cons	P95_cons	% > VRAP	% > VRAP_cons
Toutes lagunes	2121	0,012	0	43	0,586	1,138	1,94	91,25
Ingril	2121	0,014	0	43	0,659	1,279	2,04	95,74
Sauf Ingril	2121	0,001	0	43	0,056	0,108	0,08	3,92

Tableau 24 : Exposition chronique - Moules - Adultes - Données INCA3 – en $\mu\text{g/kg pc/j}$

	Population totale			Seuls consommateurs		
	n	Moy_pop	P95_pop	n_cons	Moy_cons	P95_cons
Toutes lagunes	2121	0	0	40	0,007	0,025
Ingril	2121	0	0	40	0,009	0,031
Sauf Ingril	2121	0	0	40	0,001	0,003

6.6.3 Expositions aiguës et chroniques ($\mu\text{g/kg pc/j}$) associées aux consommations de moules des adultes, issues de CALIPSO (site de Toulon)

Tableau 25 : Exposition aiguë - Moules - Données CALIPSO – en $\mu\text{g/kg pc/j}$

	Population totale			Seuls consommateurs			Dépassement de la valeur repère aiguë provisoire (VRAP)	
	n	Moy_pop	P95_pop	n_cons	Moy_cons	P95_cons	% > VRAP	% > VRAP_cons
Toutes lagunes	251	0,522	0,852	221	0,592	0,869	87,65	99,55
Ingril	251	0,586	0,958	221	0,666	0,977	87,65	99,55
Sauf Ingril	251	0,050	0,081	221	0,056	0,083	0,00	0,00

Tableau 26 : Exposition chronique - Moules - Données CALIPSO – en $\mu\text{g/kg pc/j}$

	Population totale			Seuls consommateurs		
	n	Moy_pop	P95_pop	n_cons	Moy_cons	P95_cons
Toutes lagunes	251	0,008	0,023	221	0,009	0,025
Ingril	251	0,010	0,030	221	0,012	0,031
Sauf Ingril	251	0,001	0,003	221	0,001	0,003

6.6.4 Expositions aiguës et chroniques ($\mu\text{g/kg pc/j}$) associées aux consommations de moules et de palourdes des adultes, issues de CALIPSO (site de Toulon)

Tableau 27 : Exposition aiguë - Moules + Palourdes - Données CALIPSO – en $\mu\text{g/kg pc/j}$

	Population totale (site de Toulon)			Seuls consommateurs (site de Toulon)			Dépassement de la valeur repère aiguë provisoire (VRAP)	
	n	Moy_pop	P95_pop	n_cons	Moy_cons	P95_cons	% > VRAP	% > VRAP_cons
Toutes lagunes	251	0,526	0,852	222	0,594	1,868	88,05	99,55
Ingril	251	0,590	0,958	222	0,668	0,976	88,05	99,55

Tableau 28 : Exposition chronique - Moules + Palourdes - Données CALIPSO – en $\mu\text{g/kg pc/j}$

	Population totale			Seuls consommateurs		
	n	Moy_pop	P95_pop	n_cons	Moy_cons	P95_cons
Toutes lagunes	251	0,008	0,023	222	0,009	0,025
Ingril	251	0,010	0,030	222	0,012	0,031

6.6.5 Expositions aiguës et chroniques ($\mu\text{g/kg pc/j}$) associées aux consommations de moules des adultes, issues de CONSOMER (zone méditerranéenne)

Tableau 29 : Exposition aiguë - Moules - Données CONSOMER – en $\mu\text{g/kg pc/j}$

	Population totale (zone méditerranéenne)			Seuls consommateurs (zone méditerranéenne)			Dépassement de la valeur repère aiguë provisoire (VRAP)	
	n	Moy_pop	P95_pop	n_cons	Moy_cons	P95_cons	% > VRAP	% > VRAP_cons
Toutes lagunes	821	0,587	1,568	582	0,826	1,750	71,08	100
Ingril	821	0,660	1,763	582	0,929	1,968	71,08	100
Sauf Ingril	821	0,056	0,149	582	0,079	0,167	7,270	10,23

Tableau 30 : Exposition chronique - Moules - Données CONSOMER – en $\mu\text{g/kg pc/j}$

	Population totale (zone méditerranéenne)			Seuls consommateurs (zone méditerranéenne)		
	n	Moy_pop	P95_pop	n_cons	Moy_cons	P95_cons
Toutes lagunes	821	0,010	0,032	582	0,015	0,042
Ingril	821	0,013	0,041	582	0,019	0,053
Sauf Ingril	821	0,001	0,004	582	0,002	0,005

6.6.6 Expositions aiguës et chroniques ($\mu\text{g/kg pc/j}$) associées aux consommations de moules et de palourdes des adultes, issues de CONSOMER (zone méditerranéenne)

Tableau 31 : Exposition aiguë - Moules + Palourdes - Données CONSOMER – en $\mu\text{g/kg pc/j}$

	Population totale (zone méditerranéenne)			Seuls consommateurs (zone méditerranéenne)			Dépassement de la valeur repère aiguë provisoire (VRAP)	
	n	Moy_pop	P95_pop	n_cons	Moy_cons	P95_cons	% > VRAP	% > VRAP_cons
Toutes lagunes	821	0,590	1,572	591	0,816	1,733	71,08	100
Ingril	821	0,663	1,767	591	0,917	1,946	71,08	100

Tableau 32 : Exposition chronique - Moules + Palourdes - Données CONSOMER – en $\mu\text{g/kg pc/j}$

	Population totale (zone méditerranéenne)			Seuls consommateurs (zone méditerranéenne)		
	n	Moy_pop	P95_pop	n_cons	Moy_cons	P95_cons
Toutes lagunes	821	0,011	0,032	591	0,014	0,043
Ingril	821	0,013	0,041	591	0,018	0,055

Ces résultats montrent que, dans les scénarios testés incluant les données de contamination de l'étang d'Ingril, un dépassement de la valeur repère aiguë provisoire serait observé pour 71% des adultes selon les données de consommation de l'étude CONSOMER pour la zone méditerranéenne (dans le cas du scénario incluant les non-consommateurs de moules et palourdes). Si l'on considère uniquement les individus consommateurs de moules et de palourdes, cette proportion augmente à 100%.

Dans le scénario testé excluant les données de contamination de l'étang d'Ingril, le dépassement serait de 7% pour la population totale méditerranéenne et de 10% pour les seuls consommateurs.

6.7 Etude de Rambla-Alegre *et al.* (2018)

Dans la littérature, une étude a récemment été publiée en 2018 dans laquelle les auteurs ont réalisé une estimation de l'exposition alimentaire aux PnTX G et A des consommateurs européens de coquillages.

Pour les données de contamination, Rambla-Alegre *et al.* (2018) ont analysé 96 échantillons de coquillages frais ou en conserve provenant de 8 pays européens (Danemark, Espagne, Irlande, Italie, Norvège, Pays-bas, Portugal, Slovaquie). La concentration moyenne en PnTX G a été estimée à 1,09 µg/kg de chair de coquillages selon une hypothèse basse (non détecté = non quantifié = 0) et à 1,33 µg/kg selon une hypothèse haute (non détecté = valeur de la limite de détection = 0,1 µg/kg et non quantifié = valeur de la limite de quantification = 3 µg/kg).

Pour les données de consommation de chair de coquillages, les auteurs se sont basés sur une distribution triangulaire caractérisée par 3 valeurs : minimum (0), plus probable (100 g) et maximum (400 g).

La distribution de l'exposition a une moyenne de 0,003 µg/kg pc et un 95^{ème} percentile de 0,006 µg/kg en hypothèse basse. En hypothèse haute, la moyenne est de 0,004 µg/kg pc et le 95^{ème} percentile de 0,007 µg/kg.

Pour caractériser le danger, les auteurs ont retenu la DL₅₀ de 150 µg PnTX G/kg pc chez la souris par voie orale (Munday 2008).

La marge d'exposition entre cette DL₅₀ et le 95^{ème} percentile d'exposition est supérieure à 21 000. Les auteurs concluent donc qu'il est peu probable que l'exposition à la PnTX G liée à la consommation de coquillage représente un risque sanitaire.

L'approche méthodologique et les données de contamination expliquent la différence entre les conclusions de Rambla-Alegre *et al.* (2018) et celles de l'expertise de l'Anses.

D'une part, la valeur de référence retenue par l'Anses n'est pas une dose létale à 50% chez la souris mais une valeur de référence aiguë provisoire (voir § 4.6) basée sur des données plus récentes de toxicité orale chez la souris, et qui intègre des facteurs de sécurité.

D'autre part, concernant les données de consommation, l'Anses s'est appuyée sur des données réelles rapportées dans le cadre d'enquêtes alimentaires, pour les populations de la zone géographique concernées, à savoir la zone méditerranéenne.

Enfin, la différence la plus notable concerne les données de contamination. La concentration maximale rapportée par Rambla-Alegre *et al.* (2018) est de 12 µg PnTX G/kg de chair de coquillages. Les données françaises prises en compte dans l'expertise de l'Anses montrent une contamination beaucoup plus élevée. La concentration au 95^{ème} percentile retenue pour le scénario d'exposition aiguë est de 633 µg PnTX G/kg pour le scénario toutes lagunes (incluant Ingril) et 60 µg PnTX G/kg pour le scénario des lagunes hors Ingril.

7 Caractérisation du risque

Conclusions du GT en termes de préoccupation sanitaire

Compte tenu des dépassements de la valeur repère aiguë provisoire observé dans le scénario « sauf Ingril », le GT estime qu'il peut exister une préoccupation sanitaire liée à la consommation de coquillages contaminés par les PnTX provenant de ces lagunes méditerranéennes.

Les estimations n'ont pas été réalisées pour les autres sites français où des PnTX ont été détectées dans des moules (Le Scoré, Diana) car les analyses ont porté sur les glandes digestives et la répartition des PnTX entre la glande digestive et la chair totale n'est pas connue.

8 Recommandations pour la surveillance

8.1 Surveillance environnementale

Plusieurs études sur l'écologie du dinoflagellé *V. rugosum* ont été menées *in vitro* et *in situ*. Pour autant, son origine et le déterminisme de ses efflorescences dans les milieux naturels restent à élucider.

Si la contamination de mollusques par les PnTX dans certaines zones est indéniable, la relation avec les efflorescences à *Vulcanodinium rugosum* reste difficile à établir. En effet, la phase planctonique de cette espèce est difficilement observable dans la colonne d'eau. De ce fait, la surveillance officielle des zones de production de coquillages basée sur l'identification et le dénombrement des espèces phytoplanctoniques toxiques dans la colonne d'eau est peu adaptée à cette espèce.

Plusieurs pistes de surveillance peuvent être proposées :

- 1) Pour la surveillance du dinoflagellé, il est important de mettre en place, dans les zones à risque, un suivi de la population benthique de cet organisme. Il est indispensable d'échantillonner les macroalgues présentes dans la zone pour récolter les cellules de ce dinoflagellé. Le protocole de type « *Ostreopsis* » expérimenté dans l'étude d'Abadie *et al.* (2018) montre qu'une telle surveillance est possible.
- 2) En parallèle de ce suivi de *V. rugosum*, une surveillance plus systématique de la présence des PnTX dans les mollusques doit être envisagée. Le protocole d'extraction des PnTX est identique à celui des toxines lipophiles actuellement recherchées dans le REPHYTOX. Seule une étape supplémentaire de dosage par LC-MS/MS est à envisager pour un coût analytique qui restera modéré. Il pourrait être procédé à la recherche systématique des PnTX (dans la chair totale) au cours des analyses des toxines lipophiles du REPHYTOX (et pas seulement des échantillons prélevés dans le cadre du dispositif EMERGTOX dont les analyses portent sur la glande digestive).

Cela permettrait d'estimer et de surveiller la présence des PnTX dans les mollusques bivalves des zones de production nationales.

8.2 Veille sanitaire, déclaration et modalités

8.2.1 Que signaler ?

L'association ganglioplégie / signes neuromusculaires fluctuant, de type myasthénie chez l'Homme, doit pouvoir interpeller le clinicien, surtout si des signes centraux tel qu'un syndrome pyramidal et/ou des crises d'épilepsie sont associés.

Définition de cas suspect humain : toute personne ayant consommé dans les dernières 24h des coquillages cuits ou crus (huîtres, moules, palourdes...), ou ayant été en contact direct (baignade, plongée) ou à proximité immédiate des zones lagunaires (pêche à la ligne, plaisance, kayak, plongée, planche à voile, kitesurf) et ayant présenté jusqu'à 24h après ce contact (eau de mer ou embruns) au moins un des symptômes suivants :

- faiblesse musculaire (myasthénie)
- troubles respiratoires (difficultés à respirer)
- somnolence
- syndrome anticholinergique (bouche sèche, constipation, abolition des bruits intestinaux, mydriase, troubles de l'accommodation, élévation de la pression intra-oculaire, diminution de la sécrétion lacrymale, tachycardie sinusale, rétention urinaire)
- hypo/hypertension artérielle
- brady/tachycardie
- syndrome pyramidal
- épilepsie.

Ces symptômes secondaires à une ingestion de coquillages contaminés par des PnTX correspondent à une intoxication par des antagonistes des récepteurs cholinergiques nicotiniqes (curarisant +/- ganglioplégiques).

A ce jour, en Méditerranée, aucune intoxication alimentaire par les PnTX n'a été détectée. Cependant, la présence de ces PnTX a été observée dans les zones lagunaires des départements de l'Aude (11) et de l'Hérault (34).

Si de tels cas d'intoxications graves (hospitalisation) survenaient, ils devraient être déclarés sans délai à un **Centre Antipoison et de Toxicovigilance (CAPTV)** et à l'**Agence Régionale de Santé (ARS)**.

8.2.2 Qui signale ?

Les usagers directement concernés ainsi que les professionnels de santé libéraux, hospitaliers urgentistes et pharmacies du bord de mer qui sont susceptibles de recevoir les patients suspects (troubles respiratoires, faiblesse musculaire) et de les signaler à un CAPTV.

8.2.3 A qui signaler ?

Pour tous les cas, à un Centre Antipoison et de Toxicovigilance (CAPTV).

Pour les départements de l'Hérault et de l'Aude, dans lesquels se situent les étangs palavasiens particulièrement concernés, il s'agit du CAPTV de Toulouse au : 05 61 77 74 47 et sur le portail des signalements à l'adresse suivante : <http://www.signalement-sante.gouv.fr>

Le CAPTV de Toulouse est chargé de la vérification et de la confirmation du signalement des cas groupés suspects et transmet ces informations (nombre de cas et localisation géographique) à l'ARS Occitanie.

9 Conclusions et recommandations du groupe de travail

9.1 Existe-t-il des données toxicologiques pour les PnTX et notamment, pour les effets aigus, une DL₅₀ reconnue ? Existe-t-il des données pour le risque chronique sous la forme d'une valeur toxicologique de référence (VTR) ?

Les PnTX sont un groupe de 8 toxines (PnTX A à H) parmi lesquelles la PnTX G est prise pour référence parce qu'elle est celle quasi-exclusivement retrouvée dans les coquillages en France (à l'exception de la PnTX A aussi détectée à Ingril en faibles concentrations). Il est à noter que des différences de toxicité aiguë ont été observées selon les analogues et que la PnTX G n'est pas considérée comme la plus toxique. En l'état actuel des connaissances, la PnTX F semble la plus toxique.

Suite à l'analyse de la littérature, des données toxicologiques aiguës montrent la neurotoxicité des PnTX, qui de ce fait constituent un danger potentiel pour l'Homme. Deux études expérimentales ont permis d'évaluer une DL₅₀, chez la souris, par voie orale.

Les données de ces études ont été utilisées pour proposer une valeur repère aiguë provisoire de 0,13 µg PnTX G/kg pc. A partir de cette valeur, d'une taille de portion par défaut de 400 g de coquillages (EFSA, 2010b) et d'un poids corporel par défaut de 70 kg, la concentration à ne pas dépasser dans les coquillages serait de 23 µg PnTX G/kg de chair totale.

A la connaissance du GT, aucune étude de toxicité par administration orale répétée n'est disponible, il n'est donc pas possible de proposer une valeur toxicologie de référence chronique.

La portimine, produite en quantité importante par les souches méditerranéennes de *Vulcanodinium rugosum* est associée à la problématique considérée. Cette toxine serait très faiblement accumulée dans les coquillages. Les données toxicologiques concernant la portimine sont plus limitées et elle semble moins toxique que les PnTX chez la souris par voie intrapéritonéale.

Les PtTX, identifiées au nombre de 3 (A à C), sont des analogues structuraux appartenant au groupe des PnTX, mais les données disponibles au sein de la littérature sont insuffisantes pour pouvoir les prendre en compte dans cette évaluation de risque.

9.2 Compte tenu de ces données toxicologiques, et au vu du contexte, existe-t-il une préoccupation de santé publique aux niveaux de contamination identifiés par l'Ifremer dans certaines zones de production conchylicole françaises ?

Depuis la mise en évidence de la PnTX G en 2012 dans l'étang d'Ingril par l'Ifremer, cette toxine a été observée tous les ans, au moment des efflorescences de *Vulcanodinium rugosum*, dans les échantillons de moules (jusqu'à 1244 µg/kg de chair totale) et de palourdes (jusqu'à 95 µg/kg de chair totale). En France, seules ces deux espèces de mollusques ont été étudiées et il n'y a pas de données disponibles pour les autres espèces consommées.

Les études menées ponctuellement en 2012-2014 ont montré la présence de PnTX G également dans les autres lagunes méditerranéennes.

Enfin, le dispositif de veille d'émergence des biotoxines marines dans les coquillages (EMERGTOX) a mis en évidence la présence de PnTX G sur la côte atlantique et en Corse.

Le mode d'action des PnTX établi *in vivo* et *in vitro* (symptômes et létalité, mécanistique) a permis aux experts de proposer des hypothèses de transposition à l'Homme.

A partir des données de consommation disponibles (INCA3, CONSOMER et CALIPSO) l'exposition alimentaire a été estimée selon divers scénarios. Les résultats obtenus montrent que, dans certains cas (forte consommation et forte contamination), la valeur repère aiguë provisoire peut être dépassée.

En conséquence, le GT estime qu'il peut exister une préoccupation sanitaire liée à la consommation de coquillages contaminés par les PnTX provenant des lagunes méditerranéennes. Cette préoccupation est surtout marquée pour la zone d'Ingril même si, la connaissance du GT, il n'y a pas de production conchylicole

destinée à la commercialisation. Néanmoins, le GT recommande d'éviter toute consommation de coquillages provenant de cette zone.

9.3 Quelles modalités de suivi des PnTX dans le milieu marin pourraient être recommandées, en vue d'une prise en compte de ces toxines dans le dispositif de vigilance pour les biotoxines marines lipophiles dans les coquillages piloté par la DGAL ?

Le GT recommande d'intégrer la recherche des PnTX à l'analyse des toxines lipophiles dans les coquillages conduites dans le cadre de la surveillance officielle des zones de production (REPHYTOX) et de mettre en place une surveillance du dinoflagellé *Vulcanodinium rugosum* dans sa phase benthique au sein du REPHY sanitaire.

10 Perspectives de recherche

10.1 Améliorer les connaissances sur l'écologie de *Vulcanodinium rugosum* et l'accumulation de ses toxines dans la chaîne alimentaire

Des études complémentaires devraient être conduites sur :

- La recherche de la distribution tissulaire des PnTX dans les mollusques : en effet des résultats préliminaires non publiés de Ifremer montrent que, contrairement à d'autres toxines comme l'acide okadaïque, les PnTX ne se concentreraient pas majoritairement dans la glande digestive.
- La contamination d'autres organismes marins : l'analyse de la littérature (MacKenzie *et al.* 2011) a permis d'identifier que les gastéropodes présentent des concentrations en PnTX E et F très élevées (>1000 µg/kg de chair totale). Des études complémentaires dans les zones à risque (étangs palavasiens) pourraient être mises en place sachant que certains de ces gastéropodes sont consommés.
- L'accumulation des différentes toxines produites par *V. rugosum* le long de la chaîne alimentaire marine.
- Les cinétiques d'accumulation et de détoxification chez les mollusques, et évaluer si une phase de dépuraison est envisageable.
- Les métabolites des PnTX produits par les mollusques et leur toxicité potentielle.
- La contamination par les PnTX des coquillages prélevés sur les côtes françaises pour affiner les estimations d'exposition alimentaire réalisées dans le cadre de cette expertise, qui se sont basées sur des données acquises entre 2010 et 2014 (2017 pour Ingril).
- L'étude de la stabilité thermique des PnTX (effet de la cuisson).

10.2 Toxicologie

10.2.1 Caractériser le devenir des PnTX après ingestion (ADME⁷)

Des résultats non publiés (communications personnelles de V. Fessard et J. Molgó) indiquent que les PnTX ont la capacité de franchir la plupart des barrières biologiques (barrière intestinale, hémato-encéphalique, placentaire). Cependant, les paramètres ADME pourraient dépendre de l'analogue considéré. Ces résultats préliminaires devraient être complétés par des études cinétiques *in vivo* en prenant en compte les divers analogues. Des données concernant le métabolisme et la distribution de ces toxines sont nécessaires.

Le GT recommande dans un premier temps de se focaliser sur la PnTX G et dans un second temps sur les autres analogues et sur la portimine.

10.2.2 Mieux caractériser la toxicité des toxines de *V. rugosum* par administration orale

Le GT recommande que soit réalisée une étude de toxicité orale aiguë étendue (incluant la description des symptômes cliniques, la recherche de paramètres biologiques, biochimiques, histologiques pour une gamme de doses proches de la dose maximale tolérée dans l'étude du rapport Anses-Université de Trieste-CNRS 2014) de la PnTX G chez le rongeur, avec une période d'observation de 14 jours.

Le GT recommande que soit réalisée également une étude par administration orale répétée de 28 jours (ligne directrice OCDE 407) voire de 90 jours (ligne directrice OCDE 408). Compte-tenu des données disponibles à ce jour, le GT recommande de compléter ces études en recherchant les effets neurotoxiques centraux et périphériques ainsi que les effets sur le système cardio-vasculaire. La réalisation d'une étude de neurotoxicité suivant la ligne directrice OCDE 424 est préconisée.

Cette recommandation s'applique en priorité à la PnTX G et dans un second temps aux autres PnTX et toxines associées à la portimine et aux autres métabolites identifiés dans les coquillages crus ou cuits (selon les résultats de l'étude de thermastabilité).

⁷ ADME : absorption, distribution, métabolisme, excrétion.

Les résultats préliminaires de Couesnon *et al.* (2014) ainsi que les communications personnelles sur des expositions *in ovo* de poulet suggèrent que les PnTX pourraient affecter la croissance de l'embryon. Le GT recommande d'étudier les effets potentiels sur la descendance, en suivant la ligne directrice de l'OCDE 422.

10.2.3 Epidémiologie humaine

En fonction des résultats obtenus dans les études de toxicocinétique chez le rongeur, il pourrait être intéressant de rechercher les PnTX dans le sang, les urines, les fèces, des populations habitant à proximité des étangs palavasiens et consommant les moules et palourdes.

Le GT recommande également de conduire une étude des cas d'intoxication dans la zone concernée, impliquant les centres hospitaliers à proximité des étangs palavasiens, et les cabinets des médecins généralistes du secteur. Cette étude, coordonnée par la toxicovigilance, pourra se baser sur la fiche de signalement proposée par le GT et impliquer l'Ifremer pour l'analyse des toxines dans les coquillages pour la période concernée.

11 Bibliographie

- Abadie, E., L. Kaci, T. Berteaux, P. Hess, V. Sechet, E. Masseret, J. L. Rolland, et M. Laabir. 2015. "Effect of Nitrate, Ammonium and Urea on Growth and Pinnatoxin G Production of *Vulcanodinium rugosum*." *Mar Drugs* 13 (9):5642-56. doi: 10.3390/md13095642.
- Abadie, E., A. Muguet, T. Berteaux, N. Chomerat, P. Hess, E. Roque D'OrbCastel, E. Masseret, et M. Laabir. 2016. "Toxin and Growth Responses of the Neurotoxic Dinoflagellate *Vulcanodinium rugosum* to Varying Temperature and Salinity." *Toxins (Basel)* 8 (5). doi: 10.3390/toxins8050136.
- Abadie, E., C. Chiantella, A. Crottier, L. Rhodes, E. Masseret, T. Berteaux, et M. Laabir. 2018. "What are the main environmental factors driving the development of the neurotoxic dinoflagellate *Vulcanodinium rugosum* in a Mediterranean ecosystem (Ingril lagoon, France)?" *Harmful Algae* 75:75-86. doi: 10.1016/j.hal.2018.03.012.
- Abadie, E., L. Kaci, T. Berteaux, P. Hess, V. Sechet, E. Masseret, J. Rolland, et M. Laabir. 2015. "Effect of Nitrate, Ammonium and Urea on Growth and Pinnatoxin G Production of *Vulcanodinium rugosum*." *Marine Drugs* 13 (9):5642.
- Abadie, E., A. Muguet, T. Berteaux, N. Chomérat, P. Hess, E. Roque D'OrbCastel, E. Masseret, et M. Laabir. 2016. "Toxin and Growth Responses of the Neurotoxic Dinoflagellate *Vulcanodinium rugosum* to Varying Temperature and Salinity." *Toxins (Basel)* 8 (5):136. doi: 10.3390/toxins8050136.
- Al Muftah, A., A.I. Selwood, A.J. Foss, H.M. Al-Jabri, M. Potts, M. Yilmaz. 2016. "Algal toxins and producers in the marine waters of Qatar, Arabian Gulf". *Toxicon* 122:54-66.
- Anses (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail). 2017a. Valeurs toxicologiques de référence. Guide d'élaboration de l'Anses. <https://www.anses.fr/fr/system/files/SUBSTANCES2017SA0016Ra.pdf>
- Anses (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail). 2017b. Étude individuelle nationale des consommations alimentaires 3 (INCA 3). Avis de l'Anses et Rapport d'expertise collective. <https://www.anses.fr/fr/system/files/NUT2014SA0234Ra.pdf>
- Anses-Université de Trieste-CNRS. 2014. Pinnatoxines en lien avec l'espèce *Vulcanodinium rugosum* (II) Partie 2 : Etudes sur la toxicité des pinnatoxines et d'extraits de *Vulcanodinium rugosum*.
- Araoz, R., S. Ramos, F. Pelissier, V. Guerineau, E. Benoit, N. Vilarino, L. M. Botana, A. Zakarian, et J. Molgo. 2012. "Coupling the Torpedo Microplate-Receptor Binding Assay with Mass Spectrometry to Detect Cyclic Imine Neurotoxins." *Analytical Chemistry* 84 (23):10445-10453. doi: 10.1021/ac3027564.
- Araoz, R., D. Servent, J. Molgo, B. I. Iorga, C. Fruchart-Gaillard, E. Benoit, Z. Gu, C. Stivala, et A. Zakarian. 2011. "Total synthesis of pinnatoxins A and G and revision of the mode of action of pinnatoxin A." *J Am Chem Soc* 133 (27):10499-511. doi: 10.1021/ja201254c.
- Barnes, P. R., D. J. Kanabar, L. Brueton, J. Newsom-Davis, S. M. Huson, N. P. Mann, et D. Hilton-Jones. 1995. "Recurrent congenital arthrogryposis leading to a diagnosis of myasthenia gravis in an initially asymptomatic mother." *Neuromuscul Disord* 5 (1):59-65.
- Belin, C., D. Soudant, et Z. Amzil. 2009. Surveillance des toxines lipophiles dans les coquillages. Analyse statistique et comparaison des résultats obtenus par deux méthodes d'analyse : les bio-essais sur souris et les analyses chimiques par CL-SM/SM. 98 p. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00014/12568/>
- Bravo, H., et H. J. Karten. 1992. "Pyramidal neurons of the rat cerebral cortex, immunoreactive to nicotinic acetylcholine receptors, project mainly to subcortical targets." *Journal of Comparative Neurology* 320 (1):62-68. doi: 10.1002/cne.903200104.
- CALIPSO (Etude des Consommations Alimentaires de produits de la mer et Imprégnation aux éléments traces, Polluants et Oméga 3.). 2006. 162 p. J.C. Leblanc (Coordinateur). Afssa/Ministère de l'Agriculture et de la pêche. <https://www.anses.fr/fr/system/files/PASER-Ra-Calipso.pdf>
- Chou, T., T. Haino, M. Kuramoto, D. Uemura. 1996. "Isolation and structure of pinnatoxin D, a new shellfish poison from the Okinawan bivalve *Pinna muricata*". *Tetrahedron Letters* 37(23): 4027-4030.
- Cognetti, G. et F. Maltagliati. 2000. "Biodiversity and Adaptive Mechanisms in Brackish Water Fauna." *Marine Pollution Bulletin* 40 (1):7-14. doi: [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(99\)00173-3](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(99)00173-3).
- Cohu, S., L. Mangialajo, T. Thibaut, A. Blanfuné, S. Marro, et R. Lemée. 2013. "Proliferation of the toxic dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata* in relation to depth, biotic substrate and environmental factors in the North West Mediterranean Sea." *Harmful Algae* 24:32-44. doi: 10.1016/j.hal.2013.01.002.

- Conroy, W. G., A. B. Vernallis, et D. K. Berg. 1992. "The alpha 5 gene product assembles with multiple acetylcholine receptor subunits to form distinctive receptor subtypes in brain." *Neuron* 9 (4):679-91.
- Corradi, J., et C. Bouzat. 2016. "Understanding the Bases of Function and Modulation of alpha7 Nicotinic Receptors: Implications for Drug Discovery." *Mol Pharmacol* 90 (3):288-99. doi: 10.1124/mol.116.104240.
- Costanza, R., Ralph d'Arge, Rudolf de Groot, S. Farber, M. Grasso, B. Hannon, K. Limburg, S. Naeem, R. V. O'Neill, J. Paruelo, R.G. Raskin, P. Sutton, et M. van den Belt. 1998. "The value of the world's ecosystem services and natural capital." *Ecological Economics* 25 (1):3-15. doi: [https://doi.org/10.1016/S0921-8009\(98\)00020-2](https://doi.org/10.1016/S0921-8009(98)00020-2).
- Couesnon, A., J. Lindovsky, A. Zakarian, S. Creuzet, et J. Molgo. 2014. "Pinnatoxins block skeletal neuromuscular junction activity and affect embryo development." *Toxicon* 91:175-176. doi: 10.1016/j.toxicon.2014.08.036.
- Cuddihy, S. L., S. Drake, D. T. Harwood, A. I. Selwood, P. S. McNabb, et M. B. Hampton. 2016. "The marine cytotoxin portimine is a potent and selective inducer of apoptosis." *Apoptosis* 21 (12):1447-1452. doi: 10.1007/s10495-016-1302-x.
- Darius, H. T., M. Roué, M. Sibat, J. Viallon, C. M. I. Gatti, M. W. Vandersea, P. A. Tester, R. W. Litaker, Z. Amzil, P. Hess, et M. Chinain. 2018. "Tectus niloticus (Tegulidae, gastropod) as a novel vector of ciguatera poisoning: Detection of pacific ciguatoxins in toxic samples from nuku hiva island (french polynesia)." *Toxins (Basel)* 10 (1). doi: 10.3390/toxins10010002.
- DGAL (Direction générale de l'alimentation). 2009. "note de service DGAI/SDQA/SDSSA/N2009-8331".
- Dinger, J., et B. Prager. 1993. "Arthrogryposis multiplex in a newborn of a myasthenic mother--case report and literature." *Neuromuscul Disord* 3 (4):335-9.
- Dourado, M., et P. B. Sargent. 2002. "Properties of nicotinic receptors underlying Renshaw cell excitation by α -motor neurons in neonatal rat spinal cord." *Journal of Neurophysiology* 87 (6):3117-3125.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2010a. "Scientific Opinion on marine biotoxins in shellfish – Cyclic imines (spirolides, gymnodimines, pinnatoxins and pteriattoxins)." *EFSA Journal* 8 (6):1628. doi: 10.2903/j.efsa.2010.1628.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2010b. "Statement on further elaboration of the consumption figure of 400 g shellfish meat on the basis of new consumption data." *EFSA Journal* 8 (8):1706. doi: 10.2903/j.efsa.2010.1706.
- Eikermann, M., F. M. Vogt, F. Herbstreit, M. Vahid-Dastgerdi, M. O. Zenge, C. Ochterbeck, A. de Greiff, et J. Peters. 2007. "The predisposition to inspiratory upper airway collapse during partial neuromuscular blockade." *Am J Respir Crit Care Med* 175 (1):9-15. doi: 10.1164/rccm.200512-1862OC.
- Engstrom, J.W. 2004. "Myasthenia gravis: diagnostic mimics". *Semin Neurol*. 24(2):141-7.
- Farrugia, M. E., M. D. Robson, L. Clover, P. Anslow, J. Newsom-Davis, R. Kennett, D. Hilton-Jones, P. M. Matthews, et A. Vincent. 2006. "MRI and clinical studies of facial and bulbar muscle involvement in MuSK antibody-associated myasthenia gravis." *Brain* 129 (Pt 6):1481-92. doi: 10.1093/brain/awl095.
- Galzi, J. L., F. Revah, A. Bessis, et J. P. Changeux. 1991. "Functional architecture of the nicotinic acetylcholine receptor: from electric organ to brain." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 31:37-72. doi: 10.1146/annurev.pa.31.040191.000345.
- Garcia-Altares, M., A. Casanova, V. Bane, J. Diogene, A. Furey, et P. de la Iglesia. 2014. "Confirmation of pinnatoxins and spirolides in shellfish and passive samplers from Catalonia (Spain) by liquid chromatography coupled with triple quadrupole and high-resolution hybrid tandem mass spectrometry." *Mar Drugs* 12 (6):3706-32. doi: 10.3390/md12063706.
- Garrett, M. J., C. Puchlutegui, A. I. Selwood, et J. L. Wolny. 2014. "Identification of the harmful dinoflagellate *Vulcanodinium rugosum* recovered from a ballast tank of a globally traveled ship in Port Tampa Bay, Florida, USA." *Harmful Algae* 39:202-209. doi: 10.1016/j.hal.2014.07.014.
- Gates, K.W. 2015. *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology, and Detection, Third Edition, by Luis M. Botana*. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 24:4, 411-414, doi: 10.1080/10498850.2015.1024964
- Geiger, M., G. Desanglois, K. Hogeveen, V. Fessard, T. Lepretre, F. Mondeguer, Y. Guitton, F. Herve, V. Sechet, O. Grovel, Y. F. Pouchus, et P. Hess. 2013. "Cytotoxicity, fractionation and dereplication of extracts of the dinoflagellate *Vulcanodinium rugosum*, a producer of pinnatoxin G." *Mar Drugs* 11 (9):3350-71. doi: 10.3390/md11093350.

- Gerssen, A., P. P. Mulder, M. A. McElhinney, et J. de Boer. 2009. "Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the detection of marine lipophilic toxins under alkaline conditions." *J Chromatogr A* 1216 (9):1421-30. doi: 10.1016/j.chroma.2008.12.099.
- Gotti, C., M. Zoli, et F. Clementi. 2006. "Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance." *Trends Pharmacol Sci* 27 (9):482-91. doi: 10.1016/j.tips.2006.07.004.
- Gueret, S. M., D. P. Furkert, et M. A. Brimble. 2010. "Synthesis of a Functionalized 7,6-Bicyclic Spiroimine Ring Fragment of the Spirolides." *Org Lett* 12 (22):5226-5229. doi: 10.1021/ol102525w.
- Haberer J.P. 2017. Pharmacologie des curares. EMC - Anesthésie-Réanimation 14(3):1-25 [Article 36-355-A-10].
- Hampton, M. B., A. Selwood, et F. Shi. 2014. International Publication Number WO 2014/189393 A3, 27 November 2014.
- Hannah, D.J., G.T. Desmond, T. Deveral, P.D. Jones, et J. Fry. 1995. "Extraction of Lipid-Soluble Marine Biotoxins." *J AOAC Int* 78 (2).
- Harsing, L. G., Jr., H. Sershen, et A. Lajtha. 1992. "Dopamine efflux from striatum after chronic nicotine: evidence for autoreceptor desensitization." *J Neurochem* 59 (1):48-54.
- Heinemann, S., J. Merlie, J. Lindstrom. 1978. "Modulation of acetylcholine receptor in rat diaphragm by anti-receptor sera". *Nature* 6;274(5666):65-8.
- Hellyer, S. D., A. I. Selwood, L. Rhodes, et D. S. Kerr. 2011. "Marine algal pinnatoxins E and F cause neuromuscular block in an in vitro hemidiaphragm preparation." *Toxicon* 58 (8):693-9.
- Hellyer, S. D., A. I. Selwood, L. Rhodes, et D. S. Kerr. 2013. "Neuromuscular blocking activity of pinnatoxins E, F and G." *Toxicon* 76:214-20. doi: 10.1016/j.toxicon.2013.10.009.
- Hernandez-Becerril, D. U., M. C. Rodriguez-Palacio, et C. Lozano-Ramirez. 2013. "Morphology and life stages of the potentially pinnatoxin-producing thecate dinoflagellate *Vulcanodinium rugosum* from the tropical Mexican Pacific." *Botanica Marina* 56 (5-6):535-540. doi: 10.1515/bot-2013-0079.
- Hess, P., E. Abadie, F. Herve, T. Berteaux, V. Sechet, R. Araoz, J. Molgo, A. Zakarian, M. Sibat, T. Rundberget, C. O. Miles, et Z. Amzil. 2013. "Pinnatoxin G is responsible for atypical toxicity in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and clams (*Venerupis decussata*) from Ingril, a French Mediterranean lagoon." *Toxicon* 75:16-26. doi: 10.1016/j.toxicon.2013.05.001.
- Hess, P., B. Grune, D. B. Anderson, T. Aune, L. M. Botana, P. Caricato, H. P. van Egmond, M. Halder, S. Hall, J. F. Lawrence, C. Moffat, R. Poletti, J. Richmond, G. P. Rossini, C. Seamer, et J. S. Vilageliu. 2006. "Three Rs Approaches in Marine Biotoxin Testing. The Report and Recommendations of a joint ECVAM/DG SANCO Workshop (ECVAM Workshop 54)." *Altern Lab Anim* 34 (2):193-224.
- Hu, T., A. S. deFreitas, J. M. Curtis, Y. Oshima, J. A. Walter, et J. L. Wright. 1996. "Isolation and structure of prorocentrolide B, a fast-acting toxin from *Prorocentrum maculosum*." *J Nat Prod* 59 (11):1010-4. doi: 10.1021/np960439y.
- Ifremer (Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer). 2012. P. Hess, F. Hervé, E. Abadie, V. Séchet, J. Molgo, Z. Amzil, V. Fessard. "Pinnatoxines en lien avec l'espèce *Vulcanodinium rugosum*". Référence Ifremer: 11/1219401/NYF, 09-2012 - R.RBE/EMP/PHYC 12-05, 144 p.
- Ifremer (Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer). 2014. F. Mondegue, P. Hess, F. Hervé, V. Raimbault, L. Déchamps, M. Bardouil, E. Abadie, T. Berteaux, Z. Zendong, V. Séchet, H. Palvadeau, Z. Amzil. "Contamination des mollusques bivalves par *Vulcanodinium rugosum*, producteur de pinnatoxines". Rapport Scientifique et Technique/2014.10 PHYC/Nantes, 60p.
- Ito, Y., R. Miledi, P.C. Molenaar, A. Vincent, R.L. Polak, M. van Gelder, J.N. Davis. 1976. "Acetylcholine in human muscle". *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 16;192(1109):475-80.
- Jackson, J. J., C. E. Stivala, B. I. Iorga, J. Molgo, et A. Zakarian. 2012. "Stability of cyclic imine toxins: interconversion of pinnatoxin amino ketone and pinnatoxin A in aqueous media." *J Org Chem* 77 (22):10435-40. doi: 10.1021/jo301632d.
- Klimisch, H. J., M. Andreae, et U. Tillmann. 1997. "A systematic approach for evaluating the quality of experimental toxicological and ecotoxicological data." *Regul Toxicol Pharmacol* 25 (1):1-5. doi: 10.1006/rtph.1996.1076.
- Klink, R., A. de Kerchove d'Exaerde, M. Zoli, et J. P. Changeux. 2001. "Molecular and physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors in the midbrain dopaminergic nuclei." *J Neurosci* 21 (5):1452-63.
- Landry, Y. et Gies, J.P. 2014. "Pharmacologie des cibles à la thérapeutique", 3^e édition, 544 p

- Li, A., H. Chen, J. Qiu, H. Lin, et H. Gu. 2016. "Determination of multiple toxins in whelk and clam samples collected from the Chukchi and Bering seas." *Toxicon* 109:84-93. doi: 10.1016/j.toxicon.2015.11.016.
- Lindstrom, J. 1978. "How the autoimmune response to acetylcholine receptor impairs neuromuscular transmission in myasthenia gravis and its animal model". *Fed Proc.* 37(14):2828-30.
- Litkey, J., M.W. Dailey. 2007. "Anticholinergic toxicity associated with the ingestion of lupini beans". *Am J Emerg Med.* 25(2):215-7.
- Lu, C. K., G. H. Lee, R. Huang, et H. N. Chou. 2001. "Spiro-prorocentrimine, a novel macrocyclic lactone from a benthic *Prorocentrum* sp of Taiwan." *Tetrahedron Letters* 42 (9):1713-1716.
- MacKenzie, L. A. 2010. "In situ passive solid-phase adsorption of micro-algal biotoxins as a monitoring tool." *Curr Opin Biotechnol* 21 (3):326-31. doi: 10.1016/j.copbio.2010.01.013.
- MacKenzie, L. A., A. I. Selwood, P. McNabb, et L. Rhodes. 2011. "Benthic dinoflagellate toxins in two warm-temperate estuaries: Rangaunu and Parengarenga Harbours, Northland, New Zealand." *Harmful Algae* 10 (6):559-566. doi: 10.1016/j.hal.2011.02.007.
- MacKenzie, L., V. Beuzenberg, P. Holland, P. McNabb, et A. Selwood. 2004. "Solid phase adsorption toxin tracking (SPATT): a new monitoring tool that simulates the biotoxin contamination of filter feeding bivalves." *Toxicon* 44 (8):901-18. doi: 10.1016/j.toxicon.2004.08.020.
- McCarron, P., W. A. Rourke, W. Hardstaff, B. Pooley, et M. A. Quilliam. 2012. "Identification of pinnatoxins and discovery of their fatty acid ester metabolites in mussels (*Mytilus edulis*) from eastern Canada." *J Agric Food Chem* 60 (6):1437-46. doi: 10.1021/jf204824s.
- McCarron, P., E. Wright, et M. A. Quilliam. 2014. "Liquid chromatography/mass spectrometry of domoic acid and lipophilic shellfish toxins with selected reaction monitoring and optional confirmation by library searching of product ion spectra." *J AOAC Int* 97 (2):316-24.
- McCarron, P., W.A. Rourke, W. Hardstaff, B. Pooley et M.A. Quilliam. 2012. "Identification of Pinnatoxins and Discovery of Their Fatty Acid Ester Metabolites in Mussels (*Mytilus edulis*) from Eastern Canada." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60 (6):1437-1446. doi: 10.1021/jf204824s.
- McCarthy, M., V. Bane, M. Garcia-Altares, F. N. van Pelt, A. Furey, et J. O'Halloran. 2015. "Assessment of emerging biotoxins (pinnatoxin G and spirolides) at Europe's first marine reserve: Lough Hyne." *Toxicon* 108:202-9. doi: 10.1016/j.toxicon.2015.10.007.
- McCauley, J.A., K. Nagasawa, P.A., S.G. Mischke, M.A. Semones, Y. Kishi. 1998. "Total synthesis of pinnatoxin A". *Journal of the American Chemical Society* 120(30):7647-7648.
- McNabb, P. S., D. J. McCoubrey, L. Rhodes, K. Smith, A. I. Selwood, R. van Ginkel, A. L. MacKenzie, R. Munday, et P. T. Holland. 2012. "New perspectives on biotoxin detection in Rangaunu Harbour, New Zealand arising from the discovery of pinnatoxins." *Harmful Algae* 13:34-39. doi: 10.1016/j.hal.2011.09.013.
- Nickell, J.R., V.P. Grinevich, K.B. Siripurapu, A.M. Smith, L.P. Dwoskin. 2013. "Potential therapeutic uses of mecamlamine and its stereoisomers". *Pharmacol Biochem Behav.* 108:28-43. doi: 10.1016/j.pbb.2013.04.005
- Molgo, J., E. Girard, et E. Benoit. 2007. "Cyclic Imines: An Insight into this Emerging Group of Bioactive Marine Toxins " In *Phycotoxins Chemistry and Biochemistry*, édité par L. Botana editeur Balckwell publishing, 319.
- Molgo, J., P. Marchot, R. Araoz, E. Benoit, B. I. Iorga, A. Zakarian, P. Taylor, Y. Bourne, et D. Servent. 2017. "Cyclic imine toxins from dinoflagellates: a growing family of potent antagonists of the nicotinic acetylcholine receptors." *J Neurochem* 142 Suppl 2:41-51. doi: 10.1111/jnc.13995.
- Molgó, J., E. Benoit, R. Aráoz, A. Zakarian et B.I. Iorga. 2016. "Spirolides and Cyclic Imines: Toxicological Profile." In *Marine and Freshwater Toxins*, édité par P. Gopalakrishnakone, Vidal Haddad Jr, Aurelia Tubaro, Euikyung Kim et William R. Kem, 193-217. Dordrecht: Springer Netherlands.
- Moreira-Gonzalez, A.R., A. Comas-Gonzalez, A. Valle-Pombrol, M. Seisdedo-Losa, C. Alonso-hernandez, O. Hernandez-Leyva, L.F. Ferandes, N. Chomerat, G. Bilien, F. Herve, G.A. Rovillon, P. Hess, et L.L. Mafra. 2018. "Summer bloom of *Vulcanodinium rugosum* in Cienfuegos Bay (Cuba) associated to dermatitis in swimmers." 18th edition of the International Conference on Harmful Algae (ICHA), 21-26 October 2018, Nantes (France). Poster 238. Abstract book https://www.icha2018.com/medias/content/files/ICHA_2018_Abstract_Book_v8.pdf
- Mountfort, D. O., T. Suzuki, et P. Truman. 2001. "Protein phosphatase inhibition assay adapted for determination of total DSP in contaminated mussels." *Toxicon* 39 (2-3):383-90.

- Munday, R. 2008. "Toxicology of cyclic imines: gymnodimine, spirolides, pinnatoxins, pteriattoxins, prorocentrolide, spiro-prorocentrimine and symbioimines. ." In *Seafood and freshwater toxins - Pharmacology, Physiology and Detection*, édité par Taylor & Francis Group L.Botana. CRC Press.
- Munday, R., A. I. Selwood, et L. Rhodes. 2012. "Acute toxicity of pinnatoxins E, F and G to mice." *Toxicon* 60 (6):995-999.
- Nézan, E., et N. Chomérat. 2011. "*Vulcanodinium rugosum* gen. nov., sp. nov. (dinophyceae): A new marine dino-flagellate from the french mediterranean coast." *Cryptogamie, Algologie* 32 (1):3-18.
- Newsom-Davis, J. 2004. "Lambert-Eaton myasthenic syndrome". *Rev Neurol (Paris)* 160(2):177-80.
- Nixon, Scott W. 1981. "The flux of carbon, nitrogen and phosphorus between coastal lagoons and offshore waters." *UNESCO Technical Papers in Marine Science (UNESCO). no. 33.*
- Ortega, J.A., J. Lazerson. 1987. "Anagryne-induced red cell aplasia, vascular anomaly, and skeletal dysplasia". *J Pediatr.* 111(1):87-9.
- Penna, A., E. Garcés, M. Vila, M. G. Giacobbe, S. Fraga, A. Lugliè, I. Bravo, E. Bertozzini, et C. Vernesi. 2005. "Alexandrium catenella (Dinophyceae), a toxic ribotype expanding in the NW Mediterranean Sea." *Marine Biology* 148 (1):13-23. doi: 10.1007/s00227-005-0067-5.
- Panter, K.E., L.F. James, D.R. Gardner. 1999. "Lupines, poison-hemlock and *Nicotiana* spp: toxicity and teratogenicity in livestock". *J Nat Toxins* 8(1):117-34.
- Plaud, B., B. Debaene, et F. Donati. 2001. "The corrugator supercilii, not the orbicularis oculi, reflects rocuronium neuromuscular blockade at the laryngeal adductor muscles." *Anesthesiology* 95 (1):96-101.
- PNUE (Programme des Nations Unies pour l'environnement). 2007. "Rapport annuel." ISBN : 978-92-807-2907-8, https://wedocs.unep.org/bitstream/handle/20.500.11822/7647/UNEP_AR_2007_FR.pdf?sequence=6&isAllowed=y
- Raggenbass, M., et D. Bertrand. 2002. "Nicotinic receptors in circuit excitability and epilepsy." *J Neurobiol* 53 (4):580-9. doi: 10.1002/neu.10152.
- Rambla-Alegre, M., C. O. Miles, P. de la Iglesia, M. Fernandez-Tejedor, S. Jacobs, I. Sioen, W. Verbeke, I. A. Samdal, M. Sandvik, V. Barbosa, A. Tediosi, E. Madorran, K. Granby, M. Kotterman, T. Calis, et J. Diogene. 2018. "Occurrence of cyclic imines in European commercial seafood and consumers risk assessment." *Environ Res* 161:392-398. doi: 10.1016/j.envres.2017.11.028.
- Rhodes, L., K. Smith, A. Selwood, P. McNabb, S. Molenaar, R. Munday, C. Wilkinson, et G. Hallegraeff. 2011. "Production of pinnatoxins E, F and G by scrippsielloid dinoflagellates isolated from Franklin Harbour, South Australia." *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 45 (4):703-709. doi: 10.1080/00288330.2011.586041.
- Rhodes, L., K. Smith, A. Selwood, P. McNabb, R. van Ginkel, P. Holland, et R. Munday. 2010. "Production of pinnatoxins by a peridinoid dinoflagellate isolated from Northland, New Zealand." *Harmful Algae* 9 (4):384-389. doi: 10.1016/j.hal.2010.01.008.
- Rubio, F., L. Kamp, J. Carpino, E. Faltin, K. Loftin, J. Molgo, et R. Araoz. 2014. "Colorimetric microtiter plate receptor-binding assay for the detection of freshwater and marine neurotoxins targeting the nicotinic acetylcholine receptors." *Toxicon* 91:45-56. doi: 10.1016/j.toxicon.2014.08.073.
- Rundberget, T., J. A. Aasen, A. I. Selwood, et C. O. Miles. 2011. "Pinnatoxins and spirolides in Norwegian blue mussels and seawater." *Toxicon* 58 (8):700-11. doi: 10.1016/j.toxicon.2011.08.008.
- Scherer, K., R.S. Bedlack, D.L. Simel. 2005. "Does this patient have myasthenia gravis?" *JAMA* 293(15):1906-14. doi: 10.1001/jama.293.15.1906.
- Selwood, A. I., C. O. Miles, A. L. Wilkins, R. van Ginkel, R. Munday, F. Rise, et P. McNabb. 2010. "Isolation, structural determination and acute toxicity of pinnatoxins E, F and G." *J Agric Food Chem* 58 (10):6532-42. doi: 10.1021/jf100267a.
- Selwood, A. I., A. L. Wilkins, R. Munday, H. Gu, K. F. Smith, L. L. Rhodes, et F. Rise. 2014. "Pinnatoxin H: A new pinnatoxin analogue from a South China Sea *Vulcanodinium rugosum* isolate." *Tetrahedron Letters* 55 (40):5508-5510. doi: 10.1016/j.tetlet.2014.08.056.
- Selwood, A. I., A. L. Wilkins, R. Munday, F. Shi, L. L. Rhodes, et P. T. Holland. 2013. "Portimine: A bioactive metabolite from the benthic dinoflagellate *Vulcanodinium rugosum*." *Tetrahedron Letters* 54 (35):4705-4707. doi: 10.1016/j.tetlet.2013.06.098.

- Senanayake, N., et G. C. Roman. 1992. "Disorders of neuromuscular transmission due to natural environmental toxins." *J Neurol Sci* 107 (1):1-13.
- Shi, F. 2012. "Chemical and toxicological investigation of the toxic dinoflagellate, *Karenia brevisulcata*." PhD thesis, Lincoln University. 237 p. <https://core.ac.uk/reader/35466138>
- Smith, K. F., L. L. Rhodes, S. Suda, et A. I. Selwood. 2011. "A dinoflagellate producer of pinnatoxin G, isolated from sub-tropical Japanese waters." *Harmful Algae* 10 (6):702-705. doi: 10.1016/j.hal.2011.05.006.
- Sourieux, M., S.S. Bertrand et J.-R. Cazalets. 2018. "Cholinergic-mediated coordination of rhythmic sympathetic and motor activities in the newborn rat spinal cord." *PLoS biology* 16 (7):e2005460-e2005460. doi: 10.1371/journal.pbio.2005460.
- Sournia, A., C. Belin, C. Billard, M. Catherine, E. Eraldledenn, J. Fresnel, P. Lassus, A. Pastoureaud, et R. Soulard. 1992. "The repetitive and expanding occurrence of a green bloom-forming dinoflagellate (dynophyceae) on the coasts of France." *Cryptogamie, Algologie* 13 (1):1-13.
- Stivala, C.E., E. Benoit, R. Aráoz, D. Servent, A. Novikov, J. Molgó et A. Zakarian. 2015. "Synthesis and biology of cyclic imine toxins, an emerging class of potent, globally distributed marine toxins." *Nat Prod Rep* 32 (3):411-435. doi: 10.1039/C4NP00089G.
- Takada, N., N. Umemura, K. Suenaga, et D. Uemura. 2001. "Structural determination of pteriattoxins A, B and C, extremely potent toxins from the bivalve *Pteria penguin*." *Tetrahedron Letters* 42 (20):3495-3497. doi: 10.1016/S0040-4039(01)00478-6.
- Torigoe, K., M. Murata, T. Yasumoto et T. Iwashita. 1988. Prorocentrolide, a toxic nitrogenous macrocycle from a marine dinoflagellate, *Prorocentrum lima*. *J Am Chem Soc* 110 (23):7876-7877. doi: 10.1021/ja00231a048.
- Uemura, D., T. Chou, T. Haino, A. Nagatsu, S. Fukuzawa, S. Z. Zheng, et H. S. Chen. 1995. "Pinnatoxin-a - a toxic amphoteric macrocycle from the Okinawan bivalve *Pinna muricata*". *J Am Chem Soc* 117 (3):1155-1156. doi: 10.1021/ja00108a043.
- Villar-Gonzalez, A., M. L. Rodriguez-Velasco, et A. Gago-Martinez. 2011. "Determination of lipophilic toxins by LC/MS/MS: single-laboratory validation." *J AOAC Int* 94 (3):909-22.
- Vincent, A., J. Newsom-Davis, V. Martin. 1978. "Anti-acetylcholine receptor antibodies in D-penicillamine-associated myasthenia gravis". *Lancet*. 10;1(8076):1254.
- Vincent, A., S. Huda, M. Cao, H. Cetin, I. Koneczny, P. Rodriguez-Cruz, L. Jacobson, S. Viegas, S. Jacob, M. Woodhall, A. Nagaishi, A. Maniaol, V. Damato, M.I. Leite, J. Cossins, R. Webster, J. Palace, D. Beeson. 2018. "Serological and experimental studies in different forms of myasthenia gravis". *Ann N Y Acad Sci*. 1413(1):143-153. doi: 10.1111/nyas.13592. Erratum in: *Ann N Y Acad Sci*. 2018 Apr;1417(1):130.
- Widmer, S., D. A. Moneret-Vautrin, M. C. Laxenaire, et C. Mouton. 1988. "[Leukocyte histamine liberation tests for the diagnosis of anaphylactic reaction to curare-like agents]." *Allerg Immunol (Paris)* 20 (9):344-5.
- Yasumoto, T., Y. Oshima, et M. Yamaguchi. 1978. "Occurrence of a New Type of Shellfish Poisoning in the Tohoku District." *Nippon Suisan Gakkaishi (Japanese Edition)* 44 (11):1249-1255.
- Yasumoto, T., M. Murata, Y. Oshima, G.K. Matsumoto et J.O.N. Clardy. 1984. "Diarrhetic Shellfish Poisoning." In *Seafood Toxins*, 207-214. American Chemical Society.
- Young, J.M., R.D. Shytle, P.R. Sanberg, T.P. George. 2001. "Mecamylamine: new therapeutic uses and toxicity/risk profile". *Clin Ther*. 23(4):532-65.
- Zendong, Z., C. Herrenknecht, E. Abadie, C. Brissard, C. Tixier, F. Mondegue, V. Sechet, Z. Amzil, et P. Hess. 2014. "Extended evaluation of polymeric and lipophilic sorbents for passive sampling of marine toxins." *Toxicon* 91:57-68. doi: 10.1016/j.toxicon.2014.03.010.
- Zendong, Z., P. McCarron, C. Herrenknecht, M. Sibat, Z. Amzil, R. B. Cole, et P. Hess. 2015. "High resolution mass spectrometry for quantitative analysis and untargeted screening of algal toxins in mussels and passive samplers." *J Chromatogr A* 1416:10-21. doi: 10.1016/j.chroma.2015.08.064.
- Zeng, N., H. Gu, K. F. Smith, L. L. Rhodes, A. I. Selwood, et W. Yang. 2012. "The first report of *Vulcanodinium rugosum* (Dinophyceae) from the South China Sea with a focus on the life cycle." *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 46 (4):511-521. doi: 10.1080/00288330.2012.719911.
- Zheng, S. Z., F. L. Huang, Chen S. C., Tan X. F., Zuo J. B., Peng J., et Xie R. W. 1990. "The Isolation and Bioactivities of Pinnatoxin." *Chinese Journal of Marine Drugs Zhongguo Haiyang Yaowu* (9):33-35.

ANNEXES

Annexe 1 : Lettre de saisine

2016-SA-0012

2016-SA-0013



COURRIER ARRIVE

12 JAN. 2016

DIRECTION GENERALE

MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE, DE L'AGROALIMENTAIRE ET DE LA FORÊT

Direction générale de l'alimentation

Service de l'alimentation

Sous-direction de la sécurité sanitaire des aliments

Bureau des produits de la mer et d'eau douce

251, rue de Vaugirard
75732 Paris cedex 15

Dossier suivi par : Pauline Favre

Tél. : 01 49 55 50 89

Fax : 01 49 55 56 80

Mél : bpmed.sdssa.dgal@agriculture.gouv.fr

Réf. : 15-016

0244

MINISTÈRE DES AFFAIRES SOCIALES, DE LA SANTÉ ET DES DROITS DES FEMMES

Direction générale de la santé

Sous-direction de la prévention des risques liés à l'environnement et à l'alimentation

Bureau de l'alimentation et de la nutrition

14, avenue Duquesne
75350 Paris 07 SP

Dossier suivi par : Magali NAVINER

Tél. : 01 40 56 89 44

Mél : magali.naviner@sante.gouv.fr

Le Directeur Général de l'Alimentation
et

Le Directeur Général de la Santé

à

Monsieur le Directeur Général de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
4 rue Pierre et Marie Curie
94701 Maisons-Alfort Cedex

Paris, le 11 JAN. 2016

Objet : Demande d'avis de l'Agence quant à la toxicité chronique ou aiguë de certains composés produits par la microflore aquatique susceptibles d'exposer le consommateur à un risque par ingestion : pinnatoxines et BMAA

Pièces jointes :

- Résultats de l'étude pinnatoxines (un rapport pour la phase I et deux rapports pour la phase II). Transmis par mail du fait de la taille des documents.
- Publication de l'Ifremer concernant la pinnatoxine G (Hess et al 2013)
- Résultat de suivi mensuel des pinnatoxines au niveau de l'Etang d'Ingril de juillet 2015
- Publications de l'Ifremer concernant la détection de BMAA dans les coquillages (2 publications : Réveillon et al, 2014, et Réveillon et al 2015)
- Courrier de l'InVS à l'ARS Languedoc Roussillon du 24 juillet 2012

Conformément à l'article R. 1313-1 du code de la santé publique, vous trouverez ci-après une saisine de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail en vue d'établir les risques liés à la toxicité chronique ou aiguë de certains composés, les pinnatoxines et la BMAA (Beta-N-Méthylamino-L-Alanine), produits par la microflore aquatique et susceptibles d'exposer le consommateur à un risque sanitaire par ingestion de coquillages contaminés.

A- PINNATOXINES

Des phycotoxines de *Vulcanodinium rugosum*, à savoir la pinnatoxine et ses analogues, ont été identifiées par l'Ifremer dans quelques zones aquatiques françaises, notamment dans l'étang d'Ingril.

Leur présence peut (sans certitude) correspondre à des situations de discordance (cf le dispositif de vigilance expertisé par l'Agence, avis 2012- SA-0196 du 29 juillet 2014 et avis 2015- SA-0135 du 14 août 2015) mis en évidence par le dispositif de vigilance (discordances entre bio-essais souris et analyses chimiques des toxines réglementées).

Le niveau maximal observé est de 1244 µg/kg de pinnatoxine G dans des moules en 2010 à Ingril (Hess et al 2013¹). Plus récemment, un rapport d'essai de l'Ifremer rendu dans le cadre du suivi mensuel de cette toxine au niveau de cet étang (ci-joint), fait état d'un niveau de 1143 µg/kg de pinnatoxine G dans des moules.

Or, il apparaît qu'une DL (dose létale) 50 a été établie à environ 200 µg/kg sur la souris par gavage lors de travaux de l'Université de Trieste, en collaboration avec le CNRS (Gif-sur-Yvette) et l'Anses (Fougères ; contact : V. Fessard), mentionnés dans le rapport « Pinnatoxines en lien avec l'espèce *Vulcanodinium rugosum* » de novembre 2014 ci-joint (l'ensemble des rapports pinnatoxines de l'Anses et de l'Ifremer, phase I et II sont joints pour information).

C'est pourquoi, je souhaiterais que l'Agence puisse répondre aux questions suivantes :

- 1) Existe-t-il chez l'homme des données toxicologiques pour les pinnatoxines et notamment, pour les effets aigus, une DL50 reconnue ? Existe-t-il des données pour le risque chronique sous la forme d'une valeur toxicologique de référence (VTR) basée sur ces effets ?
- 2) Compte tenu de ces données toxicologiques, et au vu du contexte (cf rapports pinnatoxines joints), existe-t-il une préoccupation de santé publique aux niveaux de contaminations identifiés par l'Institut dans certaines zones marines françaises ?
- 3) Quelles modalités de suivi de la pinnatoxine dans le milieu marin pourraient être recommandées, en vue d'une prise en compte de ces toxines dans le dispositif de vigilance ?

B- BETA-METHYLAMINO-L-ALANINE (BMAA)

L'Ifremer a, à différentes reprises, appelé l'attention de la DGAL sur les suspicions d'implication du BMAA dans des maladies neurodégénératives à l'occasion des essais que l'Institut a pu conduire sur la présence de cet acide aminé, non protéique, neurotoxique dans des organismes aquatiques.

Par exemple, une récente publication de chercheurs de l'Ifremer dans « Marine Drugs »² qui présente la méthode analytique développée par l'Institut (HILIC-MS-MS) pour identifier cet acide aminé insiste, en introduction, sur les cas suspects, *a priori* jamais élucidés, de syndrome « sclérose unilatérale amyotrophique-Parkinson-démence » (complexe ALS/PDC selon l'acronyme anglais), développés par la population autochtone de l'île de Guam. Ces cas pourraient être imputables à la bio-magnification dans la chaîne alimentaire du BMAA à partir de graines de cycas présentes sur l'île et dont la farine est utilisée de façon traditionnelle. Ces cycas seraient contaminés en BMAA par des cyanobactéries de par leur système racinaire³. L'Ifremer a testé par ailleurs la présence de BMAA dans du plancton, du périphyton (biofilm présent sur les moules) et

¹ Hess, P., et al., Pinnatoxin G is responsible for atypical toxicity in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and clams (*Venerupis decussata*) from Ingril, a French Mediterranean lagoon, *Toxicon* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.05.001>

² *Mar. Drugs* 2014, 12, 5441-5467 ; doi:10.3390/md12115441, D. Réveillon et al.

³ D'autres auteurs suggèrent un lien éventuel entre la maladie et la consommation occasionnelle de chauve-souris, elles-mêmes consommatrices des graines et, incidemment du BMAA.

des moules⁴. Il ressort de ces deux publications que les coquillages de l'Etang de Thau sont contaminés à des degrés divers.

Se pose dès lors la question de l'implication éventuelle de coquillages contaminés en BMAA dans la survenue de maladies neurodégénératives. L'Institut national de veille sanitaire s'est prononcé sur ce sujet en 2012 dans un document adressé à l'ARS Languedoc-Roussillon (ci-joint) qui minimise l'importance sanitaire des éléments tendant à identifier un lien entre coquillages contaminés par le BMAA et maladies neurodégénératives, en particulier faute d'une méthodologie adéquate pour mettre en évidence un quelconque lien de causalité.

Dans ce contexte, nous souhaiterions que l'Agence puisse répondre aux questions suivantes :

- 1) Quel est le degré de robustesse du lien épidémiologique suggéré entre exposition chronique au BMAA et syndrome de maladies neurodégénératives « SLA – Parkinson – démence », à travers une revue bibliographique, qui pourra intégrer, entre autres, les éléments liés à l'île de Guam ?
- 2) Quelles sont les données toxicologiques disponibles sur le BMAA ?
- 3) Au vu des données toxicologiques, compte tenu des niveaux observés par l'Ifremer dans certains coquillages, peut-il exister une préoccupation sanitaire liée au BMAA en lien avec l'ingestion de produits aquatiques (à relier sans doute à des scénarii réalistes de consommation de coquillages) ? L'Agence a-t-elle des recommandations complémentaires à formuler (études, etc.) ?

Enfin, l'Agence peut-elle déterminer, en complément des réponses aux questions précédentes, des pistes de recherches à engager prioritairement sur la toxicologie de ces toxines d'algues encore insuffisamment documentées du point de vue toxicologique ?

Pour l'ensemble de ces questions, nous attendons dans la mesure du possible (à préciser dans le contrat d'expertise) une réponse de votre part sous 6 mois (6 mois pour les pinnatoxines et 6 mois pour la BMAA).

Le Directeur Général de la Santé,

Professeur Benoît VALLET

Le Directeur Général de l'Alimentation,
Patrick DEHAUMONT


Copies :

DGAL/ BERL
DPMA (à l'attention de Philippe Ronsin)
DGCCRF (à l'attention de Geneviève Morrange)
Ifremer (à l'attention de Nadine Neaud Masson et de Catherine Belin, coordination REPHY et vigilance, Zouher Amzil , laboratoire PHYC)
LNR biotoxines marines (Anses Maisons Alfort, à l'attention de Marina Nicolas)

⁴ Marine Environmental Research 110 (2015) 8-18, D. Réveillon et al.

Annexe 2 : Grilles de lecture des études clés identifiées par le GT

Auteurs, Année de la publication, Titre	Rapport Anses –Université de Trieste – CNRS. Pinnatoxines en lien avec l'espèce <i>Vulcanodinium rugosum</i>. Novembre 2014 Etude de la toxicité aiguë par voie orale sur souris d'un extrait de culture de <i>Vulcanodinium rugosum</i>, d'une fraction purifiée et de la pinnatoxine G pure, pages 52 à 60
Type d'étude	Toxicité aiguë
Respect BPL – lignes directrices	Pas d'information sur les BPL Pas de référence à une ligne directrice OCDE
Nom de la toxine	Pinnatoxine G Ou extrait de <i>V. rugosum</i>
Substance test Pureté	Pinnatoxine G (pureté annoncée de 100%), extrait méthanolique de <i>V. rugosum</i> (contenant 0,03% de PnTX-G) et fraction purifiée (contenant 2% de PnTX-G) fournis par le Dr Philipp Hess (Ifremer, Laboratoire Phycotoxines, Nantes Cedex, France).
Espèce	Souris
Souche	CD-1 (Harlan, Italie)
Sexe	Femelle uniquement
Age	4 semaines
Poids	18-20 g, pesées immédiatement avant traitement
Nombre d'individus par groupe	Groupes de 3 à 8 souris cage par groupes de 5
Témoin	Des animaux témoins ont reçu uniquement un volume équivalent du véhicule seul
Concentrations en toxine	Initialement, la toxicité de l'extrait brut de <i>V. rugosum</i> (25, 65, 160, 400 and 1000 mg/kg) et de la fraction purifiée (0,4, 0,95, 2,4, 6 and 15 mg/kg) ont été évaluées à des doses équivalentes de celles administrées pour la PnTX-G (8, 20, 50, 120, 300 µg/kg) , sur la base de leur contenu en toxine. En plus, la PnTX-G a également été administrée avec de plus fortes doses (220, 300, 370, 450 µg/kg) afin de calculer la DL50 (dose entraînant la mortalité de 50% des animaux traités).
Voie d'administration	Oral : gavage
Volume	10 ml/kg
Véhicule	La PnTX G, l'extrait de <i>V. rugosum</i> et sa fraction, dissous dans du tampon phosphate (PBS) pH 7,0, contenant 1,8% d'éthanol
Fréquence d'administration	Administration unique
Durée	Observation en continu pendant 24h après administration. Puis, les souris ont été pesées et anesthésiées par injection ip de tiletamine/zolazepam (Zoletil®, Virbac, Milan Italie ; 20 mg/kg) et de xylazine (Xylazine®, Virbac, Milan Italie ; 5 mg/kg).
Autres traitements	A jeun 3h avant administration, la nourriture a été redonnée 2h après l'administration <i>ad libitum</i> pendant toute la période d'observation. Selon la ligne directrice de l'OCDE n°425 (OECD, 2008), l'utilisation de souris mises à jeun pendant 3 h avant l'administration est la meilleure condition pour évaluer la toxicité aiguë par voie orale d'un nouveau composé en réduisant les conditions de stress des animaux qui peuvent induire des divergences de résultats.
Paramètres étudiés	Mortalité, signes de toxicité, analyse histologique de certains organes, analyses sanguines biochimiques : aspartate-aminotransférase, AST; alanine-aminotransférase, ALT; glutamate déshydrogénase, GLDH;

	créatine phosphokinase, CPK; créatinine; ions sodium; ions potassium; ions calcium, ions chlore et phosphore inorganique (Pi). Les animaux ont été exsanguinés et les principaux organes et tissus ont été prélevés et fixés dans du formol 10% tamponné pour analyse histologique. Les souris mortes pendant la période d'observation ont immédiatement été pesées et autopsiées ; du sang a été collecté pour les analyses sanguines et les principaux organes et tissus ont été prélevés et fixés pour analyse histologique.
Analyse statistique	Non précisée
Description de l'effet	<u>Mortalité et signes de toxicité</u> L'administration de PnTX-G provoque de la mortalité à partir de 220 µg/kg (3/5 souris, en 22 min). Aucune mortalité observée aux doses de 8, 20, 50, 120 µg/kg. Toutes les souris (5/5) sont mortes à la dose de 370 µg/kg (temps de survie égal ou inférieur à 18 min). La DL₅₀ de la PnTX-G a été calculée à 208 µg/kg (intervalle de confiance à 95% = 155-281 µg/kg). Avant la mort, les principaux signes de toxicité sont prostration, tremblements, sauts, respiration abdominale, paralysie des membres inférieurs et cyanose. Aucun changement macroscopique n'est visible lors de l'autopsie des souris traitées avec la PnTX G. L'administration orale de l'extrait méthanolique de <i>V. rugosum</i> dans du PBS n'a induit de la mortalité seulement qu'à la plus forte dose administrée (1 000 mg/kg correspondant à 300 µg/kg de PnTX-G) pour 2 souris sur 3 environ 22 h après le gavage. Les principaux signes de toxicité observés étaient : piloérection, prostration, hypothermie, paralysie des membres inférieurs, respiration abdominale et cyanose. L'autopsie des souris mortes a révélé des rougeurs au niveau de l'estomac non-glandulaire et du jéjunum ainsi qu'une accumulation de fluide dans le jéjunum. Aucun signe de toxicité ou de changements macroscopiques n'ont été observés avec la plus faible dose administrée. La fraction purifiée n'a produit aucun effet létal ni aucun signe de toxicité aux doses administrées (0,4-15 mg/kg, correspondant à 8 et 300 µg/kg de PnTX G respectivement), suggérant que certains composés de la fraction pourraient affecter l'absorption de la PnTX G contenue dans la fraction. <u>Nécropsie</u> Aucun changement macroscopique n'a été noté dans les souris après l'administration des fractions purifiées de l'extrait de <i>V. rugosum</i> ou de la PnTX G. Après l'administration de l'extrait méthanolique de <i>V. rugosum</i>, des changements macroscopiques n'ont été observés que pour les 2 souris mortes suite à l'administration de la plus forte dose (1000 mg/kg) : rougeurs de l'estomac non-glandulaire et du petit intestin accompagnées d'un contenu liquide dans ce dernier ont été observées. <u>Analyses biochimiques</u> Aucune différence des niveaux sériques en AST, ALT, GLDH, CPK, créatinine, Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Cl⁻ et phosphore inorganique n'a été observée entre les souris témoins et celles traitées avec l'extrait brut de <i>V. rugosum</i>, la fraction purifiée ou la PnTX G purifiée. <u>Analyses histologiques</u> L'analyse histologique des principaux organes et tissus ne révèle seulement que de faibles changements tissulaires dans l'intestin grêle des souris ayant reçu la plus forte dose de l'extrait de <i>V. rugosum</i> (1000 mg/kg correspondant à 300 µg/kg de PnTX G) ainsi que celles ayant reçu la PnTX G à des doses égales ou supérieures à 300 µg/kg. En particulier, une dégénérescence modérée de la muqueuse de l'intestin grêle avec une atrophie des villosités a été observée chez tous les animaux ayant reçu l'extrait ou la PnTX G. Aucun changement tissulaire n'a été noté chez les souris ayant reçu la fraction purifiée de <i>V. rugosum</i>.

Résultats	La DL₅₀ de la PnTX G a été calculée à 208 µg/kg pc (intervalle de confiance à 95% = 155-281 µg/kg). La dose maximale tolérée (DMT) est de 120 µg/kg pc de souris. Tableau a : Létalité et signes cliniques de toxicité observés chez la souris après administration unique par gavage de l'extrait de <i>Vulcanodinium rugosum</i>, de la fraction purifiée et de PnTX G purifiée <table><tr><th>Traitement</th><th>Dose</th><th>Létalité</th><th>Temps de survie (h :mn)</th><th>Signes cliniques de toxicité</th></tr><tr><td>Contrôles</td><td>-</td><td>0/8</td><td>-</td><td>-</td></tr><tr><td rowspan="5">Extrait <i>V. rugosum</i></td><td>25 mg/kg</td><td>0/3</td><td>-</td><td>-</td></tr><tr><td>65 mg/kg</td><td>0/3</td><td>-</td><td>-</td></tr><tr><td>160 mg/kg</td><td>0/3</td><td>-</td><td>-</td></tr><tr><td>400 mg/kg</td><td>0/3</td><td>-</td><td>-</td></tr><tr><td>1000 mg/kg</td><td>2/3</td><td>21 :46 – 22 :05</td><td>Piloérection, prostration, respiration abdominale, hypothermie, paralysie des membres inférieurs, cyanose</td></tr><tr><td rowspan="5"><i>V. rugosum</i> fraction purifiée</td><td>0,40 mg/kg</td><td>0/3</td><td>-</td><td>-</td></tr><tr><td>0,95 mg/kg</td><td>0/3</td><td>-</td><td>-</td></tr><tr><td>2,40 mg/kg</td><td>0/3</td><td>-</td><td>-</td></tr><tr><td>6,00 mg/kg</td><td>0/3</td><td>-</td><td>-</td></tr><tr><td>15,00 mg/kg</td><td>0/3</td><td>-</td><td>-</td></tr><tr><td rowspan="8">PnTX G</td><td>8 µg/kg</td><td>0/3</td><td>-</td><td>-</td></tr><tr><td>20 µg/kg</td><td>0/3</td><td>-</td><td>-</td></tr><tr><td>50 µg/kg</td><td>0/3</td><td>-</td><td>-</td></tr><tr><td>120 µg/kg</td><td>0/3</td><td>-</td><td>-</td></tr><tr><td>220 µg/kg</td><td>3/5</td><td>00 :20 – 00 :22 – 00 :22</td><td>Prostration, tremblements, sauts, respiration abdominale, hypothermie, paralysie des membres inférieurs, cyanose</td></tr><tr><td>300 µg/kg</td><td>4/5</td><td>00 :12 – 00 :13 – 00 :17 – 00 :23</td><td>Prostration, tremblements, sauts, respiration abdominale, hypothermie, paralysie des membres inférieurs, cyanose</td></tr><tr><td>370 µg/kg</td><td>5/5</td><td>00 :13 – 00 :15 – 00 :16 – 00 :17 – 00 :18</td><td>Prostration, tremblements, sauts, respiration abdominale, hypothermie, paralysie des membres inférieurs, cyanose</td></tr><tr><td>450 µg/kg</td><td>5/5</td><td>00 :12 – 00 :12 – 00 :15 – 00 :16 – 00 :29</td><td>Prostration, tremblements, sauts, respiration abdominale, hypothermie, paralysie des membres inférieurs, cyanose</td></tr></table>	Traitement	Dose	Létalité	Temps de survie (h :mn)	Signes cliniques de toxicité	Contrôles	-	0/8	-	-	Extrait <i>V. rugosum</i>	25 mg/kg	0/3	-	-	65 mg/kg	0/3	-	-	160 mg/kg	0/3	-	-	400 mg/kg	0/3	-	-	1000 mg/kg	2/3	21 :46 – 22 :05	Piloérection, prostration, respiration abdominale, hypothermie, paralysie des membres inférieurs, cyanose	<i>V. rugosum</i> fraction purifiée	0,40 mg/kg	0/3	-	-	0,95 mg/kg	0/3	-	-	2,40 mg/kg	0/3	-	-	6,00 mg/kg	0/3	-	-	15,00 mg/kg	0/3	-	-	PnTX G	8 µg/kg	0/3	-	-	20 µg/kg	0/3	-	-	50 µg/kg	0/3	-	-	120 µg/kg	0/3	-	-	220 µg/kg	3/5	00 :20 – 00 :22 – 00 :22	Prostration, tremblements, sauts, respiration abdominale, hypothermie, paralysie des membres inférieurs, cyanose	300 µg/kg	4/5	00 :12 – 00 :13 – 00 :17 – 00 :23	Prostration, tremblements, sauts, respiration abdominale, hypothermie, paralysie des membres inférieurs, cyanose	370 µg/kg	5/5	00 :13 – 00 :15 – 00 :16 – 00 :17 – 00 :18	Prostration, tremblements, sauts, respiration abdominale, hypothermie, paralysie des membres inférieurs, cyanose	450 µg/kg	5/5	00 :12 – 00 :12 – 00 :15 – 00 :16 – 00 :29	Prostration, tremblements, sauts, respiration abdominale, hypothermie, paralysie des membres inférieurs, cyanose
Traitement	Dose	Létalité	Temps de survie (h :mn)	Signes cliniques de toxicité																																																																																		
Contrôles	-	0/8	-	-																																																																																		
Extrait <i>V. rugosum</i>	25 mg/kg	0/3	-	-																																																																																		
	65 mg/kg	0/3	-	-																																																																																		
	160 mg/kg	0/3	-	-																																																																																		
	400 mg/kg	0/3	-	-																																																																																		
	1000 mg/kg	2/3	21 :46 – 22 :05	Piloérection, prostration, respiration abdominale, hypothermie, paralysie des membres inférieurs, cyanose																																																																																		
<i>V. rugosum</i> fraction purifiée	0,40 mg/kg	0/3	-	-																																																																																		
	0,95 mg/kg	0/3	-	-																																																																																		
	2,40 mg/kg	0/3	-	-																																																																																		
	6,00 mg/kg	0/3	-	-																																																																																		
	15,00 mg/kg	0/3	-	-																																																																																		
PnTX G	8 µg/kg	0/3	-	-																																																																																		
	20 µg/kg	0/3	-	-																																																																																		
	50 µg/kg	0/3	-	-																																																																																		
	120 µg/kg	0/3	-	-																																																																																		
	220 µg/kg	3/5	00 :20 – 00 :22 – 00 :22	Prostration, tremblements, sauts, respiration abdominale, hypothermie, paralysie des membres inférieurs, cyanose																																																																																		
	300 µg/kg	4/5	00 :12 – 00 :13 – 00 :17 – 00 :23	Prostration, tremblements, sauts, respiration abdominale, hypothermie, paralysie des membres inférieurs, cyanose																																																																																		
	370 µg/kg	5/5	00 :13 – 00 :15 – 00 :16 – 00 :17 – 00 :18	Prostration, tremblements, sauts, respiration abdominale, hypothermie, paralysie des membres inférieurs, cyanose																																																																																		
	450 µg/kg	5/5	00 :12 – 00 :12 – 00 :15 – 00 :16 – 00 :29	Prostration, tremblements, sauts, respiration abdominale, hypothermie, paralysie des membres inférieurs, cyanose																																																																																		
Qualité de l'étude	Points faibles - Pas d'information sur les BPL - Pas de référence à une ligne directrice OCDE - Pas d'information sut la méthode statistique utilisée - Etude non publiée dans une revue scientifique à comité de lecture (donc non revue par les pairs). Limites - Un seul sexe de souris a été étudié (femelles, considérées comme plus sensibles que les mâles) Points fort - L'une des rares études sur la toxicité <i>in vivo</i> des pinnatoxines - Propose une valeur de DL₅₀ avec de la PnTX G purifiée - Etude détaillant pour chaque dose les mortalités et les signes de toxicité observés, incluant des analyses histologiques et biochimiques - Etude sur mammifères, donc potentiellement transposable à l'Homme - Equipe connue dans le domaine de la toxicologie des biotoxines marines. Analyse ToxRTool <table><tr><td>Score total</td><td>17/21</td></tr><tr><td>Cotation de Klimish 2 : Valide avec restrictions</td><td>2</td></tr></table>	Score total	17/21	Cotation de Klimish 2 : Valide avec restrictions	2																																																																																	
Score total	17/21																																																																																					
Cotation de Klimish 2 : Valide avec restrictions	2																																																																																					

Type de financement	Public (Ministère de l'Agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt, et Ministère des Affaires Sociales et de la santé et l'Anses)
Etude à retenir pour l'expertise	Oui
Conclusions de l'étude	La PnTX G est toxique par gavage chez la souris avec une DL₅₀ autour de 200 µg/kg pc. La mortalité est très rapide environ 15-20 min après l'administration orale pour des doses de 220 à 450 µg/kg. Cette observation ainsi que les symptômes observés (tremblements, sauts) correspondent bien à un effet ciblant le système nerveux. La DL₅₀ est comparable à celle rapportée par Munday <i>et al.</i> (2012) chez des souris non à jeûn (DL₅₀ = 150 µg/kg pc; intervalle de confiance à 95 % : 105-199 µg/kg), mais significativement plus faible que celle déterminée par l'ingestion volontaire de toxine incorporée dans du fromage à tartiner chez des souris non à jeûn (DL₅₀ = 400 µg/kg, intervalle de confiance à 95 % : 380-470 µg/kg). Avec l'extrait brut de <i>V. rugosum</i>, la mort des souris intervient beaucoup plus lentement (autour de 22h après gavage) et certains symptômes (tremblements, sauts) ne sont pas observés. Même si les résultats suggèrent que l'absorption de la PnTX G peut être modifiée en présence d'autres composés présents dans l'extrait, cette hypothèse n'est pas soutenue par les résultats observés sur la perméabilité <i>in vitro</i> à l'aide du modèle Caco2 n'indiquant pas de différence entre l'absorption de la PnTX G purifiée et de celle contenue dans l'extrait brut et la fraction F3P3. Cependant, la biodisponibilité par voie orale ne se résume pas à l'absorption par la barrière intestinale et d'autres éléments peuvent interférer. L'observation histologique n'a révélé que peu de signes d'altération, localisés essentiellement au niveau de l'intestin grêle avec dégénérescence modérée de la muqueuse et une atrophie des villosités. Ces effets ne sont observés que pour des doses de PnTX G et d'extrait de <i>V. rugosum</i> entraînant une létalité. Pas de changements sévères au niveau des tissus ni d'altérations significatives des paramètres biochimiques rapportés après l'administration de PnTX G, probablement parce que la toxine induit un dommage fonctionnel rapide, tel que le blocage neuromusculaire dû à l'effet antagoniste sur les récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine des muscles squelettiques comme observé précédemment <i>in vitro</i> pour cette toxine (Hellyer <i>et al.</i>, 2013), plutôt qu'un dommage structurel au niveau de tissu(s). En particulier, après l'administration orale aiguë de PnTX G aux souris, l'activité de blocage neuromusculaire de la toxine peut être à la base des principaux symptômes observés chez les souris avant leur mort tels que la prostration, la dépression respiratoire et la paralysie des membres inférieurs.
Conclusion du GT	A partir de cette étude, le GT identifie une DMT de 120 µg/kg pc.

Auteurs, Année de la publication, Titre	Munday et al. (2012). Acute toxicity of pinnatoxins E, F and G to mice
Type d'étude	Toxicité aiguë
Respect BPL – lignes directrices	Pas d'information sur les BPL Etude réalisée selon la ligne directrice OCDE 425
Nom de la toxine	Pinnatoxines E, F et G
Substance test	- PnTX G purifiée à partir d'un extrait de cultures de <i>V. rugosum</i> (Cawthron Institute Culture Collection of Micro-Algae, isolate CAWD183) - PnTX E et F purifiées à partir d'un tapis de cyanobactérie <i>Lyngbya majuscula</i>
Pureté	Identité et pureté établie par RMN et LC-MS mais pas de donnée quantitative. Pas d'information sur les méthodes analytiques mises en œuvre.
Espèce	Souris
Souche	Swiss (élevées au laboratoire)
Sexe	Femelle uniquement
Age	Non précisé
Poids	18-22 g
Nombre d'individus par groupe	Non précisé
Témoin	Non précisé
Concentrations en toxine	Non précisées
Voie d'administration	Oral : gavage, fromage à tartiner ou beurre de cacahuète, bouchons pour rongeur Intrapéritonéal
Volume	1 ml pour ip, 200 µl pour gavage
Véhicule	Composés dissous dans éthanol puis dilués dans 1% Tween 60 dans solution saline Ip 5% éthanol v/v ; gavage 12,5% éthanol. Contenu en solvant non précisé pour les bouchons
Fréquence d'administration	Administration unique
Durée	Observation jusqu'à 14 jours après administration
Autres traitements	Nourries ou à jeun 16h avant administration
Paramètres étudiés	Mortalité, symptômes, autopsie
Analyse statistique	Calcul de la DL ₅₀ et de l'intervalle de confiance à 95% avec le programme statistique US EPA 2002 (AOT 425 Statistique Program) NOAEL estimée par régression logarithmique
Description de l'effet	<u>Par injection ip</u> : les souris ayant reçues des doses létales sont d'abord très actives, puis après 15–20 min, les souris deviennent moins actives, elles présentent une posture instable avec les membres postérieurs partiellement en extension. La respiration est abdominale.

Les animaux deviennent prostrés avec une vitesse de respiration diminuant jusqu'à cesser complètement ; cyanose et exophtalmie sont observées peu de temps avant la mort, qui a lieu 30 à 50 min après administration.

A des doses toxiques mais sub-létales (75% de la LD_{50}), les souris sont actives après 20–25 min mais l'activité décroît ensuite et, après une brève période de respiration abdominale rapide, le rythme respiratoire diminue puis redevient normal après 1 à 1,5h. A ce moment, les animaux sont léthargiques avec piloérection mais leur apparence et leur comportement redevient normal après 2 à 3h et ce jusqu'à la fin de l'observation.

Pas d'effet observé chez les souris injectées avec de la PnTX E, F ou G à des doses comprises entre 25–39% de la LD_{50} .

Pas d'anomalie observée à la nécropsie.

Pas d'analyse histologique réalisée.

Par gavage : les symptômes sont très similaires à ceux observés par ip, même si plus de temps pour voir apparaître l'inactivité et la respiration abdominale à des doses létales (25 à 40 min) ainsi que le temps de la mort (autour de 1,3 h).

Pour la PnTX F, pas de différence observée entre les souris nourries et à jeun de 16h sauf sur le temps de survenue des effets qui est environ deux fois moins élevé pour les souris à jeun.

Avec des doses sub-létales, les souris présentent une récupération complète et restent normales tout au long de la période d'observation.

Pas d'anomalie observée à la nécropsie.

Pas d'analyse histologique réalisée.

Dans la nourriture : pas d'effet observé avec les PnTX F et G à 32 et 38% respectivement de la dose létale.

Résultats

Table 1: Median lethal doses of pinnatoxins E, F and G by intraperitoneal injection

Compound	State of alimentation	LD_{50} (µg/kg) ^a	NOAEL (µg/kg)
PnTX E	Fed	57,0 (39,7 - 75,3)	22,0
	Fasted	48,0 (33,5 - 63,5)	ND ^b
PnTX F	Fed	12,7 (9,5 - 14,6)	3,2
	Fasted	14,9 (12,6 - 15,8)	ND ^b
PnTX G	Fed	48,0 (36,3 - 68,1)	18,8
	Fasted	42,7 (40,0 - 50,0)	ND ^b

^a: Figures in brackets indicate 95% confidence intervals

^b: Not determined

Table 2 : Median lethal doses of pinnatoxins E, F and G by gavage

Compound	State of alimentation	LD_{50} (µg/kg) ^a	NOAEL (µg/kg)
PnTX E	Fed	2800 (2380 – 3000)	600
PnTX F	Fed	25,0 (19,1 – 35,1)	9,9
	Fasted	29,9 (25,0 – 32,0)	ND ^b
PnTX G	Fed	150 (105 – 199)	75

^a: Figures in brackets indicate 95% confidence intervals

^b: Not determined

Table 3 : Median lethal doses of pinnatoxins E, F and G by voluntary intake

Compound	State of alimentation	Vehicle	LD_{50} (µg/kg) ^a	NOAEL (µg/kg)
PnTX E	Fed	Cream cheese	50,0 (39,4 – 62,8)	16,0
PnTX F	Fed	Peanut butter mix	50,0 (37,9 – 71,5)	ND ^b
	Fasted	Cream cheese	77,0 (NC ^c)	ND ^b
	Fasted	Peanut butter mix	50,0 (39,4 – 62,8)	ND ^b
	Fasted	Mousefood	50,0 (37,9 – 71,5)	ND ^b
PnTX G	Fed	Cream cheese	400 (380 – 470)	153

^a: Figures in brackets indicate 95% confidence intervals

	b: Not determined c: Not calculated.The pattern of deaths in this experiment was such that confidence limits could not be calculated by the OAT program																				
Résultats	Table 4 : Acute toxicity of cyclic imines by various routes of administration <table><tr><th>Compound</th><th>LD₅₀ intraperitoneal injection (µg/kg)</th><th>LD₅₀ by gavage (µg/kg)</th><th>LD₅₀ by voluntary consumption (µg/kg)</th><th>Reference</th></tr><tr><td>PnTX E</td><td>57</td><td>2800</td><td>-</td><td>This work</td></tr><tr><td>PnTX F</td><td>12,7</td><td>25,0</td><td>50</td><td>This work</td></tr><tr><td>PnTX G</td><td>48</td><td>150</td><td>400</td><td>This work</td></tr></table>	Compound	LD ₅₀ intraperitoneal injection (µg/kg)	LD ₅₀ by gavage (µg/kg)	LD ₅₀ by voluntary consumption (µg/kg)	Reference	PnTX E	57	2800	-	This work	PnTX F	12,7	25,0	50	This work	PnTX G	48	150	400	This work
Compound	LD ₅₀ intraperitoneal injection (µg/kg)	LD ₅₀ by gavage (µg/kg)	LD ₅₀ by voluntary consumption (µg/kg)	Reference																	
PnTX E	57	2800	-	This work																	
PnTX F	12,7	25,0	50	This work																	
PnTX G	48	150	400	This work																	
Qualité de l'étude	Points faibles - La concentration en éthanol de 5% v/v par voie ip et de 12.5% v/v par gavage est élevée. - Le volume (1 mL) injecté par voie i.p. est élevé pour une souris de 18 g (environ 6% du poids). - Variation du véhicule par consommation volontaire (fromage, beurre de cacahuète, bouchon pour rongeur) donc valeurs difficiles à prendre en compte car n'ayant pas été estimées de la même manière - Pas d'indication du nombre d'animaux/lot - Le fait de garder des souris de 18-22 g à jeun pendant 16 h n'est pas éthique. Il est recommandé de ne pas prolonger le jeûne des souris au-delà de 3 h. Malgré la validation par le comité d'éthique néo-zélandais, les experts estiment que 16h de jeun peut induire des biais (perte de poids). - Incertitudes quant aux dose utilisées, quant à la pureté des toxines - il n'y a pas eu de souris ayant reçu seulement le solvant utilisé. Limites : - Un seul sexe de souris a été étudié (femelles, considérées comme plus sensibles que les mâles) - Souris élevées au laboratoire - Utilisation de véhicules différents, aliments qui ne sont pas utilisés en routine avec les souris (fromage à tartiner), avec impact potentiel sur la pharmacocinétique des toxines. Forces : - L'une des rares études sur la toxicité <i>in vivo</i> des pinnatoxines - Propose des valeurs de DL₅₀ pour des PnTX purifiées - Etude sur mammifères, donc potentiellement transposable à l'Homme - Différents modes d'administration testés avec des résultats cohérents - Suit la ligne directrice de l'OCDE - Equipe réputée dans le domaine des toxines marines Analyse ToxRTool <table><tr><td>Score total</td><td>13/21</td></tr><tr><td>Cotation de Klimish 2 : Valide avec restrictions</td><td>2</td></tr></table>	Score total	13/21	Cotation de Klimish 2 : Valide avec restrictions	2																
Score total	13/21																				
Cotation de Klimish 2 : Valide avec restrictions	2																				
Type de financement	New Zealand Foundation for Research, Science and Technology, Contract CAWX0703.																				
Etude à retenir pour l'expertise	Oui																				
Conclusion du GT	A partir de cette étude, le GT identifie comme valeur clé la dose de 75 µg PnTX G/kg pc (administration par gavage, non à jeun), dose testée sans mortalité et sans signe apparent de neurotoxicité																				

Annexe 3 : Tableau récapitulatif des curares utilisés en France (Collège national des enseignants du DES d'anesthésie réanimation CNEAR)

PCHCE : pseudocholinestérase voie d'hofman ou méthylation exhaustive

PA pression artérielle

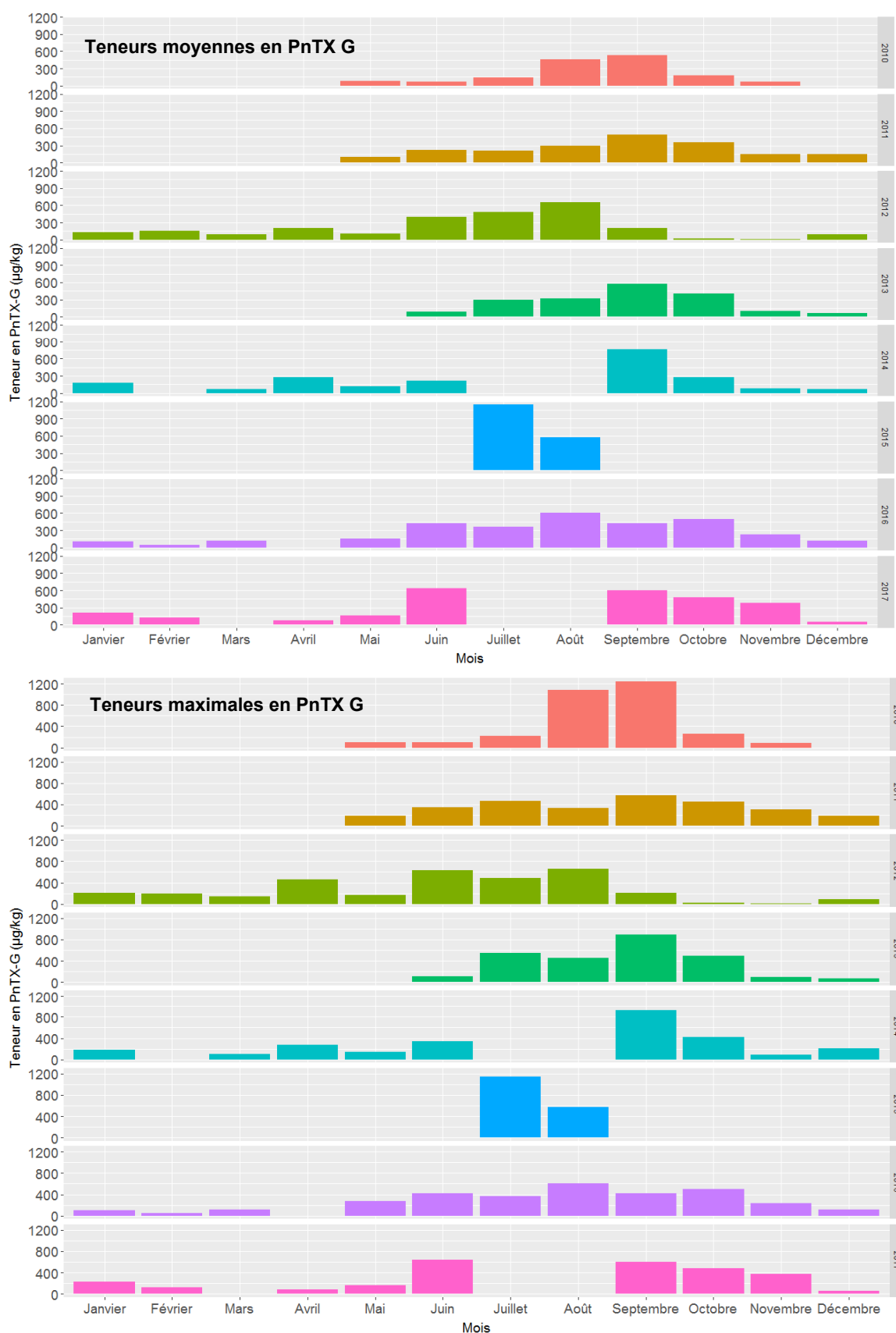
PIO pression intra oculaire

Qc rythme cardiaque

DCI	Succinylcholine Célocurine	Mivacurium Mivacron	Atracurium Tracrium	Rocuronium Esmeron	Vecuronium Norcuron	Cisatracurium Nimbex	Pancuronium Pavulon
Nom commercial							
Famille		Benzylisoquinoline	Benzylisoquinoline	Stéroïdes	Stéroïdes	Benzylisoquinoline	Stéroïdes
Types	Court	Court	Intermédiaire	Intermédiaire	Intermédiaire	Intermédiaire	Long
Mode d'action	Dépolarisant	Non dépolarisant	Non dépolarisant	Non dépolarisant	Non dépolarisant	Non dépolarisant	Non dépolarisant
Délai d'action (min)	1	3	2,5	1,5	3,5	4,5	4,5
Durée clinique (min)	8 – 10	15	30 - 40	30 - 40	30 - 40	40 - 60	60 - 120
Durée totale (min)	12	20 - 30	50 - 60	50 - 60	50 - 60	70 - 80	> 120
Indication	intub. difficile estomac plein acte bref porphyrie chirurgie ORL	chir 20 à 30 min réanimation tétanos	chir de 15 mn	chir de 30 min adaptation respi	chir de 20 min réanimation tétanos	intubation adaptation respi	chir 30 à 45 mn réanimation tétanos
Contre-indications	intox anti- cholinestérasiques hyperkaliémie H maligne déficit PCHE myopathie allergie atopie troubles du rythme ophtalmodilatateur ouvert myasthénie	hypersensibilité grossesse myasthénie intub difficile insuf rénale IHC	hypersensibilité myasthénie asthme intub difficile grossesse	hypersensibilité myasthénie intub difficile grossesse insuf rénale IHC	hypersensibilité myasthénie intub difficile grossesse insuf rénale cirrhose cholestase	hypersensibilité grossesse	myasthénies insuf rénale insuf hépatique intub difficile

DCI		Succinylcholine Célocurine	Mivacurium Mivacron	Atracurium Tracrium	Rocuronium Esmeron	Vecuronium Norcuron	Cisatracurium Nimbex	Pancuronium Pavulon
Nom commercial								
Précaution d'emploi Effets secondaires		↑ PIO et Plgstriq Larme, sialorrhée Bradycardie trouble du rythme anaphylactique HM Curarisat° longue Myalgie post-op Hyperkaliémie fasciculation	hypothermie anaphylaxie rare	anaphylaxie rare	hypothermie anaphylaxie rare	hypothermie allergie rare ↓ TP	hypothermie allergie rare ↓ TP	hypothermie allergie rare ↓ TP curari résiduelle
Pharmaco- cinétique	Absorption	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV
	Distribution	monophasique liaison prot 30 %	pluriphasique	biphasique liaison prot 80 %	triphasique liaison prot 30 %	biphasique liaison prot 20 %	biphasique	biphasique liaison prot 15 %
	Métabolisme	hydrolyse par PCHE	hydrolyse par PCHE	voie d'hofmann	hépatique peu métabolisé	hépatique métabolites actifs	voie d'hofmann	hépatique 10%
	Élimination	biliaire et rénale	biliaire et rénale	surtout biliaire Laudanosine	biliaire et rénale	biliaire	surtout biliaire Laudanosine	urinaire
Pharmacodynamie	Cardio- vasculaire	Bradycardie hypotension fibrillation Vent Rythme jctl. Dépression ♥		- < 0,6 mg/kg : peu d'effet - à forte dose : ↑ FC, Qc, ↓ PA		- bradycardie	Stable	↑ PA et du Qc tachycardie vagal
	Respiratoire	paralysie respi bronchospasme	paralysie respi ↓ Vt, puis apnée	paralysie respi ↓ Vt, puis apnée	paralysie respi ↓ Vt, puis apnée	paralysie respi ↓ Vt, puis apnée	paralysie respi ↓ Vt, puis apnée	paralysie respi ↓ Vt, puis apnée
	Œil					↓ PIO		↓ PIO
Allergie		++	+	+	++	++	+	+
Histaminolibération		Non	Oui	Oui	Oui	Oui	Non	Non
Accumulation		Non	Non	Non	Oui	Oui	Non	Oui
Les terrains	Coronarien					bradycardie risque ↓ PAD		tachycardie sauf si β -
	Obèse	↑ dose pd réel		dose du pd réel		dose du pd idéal		dose du pd idéal
	Personne âgée	↑ durée d'action		oui				↑ durée d'action

Annexe 4 : Suivi temporel de la contamination des moules (chair totale) par la PnTX G de l'étang d'Ingril



Annexe 5 : Résultats des tests statistiques sur la contamination par les PnTX G des mollusques bivalves

Test sur la saison (été versus autres saisons) (sigmaplot v12.5)

One Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in Notebook2

Normality Test (Shapiro-Wilk) Failed (P < 0.050)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Data source: Data 1 in Notebook2

Group	N	Missing	Median	25%	75%
automne	48	0	157.444	70.119	307.226
hiver	17	0	120.743	50.899	196.151
printemps	36	0	97.095	66.035	182.184
ete	49	0	324.039	131.387	585.870

H = 29.892 with 3 degrees of freedom. (P = <0.001)

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0.001)

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Dunn's Method) :

Comparison	Diff of Ranks	Q	P<0.05
ete vs hiver	47.659	3.897	Yes
ete vs printemps	44.973	4.716	Yes
ete vs automne	33.160	3.758	Yes
automne vs hiver	14.499	1.182	No
automne vs printemps	11.812	1.233	Do Not Test
printemps vs hiver	2.686	0.210	Do Not Test

Test sur la comparaison entre la contamination en PnTX G des moules et des palourdes de la lagune d'Ingril (sigmaplot V12.5)

One Way Analysis of Variance

Data source: Data 1 in donnee nettoyees

Normality Test (Shapiro-Wilk) Failed (P < 0.050)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Data source: Data 1 in donnee nettoyees

Group	N	Missing	Median	25%	75%
moules Ingril	150	0		158.520	89.921
Palourdes Ingril	20	0	23.246	18.808	28.287

H = 46.242 with 1 degrees of freedom. (P = <0.001)

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0.001)

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Dunn's Method) :

Comparison	Diff of Ranks	Q	P<0.05
moules Ingril vs Palourdes Ing	79.673	6.800	Yes

Test sur la comparaison des contaminations par la PnTX G des lagunes de l'Occitanie (Unistat V10.07)

** Multiple Comparisons (Dunn) **

Method: 95% Dunn interval

** denotes significantly different pairs. Vertical bars show homogeneous subsets.

A pairwise test result is significant if its q stat value is greater than the table q.

Group	Cases	Mean Rank	q
Parc	B		
Leu	ouzi		
Pre	In		
gates	vost		
Vic	gril		

Parc Leucate	12	7.7500	**	**	**
Bouzigues	11	18.0455		**	**
Prevost	12	30.9167	**		**
Vic	11	38.8636	**	**	
Ingril	12	51.7500	**	**	**

Group|

Parc Leucate	
Bouzigues	
Prevost	
Vic	
Ingril	

Comparison	Difference	Standard Error	q Stat	Table q
Ingril				
- Parc Leucate	44.0000	6.8859	6.3899	2.8070
Vic - Parc Leucate	31.1136	7.0406	4.4192	2.8070
Prevost				
- Parc Leucate	23.1667	6.8859	3.3644	2.8070
Bouzigues				
- Parc Leucate	10.2955	7.0406	1.4623	2.8070
Ingril - Bouzigues	33.7045	7.0406	4.7872	2.8070
Vic - Bouzigues	20.8182	7.1921	2.8946	2.8070
Prevost - Bouzigues	12.8712	7.0406	1.8281	2.8070
Ingril - Prevost	20.8333	6.8859	3.0255	2.8070
Vic - Prevost	7.9470	7.0406	1.1287	2.8070
Ingril - Vic	12.8864	7.0406	1.8303	2.8070

Comparison	Probability	Lower 95%	Upper 95%	Result
Ingril				
- Parc Leucate	0.0000	24.6711	63.3289	**
Vic - Parc Leucate	0.0001	11.3504	50.8769	**
Prevost				
- Parc Leucate	0.0077	3.8378	42.4955	**
Bouzigues				
- Parc Leucate	1.0000	-9.4678	30.0587	
Ingril - Bouzigues	0.0000	13.9413	53.4678	**
Vic - Bouzigues	0.0380	0.6298	41.0065	**
Prevost - Bouzigues	0.6753	-6.8921	32.6345	
Ingril - Prevost	0.0248	1.5045	40.1622	**
Vic - Prevost	1.0000	-11.8163	27.7102	
Ingril - Vic	0.6721	-6.8769	32.6496	

Homogeneous Subsets:

Group 1: Parc Leucate, Bouzigues

Group 2: Bouzigues, Prevost

Group 3: Prevost, Vic

Group 4: Vic, Ingril



Agence nationale de sécurité sanitaire
de l'alimentation, de l'environnement et du travail
14 rue Pierre et Marie Curie
F94701 Maisons-Alfort cedex
www.anses.fr
 @Anses_fr