

RAPPORT SCIENTIFIQUE

de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments
relatif à l'évaluation du dispositif de surveillance du milieu et à l'évaluation du risque
lié à la consommation des coquillages, notamment dans la situation du bassin
d'Arcachon

I- Question n° 1 : Elaborer la cartographie du bassin d'Arcachon et en tirer des enseignements au regard de la compréhension des phénomènes locaux toxiques

La figure ci-dessous présente le dispositif de surveillance opéré par l'Ifremer sur le bassin d'Arcachon. Les réseaux représentés sont le Réphy (Réseau de Surveillance du Phytoplancton et des Phycotoxines), le REMI, (Réseau de surveillance microbiologique), le RNO (Réseau national d'observation pour la qualité chimique du milieu marin) et Archyd (Réseau Hydrologique du bassin d'Arcachon). Apparaissent également les zones de production conchylicole des coquillages non fousseurs (moules et huîtres) et des fousseurs avec leur classement.

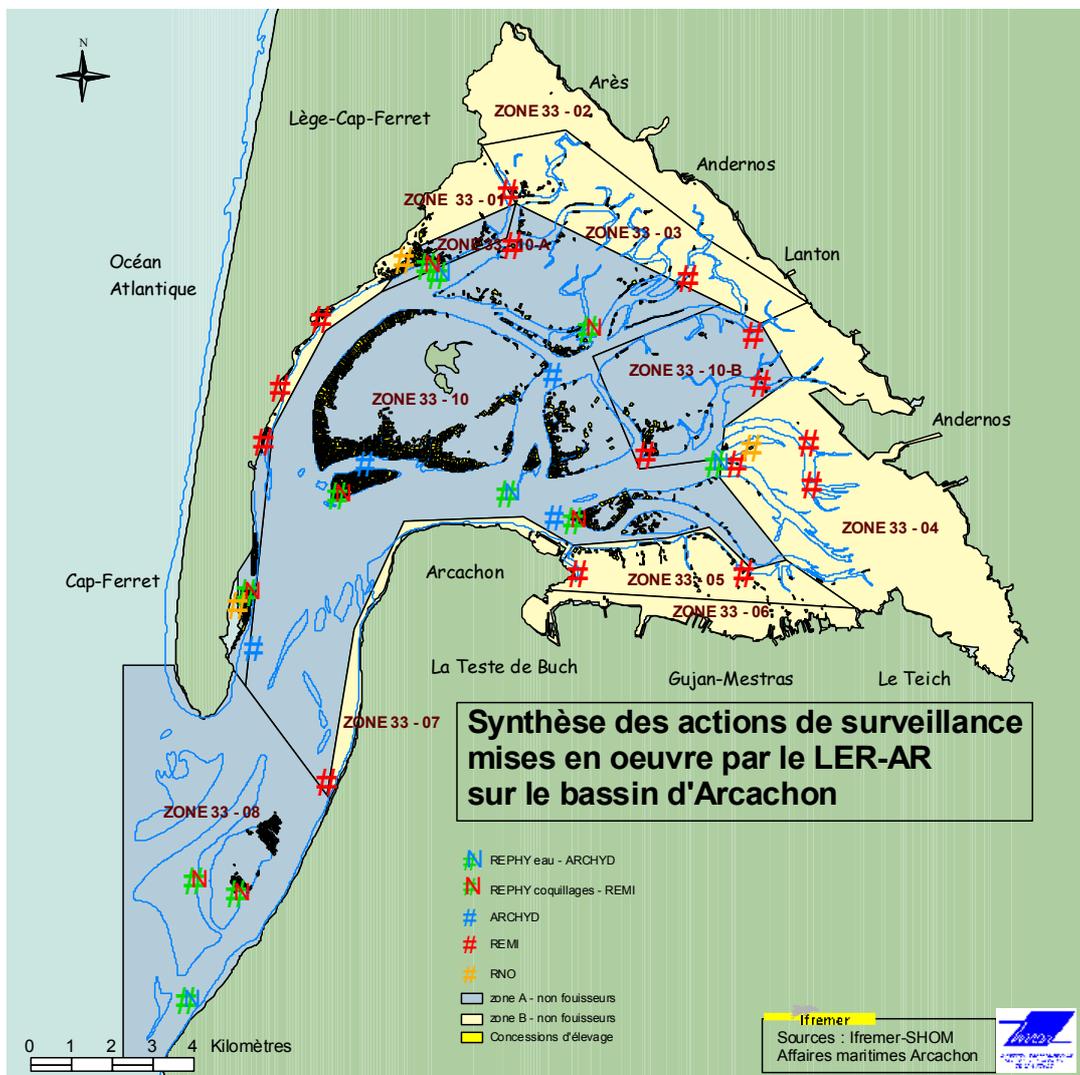
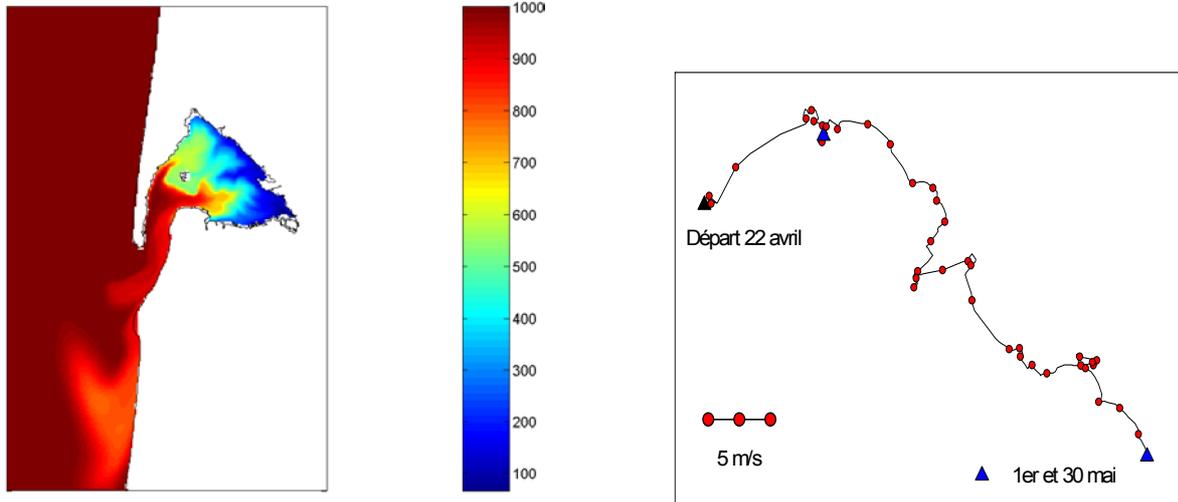


Figure 1 : Cartographie des points de surveillance Ifremer dans le bassin d'Arcachon

1- Impact des connaissances courantologiques sur le dispositif de surveillance) : Question de la sectorisation du bassin d'Arcachon

Cas des efflorescences à *Dinophysis*

La simulation de la pénétration d'une micro-algue arrivant de l'océan (Figure 2) se déroule conformément à la description faite ci-dessus de la dynamique des masses d'eau avec des vents de secteur Nord Nord-Ouest modérés.



Concentrations en *Dinophysis* après 1 mois (départ le 22 avril 2005 avec 1000 cellules/L à l'océan) - Avec vent réel

Hodographe du vent du 22 avril à fin mai 2005

Figure 2 : Résultats d'une simulation réalisée dans les conditions de marée et de vent de la crise 2005 : concentrations en *Dinophysis* dans le Bassin d'Arcachon après 1 mois d'apparition théorique de *Dinophysis* à l'océan à la concentration de 1000 cellules/L (Ifremer)

Malgré le nombre relativement faible d'épisodes toxiques dus à *Dinophysis* ayant touché le bassin d'Arcachon au cours des 20 dernières années, il apparaît comme établi que ces efflorescences viennent du large, pénètrent dans le bassin, affectent le banc d'Arguin puis peuvent se propager dans le bassin interne avec un délai de quelques jours mais ne s'y développent pas.

Cas des toxicités atypiques, inconnues

Les épisodes toxiques de 2005 (partiellement) et ceux de mai, puis d'août 2006, sont liés à une toxicité d'origine inconnue pour l'instant. Il est arrivé que les résultats de toxicité positive (tests-souris) alternent entre le Banc d'Arguin et le Bassin interne tant en 2005 qu'en 2006. Dans un tel cas, le schéma précédent lié à *Dinophysis* ne s'applique pas. En outre, si une des hypothèses étudiées actuellement (apparition de nouvelles algues potentiellement toxiques des genres *Prorocentrum* et *Fragilidium* ou effets synergiques de phycotoxines connues en faibles quantités) s'avérait exacte, elle induirait que le Bassin interne est tout autant, sinon plus, concerné que le Banc d'Arguin (les données d'Ifremer montrent que les deux algues pré-citées sont plus abondantes à l'intérieur).

2- Question de la classification des zones

La procédure de classification en zone A, B, C et D repose sur un critère microbiologique de contamination fécale illustré par le dénombrement d'*E. coli* et sur les concentrations en plomb, mercure et cadmium. Cette classification est sous la responsabilité du Préfet du département qui prend un arrêté de classement sur la base d'une proposition du DDAM après avis du DDASS.

La superposition des points Rephy et REMI est d'environ 50 % relativement au dispositif Rephy. L'objectif actuel de ce dispositif n'est pas la superposition des points des 2 réseaux parce que l'hypothèse retenue est qu'il n'y aurait pas de relation directe entre les risques de contamination fécale et phycotoxinique. Cette superposition de 50 % n'est motivée actuellement que par des contraintes

logistiques d'accès aux coquillages. Les points Rephy n'appartenant pas au REMI sont pour la plupart des points plus éloignés de la côte, tels que les points sur les gisements de pectinidés au large.

II- Question n°2 : Procéder à une analyse historique des événements de contamination liés aux phycotoxines marines à Arcachon et à une analyse analogique avec d'autres événements liés aux phycotoxines lipophiles.

1- Historique des événements de contamination liés aux phycotoxines marines dans le bassin d'Arcachon

Le tableau de l'annexe 1 (résultats du bio-essai sur souris des coquillages du bassin d'Arcachon, associés aux données du phytoplancton toxique, entre 1992 et 2006) synthétise les épisodes de toxicité liées aux phycotoxines recensés à Arcachon depuis 1992. Il est à noter qu'aucun épisode d'intoxication chez l'homme n'a été observé entre 1984, date de création du Rephy, et 1992.

Seuls les résultats relatifs aux épisodes toxiques sont décrits dans ce tableau, ce qui ne reflète pas la réalité de l'échantillonnage, l'ensemble des données comportant aussi des résultats négatifs.

Ces résultats de toxicité, acquis dans le cadre du Rephy (phycotoxines soient diarrhéiques maintenant appelées lipophiles, soient paralysantes, soient amnésiantes), sont synthétisés par année / mois / point, à raison de la plus forte valeur obtenue pour ce triplet. Un certain nombre de taxons phytoplanctoniques, toxiques, ont également été mentionnés en termes de présence / absence.

2- Analyse analogique avec d'autres événements liés aux phycotoxines lipophiles : épisodes de toxicité atypique recensés dans les données Rephy de 1992 à 2006

Préambule

En France, ce n'est qu'en 1983 que les intoxications diarrhéiques ont été liées aux efflorescences de dinoflagellés toxiques du genre *Dinophysis*. Elles ont provoqué, la même année, jusqu'à 3 300 cas de gastro-entérites en Bretagne sud. Depuis, un réseau de surveillance du phytoplancton et des phycotoxines (le Rephy) a été mis en place par l'Ifremer en 1984.

Une partie importante du littoral français est régulièrement affectée, à des périodes variables selon la latitude, par des proliférations de *Dinophysis*, généralement associées à une contamination des coquillages par les dinophysistoxines¹). La principale espèce incriminée ayant été identifiée comme étant *Dinophysis* cf. *acuminata* productrice de l'acide okadaïque et de pectenotoxine-2. Les régions les plus fréquemment touchées sont la Bretagne, la Normandie, le Languedoc-Roussillon et la Corse. Les concentrations cellulaires sont le plus souvent faibles, d'une centaine à quelques milliers de cellules par litre. Les épisodes toxiques sont généralement observés au printemps et en été en Atlantique, en été et à l'automne en Manche, pratiquement toute l'année en Méditerranée. Les coquillages concernés sont surtout les moules, mais aussi d'autres coquillages tels que huîtres, coques, coquilles Saint-Jacques, palourdes

L'ensemble des résultats des analyses physico-chimiques par chromatographie liquide couplée à la Spectrométrie de Masse (CL/SM-SM), réalisées sur les échantillons de coquillages positifs selon le test-souris pour les phycotoxines lipophiles, a mis en évidence, en plus de l'acide okadaïque et du dérivé DTX-3 ou -1, la présence de :

- DTX-2 en 2002 (isomère de l'acide okadaïque) et du dérivé DTX-3 lié à la présence de *D. acuta* en baie de Vilaine (Morbihan), au Croisic (Loire Atlantique) et en Bretagne ;
- Pectenotoxines en 2004 (PTX-2 et PTX-2-Séco acide et son épimère) dans les échantillons de coquillages de Salses Leucate et de Corse ;
- Spirolides (du groupe « FAT ») en 2005 dans les moules et les huîtres du bassin d'Arcachon.

¹Belin et Raffin, Les espèces phytoplanctoniques toxiques et nuisibles sur le littoral français de 1984 à 1995, résultats du REPHY », décembre 1998. Disponible sur : <http://www.ifremer.fr/envlit/documentation/documents.htm#1>

Description des événements

Les critères de sélection de ces événements ont été :

- leur recensement comme épisodes atypiques dans le document « Les espèces phytoplanctoniques toxiques et nuisibles sur le littoral français de 1984 à 1995, résultats du Rephy », décembre 1998 ;
- des résultats de temps de survie des souris très courts pour des tests de phycotoxines lipophiles : inférieurs à 30 minutes, accompagnés ou non de phytoplancton toxique.

Le tableau ci joint en annexe 2 (*épisodes de toxicité atypique recensés dans les données Rephy, pour l'ensemble du littoral français, de 1992 à 2006*) synthétise ces épisodes et les éventuelles explications qui ont pu être apportées ultérieurement.

L'utilisation, jusqu'à 1996, d'une méthode non spécifique des phycotoxines lipophiles (extraction des phycotoxines avec de l'acétone sans purification ultérieure) a conduit à plusieurs reprises de 1992 à 1996, à la mise en évidence d'épisodes de toxicité dite « atypique ». En effet, les conditions de mort des souris (temps de survie très courts, de l'ordre de quelques minutes, et symptômes neurologiques) étaient très différentes de celles habituellement observées en présence de phycotoxines lipophiles (temps de survie généralement supérieur à 30 minutes, et absence de symptômes neurologiques).

Les méthodes d'extraction utilisées à Ifremer ont été ensuite plusieurs fois modifiées dans les années suivantes (annexe 3). En 2002, les procédures d'extraction et le seuil utilisé pour l'interprétation du test (passage de 5h à 24h) ont été harmonisés avec le LNR (Afssa/Lerqap) et l'ensemble des laboratoires nationaux.

Certains de ces événements de toxicité atypique ont pu être expliqués ultérieurement, par exemple par des interférences avec les phycotoxines paralysantes (exemple Arcachon 1995 et Salses Leucate 1998). La plupart cependant sont restés inexpliqués :

- soit faute de matériel contaminé en quantité suffisante pour identifier la substance en cause ;
- soit en raison d'un artefact expérimental dans le cas où il s'agissait d'un seul test atypique durant un épisode *Dinophysis*. Néanmoins, la détection ultérieure, dans certaines régions françaises, de phycotoxines dont les étalons sont devenus disponibles (PTX2 et dérivés, SPXs), laissent à penser que ces phycotoxines pourraient être à l'origine de certains épisodes passés, par exemple les PTXs pour Salses Leucate en 2002 – 2003.

Etude de concordance entre les résultats des test-souris et ceux des analyses chimiques sur des prélèvements de coquillages dans le cadre du Rephy .

Des études préliminaires de concordance transmises à l'Afssa par l'Ifremer, entre les résultats du test sur souris et ceux des analyses chimiques par CL-SM/SM, sur les mêmes homogénats de glandes digestives des coquillages ayant subi la même procédure d'extraction de phycotoxines lipophiles, ont été réalisées durant la période 2002-2004. Les données montrent que sur 255 échantillons analysés sur la période 2002-2004 tous coquillages confondus originaires de l'ensemble du littoral national, le pourcentage de concordance des résultats des 2 tests est de 74 %.

- entre bio-essai positif² et analyse chimique montrant une teneur en phycotoxines inférieure à 160 µg/kg de coquillage, la non concordance est de 18,4 %;
- entre bio-essai négatif et analyse chimique montrant une teneur en phycotoxines supérieure à 160 µg/kg de coquillage, la non concordance est de 7,6 %.

Sur la période 2005 (hors Arcachon), une étude similaire, sur 178 échantillons, montre que ces non concordances sont respectivement de 20% et 7,5 %.

² Il convient de souligner qu'un test souris positif correspond, au regard de ces pourcentages, à son interprétation réglementaire (au moins 2 souris mortes sur 3 dans le délai de 24h). Toutefois, un test souris négatif n'équivaut pas forcément à une absence totale de toxicité chez la souris dans la mesure où le niveau de toxines est compris entre « non détecté » et inférieur à 160 µg/kg de coquillages (voir question 4 du rapport).

Les tableaux ci-après regroupent le nombre d'échantillons concordants et non concordants entre les résultats des bio-essais sur-souris et ceux des analyses chimiques, ainsi que le pourcentage des concordances pour la période 2002 – 2004 et l'année 2005.

Période 2002 – 2004 / tous coquillages

255 Echantillons	TS ⁺	TS ⁻	Concordance
AC ⁺	104	19	74%
AC ⁻	47	85	

Légende :

TS⁻ : test-souris 24h négatif

TS⁺ : test-souris 24h positif

AC⁻ : analyse chimique négative

AC⁺ : analyse chimique positive

Année 2005 / tous coquillages sauf ceux d'Arcachon

178 Echantillons	TS ⁺	TS ⁻	Concordance
AC ⁺	94	13	73%
AC ⁻	35	36	

Remarque : le pourcentage de concordance varie en fonction de l'espèce de coquillages (moules, huîtres, coquilles Saint-Jacques, coques, tellines, amandes, palourdes).

Concernant les échantillons de coquillages du bassin d'Arcachon de l'année 2005, sur les 35 échantillons étudiés, 34 sont non concordants.

Interprétation

Il est difficile d'expliquer la concordance ou la non concordance entre les résultats des bio-essais sur souris et les résultats des analyses chimiques par CL/SM-SM car il n'y a pas de domaine de comparaison entre les deux méthodes. Le test biologique sur souris exprime l'activité toxique globale des extraits de coquillages chez la souris sans l'identification ni la quantification des substances toxiques individuelles alors que l'analyse chimique identifie et quantifie une ou plusieurs phycotoxines cibles de manière spécifique.

Parmi les principaux facteurs susceptibles d'expliquer ce constat, on peut citer :

- L'effet « Matrice » : chez la souris, l'activité d'une phycotoxine donnée contenue dans un mélange de substances peut ne pas s'exprimer de la même manière que quand elle est à l'état pur ;
- La variabilité de réponse inter-individuelle des souris qui dépend du métabolisme, du poids, de la physiologie de la souris,
- L'interférence éventuelle des substances toxiques sur souris par voie intrapéritonéale et non toxiques par voie orale chez le consommateur (exemple des acides gras).
- La pondération du résultat chimique par le coefficient de toxicité relatif des différentes phycotoxines: la toxicité globale relevée par le test sur souris même pour le cas de mélange de phycotoxines s'exprime en termes de teneur en « x µg Equiv. toxine-étalon » et n'est comparable à la somme des quantités issues de la méthode LC/MS-MS que si la toxicité relative de chaque toxine apparentée à la toxine –étalon est connue (une toxine apparentée en grande quantité peut avoir un effet toxique chez la souris inférieure à une autre pourtant en faible quantité)
- La mise en évidence d'une toxicité chez l'animal due à une nouvelle toxine ou de nouveaux analogues de phycotoxines connues

Ces non concordances, observées en 2005 et en 2006 dans le Bassin d'Arcachon montrent que les phycotoxines lipophiles recherchées par l'analyse chimique ne permettent pas d'expliquer la toxicité observée chez l'animal. La recherche des causes fait l'objet d'une programme de recherche piloté par l'Afssa à la demande du ministre de l'Agriculture et de la Pêche.

Ces non concordances, dont le niveau semble exacerbé sur le Bassin d'Arcachon, pourraient être dues :

- concernant le bio-essai sur souris, à l'expression d'une toxicité globale basée sur le mode d'action qui fait intervenir la toxicité relative des différentes phycotoxines associée

éventuellement à des interactions avec des substances présentes dans la matrice analysée (par exemple avec des acides gras)

- concernant l'analyse chimique, à une identification et une quantification de phycotoxines individuelles connues, basées sur une réponse moléculaire.

Les éléments de correspondance des résultats entre ces 2 méthodes ne sont pas encore parfaitement connus.

Expériences des autres pays

Norvège (Spirolide)

Les spirolides ont été détectées lors de la surveillance en 2002 et 2003 en Norvège. La présence des spirolides s'est manifestée par une réponse positive « atypique » dans le bio-essai sur souris pour les phycotoxines lipophiles, après injection intrapéritonéale. Les souris sont mortes en une vingtaine de minutes, avec des symptômes violents (convulsions). L'espèce phytoplanctonique est *Alexandrium ostenfeldii*. Les 2 épisodes en Norvège se sont produits quand les zones étaient déjà fermées pour la présence de paralyzantes et lipophiles réglementées : il n'y a pas eu de décision spécifique de gestion pour les spirolides.

Il s'avère donc que la Norvège n'a pas été confrontée à ce jour à un besoin de fermeture de zones spécifiquement en rapport avec la détection de spirolide mais uniquement quand les phycotoxines classiques paralyzantes et lipophiles réglementées étaient mises en évidence.

Canada (Spirolide)

Les spirolides ont été détectées lors de la surveillance en 1991 au Canada (Est). Nous ne disposons pas encore de précision sur la gestion par ce pays des épisodes de détection de spirolides (réponse en attente). Cependant, il est important de mentionner que le Canada n'utilise pas le bio-essai pour la surveillance des phycotoxines lipophiles mais utilise uniquement une méthode séparative de type CL/SM, ce qui implique que même si ce pays dose les spirolides, ces phycotoxines peuvent ne pas être prises en compte pour la décision de gestion.

Nouvelle-Zélande (Gymnodimines)

Une évaluation du risque a été menée en Nouvelle-Zélande ayant conduit à conclure que les gymnodimines ne représentaient pas un risque pour le consommateur : les gymnodimines ne sont donc pas réglementées dans ce pays.

Tunisie (Gymnodimines)

En Tunisie, des exportations ont lieu vers l'Europe (France, Italie et Espagne). La Tunisie a fermé définitivement des zones contaminées par des gymnodimines et a renforcé ses contrôles (contrôle lot à lot uniquement par le bio-essai sur souris).

III- Question n°3 : Procéder à une analyse critique du dispositif actuellement en place tout au long de la filière et jusqu'à la remise au consommateur, au regard des réglementations européenne et nationale, de façon à identifier :

1- Rappel de la réglementation communautaire

Les zones de production

Le classement et la surveillance sanitaire des zones de production communautaire est de compétence communautaire. Jusqu'au 31 décembre 2005, les textes applicables étaient la directive 91/492/CEE du Conseil du 15 juillet 1991 fixant les règles sanitaires régissant la production et la mise sur le marché de mollusques bivalves vivants et ses décisions d'application.

Depuis le 1^{er} janvier 2006, cette directive a été abrogée et, en matière de surveillance conchylicole, c'est le dispositif du « Paquet hygiène » qui s'applique :

- **Le règlement du Parlement européen et du Conseil CE 178/2002** du 28 janvier 2002 établit les principes généraux et les prescriptions générales de la législation communautaire, et fixe les procédures relatives à la sécurité des denrées alimentaires ;

- **Les trois règlements CE 852/2004, CE 853/2004 et 854/2004** traitent respectivement des règles générales en matière d'hygiène des denrées alimentaires applicables par les exploitants, des règles spécifiques relatives aux denrées alimentaires d'origine animale et des règles spécifiques d'organisation des contrôles officiels ;
- **Le règlement CE 882/2004** traite des contrôles officiels effectués pour s'assurer de la conformité avec la législation sur les aliments pour animaux et les denrées alimentaires et avec les dispositions relatives à la santé animale et au bien-être des animaux ;
- **D'autres règlements** de la Commission complètent ces dispositions concernant les critères microbiologiques (CE 2073/2005) et l'hygiène des denrées, notamment les méthodes de référence à appliquer (CE 2074/2005).

La mise sur le marché des coquillages

- **Le règlement (CE) n°178/2002** établit les prescriptions générales de la législation alimentaire. Parmi celles-ci :
 - L'article 14 dispose qu'aucune denrée alimentaire n'est mise sur le marché si elle est dangereuse
 - L'article 17 traite des responsabilités des exploitants du secteur alimentaire mais également de celles des Etats membres (assurer l'application de la réglementation, maintenir un système de contrôles officiels et fixer les mesures et sanctions en cas d'infraction à la législation relative aux denrées alimentaires) ;
 - L'article 18 impose la traçabilité des denrées alimentaires à toutes les étapes de la production, de la transformation et de la distribution ;
 - L'article 19 impose à l'exploitant du secteur alimentaire d'engager des procédures de retrait du marché voire d'informer les consommateurs si une denrée ne répond pas aux prescriptions relatives à la sécurité des denrées alimentaires.

- **Le règlement (CE) 852/2004** du 29 avril 2004 établit des règles générales en matière d'hygiène des denrées alimentaires. Il s'applique à la production primaire (produits issus de l'élevage et de la pêche), en particulier dans son annexe I ainsi qu'à tous les exploitants du secteur alimentaire, en particulier dans son annexe II.

Ce règlement ne s'applique ni à un usage domestique privé ni à l'approvisionnement direct par le producteur du consommateur final ou du commerce de détail local en petites quantités de produits primaires. En matière de coquillages vivants, aucune petite quantité n'ayant été définie en France, cette notion ne s'applique pas.

- **Le règlement (CE) n°853/2004** du 29 avril 2004 modifié fixe des règles spécifiques d'hygiène applicables aux denrées alimentaires d'origine animale en complément du règlement 852/2004. Il ne s'applique pas non plus à la consommation domestique privée, ni aux petites quantités de produits primaires. Son annexe III section VII regroupe les exigences relatives aux mollusques bivalves vivants.
 - Chapitre I : les mollusques bivalves vivants ne peuvent être mis sur le marché en vue de la vente au détail que par un centre expéditeur agréé (les lots doivent être munis de la marque d'identification de l'établissement d'expédition). Par ailleurs, pour les lots de coquillages « produits primaires », un document d'enregistrement est nécessaire lors de tout transfert de lots de coquillages d'un établissement à un autre jusqu'à l'arrivée au centre d'expédition ou à l'établissement de transformation ;
 - Chapitre II : reprend les exigences d'hygiène applicables à la récolte et à la production des mollusques bivalves vivants. Il fixe le devenir des coquillages en fonction du classement de la zone de récolte et les règles applicables à la récolte et après la récolte, notamment en matière de prévention des contaminations, et de maintien de la viabilité des coquillages ;
 - Chapitre III : fixe les exigences structurelles applicables aux centres d'expédition et de purification ;
 - Chapitre IV : fixe les exigences en matière d'hygiène applicables aux centres de purification et d'expédition. En particulier, pour pouvoir être expédiés (c'est à dire destinés à la

consommation humaine directe), les mollusques bivalves vivants doivent provenir d'une zone classée A, d'une zone de reparcage (inexistante en France), d'un centre de purification ou d'un autre centre d'expédition ;

- Chapitre V : fixe les normes sanitaires applicables aux mollusques bivalves vivants. Pour ce qui concerne les critères microbiologiques de sécurité, ce chapitre renvoie vers le règlement 2073/2005. Celui-ci fixe deux critères de sécurité pour les mollusques bivalves vivants mis sur le marché et pendant leur durée de conservation : pour *Salmonella* : absence dans 25 g, pour *E. coli* : 230 NPP/100 g de chair et liquide intra-valvaire.

Les limites de salubrité fixées par le règlement (CE) n°853/2004, Annexe III, section VII, chapitre V, point 2, d'après la décision CE du 15 Mars 2002 (2002/225/EC) sont présentées dans le tableau ci-dessous :

Famille de phycotoxines soumise à contrôle	Limites
Phycotoxines paralysantes (ou PSP : Paralytic Shellfish Poison)	800 µg équivalent saxitoxine/kg de chair
Phycotoxines amnésiantes (ou ASP : Amnesic Shellfish Poison)	20 mg d'acide domoïque/kg de chair
Acide okadaïque + Dinophysistoxines + Pecténotoxines	160 µg d'équivalent acide okadaïque/kg de chair
Yessotoxines	1 mg d'équivalent yessotoxine/kg de chair
Azaspiracides	160 µg d'équivalent azaspiracides/kg

Les méthodes à appliquer pour le contrôle de ces phycotoxines sont mentionnées en Annexe III du règlement 2074/2005 du 5 décembre 2005.

Nota : il n'existe pas de seuil réglementaire de sécurité sanitaire pour les neurotoxines à action rapide : exemple des spiroïdes mis en évidence pour la première fois en France dans les coquillages d'Arcachon en 2005.

- Chapitre VI : traite du conditionnement et de l'emballage des mollusques bivalves vivants. Ce chapitre fixe les teneurs maximales en biotoxines marines pour les toxines des groupes des phycotoxines paralysantes, amnésiantes, pour l'AO, les DTXs et les PTXs d'une part, pour les Yessotoxines d'autre part et enfin pour les Azaspiracides.
- Chapitre VII : fixe les règles d'étiquetage et de marquage d'identification. Outre la marque d'identification, l'étiquetage doit mentionner l'espèce du mollusques bivalves vivants (nom commun et scientifique) ainsi que la date de conditionnement (jour et mois au minimum).
- Chapitre VIII : fixe des dispositions en matière de transport (maintien de la viabilité des coquillages) et interdit la ré-immersion et l'aspersion des coquillages vivants après leur expédition.
- Chapitre IX : s'applique aux pectinidés récoltés en dehors des zones de production classifiées.
- **Le règlement CE 854/2004** du 29 avril 2004 modifié fixe les règles spécifiques d'organisation des contrôles officiels concernant les produits d'origine animale destinés à la consommation humaine. Il s'applique uniquement aux activités et aux personnes relevant du règlement 853/2004. Il comprend des règles générales ainsi que des règles spécifiques de contrôle dans le domaine des mollusques bivalves vivants.

En ce qui concerne le classement de zone, les DDSV ne sont pas directement compétentes mais dans le cadre des commissions annuelles de classement, elles peuvent mettre à disposition du DDAM et du Préfet, comme élément à prendre en compte, les résultats des autocontrôles réalisés dans les établissements portés à leur connaissance ainsi que tout résultat d'analyses officielles.

Les mollusques bivalves sont soumis aux contrôles officiels prévus à l'annexe II du règlement 854/2004. En particulier, des plans de surveillance annuels sont mis en place par la DGAI pour évaluer la contamination des coquillages au stade de leur mise sur le marché comme l'exige le point D.2 de l'annexe II.

2- Rappel de la réglementation nationale

La transcription dans le droit français

Jusqu'en 2005, la directive CE 91/492 avait fait l'objet de transcription des dispositions communautaires dans le droit français notamment par les articles R 231-35 à 231-59 du Code rural, des arrêtés d'application et différentes circulaires à destination des services.

Une refonte des dispositions du Code rural est en cours, la réglementation communautaire étant désormais d'application directe.

La réforme du Code Rural sera complétée par des arrêtés.

Organisation et mise en œuvre du dispositif de surveillance en France

Les compétences

Pour l'exercice des contrôles sanitaires dans le domaine des coquillages, une répartition des compétences est définie dans le code rural. Le Ministère principalement compétent est le Ministère de l'Agriculture et de la Pêche. Au niveau central, la Direction des Pêches Maritimes et de l'Aquaculture coordonne l'action des Affaires Maritimes et est maître d'œuvre du REPHY. La Direction Générale de l'Alimentation coordonne celle des Directions Départementales des Services Vétérinaires (DDSV). Les services vétérinaires ont compétence pour inspecter les établissements qui mettent sur le marché (au sens du PH³) des mollusques bivalves vivants

La mise en œuvre du dispositif repose localement sur des laboratoires de l'Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer (Ifremer), pour la partie prélèvements et analyses, et des Directions Départementales des Affaires maritimes (DDAM) qui, sous l'autorité des Préfets, assurent l'application locale de la réglementation sur la base des données récoltées par les laboratoires. Les DDAM sont donc chargées de proposer au Préfet de département, les mesures de gestion qui s'imposent (fermeture et réouverture) et de veiller à leur application.

Par ailleurs, dès lors que les coquillages sont considérés comme des denrées alimentaires et font l'objet d'une manipulation, d'un traitement préalable (purification des coquillages par exemple) ou d'un conditionnement dans les établissements conchylicoles en vue de leur mise sur le marché pour la consommation humaine, la Direction Générale de l'Alimentation coordonne l'action des Directions Départementales des Services Vétérinaires (DDSV). Les services vétérinaires ont compétence pour inspecter les établissements qui mettent sur le marché (au sens du Paquet Hygiène⁴) des coquillages afin de s'assurer que les normes d'hygiène sont bien respectées..

Les réseaux de surveillance des zones de production

L'Ifremer, établissement public industriel et commercial créé par le décret n° 84-428 du 5 juin 1984, est « chargé d'apporter à l'Etat son concours pour l'exercice de ses responsabilités notamment pour le contrôle de la qualité des produits de la mer et du milieu marin. » (Cf. article 4 du décret). Dans cette perspective, l'Ifremer a mis en place et organisé le fonctionnement de réseaux pour l'observation et la surveillance du milieu marin côtier. (Instruction 97-005 du 18 novembre 1997 révisée le 9 novembre 2000).

Les trois réseaux de surveillance nationaux du milieu marin côtier sont :

1. Le Réseau de contrôle Microbiologique des zones de production conchylicole (REMI) est mis en place en vue de préparer le classement des zones conchylicoles définies par le décret n°2003-768 du 1^{er} août 2003 (code rural) et d'effectuer la surveillance sanitaire des dites zones dans les conditions prévues par l'arrêté du 21 mai 1999. Le REMI a pour objet la validation en continu du classement des zones par l'évaluation des niveaux de contamination

³ « mise sur le marché » : la détention de denrées alimentaires ou d'aliments pour animaux en vue de leur vente, y compris l'offre en vue de la vente ou toute autre forme de cession, à titre gratuit ou onéreux, ainsi que la vente, la distribution et les autres formes de cession proprement dites (article 3.8 du règlement (CE) n°178/2002).

⁴ « mise sur le marché » : la détention de denrées alimentaires ou d'aliments pour animaux en vue de leur vente, y compris l'offre en vue de la vente ou toute autre forme de cession, à titre gratuit ou onéreux, ainsi que la vente, la distribution et les autres formes de cession proprement dites (article 3.8 du règlement (CE) n°178/2002).

fécale et de leur évolution mesurées dans les coquillages (dénombrement des *Escherichia coli* dans 100g de chair et de liquide intravalvaire).

2. Le Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin (RNO) est un réseau environnemental destiné à évaluer les niveaux et les tendances de la contamination chimique du littoral. Les données de ce réseau peuvent servir, en seconde utilisation, pour l'évaluation de la qualité des zones de production conchylicoles.
3. Le Réseau de Surveillance du Phytoplancton et des Phycotoxines (Rephy), a un double objectif : patrimonial (connaissance de la distribution spatio-temporelle du phytoplancton sur le littoral français), et sanitaire, ce dernier objectif étant assuré par la détection des espèces phytoplanctoniques productrices de toxines, et la recherche de ces toxines dans les coquillages.

La stratégie de surveillance du risque phycotoxinique des zones de production

- La surveillance

Le Rephy, mis en place par l'Ifremer après les grandes toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) d'origine micro-algale des années 1980, a un double objectif :

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

Pour l'aspect sanitaire, la surveillance exercée par le Rephy concerne les coquillages dans leur milieu naturel (parcs, gisements). Elle est encadrée par le Laboratoire National de Référence (LNR) pour les biotoxines constitué par l'Unité Toxines polluants organiques et pesticides de l'Afssa, qui apporte un appui scientifique et technique au MAP et coordonne les activités de contrôle des laboratoires engagés dans la surveillance des zones conchylicoles et des produits mis sur le marché.

La surveillance Rephy est organisée autour de 9 laboratoires côtiers, implantés sur 12 sites, couvrant l'ensemble du littoral français.

La stratégie sanitaire du Rephy est différente selon que les coquillages sont proches de la côte ou au large.

Pour les gisements et les élevages côtiers :

- la stratégie retenue pour le risque des phycotoxines paralysantes et amnésiantes est basée sur la détection dans l'eau des espèces présumées productrices de phycotoxines, qui déclenche en cas de dépassement du seuil d'alerte phytoplancton, la recherche des phycotoxines correspondantes dans les coquillages.
- le risque phycotoxines lipophiles est géré par une surveillance systématique des coquillages dans les zones à risque et en période à risque (voir définition ci dessous). Ce dispositif a été mis en place en 2005, suite aux observations de l'Office Alimentaire et Vétérinaire communautaire (OAV), qui à la suite d'une mission d'inspection, estimait que le dispositif français de surveillance était insuffisant. En dehors des périodes à risque, la stratégie est identique à celle appliquée pour les toxines des phycotoxines paralysantes et amnésiantes.

Pour les gisements au large

La stratégie est basée sur une surveillance systématique des trois familles de phycotoxines en période de pêche.

Définitions : zones à risque, périodes à risque, seuils d'alerte**Zones à risque et périodes à risque**

Les zones à risque sont les zones qui ont été touchées au moins une fois par la présence de phycotoxines dans les coquillages à des concentrations supérieures au seuil de sécurité sanitaire, sur une période de référence définie comme étant les six dernières années d'observation.

La notion de zone à risque est définie pour une famille de phycotoxines : on parlera par exemple de zone à risque phycotoxines lipophiles.

Pour chacune des zones à risque, et pour une famille de phycotoxines, la période à risque recouvre l'ensemble des mois concernés par la présence de ces phycotoxines, selon les règles suivantes :

- pour les phycotoxines paralysantes et amnésiantes : la période à risque est égale à l'union des mois sur les six années,
- pour les phycotoxines lipophiles : la période à risque est égale à l'union des mois sur les six années, pour ceux qui ont été concernés au moins deux fois par des toxicités, et incluant obligatoirement les mois concernés pour 2004 et 2005.

Du fait de leur définition, les zones à risque et les périodes à risque sont actualisées annuellement.

Seuils d'alerte

Un seuil d'alerte est défini pour chaque groupe d'espèces phytoplanctoniques toxiques actuellement présentes sur les côtes françaises. La mise en évidence d'espèces toxiques au delà des seuils préconisés ci dessous, doit déclencher la recherche des phycotoxines concernées dans les coquillages, si cette recherche n'est pas déjà effective (comme c'est le cas en période à risque phycotoxines lipophiles).

Ces seuils d'alerte sont déterminés à partir de l'analyse des données acquises antérieurement sur l'ensemble du littoral, et sont ré-estimés annuellement.

Echantillonnage eau

Globalement, les prélèvements d'eau pour observation du phytoplancton, ainsi que les mesures physico-chimiques afférentes, sont effectués une fois par quinzaine toute l'année pour les points échantillonnés régulièrement, soit 112 points répartis sur tout le littoral métropolitain.

La fréquence est augmentée à une fois par semaine dans les cas suivants : dans les zones à risque phycotoxines en période à risque et en cas de dépassement du seuil d'alerte phytoplancton, en dehors des périodes à risque phycotoxines.

Des points supplémentaires (80 points potentiels) sont activés pendant les épisodes de toxicité, ou bien en cas de dépassement du seuil d'alerte phytoplancton : ils sont alors obligatoirement échantillonnés une fois par semaine.

Les observations phytoplanctoniques peuvent être effectuées selon trois protocoles :

1. Les Flores Totales (FT) dénombrent tous les taxons reconnaissables. Elles sont effectuées sur 29 points répartis sur l'ensemble du littoral français (état au 28 juillet 2006), et permettent d'acquérir des séries temporelles sur les populations phytoplanctoniques, d'observer des efflorescences exceptionnelles de toutes espèces, de détecter et suivre les espèces toxiques connues, de détecter et suivre les espèces douteuses, d'assurer une vigilance sur les espèces émergentes, avec retour possible sur les données historiques.
2. Les Flores Partielles Indicatrices (FPI) dénombrent une liste minimale obligatoire de taxons, dont obligatoirement les genres toxiques pour le consommateur, connus sur nos côtes (*Dinophysis*, *Alexandrium*, *Pseudo-nitzschia*), et tous les taxons présents à une concentration supérieure à 100 000 cellules par litre. Elles sont effectuées sur 83 points répartis sur l'ensemble du littoral français, et ont les mêmes avantages pour le suivi des efflorescences exceptionnelles de toutes espèces et des espèces toxiques et douteuses, avec un moindre coût.
3. Les Flores Partielles Toxiques (FPTox), sont des flores simplifiées, qui sont utilisées dans tous les autres cas, avec une fréquence d'une fois par semaine.

Les échantillons sont considérés représentatifs de la colonne d'eau dans les zones très côtières, avec une profondeur peu importante. S'agissant de la surveillance des Gisements au large, pour lesquels la

distance de la côte et la profondeur ne permettent pas un échantillonnage représentatif en phytoplancton, la recherche des trois familles de phycotoxines est effectuée systématiquement, un mois avant l'ouverture de la pêche et pendant toute la période de pêche.

Echantillonnage des coquillages

Gisements côtiers

Phycotoxines lipophiles

Les moules sont utilisées comme espèces sentinelles pour les phycotoxines lipophiles. La surveillance systématique des phycotoxines lipophiles est effectuée dans les zones à risque pour ces phycotoxines, en période à risque, selon les modalités suivantes :

- le choix d'un ou plusieurs points (moules si possible) représentatifs, pour chaque zone à risque,
- dans le cas de zones à risque ne comportant pas de moules, un ou les autre(s) coquillage(s) présent(s) sur la zone est (sont) choisi(s),
- si le nombre de points représentatifs sur une zone est supérieur à quatre, l'échantillonnage peut se faire de façon tournante sur l'ensemble de ces points,
- un échantillonnage hebdomadaire.

Cette surveillance systématique est étendue toute l'année à plusieurs points répartis sur tout le littoral, dits points de référence phycotoxines lipophiles, à raison d'un échantillonnage une fois par mois.

Chaque résultat positif ou suspect au test souris phycotoxines lipophiles, pourra conduire à une analyse chimique en Chromatographie Liquide en Spectrométrie de Masse (CL/SM) complémentaire, quelle que soit l'espèce de coquillage. Pratiquement, celles ci seront réalisées systématiquement sur les échantillons d'huîtres et de pectinidés, mais seulement sur un certain nombre d'échantillons pour les autres coquillages.

Phycotoxines paralysantes

Le déclenchement de la recherche de phycotoxines paralysantes dans les coquillages, est déterminé par la présence des espèces toxiques d'*Alexandrium* au dessus des seuils d'alerte (sauf pour le bassin d'Arcachon soumis à un régime particulier (voir ci dessous). La notion d'espèce sentinelle n'existant pas pour ces phycotoxines, toutes les espèces de coquillages présents sur la zone doivent être échantillonnées.

Pour le bassin d'Arcachon, une surveillance systématique des phycotoxines paralysantes est assurée en période hivernale (octobre à février), sur les huîtres et les moules, une fois par semaine. Un certain nombre d'échantillons font également l'objet d'une analyse chimique en Chromatographie Liquide en Fluorimétrie (CL/FL), en supplément du bio-essai sur souris pour les phycotoxines paralysantes.

Phycotoxines amnésiantes

Le déclenchement de la recherche de phycotoxines amnésiantes dans les coquillages, est déterminé par la présence de *Pseudo-nitzschia* au dessus des seuils d'alerte. La notion d'espèce sentinelle n'existant pas pour ces phycotoxines, toutes les espèces de coquillages présents sur la zone doivent être échantillonnées.

Gisements du large

La surveillance des coquillages des gisements du large en général, et donc des pectinidés, est assurée selon les modalités suivantes :

- la recherche des trois familles de phycotoxines est effectuée systématiquement, un mois avant l'ouverture de la pêche et pendant toute la période de pêche, à raison d'un échantillon par quinzaine (un par semaine en cas d'épisode toxique), sur les zones de production listées ci-dessous,
- les pectinidés se trouvant sur des gisements d'autres coquillages, et susceptibles d'être collectés toute l'année, sont traités comme les autres coquillages.

La surveillance assurée par Ifremer pour les gisements au large est ciblée sur les zones de pêche, avec des prélèvements réalisés par des professionnels. Les informations sur les périodes de pêche sont fournies en temps utile par la DRAM au LER / Ifremer concerné.

Au bilan, le Rephy est donc constitué d'un réseau de 343 points de prélèvements répartis sur l'ensemble du littoral français : 192 points servent aux prélèvements d'eau pour le suivi des espèces phytoplanctoniques, 264 aux prélèvements de coquillages pour la recherche de phycotoxines.

Les suivis antérieurs ont permis à l'Ifremer de disposer d'éléments permettant l'organisation du réseau, laquelle est revue annuellement à la lumière des nouveaux éléments.

Les analyses sont réalisées par les laboratoires de l'Ifremer, selon les méthodes officielles reconnues au niveau communautaire : la mesure de la toxicité dans les coquillages pour les phycotoxines lipophiles résulte du bio essai sur souris, méthode de référence adoptée au niveau communautaire, après avis des experts des LNR des différents Etats membres sous l'égide du LCR (laboratoire communautaire de référence).

Par ailleurs, la survenue de TIAC ou de résultats positifs mis en évidence soit par des auto-contrôles réalisés par les producteurs, soit par des contrôles officiels sur des coquillages mis à la consommation (plans de surveillance annuels de la DGAI), peut donner lieu à des prélèvements complémentaires sur les zones de production.

- Les mesures de gestion

La réglementation communautaire actuelle (règlement (CE) n°854/2004 du Parlement européen et du Conseil du 29 avril 2004) prévoit que lorsque les normes sanitaires ne sont pas respectées, « l'autorité compétente doit fermer la zone de production concernée, empêchant ainsi la récolte de mollusques bivalves vivants. » Il s'agit d'une compétence liée.

Tout résultat défavorable (mortalité d'au moins deux souris sur trois dans un délai de 24 heures pour les phycotoxines lipophiles) doit conduire à la fermeture par arrêté préfectoral, proposé par le Directeur départemental des Affaires maritimes (DDAM), dans la plupart des cas en concertation avec les membres de la Mission Interservices de Sécurité Sanitaire des Aliments (MISSA).

Les prélèvements sur zones sont poursuivis durant tout le temps de fermeture de la zone, à une fréquence correspondant à la zone et la période. Pour la réouverture de la zone, tenant compte du temps de décontamination nécessaire aux coquillages et des fluctuations possibles du taux de phycotoxines avant un retour à un niveau stable inférieur aux seuils, la réglementation prévoit la nécessité d'obtention de deux résultats favorables successifs à 48 heures d'intervalle au minimum. Les données de cinétique de décontamination montrent que des prélèvements à une périodicité hebdomadaire sont suffisants, ce qui conduit à des fermetures de zone d'un minimum de deux semaines.

Néanmoins, afin de limiter les conséquences économiques liées à ces fermetures, il a été convenu, pour le bassin d'Arcachon, de réaliser deux prélèvements par semaine lors des fermetures, afin de pouvoir, éventuellement, anticiper une réouverture.

La stratégie de surveillance des coquillages mis sur le marché

La DGAI met en œuvre annuellement des plans de surveillance pour vérifier la conformité des coquillages mis sur le marché. Ces plans de surveillance des coquillages ont été mis en place après l'inspection de l'OAV de 1998, sur les 3 familles de phycotoxines, les métaux lourds, les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques et les Dioxines et PCB indicateurs. Le bilan du plan de 2005 fait l'objet de la note de service DGAL/SDSSA 2006-8202 du 14 août 2006. Concernant les phycotoxines, ce bilan montre un taux de conformité de 100 % pour les phycotoxines paralysantes et amnésiantes et d'environ 98 % pour les phycotoxines lipophiles.

L'évolution de la surveillance des zones de production notamment suite aux inspections de l'Office Alimentaire Vétérinaire

Suite aux inspections de l'Office alimentaire vétérinaire qui se sont déroulées respectivement en 2001 et en 2004, plusieurs dispositions ont été prises qui ont conduit à faire évoluer le système de surveillance des biotoxines.

En 2002

La France a réalisé, à partir du mois de mars 2002, un état des lieux d'une éventuelle présence des azaspiracides dans les coquillages français. L'étude a porté sur plusieurs zones réparties sur l'ensemble du littoral français et sur plusieurs espèces de coquillages pendant une année complète.

L'étude a conclu à l'absence d'azaspiracides dans les 16 zones, représentatives des eaux littorales françaises. Elle a par ailleurs montré que les huîtres pouvaient fixer l'acide okadaïque et ses dérivés à des quantités supérieures aux seuils de la décision CE 2002/225 ce qui a conforté la nécessité de surveiller cette espèce de mollusques bivalves vivants en cas de bloom de *Dinophysis*.

La recherche des phycotoxines lipophiles a été effectuée également sur les huîtres dans les zones où elles sont produites en quantités significatives.

Afin de couvrir l'ensemble du complexe des phycotoxines lipophiles, le bio-essai sur souris actuellement mis en oeuvre par l'Ifremer est remplacé par le test Yasumoto 84 modifié et sa durée portée de 5 heures à 24 heures.

En ce qui concerne le bassin d'Arcachon où l'on a observé pendant l'hiver une faible contamination par les phycotoxines paralysantes sans présence remarquée d'*Alexandrium*, il a été décidé tout d'abord, de revoir le plan d'échantillonnage en tenant compte de la localisation des principales zones de production et des données d'observation sur le phytoplancton et enfin, d'effectuer des tests de toxicité PSP systématiques d'octobre à mars sur les points de prélèvements les plus adaptés.

En 2004

La stratégie de surveillance pour les phycotoxines lipophiles a été révisée et mise en oeuvre à partir de 2005. Il a été décidé de suivre les phycotoxines lipophiles à partir de périodes à risque (définition fondée sur le recensement des épisodes sur les six dernières années) sur la réalisation systématique de tests biologiques (Yasumoto 84 modifiée) hebdomadaires sur des échantillons de moules prélevées dans la zone considérée (ou du coquillage le plus sensible présent dans la zone), sans surveillance préalable des algues dans l'eau. Le reste de l'année, la stratégie est inchangée à savoir qu'il y a suivi des micro-algues et si présence au-delà d'un seuil prédéfini par type de phytoplancton potentiellement toxique et sous-espèce, déclenchement du bio-essai sur souris.

Toutefois, pour affiner cette stratégie et la définition des périodes à risque, un dispositif complémentaire est mis en oeuvre, qui consiste à effectuer une surveillance phytoplanctonique, assorties d'analyses chimiques complémentaires, toute l'année sur les moules de 6 points représentatifs du littoral, sur un rythme hebdomadaire en période à risque, bimensuel un mois avant et après cette période et mensuel le reste de l'année.

L'utilisation du bio-essai sur souris comme méthode de référence dans la gestion sanitaire a été réaffirmée par la Commission Européenne, même si les Etats Membres avaient travaillé à développer et à valider en intra-laboratoire une méthode de quantification chimique des phycotoxines réglementées.

Sur Arcachon, la surveillance des phycotoxines paralysantes est fondée sur l'analyse périodique directe dans la chair des coquillages, en période à risque. Le même type de surveillance a été étendue aux phycotoxines lipophiles en période à risque.

Les évolutions possibles

La validation des méthodes chimiques de quantification des phycotoxines lipophiles et la modification conséquente de la réglementation communautaire permettra dans l'avenir de faire évoluer le système de surveillance. Toutefois, il conviendra tout d'abord de fixer des seuils pour les phycotoxines

émergentes non encore réglementées après évaluation du risque pour le consommateur⁵. Cependant, ce système devra être complété par un dispositif de vigilance adapté, afin de couvrir les risques émergents (palytoxine et spirolide par exemple).

La deuxième piste d'amélioration pourrait être de refaire un état zéro de la pertinence des points de prélèvement du fait de la colonisation et de l'évolution des phytoplanctons toxiques dans les zones de production conchycoliques.

Enfin, une extension de l'échantillonnage de la surveillance dans les zones de production durant les grosses périodes de commercialisation, notamment en fin d'année pourrait être envisagée : échantillonnage hebdomadaire de novembre à janvier afin de s'assurer de la qualité des coquillages pendant les fêtes de fin d'année. Toutefois, il est rappelé que le RePHY n'a pas vocation à adapter son effort d'échantillonnage en fonction des tonnages commercialisés sur les marchés.

Un descriptif détaillé du dispositif de contrôle de la sécurité des coquillages depuis leur collecte jusqu'à leur remise au consommateur

Les contrôles des Directions Départementales des Services Vétérinaires (DDSV) sont effectués dans les établissements expéditeurs et purificateurs, au débarquement et en criée, pour les coquillages de pêche, ainsi qu'à toutes les étapes y compris la transformation, l'entreposage, le négoce jusqu'à la vente au consommateur (marché, restaurant, GMS...).

Chaque DDSV établit annuellement une programmation de ses inspections en fonction d'une analyse de risque (activité, produits, volume, fonctionnement, notation de l'inspecteur...). Une fréquence d'inspection est alors définie par établissement en fonction du nombre d'établissements à inspecter, des priorités définies soit au niveau central soit localement et des ressources disponibles. Ainsi, une pression d'inspection renforcée est mise en place lors de l'application des protocoles de fonctionnement en période de contamination (cf. ci-dessous).

Lors des inspections dans les établissements conchycoliques une attention particulière est portée à :

- la traçabilité des coquillages ;
- la qualité de l'eau ;
- les autocontrôles (les analyses effectuées sont essentiellement microbiologiques, les autres contaminants ne sont pas recherchés en routine mais peuvent l'être en fonction de la connaissance d'un risque accru, comme pour la recherche de phycotoxine en autocontrôle dans le cadre de la mise en œuvre du protocole décrit ci-dessous). Dans certaines régions, ces autocontrôles microbiologiques sont mutualisés (cas de la Charente Maritime).

L'harmonisation de l'inspection a pour but de répondre à deux objectifs : se conformer aux prescriptions du Paquet hygiène en matière de contrôles et répondre à la volonté ministérielle d'une mise sous assurance qualité des services vétérinaires pour 2008. Dans ce contexte, un *vade-mecum* sectoriel est en cours de rédaction par un groupe de travail DDSV-R (régionale) coordonné par la DGAI. Ce *vade-mecum* regroupera l'ensemble des textes applicables (communautaires et nationaux) pour ce secteur et proposera des avis d'experts (indications pour évaluer la conformité à la réglementation lors d'une inspection). Une grille d'inspection spécifique sera ainsi établie sur le principe des 5 M (matière première, matériel, main d'œuvre, méthode milieu). Les rapports d'inspection vont évoluer sur la base de cette grille.

Pour fonctionner, les établissements conchycoliques doivent disposer d'une autorisation préalable délivrée par la DDSV (agrément). La base réglementaire nationale concernant cet agrément est l'arrêté ministériel du 8 juin 2006 qui fixe notamment la procédure de délivrance de cet agrément. Une note générale d'application est en voie de finalisation. Elle sera accompagnée d'une note spécifique aux établissements conchycoliques. Les Affaires Maritimes doivent donner leur avis sur les dossiers d'agrément en particulier sur l'implantation des points de pompage pour l'approvisionnement en eau. Les établissements agréés sur l'ancienne base réglementaire ont jusqu'au 8 août 2008 pour mettre à jour leur dossier d'agrément.

Enfin, un projet de circulaire interministérielle (DPMA, DGAL, DGS, DGCCRF) sur la prévention et la gestion des crises dans le milieu conchylicole est en cours d'élaboration.

⁵ A ce sujet, des travaux sont engagés au niveau international et communautaire pour l'évaluation de nouvelles phycotoxines et pour la réévaluation des seuils des phycotoxines déjà réglementées. Selon les conclusions des évaluations, les méthodes de détection recommandées pourraient évoluer.

Il convient également de noter que lors de la fermeture d'une zone de production, compte tenu des délais d'analyses allant de 2 jours (pour les résultats microbiologiques) à 4 jours (pour les résultats de phycotoxines), un retrait de la commercialisation des coquillages est à mettre en place, sous la responsabilité du professionnel conformément à l'article 19 du règlement (CE) n°178/2002. S'il s'avère que le retrait opéré par les professionnels n'est pas efficace, la DDSV ou la DGAI peut prendre des mesures afin d'améliorer l'effectivité du retrait (soit auprès du professionnel soit par un message d'alerte active à l'ensemble des DDSV). De manière générale, au moment de la fermeture d'une zone, la DGAI émet, depuis 2006, un message à destination des fédérations nationales de la distribution, de la restauration et des producteurs (Comité National de la Conchyliculture) pour les informer que des mesures de retrait doivent être mises en place par les producteurs. En pratique, même si le retrait est de la responsabilité des professionnels, dans certains départements, il s'appuie sur une date fixée par le Préfet à partir de laquelle les coquillages de la zone ne peuvent être récoltés et commercialisés (retrait des coquillages récoltés dans la zone fermée à compter de cette date).

Enfin, il est important de rappeler que, pour les exploitants de l'aval de la filière (distributeurs et restaurateurs) comme pour les services de contrôle, le retrait de la commercialisation est difficile à contrôler sur la seule inspection d'un lot. En effet, les mentions réglementaires sur un colis sont : la date de conditionnement et la mention « élevé en France » (même si pour des raisons commerciales, il est souvent fait mention de la zone d'origine), alors que ce sont la date de récolte et l'origine exacte des produits qui importent (d'autant plus que les pratiques professionnelles peuvent amener à mélanger plusieurs origines et plusieurs dates de récolte, notamment pour des raisons de calibrage). En outre, le numéro d'agrément du centre expéditeur qui commence par le numéro du département ne permet pas de statuer sur l'origine du produit puisqu'un établissement conchylicole peut travailler des coquillages d'une autre origine que les coquillages du bassin fermé (à condition de disposer d'une eau propre).

Evolution pour l'application du « Paquet hygiène »

L'entrée en vigueur du paquet hygiène entraîne la révision de l'ensemble de la réglementation nationale : le règlement étant d'application directe, il est nécessaire de supprimer toutes les dispositions similaires ou contradictoires dans le corpus réglementaire national. L'adaptation nationale est également nécessaire pour définir les compétences entre les différentes administrations, alors que le Paquet hygiène ne fait référence qu'aux « autorités compétentes ».

L'ordonnance adoptée par le Conseil des ministres le 4 octobre 2006 (en application de l'article 71 de la loi n° 2006-11 du 5 janvier 2006 d'orientation agricole) modifie la partie législative du code rural notamment en matière de compétences pour réaliser les contrôles officiels dans le cadre du paquet hygiène ainsi qu'en matière de délits pour sanctionner certaines infractions (fonctionnement sans agrément, mise sur le marché d'une denrée dangereuse...). Ce texte a fait l'objet d'un avis favorable de l'Afssa.

La partie réglementaire du code rural est également en cours de modification par la voie d'un décret notamment sa sous section IV relative aux dispositions particulières aux produits de la mer et d'eau douce, des sanctions pénales sont également définies pour les infractions qui sont réprimées par des contraventions. Ce texte a fait l'objet d'un avis favorable de l'Afssa.

La plupart des arrêtés ministériels sectoriels seront modifiés ou abrogés (pour ce qui concerne les établissements conchylicoles, l'arrêté du 25 juillet 1994 sera abrogé dans sa totalité). Ces textes ont également fait l'objet d'un avis favorable de l'Afssa en juillet 2006.

La traduction qui a été faite de cette réglementation au niveau local sur le bassin d'Arcachon, tant en périodes de contamination qu'en périodes d'inter-contamination

Les questions de zonage et de sectorisation

Si le règlement (CE) n° 854/2004 fonde l'évaluation du risque "phycotoxines" sur la présence de phytoplancton toxique, il ne fixe pas précisément les modalités d'échantillonnage (nombre de prélèvements dans l'espace, fréquence). Celles-ci sont tributaires de la connaissance des sources de variation.

A l'échelle du bassin d'Arcachon, les éléments courantologiques (voir question 1) montrent la non possibilité de sectorisation, ou de stratification en terme statistique, de l'intérieur du bassin, dans le cas de *Dinophysis* et *a fortiori* dans le contexte de la toxicité atypique. Dans le cas d'une toxicité de type lipophiles, on estime à une dizaine de jours la cinétique de décontamination d'une zone en se fondant sur les données historiques. Ceci explique la fréquence hebdomadaire retenue pour le suivi ainsi que la nécessité de disposer de deux résultats négatifs pour que l'administration décide de rouvrir la zone considérée. Cependant, dans le cas de la toxicité atypique, sous la pression des professionnels et compte tenu de la nécessité d'acquisition de connaissances complémentaires, la fréquence a été rendue bi-hebdomadaire pendant la crise.

Concernant la stratégie spatiale de l'échantillonnage, l'Ifremer ne dispose pas d'information sur l'hétérogénéité de la répartition des phycotoxines dans les coquillages et dans les eaux associées. On ne peut donc pas estimer la probabilité d'obtenir un échantillon négatif alors que la zone serait toxique, et inversement. La stratégie d'échantillonnage retenue par l'Ifremer se fonde sur les 2 hypothèses suivantes :, dans la mesure où :

- Dans le cas d'une contamination phycotoxinique massive, on suppose qu'il y a une homogénéité dans la population des échantillons possibles ; la probabilité ne pas prélever un échantillon positif est faible.
- Dans le cas d'une contamination phycotoxinique faible, on suppose que la répartition est plus hétérogène dans la zone de production, mais l'hypothèse retenue est que le risque sanitaire évalué par le test souris est très en deçà du seuil de salubrité. Ifremer s'appuie également sur l'absence de notification de cas de toxi-infections massives imputables à la présence de phycotoxines dans les coquillages des côtes françaises métropolitaines depuis la mise en place du Rephy en 1987.

Le Rephy

Le Rephy est en évolution permanente pour s'adapter à la recrudescence des événements phycotoxiniques. En particulièrement depuis 2002, le Rephy a intensifié son effort d'échantillonnage, que ce soit en points « eau » pour l'identification des espèces toxiques ou nuisibles ou en points « coquillage » pour les analyses de phycotoxines.

La stratégie de surveillance du Rephy était au départ basée sur la détection des espèces phytoplanctoniques toxiques dans l'eau. **Dans le Bassin d'Arcachon**, 4 stations (Teychan, depuis 1987, Bouée 7, depuis 1995, Jacquets et Comprian, depuis 2003 - voir Figure 3) font l'objet de prélèvements d'eau hebdomadaires pour y rechercher le phytoplancton toxique.

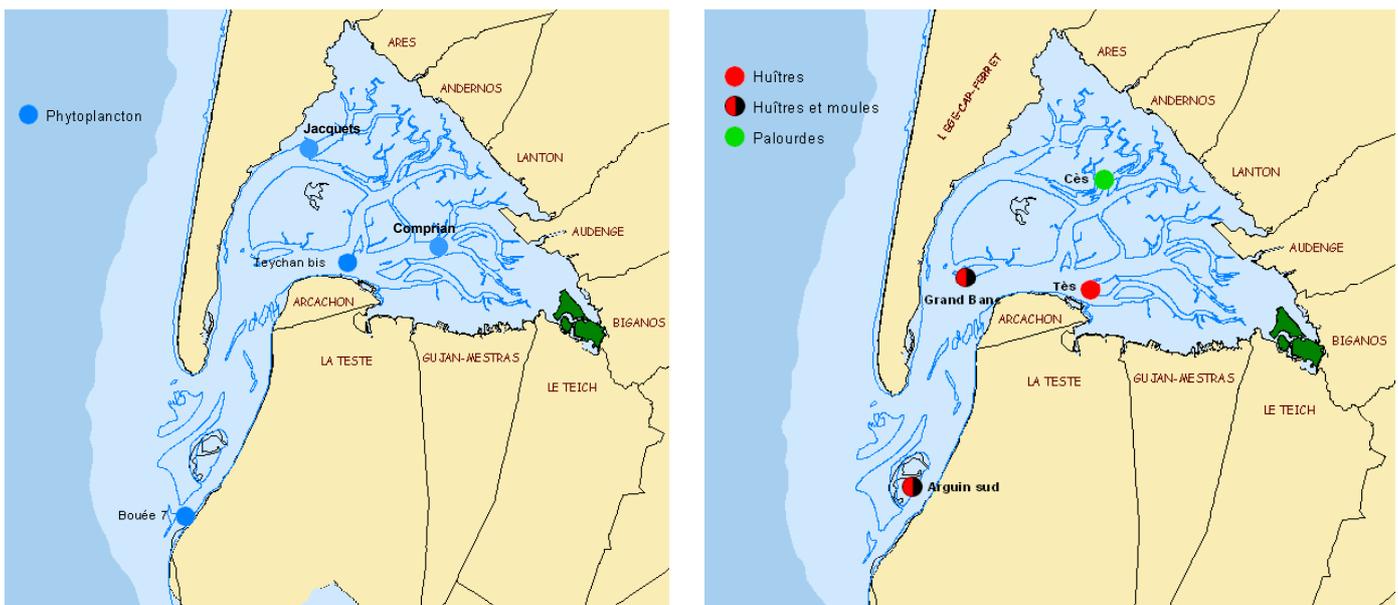


Figure 3 : Points de prélèvement d'eau et de coquillages dans le Bassin d'Arcachon.

Lorsque les abondances de certains genres ou espèces phytoplanctoniques dépassent le seuil d'alerte (500 cellules/litre pour *Dinophysis*), des analyses de phycotoxines sont mises en œuvre dans les coquillages pour évaluer le niveau de contamination au regard des seuils de salubrité réglementaires.

Si le dépassement du seuil d'alerte ne concerne que la station Bouée 7, seuls les mollusques du Banc d'Arguin sont testés. Si ce dépassement est observé dans d'autres stations (Teychan, Jacquets et/ou Comprian), les mollusques de toutes les stations sont testés.

Les inspecteurs de l'Office Alimentaire et Vétérinaire de la Commission Européenne ont jugé que cette stratégie était insuffisante pour assurer la protection du consommateur, en raison des incertitudes sur la détection de *Dinophysis* à très faible concentration, particulièrement en début d'épisode, de la difficulté de reconnaissance de certaines espèces productrices de toxines diarrhéiques (YTX, AZAs), ainsi que de la méconnaissance des seuils d'alerte pour ces dernières. D'ailleurs, certains pays européens recherchent directement le niveau de salubrité dans tous les gisements de mollusques exploités, sans s'intéresser aux espèces phytoplanctoniques dans l'eau de mer qui les baigne en tant qu'indicateur de contamination.

C'est pourquoi, en accord avec le MAP (DPMA et DGAI)⁶ et le LNR Biotoxines Marines (Afssa/LERQAP), la stratégie d'échantillonnage du RePHY concernant les phycotoxines lipophiles a été révisée en 2005, en appliquant une surveillance systématique de la contamination phycotoxinique des coquillages, dans les zones à risque et pendant les périodes à risque définies comme suit (sur la base de la présence de *Dinophysis* essentiellement) :

- Les zones à risque sont celles qui ont été touchées au moins une fois par la présence de phycotoxines dans les coquillages à des concentrations supérieures au seuil de sécurité sanitaire, sur une période de référence définie comme étant les 6 dernières années d'observation ;
- Pour chacune des zones à risques, et pour les phycotoxines lipophiles, la période de risque est définie comme l'union des mois sur les 6 années pour ceux qui ont été concernés au moins 2 fois par des toxicités, et incluant obligatoirement les mois concernés des 2 années précédentes.

Pour le Bassin d'Arcachon, une période à risque a été définie pour les phycotoxines lipophiles : pour 2006, il s'agit des mois de janvier puis d'avril à août. Cela signifie que les moules et les huîtres du Banc d'Arguin font l'objet, pendant ces périodes, d'un échantillonnage hebdomadaire systématique destiné à réaliser des bio-essais sur-souris. Dans le cas où au moins un des tests donne des résultats positifs (au moins deux souris sur trois mortes en moins de 24 heures), les coquillages provenant d'autres sites (Grand Banc, Tès) sont également testés. Il est important de noter que des prélèvements d'eau sont aussi réalisés de manière hebdomadaire pour dénombrer les espèces phytoplanctoniques potentiellement toxiques et surveiller la présence éventuelle d'indicateurs de la présence des autres familles de phycotoxines réglementées.

Par ailleurs, lors des premiers temps du suivi des phycotoxines lipophiles dans les coquillages par l'Ifremer, seules les moules étaient prises en compte, compte tenu que les moules accumulent beaucoup plus ces phycotoxines que les autres espèces de mollusques. Cette stratégie a évolué à la suite des remarques émises par les inspecteurs de l'Office Alimentaire Vétérinaire de l'Union européenne, en 2001, afin que les autres espèces fassent aussi l'objet de suivi de contamination par les phycotoxines. Depuis 2002, tous les coquillages exploités dans le Bassin d'Arcachon : huîtres, moules (et palourdes lors des alertes) font l'objet d'analyses en période à risque.

Pour le Bassin d'Arcachon, une période à risque a été définie pour les phycotoxines paralysantes pendant l'hiver.

Surveillance hors période à risques

Cette surveillance est basée sur les indicateurs phytoplanctoniques, en l'occurrence *Dinophysis*, pour les phycotoxines lipophiles. Des prélèvements d'eau sont réalisés tous les 14 jours sur les points réguliers : si un dépassement du seuil d'alerte (pour *Dinophysis* : 500 cellules par litre) est observé sur

⁶ MAP : Ministère de l'Agriculture et de la Pêche.

l'un de ces points, des prélèvements de coquillages sont effectués le plus rapidement possible, puis à une fréquence hebdomadaire, jusqu'à la fin de l'épisode.

La mise sur le marché

- En ce qui concerne les établissements conchylicoles en Gironde

Le nombre d'établissements agréés recensés fin août 2006 est de 337 dont une vingtaine agréés pour la purification. En 2004 et 2005, respectivement 280 et 364 inspections ont été réalisées. Pour 2006, la programmation des inspections a retenu une visite annuelle au minimum pour chacun des établissements conchylicoles.

Par ailleurs, la DDSV 33 a réalisé 193 prélèvements pour analyse bactériologique en 2003, 55 en 2004 (poste budgétaire affecté par la présence de la rage) et 129 en 2005. Ces prélèvements concernaient la recherche d'*Escherichia coli* et, éventuellement, de Salmonelles (notamment lorsque la teneur en *E. coli* est supérieure au seuil de sécurité sanitaire de 230 E.coli NPP⁷/ 100 g de coquillage et liquide intra-valvaire). Enfin, les analyses réalisées par la DDSV 33 au titre des plans de surveillance sont récapitulées dans le tableau ci-dessous (recherche de phycotoxines et de métaux lourds):

	Nombre d'analyses sur coquillages	Dont nombre d'analyses pour recherche de phycotoxines (toxines lipophiles / paralysantes / amnésiantes)	Dont nombre d'analyses pour recherche des métaux lourds (Cd / Hg / Pb)
2002	57	30	21
2003	78	30	30
2004	89	44	30
2005	84	36	30

Tableau 1 : Analyses de coquillages pour la recherche de phycotoxines et de métaux lourds réalisées au titre des plans de surveillance pour la DDSV 33

Tous ces résultats se sont révélés conformes. Par ailleurs, en 2006, 84 prélèvements sont prévus dont 36 pour recherche de phycotoxines.

- Les spécificités liées aux zones de stockage protégées à Arcachon

En préambule, il convient de distinguer « les malines », réserves d'eau et zones de stockage des coquillages, des bassins de stockage, des bassins dégorgeoirs ou de purification des établissements conchylicoles.

Afin de pouvoir disposer d'eau de mer en continu, et notamment à marée basse, certains ports ostréicoles ont créé des réserves d'eau, appelées malines. Elles ont pour but principal d'approvisionner en eau de mer certains établissements conchylicoles pour leurs activités de production (travail sur des coquillages en période d'élevage, comme pour les huîtres de 18 mois) et d'expédition (travail sur des coquillages destinés à la consommation humaine directe, c'est-à-dire principalement, lavage et opération de finition : opération permettant à l'huître, en dégorgeant, de se débarrasser des boues, vase et mucus). Les malines peuvent également être utilisées comme zones de stockage pour les coquillages récoltés, dans l'attente du travail d'expédition. Les malines sont remplies avec de l'eau du bassin d'Arcachon de zone B, à marée haute, soit passivement (écluse ou tuyau à clapets), soit activement (pompe). Certaines malines peuvent être isolées du bassin d'Arcachon (étanchéité). Les malines peuvent être à usage collectif ou individuel.

Les établissements conchylicoles disposent de bassins cimentés et étanches pour la finition (bassin dégorgeoirs) ou pour la purification (bassin de purification). Ces bassins sont généralement alimentés en eau provenant du bassin d'Arcachon de zone B, soit directement, soit via une maline. Dans les établissements, l'eau est renouvelée selon un rythme variable en fonction de la saison, du chargement en huîtres et des moyens techniques mis en œuvre pour maintenir sa qualité sanitaire

⁷ Nombre le plus probable

(oxygénation, traitement UV, filtre à sable...). Ainsi, certains établissements peuvent fonctionner plusieurs mois avec la même eau qui re-circule dans les bassins (fonctionnement en circuit fermé).

Lors de l'épisode de contamination ayant entraîné la fermeture du bassin d'Arcachon en mai 2006, la Section Régionale Conchylicole et le Préfet de la Gironde ont entériné un protocole de fonctionnement des établissements permettant la mise sur le marché des coquillages vivants en période de contamination du bassin d'Arcachon par des phycotoxines, sous certaines conditions.

Ce protocole est mis en œuvre à condition que les exploitants apportent les garanties nécessaires permettant de mettre sur le marché des coquillages propres à la consommation humaine. Il repose sur le principe de responsabilité des exploitants tel qu'énoncé dans le règlement (CE) n° 178/2002 et nécessite la mise en place de contrôles renforcés de la part des services compétents.

○ *Principe du protocole :*

Permettre le fonctionnement des établissements qui garantissent un approvisionnement sûr en coquillages et en eau.

Le principe de ce protocole est d'anticiper la période de fermeture en assurant un approvisionnement conforme à la fois en coquillages et en eau servant à travailler ces coquillages dans les établissements conchylicoles.

A ce titre, les sources d'approvisionnement en coquillages peuvent être :

- des coquillages provenant d'une zone ouverte ;
- des coquillages provenant du bassin d'Arcachon, s'ils ont été récoltés au plus tard la veille du jour du prélèvement ayant permis de constater la contamination du bassin.

L'eau servant au stockage et au travail des coquillages dans les établissements conchylicoles ne peut provenir que :

- du bassin d'Arcachon, si elle a été pompée au plus tard la veille du jour du prélèvement ayant permis de constater la contamination du bassin ;
- d'une autre origine (forage autorisé, eau de mer apportée d'une zone ouverte, eau de mer reconstituée...)

Le stockage de ces coquillages est réalisé soit dans les bassins des établissements, soit dans des malines, à condition que l'eau remplisse les conditions décrites ci-dessus. L'étanchéité par rapport au milieu extérieur des bassins de finition ou des malines doit être garantie (déclaration de l'exploitant concernant la date d'arrêt du système d'entrée d'eau pour les bassins ou attestation d'étanchéité des malines par un organisme indépendant).

○ *Procédures : déclaration de l'exploitant à la DDSV*

Dès que la fermeture de la zone est prononcée par le Préfet (connaissance des résultats entraînant une interdiction de récolte des coquillages du bassin), l'exploitant déclare par écrit à la DDSV son intention de poursuivre la commercialisation des coquillages, selon les conditions du protocole.

La DDSV délivre à l'exploitant un récépissé, sous réserve que celui-ci lui présente des résultats d'auto-contrôle conformes effectués sur l'eau qu'il souhaite utiliser (lorsqu'elle provient de la zone). Elle vérifie également pour chaque établissement les premiers éléments de traçabilité fournis par le professionnel.

Cet acte administratif, même s'il n'a pour but que d'enregistrer les exploitants fonctionnant sous le protocole, peut s'apparenter à une autorisation de fonctionnement étant donné que des garanties préalables sont demandées à l'exploitant. Celui-ci ne peut commercialiser des coquillages que lorsqu'il reçoit le récépissé (cela lui permet également d'apporter des preuves à ses clients que les coquillages qu'il commercialise ne sont pas touchés par l'interdiction de commercialisation prononcée par le Préfet). De plus, cet enregistrement permet de faciliter les contrôles en identifiant les professionnels qui mettent en œuvre ce protocole.

- *Garanties apportées par l'exploitant : auto-contrôles et traçabilité*

Des analyses d'auto-contrôle doivent être réalisées par les professionnels :

- sur l'eau : une analyse de dénombrement d'algues toxiques de l'eau utilisé dans les établissements ;
- sur les coquillages qui proviennent du bassin d'Arcachon : une analyse chimique par zone de production sur les coquillages sortis du milieu et placés en stockage protégé (dans les bassins des établissements ou dans les malines). Cet auto-contrôle peut être mutualisé entre plusieurs exploitants récoltant dans la même zone de production.

Ces auto-contrôles apportent des garanties supplémentaires par rapport aux coquillages récoltés à la même date et commercialisés avant la décision d'interdiction.

En outre, les professionnels, par l'intermédiaire de leur système de traçabilité, doivent apporter la preuve de l'origine de leurs coquillages.

- *Contrôle de l'application conforme du protocole*

Une pression d'inspection renforcée concernant ces établissements est mise en place par les agents de la DDSV. Compte tenu des modalités d'application du protocole, la performance du système de traçabilité mis en œuvre par l'exploitant est particulièrement contrôlée.

- *Evolutions envisageables*

Il conviendrait sans doute d'adapter le protocole, qui a été élaboré dans le contexte d'une contamination par des phycotoxines lipophiles, aux épisodes de contamination « atypique ». En particulier, il serait cohérent de procéder à des bio-essais sur souris pour valider tant la conformité sanitaire des coquillages provenant de la zone que celle de l'eau utilisée (par la conformité des coquillages au contact de cette eau).

Pour l'application du protocole, il est nécessaire de prévoir des analyses sur les lots de coquillages récoltés pendant la période autorisée et placés en stockage protégé, afin de déterminer si, au moment de leur récolte, ils étaient ou non contaminés.

Enfin, il convient également de prévoir les actions de contrôle de l'application du protocole à mettre en place qui devrait impliquer l'ensemble des administrations locales dans le cadre de la Mission Interservices de Sécurité Sanitaire des Aliments (MISSA qui regroupe toutes les administrations concernées par la sécurité sanitaire des aliments), comme en situation de crise. Les administrations devraient par ailleurs avoir la possibilité d'évaluer l'opportunité de mettre en place un tel protocole lors de chaque fermeture de zone et notamment lorsque la situation est jugée « atypique ».

Le Préfet de la Gironde a demandé de revoir le protocole afin de l'adapter et de le renforcer.

- Les conditions de sécurisation de la remise des produits au consommateur (vente, dégustation, etc.)

Les activités de vente directe des coquillages au consommateur sont couvertes par le paquet hygiène. L'exploitant qui met sur le marché des coquillages doit respecter les règles générales d'hygiène énoncées dans le règlement (CE) n° 852/2004 ainsi que les dispositions spécifiques du règlement (CE) n° 853/2004 en particulier les chapitres V, VI, VIII et IX ainsi que le point 3 du chapitre VII de la section VII de l'annexe III.

Ainsi, les mollusques bivalves vivants ne peuvent être mis à la vente au détail que revêtus d'une marque d'identification (passage obligatoire par un centre expéditeur). Les colis unitaires de mollusques bivalves vivants remis directement au consommateur doivent être fermés et le rester jusqu'à la vente au consommateur.

La commercialisation des coquillages du Bassin d'Arcachon est essentiellement assurée par la vente directe des producteurs aux consommateurs. Une activité de « dégustation » de coquillages dans les établissements se développe autour du Bassin d'Arcachon et a incité la préfecture à réglementer cette activité afin de prévenir les risques de concurrence déloyale avec les activités de restauration commerciale (arrêté préfectoral du 2 août 2006). D'un point de vue sanitaire, l'inspection de ces

activités de vente directe est réalisée en même temps que les activités pour lesquelles l'établissement a été agréé (purification et expédition).

Au stade de la remise directe (Grande et Moyenne Surface, écaillers, restauration,...), les contrôles des établissements sont assurés tout au long de l'année par les inspecteurs des services vétérinaires ainsi que ceux de la DDCCRF et parfois par les agents des Affaires Maritimes dans les départements côtiers. Un effort croissant de coordination et de programmation de ces différents types de contrôles est mis en place au sein des MISSA.

Les contrôles sont renforcés lors des périodes de fortes activités commerciales (Opération Alimentation Vacances pour la période estivale et Opération Fête de Fin d'Année). Ainsi, le bilan de la dernière opération fête de fin d'année (1^{er} décembre 2005 au 7 janvier 2006) fait état d'un faible taux de non-conformités rapporté dans les établissements conchylicoles, mais il montre que des efforts restent à faire en ce qui concerne la traçabilité des coquillages.

Enfin, il apparaît que certains opérateurs se livrent à des manipulations de re-conditionnement susceptibles d'entraîner une perte de traçabilité, notamment lorsqu'elle intervient par l'intermédiaire d'établissements non autorisés à le faire, c'est à dire qui ne disposent pas de l'agrément adéquat.

Délais et conditions de transport des prélèvements entre les différents laboratoires concernés

- Pour les échantillons

L'envoi des échantillons prélevés se fait par un transporteur soit en glacière s'il s'agit de coquillages entiers, soit en colis isotherme, s'il s'agit de glandes digestives. Le laboratoire destinataire prend systématiquement la température à l'arrivée, celle ci est le plus souvent très inférieure à 10°C (pour un colis contenant 3 flacons de glandes digestives, il est mis par exemple 3 bouteilles d'eau gelée).

Le transporteur vient prendre le colis ou la glacière sur place au laboratoire expéditeur. Ceux ci arrivent le lendemain au laboratoire destinataire.: Un suivi du colis est possible par internet.

- Pour les souris

Deux fournisseurs sont disponibles pour toute la France : l'un livre les laboratoires de la Manche et de l'Atlantique, un autre livre les laboratoires de Méditerranée.

Le premier fait livrer les souris en Atlantique les mardi, mercredi et jeudi. Mais quand la température extérieure est trop basse ou trop haute, il ne peut y avoir de livraison avant le jeudi, car dans ce cas il livre avec ses propres camions climatisés.

Le fournisseur de Lyon ne livre que le mercredi à Sète et Toulon, ce qui explique que les résultats ne peuvent être disponibles avant le vendredi pour le test souris phycotoxines lipophiles.

Question n° 4 : Conduire une réflexion permettant de préciser les apports et les limites de l'utilisation du « bio-essai souris » dans l'objectif de protection de la santé du consommateur que ce soit dans un cadre de surveillance ou de vigilance .

1-Préambule

En préambule, deux distinctions sont à faire :

- D'une part, distinguer les phycotoxines lipophiles des phycotoxines hydrophiles. En effet, l'analyse des experts, au regard de la problématique du test, a porté exclusivement sur les phycotoxines lipophiles car ce sont exclusivement elles qui ont soulevé des questions lors des derniers épisodes de contamination;
- D'autre part, distinguer le cadre de la surveillance de celui de la vigilance. Le premier concerne le contrôle des niveaux de contamination des coquillages par les phycotoxines connues, alors que le second a pour objectif de repérer l'émergence de nouvelles substances potentiellement toxiques pour l'homme.

2- Les phycotoxines lipophiles

Présentation des phycotoxines lipophiles

Ce sont des phycotoxines moyennement polaires à apolaires ayant une affinité pour les solvants organiques de polarité correspondante. Elles ont été regroupées dans une même catégorie car elles possèdent des propriétés physico-chimiques voisines mais présentent des activités biologiques diverses.

Les phycotoxines lipophiles sont composées :

- de toxines qui se sont avérées responsables d'un syndrome diarrhéique chez l'homme : il s'agit de la famille de l'Acide Okadaïque et des Dinophysistoxines (AO+DTXs) et de la famille des Azaspiracides (AZAs) ;
- de toxines pour lesquelles le risque chez l'homme est mal connu mais a été évalué à partir de données toxicologiques expérimentales chez l'animal chez lequel elles se sont révélées cardiotoxiques à forte dose : famille des Yessotoxines (YTXs) ou hépatotoxiques : famille des Pecténotoxines (PTXs).

Depuis ces dernières années, de nouvelles phycotoxines lipophiles ont été identifiées, en partie à travers leur action neurotoxique létale très rapide chez les souris par voie intra-péritonéale dans le cadre du bio-essai sur souris dans lequel elles se révèlent. Les effets toxiques chez l'homme ne sont pas connus et, à ce jour, aucun cas clinique n'a pu leur être imputé. Les neurotoxines à action rapide (ou « Fast Acting Toxins », FAT) forment un groupe comprenant les spirolides (SPXs), les gymnodimines, les pinnatoxines, les pteriatoxines et les proocentrolides. Elles ne sont soumises à aucun contrôle tant dans la réglementation communautaire que dans la réglementation nationale. Il a été montré que les gymnodimines et les spirolides sont bioaccumulables dans les coquillages, tandis que pour les autres, nous ne disposons pas de données. Ces phycotoxines sont rapportées dans un nombre croissant de pays (Canada, Norvège, France, Nouvelle Zélande, Tunisie...).

Les phycotoxines lipophiles réglementées et les nouvelles phycotoxines non encore réglementées font actuellement l'objet de travaux d'évaluation des risques au niveau international (Codex, EFSA).

Éléments de contexte de la surveillance des phycotoxines lipophiles : 4 familles, 13 analogues à détecter

L'agent toxique responsable n'est pas une seule substance mais une famille de dérivés (on parle alors de « complexe toxinique ») dont la toxicité est variable par rapport à celle de la molécule de base. Ces phycotoxines peuvent faire l'objet de réactions biochimiques (métabolisation), principalement dans les coquillages et probablement dans le tube digestif, qui se traduit par la formation de dérivés plus ou moins toxiques, par rapport à la toxine de base. C'est pourquoi, la complexité du profil toxinique de chaque famille de phycotoxines continue à poser des difficultés pour la mise au point de méthodes appropriées de détection et de quantification des différentes phycotoxines dans les échantillons de coquillages. Il peut y avoir également la présence de phycotoxines de plusieurs familles en même temps, comme on l'a vu à Arcachon en 2005 (AO + DTXs + spirolides).

C'est la raison pour laquelle la réglementation s'appuie actuellement sur un test de toxicité globale sur animal, en l'absence de méthode alternative validée.

Dans le cadre du dispositif national de la surveillance des phycotoxines et en application de la réglementation européenne, le bio-essai sur souris des phycotoxines liposolubles à partir des glandes digestives de coquillages doit s'effectuer selon la méthode d'analyse dite de Yasumoto *et al.* 1984 modifiée comprenant une extraction à l'acétone suivie d'un fractionnement dichlorométhane/eau, on teste la fraction dichlorométhane et la phase aqueuse est éliminée. Les coquillages sont considérés contaminés si on observe la mort d'au moins deux souris sur trois, suite à l'injection par voie intrapéritonéale d'extraits de glandes digestives des échantillons à tester sur une période de 24 heures.

3-Les pré-requis d'un test idéal susceptible de garantir le meilleur niveau de protection du consommateur

D'après les experts et dans un objectif sanitaire, le test idéal serait un test qui permettrait de détecter l'ensemble des phycotoxines lipophiles susceptibles d'être responsables d'intoxication chez le consommateur et de déterminer leur niveau de présence dans les coquillages (voir tableau 2). Ce test idéal devrait, de plus, bénéficier d'une validation internationale de manière à caractériser ses performances et sa variabilité.

Grille de référence et comparaison des caractéristiques des tests utilisés ou utilisables

Une grille de référence reprenant tous les pré-requis auxquels un test idéal devrait répondre pour garantir le meilleur niveau de protection du consommateur a été élaborée par le groupe de travail. Cette grille inclut des critères qualitatifs et quantitatifs indispensables qui se rapportent plus spécifiquement à l'un ou l'autre type de test (page suivante).

Le choix d'un tel test ne peut pas être fondé uniquement sur les performances intrinsèques de la méthode donnée mais doit également prendre en compte la réalité opérationnelle dans le cadre de son déploiement dans un dispositif de surveillance. Il existe actuellement plusieurs méthodes de détection et/ou de quantification basées sur des principes différents et dont les résultats indiquent des informations de différente nature. Ainsi, ces diverses méthodes ne seraient pas en compétition mais plutôt complémentaires.

On distingue schématiquement les bio-essais sur souris, les tests basés sur le mode d'action encore appelés tests fonctionnels, les tests immunochimiques, les tests d'immuno-chromatographie en flux latéral, la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (le plus souvent en tandem, à savoir LC-MS/MS).

En l'état actuel de la réglementation communautaire, seul le bio-essai sur souris est reconnu comme le test de référence pour les phycotoxines lipophiles en raison notamment de l'efficacité qu'il a pu montrer à travers sa pratique depuis de nombreuses années dans de nombreux pays. Néanmoins, le bio-essai n'est pas validé⁸ selon les critères normalisés. Mais plutôt par une longue expérience qui a permis l'amélioration des conditions de sa mise en œuvre et l'acquisition de données issues d'analyses inter-laboratoires d'aptitude réalisés au niveau national et communautaire. Il n'existe pas de méthode alternative officiellement reconnue à ce jour.

⁸ En 1999, sur proposition du Laboratoire Communautaire de Référence (LCR) de valider et normaliser le bio-essai sur souris, le Comité Européen de Normalisation a opposé un refus pour ne pas entrer en contradiction avec la réglementation européenne qui vise au remplacement des tests sur animaux.

Tableau 2 : Grille de référence et comparaison des caractéristiques des tests utilisés ou utilisables

	Test idéal	Bio-essai souris ip	Bio-essai rat oral	Tests fonctionnels	Tests immuno-chimiques	Immuno chromatographie à flux latéral (sticks)	CL-SM/SM
Spécificité	haute	S relative selon symptomatologie Risque d'interférences	S pour 2 familles à effet diarrhéique chez l'homme (AO/DTXs et AZAs)	S/famille	S pour quelques analogues/famille Risque d'interférences	S pour quelques analogues/famille	S
Temps de mise en oeuvre (avec témoins et extraction)	réduit	2j	1,5 j	<1j	<1j	0,5j	1,5j
Réponse globale de toxicité	+++ (sécurité)	++++/toutes familles	+++/2 familles	+++/famille	++/famille	++/famille	+++/famille
Possibilité de détection - *d'une toxine non identifiée	oui pour vigilance	+++	---	---	---	---	++ (pas en routine)
* de nouveaux analogues de phycotoxines connues		+++	+++	+++	+	+	
Fiabilité	Maximale	++ (conditions strictes)	+	+++	++	++	++++
* Faux-positifs	minimal	oui – symptômes peuvent le révéler	pas de recul	pas de recul	moyen	pas de recul	minimal
* Faux-négatifs	minimal	faible	pas de recul	pas de recul	modéré	pas de recul	minimal
Réponse qualitative du test Symptomatologie discriminante (positive ou négative)	OUI OUI	OUI +/-	OUI ----	OUI ----	OUI ----	OUI ----	OUI ----
Réponse semi-quantitative	OUI	OUI (DL50 = 192µg/kg AO)	OUI (score de 0 à 5 selon la consistance des fécès)	OUI (dépend du kit)	OUI (dépend du kit)	OUI (dépend du kit) Autour du seuil de salubrité	OUI De l'ordre de 30 µg/Kg
Seuil de sensibilité	< salubrité	160 µg/Kg pour AO/DTXs, PTXs et AZAs	pas de recul	Pas de données	Pas de données		<10%

Variabilité	minimale	? pour les YTXs +/- 20% (issu de l'expérience)	pas de recul			Pas de données	
Réponse quantitative Seuil de sensibilité Variabilité	OUI < salubrité minimale	NON	NON	OUI (dépend du kit) Pas de données	OUI (dépend du kit) Pas de données	NON Pas de données	OUI De l'ordre de 30 µg/Kg
Besoin en personnel de haute technicité	réduit, automatisation	++	++	++	++	++	++++
Simplicité/transfert en réseau	maximum	Moyen	Moyen	Maximum	Maximum	Maximum	Minimum
Coût (dont équipement et personnel)	faible	Moyen	Moyen	Faible	Faible	Faible	Elevé

4-Le bio-essai sur souris

La méthode

Dans le cadre du dispositif national de la surveillance des phycotoxines et en application de la réglementation européenne, le dépistage sur souris des phycotoxines liposolubles à partir des glandes digestives de coquillages doit s'effectuer selon la méthode d'analyse dite de Yasumoto *et al.* 1984 modifiée. Les coquillages sont considérés contaminés si on observe la mort d'au moins deux souris sur trois (la mort de deux souris sur trois et non pas de trois sur trois correspond à une valeur proche de la DL50 sur 24h), suite à l'injection par voie intrapéritonéale d'extraits de glandes digestives des échantillons à tester sur une période de 24 heures.

Rappel des motivations ayant entraîné l'évolution temporelle du protocole du bio-essai sur souris (cf. annexe 2)

Dans le cadre du RePHY et jusqu'à la mise en évidence de DTX-3 dans les coquillages contaminés par *Dinophysis* et la mise en cause de DTX-3 dans des cas d'intoxications de consommateurs au Portugal (Vale *et al.*, 1999⁹), la préparation des extraits de coquillages à tester sur souris était la suivante : dichlorométhane / méthanol-eau / hexane. C'est la fraction moyennement polaire (dichlorométhane) qui faisait l'objet d'un bio-essai sur souris. Les dérivés acylés DTX-3 n'étaient pas pris en compte puisqu'ils étaient éliminés dans la phase hexane. La préparation des extraits de coquillages à tester sur souris a donc évolué en éliminant l'étape de lavage à l'hexane.

En France, depuis 1999, date de la mise en évidence de dérivés DTX-3, leur recherche systématique par analyse chimique dans tous les échantillons de coquillages ayant donné un bio-essai sur-souris positif a mis en évidence la présence de DTX-3 dans des proportions allant de 50 % à 100 % de la concentration totale en équivalent AO (études toxines émergentes depuis 2002 dans le cadre de convention DPMA/Ifremer).

La justification du temps d'observation de 24 heures

Le temps d'observation de 24 heures est justifié par :

- la nécessité de contrôler le niveau des phycotoxines lipophiles réglementaires hors yessotoxines, c'est à dire 160 µg Equivalent AO/kg de chair de coquillage liée à mortalité de la souris à 24h.
- la nécessité de contrôler le niveau de dérivés DTX-3, dont l'action toxique est différée dans le temps par rapport à celle de l'AO libre
- la nécessité de contrôler le niveau en azaspiracides.

Explication du seuil de salubrité de 160 µg/kg pour AO, DTX

Les seuils retenus au niveau international pour la recherche de phycotoxines diarrhéiques (acide okadaïque et dinophysistoxines) ont été déduits de données épidémiologiques au Japon. Les coquillages incriminés ont été analysés et des études de toxicologie ont été menées sur des souris. Ces études montrent qu'une unité souris (US), qui correspond à la dose minimale injectée par voie intrapéritonéale par souris de 20g et entraînant la mort de la moitié des souris en 24h après injection intrapéritonéale (DL50 à 192 µg d'AO/kg de souris), est de l'ordre de 4 µg d'AO.

Les données issues de l'épisode du Japon ont montré que les premiers effets chez l'homme correspondent à 12 US soit 48 µg d'AO ingéré, ou 0,8 µg/kg p.c. (poids corporel moyen de 60 kg).

Afin de tenir compte de la variabilité de sensibilité des individus exposés (âges et état de santé des consommateurs de coquillages), un facteur de sécurité de 3 a été retenu, en raison du grand nombre de données épidémiologiques disponibles, conduisant à une dose de référence aiguë de 0,27 µg d'AO/kg p.c. Rapporté à un individu moyen de 60 kg, cela donne une quantité « ingérable » de 16,2 µg (0,27 µg x 60 kg).

⁹ Vale P., Antonia M., Sampayo M. (1999). Esters of okadaic acid and dinophysistoxin-2 in Portuguese bivalves related to human poisonings, *Toxicon* 37 (8) : 1109-1121.

La consommation moyenne de coquillages retenue, lors de cette première évaluation des risques réalisée dans le cadre de la directive 91/492, est de 100 g. La limite réglementaire déduite est de 160 µg éq.AO /kg.

L'injection à chaque souris de l'équivalent de 25 g de chair de coquillage (soit l'équivalent de 5 g d'hépatopancréas) permet de tester le seuil de salubrité de 160 µg eq AO /kg de chair de coquillage. En effet chaque souris de 20 g réagit à 4 µg eq AO dans des conditions de doses létales à 50 % (le test est positif à 2 souris mortes sur trois mais pas pour une souris morte sur trois).

Conclusion sur le bio-essai sur souris

Contrairement au test de dépistage des phycotoxines paralysantes (PSP ; AOAC 1990) et aux analyses chimiques des phycotoxines amnésiantes (ASP, AOAC, 1991, 1995) qui sont validés par l'AOAC (Association of Official Analytical Chemists), les tests biologiques sur souris officiels utilisés pour le dépistage des phycotoxines lipophiles (Yasumoto 1978 ou Yasumoto 1984 modifié) ne sont pas validés selon les critères normalisés mais bénéficie de 30 ans de recul.

Ils font l'objet de critiques dans de nombreux pays pour leur faible spécificité (Draisci *et al.*, 1994), leur manque de fiabilité dû aux variations de réponse inter-individuelles des souris. En effet, des travaux japonais (conférence internationale sur les algues toxiques, 2006) sur la variabilité de réponse des souris traitées avec de l'acide okadaïque selon le test-souris des phycotoxines lipophiles ont montré que les souris injectées le matin mourraient plus rapidement par rapport à celles injectées l'après-midi.

Le nombre d'animaux utilisés dans ce test diagnostique de 3 est souvent mis en cause comme un des facteurs de variabilité de la réponse. Pour limiter cette variabilité, les conditions de mises en œuvre recommandent d'utiliser des souris de même souche de souris, de même sexe, de même gamme de poids. Il est recommandé d'utiliser le plus fréquemment possible des échantillons témoins de contrôle interne au cours des séries d'analyse pour vérifier la qualité de la série analytique, et les bonnes conditions pour l'expérimentation.

5- Méthodes d'analyses alternatives

Pour pallier les problèmes posés par ce test biologique, éthiques et techniques et suite à la séparation des phycotoxines lipophiles en 4 familles distinctes avec un seuil de salubrité fixé pour chacune d'entre elles, des études ont été mises en place pour développer des méthodes alternatives, soit biologiques/biochimiques (basées sur le mode d'action des phycotoxines), soit immuno-chimiques et physico-chimiques (basées sur la structure moléculaire des phycotoxines).

En s'appuyant sur des données scientifiques récentes, la décision européenne CE 2002/225 du 15 mars 2002 a retenu la possibilité d'utiliser des méthodes alternatives spécifiques pour la détection des phycotoxines lipophiles réglementées à condition que la méthode choisie ou la combinaison de méthodes ne soit pas moins efficace que le test biologique sur souris officiel pour protéger le consommateur. Cette décision prévoit, en plus du test biologique, la possibilité d'utiliser ces méthodes alternatives – analyse physico-chimique, tests-immunologiques, tests-biochimiques- à condition qu'elles puissent, seules ou combinées au test biologique, détecter au moins les quatre familles de phycotoxines (acide okadaïque/dinophysistoxines, pectenotoxines, yessotoxines, azaspiracides). Une condition indispensable est que les méthodes alternatives aient suivi une analyse inter-laboratoire au niveau international.

Méthodes fonctionnelles

Ce sont des méthodes basées sur le mode d'action des phycotoxines analysées, pour lesquelles on obtient une réponse globale de toxicité par famille. Elles présentent l'avantage de détecter tous les analogues d'une même famille.

Bien que prometteuses, ces méthodes ne sont encore qu'au stade du développement ou de la validation.

Un kit est actuellement disponible sur le marché sous la référence Toxiline DSP (ZEU Immunotec, Espagne) , selon les données fabricant suivantes :

Ce kit est basé sur le mode d'action de l'AO et des DTXs. Il détecte tous les analogues qui ont le même mode d'action (inhibition des protéines-phosphatases) et la détection se fait sur lecteur de

micro-plaques par fluorimétrie. Quelques performances sont précisées par le fabricant : de l'ordre de 3h, la limite de détection est de 30 µg/kg. Les performances de ce test en analyses inter-laboratoire internationales ne sont pas connues

Méthodes immuno-chimiques

Ce sont des méthodes basées sur une interaction anticorps/antigène. Les anticorps sont développés en général pour une seule toxine (la principale) et peuvent « croiser » donc détecter plus ou moins sélectivement les autres phycotoxines apparentées de la famille. De plus la possibilité d'effet matrice doit être clairement identifié.

Un kit est actuellement disponible sur le marché sous la référence « OA-CHECK » (Mitsubishi Kagaku Iatron, inc.), selon les données fabriquant suivantes :

Ce kit ELISA permet de doser l'AO et la DTX1 ainsi que leurs dérivés DTX3. Les données du fabriquant ne précisent pas s'il croise avec la DTX2.

Les pectenotoxines, la saxitoxine et la tétradoxine n'interfèrent pas.

Il est spécifié qu'il peut être utilisé sur des extraits de phytoplancton et de coquillages.

La durée (extraction et test) est de l'ordre de 4h.

Le limite de détection est de 2 ng

Les performances de ce test en analyses inter-laboratoire internationales ne sont pas connues

Méthodes immuno-chromatographique à flux latéral (dip stick)

Ce sont des méthodes qui combinent une interaction anticorps/antigène avec une séparation chromatographique sur bandelette. Cette méthode de dépistage ne permet qu'une réponse binaire : au-dessous/au-dessus du seuil de salubrité. Elles sont développées pour l'acide okadaïque et les DTXs.

Conclusion sur ces 3 méthodes alternatives :

Ces 3 techniques sont rapides, sensibles et d'un coût moyen. Elles présentent l'avantage d'être facile à mettre en oeuvre dans le cadre d'un réseau de surveillance et dans celui d'auto-contrôles.

Elles présentent certains d'inconvénients, notamment une spécificité variable associée à une seule des 4 familles. Par ailleurs, elles ne permettent pas une analyse quantitative des phycotoxines individuelles.

En général, l'expérience a montré qu'il est absolument nécessaire qu'une validation internationale soit réalisée pour tester la robustesse de ce type de tests, notamment sur différents coquillages et sur des profils de phycotoxines qui varient d'un pays à un autre. Il apparaît que les fabricants travaillent majoritairement avec des molécules purifiées et que le test perd de sa robustesse lorsque les coquillages sont analysés.

Il est important de souligner qu'actuellement 3 projets financés dans le cadre du 6^{ème} PCRD ont pour but le développement de méthodes pour remplacer le bioessai.

Ces projets sont :

- BIOTOX : Development of cost-effective tools for risk management and traceability systems for marine biotoxins in seafood. Fin prévue : Décembre 2007
- DetecTox : Development of an SPR-based biosensor for the detection of lipophilic phycotoxins in shellfish residues
- BIOTOXMARIN : Development of novel analytical tools for the detection of marine biotoxins

Méthodes physico-chimiques par CL-SM/SM

Ces méthodes sont basées sur un couplage de chromatographie liquide couplée avec un spectromètre de masse en tandem . Les méthodes développées actuellement visent à détecter et à quantifier l'ensemble des phycotoxines lipophiles en une seule analyse (méthode multi-toxines). Grâce à la spectrométrie de masse, elles permettent une identification formelle des différentes phycotoxines avec une grande sensibilité et grande sélectivité.

L'équipement de base est onéreux, mais ces méthodes permettent de traiter un grand nombre d'échantillons. A terme, une méthode harmonisée/normalisée pourrait devenir la méthode de référence.

Annexe 1

Résultats du bio-essai sur souris des coquillages du bassin d'Arcachon, associés aux données du phytoplancton toxique, entre 1992 et 2006

Année	Mois	Point	Nom point	Coquillage	Bio-essais souris (dichloro jusqu'en 1995, Yasumoto 84 ensuite)	DSP (AO+DTXs+PTXs) max	AO+DTXs max	PTXs max	SPXs max	TOXPSP max	ASP max	dino max	alex max	psnz max	promin max	gymn gyro max	gony lingpol max	proi max	Fermeture
1992	12	34077054	Arguin	moûle						49									non
1993	01	34077005	Cap Ferret (a)	moûle						39									non
		34077037	Grand Banc	moûle						39									non
1993	02	34077037	Grand Banc	moûle						84									oui
		34077054	Arguin	moûle						95									oui
1993	08	34077054	Arguin	moûle	positif					35									non
1994	01	34077005	Cap Ferret (a)	moûle	positif														oui
		34077037	Grand Banc	moûle	positif														oui
		34077054	Arguin	huître	positif														oui
				moûle	positif														oui
1994	02	34077054	Arguin	moûle	positif														oui
1994	05	34077037	Grand Banc	moûle	positif														non
1994	11	34077037	Grand Banc	moûle	positif														non
		34077054	Arguin	moûle	positif														non
1995	06	34077005	Cap Ferret (a)	moûle	positif														non
		34077052	Le Pont	palourde	positif														non
		34077054	Arguin	donace	positif														non
				moûle	positif														non
				coque	positif														non

Afssa – Saisine n° 2006-SA-0254

Année	Mois	Point	Nom point	Coquillage	Bio-essais souris (dichloro jusqu'en 1995, Yasumoto 84 ensuite)	DSP (AO+DTXs+PTXs) max	AO+DTXs max	PTXs max	SPXs max	TOXPSP max	ASP max	dino max	alex max	psnz max	prormin max	gymn gyro max	gony lingpol max	proi max	Fermeture		
1995	07	34077005	Cap Ferret (a)	moule	positif																
		34077054	Arguin	coque	positif															oui	
2000	12	34077054	Arguin	huître						41											
				moule						48										non	
2002	11	34077060	Banc Arguin sud	huître	positif					35									non		
2002	12	34077005	Cap Ferret (a)	moule	positif					38											
		34077037	Grand Banc	moule	positif					86											
		34077060	Banc Arguin sud	huître	positif					53											
				moule	positif					74									oui		
2003	01	34077037	Grand Banc	huître	négatif					39											
				moule	positif					70											
				34077060	Banc Arguin sud	huître	négatif					41									
						moule	positif					85								oui	
2003	04	34077060	Banc Arguin sud	moule	positif													non			
2004	06	34077060	Banc Arguin sud	moule	positif																
2004	07	34077060	Banc Arguin sud	moule	positif																
2004	08	34077060	Banc Arguin sud	moule	positif																
2005	04	34077030	Le Tes	huître							2										
		34077037	Grand Banc	huître							3										
				moule	positif	790															
		34077060	Banc Arguin sud	huître	positif	126					3										
moule	positif			718					5												
2005	05	34077030	Le Tes	huître	positif	20															

Année	Mois	Point	Nom point	Coquillage	Bio-essais souris (dichloro jusqu'en 1995, Yasumoto 84 ensuite)	DSP (AO+DTXs+PTXs) max	AO+DTXs max	PTXs max	SPXs max	TOXPSP max	ASP max	dino max	alex max	psnz max	prormin max	gymn gyro max	gony lingpol max	proi max	Fermeture
		34077037	Grand Banc	huître	positif	84				35									
				moûle	positif	577				35									
		34077060	Banc Arguin sud	huître	positif	180													
				moûle	positif	577													
2005	06	34077037	Grand Banc	huître	négatif	24,8													
				moûle	positif	127													
		34077060	Banc Arguin sud	huître	positif	42,9													
				moûle	positif	186													
2005	07	34077037	Grand Banc	huître	positif	105													
				moûle	positif	57,3													
		34077060	Banc Arguin sud	huître	positif	22,7													
				moûle	positif	183,2													
2005	08	34077060	Banc Arguin sud	moûle	positif	18													
2006	04	34077037	Grand Banc	huître	négatif		17	5	17										
		34077060	Banc Arguin sud	moûle	négatif		140	27	61										
				huître	négatif		19	5	20										
2006	05	34077030	Le Tes	huître	positif	5	5	5	4										
		34077037	Grand Banc	moûle	positif		8	5	8										
				huître	positif		5	5	3										
		34077060	Banc Arguin sud	moûle	positif		11	5	4										
				huître	négatif		5	5	4										
2006	06	34077030	Le Tes	huître	négatif		5	5	1										
		34077037	Grand Banc	huître	négatif		5	5	1,5										
				moûle	négatif		5	5	2										
		34077060	Banc Arguin sud	huître	négatif		5	5	4										
				moûle	négatif		5	5	4										

Afssa – Saisine n° 2006-SA-0254

Année	Mois	Point	Nom point	Coquillage	Bio-essais souris (dichloro jusqu'en 1995, Yasumoto 84 ensuite)	DSP (AO+DTXs+PTXs) max	AO+DTXs max	PTXs max	SPXs max	TOXPSP max	ASP max	dino max	alex max	psnz max	prormin max	gymn gyro max	gony lingpol max	proi max	Fermeture
2006	07	34077060	Banc Arguin sud	huître	positif														
				moûle	positif														
2006	08	34077030	Le Tes	huître	positif														
		34077037	Grand Banc	moûle	positif														
				huître	positif														
		34077060	Banc Arguin sud	huître	positif														
				moûle	positif														
2006	09	34077037	Grand Banc	huître	positif														

Phytoplancton : gris/ = présent, blanc = absent

Annexe 2

Episodes de toxicité atypique recensés dans les données Rephy
sur l'ensemble du littoral français entre 1992 et 2006

Bassin	Période	Coquillage	Bio-essais souris TS = temps de survie		DSP max	AO+DTXs max	PTXs max	SPXs max	Autres toxines	Fermeture	Commentaires
010 Antifer, 011 Estuaire Seine 012 Orne	juillet et août 1994	moules	TS très courts							en partie	Les faibles quantités d'acide okadaïque détectées dans les coquillages n'expliquent pas la forte toxicité sur souris, ni les symptômes neurologiques. Les résultats des tests souris PSP sont négatifs. La présence d'une substance neurotoxique indéterminée est soupçonnée, mais les investigations ne peuvent être poursuivies faute de matériel contaminé. Toutefois, les analyses effectuées montrent que cette substance n'a pas les mêmes caractéristiques que celles détectées sur les autres sites la même année (*)
039 Douarnenez	mai 1999	donaces	TS très courts							oui	Pas d'explication
041 Glénan	mars et juin 2000	palourdes roses	TS très courts						PSP <40 ASP <0.15	en partie	Pas d'explication (analyse chimique : néant)
045 Lorient Groix	mai 2000	moules	TS très courts							oui	Pas d'explication
	avril 2001	moules	TS très courts							oui	
	juin 2006	moules	Yasumoto 84 TS "normaux " (>30 min)	atypiques (neuro.)		1705		47			
046 et 047 Etel	juin 2006	donaces	Yasumoto 84 TS "normaux " (>30 min)	atypiques (neuro.)		2554		28			Les fortes concentrations en AO, associées aux spirulides, pourraient peut être expliquer les symptômes neurologiques (effet de synergie?)
		moules	Yasumoto 84 TS "normaux " (>30 min)	atypiques (neuro.)		1333		27			
		huîtres	Yasumoto 84 TS "normaux " (>30 min)	atypiques (neuro.)		106		33			Pas d'explication

Bassin	Période	Coquillage	Bio-essais souris TS = temps de survie		DSP max	AO+DTXs max	PTXs max	SPXs max	Autres toxines	Fermeture	Commentaires
053 Rivière d'Auray et 054 Golfe Morbihan	juin et juillet 1994	moules	TS très courts							en partie	Les tests souris spécifiques DSP (extraction dichlorométhane) sont négatifs. Les tests souris PSP sont négatifs, mais un résultat est très légèrement supérieur au seuil de détection. Les investigations ne peuvent être poursuivies faute de matériel contaminé.(*)
		huîtres	TS très courts								
053 Rivière d'Auray	juin 2001	moules	TS très courts							oui	Les traces d'AO trouvées en analyse chimique ne peuvent expliquer les temps de survie courts
055 Plateau Recherche	septembre 2006	coquilles St Jacques	TS très courts	atypiques (neuro.)		136			ASP 10		Pas d'explication
057 Vilaine	mai et juillet 1999	moules	TS très courts							oui	Pas d'explication
	juin 2004	huîtres	Yasumoto 84 TS très courts		50						Pas d'explication, les quantités d'AO n'expliquent pas les temps de survie courts : artefact labo?
	juillet 2005	moules	Yasumoto 84 TS très courts		80						
	juin 2006	moules	Yasumoto 84 TS très courts	atypiques (neuro.)		812		28			Les fortes concentrations en AO, associées aux spirolides, pourraient peut être expliquer les symptômes neurologiques (effet de synergie?)
059 Croisic	octobre 2002	huîtres	Yasumoto 84 TS très courts							oui	Pas d'explication
	mai et octobre 2004	moules	Yasumoto 84 TS très courts		10						Pas d'explication, les quantités d'AO n'expliquent pas les temps de survie courts : artefact labo?
		huîtres	Yasumoto 84 TS très courts		109						
	juillet 2005	moules	Yasumoto 84 TS très courts		105						
	mai et juin 2006	moules	Yasumoto 84 TS très courts	atypiques (neuro.)		254		11			
060 Loire	juin et juillet 2006	moules	Yasumoto 84 TS "normaux " (>30 min)	atypiques (neuro.)		406		49	ASP <1		Les fortes concentrations en AO, associées aux spirolides, pourraient peut être expliquer les symptômes neurologiques (effet de synergie?)

Bassin	Période	Coquillage	Bio-essais souris TS = temps de survie	DSP max	AO+DTXs max	PTXs max	SPXs max	Autres toxines	Fermeture	Commentaires	
062 Vendée nord et 063 Olonne	novembre 1992	moules	TS très courts					PSP <40	oui	Les premières analyses effectuées sur les coquillages du Pertuis breton montrent une absence de toxines DSP, et la présence de toxines PSP en faible quantité. L'épisode s'est ensuite étendu aux bassins voisins (062, 063, 068, 070), avec présence de toxines PSP en faible quantité. En février 1993, deux tests PSP donnent des résultats positifs. Les temps de survie très courts sont donc expliqués (interférence tests DSP et PSP)(*)	
	décembre 1992 et janvier 1993	moules						PSP 59	en partie		
065 Pertuis Breton	novembre et décembre 1992	moules	TS très courts					PSP <36	oui		
068 Chatelaillon et 070 Nord Marennes Oléron	novembre et décembre 1992	moules	TS très courts					PSP <36	oui		
070 Nord Marennes Oléron	février 1993	huîtres						PSP 119	oui		
071 Sud Marennes Oléron	mai 2004	huîtres	Yasumoto 84 TS très courts	0				PSP <34			Pas d'explication
076 Côte océane	décembre 1992, janvier et février 1993	moules						PSP 58	en partie		L'analyse de coquillages prélevés dans le bassin d'Arcachon en janvier 1994, montre que la présence de traces de toxines PSP explique à elle seule la toxicité observée sur souris : l'extraction acétone à partir des glandes digestives des coquillages concentre en effet de façon extrêmement importante les toxines PSP, mais ce test n'est pas valide pour les quantifier. L'origine de ces traces de toxines PSP n'est pas connue à ce jour (phytoplancton toxique non détecté). Le phénomène s'est également produit dans les bassins voisins (076, 078 et 079) avant et après cet épisode. (*)
	janvier 1994	moules	TS très courts						non		
077 Bassin d'Arcachon	décembre 1992, janvier et février 1993	moules						PSP 95	en partie		
	janvier et février 1994	moules	TS très courts					PSP <36	oui		
		huîtres	TS très courts								
078 Côte landaise	janvier 1994	moules	TS très courts						non		
079 Côte basque	décembre 1994 et janvier 1995	moules	TS très courts					PSP <36	non		
077 Bassin d'Arcachon	décembre 2002	moules	Yasumoto 84 TS très courts					PSP 86	oui	Problème d'extraction? (interférence avec PSP?)	

Bassin	Période	Coquillage	Bio-essais souris TS = temps de survie	DSP max	AO+DTXs max	PTXs max	SPXs max	Autres toxines	Fermeture	Commentaires
	janvier 2003	moules	Yasumoto 84 TS très courts					PSP 85	oui	
083 Salses Leucate	mai et juin 1994	moules	TS très courts						oui	Les analyses effectuées montrent une absence de toxines DSP de 1993 à 1995, des traces de toxines PSP en 1993 et une absence de toxines PSP en 1994 et 1995. La substance toxique en cause est donc une neurotoxine indéterminée. (*)
	mai et juin 1995	moules	TS très courts						non	
	février 1999	moules	TS très courts					PSP 44	oui	
	mai et juin 1999	moules	TS très courts					PSP <40	oui	
	octobre à décembre 1999	moules	TS très courts					PSP <40	oui	
	janvier et mars 2000	moules	TS très courts					PSP <40	non	
087 Etang de Thau	novembre 1998	moules	TS très courts					PSP 855	oui	Les concentrations en toxines PSP expliquent à elles seules les temps de survie très courts : interférences entre tests DSP et PSP
		huîtres	TS très courts					PSP 47		
	août 1999	moules	TS très courts					PSP 41	non	Pas d'explication (interférence avec PSP?)
088 Côte languedocienne	mars 1999	moules	TS très courts					PSP <40	non	Pas d'explication
091 Etangs Camargue ouest	juin 2001	moules	TS très courts					PSP <35	non	Pas d'explication
100 Rade Toulon	mars 1993	moules						PSP 50	oui	Les analyses effectuées durant l'hiver 1993 – 1994 montrent une absence de toxines DSP, et la présence de toxines PSP, soit à l'état de traces, soit en faible quantité (en particulier pendant un épisode antérieur en mars et avril 1993). Mais la toxicité de la chair des coquillages,

Bassin	Période	Coquillage	Bio-essais souris TS = temps de survie		DSP max	AO+DTXs max	PTXs max	SPXs max	Autres toxines	Fermeture	Commentaires
	avril et mai 1993	moules	TS très courts						PSP 63	oui	alors que dans les autres cas seule la glande digestive était toxique, laisse à penser qu'une autre substance neurotoxique indéterminée est également présente. L'intoxication par voie orale de souris montre que cette substance est toxique au niveau du système nerveux central et capable de passer la barrière intestinale. Le principe actif est thermostable et stable dans le temps.(*)
	novembre et décembre 1993	moules	TS très courts							oui	
	janvier à mai 1994	moules	TS très courts						PSP 48	oui	
	décembre 1999	moules	TS très courts						PSP <40	non	Même phénomène?
	février et mars 2000	moules	TS très courts						PSP <40	oui	
114 Diana Urbino	mars 2005	huîtres	Yasumoto 84 TS très courts		0				ASP <0.15		Pas d'explication, l'absence d'AO en analyse chimique n'explique pas les temps de survie courts : artefact labo?

Annexe 3

Historique des méthodes associées aux bio-essai sur souris pour les phycotoxines lipophiles effectués à l'Ifremer depuis la création du Rephy (1984)

En 1983 et 1984

Le seuil semble avoir été variable. Les informations sont extraites du rapport :

Berthomé J.P. & Lassus P., 1985. – Manifestation et suivi de l'algue toxique *Dinophysis acuminata* sur les côtes françaises, en 1984. – Rapport interne IFREMER / DRV-85.01-SR-NTES : 28 p.

« ...le seuil de 48 heures, délai au bout duquel on donnait le résultat du test a semblé dès lors irréaliste. Nous avons donc limité le temps d'observation des souris à 24 heures et estimé qu'au bout de 4 heures nous pourrions donner un avis.... Les derniers résultats obtenus semblent démontrer que le délai à retenir serait 5 heures... »

De 1985 à 1992

Extraction acétone

Seuil 5 heures

1^{ère} référence disponible : note Berthomé & Belin (322/89) du 21 mars 1989

1992

Introduction d'une extraction méthanol suivie d'un lavage à l'hexane, pour éliminer les acides gras pouvant donner des faux positifs :

- extraction acétone
- reprise dans le méthanol - eau
- lavage hexane

Seuil 5 heures

Référence : CR réunion REPHY 1992

1994

Introduction d'un partage dichlorométhane / méthanol - eau, qui permet de récupérer les toxines diarrhéiques dans le dichlorométhane, et éliminer les toxines dites « atypiques » dans le méthanol :

- extraction acétone
- reprise dans le méthanol -eau
- lavage hexane
- partage dichlorométhane / méthanol -eau

Seuil 5 heures

Référence : CR réunion REPHY 1994

1996

- l'extraction acétone est remplacée par une extraction méthanol - eau
- puis hexane
- puis dichlorométhane

Seuil 5 heures

Référence :

Belin C., Marcaillou-Le Baut C., Amzil Z. & Le Doux M., 1996. REPHY (Réseau de Surveillance du Phytoplancton et des Phycotoxines). Méthodes de détection des phycotoxines diarrhéiques (DSP) et paralysantes (PSP). Méthodes biologiques sur souris. Rapport interne IFREMER / DEL / 96.17 / Nantes : 28 p.

1998

Première analyse des données pour évaluer les conséquences d'un changement de seuil de 5 à 24 heures. Examen du problème test-souris DSP en CSTS → recommandations : s'en tenir au test décrit en 1996

Référence : CR des journées REPHY 1998

1999

Protocole expérimental pour comparer les procédures acétone et dichlorométhane / méthanol –eau.
Suppression du lavage à l'hexane (une partie des DTX3 seraient retenues dans la phase hexane)

Références :

Amzil Z., 1999. Procédure analytique pour déterminer à la fois la toxicité globale des coquillages sur souris et le type de toxines impliquées. Protocole expérimental 1999. Rapport RST.DEL/99 04/Nantes, 10 p.

Amzil Z. & Belin C., 2000. Bilan du protocole expérimental Ifremer sur le dépistage des toxines diarrhéiques. Document de travail. Rapport DEL/MP/RST/00/10/Nantes, 89 pages.

Amzil Z., 2001. Addendum au rapport DEL/MP/RST/00/10/Nantes : synthèse et interprétation des résultats des tests-souris et analyses physico-chimiques. 6 pages.

2000

- extraction méthanol / eau
- partage dichlorométhane / méthanol -eau

2001

Même protocole qu'en 2000

2002

Méthode Yasumoto 1984 modifiée :

- extraction acétone
- partage dichlorométhane / eau

Références : Amzil Z., 2001. Toxines diarrhéiques (DSP) et associées. Guide et Manuel. Document de prescription REPHY. 21 pages.

Changement de seuil : 24 H au lieu de 5 H

2003 - 2006

Méthode Yasumoto 1984 modifiée

Références : Guides et Manuels 2003 (complément aux Manuels 2001), puis 2004, et 2006.